

ALMA MATER STUDIORUM

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in Biologia Marina

**Effetti dei leachates da bioplastiche su parametri
fisiologici del mitilo mediterraneo
(*Mytilus galloprovincialis*)**

Tesi di laurea in

Adattamenti degli animali all'ambiente marino

Relatore

Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da

Tanya Alessandro

Correlatore

Dott. Marco Capolupo

Sessione II

Anno Accademico 2020/2021

*“Even if you’ve never seen the ocean or touched the ocean,
know that the ocean touches you with every breath you take
and every drop of water you drink.
The world is basically a blue planet.”
(Sylvia Earle)*

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Una grave emergenza ambientale: il “marine litter”	1
1.1.1 Composizione del marine litter.....	2
1.1.2 Distribuzione e abbondanza del marine litter	4
1.2 Un rifiuto particolare: la plastica.....	7
1.2.1 Produzione e consumo di plastica nel mondo	9
1.2.2 Processo di degradazione e frammentazione della plastica.....	11
1.3 L’alternativa verde all’oro nero: le bioplastiche	14
1.3.1 Processo di biodegradazione delle bioplastiche	19
1.3.2 Norme e certificazioni delle plastiche biodegradabili e compostabili	20
1.3.3 Acido polilattico (PLA)	22
1.3.4 Polietilene tereftalato a base biologica (Bio-PET).....	23
1.3.5 Biopolimeri a base di amido (Starch-blend biopolymers).....	25
1.4 Una minaccia nascosta: i leachate da bioplastica	28
1.4.1 Concentrazione e rilascio di sostanze inquinanti.....	28
1.4.2 Che cosa s’intende per “leachate”?.....	31
1.4.3 Effetti dei leachate da plastica sugli organismi acquatici.....	32
1.5 Il mitilo mediterraneo come organismo modello	33
1.5.1 Caratteri distintivi e anatomia di <i>Mytilus galloprovincialis</i>	33
1.5.2 Distribuzione e habitat di <i>Mytilus galloprovincialis</i>	37
1.5.3 Il mitilo come organismo sentinella.....	37
1.6 I biomarker.....	38
1.6.1 Biomarker di alterazione lisosomiale.....	41
1.6.2 Biomarker immunologici	42
1.6.3 Biomarker di stress ossidativo e neurotossicità.....	43
2. SCOPO DELLA RICERCA	45
3. MATERIALI E METODI	47
3.1 Preparazione dei bio-leachate	47
3.2 Analisi chimiche dei bio-leachate	47

3.3	Esposizione dei mitili al trattamento con bio-leachate	48
3.4	Stabilità delle membrane lisosomiali.....	50
3.5	Analisi istocitochimiche	51
3.5.1	Contenuto di lipidi neutri	51
3.5.2	Accumulo di lipofuscine	51
3.5.3	Rapporto lisosomi/citoplasma	52
3.5.4	Analisi d'immagine dei vetrini	52
3.6	Biomarker immunologici.....	53
3.6.1	Analisi dell'attività del lisozima	53
3.7	Biomarker di stress ossidativo e neurotossicità.....	53
3.7.1	Preparazione dei campioni	53
3.7.2	Determinazione dell'attività specifica di CAT	54
3.7.3	Determinazione dell'attività specifica di GST	55
3.7.4	Determinazione del contenuto di malondialdeide (MDA)	56
3.7.5	Determinazione dell'attività specifica di AChE	56
3.8	Analisi statistica e integrazione dei dati	57
4.	RISULTATI.....	58
4.1	Composizione chimica dei bio-leachate	58
4.1.1	Analisi in GC-MS per il contenuto di sostanze organiche nei bio-leachate.....	58
4.1.2	Analisi in ICP/MS per il contenuto di metalli nei bio-leachate.....	59
4.2	Risposte di alterazione lisosomiale	60
4.2.1	Stabilità delle membrane lisosomiali (LMS).....	60
4.2.2	Accumulo di lipidi neutri	61
4.2.3	Rapporto lisosomi/citoplasma	62
4.3	Risposte immunologiche	63
4.3.1	Determinazione dell'attività del lisozima	63
4.4	Risposte antiossidanti, detossificanti e neurotossiche	64
4.4.1	Determinazione dell'attività specifica di CAT nelle ghiandole digestive e nelle branchie di mitilo.....	64
4.4.2	Determinazione dell'attività specifica di GST nelle ghiandole digestive e nelle branchie di mitilo.....	65

4.4.3 Determinazione del contenuto di malondialdeide (MDA)	66
4.4.4 Accumulo di lipofuscine	67
4.4.5 Determinazione dell'attività specifica di AChE	68
4.5 Integrazione dei dati tramite MES.....	69
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	71
6. BIBLIOGRAFIA	82
7. RINGRAZIAMENTI.....	103

ABSTRACT

Grazie alle caratteristiche di biodegradabilità e riduzione dell'impronta di carbonio associata alla loro produzione, le bioplastiche vengono al giorno d'oggi proposte come una valida alternativa ai materiali plastici d'origine fossile. Va, tuttavia, ricordato che, così come le materie plastiche, anche le bioplastiche liscivate in ambiente marino sono associate ad una complessa miscela di sostanze chimiche, come sottoprodotti di degradazione o metaboliti, inquinanti organici persistenti (POPs), metalli o additivi, alcuni dei quali, denominati "leachate", sono stati riconosciuti come contaminanti emergenti, in quanto non sottoposti alle regolamentazioni necessarie a limitarne gli impatti potenzialmente deleteri su flora e fauna marina. Lo scopo del presente studio consiste nel valutare i potenziali effetti avversi registrati su esemplari adulti di mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) esposti per una durata complessiva di 7 giorni ad una concentrazione pari a 6 ml/L di leachate derivanti da 3 tipologie di bioplastiche, quali acido polilattico (PLA), Bio-PET (BPT) e un biopolimero a base di amido (Starch-blend SB), comparati con leachate derivanti dalla convenzionale gomma per pneumatici (Tire Rubber TR). Possibili effetti subletali dei bio-leachate sono stati valutati in tessuti di ghiandola digestiva e branchie utilizzando una batteria di 9 biomarker, selezionati come indicatori di alterazione lisosomiale, di stress ossidativo e neurotossicità, mentre la capacità di risposta del sistema immunitario dei mitili è stata misurata, esaminando gli emociti, tramite l'analisi dell'attività del lisozima. L'esposizione ai leachate ha alterato parametri di stress generale, inclusi il contenuto di lipidi neutri (tutti i leachate), la stabilità delle membrane lisosomiali (SB, TR) e il rapporto lisosomi/citoplasma (PLA, SB, TR). Un incremento della percentuale di lipofuscine, unitamente ad un'inibizione dell'attività del lisozima, è stato stato, inoltre, riscontrato nei mitili esposti ai leachate da SB e TR. Nessuna risposta neurotossica sui mitili trattati è stata evidenziata nel presente lavoro, mentre le risposte antiossidanti e detossificanti registrate non seguono un trend univoco. Ulteriori analisi riguardanti la composizione chimica di ciascun bio-leachate hanno permesso di correlare gli eventuali effetti osservati allo specifico composto, metallo e/o additivo in esso contenuto. I dati ottenuti sono, infine, stati integrati mediante il Mussel Expert System (MES), che classifica lo stato di salute degli organismi in base alle risposte dei biomarker. Il MES ha assegnato un HSI di buono stato di salute ai mitili esposti ai leachate da PLA e SB ed un HSI di stress moderato ai mitili esposti ai trattamenti con SB e TR. Lo studio dimostra come gli additivi lisciviati dai biopolimeri di plastica o gomma selezionati siano in grado di alterare la fitness fisiologica dei mitili, esercitando su di essi effetti, la cui entità può essere maggiore nel caso dei leachate da SB e TR a causa di un maggiore contenuto di additivi, composti organici e metalli.

CAPITOLO 1

1. INTRODUZIONE

1.1 UNA GRAVE EMERGENZA AMBIENTALE: IL “MARINE LITTER”

Sebbene il benessere umano sia strettamente legato al mare e alle sue risorse naturali, l'umanità ha sostanzialmente modificato l'aspetto dell'oceano nel giro di pochi secoli. Pesca, inquinamento, eutrofizzazione, esplorazione d'idrocarburi in acque profonde, acidificazione e riscaldamento globale degli oceani, accompagnati dall'innalzamento del livello del mare conseguente alla rapida fusione dei ghiacciai e all'espansione termica dell'acqua di mare (IPCC 2014), costituiscono esempi emblematici delle pressioni esercitate dall'uomo sugli oceani, le quali hanno generato ripercussioni ecologiche e socio-economiche piuttosto gravi. Tra le varie forme di inquinamento prodotte, basti pensare all'uso crescente di prodotti monouso, lo smaltimento incontrollato dei rifiuti, insieme a cattive pratiche di gestione e riciclaggio, che rappresentano, ad oggi, il movente principale dell'accumulo di rifiuti di natura antropogenica in mare, i cui impatti sul biota si rivelano, spesse volte, potenzialmente deleteri (Werner et al., 2016). Una delle tematiche ambientali che attualmente desta maggiore preoccupazione è quella riguardante la presenza di plastica in ambiente marino, la quale si colloca a tutti gli effetti tra gli inquinanti antropogenici più diffusi nelle acque a livello mondiale (Dunlap e Scarce, 1991; Mato et al., 2001; Gregory, 2009; Thompson et al., 2009; Rochman et al., 2013). Il massiccio utilizzo di plastica nel mondo trova conferma nella formazione di ampie aree di rifiuti galleggianti, denominate “isole di plastica”, le quali non si configurano come nuove terre emerse, bensì come veri e propri conglomerati di rifiuti di natura plastica che si accumulano, rimanendo intrappolati in vortici acquatici anche per diversi anni. L'esempio più eclatante di vortice di plastica è stato individuato nell'Oceano Pacifico del Nord, dove si trova la “Great Pacific Garbage Patch”, meglio conosciuta come “Pacific trash vortex”, la quale, alimentata da circa una tonnellata di rifiuti al giorno, raggiunge dimensioni allarmanti che oscillano tra 700.000 km² e 10 milioni di km², ragion per cui si presume possa ben presto diventare visibile persino dallo spazio (Lee et al., 2021). È stato stimato che il 99% dei rifiuti marini che la costituiscono siano materiali plastici, con circa 1,8 trilioni di pezzi di plastica di varia misura, per un peso complessivo di 79.000 tonnellate (Lebreton et al., 2018). Il galleggiamento delle particelle plastiche, che assumono un comportamento idrostatico simile a quello del plancton, ne induce spesso l'ingestione da parte degli animali planctofagi, causando in questo modo

l'introduzione di plastica nella catena alimentare. In alcuni campioni di acqua marina prelevati nel 2001, il rapporto tra la quantità di plastica e quella dello zooplancton, la vita animale dominante in quest'area, era superiore a sei parti di plastica per ogni parte di zooplancton (Lebreton et al., 2018). Pertanto, in quanto grave emergenza ambientale globale, il cosiddetto "marine litter" rappresenta una delle categorie incorporate nella Convenzione di Washington del 1995 relativa ad un programma d'azione globale (GPA) per la protezione dell'ambiente marino da fonti di derivazione terrestre (UNEP 1995). In particolare, il Programma delle Nazioni Unite per l'ambiente (UNEP) ha definito "Marine Litter" o "Marine Debris" qualsiasi materiale solido scartato, fabbricato o trasformato, smaltito o abbandonato in ambiente marino o costiero. Quest'ultimo consta di oggetti che sono stati prodotti o utilizzati da persone e volutamente scartati nei fiumi, in mare, sulle spiagge o portati indirettamente al mare attraverso fiumi, acque reflue, acqua piovana o tramite l'azione dei venti, oppure ancora accidentalmente persi, compreso il materiale disperso in mare in caso di maltempo (UNEP, 2009). Ulteriori attività contrastanti l'insorgenza di tale problematica sono state, poi, intraprese da parte dell'Unione Europea mediante la Direttiva Quadro 2008/56/CE sulla strategia per l'ambiente marino (Marine Strategy Framework Directive - MSFD), entrata in vigore nel 2008, recepita in Italia con il D. Lgs. n. 190/2010 e concepita come primo contesto normativo vincolante per gli Stati Membri, il cui obiettivo si identifica nel raggiungimento o il mantenimento del buono stato ambientale ("Good Environmental Status" - GES) delle acque marine entro il 2020. Per consentire agli Stati membri di preservare la diversità ecologica e l'utilizzo dell'ambiente marino ad un livello sostenibile tramite un approccio integrato, la direttiva ha sviluppato 11 descrittori qualitativi sulla base dei quali vengono effettuate le valutazioni previste, tra cui al decimo posto figurano le proprietà e la quantità di rifiuti marini, che, di fatto, sono stati riconosciuti come una delle principali cause di inquinamento di origine marina. La definizione di un livello accettabile di questo descrittore, dunque di uno stato ambientale definibile buono, deve prendere in considerazione la stima dei quantitativi di litter nei diversi comparti dell'ambiente marino (fondali, superficie del mare, colonna d'acqua, linea di costa), nonché gli effetti su organismi marini e i problemi legati alla degradazione, così come gli aspetti sociali ed economici ad esso correlati (Galgani et al., 2013).

1.1.1 Composizione del marine litter

Il "marine litter" è ubiquitario in tutti i mari e gli oceani del mondo, non solo nelle regioni densamente popolate, ma anche in aree remote, lontano da fonti evidenti e dal contatto umano

(Ryan, 2015). I detriti marini comprendono una vasta gamma di manufatti antropici, tra cui troviamo sacchetti e bottiglie di plastica, palloni, boe, corde, materiale medico sanitario, bottiglie di vetro, accendini, sigarette, lattine, polistirolo, lenze e reti da pesca ed, infine, vari rifiuti provenienti dalle navi (Alessi et al., 2018).

L'analisi della composizione dei rifiuti marini è funzionale a fornire informazioni utili sui rifiuti individuali e sulle relative fonti di ingresso. Difatti, per monitorare la posizione dei rifiuti di plastica, risulta di fondamentale importanza comprendere i legami dinamici tra i sources e i sinks dei rifiuti stessi, vale a dire tra le fonti di ingresso e gli elementi naturali che ne influenzano la distribuzione e l'accumulo, dal momento che la combinazione di più punti d'ingresso diffusi e il trasporto non casuale dei detriti dai venti o dalle correnti si traduce in una grande variabilità spaziale e temporale dei carichi depositati (Galgani et al., 2015; UNEP, 2016). A tal proposito, il modello di Ryan (Figura 1.1) mostra le principali sorgenti e i percorsi che la plastica effettua nell'ambiente marino. E' noto, infatti, che i detriti vengono portati a riva sulle spiagge o si spingono nelle acque costiere, per poi giungere in mare aperto, dove possono galleggiare o affondare in profondità.

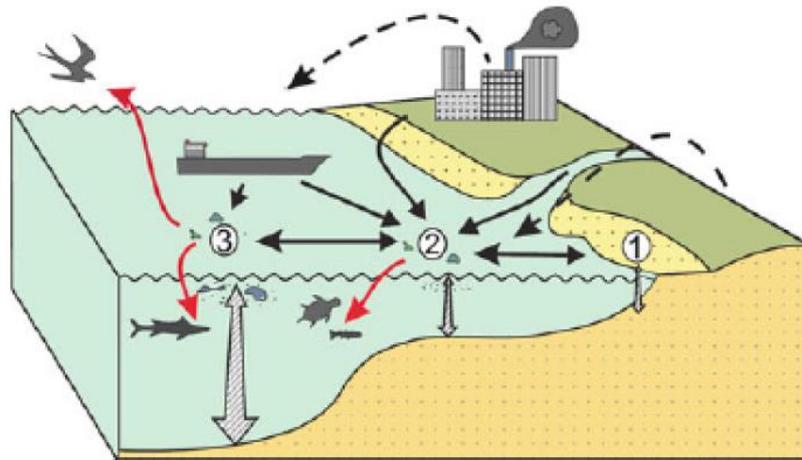


Figura 1.1: Rappresentazione schematica che mostra i percorsi della plastica nell'ambiente marino: (1) detriti portati a riva sulle spiagge, (2) rifiuti nelle acque costiere, (3) rifiuti in mare aperto, che possono anche affondare in profondità. Le frecce tratteggiate indicano i detriti trasportati dal vento, le frecce nere indicano quelli trasportati attraverso l'acqua, le frecce rosse gli effetti sulla vita marina, mentre le frecce grigie indicano il movimento verticale lungo la colonna d'acqua (Ryan et al., 2009).

La maggior parte dei rifiuti marini consta di materiale che degrada lentamente, se non del tutto, per cui un ingresso continuo di grandi quantità di tali materiali produce un inevitabile e progressivo loro accumulo nell'ambiente marino e costiero. A seconda del luogo di origine, essi vengono, poi, classificati in fonti di origine terrestre o fonti di origine marina (Galgani et al., 2015). Ad oggi, è noto che l'80% dei rifiuti marini globali è di provenienza terrestre (Jambeck

et al., 2015), in particolare una delle principali fonti di rifiuti terrestri risulta essere la costa, che, grazie al turismo, viene largamente sfruttata a scopo ricreativo (Lee et al., 2013).

Ulteriori punti d'ingresso dei rifiuti nel sistema marino sono associati alla presenza di discariche comunali situate lungo la costa o nell'entroterra, il trasporto fluviale dei rifiuti dalle discariche, lo scarico di acque reflue non trattate, la presenza di impianti industriali con il rilascio di rifiuti solidi o la loro perdita accidentale ed, infine, l'intervento di eventi climatici estremi (Galgani et al., 2015), come tsunami (Prasetya et al., 2012) o tempeste tropicali (Doong et al., 2011). Solo il 20% dei rifiuti in generale, invece, deriva da fonti di origine marina (Jambeck et al., 2015); più nel dettaglio, essi provengono per la maggior parte dal traffico marittimo di traghetti, navi da crociera e commerciali, pescherecci, flotte militari e di ricerca, imbarcazioni da diporto e installazioni offshore, quali le piattaforme e gli impianti di acquacoltura (Galgani et al., 2015). Tra i rifiuti solidi prodotti da una nave si annoverano vetro, carta, cartone, plastica e lattine di alluminio e metallo. Circa il 75% dei rifiuti viene, inoltre, trattata a bordo tramite riciclaggio o incenerita e ridotta in polvere per la successiva dispersione in mare: ciò si verifica, tuttavia, nel momento in cui i rifiuti devono obbligatoriamente essere scaricati, come nel caso dell'alluminio e del vetro, i quali non possono essere inceneriti (Donahue, 1996). Al fine di prevenire i rischi associati all'inquinamento prodotto dal transito delle navi, l'Organizzazione Marittima Internazionale (IMO) ha stipulato una Convenzione internazionale per la prevenzione dell'inquinamento causato da navi (MARPOL 73/78), il cui allegato V, entrato in vigore nel 31 dicembre 1988 e concernente le differenti modalità mediante le quali è possibile smaltire le varie tipologie di rifiuti, si basa sul divieto assoluto di smaltimento di qualsivoglia forma di plastica in mare.

1.1.2 Distribuzione e abbondanza del marine litter

Ad oggi, il fatto che circa il 93% degli oltre 300 milioni di tonnellate di rifiuti di plastica prodotti ogni anno si riversa negli oceani costituisce un'evidenza scientifica (UNEP/MAP-PlanBleu, 2020). E' ormai noto, infatti, che le diverse attività umane producono notevoli quantità di detriti marini antropogenici (AMD), la cui tipologia, composizione, quantità globali e densità sono in continuo aumento, sebbene la produzione di rifiuti vari da paese a paese. Nel 2010, ad esempio, la quantità di rifiuti mal gestiti generati dalla popolazione costiera di un singolo paese variava da 1,1 a 8,8 milioni tonnellate all'anno. Inoltre, l'83% del totale dei rifiuti di natura plastica mal gestiti venivano prodotti da paesi come la Cina, Indonesia, Filippine, Vietnam e Sri Lanka (Figura 1.2) (Jambeck et al., 2015).

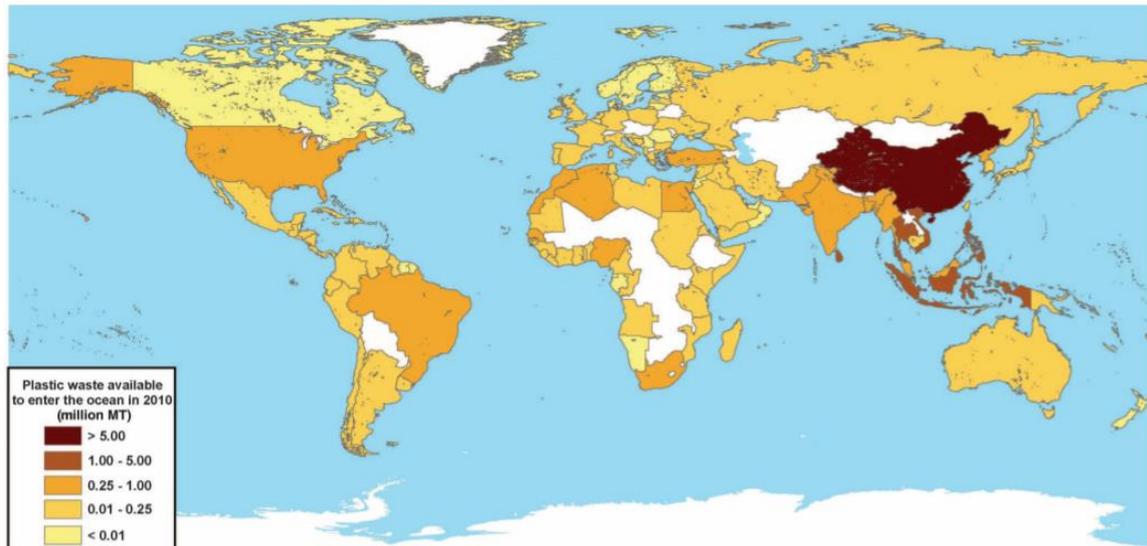


Figura 1.2: Mappa globale con ciascun paese ombreggiato a seconda della quantità stimata di rifiuti di plastica mal gestiti (in milioni di tonnellate MT) generati nel 2010 da popolazioni che vivono nel raggio di 50 km dalla costa. I paesi non inclusi nello studio sono ombreggiati di bianco (Jambeck et al., 2015).

Gli hotspot di accumulo, nonché le zone ad elevata concentrazione di rifiuti, sono presenti in tutti gli habitat marini, sebbene si distribuiscono prevalentemente sulle coste, vicino ad aree popolate, in particolare nelle spiagge (Corcoran et al., 2009), nelle acque superficiali pelagiche e nei substrati marini, così come anche nei canyon sottomarini, dove i rifiuti di provenienza terrestre si accumulano in grandi quantità e il processo di degradazione è molto più lento (Galgani et al., 2015; Mordecai et al., 2011; Barnes et al., 2009).

Inoltre, il tipo e la quantità dei rifiuti che si trovano in mare aperto o lungo le spiagge sono influenzati da diversi fattori, tra i quali si annoverano i modelli oceanici, il clima e le maree, la vicinanza alle aree urbane, industriali e ricreative, le rotte di navigazione e le zone di pesca (Galgani et al., 2015). In dipendenza della zona in cui si trovano, i detriti marini possono essere classificati in:

- **Detriti galleggianti:** si identificano in quei rifiuti o residui di rifiuti che, giunti al mare attraverso varie vie, permangono sulla superficie dell'acqua, la maggior parte dei quali è costituita da polimeri sintetici, il cui destino dipende dalle loro proprietà fisico-chimiche e dalle condizioni ambientali (Galgani et al., 2015). Essi possono essere presenti dappertutto, anche nelle zone più remote del pianeta come l'Oceano Artico (Bergmann e Klages, 2012) o quello Antartico (Do Sul et al., 2011). I dati esistenti sui rifiuti galleggianti mostrano una variabilità spaziale particolarmente elevata, soprattutto riguardo i rifiuti di plastica, confermando che vi è una certa facilità di spostamento tra i gyres oceanici, nonché sistemi di rotazione delle correnti oceaniche in grado di

tramutarsi in vortici di spazzatura sfruttando l'effetto Coriolis, e gli emisferi, che ne aumenta la diffusione in tutti i mari e gli oceani del mondo (Eriksen et al., 2014).

- **Detriti associati al fondale marino:** rappresentano quella porzione di rifiuti marini in grado di sprofondare sul fondo dei mari. Questo tipo di accumulo è molto meno indagato a causa delle difficoltà legate allo studio del fondale marino, tra cui figurano la difficoltà di campionamento, l'inaccessibilità e i costi elevati, che raramente consentono la ricerca in acque più profonde, motivo per cui gli studi si concentrano tipicamente su piattaforme continentali. Ciononostante, si stima che circa il 50% dei rifiuti marini di origine plastica affondino in mare (Galgani et al., 2015). La distribuzione geografica di detriti sul fondo dell'oceano è fortemente influenzata dall'idrodinamica, dalla geomorfologia e da fattori umani (Pham et al., 2014). La considerevole varietà di attività antropiche quali pesca, sviluppo urbano e turismo contribuiscono al modello di distribuzione dei rifiuti sul fondo del mare. Non sorprende, ad esempio, l'evidenza che i rifiuti provenienti dall'industria della pesca prevalgono in quelle zone dove la pesca risulta essere più intensiva (Schluning et al., 2013). Inoltre, la presenza di notevoli variazioni climatiche soprattutto stagionali, come il verificarsi di tifoni e cicloni, porta all'accumulo e alla concentrazione di rifiuti marini in particolari aree geografiche (Galgani et al., 2015). I trend risultano essere, tuttavia, di difficile interpretazione, in quanto l'invecchiamento dei materiali di rifiuto presenti in profondità risulta sconosciuto e si ritiene che l'accumulo di detriti sul substrato sia senza dubbio iniziato prima degli studi scientifici, che hanno preso avvio intorno al 1990 (Galgani et al., 2015). In generale, i rifiuti tendono a rimanere intrappolati in zone a bassa circolazione, dove i sedimenti sono soliti accumularsi in notevoli concentrazioni (Galgani et al., 1996; Schluning et al., 2013; Pham et al., 2014), il che si traduce nell'accumulo di rifiuti in baie, lagune e barriere coralline, piuttosto che in mare aperto. Anche le piattaforme continentali sono considerate come zone di accumulo di rifiuti marini (Lee et al., 2006), nonostante presentino minori concentrazioni rispetto ai canyon adiacenti, dove i detriti non vengono solitamente accumulati, bensì trasportati in mare aperto dalle correnti, associati ai venti provenienti da terra e dai flussi fluviali (Galgani et al., 2015).
- **Beach litter:** costituito da materiali quali bottiglie e sacchetti di plastica, alluminio, vetro e legno presenti lungo la riva delle spiagge, è attualmente divenuto motivo di preoccupazione permanente, in quanto la sua abbondanza risulta essere direttamente proporzionale al numero di turisti che affollano una determinata località balneare (Pham et al., 2014). E' stato, infatti, stimato che ogni turista produce circa 7,2 kg di rifiuti al

giorno, il che supera di gran lunga la quantità media di rifiuti generati dai locali che vivono nelle aree urbane (2,8 kg) e nelle aree rurali (1,0 kg) (UNEP, 2019). I rifiuti si accumulano nelle spiagge sia attraverso fonti dirette, quando vengono gettati direttamente in spiaggia, sia indirettamente, quando vengono portati dal mare. Tra questi ultimi, figurano soprattutto i rifiuti plastici, la cui galleggiabilità favorisce il loro viaggio sulla superficie degli oceani anche per lunghe distanze, finché non vengono in parte gettati sulla costa dalle correnti e dalle onde (Andrady, 2015).

Diversi sono i fattori naturali che interferiscono con la capacità di una spiaggia di trattenere i rifiuti o disperderli in mare, tra cui il regime onde-vento, l'orientamento e la geomorfologia di ciascuna spiaggia, ai quali si affiancano una serie di fattori antropici, come la vicinanza ai centri urbani, la densità di popolazione, i visitatori della spiaggia e il traffico marittimo, che svolgono un ruolo fondamentale nel determinare la composizione e l'abbondanza del beach litter (Critchell et al., 2015; Prevenios et al., 2018). Il Mediterraneo, per esempio, vede alti volumi di navigazione, è caratterizzato da un'elevata densità di popolazione costiera, un'industria turistica molto ben sviluppata e presenta scambi molto limitati con l'Atlantico. Per tutti questi fattori, non sorprendono gli alti livelli di materie plastiche galleggianti, costiere e dei fondali osservati (Eriksen et al., 2014; Galgani et al., 2015). La presenza visibile di rifiuti marini finisce per intaccare il valore estetico, nonché l'attrattiva di spiagge e coste, determinando in tal modo una riduzione nel numero di visitatori con il conseguente calo di investimenti legati al settore turistico che, a sua volta, si traduce inevitabilmente in un danneggiamento dell'economia locale e regionale (Tudor e Williams, 2003; Anfuso et al., 2017).

1.2 UN RIFIUTO PARTICOLARE: LA PLASTICA

E' ormai stato comprovato che, tra i rifiuti solidi maggiormente diffusi e impattanti per l'ambiente vi siano le materie plastiche; non a caso, il NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) ha definito la plastica come uno dei principali tipi di marine litter. Vi sono pochi dubbi riguardo il fatto che la plastica, grazie alla sua versatilità e capacità di innovazione, che ne permettono l'uso in innumerevoli campi, applicazioni e settori dell'industria e dell'economia, sia il materiale che più caratterizza la nostra società dei consumi almeno dagli anni Cinquanta del secolo passato, tanto da render noti questi anni come l'"età della plastica" (Thompson et al., 2009).

Il termine plastica deriva dal greco "*plastikos*", che significa "adatto ad essere modellato", il che si riferisce alla facilità del materiale nel prendere una forma durante la sua fabbricazione (Liddell et al., 1940). Le numerose caratteristiche eccezionali della plastica, tra cui leggerezza, robustezza, malleabilità e durata, unitamente ai costi di produzione relativamente bassi, hanno contribuito a rendere quest'ultima una risorsa fondamentale e, per svariati settori economici, quasi indispensabile (Geyer et al., 2017). Tra le tante applicazioni, le sue eccellenti proprietà di isolamento termico ed elettrico, di barriera all'ossigeno e all'umidità, la bio-inerzia ed il suo basso peso la rendono particolarmente idonea come materiale da imballaggio (Andrady, 2015). Più nel dettaglio, le materie plastiche sono polimeri organici sintetici, derivati dalla polimerizzazione di materie prime organiche ed inorganiche, come carbone, silicio, idrogeno, ossigeno e cloruro (Shah et al., 2008), estratti dal petrolio o da gas naturali (Derraik, 2002; Rios et al., 2007; Thompson et al., 2009). Esse, inoltre, possono essere classificate in diversi modi:

- a seconda del processo mediante il quale vengono sintetizzate;
- in base alla termoplasticità;
- in base alla biodegradabilità;
- in base alla conducibilità elettrica;
- in base alla densità;
- in base alla resistenza a vari prodotti chimici (Millet et al., 2019).

Tuttavia, due sono le principali famiglie nelle quali si dividono le materie plastiche (Figura 1.3) (PlasticsEurope, 2020):

- **Termoplastiche** (*thermoplastics*): costituiscono una grande famiglia di materie plastiche sintetiche che si sciolgono se riscaldate e, viceversa, si induriscono se raffreddate. Questi processi sono reversibili, pertanto si tratta di materiali meccanicamente riciclabili;
- **Polimeri termoindurenti** (*thermosets*): sono materiali sintetici che, se trattati, formano a livello molecolare reti tridimensionali che ne causano l'indurimento. Una volta riscaldati e trattati, le molecole non possono essere nuovamente fuse, pertanto il modellamento del materiale è irreversibile.

Tra le varie tipologie di plastiche, le più diffuse risultano essere: polietilene (PE, 29%), polipropilene (PP, 18%), polivinilcloruro (PVC, 15%), polietilentereftalato (PET, 20%), polistirene (PS, EPS, 7,8%) e nylon (PA, 1%).

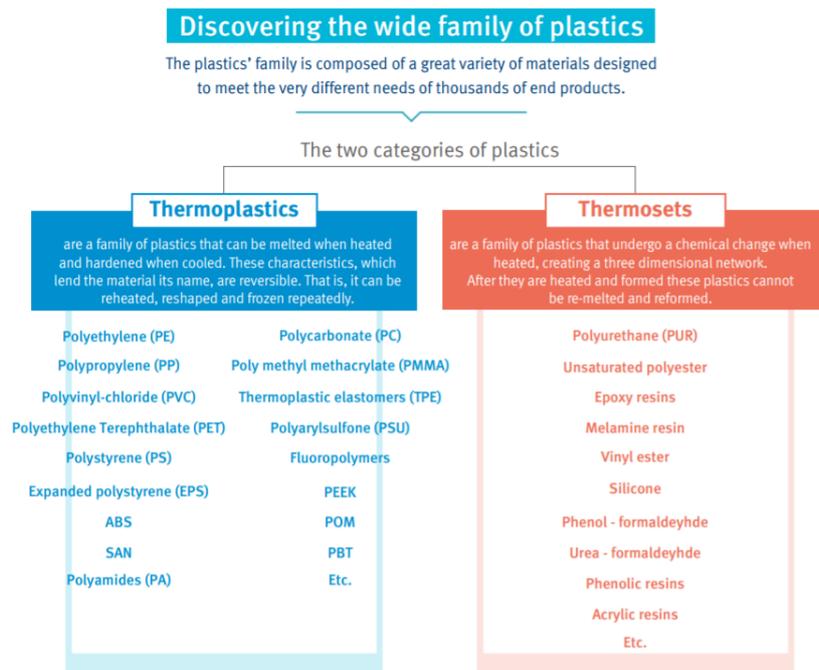


Figura 1.3: Illustrazione schematica delle due grandi famiglie in cui si dividono le materie plastiche, con esempi dei principali materiali associati a ciascuna delle due (PlasticsEurope 2020).

1.2.1 Produzione e consumo di plastica nel mondo

La produzione globale di materie plastiche è aumentata radicalmente dal 1950, anno del loro sviluppo commerciale, in poi, con una crescita media della produzione del 9% all'anno (UN Environment, 2020). Le stime più aggiornate riportano abbondanze pari a 368 milioni di tonnellate di plastica prodotte a livello mondiale nel 2019, di cui ben 61 milioni di tonnellate esclusivamente prodotte in Europa (PlasticsEurope, 2020). La maggior parte delle materie plastiche è prodotta in Nord America, Europa Occidentale e in Cina, paesi, questi, che ne rappresentano al contempo i principali consumatori. I settori in cui sono maggiormente utilizzate sono: imballaggi (39,6%), edilizia e costruzioni (20,4%) e trasporti (14%) (UN Environment, 2020). Normalmente, esiste una forte correlazione tra produzione di plastica e il suo consumo; se in Nord America e in Europa Occidentale l'elevata produzione è dovuta al crescente consumo di plastica pro-capite, in Cina consumo e produzione sono legati alla numerosità della popolazione, sebbene il consumo pro-capite sia comunque costantemente in aumento (Figura 1.4) (UN Environment, 2018). Il risultato palpabile oggi più che mai è l'inquinamento da plastica diffuso a livello planetario, una minaccia, questa, che colpisce tutti gli ecosistemi marini e di acqua dolce, finendo per esercitare effetti potenzialmente letali a danno delle differenti forme di biodiversità che abitano i sistemi acquatici (Còzar et al., 2015).

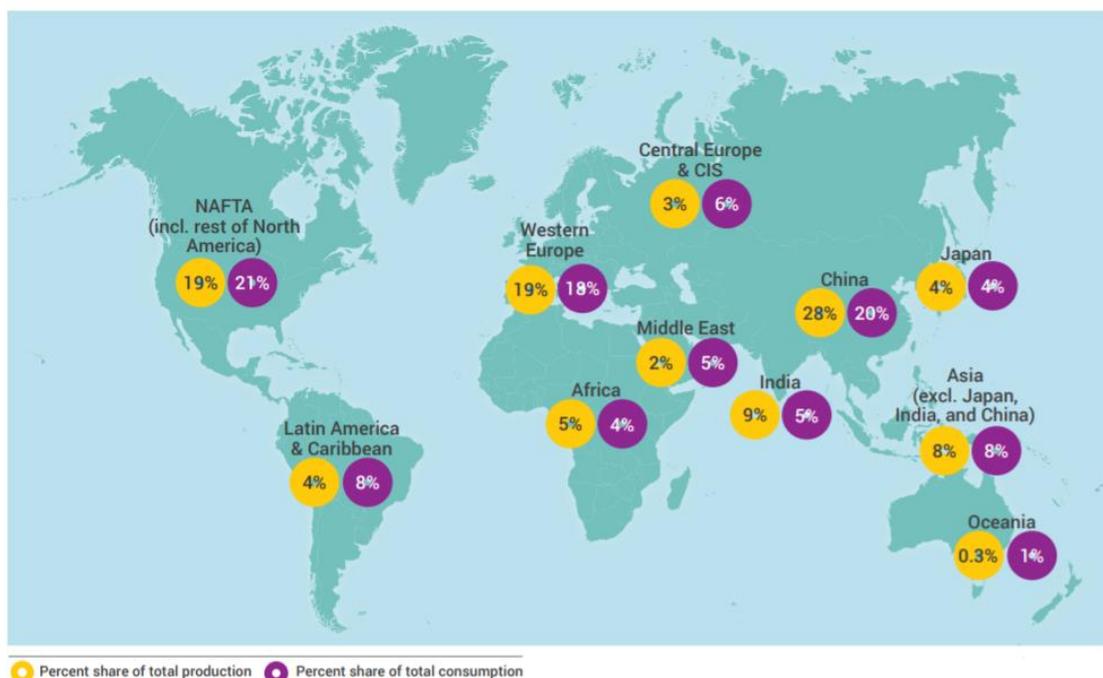


Figura 1.4: Mappa contenente i valori percentuali relativi alla produzione totale (in giallo) e il consumo totale (in viola) di materie plastiche nelle diverse aree del mondo (UN Environment, 2018).

Proiezioni future, basate sulle previsioni di crescita della popolazione mondiale e del PIL, affermano che entro il 2025, il mondo produrrà circa 230 milioni di tonnellate di rifiuti urbani di plastica mal gestiti all'anno, che aumenteranno a circa 300 milioni di tonnellate all'anno nel 2040 ed, infine, 380 milioni di tonnellate nel 2060 (Figura 1.5) (Lebreton e Andrady, 2019). Dati, questi, che dettano l'urgenza di serie politiche di prevenzione che coinvolgano istituzioni, cittadini, aziende e associazioni di categoria, partendo dal mondo della pesca a quello del turismo. Difatti, esattamente come per la produzione dei rifiuti solidi, la produzione e il consumo di plastica sono influenzati dalla crescita della popolazione e dal livello di reddito del paese, il che vuol dire che più un paese è ricco e possiede una grande popolazione, più sono alti produzione e consumo di plastica, come nel caso dei paesi a reddito medio-basso. Gli scenari futuri immaginati possono essere ridimensionati in vista di un ipotetico miglioramento del trattamento dei rifiuti o della promozione di un utilizzo più accorto delle materie plastiche, con particolare attenzione agli imballaggi e la plastica monouso (Lebreton e Andrady, 2019). A tal proposito, si fa spazio al giorno d'oggi un notevole interesse nel passaggio dall'uso di fonti fossili a quello di fonti biologiche e biodegradabili, allo scopo di realizzare bioplastiche che sostituiscano anche la plastica sintetica più usata, quale il polietilene.

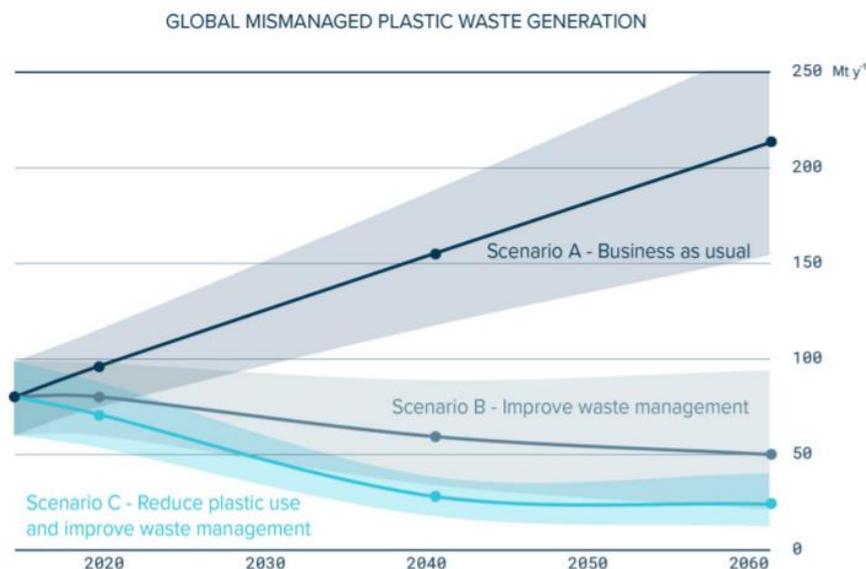


Figura 1.5: Proiezioni future riguardanti tre scenari diversi relativi alla produzione globale di rifiuti di plastica mal gestiti. Lo scenario A corrisponde al caso peggiore definito “business-as-usual”, in cui la domanda di plastica da parte dei consumatori aumenta esponenzialmente con l’economia. Lo scenario B considera che la gestione dei rifiuti plastici possa migliorare in vista di un incremento del PIL pro-capite. Lo scenario C riflette una riduzione dell’utilizzo di plastica pro-capite, unitamente al miglioramento della gestione dei rifiuti, prevedendo una frazione di plastica contenuta nei rifiuti solidi urbani pari al 5% entro il 2040 (Lebreton e Andrady, 2019).

1.2.2 Processo di degradazione e frammentazione della plastica

Una volta nell’ambiente, la plastica permane per molti anni, principale motivo per cui essa risulta, tuttora, identificata come un pericolo incombente per gli ecosistemi marini. Inoltre, il decadimento naturale degli oggetti di plastica nell’ambiente marino richiede tempistiche estremamente lunghe, generalmente stimate intorno alle centinaia e migliaia di anni (Barnes et al., 2009). Generalmente, le plastiche marine subiscono un processo di frammentazione in pezzi sempre più piccoli ad opera di processi fotochimici, meccanici e biologici (Davidson, 2012). Una volta riversate nell’ambiente acquatico, l’effetto combinato di esposizione a luce solare, acqua marina, stress micromeccanici ed altri fattori determina non solo la modifica chimica delle catene polimeriche, ma anche la progressiva scomposizione in frammenti sempre più piccoli fino a raggiungere dimensioni micro e nanometriche (Figura 1.6). Per tale motivo, convenzionalmente i rifiuti plastici vengono suddivisi in quattro classi dimensionali (Franzellitti et al., 2019; GESAMP, 2016):

- **Macroplastiche:** rifiuti marini di plastica di dimensioni superiori ai 20 mm di diametro;

- **Mesoplastiche:** rifiuti marini di plastica di dimensioni comprese tra 5-20 mm di diametro;
- **Microplastiche:** rifiuti marini di plastica di dimensioni inferiori ai 5 mm di diametro;
- **Nanoplastiche:** rifiuti marini di plastica di dimensioni comprese tra 0,001 a 0,1 μm .

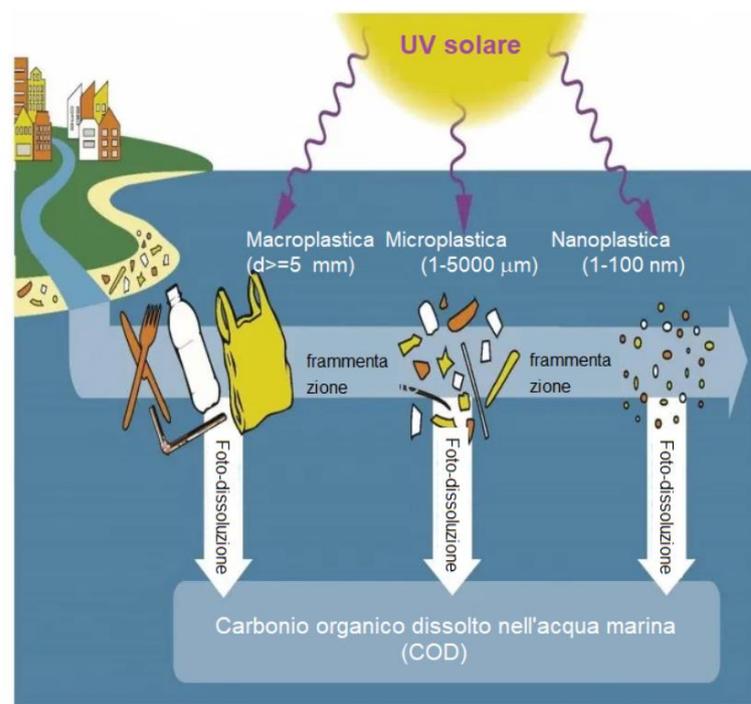


Figura 1.6: Illustrazione schematica della degradazione della plastica in mare ad opera di fattori abiotici in micro e nanoplastiche (Eriksen et al., 2014).

Il processo di degradazione viene definito come una trasformazione chimica atta a ridurre drasticamente il peso molecolare medio del polimero (Andrady, 2011), pertanto essa indebolisce inevitabilmente il materiale, dal momento la resistenza meccanica dei materiali plastici dipende sempre dal loro peso molecolare. Difatti, le plastiche degradate, a lungo andare, diventano abbastanza fragili e si sfaldano in frammenti polverosi. Questi ultimi, spesso non visibili ad occhio nudo, possono subire un'ulteriore degradazione del carbonio del polimero, che viene poi convertito in CO_2 e incorporato nella biomassa marina tramite un processo denominato “biodegradazione microbica” (Andrady, 2015).

In generale, la degradazione viene classificata in:

- **Biodegradazione:** svolta per azione degli organismi viventi, di solito microbi;
- **Fotodegradazione:** svolta per azione della luce del sole;

- **Degradazione termo-ossidativa:** consiste in una ripartizione ossidativa lenta a temperature moderate;
- **Degradazione termica:** svolta per azione delle temperature elevate;
- **Idrolisi:** consiste in una reazione con l'acqua.

La degradazione ossidativa indotta dalla luce è particolarmente efficace nei confronti della plastica galleggiante in superficie o quella presente sulle spiagge in ambiente marino (Cooper e Corcoran, 2010), dove la lenta ossidazione termica delle materie plastiche continua con la fotoossidazione. Le lunghezze d'onda solari UV-B ad alta energia (290-315 nm) e UV-A a media energia (315-400 nm) presentano elevata efficienza nel facilitare la fotodegradazione dei polimeri (Andrady et al., 1996), ragion per cui i tassi di degradazione sono marcatamente maggiori a temperature ambientali elevate. Ne deriva che le plastiche accumulate sulla sabbia calda subiscono una fotoossidazione più veloce rispetto a quelle che galleggiano sull'acqua, mantenute, invece, ad una temperatura inferiore. Lo stesso fenomeno è, inoltre, responsabile dei tassi di degradazione delle materie plastiche di colore diverso: le tonalità di materie plastiche più scure esposte al sole tendono ad assorbire più energia infrarossa nello spettro solare, raggiungendo temperature più alte (Andrady, 2015).

Tuttavia, vi sono una serie di fattori limitanti la disponibilità della luce solare, tra cui si annoverano eventi climatici e atmosferici, ma soprattutto la presenza di bioincrostazioni sulla superficie della plastica, la quale può essere soggetta alla rapida colonizzazione da parte di alghe e altri organismi marini, inclusi quelli incrostanti, che determinano, in questo modo, l'incremento della densità della plastica, facendola affondare in profondità (Muthukumar et al., 2011). Le particelle di plastica che affondano a causa di tale processo possono riemergere in un secondo momento, una volta che gli epibionti sono stati predati dai consumatori marini. Come dimostrato dalle depressioni superficiali e dai fori presenti sui detriti di plastica, tali microrganismi sono, talvolta, in grado di secernere enzimi coinvolti nella biodegradazione di materie plastiche comuni come il polietilene (Zettler et al., 2013). Le specie interessate, tuttavia, risultano essere rare, per cui la cinetica di biodegradazione in mare è particolarmente lenta, al punto tale da risultare inefficace nel processo di completa rimozione dei detriti di plastica dall'ambiente o nella significativa diminuzione dei loro livelli di concentrazione nel sistema marino (Andrady, 2015).

1.3 L'ALTERNATIVA VERDE ALL'ORO NERO: LE BIOPLASTICHE

Oltre ai materiali plastici di origine fossile, che sono i più inquinanti, esistono altri tipi di plastiche, derivanti da materiale biologico o biodegradabile, le quali spesso presentano le stesse caratteristiche delle materie plastiche, sebbene risultino meno inquinanti: le bioplastiche. Secondo la European Bioplastics, associazione che rappresenta la fiorente industria delle bioplastiche a livello europeo, un materiale plastico è definito “bioplastica” se è *bio-based*, biodegradabile, o se presenta entrambe le proprietà. Con il termine *bio-based* si intende che il materiale o prodotto è, anche parzialmente, derivato dall'utilizzo di biomassa, solitamente proveniente da mais, canna da zucchero o cellulosa. Con il termine biodegradazione si indica, invece, il processo chimico attraverso il quale i microorganismi presenti nell'ambiente convertono i materiali in sostanze naturali quali acqua, anidride carbonica e compost, senza la necessità di additivi artificiali. Il processo di biodegradazione dipende dalle condizioni ambientali, come umidità e temperatura, dal materiale e dall'applicazione, mentre la proprietà della biodegradazione non dipende dalla base di risorse di un materiale, ma risulta piuttosto legata alla sua composizione chimica (European Bioplastic, 2018). Attualmente, le bioplastiche stanno guidando l'evoluzione della plastica, dal momento che presentano una serie di vantaggi rispetto alle plastiche convenzionali (Figura 1.7) (Shamsuddin et al., 2017), tra cui:

- Aumento dell'efficienza energetica e dell'ecocompatibilità delle risorse mediante:
 - coltivazione delle risorse su base annuale;
 - secondo il principio di uso “a cascata”, la biomassa può essere utilizzata dapprima per la produzione di materiali e, successivamente, per la generazione di energia;
- Riduzione del “carbon footprint” e dell'emissione di gas serra;
- Riduzione dell'uso di combustibili fossili.



Figura 1.7: Illustrazione schematica dei vantaggi e svantaggi derivati dall'utilizzo di bioplastiche (<https://www.ecoage.it/>).

Viceversa, tra gli svantaggi legati all'utilizzo di bioplastiche (Figura 1.7) troviamo:

- Alti costi di produzione, che certamente incidono sul prezzo finale del prodotto finito;
- Necessità di regolamentare l'origine e le caratteristiche delle materie prime utilizzate, al fine evitare di incidere ancor di più sul fenomeno della deforestazione;
- Elevati costi di trasporto delle biomasse, in quanto molto voluminose, e mezzi di trasporto inquinanti, motivo per il quale andrebbe favorito l'approvvigionamento locale, allo scopo di ridurre l'impatto ambientale ed economico.

Per tutti gli aspetti elencati, le bioplastiche si configurano, dunque, come una componente essenziale della bioeconomia e di un'industria innovativa in rapida evoluzione che ha il potenziale di disaccoppiare la crescita economica dall'impovertimento delle risorse e dal potente impatto ambientale. Esse possono, inoltre, essere suddivise in tre gruppi principali (European Bioplastics, 2020):

- **Materie plastiche non biodegradabili totalmente o parzialmente naturali:** tra cui troviamo il bio-polietilene (bio PE), il bio-polipropilene (bio PP) o il bio-polietilene tereftalato (bio PET), ottenuti a partire da zuccheri vegetali, e polimeri naturali di prestazione tecnica come il politrimetilentereftalato (PTT) o il copoliestere termoplastico (TPC-ET);
- **Materie plastiche naturali e biodegradabili:** tra cui figurano l'acido polilattico (PLA) e i poliidrossialcanoati (PHA) o il polibutilene succinato (PBS);
- **Materie plastiche che si basano su risorse fossili e sono biodegradabili:** tra cui troviamo il polibutirrato (PBAT).

Sono state proposte diverse metodologie di ottenimento delle bioplastiche:

- **Produzione di bioplastica da biomassa:** la fotosintesi effettuata da piante, cianobatteri e microalghe determina la riduzione della CO₂ grazie all'energia solare e la formazione di un complesso di biomolecole che costituiscono la biomassa. Un metodo semplice per integrare questa biomassa nell'industria petrolchimica per la produzione di plastiche è quello di convertirla a metano tramite un processo di fermentazione. Il metano, a sua volta, può essere utilizzato per produrre poliidrossialcanoati (PHA), acido lattico ed etanolo, che costituisce il precursore del bio polietilene e del bio polivinilcloruro. Un simile approccio presenta il vantaggio di minimizzare i costi iniziali e operativi, in quanto i processi coinvolti risultano relativamente semplici, mentre lo svantaggio

risiede nel fatto che tutta l'energia solare e chimica impiegata per generare le biomolecole viene persa nella loro riconversione a metano da cui le molecole precursore delle bioplastiche devono essere sintetizzate nuovamente (Thakur et al., 2018);

- **Produzione di bioplastica tramite raffinazione:** una possibile strategia alternativa e maggiormente mirata consiste nello scomporre la biomassa nelle sue componenti biomolecolari tramite un approccio di bioraffinazione. Sono, attualmente, in via di sviluppo processi basati sulla rottura meccanica delle cellule e sulla liquefazione idrotermale atti a permettere il rilascio di proteine, lipidi, carboidrati, acidi nucleici e cellulosa, materiali, questi, che possono, poi, essere utilizzati al fine di produrre le diverse classi di bioplastiche. Il successo di questo approccio risulta, tuttavia, condizionato dal raggiungimento di un buon rapporto costi-benefici, nonostante l'alto costo iniziale richiesto per frazionare la biomassa nelle sue componenti. I cianobatteri possono essere usati come risorsa per la coproduzione di polidrossialcanoati (PHA), pigmenti, metano e fertilizzanti. La produzione di molteplici bioplastiche a partire dalla stessa biomassa è fondamentale e contribuisce a livellare l'alto costo richiesto per il frazionamento e la purificazione (Arikan e Ozsoy, 2015);
- **Produzione di bioplastica tramite metodi di ingegneria genetica:** sfruttando la capacità di cianobatteri geneticamente modificati di utilizzare la luce solare per potenziare la produzione di poliidrossialcanoati, unitamente con l'avanzare dei progressi connessi alla tecnologia CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*), si ritiene che sarà possibile ottimizzare l'efficienza di cattura della luce. L'ingegnerizzazione di specifici pathway biochimici, inoltre, permetterà la produzione di nuove molecole precursore in grado di conferire un ampio range di proprietà fisiche e chimiche alle future generazioni di bioplastiche (Karan et al., 2019).

Nonostante, ad oggi, le bioplastiche rappresentino circa l'1% dei 335 milioni di tonnellate di plastica prodotta ogni anno, i risultati del rapporto annuale sul mercato globale delle bioplastiche aggiornati all'anno 2020 si sono rivelati piuttosto promettenti, prevedendo, tra le altre cose, un incremento della capacità produttiva globale di bioplastiche da circa 2,1 milioni di tonnellate nel 2020 a 2,8 milioni di tonnellate auspicabili nel 2025 (Figura 1.8) (European Bioplastics, 2020). Sebbene ormai un quarto della potenzialità produttiva mondiale di bioplastiche si trovi in Europa, con una percentuale di produzione di bioplastiche del 46% registrata nel 2020, l'Asia continua a guidare il settore (European Bioplastics, 2020).

Tuttavia, le stime prevedono un lieve aumento della produzione di bioplastiche in Nord America dal 17% nel 2020 al 18% nel 2025 (Figura 1.9).

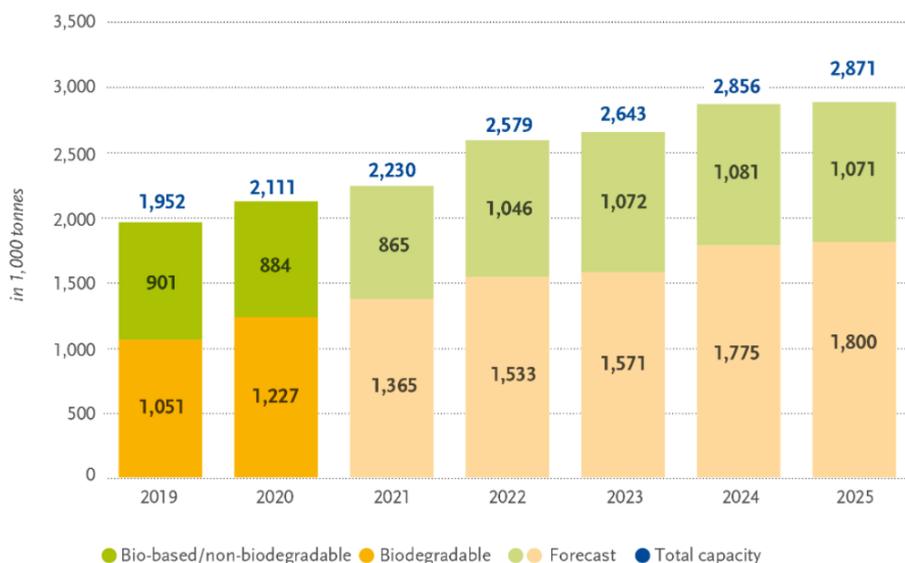


Figura 1.8: Capacità di produzione globale di bioplastiche aggiornata al 2020 (European Bioplastics, 2020).



Figura 1.9: Capacità di produzione globale di bioplastiche per regione aggiornata al 2020 (European Bioplastics, 2020).

Per ciò che concerne le loro applicazioni, l'imballaggio rimane il campo di applicazione più ampio per le bioplastiche, con quasi il 47% (pari a 0,99 milioni di tonnellate) del mercato totale nel 2020. Ulteriori segmenti di mercato coinvolti in tale produzione sono: agricoltura e orticoltura (14%), rivestimenti e adesivi (9%), elettronica (8%), settore tessile (5%), edilizia (2%) e settore automobilistico (1%) (European Bioplastics, 2020).

La biodegradabilità è una caratteristica spesso ricercata nel caso delle confezioni alimentari per prodotti deperibili, vale a dire a bassa durata di conservazione o senza aggiunta di conservanti.

Quando si tratta di proteggere gli alimenti e prolungare la durata di conservazione, le prestazioni degli imballaggi in bioplastica sono quantomeno paragonabili a quelle degli imballaggi convenzionali esistenti, talvolta anche migliori. Perseverando nell'obiettivo di migliorare le proprietà barriera come il rivestimento antimicrobico ed ulteriori aspetti ad esso connessi, l'industria delle bioplastiche sarà presto in grado di ottenere una migliore conservazione dei prodotti alimentari rispetto alle confezioni attuali.

Allo stesso modo, nell'industria automobilistica, i produttori si sono rivolti all'adozione di bioplastiche durevoli totalmente o parzialmente naturali al fine di produrre robusti componenti del cruscotto e altre solide parti interne ed esterne, come ad esempio i paraurti, costituenti, questi, in grado di fornire uno standard di sicurezza che si rivela essere di estrema importanza nel settore dei trasporti.

Per quanto riguarda l'uso di suolo, invece, le materie prime attualmente più efficienti nella produzione di bioplastiche, quali piante ricche di carboidrati come il mais o la canna da zucchero, si definiscono "materie prime di prima generazione", in quanto richiedono la minore quantità di terreno da coltivare e producono i maggiori rendimenti. L'industria delle bioplastiche sta, tuttavia, affinando lo studio relativo all'uso di colture non alimentari, denominate materie prime di seconda e terza generazione, tra cui figura la cellulosa. Le tecnologie innovative si concentrano sui sottoprodotti non commestibili della produzione di colture alimentari, che generano inevitabilmente grandi quantità di sottoprodotti cellulosici, come paglia e stoppie di mais o bagassa, i quali vengono solitamente lasciati sul campo, dove si biodegradano in quantità molto più elevata di quanto necessario per il ripristino del livello di carbonio nel suolo. Nel 2020, la capacità produttiva globale di bioplastiche ammontava a 2,1 milioni di tonnellate, il che si traduce in circa 0,7 milioni di ettari di terreno. Ciò significa che la superficie di suolo richiesta per coltivare una quantità sufficiente di materie prime per la produzione di bioplastiche è attualmente inferiore allo 0,02% della superficie agricola globale pari a 4,8 miliardi di ettari, pertanto non esiste competizione tra materie prime rinnovabili per alimenti e mangimi e la produzione di bioplastiche. Ipotizzando che la crescita del mercato delle bioplastiche continui ad aumentare sulla base dell'attuale stadio di sviluppo tecnologico, entro il 2025 potrebbe essere raggiunto un mercato di 2,43 milioni di tonnellate, pari a circa 1,1 milioni di ettari, ovvero circa lo 0,02% della superficie agricola mondiale (Figura 1.10) (European Bioplastics, 2020). Questa stima non include, tuttavia, l'atteso incremento della quota di residui alimentari, colture non alimentari o biomassa cellulosica, che inevitabilmente porterà ad un'ulteriore diminuzione della domanda di uso di suolo per la produzione di bioplastiche rispetto alla quantità sopra stimata.

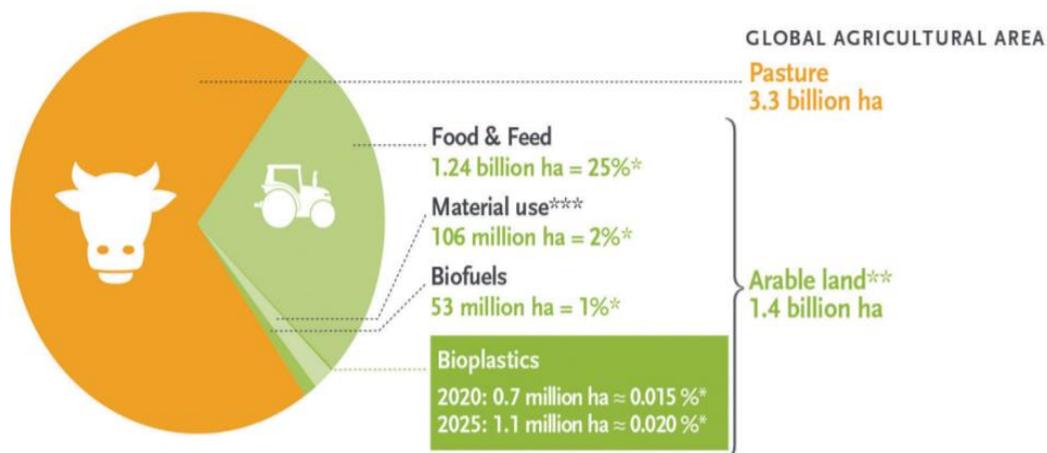


Figura 1.10: Stima dell'uso di suolo per la produzione di bioplastiche nel 2020 e nel 2025 (European Bioplastics, 2020).

1.3.1 Processo di biodegradazione delle bioplastiche

L'introduzione nel mercato di biopolimeri biodegradabili non può prescindere da accurate analisi di biodegradabilità in condizioni ambientali diverse, volte ad evitare l'ulteriore inquinamento da materiali plastici. La biodegradazione dei polimeri, che può avvenire grazie a batteri, alghe e funghi, segue tre diversi step (Emadian et al., 2017):

- **Biodeterioramento;**
- **Bioframmentazione;**
- **Assimilazione.**

I meccanismi base di biodegradazione sono l'ossidazione o l'idrolisi da parte di enzimi che migliorano l'idrofilicità del materiale plastico, da cui si ottiene un polimero a più basso peso molecolare adatto all'assimilazione da parte dei microrganismi. Successivamente alla degradazione, la frammentazione causa la rottura delle catene polimeriche di plastica che rendono possibile la loro assimilazione. Polimeri diversi possiedono proprietà di biodegradazione differenti. Le bioplastiche in polilattato (PL), ad esempio, mostrano una degradazione alquanto lenta (fino ad un anno), mentre quelle in acetato di cellulosa impiegano solo qualche mese (Arikan e Ozsoy, 2015). Inoltre, la biodegradazione di questi materiali varia a seconda del comparto ambientale: spesso presentano alta degradabilità nel comparto suolo e nei sistemi di compostaggio, ma bassa nel caso di comparti acquatici. La natura acida dell'ambiente può anch'essa influenzare la biodegradazione, dal momento che il pH modifica il tasso di idrolisi e di crescita dei microrganismi. Un ulteriore fattore capace di influenzare il tasso di biodegradazione è la flessibilità delle catene del polimero: più è alta, maggiore sarà la

biodegradazione, in quanto le reazioni di idrolisi procederanno a maggior velocità (Emadian et al., 2017). Condizioni anaerobiche sono, invece, idonee per la degradazione del polilattato e dei poliidrossialcanoati. L'energia liberata dal processo di mineralizzazione è utilizzata dai microrganismi: in questo caso essi utilizzano un accettore di elettroni alternativo all'ossigeno, come lo ione solfato o lo ione nitrato. Generalmente i tassi di degradazione in condizioni di anaerobiosi sono più lenti rispetto a quelli aerobici a causa della mancanza di ossigeno. Tuttavia, i tassi di degradazione per il polilattato e del poliidrossibutirrato (PHB) risultano più elevati in condizioni anaerobiche (Emadian et al., 2017).

Per uno sviluppo industriale totalmente sostenibile, in ogni caso, sarà necessario che le bioplastiche progettate per biodegradarsi, si degradino totalmente a CO₂ e acqua, evitando in questo modo il rilascio di residui chimici pericolosi. Alla luce di quanto riportato, risulta comunque necessario accoppiare alle innovazioni tecnologiche in questo campo, un apparato legislativo che permetta la transizione verso una bioeconomia circolare e rinnovabile basata sull'utilizzo di bioplastiche (Karan et al., 2019).

1.3.2 Norme e certificazioni delle plastiche biodegradabili e compostabili

La rapida espansione del mondo delle bioplastiche è, spesse volte, causa di confusione generale da parte dei consumatori del mercato, che, in quanto poco esperti e meno attenti, possono essere attratti da termini standardizzati e poco significativi in assenza di valide certificazioni (Yu et al., 2018). Le norme di riferimento per le certificazioni delle bioplastiche sono la EN 13432:2002 e la NF T 51-800: 2015. La prima definisce quattro criteri da rispettare per valorizzare i materiali o gli imballaggi mediante compostaggio industriale, quali composizione, biodegradazione, disintegrazione e qualità del compost, stabilendo tempi e condizioni di trattamento per la verifica della biodegradabilità di un materiale, per la quale sono previsti 6 mesi, e della sua compostabilità, nonché la sua capacità di disgregarsi in frammenti di dimensioni inferiori ai 2 mm entro circa 3 mesi. La seconda, invece, s'identifica in una norma più recente, incentrata sulla capacità dei materiali di essere valorizzati mediante compostaggio domestico. Quest'ultima serve particolarmente come base per le leggi che regolano l'utilizzo di sacchetti in plastica monouso destinati all'imballaggio delle merci nei punti vendita, alle pellicole di imballaggio, ai bicchieri e ai piatti usa e getta (European Bioplastics, 2020).

Varianti di queste norme vengono oggi applicate per valutare la biodegradazione delle bioplastiche in diverse condizioni e ambienti, come ad esempio il terreno o l'acqua marina.

I test, secondo tali norme, comprendono:

- **Test chimico:** divulgazione di tutti i costituenti e rispetto dei valori limite per i metalli pesanti;
- **Biodegradabilità in condizioni controllate di compostaggio** (consumo di ossigeno e produzione di CO₂): è necessario dimostrare che almeno il 90% del materiale organico viene convertito in CO₂ entro 6 mesi;
- **Disintegrazione:** dopo 3 mesi di compostaggio e successiva setacciatura mediante un setaccio da 2 mm, non può rimanere più del 10% di residuo rispetto alla massa originale;
- **Prove pratiche di compostabilità in un impianto di compostaggio semi-industriale o industriale;**
- **Test di ecotossicità:** esame degli effetti del compost risultante sulla crescita delle piante (test agronomico).

Sulla base delle prove conformi alle norme indicate, è possibile ottenere attestati che diano maggiore visibilità ai materiali e ai prodotti certificati rivolgendosi a due organismi europei: DIN CERTCO (Germania) e TÜV AUSTRIA (Belgio) (Figura 1.11) (European Bioplastics, 2020). Per quanto riguarda le etichette che certificano prodotti bio-based, non vi è attualmente alcun obbligo per i produttori di rivelare l'esatta quantità di materiali da biomassa nei loro prodotti. I produttori possono fornire queste informazioni ai consumatori su base volontaria, e quindi motivare le loro dichiarazioni di marketing, facilitando in tal modo una decisione di acquisto consapevole per i consumatori attenti all'ambiente. Tali dichiarazioni devono, tuttavia, essere conformi allo standard EN 17228:2019, che specifica il metodo di calcolo per determinare il contenuto di carbonio bio-based in monomeri, polimeri e materiali e prodotti in plastica, in base alla misurazione del contenuto di carbonio-14.



Figura 1.11: Esempi di etichette DIN CERTCO e TÜV AUSTRIA (European BioPlastics, 2020).

1.3.3 Acido polilattico (PLA)

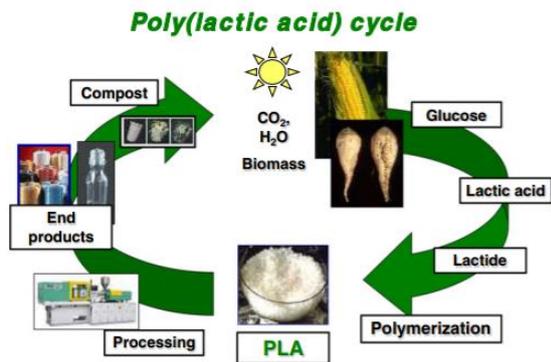


Figura 1.12: Ciclo di vita del PLA a partire da maïs e barbabietola da zucchero (Murariu e Dubois, 2016).

L'acido polilattico (PLA) è attualmente considerato uno dei più promettenti polimeri biodegradabili appartenenti al gruppo dei biopoliesteri, grazie al largo spettro dei suoi potenziali impieghi. Ottenuto dalla fermentazione degli zuccheri del maïs, tra i suoi punti di forza vi sono la versatilità nell'essere processato con diverse tecnologie industriali e l'ampia disponibilità commerciale a prezzi

relativamente contenuti e in diverse tipologie, che lo rendono adatto per numerose applicazioni (Murariu e Dubois, 2016). Può essere classificato come biopolimero sia perché è prodotto a partire da materie prime naturali rinnovabili ricche di amido, sia perché risulta biodegradabile e compostabile. La produzione parte dallo zucchero ricavato dall'amido e trasformato in acido lattico mediante fermentazione. L'acido lattico, che è l'unità costituente, nonché monomero del biopolimero, viene poi dimerizzato a lattide. Infine, dalla policondensazione del lattide si ottiene il PLA (Figura 1.12) (Murariu e Dubois, 2016).

Esso gode delle seguenti proprietà (Farah et al., 2016):

- **Meccaniche:** variano da quelle di un polimero amorfo a quelle di un polimero semicristallino, proprietà intermedie a quelle del PET (polietilene tereftalato) e del PS (polistirene). La temperatura di transizione vetrosa è maggiore della temperatura ambiente;
- **Biodegradabilità:** sebbene appena prodotto non risulti biodegradabile, lo diventa in seguito a idrolisi a temperatura maggiore di 60 °C e umidità maggiore del 20%;
- **Elevata trasparenza;**
- **Bassa temperatura di termoformatura;**
- **Rigidità elevata;**
- **Limitata resistenza termica pari a 60°C** (se non orientato);
- **Igroscopicità,** nonché la capacità di assorbire prontamente le molecole d'acqua presenti nell'ambiente circostante.

A livello mondiale, sono noti molti grandi produttori di PLA, aventi almeno 30 siti produttivi sparsi tra Nord America, Europa ed Asia. Il leader mondiale nella produzione di acido polilattico, commercializzato con il nome di NatureWorks, è sicuramente Cargill USA, con un

impianto in Nebraska in grado di produrre 140.000 t/anno. Il costo commerciale può variare tra i 2 e i 5 euro/kg, in base alle diverse tipologie presenti sul mercato (Vink et al., 2003). Tra i prodotti è, inoltre, commercializzata anche una schiuma di PLA distribuita con il nome di BioFoam, che si presenta come alternativa biodegradabile ai prodotti attualmente utilizzati a base di polistirene.

L'acido polilattico ha un aspetto esteriore praticamente identico a quello della plastica e può essere modellato in lamine, fibre o sfere. A livello industriale, la produzione consiste fondamentalmente nell'estrusione della colata, seguita da termoformatura, iniezione, rivestimento, soffiaggio, spinning (Murariu e Dubois, 2016). Tra i parametri fondamentali da controllare vi è, senza dubbio, la temperatura di lavoro, che dipende dalla viscosità della colata, la quale è, a sua volta, legata alla distribuzione dei pesi molecolari, al tipo e alla quantità di plastificanti, alla deformazione applicata e al tipo di processo produttivo utilizzato.

Risulta, dunque, molto importante lo studio delle proprietà reologiche dei polimeri in modo da poterli associare con i processi produttivi idonei. Dal momento che lo stiramento ne migliora le proprietà, molte delle applicazioni produttive possono essere trovate tra le seguenti:

- Termoformatura;
- Film biorientato;
- Iniezione soffiaggio (flaconi e bottiglie);
- Fibre.

Tali tecniche ne consentono l'utilizzo al fine di ottenere contenitori per alimenti, bottiglie per l'acqua, filamenti per stampa 3D, protesi medicali, suture mediche, rivestimenti per il rilascio controllato di farmaci, packaging e buste biodegradabili. Ne deriva che, ad oggi, i materiali a base di PLA risultano commercializzati in tre diversi campi: biomedicale, imballaggio e tessile (Murariu e Dubois, 2016). In particolare, è stato riscontrato che circa il 70% del PLA prodotto viene utilizzato nel settore dell'imballaggio (Domenek e Ducruet, 2016). A causa del suo costo elevato, tuttavia, l'uso iniziale del PLA come materiale di packaging era limitato a film di alto valore, termoformati rigidi, contenitori per cibi, bevande e carte ricoperte. Una delle prime compagnie ad usare il PLA negli imballaggi fu la *Danone* per i vasetti dello yogurt, ma attualmente il suo utilizzo risulta largamente esteso in tutta Europa, Giappone e USA, dove viene utilizzato per prodotti freschi e a breve conservazione, quali frutta e verdura.

Inoltre, il PLA rappresenta il materiale più usato nella realizzazione di prodotti mediante tecniche produttive come la FDM (*Fused Deposition Modeling*), meglio note come stampanti 3D, che prevedono l'impiego di macchine di prototipazione rapida (Domenek e Ducruet, 2016).

1.3.4 Polietilene tereftalato a base biologica (Bio-PET)

I poliesteri costituiscono un ampio gruppo di polimeri aventi il potenziale di essere prodotti a partire da materie prime a base biologica. Tra i più rilevanti per uno shift verso prodotti chimici a base biologica troviamo polietilene tereftalato (PET), polibutilene tereftalato (PBT), polibutilene succinato (PBS) e i copolimeri di polibutirrato-adipato-tereftalato (PBAT) (European Bioplastics, 2020). Tra questi, il polietilene tereftalato (PET), una resina polimerica termoplastica prodotta dalla policondensazione di glicole etilenico (EG) e acido tereftalico (TPA), risulta il poliesteri più utilizzato grazie alle sue proprietà fisiche e meccaniche, che lo rendono particolarmente adatto per applicazioni afferenti al campo tessile (65%) e dell'imballaggio (35%) (Siracusa e Blanco, 2020). Svolge un ruolo piuttosto importante nel mercato della plastica, ma a causa della sua scarsa sostenibilità dovuta ad una degradabilità particolarmente lenta, pone seri problemi ambientali, legati soprattutto al trattamento dei rifiuti, specie se utilizzato per applicazioni di breve durata, ad esempio per gli imballaggi alimentari (Storz e Vorlop, 2013). La produzione del PET comprende due fasi, la prima delle quali consiste in un'esterificazione del TPA con l'EG, mentre la seconda è una policondensazione, in cui il PET si forma mediante una reazione di transesterificazione. L'EG e il TPA provengono in genere dal petrolio, ma possono essere prodotti in alternativa tramite percorsi a base biologica. Convenzionalmente, l'EG viene prodotto tramite l'idrolisi di ossido di etilene, un prodotto dell'ossidazione catalitica di etilene, mentre la produzione del TPA a base biologica risulta non poco complicata, al punto da impedirle di raggiungere una scala commerciale più ampia (Dodds e Humphreys, 2013). A piccola scala, il processo inizia con la produzione biotecnologica di isobutanolo, che viene, poi, successivamente trasformato mediante isobutilene e paraxilene in bio-TPA attraverso più passaggi di conversione catalitica (Figura 1.13) (Storz e Vorlop, 2013).

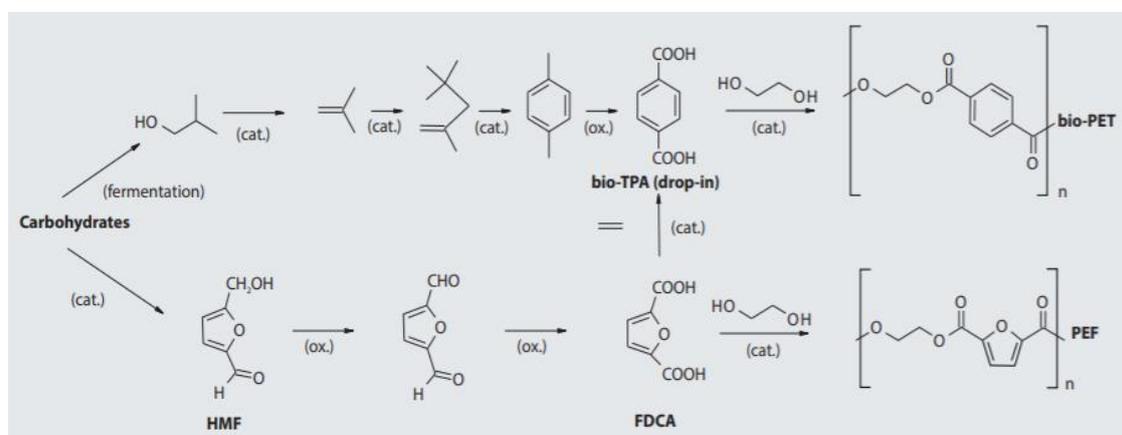


Figura 1.13: Conversione dello zucchero in bio-PET e PEF, una nuova plastica a base biologica che ricorda la struttura del PET (Storz e Vorlop, 2013).

Il bio-PET utilizzato oggi risulta essere a parziale base biologica, costituito da EG a base biologica e TPA derivato dal petrolio, presenta un contenuto di carbonio a base biologica pari al 20% e, pur non essendo biodegradabile, risulta essere un tipo di plastica riciclabile al 100% (Storz e Vorlop, 2013).

Nel 2011, la capacità produttiva del PET a base biologica raggiunse le 620 tonnellate, registrando un incremento di circa 12 volte superiore rispetto ai numeri risalenti al 2010, a causa dell'incredibile successo della "PlantBottle", una bottiglia realizzata in bio-PET introdotta da *Coca-Cola* nel 2009. Un simile evento suscitò fortemente l'interesse nella realizzazione di una bottiglia a base completamente biologica da parte di *Coca-Cola* e delle aziende competitor, tanto che le stime riportano un aumento della capacità produttiva di bio-PET pari a 5.000 tonnellate nel 2016. Nonostante negli scorsi anni sembrasse promettere una rapida crescita, tuttavia, ad oggi il bio-PET ha disatteso le attese, in quanto rappresenta solo una piccola percentuale delle bioplastiche non biodegradabili pari al 7,8% (Figura 1.14) (European Bioplastics, 2020), il che ha spostato l'attenzione del mondo del beverage sul polietilene-furanoato (PEF), poliestere interamente ottenuto da risorse rinnovabili, non biodegradabile, alternativo al PET e per certi aspetti più performante, soprattutto nelle proprietà barriera, che dovrebbe essere disponibile sul mercato a partire dal 2023 (Siracusa e Blanco, 2020).

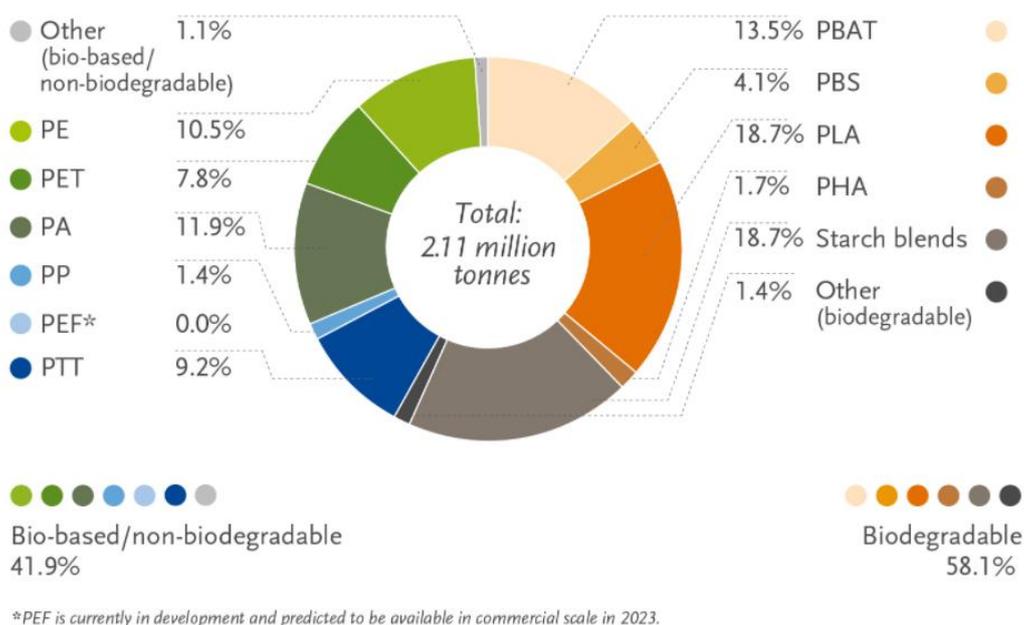


Figura 1.14: Capacità produttiva globale di bioplastiche a seconda del tipo di materiale aggiornata al 2020 (European Bioplastics, 2020).

1.3.5 Biopolimeri a base di amido (Starch-blend Biopolymers)

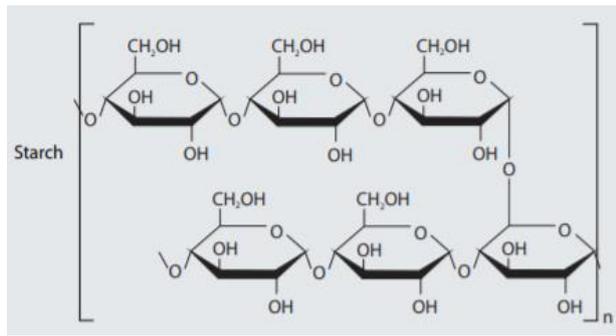


Figura 1.15: Struttura biochimica dell'amido
(Storz e Vorlop, 2013)

Attualmente, si ritiene che le piante siano particolarmente valide nella produzione di bioplastiche grazie alla loro capacità di agire come biofabbriche ad energia solare e al potenziale di essere rinnovabili, sostenibili e produrre numerosi polimeri, tra cui l'amido e la cellulosa (Ismail et al., 2016).

Prodotto dalle piante verdi per lo stoccaggio di energia, l'amido è un polisaccaride abbondante e poco costoso, annualmente disponibile nel mais e in altre piante, quali frumento, riso, patata, tapioca, pisello, nonché totalmente biodegradabile in una vasta varietà di ambienti, che consente lo sviluppo di prodotti completamente degradabili per specifici bisogni di mercato (Storz e Vorlop, 2013).

Esso è, inoltre, costituito da due maggiori componenti: amilosio, un α -D-(1-4)-glucano prevalentemente lineare, e amilopectina, un α -D-(1-4)-glucano con legami α -D-(1-6) ai punti di ramificazione. Le molecole di amilosio lineare dell'amido hanno un peso molecolare di 0,2-2 milioni, mentre le molecole di amilopectina ramificate hanno un peso molecolare pari a 100-400 milioni (Gadhavé et al., 2018). La degradazione o l'incenerimento di prodotti a base d'amido permette il riciclo della CO₂ atmosferica accumulata dalle piante che producono amido durante la crescita, chiudendo così il ciclo biologico del carbonio.

L'utilizzo di amido nella produzione di bioplastiche prende avvio a partire dagli anni '70 (Curvelo et al., 2001), quando veniva utilizzato allo stato granulare per riempire poliolefine o come componente in miscele di polimeri sintetici.

Nel corso degli anni, numerosi sono stati gli sforzi compiuti allo scopo di sviluppare polimeri a base di amido atti a conservare le risorse petrolchimiche e ridurre l'impatto ambientale. Tuttavia, i materiali a base di amido presentano alcune limitazioni, tra cui la stabilità a lungo termine causata dall'assorbimento d'acqua, l'invecchiamento causato dalla retrogradazione e scarse proprietà meccaniche, le quali sono state superate mediante l'aggiunta di un plastificante come la glicerina atta a migliorare la conservabilità e l'elasticità del prodotto finale (Ismail et al., 2016). Un esempio di bioplastica a base di amido è l'amido termoplastico (TPS), che viene solitamente preparato miscelando e riscaldando granuli di amido in presenza di uno o più plastificanti mediante un processo che prende il nome di "destrutturazione". Tuttavia, il TPS risulta essere molto idrofilo, il che lo rende inadatto per applicazioni in ambienti umidi (Liu et al., 2009).

Questo attualmente limita l'applicabilità del TPS a prodotti di nicchia come le pastiglie per lavastoviglie o i nastri adesivi a rapida dissoluzione. Per tale motivo, sono state sviluppate diverse soluzioni al fine di migliorare le proprietà del TPS, compreso l'uso di plastificanti meno volatili e meno sensibili all'acqua, quali sorbitolo o xilitolo, e l'aggiunta di cariche idrofobiche adeguate come la lignina (Fang e Hanna, 2000; Kaewtatip e Thongmee, 2013; Li e Huneault, 2011; Rahmat et al., 2009). La miscela di TPS e amido con plastiche idrofobe ha esteso il loro uso come materiali plastici: la componente idrofoba, infatti, impedisce l'assorbimento diretto di acqua e aumenta significativamente la resistenza all'acqua.

Tuttavia, dal momento che la maggior parte dei polimeri idrofobici è incompatibile con l'amido, il contenuto massimo di amido delle miscele è limitato a circa il 25-30% (Kalambur e Rizvi, 2006). Ad oggi, polimeri a base di amido vengono commercializzati sotto forma di prodotti biodegradabili di breve durata come sacchetti, pellicole da imballaggio, film commestibili e schiume di protezione; il campo in cui predominano risulta quello dell'industria alimentare (food packaging), seguita dal settore dell'agricoltura, dove trovano importanti applicazioni come copertura di serre, film per pacciamatura e fertilizzanti, e infine dal campo biomedico (Lu et al., 2009). Difatti, polimeri biodegradabili a base di amido sono stati ampiamente studiati nel settore dell'ingegneria del tessuto osseo, in quanto capaci di fornire supporto strutturale immediato grazie ad un'ottima biocompatibilità, adeguate proprietà meccaniche e alla formazione di prodotti di degradazione non tossici (Lu et al., 2009). Oltre alla Cereplast (USA), che offre miscele di TPS mirate per applicazioni a lungo termine in automobili e beni di consumo, i più importanti produttori di materie plastiche a base di amido sono Novamont (Italia) e Rodenberg (Paesi Bassi) (Storz e Vorlop, 2013). Resta, tuttavia, da considerare che, sebbene le materie plastiche a base di amido siano protagoniste di un'elevata diffusione all'interno del mercato globale delle tecnologie rivolte al miglioramento del packaging alimentare, i componenti di tali polimeri non sono completamente inerti, pertanto la loro eventuale migrazione nei cibi ingeriti può causare notevoli danni al corpo umano (Lu et al., 2009). Alla luce di tale evidenza, sono in fase di sviluppo nuovi materiali di confezionamento alimentare, tra cui sistemi nanocompositi a matrice polimerica amido/argilla, i quali presentano una bassa permeabilità all'ossigeno a bassi tassi di umidità e sono stati proposti per migliorare la qualità e la durata di conservazione del cibo, riducendo al contempo la migrazione di polimeri e additivi (Ross et al., 2017).

1.4 UNA MINACCIA NASCOSTA: I LEACHATE DA BIOPLASTICA

1.4.1 Concentrazione e rilascio di sostanze inquinanti

Le plastiche sono considerate biochimicamente inerti, motivo per cui, grazie alla loro struttura macromolecolare, non reagiscono con la membrana cellulare di un organismo, nè la penetrano (Rochman, 2015). Tuttavia, la maggior parte delle materie plastiche non sono pure: oltre alla loro struttura polimerica, esse risultano costituite da una varietà di sostanze chimiche che contribuiscono a determinarne gli aspetti qualitativi ed estetici (Hammer et al., 2012; Hermabessiere et al., 2017). I rifiuti marini di natura plastica sono associati ad un “cocktail di contaminanti”, vale a dire una miscela complessa di sostanze (Figura 1.17), tra cui si annoverano sostanze chimiche aggiunte intenzionalmente o meno durante il processo di produzione (Lithner et al., 2011), come additivi e composti chimici prodotti durante la combustione del petrolio grezzo, seguiti da sottoprodotti di fabbricazione o sottoprodotti derivanti dal riciclaggio dei rifiuti di plastica ed infine contaminanti chimici presenti nell’oceano che si accumulano nelle plastiche nel momento in cui diventano rifiuti, ad esempio, inquinanti organici persistenti (POP) e metalli (Mato et al., 2001; Ogata et al., 2009; Rochman, 2015). In definitiva, i rifiuti di plastica nell’ambiente marino possono contenere due tipi di contaminanti tossici: (1) additivi, in grado di migliorare le caratteristiche desiderabili o diminuire le proprietà indesiderate del prodotto finale e (2) prodotti chimici idrofobici che vengono assorbiti dall’acqua circostante (Teuten et al., 2009).

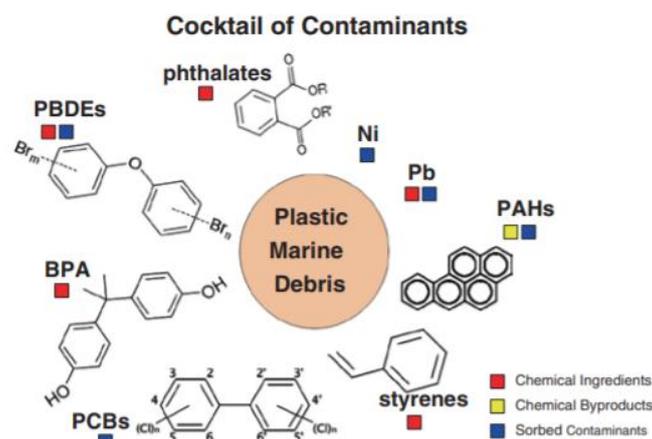


Figura 1.17: Miscela di contaminanti associati ai detriti di plastica marina. I contaminanti chimici associati ai rifiuti marini sono ingredienti chimici (quadrati rossi), i sottoprodotti della lavorazione (quadrati gialli) e quelli che vengono assorbiti dall’acqua dell’oceano circostante (quadrati blu) (Rochman, 2015).

Secondo una recente classificazione, gli additivi possono essere distinti in base alle loro componenti funzionali e strutturali in quattro classi principali: additivi funzionali, coloranti, riempitivi e stabilizzanti (Hansen et al., 2013). I primi includono sostanze progettate per modificare le proprietà fisico-chimiche dei polimeri (dai plastificanti agli agenti schiumogeni), i secondi comprendono pigmenti e azocoloranti ampiamente usati per trattare i prodotti tessili; tra i riempitivi si annoverano sostanze come argilla, talco o carbonati volti a migliorare le proprietà del rivestimento polimerico, mentre gli stabilizzanti includono fibre sintetiche utilizzate al fine di aumentare la resistenza meccanica dei prodotti (Hansen et al., 2013). Il rischio chimico legato alla presenza di plastica nell'ambiente marino risulta essere, dunque, triplo, a causa dell'azione integrata di (1) POP rilasciati dalla superficie della plastica, (2) additivi che fuoriescono dal materiale plastico e (3) sostanze chimiche prodotte dalla degradazione del polimero plastico. Il 78% delle sostanze chimiche elencate come inquinanti prioritari da parte del US EPA risulta associato ai rifiuti di plastica marina (Rochman et al., 2013), il che costituisce motivo di non poca preoccupazione, dal momento che si tratta di sostanze catalogate dalla Commissione Europea 2014 come persistenti, bioaccumulabili e tossiche (Rochman, 2015), molte delle quali hanno dimostrato avere effetti nocivi (Xu et al., 2004; Halden, 2010; Lithner et al., 2011). Ad esempio il Bisfenolo A (BPA), utilizzato nella produzione del policarbonato, può esercitare effetti negativi interferendo con il sistema endocrino (Halden, 2010; Oehlmann et al., 1996; Crain et al., 2007), così come lo stirene e il monomero polivinilcloruro, utilizzati nella produzione di polistirolo e polivinil cloruro (PVC), possono essere cancerogeni e mutageni (Xu et al., 2004; Lithner et al., 2011; Papaleo et al., 2011), ragion per cui sono stati classificati come sostanze tossiche dalla maggioranza delle agenzie americane per la salute e per l'ambiente (EPA, ATSDR e OSPAR). L'impatto esercitato dalle materie plastiche sui vertebrati marini come tartarughe, mammiferi e uccelli, è ben riconosciuto sin dagli anni '80 (De Stephanis et al., 2013; Crain et al., 2007). Tuttavia, solo recentemente la preoccupazione per gli effetti causati dalle particelle di plastica nelle reti alimentari e negli ecosistemi marini è aumentata notevolmente. Si calcola, infatti, che più della metà delle materie plastiche contenga almeno un componente pericoloso (Rochman et al., 2013), di conseguenza quelle riversate nei sistemi acquatici possono diventare sempre più tossiche a causa dell'assorbimento degli inquinanti organici persistenti (POPs) che avviene sulla loro superficie (Rochman et al., 2013). Esistono, inoltre, prove scientifiche secondo le quali la miscela di contaminanti può diventare biodisponibile al biota marino (Figura 1.18); in tal modo, le tossine concentrate potrebbero essere inevitabilmente trasferite agli animali tramite l'ingestione e l'endocitosi (Teuten et al., 2009; Von Moos et al., 2012). Una volta ingerite, tali

particelle possono essere trattenute e ostruire il tratto digestivo (Derraik, 2002; Besseling et al., 2013), essere assimilate e trasferite nei tessuti (Browne et al., 2008; Von Moos et al., 2012; Farrel e Nelson, 2013) e agire come vettore di altre sostanze tossiche nella catena alimentare (Mato et al., 2001; Teuten et al., 2009; Browne et al., 2013; Farrel e Nelson, 2013). I contaminanti assorbiti risultano, infatti, in grado di penetrare nei fluidi digestivi per poi essere trasferiti ad altri tessuti, dove si accumulano in concentrazioni elevate (Hammer et al., 2012). La loro captazione è stata osservata in specie pelagiche e bentoniche aventi diverse strategie di alimentazione (Tourinho et al., 2010; Murray e Cowie, 2011; Cole et al., 2013; Lusher et al., 2013) con conseguenze fisiche, chimiche o biologiche sugli organismi marini, nonché un potenziale impatto sulla catena trofica e sulla salute umana (Gall e Thompson, 2015; Vandermeersch et al., 2015). Le sostanze tossiche ingerite, inoltre, possono andare incontro ad un accumulo supplementare, dando vita ad un conseguente aumento della loro concentrazione chimica all'aumentare del livello trofico nelle reti alimentari (Connolly e Pedersen, 1988), un processo, questo, noto col termine di “biomagnificazione”, la quale è stata particolarmente documentata nelle balene (Fossi et al., 2012), negli squali elefante (Fossi et al., 2014), negli uccelli marini (Teuten et al., 2009; Tanaka et al., 2013; Lavers et al., 2014), negli anfipodi (Chua et al., 2014), nei vermi (*Arenicola marina*) (Besseling et al., 2012; Browne, 2015) e nei pesci (Rochman et al., 2013), dove si verifica attraverso l'ingestione. Tuttavia, ulteriori studi hanno messo in luce quanto l'importanza relativa di questo percorso di assorbimento sia limitata rispetto ad altre vie di esposizione e l'ingestione di materie plastiche potrebbe svolgere un ruolo significativo nell'accumulo di contaminanti negli organismi marini (Hammer et al., 2012).

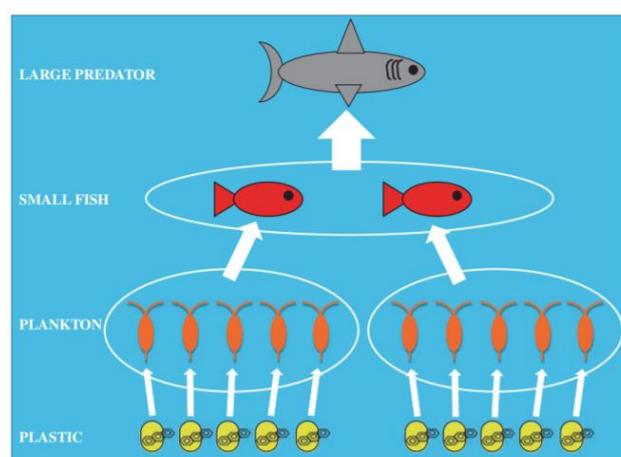


Figura 1.18: Processo di biomagnificazione delle sostanze chimiche nella rete alimentare. Il diagramma raffigura uno scenario in cui i prodotti chimici organici (ad esempio, i PAHs) derivanti dalla plastica possono essere trasferiti in organismi di livello trofico inferiore (ad esempio zooplancton) tramite l'ingestione ed accumularsi a concentrazioni molto maggiori tramite biomagnificazione in organismi di livello trofico superiori (ad esempio, piccoli pesci e squali), compromettendo in questo modo la qualità del cibo destinato all'uomo. La

dimensione delle frecce mostra come il carico corporeo, nonché il bioaccumulo delle sostanze chimiche, può amplificarsi nei predatori rispetto alle loro prede (Rochman, 2015).

1.4.2 Che cosa s'intende per "leachate"?

Col termine "leachate" ci si riferisce alla complessa miscela di additivi contenuti nelle plastiche, alcuni dei quali sono classificati come contaminanti emergenti, nonché sostanze non ancora sottoposte a regolamentazioni, aventi il potenziale di comportare rilevanti rischi per l'ambiente e la salute umana (Gunaalan et al., 2020). La frammentazione e la degradazione della plastica può facilitare il rilascio di additivi chimici, tra cui metalli quali alluminio, cromo, cobalto, nichel etc, ftalati e ritardanti di fiamma bromurati (BFR), la maggior parte dei quali non sono legati covalentemente ai polimeri e sono, pertanto, soggetti al loro rilascio in ambiente (Kwan e Takada, 2016; Teuten et al., 2009). Ciononostante, non sono ancora state definite soglie di sicurezza ambientale per numerose altre classi di additivi, incluso il BPA, noto per la sua ubiquità nelle acque superficiali e gli effetti di interferenza endocrina sugli organismi acquatici (Canesi e Fabbri, 2015) ed altri esteri organofosforici (OPEs) usati come ritardanti di fiamma. Negli ultimi decenni, una mole significativa di studi sperimentali si è concentrata sugli impatti esercitati dai singoli additivi sugli organismi acquatici, i quali colpiscono non pochi organismi tra pesci, crostacei e molluschi, con effetti che interessano le vie estrogeniche (BPA) o antiestrogeniche (ftalati), disturbi lisosomiali, stress ossidativo, fino a determinare alterazioni del comportamento degli organismi o della struttura di comunità. Tuttavia, recenti prove confermano che gli additivi rappresentano una porzione minima delle sostanze chimiche liscivate dalla plastica nei sistemi acquatici (Capolupo et al., 2020; Tetu et al., 2019), motivo per cui i loro impatti ambientali dovrebbero essere valutati sulla base dell'intera miscela di sostanze liscivate dal nucleo polimerico, il che potrebbe portare a effetti cumulativi sul biota esposto. La lisciviazione degli additivi plastici scaricati nell'ambiente può, quindi, esporre le specie animali selvatiche a complesse miscele chimiche contenenti non solo componenti regolamentati dall'attuale legislazione ambientale, ma anche una serie di contaminanti di interesse emergente (CECs). Questi ultimi sono prodotti chimici potenzialmente dannosi per l'ambiente, tra cui si annoverano benzotiazolo, acetofenone e ftalide, per i quali la mancanza di dati ecotossicologici e di una destinazione ambientale pertinente impediscono la definizione di un'attenta valutazione dei rischi, cui dovrebbero seguire piani di monitoraggio periodici e standard legislativi volti a prevenire i loro impatti sugli ecosistemi marini (Capolupo et al., 2020; Schiavo et al., 2020; Tetu et al., 2019). Ad oggi, si assiste, dunque, ad un recente cambio di paradigma nell'ambito della tossicologia delle materie plastiche, che risulta correlato alla

necessità di documentare gli effetti negativi derivati dagli estratti chimici o dai leachate prodotti da un determinato materiale plastico piuttosto che dai singoli additivi plastici (Groh et al., 2019). Gli sforzi recentemente compiuti nella caratterizzazione chimica e tossicologica dei leachate da plastica hanno fornito informazioni circa nuovi possibili impatti a danno degli ecosistemi acquatici (Gunaalan et al., 2020), superando in tal modo gli studi finora focalizzati principalmente sui soli effetti fisici derivanti dall'ingestione di microplastiche o dall'adsorbimento di inquinanti trasportati per azione dell'acqua. Nel complesso, numerosi gaps ostacolano una valutazione completa dei rischi associati ai prodotti in plastica, tra cui l'inaccessibilità delle informazioni relative agli additivi utilizzati per la produzione di un determinato articolo di plastica, così come l'assenza di un test biologico standardizzato atto a valutare la tossicità dei leachate da plastica. Attualmente non esistono metodi analitici per l'identificazione e la quantificazione dei leachate da plastica nei prodotti alimentari, dunque mancano del tutto dati sulla loro eventuale presenza negli alimenti e le conseguenti implicazioni sulla salute umana. In vista della crescente domanda di bioplastica, inoltre, vanno colmati i gaps relativi ai plausibili effetti dei leachate da bioplastica sugli organismi acquatici, primi fra tutti quelli di interesse commerciale, che il presente elaborato si prefigge di trattare.

1.4.3 Effetti dei leachate da plastica sugli organismi acquatici

Gli effetti derivanti dai leachate da plastica finora riscontrati tramite evidenze scientifiche si estrinsecano su specie acquatiche a diversi livelli trofici. Per quanto riguarda i microrganismi fotosintetici e le piante marine, un recente studio condotto da Capolupo et al. (2020) ha messo in luce la significativa inibizione della crescita della microalga marina *Skeletonema costatum* indotta da leachate derivanti da gomma per pneumatici per auto (CTR), PVC, PP e PS, a differenza di quelli derivanti da PET, che non causavano inibizione nemmeno ad una concentrazione pari al 100% di leachate. Inoltre, si è scoperto che i leachate da EPS consistenti in una miscela acquosa di esabromociclododecano (HBCD), BPA e bumetrisolo aumentano i processi fotosintetici nelle microalghe marine, tra cui *Dunaliella salina*, *Scenedesmus rubescens*, *Chlorella saccharophila* e *Stichococcus bacillaris* (Chae et al., 2020), il che risulta essere in contrasto con i dati precedentemente riportati da Sjollema et al. (2016), che non hanno osservato cambiamenti nell'attività fotosintetica di *Dunaliella* e *Clorella spp.* a seguito dell'esposizione a microparticelle di PS, a conferma dell'importanza dei processi di lisciviazione sperimentale al fine di valutare in modo affidabile la tossicità degli additivi desorbiti. Un

esperimento di laboratorio messo a punto da Menicagli et al. (2019) al fine di analizzare gli effetti dei leachate derivanti da sacchetti convenzionali non degradabili, costituiti da polietilene ad alta densità (HDPE), e nuovi sacchetti compostabili sulle piante costiere *Thinopyrum junceum* e *Glaucium flavum* ha permesso di osservare un'alterazione nei tempi di crescita e germinazione dei semi delle rispettive specie esposte ad entrambi i materiali plastici, nonché una serie di cambiamenti associati all'attività fotosintetica e la trascrizione genica delle piante, sollecitando, in tal modo, la necessità di una migliore comprensione dei rischi associati ai leachate, le cui conseguenze si andranno a ripercuotere sui processi microbici che regolano la produzione primaria e sui servizi ecosistemici garantiti dalla vegetazione costiera. Svariate sono, invece, le funzioni risultate compromesse in seguito all'esposizione a leachate da plastica negli invertebrati marini, i quali vengono generalmente scelti come organismo modello dal momento che risultano abili filtratori, presentano una rapida risposta a fattori di stress esterni ed una notevole adattabilità alle condizioni di laboratorio (Gunaalan et al., 2020). Recentemente, le crescenti preoccupazioni riguardanti gli effetti derivati dall'ingestione di plastica hanno incrementato la consapevolezza circa l'impatto dei leachate sulle prime fasi di nuoto di organismi bentonici e intertidali, alcuni dei quali sono noti per essere altamente sensibili agli additivi organici, come BPA (Balbi et al., 2016). Studi effettuati da Ke et al. (2019), volti a valutare la tossicità dei leachate derivati da due sacchi monouso di PE nelle prime fasi di vita della vongola gialla *Meretrix meretrix*, hanno riportato anomalie dello sviluppo embrionale, dell'altezza del guscio e dei tassi di sopravvivenza delle larve D-veliger, ma nessuna alterazione dei tassi di fecondazione dei gameti. Allo stesso modo, endpoint cellulari, come la stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti, e parametri connessi alle prime fasi vitali, quali fecondazione dei gameti, sviluppo embrionale, che è risultato il parametro più sensibile, seguito da motilità delle larve e tasso di sopravvivenza, sono stati profondamente influenzati dall'esposizione del mitilo *Mytilus galloprovincialis* ai leachate derivanti da PET, PS, PP, PVC e gomma per pneumatici da auto (Capolupo et al., 2020). Sopravvivenza e insediamento delle prime fasi di vita del cirripede *Amphibalanus amphitrite* sono stati studiati in seguito ad esposizione a concentrazioni crescenti (da 0,004 a 0,5 m²/L) di leachate rilasciati da polietilene ad alta densità (HDPE), polietilene a bassa densità (LDPE), PP, PVC, PC, PET e PS da Li et al. (2016): in questo caso, l'insediamento dei cirripedi veniva inibito a tutte le concentrazioni testate, mentre la sopravvivenza dei naupli esposti diminuiva al dosaggio più alto. Anche la risposta degli organismi marini ai segnali chemiosensoriali utili per sfuggire alla predazione può essere significativamente influenzata dai leachate di plastica, come dimostrato da esemplari del mollusco gasteropode *Littorina littorea* esposti a leachate di

polipropilene (PP) (Seuront, 2018). In tal caso, si è riscontrato come, in presenza di segnali chimici predatori provenienti dal granchio costiero *Carcinus maenas*, il tempo trascorso per il ritiro in rifugio *L. littorea* è stato ridotto, indicando un'inibizione generale delle risposte di evitamento indotte dai predatori. Le conoscenze relative agli effetti dei leachate da plastica sui pesci marini, tuttavia, sono ancora molto limitate rispetto agli invertebrati o ai microrganismi. La prova della tossicità dovuta alla migrazione di tali sostanze è stata ottenuta nell'orchidea dottyback *Pseudochromis fridmani* esposta al tensioattivo non ionico nonilfenolo lisciviato dai sacchetti alimentari di polietilene (PE), che veniva filtrato fino a circa 160 µg/L dopo 48 ore di interazione plastica-acqua e tendeva a bioaccumularsi nel tessuto ittico a livelli considerati positivamente correlati alla mortalità a breve e lungo termine (60% e 100%, rispettivamente) (Hamlin et al., 2015). Gli studi finora compiuti sugli uccelli marini sollevano una nuova preoccupazione circa la possibilità che i fluidi dello stomaco aumentino la lisciviazione degli additivi dopo l'ingestione di particelle di plastica. Esperimenti di alimentazione con palline di plastica di polistirene composte da cinque additivi hanno fornito prove dirette del trasferimento di ritardanti di fiamma e stabilizzanti ultravioletti al tessuto adiposo addominale e al fegato dei pulcini di *Calonectris leucomelas* (Tanaka et al., 2020). Dal 15° al 16° giorno, dal 42% all'88% degli additivi è stato lisciviato dallo stomaco e trovato a concentrazioni significative nei tessuti. Pertanto, gli autori hanno ipotizzato che l'olio dello stomaco, presente nel tratto digerente degli uccelli marini, agisca come un solvente organico, facilitando la lisciviazione delle sostanze chimiche idrofobiche, dati, questi, che sottolineano l'importanza dei detriti di plastica come fonte crescente di inquinamento successivo all'ingestione. Soltanto pochi studi, invece, sono stati dedicati alla valutazione della tossicità dei leachate negli organismi d'acqua dolce; tra questi, una delle prime indagini è stata eseguita da Lithner et al. (2009) allo scopo di testare gli effetti dei leachate da plastica sulla mobilità del cladocero *Daphnia magna*, utilizzando due diverse tecniche di lisciviazione, quali batch e test di diffusione. I risultati hanno mostrato come nove dei 32 leachate testati portassero dopo 48 ore ad ottenere EC₅₀ che vanno da 5 a 80g di materiale plastico per litro, con il materiale del compact disc catalogato come il più tossico a causa della presenza di uno o più strati d'argento. Non va, però, trascurato il fatto che le condizioni ambientali dei sistemi di acqua dolce variano considerevolmente ogni giorno o stagionalmente, il che risulta particolarmente evidente in laghi, stagni e ruscelli, dove i bassi tassi di rinnovo dell'acqua e le frequenti fluttuazioni fisico-chimiche potrebbero influenzare efficacemente la lisciviazione degli additivi delle plastiche alterati dagli agenti atmosferici. Sono, pertanto, necessari ulteriori sforzi per chiarire l'entità dell'influenza di tali variazioni sulla

migrazione degli additivi plastici e se queste condizioni possano produrre effetti cumulativi o interattivi dei leachate sulle specie e sugli ecosistemi di acqua dolce (Gunaalan et al., 2020).

1.5 IL MITILO MEDITERRANEO COME ORGANISMO MODELLO

1.5.1 Caratteri distintivi e anatomia di *Mytilus galloprovincialis*

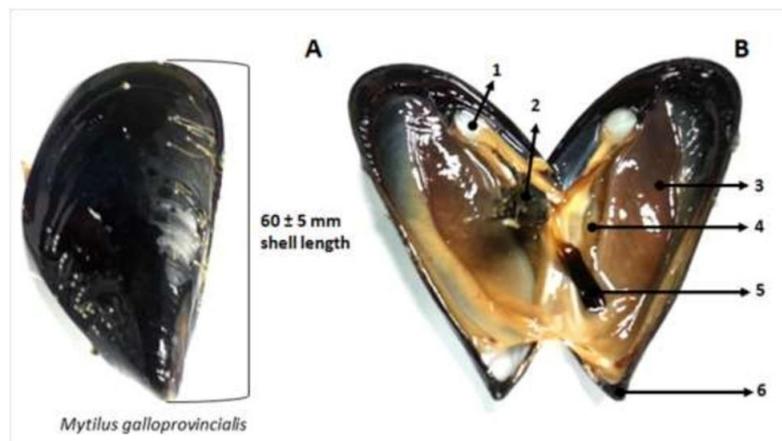


Figura 1.19: Anatomia di un esemplare adulto di mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) visto da due prospettive differenti: A) conchiglia chiusa; B) struttura interna del mitilo in cui figurano: muscolo adduttore posteriore (1), bisso (2), branchie (3), ghiandola digestiva (4), piede (5) e conchiglia (6).

Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819), esemplare originario del Mar Mediterraneo volgarmente denominato “cozza”, è un mollusco bivalve appartenente alla famiglia Mytilidae, ordine Mytiloida, classe Bivalvia, phylum Mollusca (Figura 1.19). Si tratta di un mollusco lamelibranco, vale a dire dotato di una conchiglia interamente rivestita da carbonato di calcio, costituita da due valve uguali, ciascuna delle quali presenta dei sottili cerchi concentrici rappresentanti le fasi di crescita. Dal punto di vista ecologico, *M. galloprovincialis* svolge il ruolo di filtratore sessile, colonizzando generalmente gli ambienti intertidali in cui vive ancorato a substrati duri per mezzo del bisso, un materiale filamentoso di natura corneo-elastica secreto da una ghiandola bissogena situata sul piede (Ceccherelli e Rossi, 1984). Esternamente l’animale presenta valve simmetriche di colore nero violaceo compresse lateralmente e tenute insieme da un legamento dentellato, detto cerniera, che, articolandosi, permette l’apertura delle valve, ed è sotto il diretto controllo di muscoli adduttori, di cui due anteriori ed uno posteriore. Il meccanismo di apertura e chiusura delle valve, comunemente definito “catch”, permette all’animale di trattenere il volume d’acqua necessario alla sopravvivenza nelle fasi di emersione. La posizione di chiusura viene normalmente mantenuta se l’animale si trova esposto temporaneamente all’aria, come avviene periodicamente nelle specie intertidali, o si trova in

presenza di condizioni ambientali avverse da cui si difende isolandosi temporaneamente. La presenza e lo sviluppo dei muscoli adduttori, valutabili anche dall'impronta sulla faccia interna della conchiglia, assume valore sistematico, così come la disposizione ed il numero dei dentelli della cerniera. Internamente, invece, le valve sono ricoperte dal mantello (o pallio), una massa tegumentale che svolge un ruolo cruciale nella sopravvivenza dell'organismo grazie all'accumulo di sostanze di riserva utilizzate soprattutto durante il processo di maturazione delle gonadi. Le branchie, situate in una cavità del mantello e aventi una struttura di tipo filamentoso, svolgono, come in tutti i lamellibranchi, la duplice funzione di garantire gli scambi gassosi e permettere, al contempo, la captazione delle particelle alimentari in sospensione. La filtrazione avviene per mezzo di un flusso unidirezionale di acqua garantito dall'azione modulata di un sifone inalante, che pompa l'acqua all'interno della cavità del mantello esponendola alla superficie branchiale, ed un sifone esalante, attraverso il quale l'acqua viene espulsa all'esterno. E' noto che, in condizioni normali, un mitilo di media dimensione, filtra all'incirca da 4 a 5 litri di acqua all'ora ed è in grado di trattenere il 90% delle particelle contenute in essa, che rientrano nella gamma delle dimensioni filtrabili (2-5 micron) (Mengoli, 1998). Le particelle alimentari parzialmente digerite vengono convogliate alla ghiandola digestiva, la quale consiste in una serie di diverticoli comunicanti con lo stomaco. Quest'ultimo consta di due regioni chiaramente differenziate: quella dorsale, nella quale sboccano l'esofago ed i condotti della ghiandola digestiva, e la regione ventrale a forma di sacca, nella quale si trova lo stilo cristallino, anch'esso ghiandolare, secernente una serie di enzimi, quali amilasi, cellulasi e lipasi (Thompson et al., 1974). La ghiandola digestiva dei molluschi costituisce il centro principale per la regolazione del metabolismo, in quanto partecipa ai meccanismi di difesa immunitaria e di regolazione omeostatica del mezzo interno, così come ai processi di disintossicazione e eliminazione degli xenobiotici (Moore e Allen, 2002). Infine, il materiale digerito viene convogliato nell'intestino fino a raggiungere l'apparato escretore collocato sotto la cavità pericardica. L'alimentazione dei molluschi bivalvi è microfaga, vale a dire a base di plancton e di piccole particelle organiche mantenute in sospensione nell'acqua (Mengoli, 1998). Il sistema circolatorio è di tipo aperto, mentre quello nervoso è costituito da gangli pari e da commisture anastomizzate che permettono l'innervazione dei diversi distretti corporei. Posto dorsalmente, in particolare, il cuore è composto da un ventricolo, il principale propulsore dell'emolinfa, e da due atri. I caratteri esterni non permettono la distinzione tra i due sessi, che invece si riconoscono dalla colorazione del mantello, la quale appare giallo crema nei maschi e rosso arancio nelle femmine. Inoltre, gli esemplari di tale specie presentano generalmente sessi

separati e una fecondazione esterna, con gonadi costituite da tessuto ghiandolare che si insinua tra gli organi digestivi e nel mantello.

1.5.2 Distribuzione e habitat di *Mytilus galloprovincialis*

La specie *M. galloprovincialis* è ritenuta autoctona delle coste del Mar Mediterraneo e del Mar Nero, nonostante abbia attualmente una vasta distribuzione nelle zone temperate di tutto il mondo (Bownes e McQuaid, 2006), essendo stata rinvenuta dal canale della Manica fino alle coste del Marocco, soprattutto in prossimità di grandi porti (Branch e Steffanni 2004). Tale diffusione, dovuta in gran parte al trasporto di acque di zavorra negli scafi delle imbarcazioni, ha permesso al *M. galloprovincialis* di insediarsi e colonizzare nuove zone, causando così non poche difficoltà alle comunità di mitili autoctone (Carlton, 1992; Robinson e Griffiths 2002; Geller, 1999). Esso si trova generalmente nella zona infralitorale, dal limite superiore della zona intertidale fino a profondità di qualche metro, dove vive in comunità particolarmente numerose, attaccato a materiali duri (rocce o pali) oppure a un'enorme varietà di substrati relativamente mobili in sospensione (corde galleggianti, frammenti di polistirolo, legname, boe in materiale plastico o in metallo, persino frammenti di buste di plastica), ai quali aderisce per mezzo del bisso. La salinità di crescita si aggira intorno al 28/34‰ (ottimale: 27/30‰), mentre l'optimum della temperatura oscilla tra gli 8°C e i 25°C. Grazie alle loro notevoli capacità di adattamento, i mitili sopravvivono facilmente all'interno di acquari e, come tali, si prestano ad indagini effettuate in laboratorio (Maire et al., 2007). Tuttavia, nonostante questo vantaggio apparente, possono comportarsi in modo diverso dai conspecifici selvatici se le condizioni sperimentali sono inappropriate, fornendo in tal caso risultati ben diversi dai desiderati (Robson et al., 2010).

1.5.3 Il mitilo come organismo sentinella

Oltre ad essere una specie edule di grandissimo interesse zootecnico, il mitilo mediterraneo figura tra le specie maggiormente utilizzate come bioindicatori dello stato ecologico degli ecosistemi marino costieri nei programmi di monitoraggio ambientale. Essendo un organismo filtratore sessile in grado di assimilare una vasta gamma di composti di natura antropica, offre la possibilità di effettuare una valutazione complessiva della contaminazione ambientale, soprattutto grazie alle ormai acquisite conoscenze riguardo i pattern che regolano le principali risposte fisiologiche della specie a fattori di stress di diversa natura. Con il termine di

“bioindicatore” o “organismo sentinella” si intende un organismo animale o vegetale sensibile alla contaminazione ambientale, in grado di fornire informazioni sulla qualità dell’ambiente in maniera chiara, ripetibile e misurabile (Bargagli et al., 1998). Requisiti fondamentali affinché una specie possa essere utilizzata come bioindicatore sono: la sensibilità all’ambiente contaminato, ma al contempo la resistenza in ambienti di scarsa qualità, l’ampia diffusione geografica (Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville, 2006), una relativa semplicità nella manipolazione (Nasci et al., 2002) e la capacità di sviluppare risposte sufficientemente rapide e ripetibili (Bargagli et al., 1998) unitamente ad una certa plasticità fisiologica, nonché la capacità di acclimatarsi alle condizioni ambientali. A tal proposito, lo stato sedentario o sessile, le abitudini alimentari preferibilmente di tipo filtratorio e la discreta conoscenza della fisiologia e delle risposte adattative hanno confermato in *M. galloprovincialis* un’elevata capacità di bioaccumulo e limitata capacità di metabolizzare gli xenobiotici, incrementando l’uso di questo organismo come indicatore della presenza di inquinanti nelle acque costiere (Geyer et al., 1982), nonché come importante strumento biotecnologico in quanto capace di fungere da “campanello d’allarme” dello stato ambientale, quando opportunamente monitorato. I mitili risultano, inoltre, facilmente allevabili in condizioni di laboratorio, ragion per cui vengono spesso impiegati in test ecotossicologici finalizzati a determinare eventuali correlazioni tra la presenza di specifici inquinanti nelle acque costiere e l’alterazione dei processi biologici che definiscono il ruolo ecologico della specie negli ecosistemi marini (Franzellitti et al., 2010).

1.6 I BIOMARKER

Per soddisfare la necessità di un’ampia ed accurata indagine del monitoraggio ambientale, l’ecotossicologia, allo stato attuale, presenta come sfida lo sviluppo di strumenti convenienti, più sensibili ed affidabili, aventi un’elevata rilevanza biologica ed ecologica, in grado di poter constatare in anticipo eventuali impatti prima che un disturbo irreversibile si possa verificare nell’ecosistema (Walker, 1998; Wadhia e Thompson, 2007; Martínez-Gómez et al., 2017). In tale prospettiva si inseriscono i biomarker, col cui termine si identificano le variazioni biochimiche, cellulari o fisiologiche che possono essere misurate in un organismo bioindicatore come risposta all’esposizione a composti inquinanti (Livingstone et al., 1997). L’obiettivo del monitoraggio ambientale è quello di stimare, prevedere e, di conseguenza, evitare eventi inaccettabili a livello ecologico, come l’insuccesso riproduttivo o l’incremento della mortalità nell’ambito di una popolazione, attraverso l’utilizzo di “segnali precoci” di esposizione o di

effetto. L'impiego di biomarkers permette, dunque, in primo luogo di diagnosticare, attraverso lo studio delle risposte immediate (induzione di sistemi detossificanti, inibizione di attività enzimatiche, formazione di prodotti metabolici, alterazioni al DNA, etc.) il tipo e/o i tipi di contaminanti ai quali l'organismo bioindicatore è sottoposto ed i livelli "semi-quantitativi" dell'esposizione, e successivamente, prevedere il verificarsi degli effetti negativi a lungo termine (Peakall e Shugart, 1993; Fossi e Leonzio, 1994; Fossi, 1998; Fossi, 2000). Nel momento in cui un composto tossico penetra in un ecosistema, sia questo marino, terrestre o d'acqua dolce, esso può provocare una serie d'alterazioni o danni a diversi livelli di complessità strutturale che vanno dal danno molecolare, fino a giungere ad alterazioni a livello di organismi, popolazioni o comunità (Stebbing, 1985) (Figura 1.20). Per questo motivo, la rilevazione precoce di una contaminazione risulta funzionale ad evitare che l'eventuale danno possa estendersi anche a livelli superiori dell'organizzazione biologica (Munkittrick e McCarthy, 1995).

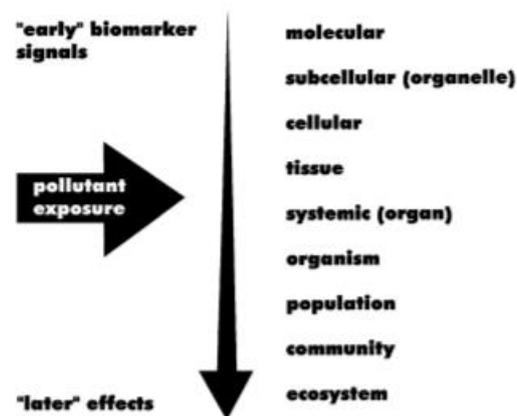


Figura 1.20: Schematizzazione della sequenza temporale con cui un inquinante induce risposte in un sistema biologico (Van Der Oost et al., 2003).

Nel caso di uno screening ambientale, i biomarker, definiti anche "sistemi di early warning", si rivelano strumenti utili allo scopo di compiere un'indagine preliminare volta a mettere in evidenza la presenza di una sostanza xenobiotica e prevedere l'impatto che questa potrebbe esercitare sull'ambiente, motivo per cui viene solitamente utilizzata una "batteria" di biomarker nel caso in cui non si conosca esattamente il tipo di contaminazione (Payne et al., 1987). L'utilizzo di biomarker negli studi ecotossicologici non può, tuttavia, prescindere dalla scelta a monte di un valido organismo bioindicatore, del quale è necessario conoscere approfonditamente gli aspetti biologici e fisiologici al fine di poter minimizzare la probabilità di incorrere in errori di valutazione dovuti a cause diverse dall'esposizione ad uno xenobiotico (Stegeman et al., 1992). Difatti, la valutazione degli effetti dei contaminanti di origine antropica

sulle comunità naturali risulta essere un problema di difficile soluzione a causa dei seguenti motivi (Peakall and Shugart, 1993; Fossi, 1998; Fossi, 2000):

- Esistono varie vie di assunzione dei composti inquinanti all'interno dell'organismo;
- I contaminanti mostrano una diversa biodisponibilità a seconda dei comparti ambientali in cui si trovano;
- Gli organismi sono generalmente esposti non ad un solo composto inquinante, bensì ad una miscela di contaminanti, i quali possono generare fra di loro diverse interazioni biochimiche e tossicologiche (sinergismi, antagonismi);
- Esiste un periodo di latenza molto lungo prima che si manifestino alterazioni a livello di popolazioni e comunità.

Per i medesimi motivi, la conoscenza approfondita dei cicli riproduttivi della specie bioindicatrice e delle sue caratteristiche fisiologiche permettono, unitamente ad un adeguato programma di campionamento, di eliminare totalmente o in parte tali fattori di disturbo. Inoltre, anche la presenza in certi casi di un'elevata variabilità interindividuale nella risposta dei biomarkers verso uno stesso livello di esposizione, può rappresentare, se non correttamente interpretato, un fattore di disturbo nella comprensione dei dati statistici. In accordo con l'NRC (1987) e con l'WHO (1993), i biomarker possono essere suddivisi in tre classi:

- **Biomarker di esposizione:** segnalano risposte relative alla prima interazione tra la molecola (inquinante o suo metabolita) ed il recettore biologico. Tramite quest'indice si individua l'avvenuta esposizione al contaminante;
- **Biomarker di effetto:** segnalano come un organismo, una popolazione o una comunità siano soggette ad effetti tossicologici da parte di uno o più inquinanti. Includono misure a livello biochimico, fisiologico o altre interazioni all'interno dei tessuti o fluidi corporei;
- **Biomarker di suscettibilità:** indicano la capacità intrinseca o acquisita di un organismo di rispondere ai cambiamenti in seguito ad esposizione a specifiche sostanze, includendo fattori genetici e cambiamenti dei recettori che alterano la suscettibilità di un organismo all'esposizione.

In funzione della loro "specificità" di risposta nei confronti di agenti inquinanti (McCarthy e Shugart, 1991) vengono, inoltre, distinti in:

- **Biomarker specifici:** indicano risposte molecolari e biochimiche che si manifestano in un organismo come risposta ad una specifica classe di contaminanti (ad esempio metallotioneine in risposta all'inquinamento da metalli). In questo caso, la risposta di difesa è estremamente specifica e indica chiaramente la classe di sostanze responsabile della contaminazione;
- **Biomarker generali:** indicano risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico, che non possono essere ricondotte ad una specifica classe d'inquinanti, ma rappresentano lo stato generale di stress dell'organismo (determinati danni al DNA, i disordini immunitari, gli indici somatici, la stabilità delle membrane lisosomiali etc).

I biomarker possono essere applicati su tre livelli gerarchici nei programmi di biomonitoraggio ambientale (McCarthy e Shugart, 1991): il primo stadio è rappresentato dall'identificazione del pericolo, un approccio, questo, solitamente applicato quando non si conosce la composizione della miscela contaminante. Attraverso l'individuazione del pericolo, diagnosticata mediante l'utilizzo dei biomarker generali, è poi possibile individuare la presenza o assenza di un rischio chimico. Il secondo stadio è la valutazione del pericolo, che si attua quando si conoscono a priori i potenziali inquinanti. In tal caso, utilizzando i biomarker specifici, è possibile identificare le classi dei contaminanti presenti, l'estensione e la gravità dell'area di contaminazione. Infine, l'ultimo stadio coincide con la previsione del rischio, nel qual caso le risposte dei biomarker possono suggerire potenziali conseguenze negative a lungo termine a livello di popolazione e di comunità.

1.6.1 Biomarker di alterazione lisosomiale

Gli studi di monitoraggio ambientale prevedono un primo livello di screening che consiste nell'utilizzo di biomarker generici aventi la caratteristica di fornire informazioni utili circa lo stato di salute dell'animale oggetto di indagine (Martínez-Gómez et al., 2017). Tra questi, si annoverano:

- **Stabilità delle membrane lisosomiali (LMS):** si tratta di un biomarker generico in grado di misurare l'efflusso del contenuto lisosomiale nel citosol che, in mitili esposti a stress ambientali, riflette un processo fisiologico in risposta a danni alla membrana e deterioramenti della pompa protonica (Svendsen et al., 2004; Martínez-Gómez et al., 2015). Ad una bassa mortalità generalmente corrisponde un aumento della stabilità delle

membrane lisosomiali, a dimostrazione del fatto che gli animali sono esposti ad un ambiente di discreta qualità;

- **Accumulo di lipidi neutri insaturi nei lisosomi:** tale modificazione del metabolismo è, in genere, correlata ad una alterazione dello stato redox cellulare e può essere messa in evidenza con una opportuna colorazione;
- **Rapporto lisosomi/citoplasma (Lys/Cyt):** l'ingrandimento dei lisosomi indica tossicità cellulare. Inoltre, l'aumento del volume lisosomiale è stato associato alla destabilizzazione delle membrane o all'incremento della permeabilità delle stesse.

1.6.2 Biomarker immunologici

Studi pregressi hanno segnalato che la presenza di contaminanti xenobiotici può influenzare negativamente il sistema immunitario degli organismi marini (Harvell et al., 1999), aumentando la suscettibilità agli agenti patogeni (Pipe e Coles, 1995). In quest'ottica, al fine di valutare i possibili effetti legati all'esposizione di leachate provenienti da quattro tipologie di bioplastica (PLA, BPT, SB, TR) nel mitilo mediterraneo *M. galloprovincialis*, si è fatto ricorso all'analisi dell'attività del lisozima come biomarcatore immunologico. E' noto che i bivalvi, in quanto invertebrati, mancano di una risposta immunitaria adattativa, ma possiedono un sistema immunitario innato abbastanza efficace per combattere e controllare numerose particelle estranee, compresi gli xenobiotici. La risposta immunitaria si espleta soprattutto attraverso la fagocitosi del materiale estraneo mediata dagli emociti, la produzione di enzimi idrolitici (lisozima), di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROS) e di fattori umorali (opsonine e agglutinine) (Canesi et al., 2002). Gli emociti, nonché le cellule dell'emolinfa, fluido circolante che pervade la maggior parte degli organi interni, svolgono svariate funzioni, in particolare costituiscono il sistema immunitario e rivestono un ruolo di primo piano nell'accumulo di sostanze nutritive, di prodotti del metabolismo e dei pigmenti respiratori. Il lisozima, impegnato nella difesa cellulare e umorale contro una vasta gamma di agenti estranei, è stato identificato e caratterizzato in una varietà di invertebrati, dove viene sintetizzato in seguito ad infezioni e lesioni (Malham et al., 1998). Si tratta di una proteina in grado di tagliare alcune molecole che si trovano sulla parete dei batteri, per cui, sfruttando la capacità batteriolitica di questo enzima, è possibile determinare la sua attività nei campioni di emolinfa sia trattati che di controllo. Una riduzione dell'attività del lisozima suggerisce l'immunosoppressione. Quando le cellule sperimentano un sovraccarico di prodotti di degradazione, possono verificarsi profonde

alterazioni strutturali della membrana lisosomiale che determinano, a loro volta, la perturbazione dei naturali processi di degradazione e digestione intracellulare. Se protratta nel tempo, questa condizione può avere come peggiore conseguenza la comparsa di fenomeni più o meno generalizzati di necrosi cellulare dovuta alla diffusione degli enzimi idrolitici nel citoplasma, cui seguirebbero importanti ripercussioni sullo stato nutrizionale degli individui esposti alle fonti inquinanti (UNEP/RAMOGE, 1999).

1.6.3 Biomarker di stress ossidativo e neurotossicità

Il meccanismo situato alla base della maggior parte dei saggi che impiegano biomarcatori di stress ossidativo è legato al cambiamento nell'attività del sistema di difesa dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Lo stress ossidativo rappresenta l'espressione biologica di un danno che si verifica nel momento in cui i fattori pro-ossidanti superano le difese antiossidanti (Storz e Imlay, 1999). L'equilibrio esistente in condizioni fisiologiche può essere turbato sia da fattori che potenziano la produzione di specie reattive dell'ossigeno, sia da fattori che riducono l'attività dei sistemi di difesa antiossidanti dell'organismo. I mitili, in quanto organismi filtratori, accumulano una notevole varietà di sostanze presenti nell'ambiente, alcune delle quali inducono un aumento della produzione di radicali nell'organismo (Winston e Di Giulio, 1991). La tossicità dell'ossigeno è definita come la causa degli effetti citotossici delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), noti anche come intermedi reattivi dell'ossigeno, radicali liberi dell'ossigeno o ossidoradicali (Di Giulio et al., 1989; Halliwell e Gutteridge, 1999). Pertanto, l'esposizione ad elevate concentrazioni di queste sostanze può alterare l'equilibrio tra pressione pro-ossidante e difese antiossidanti inducendo l'instaurarsi di una condizione di stress ossidativo nei mitili. Tra i numerosi biomarker suscettibili di modifica in risposta allo stress ossidativo, quelli scelti per le analisi del presente studio includono:

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

- **Attività della Catalasi (CAT):** la catalasi è un enzima antiossidante appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, considerato di difesa, in quanto coinvolto nei processi di detossificazione. La misura dell'attività di questo enzima permette di individuare un eventuale stress ossidativo causato da agenti xenobiotici (Viarengo et al., 2007). Nei molluschi bivalvi, un aumento dell'attività catalitica è stato segnalato in un discreto numero di studi quando un eccesso di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) era presente (Pellerin-Massicotte 1997; Cheung et al., 2004). Precedentemente alcuni studi hanno indicato un'induzione dell'attività della CAT in *M. galloprovincialis* in seguito all'esposizione a metalli pesanti (Vlahogianni et al., 2007);
- **Contenuto di Malondialdeide (MDA):** la malondialdeide, che costituisce il principale prodotto intermedio della perossidazione lipidica a carico delle membrane biologiche, è una molecola sovente utilizzata come indicatore della presenza di un danno ossidativo. Il livello di MDA è stato misurato nei molluschi bivalvi, specialmente in mitili, per studiare la risposta del biomarker in presenza di radicali liberi sotto diverse esposizioni di metalli (Roméo e Gnassia-Barelli, 1997; Geret et al., 2002 a,b);
- **Accumulo di lipofuscine nei lisosomi:** l'alterazione dello stato redox dei lisosomi è segnalata dall'accumulo di lipofuscine, dette anche "pigmenti dell'invecchiamento", presenti all'interno dei lisosomi, che si originano dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi di cui sono ricchi i tessuti e rappresentano il prodotto terminale della perossidazione lipidica;
- **Attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE):** l'acetilcolinesterasi è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi coinvolto nella trasmissione dell'impulso nervoso, che catalizza l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina, utilizzato come un biomarcatore specifico di neurotossicità. La sua inibizione è causata principalmente dall'esposizione agli organofosfati e pesticidi (Fulton e Key, 2001), sebbene sia stato dimostrato che anche altre sostanze chimiche, quali metalli pesanti e IPA, possano inibire l'attività di AChE (Guilhermino et al., 1998; Akcha et al., 2000; Brown et al., 2004) negli invertebrati. L'enzima è stato caratterizzato anche nei molluschi, ad esempio in *Ostrea edulis* (Valbonesi et al., 2003). Alcune specie di bivalvi, tuttavia, presentano un'attività AChE minima, come nel caso di *Tapes philippinarum* (Valbonesi et al., 2003). Senza ulteriori prove, AChE dev'essere considerato, per ora, un biomarcatore a bassa sensibilità di stress nei molluschi bivalvi, la cui variazione nell'attività deve essere correlata agli effetti neurotossici a livello di organismo (Viarengo et al., 2007).

CAPITOLO 2

2. SCOPO DELLA RICERCA

Pur essendo fruitori di una vasta gamma di servizi ecosistemici di rilievo, tra cui la fornitura di cibo, lo stoccaggio del carbonio e benefici culturali legati ad opportunità ricreative e spirituali (Worm et al., 2006; Liqueste et al., 2013), gli ecosistemi marini risultano fortemente minacciati dall'inquinamento da plastica, che, ad oggi, costituisce una minaccia di dimensioni planetarie ben accertata (Geyer et al., 2017; Beaumont et al., 2019). Si stima, infatti, che circa 4,8-12,7 milioni di tonnellate di plastica siano entrate negli oceani da fonti terrestri solo nel 2010, motivo per cui si prevede che tale flusso aumenterà di un ordine di grandezza entro il prossimo decennio (Jambeck et al., 2015). A tale problematica si aggiungono, poi, le conseguenze derivate dai processi di progressiva frammentazione delle materie plastiche in acqua, cui segue la lisciviazione di additivi chimici, alcuni dei quali, denominati “leachates”, sono stati riconosciuti come contaminanti emergenti a causa dell'assenza di soglie di sicurezza ambientale atte a limitarne gli impatti potenzialmente deleteri su flora e fauna marina (Gunaalan et al., 2020). Recentemente, una promettente ascesa vede protagonista l'industria delle bioplastiche, lunghe catene di polimeri composte in tutto o in parte da risorse rinnovabili, i cui obiettivi rientrano all'interno di un piano volto all'insediamento di un'economia circolare, basata sulla riduzione nell'utilizzo di materie prime di origine fossile così come delle emissioni a effetto serra, allo scopo di generare benefici per la salute ed il clima (Karan et al., 2019). Secondo le stime più recenti provenienti da European Bioplastics, infatti, la capacità di produzione globale di bioplastiche potrebbe incrementare di un tasso pari al 36%, passando da circa 2,11 milioni di tonnellate nel 2020 a circa 2,87 milioni di tonnellate nel 2025. Se da un lato sono noti gli effetti prodotti dai leachate da plastica su determinati organismi acquatici (Gunaalan et al., 2020; Lithner et al., 2012; Rendell-Bhatti et al., 2021), dall'altro, invece, risultano assenti o di recente avvio studi concernenti la caratterizzazione chimica e tossicologica dei bio-leachate. A fronte di tali evidenze scientifiche, lo scopo della presente ricerca consiste nel valutare i potenziali effetti avversi registrati su esemplari adulti di mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) esposti per una durata complessiva di 7 giorni a leachate derivanti da 3 tipologie di bioplastiche, quali acido polilattico (PLA), Bio-PET (BPT) e un biopolimero a base di amido (Starch-blend SB), comparati con leachate derivanti dalla convenzionale gomma per pneumatici (TR). Condotta in un ambiente controllato, l'esperimento ha previsto la scelta di una concentrazione di leachate pari allo 0,6% del volume in cui i mitili sono stati allevati, che

rappresenta il dosaggio più basso a cui sono stati osservati effetti significativi dei bio-leachate in larve di mitilo utilizzate in studi embrio-tossicologici pregressi (Capolupo et al., 2020). Possibili effetti subletali dei leachate da bioplastiche sono stati valutati in tessuti di ghiandola digestiva e branchie utilizzando una batteria di 9 biomarker, selezionati come indicatori di alterazione lisosomiale, di stress ossidativo e neurotossicità, mentre la capacità di risposta del sistema immunitario dei mitili è stata misurata, esaminando gli emociti, tramite l'analisi dell'attività del lisozima. In particolare, i biomarker sono stati utilizzati allo scopo di ottenere informazioni di diverso tipo:

- sullo stato di salute generale degli organismi, valutato mediante un biomarker di citotossicità quale la stabilità delle membrane lisosomiali (LSM) con il metodo del Neutral Red Retention (NRRA);
- su eventuali alterazioni dei compartimenti lisosomiali, tramite l'analisi del contenuto di lipidi neutri insaturi (LN) e il rapporto lisosomi/citoplasma (Lys/cyt);
- sul compartimento di difesa allo stress ossidativo, tramite il saggio dell'attività specifica della Catalasi (CAT) e della Glutathione S-transferasi (GST);
- sui prodotti intermedi e finali della perossidazione lipidica, come malondialdeide (MDA), lipofuscine (LF);
- sul funzionamento dei processi di origine nervosa, valutato mediante un biomarker di risposta specifica quale l'attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE).

Ulteriori analisi riguardanti la composizione chimica di ciascun bio-leachate hanno permesso di correlare gli eventuali effetti osservati allo specifico composto, metallo e/o additivo in esso contenuto. Infine, i risultati relativi a ciascun biomarker utilizzato sono stati integrati mediante l'utilizzo del Mussel Expert System (MES), che ha permesso di classificare il livello di stress ambientale sperimentato dai mitili esposti a ciascun trattamento effettuato.

CAPITOLO 3

3. MATERIALI E METODI

3.1 PREPARAZIONE DEI BIO-LEACHATE

Per la fase preliminare di preparazione dei bio-leachate, si è fatto ricorso ai protocolli standardizzati di riferimento per i test ecotossicologici descritti da Capolupo et al. (2020). I leachate derivanti da ciascuna delle tre bioplastiche utilizzate (PLA, BPT, SB) e dalla gomma per pneumatici (TR) sono stati generati in acqua di mare, precedentemente regolata alla temperatura di 20°C. Dopo aver frammentato i polimeri (in frammenti di circa 3-5 mm di diametro), essi sono stati aggiunti ad acqua di mare microfiltrata per un rapporto polimero/acqua di 80 g/L. I campioni sono stati poi messi in agitazione in un incubatore rotante (125 rpm) a temperatura ambiente (~25°C) per un arco temporale di 14 giorni al buio. Al momento del campionamento, i leachate ottenuti sono stati isolati mediante filtrazione su filtro sterile di dimensioni 0,22 µm.

3.2 ANALISI CHIMICHE DEI BIO-LEACHATE

L'analisi chimica relativa al contenuto dei leachate utilizzati (PLA, BPT, SB, TR) è stata effettuata in GC-MS dai ricercatori del Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari" (Campus di Rimini) mediante un protocollo di screening non-target, basato sulla misurazione dei picchi e confronto con specifiche librerie al fine di proporre in via preliminare l'identificazione delle sostanze organiche, inclusi sottoprodotti di degradazione o metaboliti, potenzialmente trascurate. Quest'ultima risulta essere funzionale a correlare gli eventuali effetti osservati in ciascun trattamento agli specifici composti e/o additivi contenuti nei leachate e confrontare i dati ottenuti. I valori di concentrazione del Bisfenolo A (BPA) contenuto in ognuno dei leachate testati sono stati, poi, ottenuti in seguito ad analisi in HPLC-MS/MS, che hanno previsto l'utilizzo di standard interni. Il limite di quantificazione (LOQ) per questo tipo di analisi è stato 0.032 µg/L. Parallelamente, i leachate generati da ciascun biopolimero utilizzato sono stati sottoposti ad uno screening elementare eseguito dalla ditta LAV s.r.l. di Rimini mediante ICP/MS (ISO 17294-2:2016) al fine di determinarne il contenuto in termini di metalli.

3.3 ESPOSIZIONE DEI MITILI AL TRATTAMENTO CON BIO-LEACHATE

Gli esemplari adulti sessualmente maturi di *M. galloprovincialis* oggetto di indagine (5-6 cm di lunghezza) derivano da un allevamento situato in Mar Adriatico a largo delle coste di Cesenatico (Forlì-Cesena). Inizialmente, sono stati scelti circa 300 individui adulti, posizionati in 6 vasche contenenti 50 mitili ciascuna, areate con diffusori a pietra porosa in ambiente termostato alla temperatura di 16 °C. I mitili sono stati mantenuti in queste condizioni per una durata complessiva di 3 giorni necessari a favorirne l'acclimatazione, così come a consentire l'individuazione ed eventuale eliminazione di esemplari in stato di salute non idoneo. Successivamente, sono stati allestiti 4 trattamenti sperimentali (Figura 3.1), ognuno dei quali è stato realizzato in triplicato (N=3) all'interno di vasche contenenti 15 mitili ciascuna in un volume complessivo di 7 litri d'acqua di mare mantenuta in condizioni costanti di areazione e temperatura (16°C) (Figura 3.2). In tal modo, gli individui sono stati esposti ad una concentrazione di bio-leachate pari allo 0,6% del volume di acqua in cui sono stati allevati, corrispondente al valore di diluizione più basso a cui sono stati osservati effetti significativi in larve di mitilo utilizzate in studi embrio-tossicologici pregressi (Capolupo et al., 2020). Più precisamente, in ciascuna vasca sono stati somministrati giornalmente 42 ml (6 ml per ogni litro) di leachate derivanti da tre tipologie di bioplastiche, quali acido polilattico (PLA), Bio-PET (BPT) e un biopolimero a base di amido (Starch-blend, SB), unitamente a leachate derivanti dalla convenzionale gomma per pneumatici (TR). L'esposizione ai contaminanti si è protratta per 7 giorni, durante i quali sono stati effettuati cambi d'acqua giornalieri seguiti dal ripristino delle concentrazioni di leachate selezionate. Ad ogni cambio d'acqua e in concomitanza con la somministrazione dei leachate, i mitili sono stati alimentati con microalghe della specie *Nannochloropsis oculata* (1,2 milioni di cellule/litro). Oltre ai trattamenti, sono state previste tre vasche di controllo (CTR) contenenti 7 litri d'acqua di mare in cui i mitili non sono stati esposti ai bio-leachate.

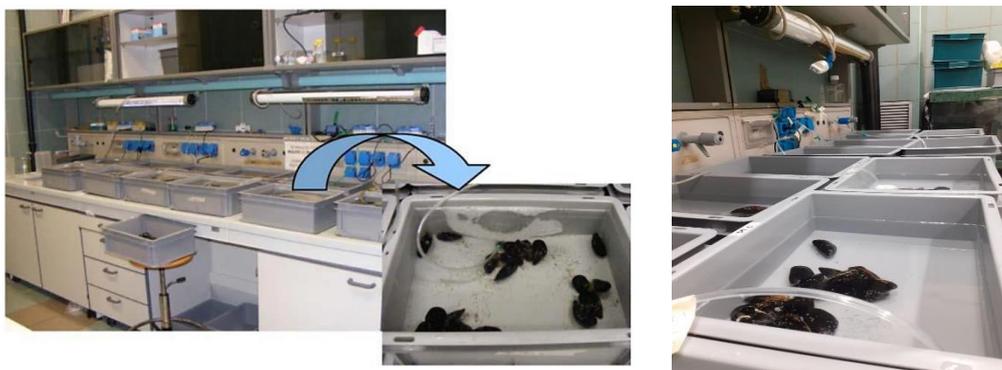


Figura 3.1: Vasche contenenti i mitili esposti ai diversi bio-leachate in camera termostata (16°C).

Una volta terminata la fase di esposizione, si è proceduto al campionamento dei tessuti. In particolare, ai fini delle nostre analisi, per ogni vasca è stato scelto un pool di 5 mitili dai quali è stata prelevata l'emolinfa mediante l'ausilio di una siringa ipodermica da 2.5 mL, contenente una piccola quantità (100 µL) di soluzione fisiologica, mentre i restanti 10 individui sono stati sottoposti a dissezione con il conseguente prelievo di ghiandola digestiva e branchie, che sono stati, infine, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C sino al momento del loro utilizzo. Per la valutazione del rapporto lisosomi/citoplasma, dei lipidi neutri e delle lipofuscine, le ghiandole digestive di 4 mitili per vasca sono state prelevate, posizionate su supporti metallici per le analisi al criostato (chucks) e congelate con N-esano pre-raffreddato in azoto liquido a -70°C, per poi essere immediatamente conservate a -80°C.



Figura 3.2: Impostazione del disegno sperimentale. I trattamenti sono stati effettuati in triplicato (N=3) all'interno di vasche, ciascuna delle quali contenente 15 mitili immersi in 7 litri d'acqua di mare.

3.4 STABILITA' DELLE MEMBRANE LISOSOMIALI

Il Neutral Red Retention Assay è stato usato per valutare la stabilità delle membrane lisosomiali (Lysosomal membrane stability, LMS) negli emociti dei mitili esposti. Il metodo si fonda sul principio secondo cui il colorante Neutral Red (NR), somministrato agli emociti vitali, viene immagazzinato all'interno dei compartimenti lisosomiali e trattenuto per un certo intervallo di tempo, che può arrivare fino a 180 minuti quando le cellule sono in buono stato di salute. Il NR è un colorante cationico debole, lipofilo e amminico, capace di penetrare liberamente le membrane cellulari per diffusione non ionica per poi essere catturato per protonizzazione dai lisosomi, al cui interno tende ad accumularsi, legandosi ai siti anionici sulla matrice lisosomiale. L'ambiente acido di tali organelli, che favorisce l'intrappolamento del colorante al loro interno, è mantenuto da una pompa protonica di membrana Mg^{2+} -ATPasi dipendente, che trasporta quindi H^+ . Danni alla membrana, causati dall'impatto di agenti citotossici, diminuiscono i tempi di ritenzione del NR, inducendo la fuoriuscita delle sostanze contenute all'interno dei lisosomi: una volta destabilizzati, i lisosomi si fondono assieme, formando strutture lisosomiali più grandi e il colorante viene riversato all'interno del citosol (Lowe e Pipe, 1994). Il protocollo del NNRA ha previsto, innanzitutto, il prelievo dell'emolinfa dal muscolo adduttore posteriore dei mitili (Figura 3.3), come descritto precedentemente.



Figura 3.3: Prelievo di emolinfa dal muscolo adduttore posteriore di un esemplare adulto di *M. galloprovincialis* per la successiva analisi del Neutral Red Retention Assay (NRRA).

In seguito, si è proceduto alla preparazione dei vetrini distribuendo su questi ultimi 5 μ L di poli-L-lisina (0,1%), utile a favorire l'adesione degli emociti, a cui sono stati aggiunti 40 μ L di emolinfa posti al centro del vetrino. Si sono, poi, lasciate aderire le cellule al vetrino per 30 minuti in una camera umida (20°C) al buio. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono stati aggiunti 40 μ L di NR in corrispondenza dello strato di emociti adesi al vetrino, lasciando il tutto in incubazione per 15 minuti al buio all'interno di una camera umida. Inclinato nuovamente il vetrino al fine di eliminare il liquido eccedente, si è aggiunto, infine, il vetrino

coprioggetto. I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico (Zeiss, Axioscop 40) ad intervalli di 15 minuti al fine di misurare la ritenzione del colorante nei lisosomi degli emociti. I dati sono stati espressi in “Neutral Red Retention Time” (NRRT), che rappresenta il tempo (in minuti) in cui più del 50% delle cellule mostra una perdita di colorante dovuta alla destabilizzazione delle membrane lisosomiali o anomalie come fusione o ingrandimento lisosomiale (Moore et al., 2008).

3.5 ANALISI ISTOCITOCHIMICHE

Il contenuto intra-lisosomiale di lipidi neutri (LN) e lipofuscine (LF), così come il rapporto lisosomi/citoplasma (LYS/CYT), sono stati analizzati in preparati istologici di ghiandola digestiva di mitilo. Nello specifico, tali biomarker sono stati analizzati in sezioni di ghiandola digestiva di mitilo dello spessore di 10 µm ottenute tramite criostato (Microm, HM505 N) e fatte aderire a vetrini per microscopia ad una temperatura di -25°C. Per ognuno dei parametri è stato utilizzato un protocollo di colorazione selettiva seguito da valutazione al microscopio e successiva analisi di immagine, come di seguito descritto.

3.5.1 CONTENUTO DI LIPIDI NEUTRI

La valutazione dei LN accumulati nei lisosomi è stata effettuata seguendo quanto riportato da Donnini et al. (2007). I vetrini contenenti le sezioni di ghiandola digestiva di mitilo sono stati fissati in una soluzione di Ca-formolo per 15 minuti a 4°C e, una volta eliminato il fissante, immersi in una soluzione di Trietilfosfato 60% per 3 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, si è proceduto ad esporre le sezioni ad una soluzione all'1% del colorante ‘Oil Red’ per 15 minuti al buio a temperatura ambiente e, di seguito, nuovamente a Trietilfosfato 60% per 30 secondi al fine di fissare il colorante. Effettuati dei risciacqui in acqua distillata, i tessuti sono stati fissati con gel di glicerina e coperti con i rispettivi vetrini coprioggetto.

3.5.2. ACCUMULO DI LIPOFUSCINE

Il contenuto di LF all'interno dei lisosomi delle ghiandole digestive è stato valutato mediante l'utilizzo del reattivo di Schmorl (Pearse, 1972). I tessuti adesi ai rispettivi vetrini sono stati fissati con una soluzione di Ca-Formolo per 15 minuti e immersi in una soluzione 3:1 di Cloruro di Ferro FeCl₃ 1% e Potassio Ferrocianuro Fe (KCN)₆ 1% (reattivo di Schmorl) a temperatura ambiente per 5 minuti, al buio. In seguito, i campioni sono stati esposti ad acido acetico CH₃COOH 1% per 1 minuto al fine di fissare il colorante. Dopo aver sciacquato i vetrini con

acqua distillata, questi sono stati lasciati asciugare, fissati con gel di glicerina e coperti con vetrini coprioggetto.

3.5.3. RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA

Il protocollo riportato da Capolupo et al. (2016) è stato utilizzato per la valutazione del LYS/CYT nelle ghiandole digestive dei mitili esposti ai trattamenti selezionati. I vetrini contenenti le sezioni di ghiandola digestiva sono stati immersi in una soluzione di Polypep 7% e Naftol 0,04%, in buffer citrato 0,1M (pH 4.5), ed incubati in agitazione a 37°C in bagno termostato per 20 minuti. Rimossa la soluzione Polipep+Naftol, i vetrini sono stati lavati con NaCl 3% a temperatura ambiente ed esposti ad una soluzione del colorante Fast Violet per 10 minuti a temperatura ambiente al buio. Successivamente, i vetrini sono stati sciacquati per 5 minuti sotto l'acqua corrente, fissati con gel di glicerina e coperti con vetrini coprioggetto.

3.5.4 ANALISI D'IMMAGINE DEI VETRINI

I vetrini ottenuti per la valutazione di LN, LF e LYS/CYT sono stati analizzati ad un ingrandimento di 20× mediante un microscopio ottico (Zeiss, Axioskop 40) collegato ad una telecamera, grazie alla quale sono state scattate 4 fotografie per ghiandola, per un totale di 16 immagini per vetrino. Successivamente, l'analisi di immagine è stata eseguita con l'ausilio del software ScionImage 4.0 che ha permesso di determinare la superficie colorata di ciascuna sezione di ghiandola, proporzionale alla quantità di LN e LF all'interno dei lisosomi, nonché al rapporto tra lisosomi e citoplasma.

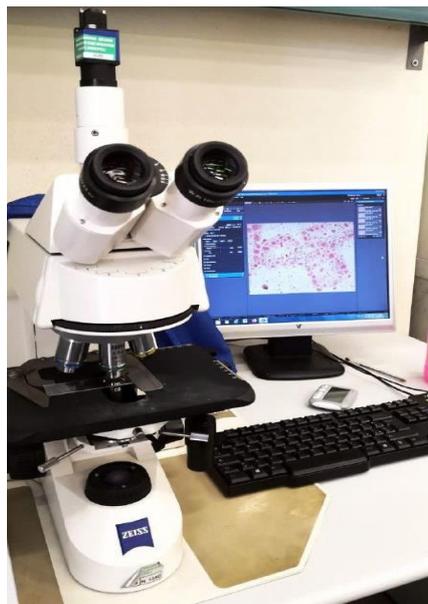


Figura 3.4: Microscopio elettronico Zeiss, Axioshop 40 e visualizzazione di tubuli di ghiandola digestiva di mitilo colorati con Oil Red 1%.

3.6 BIOMARKER IMMUNOLOGICI

3.6.1 Analisi dell'attività del lisozima

L'attività del lisozima è stata analizzata mediante spettrofotometria secondo il metodo di Chu e La Peyre (1989), utilizzando una sospensione di batteri appartenenti alla specie *Micrococcus lysodeikticus*. Il metodo si basa sul calo graduale di assorbanza a 450 nm proporzionato all'attività litica del lisozima contenuto nel siero di emolinfa di mitilo nei confronti del batterio sopracitato. L'emolinfa prelevata dai mitili è stata centrifugata a 400 xg per 10 minuti a 4°C al fine di separare gli emociti dal siero. A parte, cellule batteriche di *M. lysodeikticus* sono state risospese in tampone fosfato 0,066 M a pH 6.24 conservato a 25°C fino ad ottenere una soluzione contenente 9 mg di batteri liofilizzati su 100 mL di tampone. Successivamente, il siero prelevato da ogni campione (60 µl) è stato addizionato alla soluzione (540 µl) contenente *M. lysodeikticus* (rapporto siero: batteri 1:10) all'interno di cuvette, le quali sono poi state sottoposte a lettura spettrofotometrica a 450 nm ad intervalli di 1 minuto per un totale di 8 minuti. L'attività è stata espressa in Unità (U) su g di proteine secondo il protocollo ufficiale Sigma (Milano, Italia), in cui 1 U viene considerata l'attività di enzima in grado di determinare una diminuzione di assorbanza pari allo 0,001. I dati sono stati espressi come unità di lisozima per g di proteine di emolinfa. La concentrazione totale di proteine nell'emolinfa è stata misurata con il metodo Lowry et al. (1951).

3.7 BIOMARKER DI STRESS OSSIDATIVO E NEUROTOSSICITA'

3.7.1 Preparazione dei campioni

I parametri correlati all'eccesso di specie reattive dell'ossigeno, nonché alla presenza di eventuali composti neurotossici, sono stati valutati spettrofotometricamente previa omogenazione dei tessuti, centrifugazione e recupero del sovranatante, sulla base di protocolli precedentemente validati nel mitilo.

Per le analisi di catalasi (CAT) e glutatione S-transferasi (GST), i tessuti sono stati trattati come riportato da Mimeault et al. (2006). Per ciascun trattamento, un pool di tessuti di 3 branchie e di 3 ghiandole digestive di mitilo per ognuna delle tre repliche (per un totale di 600 mg per pool di tessuto) sono stati omogenati in 5 volumi di tampone potassio-fosfato KPB (Kalium Phosphate Buffer, 50 mM a pH 7), contenente acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 0.5 mM, e 1 µL di cocktail di inibitori delle proteasi ogni 100 mg totali di tessuto. I tessuti sono

stati omogenati tramite un omogenizzatore Ultra TURRAX © (Figura 3.5) e centrifugati a 15.000 xg (13000 rpm) a 4°C per 15 minuti.

Per la valutazione del contenuto di malondialdeide (MDA), pool di 3 ghiandole digestive di mitilo per ciascuna replica (circa 1 g di tessuto complessivo per trattamento) sono stati omogenati in due volumi di tampone di lisi (Tris-HCL 20 mM, 0,1% di β -mercaptoetanol, pH 7,4) e centrifugati a 10.000 xg per 20 minuti a 4 °C.

L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE) è stata valutata in pool di branchie prelevate da 3 mitili per replica sperimentale. I tessuti sono stati omogenati in 4 volumi di tampone fosfato PBS (Phosphate Buffered Saline, 0.1M a pH 7,4) utilizzando un omogenizzatore di tipo POTTER- ELVEHJEM. L'omogenato ottenuto è stato centrifugato a 9.000 xg a 4°C per 30 minuti ed il sovrinatante prelevato da ciascun campione.

Per tutti i biomarker sopracitati, il sovrinatante ottenuto è stato in parte diluito 1:10 in NaOH 1N per il dosaggio delle proteine (effettuato mediante metodo di Lowry et al., 1951) ed in parte aliquotato e congelato a -80°C per essere successivamente saggiato come descritto di seguito.



Figura 3.5: Potter di omogeneizzazione dei tessuti Ultra TURRAX ©.

3.7.2 Determinazione dell'attività specifica di CAT

L'attività specifica dell'enzima CAT nelle ghiandole digestive e nelle branchie di mitilo è stata determinata attraverso l'utilizzo di uno spettrofotometro (Beckman Coulter, DU 800 Spectrophotometer, Figura 3.6), che ha permesso di valutare la diminuzione dell'assorbanza dovuta al consumo del perossido di idrogeno. I campioni di sovrinatante precedentemente aliquotati sono stati aggiunti ad una soluzione di H₂O₂ 55 mM preparata in buffer potassio-

fosfato KPB in cuvette di quarzo. Successivamente l'assorbanza dei campioni è stata letta a 240 nm a 25°C e la reazione è stata seguita per 2 minuti. L'attività enzimatica è stata espressa in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ di proteine totali.



Figura 3.6: Spettrofotometro Beckman Coulter, DU 800 Spectrophotometer.

3.7.3 Determinazione dell'attività specifica di GST

L'attività specifica dell'enzima GST nelle ghiandole digestive e nelle branchie di mitilo è stata determinata spettrofotometricamente seguendo quanto riportato da Martin-Diaz et al. (2009). I campioni precedentemente aliquotati sono stati aggiunti ad una soluzione contenente 1.1 mM 1-Cl-2,4-dinitrobenzene CDNB 0,8M preparata in buffer potassio-fosfato. Immediatamente prima della lettura in spettrofotometro (Biotek EL 808, Figura 3.7), ai campioni è stato aggiunto il substrato glutatione ridotto (GSH) 110mM. La reazione è stata seguita per 10 minuti tramite lettura a 340 nm e l'attività enzimatica è stata espressa in $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ di proteine totali.



Figura 3.7: Lettore spettrofotometrico per micropiastre Biotek EL 808.

3.7.4 Determinazione del contenuto di malondialdeide (MDA)

Il contenuto di MDA nella ghiandola digestiva di mitilo è stato analizzato secondo il metodo di Banni et al. (2007). Il principio del metodo si basa sulla reazione di coniugazione della malondialdeide con 1-metil-2-fenilindolo (NMPI), che dà luogo alla formazione di un composto con assorbanza rilevabile a lunghezze d'onda $\lambda=586$ nm. I campioni sono stati dunque aggiunti a NMPI 10.3 mM in presenza di HCl ad una concentrazione di 10.1 N. Successivamente la reazione di coniugazione è stata condotta per 40 minuti a 45°C in un bagnetto termostato a lenta agitazione (Figura 3.8). Dopo aver centrifugato i campioni a 15.000 xg per 10 minuti a temperatura ambiente, il surnatante è stato letto a 586 nm in lettore spettrofotometrico per micropiastre (Biotek EL 808) (Figura 3.7). La concentrazione di MDA nei campioni è stata valutata utilizzando una curva di calibrazione di standard di TMOP (1,1,3,3-tetrametossipropano). Il risultato finale è stato espresso in nmol MDA/mg proteine.



Figura 3.8: Bagno termostato ad agitazione regolabile.

3.7.5 Determinazione dell'attività specifica di AChE

L'attività enzimatica dell'AChE è stata valutata nelle branchie dei mitili seguendo il metodo di Ellman (Ellman et al., 1961) ottimizzato per i bivalvi, applicato ai campioni di branchie precedentemente preparati (vedi paragrafo 3.7.1). Il metodo consiste nella misurazione spettrofotometrica del prodotto della reazione tra l'enzima AChE presente nelle emibranchie di mitilo e il substrato acetilcolina, in presenza del reagente di Ellman (DTNB: acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico). Nel saggio è stata utilizzata una quantità di campione tale che nel volume finale fossero presenti 0,5 mg/mL di proteine precedentemente determinate con il

metodo di Lowry et al. (1951). Ad ogni campione sono stati addizionati 50 μ L di DTNB 0.3 mM, a cui è stato poi aggiunto il tampone fosfato PBS (Phosphate Buffered Saline) 0.1M a pH 7.4 e acetiltiocolina 0.5 mM. La tiocolina prodotta riduce il reattivo DTNB, che libera nitrobenzoato (TNB), fornendo una colorazione gialla. La lettura dell'assorbanza a 405 nm per 10 minuti è stata eseguita utilizzando il lettore per micropiastre (Biotek EL 808) (Figura 3.7). I dati sono stati espressi in nmol/min/mg di proteine.

3.8 ANALISI STATISTICA E INTEGRAZIONE DEI DATI

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante l'utilizzo del software SigmaPlot 13.0. Differenze significative tra i campioni trattati ed i controlli sono state determinate attraverso un'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA), seguita da confronti multipli a coppie eseguiti con il test post-hoc di Dunnett. Per tutte le analisi effettuate, le differenze tra i dati sono state ritenute statisticamente significative per valori di $p < 0,05$. I risultati di ciascun biomarker sono stati successivamente integrati mediante l'utilizzo del Mussel Expert System (MES) sviluppato da Dagnino et al. (2007). Si tratta di uno strumento in grado di elaborare i risultati dei singoli biomarker misurati nel mitilo e di integrare le informazioni elaborate, classificando il livello di stress indotto da ciascun trattamento effettuato. Il sistema utilizza le risposte dei biomarker a diversi livelli di organizzazione biologica, partendo da quello cellulare fino al livello di intero organismo. Tali dati sono classificati considerando che i cambiamenti nei valori dei singoli biomarker lungo un gradiente di stress producono tendenze caratteristiche, come profili di risposta crescenti, decrescenti o a campana. Variazioni significative rispetto ai campioni di controllo vengono elaborate dal sistema per ottenere un fattore di alterazione (AF), che rappresenta il rapporto tra le medie di quello specifico valore e le medie del rispettivo controllo. Pertanto, viene generato un livello di alterazione (AL), confrontando AF con livelli di soglia specifici a seconda del profilo dei biomarker; questo valore viene, poi, integrato in un algoritmo a più fasi basato sull'implicazione logica "se...allora" al fine di rilevare un indice dello stato di salute (HSI) per ciascuna delle condizioni sperimentali impostate. Il biomarker più sensibile della batteria usata viene selezionato come parametro guida (GP), in modo tale che le variazioni del suo valore AL vengano considerate principalmente dal sistema per interpretare gli altri dati. I livelli di HSI sono espressi in una scala da A a E (A: sano; B: stress basso; C: stress moderato; D: stress alto; E: patologico).

CAPITOLO 4

4. RISULTATI

4.1 COMPOSIZIONE CHIMICA DEI BIO-LEACHATE

4.1.1 Analisi in GC-MS per il contenuto di sostanze organiche nei bio-leachate

I risultati relativi all'analisi chimica del contenuto dei leachate utilizzati (PLA, BPT, SB, TR) sono schematizzati in Tabella 1. In tutti i leachate testati è stata riscontrata la presenza di bisfenolo A (BPA), valutato mediante HPLC-MS/MS, seppur in differenti concentrazioni, la più alta delle quali è relativa al TR (BPA: 4.81 µg/L). La maggioranza dei composti chimici provvisoriamente identificati mediante GC-MS è stata osservata nei leachate derivanti da SB e TR. Viceversa, soltanto l'acido lattico è stato identificato per il PLA, che d'altronde rappresenta il suo monomero, mentre ancora nessuna sostanza chimica è stata rilevata all'interno dei leachate derivanti da BPT. In particolare, nei leachate da TR sono stati riscontrati benzotiazolo, anilina e di-cicloesilammina, mentre i leachate derivanti da SB risultano costituiti da 1,6-diossaciclododecano-7,12-dione, 2-(butossietossi)etanolo e 1,4-butandiolo, noto per la sua tossicità nei confronti delle specie acquatiche.

Tabella 1. Dati chimici riguardanti la concentrazione delle sostanze organiche riscontrate nei leachate testati. Accanto ai composti rinvenuti in ciascun leachate è indicato l'uso ad essi associato.

TR	SB	PLA	BPT
Bisfenolo A (4.81 µg/L) * - plastificante/ antiossidante; EDC	Bisfenolo A (0.51 µg/L) * - plastificante/ antiossidante; EDC	Bisfenolo A (0.30 µg/L) * - plastificante/ antiossidante; EDC	Bisfenolo A (0.34 µg/L) * - plastificante/ antiossidante; EDC
Anilina (30 µg/L) - accelerante di reazione	1,4-butandiolo (25 µg/L) - solvente organico	Acido lattico (n.d; hydrolysis product of lactides) - monomero	
Benzotiazolo (8 µg/L) - vulcanizzante	2-(butossietossi) etanolo (4300 µg/L) - intermedio di reazione		
Di-cicloesilammina (2 µg/L) - accelerante di reazione	1,6- diossaciclododecano- 7,12-dione (600 µg/L)		

*: analisi target eseguita in HPLC-MS/MS (LOQ 0.032 µg/L); n.d.: non determinato.

4.1.2 Analisi in ICP/MS per il contenuto di metalli nei bio-leachate

I risultati relativi all'analisi del contenuto in metalli riscontrato nei leachate utilizzati (PLA, BPT, SB, TR) sono schematizzati in Tabella 2. Tra tutti, i leachate da TR mostrano un maggiore arricchimento in metalli, tra cui figurano alluminio, ferro, piombo, cromo e arsenico che, invece, si mantengono al di sotto del limite di quantificazione (LOQ) nell'acqua di controllo. Tra i diversi bio-leachate, quelli derivanti da SB mostrano aumenti in ferro, rame, piombo, nichel e arsenico rispetto al controllo. Concentrazioni superiori di rame e nichel sono, poi, state riscontrate nei leachate da BPT, mentre non sono evidenti arricchimenti rilevanti nei leachate da PLA. Infine, le concentrazioni di mercurio, cadmio, antimonio e cobalto si sono conservate al di sotto del LOQ in tutti i leachate testati.

Tabella 2. Dati chimici riguardanti la concentrazione dei metalli riscontrati nei leachate testati. I risultati sono espressi in $\mu\text{g/L}$ per tutti i campioni. I dati rappresentano la media \pm ES (K=2; df= 10) dei livelli misurati per ciascun trattamento.

$\mu\text{g/L}$	Al	Fe	Cu	Zn	Pb	Hg	Cr	Ni	Cd	As	Sb	Co	Sr	Mn
CTR	<5	<5	3.1	150	<1	<0.5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	5100	12
ASW			\pm 0.5	\pm 46										
PLA	<5	<5	12.9	82	<1	<0.5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4900	18.5
			\pm 2.0	\pm 25										
BPT	<5	<1	16.8	150	<1	<0.5	<1	2.7	<1	<1	<1	<1	4800	18.5
			\pm 2.6	\pm 46				\pm 0,8						
SB	<5	11.1	36.5	110	2.1	<0.5	<1	5.0	<1	1.9	<1	<1	4900	12.9
		\pm 1.4	\pm 5.6	\pm 35	\pm 0.3			\pm 1,5		\pm 0.5				
TR	6.5	13.8	2.8	220	1.6	<0.5	1.3	<1	<1	1.3	<1	<1	5400	26.5
	\pm 0.9	\pm 1.8	\pm 0.4	\pm 69	\pm 0.3		\pm 0.5			\pm 0.4				
LOQ	5	5	1	5	1	0.5	1	1	1	1	1	1	1	1

ASW: acqua di mare artificiale; LOQ: limite di quantificazione.

4.2 RISPOSTE DI ALTERAZIONE LISOSOMIALE

4.2.1 Stabilità delle membrane lisosomiali (LMS)

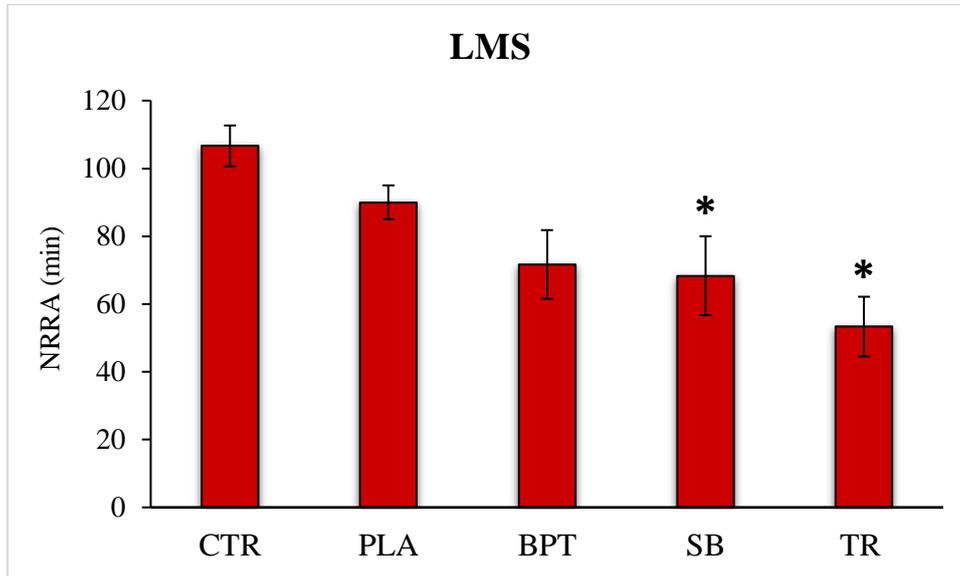


Figura 4.1: Stabilità delle membrane lisosomiali negli emociti di mitili di controllo e mitili esposti a leachate derivanti dalle bioplastiche PLA, BPT e SB e da gomma per pneumatici (TR). I risultati sono espressi in minuti. I dati rappresentano la media \pm ES di 3 repliche sperimentali (N=3) per ciascun trattamento. *: $p < 0,05$ rispetto al controllo (ANOVA ad una via, Test di Dunnett).

L'effetto dei leachate da bioplastica sulla stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti di mitilo *M. galloprovincialis* è illustrato in Figura 4.1. Il tempo di destabilizzazione della membrana lisosomiale è di circa 106 minuti negli emociti degli animali di controllo, a dimostrazione del buono stato di salute di questi ultimi. L'ANOVA ha permesso di riscontrare differenze significative tra i lisosomi dei mitili esposti a SB e TR rispetto ai lisosomi degli organismi di controllo. L'accelerazione nel tempo di destabilizzazione delle membrane lisosomiali è confermata anche in seguito ad esposizione dei mitili a PLA e BPT, sebbene le differenze in tal caso non mostrino significatività rispetto al controllo.

4.2.2 Accumulo di lipidi neutri

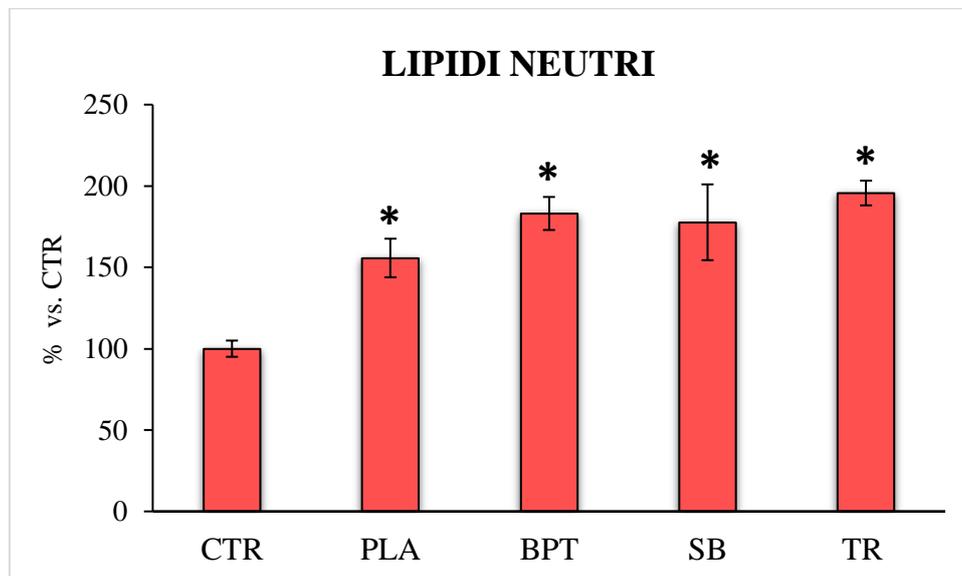


Figura 4.2: Accumulo di lipidi neutri in ghiandole digestive di mitili di controllo e mitili esposti a leachate derivanti dalle bioplastiche PLA, BPT e SB e da gomma per pneumatici (TR). I risultati sono espressi in percentuale rispetto al controllo. I dati rappresentano la media \pm ES (N=3) dei livelli misurati per ciascun trattamento. *: $p < 0,05$ rispetto al controllo (ANOVA ad una via, Test di Dunnett).

I livelli intra-lisosomiali di lipidi neutri misurati nella ghiandola digestiva dei mitili esposti ai leachate testati sono riportati in Figura 4.2. In questo caso, si sono osservate differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra tutti i trattamenti effettuati rispetto al controllo. In particolare, la percentuale di lipidi neutri contenuti nei lisosomi dei mitili di controllo ha subito un incremento statisticamente significativo nei lisosomi dei mitili esposti a PLA, BPT, SB e TR.

4.2.3 Rapporto lisosomi/citoplasma

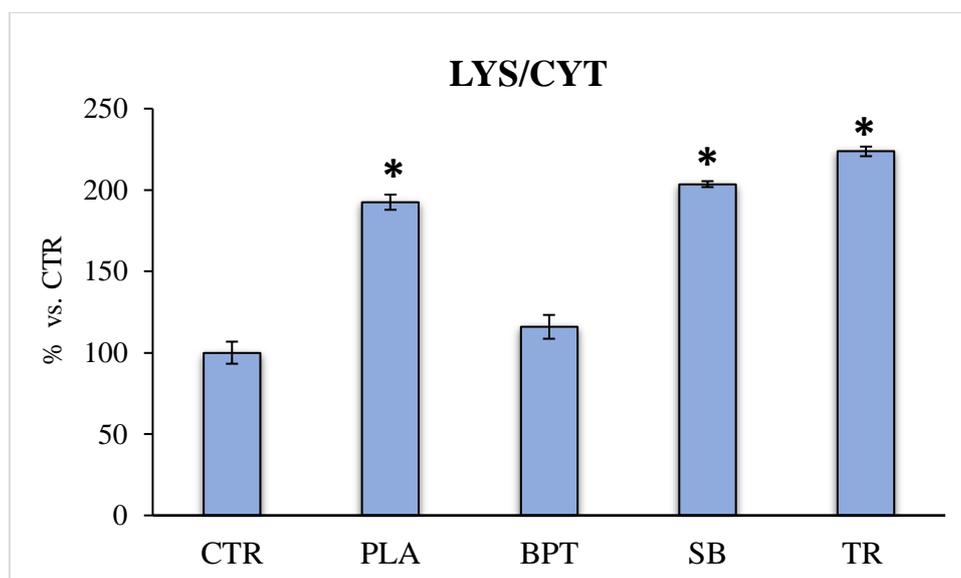


Figura 4.3: Rapporto lisosomi/citoplasma in ghiandole digestive di mitili di controllo e mitili esposti a leachate derivanti dalle bioplastiche PLA, BPT e SB e da gomma per pneumatici (TR). I risultati sono espressi in percentuale rispetto al controllo. I dati rappresentano la media \pm ES (N=3) dei livelli misurati per ciascun trattamento. *: $p < 0,05$ rispetto al controllo (ANOVA ad una via, Test di Dunnett).

I dati relativi al rapporto lisosomi/citoplasma misurato nella ghiandola digestiva dei mitili esposti ai leachate testati sono illustrati in Figura 4.3. Rispetto alle condizioni di controllo, si osserva un incremento statisticamente significativo ($p < 0,05$) nei mitili esposti a PLA, SB e TR. Viceversa, nessuna variazione significativa è stata osservata nei mitili esposti a BPT rispetto ai controlli.

4.3 RISPOSTE IMMUNOLOGICHE

4.3.1 Determinazione dell'attività del lisozima

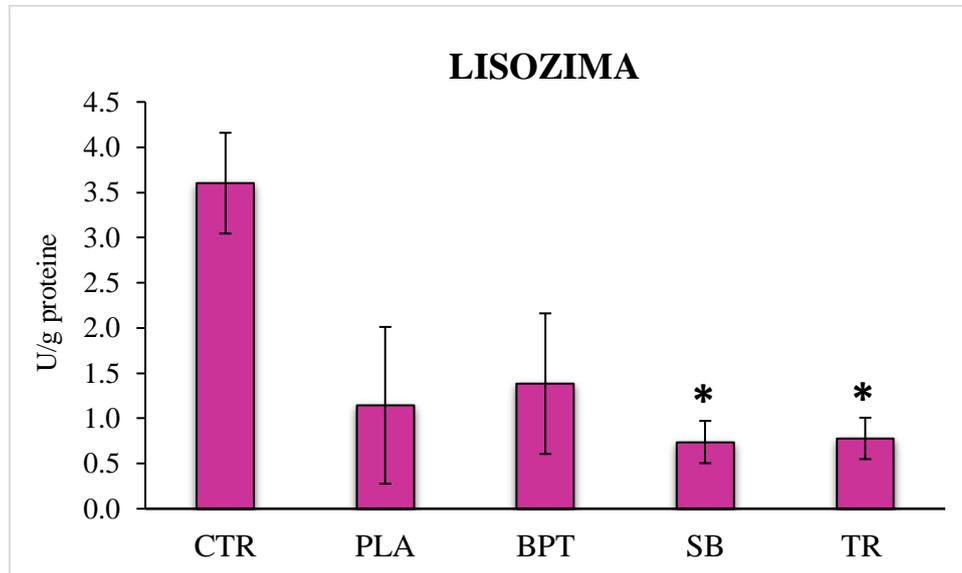


Figura 4.4: Attività del lisozima misurata nell'emolinfa di mitili di controllo e mitili esposti a leachate derivanti dalle bioplastiche PLA, BPT e SB e da gomma per pneumatici (TR). I risultati sono espressi in U/g di proteine. I dati rappresentano la media \pm ES (N=3) dell'attività specifica per ciascun trattamento. *: $p < 0,05$ rispetto al controllo (ANOVA ad una via, Test di Dunnett).

I valori relativi all'attività del lisozima misurata nel siero dei mitili esposti ai leachate testati sono riportati in Figura 4.4. Nel complesso, si osserva una generale riduzione dell'attività del lisozima nei quattro trattamenti effettuati rispetto al controllo. L'ANOVA ha riscontrato differenze significative nell'attività dei mitili esposti a SB e TR rispetto a quella misurata nei mitili di controllo. Non sono state, invece, osservate differenze significative tra i mitili esposti a PLA e BPT e i mitili di controllo.

4.4 RISPOSTE ANTIOSSIDANTI, DETOSSIFICANTI E NEUROTOSSICHE

4.4.1 Determinazione dell'attività specifica di CAT nelle ghiandole digestive e nelle branchie di mitilo

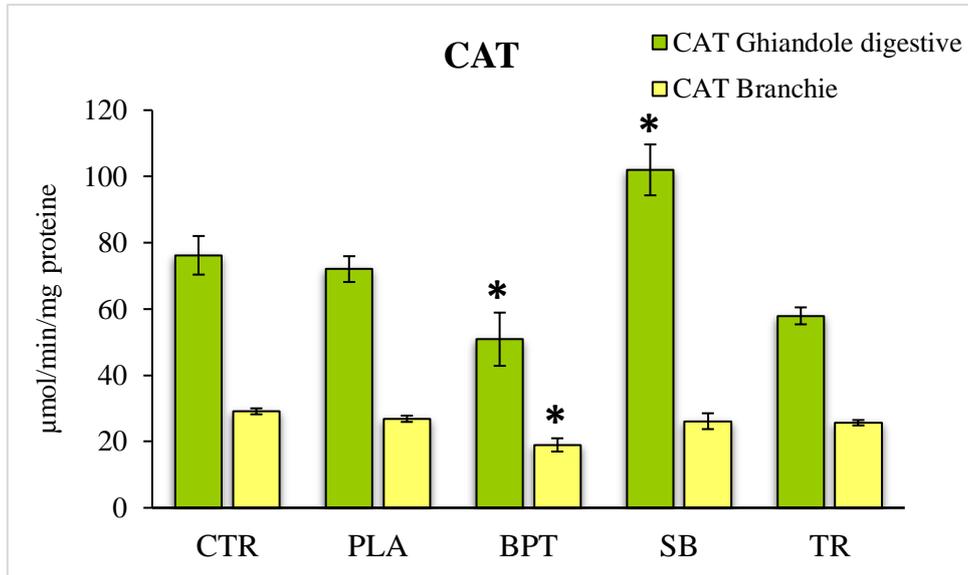


Figura 4.5: Attività dell'enzima CAT misurata nelle ghiandole digestive (in verde) e nelle branchie (in giallo) di mitili di controllo e mitili esposti a leachate derivanti dalle bioplastiche PLA, BPT e SB e da gomma per pneumatici (TR). I risultati sono espressi in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ di proteine. I dati rappresentano la media \pm ES (N=3) dell'attività specifica per ciascun trattamento. *: $p < 0,05$ rispetto al controllo (ANOVA ad una via, Test di Dunnett).

Gli effetti indotti dai leachate testati sull'attività specifica dell'enzima CAT sono illustrati in Figura 4.5. In generale, l'attività enzimatica basale risulta essere maggiore nelle ghiandole digestive piuttosto che nelle branchie di mitilo. Una diminuzione significativa è stata poi osservata sia nelle ghiandole digestive che nelle branchie dei mitili esposti a BPT rispetto ai controlli. Viceversa, un aumento significativo dell'attività enzimatica è stato osservato nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a leachate da SB.

4.4.2 Determinazione dell'attività specifica di GST nelle ghiandole digestive e nelle branchie di mitilo

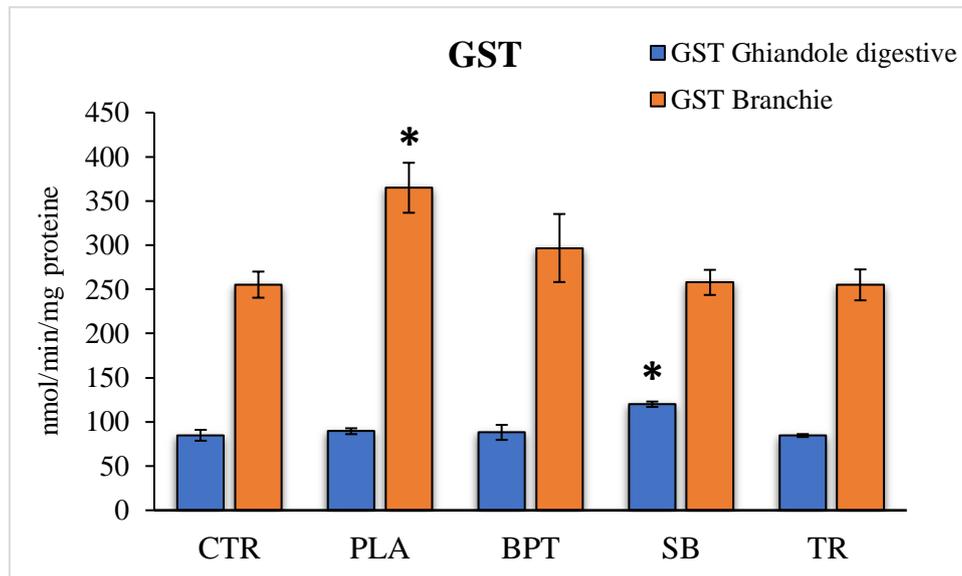


Figura 4.6: Attività dell'enzima GST misurata nelle ghiandole digestive (in blu) e nelle branchie (in arancio) di mitili di controllo e mitili esposti a leachate derivanti dalle bioplastiche PLA, BPT e SB e da gomma per pneumatici (TR). I risultati sono espressi in nmol/min/mg di proteine. I dati rappresentano la media \pm ES (N=3) dell'attività specifica per ciascun trattamento. *: $p < 0,05$ rispetto al controllo (ANOVA ad una via, Test di Dunnett).

Gli effetti indotti dai leachate testati sull'attività specifica dell'enzima GST sono riportati in Figura 4.6. In generale, l'attività basale della GST risulta essere maggiore nelle branchie piuttosto che nelle ghiandole digestive di mitilo. Rispetto ai mitili di controllo, un aumento significativo dell'attività enzimatica è stato riscontrato nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a leachate da SB, mentre un aumento significativo è stato osservato nelle branchie dei mitili esposti a PLA.

4.4.3 Determinazione del contenuto di malondialdeide (MDA)

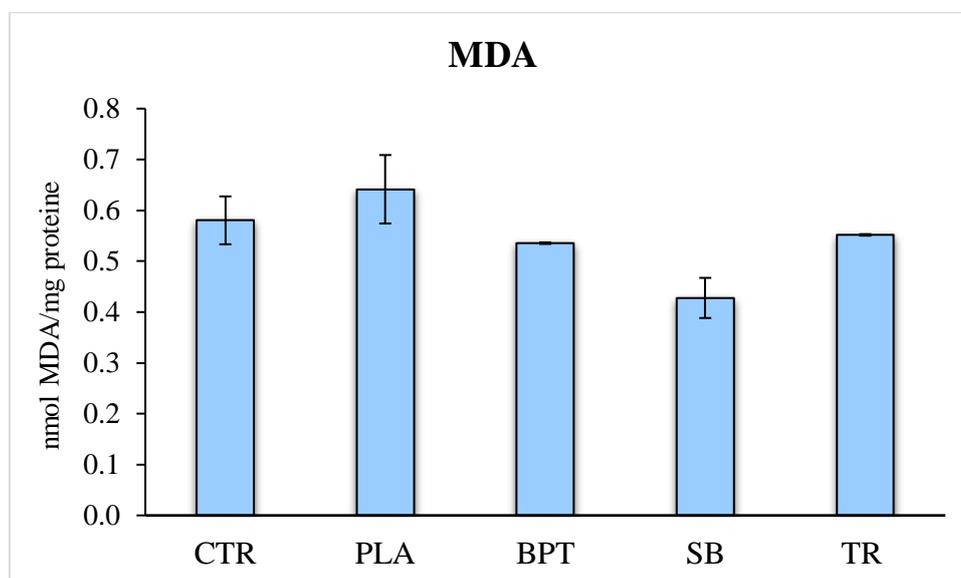


Figura 4.7: Contenuto di MDA misurato in ghiandole digestive di mitili di controllo e mitili esposti a leachate derivanti dalle bioplastiche PLA, BPT e SB e da gomma per pneumatici (TR). I risultati sono espressi in nmol MDA/mg di proteine. I dati rappresentano la media \pm ES (N=3) del contenuto misurato per ciascun trattamento. L'ANOVA non ha rivelato effetti significativi dei trattamenti effettuati su questo parametro.

I risultati relativi all'analisi del contenuto di MDA nelle ghiandole digestive dei mitili esposti ai leachate sono riportati in Figura 4.7. A differenza dei mitili esposti a BPT e SB, nei quali è stata registrata una lieve diminuzione nel contenuto di MDA, i mitili esposti a PLA e TR hanno mostrato un lieve aumento rispetto ai controlli. Tuttavia, in nessun caso sono state osservate differenze statisticamente significative tra i mitili esposti ai trattamenti ed i mitili di controllo.

4.4.4 Accumulo di lipofuscine

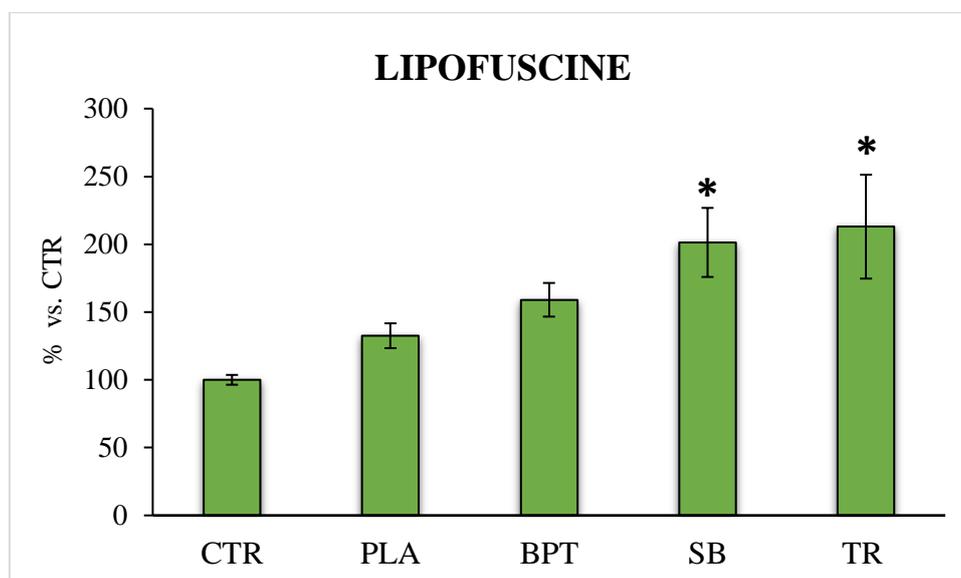


Figura 4.8: Accumulo di lipofuscine in ghiandole digestive di mitili di controllo e mitili esposti a leachate derivanti dalle bioplastiche PLA, BPT e SB e da gomma per pneumatici (TR). I risultati sono espressi in percentuale rispetto al controllo. I dati rappresentano la media \pm ES (N=3) dei livelli misurati per ciascun trattamento. *: $p < 0,05$ rispetto al controllo (ANOVA ad una via, Test di Dunnett).

I risultati dell'analisi delle lipofuscine accumulate nei lisosomi dei mitili esposti ai leachate testati sono mostrati in Figura 4.8. In particolare, si osserva un significativo aumento del contenuto di lipofuscine nei mitili esposti a SB e TR rispetto ai valori di controllo. L'incremento è confermato anche in seguito ad esposizione dei mitili a PLA e BPT, sebbene le differenze in tal caso non mostrino significatività rispetto al controllo.

4.4.5 Determinazione dell'attività specifica di AChE

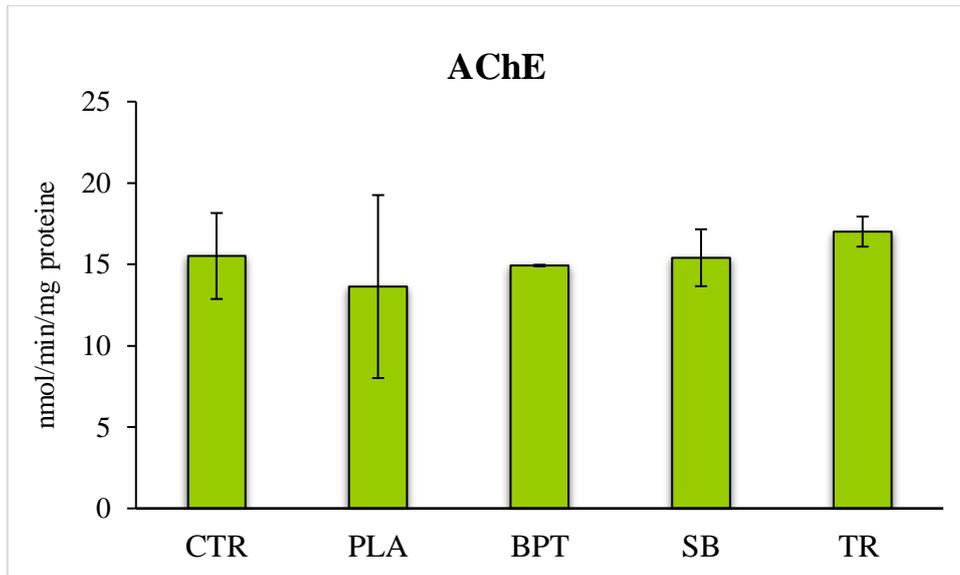


Figura 4.9: Attività dell'enzima AChE misurata in branchie di mitili di controllo e mitili esposti a leachate derivanti dalle bioplastiche PLA, BPT e SB e da gomma per pneumatici (TR). I risultati sono espressi in nmol/min/mg di proteine. I dati rappresentano la media \pm ES (N=3) dell'attività specifica per ciascun trattamento. L'ANOVA non ha rivelato effetti significativi dei trattamenti effettuati su questo parametro.

I risultati relativi all'analisi dell'attività specifica di AChE misurata nelle branchie dei mitili esposti ai diversi leachate selezionati sono illustrati in Figura 4.9. A differenza dei mitili esposti a PLA, BPT e SB, nei quali è stato registrato un lieve calo di attività dell'enzima AChE, i mitili esposti a TR hanno mostrato un lieve aumento di attività enzimatica rispetto ai controlli. Tuttavia, l'ANOVA, seguita dal test post-hoc di Dunnett, non ha riscontrato differenze statisticamente significative tra nessuno dei trattamenti effettuati rispetto ai controlli.

4.5 INTEGRAZIONE DEI DATI TRAMITE MES

Tabella 3. Integrazione dei dati eseguita tramite il Mussel Expert System (MES).

Biomarker	Profilo tossicologico		CTR	PLA	BPT	SB	TR
Cellula							
LMS ^{GP}	Decrescente	AF	1.00	0.84	0.67	0.64*	0.50*
		AL	NV	NV	NV	-	-
LF	Crescente	AF	1.00	1.33	1.59	2.01*	2.13*
		AL	NV	NV	NV	++	++
LN	A campana	AF	1.00	1.56*	1.83*	1.78*	1.96*
		AL	NV	+	+	+	+
MDA	Crescente	AF	1.00	1.11	0.92	0.74	0.95
		AL	NV	NV	NV	NV	NV
AChE	Decrescente	AF	1.00	0.88	0.96	0.99	1.10
		AL	NV	NV	NV	NV	NV
CAT g	A campana	AF	1.00	0.95	0.67*	1.34*	0.76
		AL	NV	NV	-	+	NV
CAT br	A campana	AF	1.00	0.92	0.65*	0.90	0.88
		AL	NV	NV	-	NV	NV
GST g	A campana	AF	1.00	1.05	1.04	1.41*	1.00
		AL	NV	NV	NV	+	NV
GST br	A campana	AF	1.00	1.43*	1.16	1.01	1.00
		AL	NV	+	NV	NV	NV
Lisozima	A campana	AF	1.00	0.32	0.38	0.20*	0.22*
		AL	NV	NV	NV	--	--
Tessuti							
LYS/CYT	Crescente	AF	1.00	1.92*	1.16	2.04*	2.24*
		AL	NV	+	NV	++	++
Organismo							
Sopravvivenza	Decrescente	AF	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		AL	NV	NV	NV	NV	NV
HSI			A	A	A	C	C
			(sano)	(sano)	(sano)	(stress moderato)	(stress moderato)

LMS: stabilità delle membrane lisosomiali valutata negli emociti di mitilo; LF: lipofuscine; LN: lipidi neutri; MDA: malondialdeide; AChE: attività dell'acetilcolinesterasi; CAT g: attività della catalasi analizzata nelle ghiandole digestive; CAT br: attività della catalasi analizzata nelle branchie; GST g: attività della GST analizzata nelle ghiandole digestive; GST br: attività della GST analizzata nelle branchie; Lisozima: attività del lisozima analizzata negli emociti; LYS/CYT: rapporto lisosomi/citoplasma; Sopravvivenza: tasso di sopravvivenza dei mitili; ^{GP}: parametro guida; HSI: Indice dello stato di salute dei mitili. Soglie di AF per biomarker crescenti/a campana: NV (nessuna variazione) = AF < 1.2; += AF > 1.2; +++ = AF > 2; Soglie di AF per biomarker decrescenti: NV = AF > 0.8; - = AF < 0.8; -- = AF < 0.5. *: p<0,05 rispetto al controllo (ANOVA ad una via, Test di Dunnett).

I risultati ottenuti dall'integrazione dei dati effettuata mediante il MES sono riportati in Tabella 2. LMS è stato selezionato come parametro guida alla luce della sua elevata sensibilità nel rilevare l'insorgenza di sindromi da stress indotte dall'azione di inquinanti o il miglioramento della vulnerabilità dell'animale, dal momento che l'emolinfa risulta il tessuto principalmente coinvolto nella mediazione delle risposte immunitarie degli animali. Sulla base delle risposte osservate attraverso i vari biomarker, il MES ha assegnato un HSI di buono stato di salute (HSI livello A) ai mitili di controllo e quelli esposti ai trattamenti con PLA e BPT, mentre per i mitili esposti ai leachate derivanti da SB e TR è stato calcolato un indice di condizione di stress moderato (HSI livello C).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La plastica, in tutte le sue forme, rappresenta la pietra miliare della civiltà moderna, che segna il passaggio da una tradizione agricola fondata sul riutilizzo ad una società dei consumi improntata sulla pratica della sostituzione. Sebbene l'umanità tragga indubbiamente vantaggio dalla versatilità e dalla durata delle materie plastiche, esse costituiscono un enorme fardello per l'ambiente, a cui si sta cercando di far fronte promuovendo un approccio sostenibile ed eco-friendly basato sul consumo di bioplastiche (Emadian et al., 2007). Gli ecosistemi marini e costieri, unitamente alla biodiversità che li abita, non sono esenti da questa minaccia, anzi subiscono in proporzioni diverse le conseguenze legate ai processi di degradazione e lisciviazione della plastica in acqua. Nonostante la sostituzione delle plastiche derivate dal petrolio rappresenti un obiettivo importante da raggiungere, tuttavia, il destino delle bioplastiche negli ambienti naturali necessita di essere ancora investigato (Cucina et al., 2021). A tale consapevolezza si aggiunge il fatto che gli organismi acquatici, specie se bioaccumulatori, sono costantemente esposti a miscele inquinanti, le cui sostanze chimiche possono agire in modo sinergico, antagonistico o additivo, generando così interazioni che non sono state adeguatamente documentate, in particolare nel caso dei contaminanti emergenti. La necessità di rilevare e valutare gli effetti della contaminazione a basse concentrazioni e in miscele complesse ha portato allo sviluppo di una vasta gamma di bioindicatori, meglio definiti "biomarker" (Livingstone et al., 1997), il cui utilizzo è suggerito da esperti del Joint Research Centre (JRC, 2010) per la valutazione del Good Environmental Status dell'ambiente marino richiesto dalla Marine Strategy Framework Directive (MSFD, 2008). Il presente studio rappresenta il primo tentativo messo in atto al fine di analizzare i potenziali effetti sub-letali indotti dall'esposizione di esemplari adulti del mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis* a leachate da bioplastica (PLA, BPT e SB) e da gomma per pneumatici (TR). I parametri presi in considerazione comprendono analisi chimiche ed un'ampia batteria composta da 9 biomarker di stress ambientale, la cui validità è stata già precedentemente testata all'interno di studi ecotossicologici aventi come focus la valutazione delle alterazioni del generale stato di salute di mitili esposti a prodotti farmaceutici (Fabbri e Franzellitti, 2016).

I risultati delle analisi chimiche eseguite tramite HPLC-MS/MS mostrano che, sebbene in differenti concentrazioni, il BPA è presente in tutti i leachate testati (TR: 4.81 µg/L; SB: 0.51

$\mu\text{g/L}$; BPT: $0.34 \mu\text{g/L}$; PLA: $0.30 \mu\text{g/L}$). Si tratta di un composto in grado di agire da potente interferente endocrino e, a dosi più elevate, da agente teratogeno in diversi organismi marini, quali pesci, crostacei e molluschi, ai quali può provocare danni di svariata entità che vanno da disordini lisosomiali, allo stress ossidativo, fino ad alterazioni del comportamento degli organismi o della struttura di comunità (Canesi e Fabbri, 2015). Le indagini di impatto ambientale rivelano l'ubiquità e le caratteristiche di persistenza di tale composto negli ecosistemi acquatici, in cui viene frequentemente misurato a concentrazioni variabili tra i $12 \mu\text{g/L}$ per le acque superficiali e i 17mg/L per gli effluenti degli impianti di scarico (Flint et al., 2012). Tuttavia, recenti evidenze sperimentali confermano che esso costituisce una porzione minima delle sostanze chimiche liscivate dalle bioplastiche nei sistemi acquatici (Tetu et al., 2019). A tal proposito, tra i composti identificati provvisoriamente mediante screening non target nei leachate da SB si annoverano:

- 1,6-diossaciclododecano-7,12-dione, un prodotto ottenuto dalla degradazione della resina potenzialmente tossico, già precedentemente riscontrato come componente del packaging alimentare biodegradabile (Canellas et al., 2015);
- 2-(butossietossi)etanolo ($4300 \mu\text{g/L}$), un glicol etere la cui massima concentrazione ammissibile (MCP) nei sistemi acquatici è pari a $1000 \mu\text{g/L}$ (Bodar, 2008);
- 1,4-butandiolo, un noto solvente industriale che, se ingerito, si converte in acido idrossibutirrico (GHB), esercitando effetti sul sistema nervoso centrale mediati dai recettori GABA di tipo B. In particolare, studi precedenti in vivo hanno messo in evidenza la capacità del 1,4-butandiolo in concentrazione 20mg/Kg di indurre stress ossidativo, stimolando la perossidazione lipidica e riducendo le difese antiossidanti non enzimatiche nella corteccia cerebrale di ratto (Sgaravatti et al., 2009).

Differenti composti organici sono stati rinvenuti, invece, nei leachate da TR, tra cui:

- Benzotiazolo: già precedentemente riscontrato nei leachate da plastica (Capolupo et al., 2020), risulta essere un vulcanizzante tossico e persistente principalmente usato come acceleratore negli pneumatici delle auto, la cui biodegradazione nel suolo e in acqua è piuttosto lenta;
- Di-cicloesilammina (DCHA): probabile prodotto di degradazione dei benzotiazoli, è un'ammina idrofoba particolarmente utilizzata nei processi chimici per la produzione di insetticidi, plastificanti, così come nell'industria dei metalli, come additivo per olio combustibile e come intermedio chimico. La sua ampia dispersione in ambiente è dovuta al traffico ed ulteriori attività urbane, in quanto anch'essa può diventare parte del processo di vulcanizzazione della gomma da pneumatici. Per entrambe le sostanze

sono riportati effetti tossici di varia entità nei confronti degli organismi acquatici, che riflettono alterazioni genetiche e ormonali legate allo sviluppo o alla riproduzione (Brorström-Lundén et al., 2012). Confrontando il valore teorico di PNEC (Predicted No Effect Concentration) per la DCHA pari a 160 ng/L (Woldegiorgis et al., 2008) e quello per il benzotiazolo pari a 250 ng/L (Remberger et al., 2006) con le rispettive concentrazioni misurate nei leachate da TR nel presente studio (2 µg/L e 8 µg/L), è ragionevole ipotizzare di includere anche questi prodotti di trasformazione nella valutazione del rischio ambientale.

- Anilina: è un'ammina aromatica avente effetti cancerogeni sull'uomo ampiamente utilizzata come prodotto intermedio nella sintesi di coloranti, i cui valori di PEC (Predicted Effect Concentration) regionale e PEC continentale equivalgono rispettivamente a 0.13 µg/L e 0.017 µg/L (European Commission, 2003). Effetti tossici dell'anilina sono stati osservati su diversi organismi viventi, tra cui protozoi, crostacei, rotiferi e pesci (Nielsen et al., 1993); in particolare, studi precedenti condotti da Bhunia et al. (2003) allo scopo di testare la tossicità derivata dall'esposizione di esemplari di tilapia *Oreochromis mossambicus* a differenti concentrazioni di anilina hanno messo in luce la capacità di tale composto di indurre perdita dell'appetito e causare una riduzione nel tasso di crescita dell'organismo già a concentrazioni basse pari a 20 µg/L. Un netto incremento del tasso di mortalità è, invece, stato osservato nel cladocero *Moina micrura* e nell'oligochete *Branchiura sowerbyi*, il che testimonia l'influenza dell'anilina sul regolare funzionamento dei processi fisiologici di tali invertebrati marini.

Oltre al BPA, soltanto l'acido lattico è stato identificato nei leachate da PLA, che d'altronde rappresenta il suo monomero, mentre ancora nessuna sostanza chimica è stata rilevata all'interno dei leachate da BPT, ragion per cui non sorprende che questi risultino meno impattanti.

Il costante aumento dei rifiuti di natura industriale, fonte di metalli pesanti, determina il trasferimento di inquinanti verso le zone di estuario. È noto che i molluschi bivalvi, in quanto filtratori, accumulano metalli che possono produrre effetti deleteri sul funzionamento fisiologico dell'organismo e, di conseguenza, sulla salute dell'uomo quale consumatore del prodotto ittico. In linea con le analisi chimiche eseguite in GC-MS, il maggior numero di metalli identificati mediante ICP/MS è stato osservato nei leachate da TR (9), seguiti dai leachate da SB (8), da BPT (5) e da PLA (4). Considerando che Cu e Zn sono metalli essenziali e che il Mn

è a concentrazioni relativamente basse, con un unico additivo organico identificato al suo interno, il PLA si conferma uno dei biopolimeri più “puri” utilizzati nel presente lavoro.

Per ciò che concerne i dati biologici, il grado di tossicità dei leachate selezionati varia a seconda del biopolimero considerato, rispecchiando apparentemente la diversa composizione chimica e concentrazione degli additivi e dei metalli lisciviati. In accordo con un recente studio di Capolupo et al. (2021) volto a valutare i possibili effetti sub-letali dei leachate derivanti dalle plastiche PP, PET, PS, PVC e CTR sul mitilo *M. galloprovincialis*, gli endpoint lisosomiali (LMS, LN, LF, LYS/CYT) sono stati i più colpiti tra i parametri testati, motivo per cui sono stati successivamente identificati dal Mussel Expert System (MES) come uno dei principali fattori coinvolti nel complessivo calo della fitness sperimentato dai mitili esposti ai leachate selezionati. Il primo livello di screening dello studio in questione si è basato sulla valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali (LMS) negli emociti di mitilo, uno dei più rappresentativi biomarker di stress ambientale (Viarengo et al., 2007). L'esposizione dei mitili alla concentrazione di 6 ml/L dei diversi bio-leachate ha provocato una generale riduzione nei tempi di stabilizzazione delle membrane lisosomiali, che hanno raggiunto valori statisticamente significativi pari a circa 68 min nei mitili esposti a SB e 53 min nei mitili esposti a TR. Tale diminuzione è indice di una perdita di funzionalità lisosomiale associata all'inattivazione delle idrolasi lisosomiali coinvolte nella degradazione di xenobiotici ed è, inoltre, direttamente correlata ad una riduzione delle possibilità di crescita nonché a disturbi della gametogenesi e dello sviluppo embrio-larvale nei bivalvi (Moore et al., 2004; Ringwood et al., 2004), come descritto nel lavoro di Capolupo et al. (2020). E' noto che alcune delle sostanze chimiche rilevate nei leachate testati possano essere responsabili delle disfunzioni lisosomiali riscontrate negli emociti dei bivalvi. In uno studio condotto in vitro, Canesi et al. (2005) hanno dimostrato come il BPA influenzasse la LMS a concentrazioni di un ordine di grandezza superiore a quelle rilevate nel presente studio, suggerendo che ulteriori additivi potrebbero aver contribuito alle modulazioni osservate, tra cui il benzotiazolo, anch'esso concentrato nei leachate da TR (8 µg/L), noto per mostrare proprietà chelanti in grado di interferire con i processi legati alla membrana e all'attività delle idrolasi lisosomiali (De Wever e Verachtert, 1997). È stato, inoltre, scoperto che lo zinco, essenziale per il metabolismo cellulare dei mitili ai livelli naturali dell'acqua di mare (Olmedo et al., 2013), influisce sulla LMS e induce la necrosi degli emociti nell'intervallo da µg a mg/L o in combinazione con Pb, Cu e Cr (Giamberini e Pihan, 1997; Hietanen et al., 1988), come nel caso dei leachate da SB e TR. La destabilizzazione delle membrane lisosomiali è un effetto ricorrente dell'esposizione a micro e nanoplastiche di

invertebrati marini, inclusi i mitili (Canesi et al., 2015; Capolupo et al., 2021; Fabbri et al., 2020), le ostriche (Thomas et al., 2020; Capolupo et al., 2021; Fabbri et al., 2020) e i ricci di mare (Marques-Santos et al., 2018). Sebbene non direttamente indagati, i dati riportati in questo studio indicano che tale effetto potrebbe essere causato da sostanze chimiche associate alle particelle di bioplastica e non dalle particelle fisiche stesse.

La condizione di stress ossidativo dovuta all'assenza delle opportune difese cellulari capaci di contrastare la presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è confermata dall'aumento del contenuto intra-lisosomiale di lipidi neutri insaturi (LN) e del rapporto lisosomi/citoplasma (LYS/CYT). In particolare, la percentuale di LN dei mitili esposti a tutti i leachate testati ha subito un incremento significativo rispetto ai valori di controllo, a dimostrazione del progressivo indebolimento del meccanismo di degradazione dei lipidi, i quali finiscono, quindi, per stanziarsi all'interno dei compartimenti lisosomiali, dando vita ad un fenomeno generalizzato di lipidosi all'interno della ghiandola digestiva che, se protratto nel tempo, può comprometterne le normali funzioni biologiche (Moore, 1988). Alterazioni nella percentuale di LN sono state precedentemente identificate in mitili esposti a inquinanti organici in condizioni di campo (Capolupo et al., 2017) e a concentrazioni crescenti di BPA in contesti sperimentali (Canesi et al., 2007). Similmente, arricchimenti in metalli, quali Cu, Zn e Pb, rinvenuti nei leachate sono risultati correlati a disordini cellulari relativi all'accumulo di LN nei mitili (Donnini et al., 2007; Fokina et al., 2013).

Conforme all'aumento dei livelli intra-lisosomiali di LN risulta l'aumento della percentuale del LYS/CYT misurato nella ghiandola digestiva dei mitili esposti ai leachate da PLA, SB e TR, nonostante esso non sia stato significativo per i leachate da BPT. Una simile risposta è indicativa di un aumento delle dimensioni dei lisosomi, una condizione fisiopatologica avanzata nell'epatopancreas dei mitili, a sua volta conseguente all'accumulo di lipofuscine (LF) e LN inglobati e fagocitati al loro interno, il che è coerente con lo studio di Moore et al. (2008), nel quale viene descritta l'autofagia lisosomiale come meccanismo di difesa cellulare contro lo stress ossidativo indotto dagli inquinanti ambientali. Non si esclude che la modulazione di questo biomarker possa essere stata influenzata dalla presenza di metalli noti per la loro capacità di indurre effetti lisosomotropici nei mitili; a tal proposito, studi di biomonitoraggio progressivi hanno evidenziato livelli elevati di LYS/CYT in campioni di *M. galloprovincialis* che mostravano un incremento dei livelli tissutali di Cu e Zn (Capolupo et al., 2017; Etxeberria et al., 1995), i quali hanno difatti raggiunto le concentrazioni più elevate rispettivamente nei leachate da SB e TR.

Uno degli aspetti peculiari del presente studio consiste nell'affiancamento al set di biomarker enzimatici scelti come indicatori di stress ossidativo di un biomarker immunologico, quale l'attività del lisozima. E' ben noto, infatti, che uno dei maggiori rischi derivanti dall'assorbimento di plastiche è legato al loro potenziale di interferire con le risposte immunitarie innate, alterando i meccanismi di difesa degli organismi contro fattori di stress microbiologici. Nel sistema immunitario dei bivalvi, il lisozima svolge un importante ruolo batteriolitico nei confronti di un ampio range di patogeni, motivo per cui l'inibizione di tale enzima suggerisce un'immunosoppressione, capace di esporre la specie a maggiori rischi di colonizzazione o infezione, rendendola, quindi, più vulnerabile agli attacchi da parte di agenti estranei all'organismo (Callewaert et al., 2012). Dai risultati ottenuti si evince che, rispetto ai valori di controllo, l'attività enzimatica del lisozima si presenta inferiore in tutti i trattamenti effettuati, mostrando variazioni significative nei mitili esposti a leachate da SB e TR. Tali evidenze sperimentali risultano in linea con recenti studi condotti da Iheanacho et al. (2021), che testimoniano la capacità di leachate derivanti da cenere di pneumatici bruciati (BTA) di alterare lo stato di immunosorveglianza nel pesce gatto africano *Clarias gariepinus*, provocando l'inibizione del lisozima dopo 14 giorni di esposizione. Ulteriori studi di natura prettamente chimica hanno, inoltre, messo in evidenza l'interazione esistente tra il benzotiazolo ed il lisozima, dimostrando come questo composto sia in grado di indurre una modifica conformazionale non fisiologica in corrispondenza delle α -eliche della proteina, alterandone in questo modo la funzionalità (Rial et al., 2021). Quest'assunto costituisce la riconferma della stretta relazione che intercorre tra composizione chimica e livello di tossicità dei leachate testati. Effetti in vitro e in vivo del Cr, un importante contaminante rilasciato da effluenti sia domestici che industriali, in questo caso unicamente rinvenuto nei leachate da TR, sono stati precedentemente valutati sui parametri immunitari di *Mytilus galloprovincialis* da Ciacci et al., 2011; in particolare, concentrazioni crescenti del metallo sono state associate ad una diminuzione dei valori di LMS degli emociti e dell'attività del lisozima sierico in mitili esposti a Cr (0.1, 1 e 10 $\mu\text{g/L}$) per 96 h. Diversi studi hanno dimostrato che i metalli, tra cui il Cu, sono in grado di modulare i parametri immunologici dei molluschi. Tuttavia, l'immunomodulazione è influenzata dalla loro concentrazione, nonché da ulteriori fattori quali la presenza di potenziali agenti patogeni e variabili ambientali, come ad esempio la temperatura o la salinità (Girón Perez, 2010).

Le alterazioni dello stato redox cellulare rappresentano una delle conseguenze più frequenti osservate negli invertebrati acquatici esposti a xenobiotici ambientali (Fent et al., 2006).

In condizioni di stress ossidativo, vengono prontamente attivati una serie di enzimi antiossidanti, tra cui la Glutathione S-transferasi (GST) e la Catalasi (CAT), al fine di ripristinare l'omeostasi cellulare prima dell'insorgenza di danni irreversibili (Regoli and Giuliani, 2014). L'enzima CAT catalizza la conversione del perossido di idrogeno ad acqua e ossigeno, mentre la GST interviene nella fase II del metabolismo epatico umano, catalizzando la reazione di coniugazione delle molecole tossiche con il glutathione ridotto (GSH) e lo stesso pattern è stato riconosciuto nei pesci teleostei (Li et al., 2012). Dai risultati è emerso che l'attività basale della GST è maggiore nelle branchie dei mitili rispetto alla ghiandola digestiva, mentre l'attività del CAT presenta un trend opposto. Tali relazioni sono in linea con precedenti osservazioni sui mitili marini (Capolupo et al., 2016; Saènz et al., 2010), e suggeriscono il diverso ruolo svolto da questi enzimi a seconda del tessuto. In questo caso, le risposte ottenute per i due enzimi non seguono un andamento chiaro: alla concentrazione di leachate testata, nei due tessuti target è stata osservata una generale sovraregolazione dell'attività specifica della GST, che tuttavia si è rivelata significativa unicamente nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a leachate da SB e nelle branchie di quelli esposti a leachates da PLA ed, al contrario, una sottoregolazione dell'attività specifica della CAT, che ha raggiunto valori significativi sia nell'uno che nell'altro tessuto dei mitili esposti a leachate da BPT. In accordo con i risultati finora ottenuti, tuttavia, per la CAT è stato registrato un aumento significativo nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a leachate da SB. Considerando il contenuto di additivi organici relativamente basso riscontrato nei leachate da BPT e PLA, i cambiamenti osservati potrebbero essere attribuiti al comportamento pro-ossidante dei metalli lisciviati. Tra i metalli che raggiungono concentrazioni elevate nei suddetti leachate si annovera, infatti, il rame, noto per indurre le reazioni metaboliche della fase II mediate dall'attivazione di GST in *Mytilus* spp. (Canesi et al., 1999; Capolupo et al., 2017). Inoltre, studi pregressi realizzati da Canesi et al. (2007) hanno segnalato una significativa sovraregolazione della GST nei mitili in seguito ad esposizione al BPA, suggerendo che l'attivazione enzimatica osservata per i leachate da SB e PLA potrebbe essere dovuta ad un'attività sinergica di additivi sia organici che inorganici. La ghiandola digestiva è il tessuto maggiormente coinvolto nel processo di detossificazione da xenobiotici, motivo per cui l'aumento di attività sia della GST sia della CAT nei mitili esposti a leachate da SB segnala l'avvio di una difesa detossificante e antiossidante, rimarcando ancora una volta la loro effettiva tossicità. Così come per SB, anche nel caso dei leachate da TR, considerata la destabilizzazione delle membrane lisosomiali dapprima osservata mediante NRRA, ci si sarebbe aspettato un aumento dell'attività specifica di entrambi gli enzimi, che non si è però verificato. La scarsa attività della CAT potrebbe aver portato, in tal caso, ad una diminuzione

dell'azione di difesa contro gli agenti ossidanti e di conseguenza ad un aumento dello stress ossidativo, causando così la perossidazione lipidica delle membrane lisosomiali, corroborata dall'aumento significativo della percentuale di LF registrato nei leachate da TR. Sebbene in misura diversa a seconda dei leachate, però, l'attivazione di entrambi gli enzimi avvalorava la tesi del danno ossidativo in corso ipotizzato dal confronto con le risposte dei precedenti biomarker. Ad oggi è stata comprovata l'adeguatezza di tali test enzimatici nel monitoraggio degli effetti degli inquinanti sugli organismi sentinella. La risposta enzimatica alla tossicità chimica mostra, tuttavia, un trend a campana con un incremento iniziale dovuto alla sintesi degli enzimi, seguito da una diminuzione dell'attività enzimatica dovuta ad un maggiore tasso catabolico e/o alla diretta inibizione dell'attività ad opera dei componenti tossici (Viarengo et al., 2007). Per questa ragione, in questo lavoro di tesi i saggi enzimatici sono stati usati in associazione con altri biomarker che rendono più chiara l'interpretazione ed il significato fisiologico delle modifiche osservate nell'attività degli enzimi antiossidanti.

Un'eccessiva produzione cellulare di ROS è, inoltre, solitamente associata all'inizio della perossidazione lipidica delle membrane biologiche (Pizzimenti et al., 2010), la quale comporta l'accumulo di sottoprodotti chimici, quali malondialdeide (MDA) e LF. Questi parametri tendono ad accumularsi nei mitili in risposta a metalli, come Cu, Cd, Ag e Hg (Gomes et al., 2011; Maria e Bebianno, 2011), e composti organici, compresi alcuni noti per il loro uso come additivi o interferenti endocrini (Canesi et al., 2008). Ne consegue che la loro determinazione analitica non solo certifica il deterioramento ossidativo dei lipidi, ma in varie condizioni patologiche può essere considerata come un indice biochimico di danno cellulare. La MDA è un composto intermedio della perossidazione lipidica: un aumento dei suoi livelli negli organismi è correlato ad un calo della qualità dell'ambiente in cui essi vivono (Box et al., 2007). In questo studio, nessun cambiamento significativo è stato osservato nel contenuto di MDA all'interno della ghiandola digestiva dei mitili esposti ai trattamenti. Tuttavia, l'assenza inaspettata di un aumento dei livelli di tale composto potrebbe essere probabilmente dovuta alla presenza di composti perossidati già inclusi all'interno delle LF; si può ipotizzare, quindi, che la malondialdeide sia stata degradata velocemente e trasformata nei prodotti finali della perossidazione lipidica quali le lipofuscine. Così come per i lipidi neutri, anche la percentuale di accumulo delle lipofuscine risulta, infatti, essere maggiore nelle ghiandole digestive dei mitili, mostrando però differenze significative rispetto al controllo solo nei mitili esposti ai leachate da SB e TR. I livelli di LF sono significativamente correlati alla LMS analizzata negli emociti dei mitili. Una simile relazione è stata osservata anche altrove (Donnini et al., 2007;

Franzellitti et al., 2014) e conferma ulteriormente il legame meccanicistico esistente tra i disturbi lisosomiali che si verificano in diversi tessuti e l'insorgenza di effetti pro-ossidanti negli organismi esposti.

L'acetilcolinesterasi (AChE) è uno dei biomarker più efficaci nella valutazione delle alterazioni neurologiche indotte da xenobiotici nelle specie acquatiche (Rickwood e Galloway, 2004). La sua inibizione induce un prolungamento dello stimolo nervoso, che rappresenta il meccanismo d'azione di numerosi composti neurotossici, come i pesticidi (Bocquené e Galgani 1998; Zinkl et al., 1991). Data la bassa attività dell'enzima nella ghiandola digestiva di mitilo, questo tessuto non è stato preso in considerazione per le analisi di neurotossicità, che si sono, invece, concentrate sulle branchie. Diversamente dalle aspettative, nessuna risposta neurotossica sui mitili trattati è stata evidenziata nel presente lavoro. In uno studio precedente condotto da Juhel et al. (2017), è emerso che nei mitili (*Perna viridis*) il BPA a concentrazioni medie e alte suscita un effetto inibitorio dell'AChE quando somministrato in una miscela con altri contaminanti emergenti, come carbamazepina e atrazina. Pertanto, tenuto conto che i mitili sono stati esposti ad una diluizione di leachate 1:180 al fine di creare uno scenario più realistico dal punto di vista ambientale, si può ipotizzare che la mancanza di effetti osservati sull'enzima sia dovuta al basso dosaggio utilizzato. Sebbene in contrasto con studi pregressi che riportano una sensibilità dell'AChE all'esposizione a Cu in ambienti marini inquinati (Vidal-Liñán et al., 2014), i risultati ottenuti appaiono coerenti con il lavoro di Brown et al. (2004), in cui concentrazioni di Cu paragonabili a quelle identificate nei leachate testati non hanno provocato una riduzione dell'attività specifica di AChE in *Mytilus edulis* dopo 7 giorni di esposizione. Allo stesso modo, l'attività dell'AChE non è stata alterata dopo 4 giorni di esposizione a 25-150 µg/L di Cu nei bivalvi *Macoma balthica* e *Scrobicularia plana* (Bonnard et al., 2009), suggerendo che l'effetto inibitorio del Cu sull'attività dell'AChE dei bivalvi possa essere specie-specifico oltre che dose-dipendente.

Gli output ottenuti dall'integrazione dei dati realizzata mediante il Mussel Expert System (MES) attribuiscono un profilo di moderata tossicità ai leachate da SB e TR (HSI=C), corroborata dalle indagini relative al loro contenuto chimico, mentre nessuna alterazione dello stato di salute dei mitili è stata osservata nei restanti trattamenti con leachate da PLA e BPT. In base al livello di alterazione (AL) generato per i singoli biomarker, il sistema ha rilevato che i mitili esposti a leachate da PLA e BPT mostrano alterazioni a livello cellulare in meno del

20% dei parametri analizzati (HSI=A). Nei mitili esposti a leachate da SB e TR si sono, invece, notati effetti non trascurabili a livello cellulare e tissutale in più del 50% dei biomarker analizzati (HSI=C). Ne deriva la seguente classificazione del livello di stress sperimentato dai mitili in ciascun trattamento: TR=SB < BPT=PLA, la quale appare in linea con la modulazione dei biomarker di stress ossidativo, di alterazione lisosomiale e immunologici e riflette le concentrazioni di additivi organici e inorganici misurate nei leachate selezionati.

Riepilogando, il presente studio intende dimostrare per la prima volta che le complesse miscele di additivi liscivate da diversi tipi di biopolimeri in acqua di mare possono alterare in modo selettivo la fitness fisiologica dei mitili, fornendo ulteriori approfondimenti sulle implicazioni ambientali associate al consumo di bioplastica. Tra i biomarker esaminati, LMS, NL, LF e LYS/CYT hanno mostrato i cambiamenti più marcati, suggerendo che gli additivi organici e inorganici lisciviati possono comportare rischi specifici per la funzionalità del sistema lisosomiale. I dati evidenziano anche l'insorgenza di condizioni pro-ossidanti nella ghiandola digestiva e un indebolimento delle difese immunitarie dei mitili, apparentemente derivanti dal rilascio di metalli e sostanze organiche da alcuni dei biopolimeri testati. In determinati casi, queste alterazioni sono state associate ad un aumento di attività della GST e della CAT, che denota l'avvio delle reazioni metaboliche coinvolte nella biotrasformazione dei ROS. Dalle indagini sperimentali condotte, i leachate derivanti da SB e TR sembrano rappresentare i composti più dannosi per i mitili. L'elevata tossicità osservata per i suddetti leachate potrebbe essere direttamente correlata al maggiore contenuto di additivi chimici e metalli rilevati al loro interno rispetto agli altri leachate testati; un dato, questo, confermato dalle risposte relative alla maggioranza degli endpoint analizzati. Questi risultati, tuttavia, necessitano di essere interpretati con cautela, in quanto la tossicità e composizione chimica dell'additivo possono variare notevolmente tra prodotti commerciali dello stesso tipo di polimero, a seconda di fattori ambientali e/o del metodo di diluizione utilizzato. I dati ottenuti mostrano che i leachate da bioplastica possono causare alterazioni fisiologiche nei mitili simili a quelle registrate per effetto dei leachate derivanti dai polimeri sintetici. Pertanto, prima di incentivare il consumo di plastiche bio-based come soluzione alternativa e sostenibile contro l'inquinamento da plastica, è opportuno riconsiderare le linee guida relative alla sicurezza chimica dell'uso di bioplastiche ed eventualmente estendere gli studi circa i loro effetti avversi al livello di ecosistema. In conclusione, al fine di ottenere una visuale più ampia e concreta della problematica descritta, è auspicabile che indagini future includano l'utilizzo di differenti concentrazioni di leachate in maniera tale da evidenziare eventuali risposte dose-dipendenti. Inoltre, i dati di tossicità

riportati nel presente lavoro sono stati ottenuti dopo esposizione subcronica dei mitili, utilizzando parametri fisiologici convalidati come “early warning signals” di eventuali disfunzioni cellulari e tissutali. Allo scopo di ottenere una visione più coerente degli impatti degli additivi in condizioni ambientali realistiche, sono necessari ulteriori sforzi per definire gli effetti dei leachate in caso di esposizione prolungata e/o in associazione con altri fattori di stress ambientale (ad esempio pH, salinità o fluttuazioni di temperatura). Non va, infine, trascurato che gli esperimenti sono stati condotti in ambiente controllato, indi per cui la tossicità dei leachate realmente riversati nelle acque potrebbe essere esacerbata dalla presenza di altri contaminanti e merita di essere opportunamente indagata.

6. BIBLIOGRAFIA

- ❖ **Akcha F, Izuel C, Venier P, Budzinski H, Burgeot T, Narbonne JF 2000.** Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 49: 269–287.
- ❖ **Alessi E, Di Carlo G, Campogianni S, Tangerine B, Pietrobelli E 2018.** Out of the plastic trap: saving the Mediterranean from plastic pollution. WWF Mediterranean Marine Initiative, Roma.
- ❖ **Andrady AL 2011.** Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 62: 1596–1605.
- ❖ **Andrady AL 2015.** Persistence of plastic litter in the oceans. In: Bergmann M, Gutow L, Klages M (eds) *Marine anthropogenic litter*. Springer, Cham.
- ❖ **Andrady AL, Pegram JE, Searle ND 1996.** Wavelength sensitivity of enhanced photodegradable polyethylenes, ECO, and LDPE/MX. *J Appl Polym Sci* 62: 1457–1463.
- ❖ **Anfuso G, Williams AT, Martínez GC, Botero CM, Hernández JC, Pranzini E 2017.** Evaluation of the scenic value of 100 beaches in Cuba: Implications for coastal tourism management. *Ocean Coast Manag* 142: 173-185.
- ❖ **Arikan EB, Ozsoy HD 2015.** A review: investigation of bioplastics. *J Civ Eng Arch* 9: 188-192.
- ❖ **Balbi T, Franzellitti S, Fabbri R, Montagna M, Fabbri E, Canesi L 2016.** Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: effects on gene transcription. *Environ Pollut* 218: 996– 1004.
- ❖ **Banni M, Dondero F, Jebali J, Guerbej H, Boussetta H, Viarengo A 2007.** Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers* 12: 369-383.
- ❖ **Bargagli B, Cruscanti M, Leonzio C, Bacci E 1998.** I bioindicatori. In: Vighi M, Bacci E (eds) *Ecotossicologia*. UTET, Torino, Italia.

- ❖ **Barnes DK, Galgani F, Thompson RC, Barlaz M 2009.** Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364: 1985–1998.
- ❖ **Barnes DK, Walters A, Gonçalves L 2010.** Macroplastics at sea around antarctica. *Mar Environ Res* 70: 250–252.
- ❖ **Beaumont NJ, Aanesen M, Austen MC, Börger T, Clark JR, Cole M, Wyles KJ 2019.** Global ecological, social and economic impacts of marine plastic. *Mar Pollut Bull* 142: 189-195.
- ❖ **Bergmann M, Klages M 2012.** Increase of litter at the Arctic deep-sea observatory Hausgarten. *Mar Pollut Bull* 64: 2734–2741.
- ❖ **Besseling E, Wegner A, Foekema EM, Van den Heuvel-Greve MJ, Koelmans AA 2012.** Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environ Sci Technol* 47: 593–600.
- ❖ **Bhunia F, Saha NC, Kaviraj A 2003.** Effects of Aniline—an aromatic amine to some freshwater organisms. *Ecotoxicology* 12: 397-404.
- ❖ **Bodar CWM 2008.** Environmental risk limits for 2-(2-butoxyethoxy) ethanol (DEGBE). RIVM Letter report 60178-2008.
- ❖ **Bocquené G, Galgani F 1998.** Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES* 13, ISSN0903-2606.
- ❖ **Bownes SJ, McQuaid CD 2006.** Will the invasive mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck replace the indigenous *Perna perna* L. on the south coast of South Africa?. *J Exp Mar Biol Ecol* 338: 140-151.
- ❖ **Box A, Sureda A, Falgani F, Pons A, Deudero S 2007.** Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146: 531-539.
- ❖ **Branch GM, Steffani CN 2004.** Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *J Exp Mar Biol Ecol* 300: 189-215.
- ❖ **Brorström-Lundén E, Remberger M, Kaj L, Hansson K, Holmquist H, Haglund P, Grabic R 2012.** Screening of benzothiazoles, benzenediamines, dicyclohexylamine and benzotriazoles. IVL Report B2023.
- ❖ **Brown RJ, Galloway TS, Lowe D, Browne MA, Dissanayake A, Jones MB, Depledge MH 2004.** Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquat Toxicol* 66: 267–278.

- ❖ **Browne MA 2015.** Sources and pathways of microplastics to habitats. In: Bergmann M, Gutow L, Klages M (eds) Marine anthropogenic litter. Springer, Cham.
- ❖ **Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS, Lowe DM, Thompson RC 2008.** Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ Sci Technol* 42: 5026-5031.
- ❖ **Callewaert L, Van Herreweghe JM, Vanderkelen L, Leysen S, Voet A, Michiels CW 2012.** Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors. *Trends Microbiol* 20: 501-510.
- ❖ **Canesi L, Betti M, Lorusso LC, Ciacci C, Gallo G 2005.** ‘In vivo’ effects of Bisphenol A in *Mytilus* hemocytes: modulation of kinase-mediated signalling pathways. *Aquat Toxicol* 71: 73-84.
- ❖ **Canesi L, Borghi C, Ciacci C, Fabbri R, Vergani L, Gallo G 2007.** Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. *Mol Cell Endocrinol* 276: 36-44.
- ❖ **Canesi L, Ciacci C, Bergami E, Monopoli MP, Dawson KA, Papa S, Corsi I 2015.** Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Mar Environ Res* 111: 34-40.
- ❖ **Canesi L, Fabbri E 2015.** Environmental effects of BPA: focus on aquatic species. *Dose-Response* 13: 932-983.
- ❖ **Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C 2002.** Bacteria hemocyte interaction and phagocytosis in marine bivalve. *Microsc Res Tech* 57: 469-476.
- ❖ **Capolupo M, Franzellitti S, Kiwan A, Valbonesi P, Dinelli E, Pignotti E, Fabbri E 2017.** A comprehensive evaluation of the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy): Integrating chemical and physiological analyses in mussels as a biomonitoring strategy. *Sci Total Environ* 598: 146-159.
- ❖ **Capolupo M, Gunaalan K, Booth AM, Sørensen L, Valbonesi P, Fabbri E 2021.** The sub-lethal impact of plastic and tire rubber leachates on the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Pollut* 283: 17-81.
- ❖ **Capolupo M, Sørensen L, Jayasena KDR, Booth AM, Fabbri E 2020.** Chemical composition and ecotoxicity of plastic and car tire rubber leachates to aquatic organisms. *Water Res* 169: 115-270.
- ❖ **Capolupo M, Valbonesi P, Kiwan A, Buratti S, Franzellitti S, Fabbri E 2016.** Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses

induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Sci Total Environ* 563: 538-548.

- ❖ **Carlton JT 1992**. Introduced marine and estuarine mollusks of North America: an end-of-the-20th-century perspective. *J Shellfish Res* 11: 489-505.
- ❖ **Ceccherelli VU, Rossi R 1984**. Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser* 16: 173-184.
- ❖ **Chae Y, Hong SH, An YJ 2020**. Photosynthesis enhancement in four marine microalgal species exposed to expanded polystyrene leachate. *Ecotoxicol Environ Saf* 189: 109-936.
- ❖ **Cheung CCC, Siu WHL, Richardson BJ, De Luca-Abbott SB, Lam PKS 2004**. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ Pollut* 128: 393–403.
- ❖ **Chu FLE, La Peyre JF 1989**. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *J Invertebr Pathol* 54: 224–232.
- ❖ **Chua EM, Shimeta J, Nugegoda D, Morrison PD, Clarke BO 2014**. Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allorchestes compressa*. *Environ Sci Technol* 48: 8127–8134.
- ❖ **Cole M, Lindeque P, Fileman E, Halsband C, Goodhead R, Moger J, Galloway TS 2013**. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ Sci Technol* 47: 6646-6655.
- ❖ **Connolly JP, Pedersen CJ 1988**. A thermodynamic-based evaluation of organic chemical accumulation in aquatic organisms. *Environ Science Technol* 22: 99-103.
- ❖ **Cooper DA, Corcoran PL 2010**. Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. *Mar Pollut Bull* 60: 650–654.
- ❖ **Corcoran PL, Biesinger MC, Grifi M 2009**. Plastics and beaches: A degrading relationship. *Mar Pollut Bull* 58: 80–84.
- ❖ **Còzar A, Sanz-Martìn M, Martì E, González-Gordillo JI, Ubeda B, Gàlvez JA, Irigoien X, Duarte CM 2015**. Plastic accumulation in the Mediterranean Sea. *PLoS One* 10: 121-762.
- ❖ **Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, Guillette LJ 2007**. An ecological assessment of bisphenol-a: evidence from comparative biology. *Reprod Toxicol* 24: 225–239.

- ❖ **Critchell K, Grech A, Schlaefter J, Andutta FP, Lambrechts J, Wolanski E, Hamann M 2015.** Modelling the fate of marine debris along a complex shoreline: Lessons from the Great Barrier Reef. *Estuar Coast Shelf Sci* 167: 414-426.
- ❖ **Cucina M, De Nisi P, Tambone F, Adani F 2021.** The role of waste management in reducing bioplastics leakage into the environment: a review. *Bioresour Technol* 12: 54-59.
- ❖ **Curvelo AAS, De Carvalho AJF, Agnelli JAM 2001.** Thermoplastic starch–cellulosic fibers composites: preliminary results. *Carbohydr Polym* 45: 183-188.
- ❖ **Dagnino A, Allen JI, Moore MN, Broeg K, Canesi L, Viarengo A 2007.** Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12: 155-172.
- ❖ **Davidson TM 2012.** Boring crustaceans damage polystyrene floats under docks polluting marine waters with microplastic. *Mar Pollut Bull* 64: 1821– 1828.
- ❖ **De Lafontaine YD, Gagne F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM 2000.** Biomarkers in zebra mussels (*Dreissenap olymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat Toxicol* 50: 51–71.
- ❖ **De Stephanis R, Giménez J, Carpinelli E, Gutierrez-Exposito C, Cañadas A 2013.** As main meal for sperm whales: plastics debris. *Mar Pollut Bull* 69: 206–214.
- ❖ **De Wever H, Verachtert H 1997.** Biodegradation and toxicity of benzothiazoles. *Water Res* 31: 2673-2684.
- ❖ **Derraik JG 2002.** The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar Pollut Bull* 44: 842–852.
- ❖ **Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW, Jewell CS 1989.** Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem* 8: 1103-1123.
- ❖ **Do Sul JAI, Barnes DK, Costa MF, Convey P, Costa ES, Campos LS 2011.** Plastics in the Antarctic environment: are we looking only at the tip of the iceberg?. *Oecol Aust* 15: 150-170.
- ❖ **Dodds D, Humphreys B 2013.** Production of aromatic chemicals from biobased feedstock. In: Imhof P, Van Der Waal JC (eds) *Catalytic Process Development for Renewable Materials, Vol.1*. Wiley-VHC, Germany.

- ❖ **Domenek S, Ducruet V 2016.** Characteristics and Applications of PLA. In: Kalia S, Avérous L (eds) Biodegradable and biobased polymers for environmental and biomedical applications, Wiley-Scrivener, USA.
- ❖ **Donahue SC 1996.** Clean Ships, Clean Ports, Clean Oceans: Controlling Garbage and Plastic Wastes at Sea. *Ocean Coast Manag* 2: 127-128.
- ❖ **Donnini F, Dinelli E, Sangiorgi F, Fabbri E 2007.** A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). *Environ Int* 33: 919-928.
- ❖ **Doong DJ, Chuang HC, Shieh CL, Hu JH 2011.** Quantity, distribution, and impacts of coastal driftwood triggered by a typhoon. *Mar Pollut Bull* 62: 1446–1454.
- ❖ **Dunlap RE, Scarce R 1991.** Poll trends: environmental problems and protection. *Public Opin Q* 55: 651–672.
- ❖ **Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- ❖ **Emadian SM, Onay TT, Demirel B 2017.** Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Manag Res* 59: 526-536.
- ❖ **Eriksen M, Lebreton LC, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, Borerro JC, Galgani F, Ryan PG, Reisser J 2014.** Plastic pollution in the world’s oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS One* 9: 111-913.
- ❖ **European bioplastics 2018.** Bioplastics market data. Available at: <http://www.european-bioplastics.org/market/> .
- ❖ **European Bioplastics 2020.** Bioplastics Market Data 2019. Available at: https://docs.europeanbioplastics.org/publications/market_data/Report_Bioplastics_Market_Data_2019.pdf .
- ❖ **Etxeberria M, Cajaraville MP, Marigomez I 1995.** Changes in digestive cell lysosomal structure in mussels as biomarkers of environmental stress in the Urdaibai Estuary (Biscay Coast, Iberian Peninsula). *Mar Pollut Bull* 30: 599-603.
- ❖ **Fabbri E, Franzellitti S 2016.** Human pharmaceuticals in the marine environment: focus on exposure and biological effects in animal species. *Enviro Toxicol Chem* 35: 799-812.
- ❖ **Fabbri D, Rombolà AG, Vassura I, Torri C, Franzellitti S, Capolupo M, Fabbri E 2020.** Off-line analytical pyrolysis GC–MS to study the accumulation of polystyrene microparticles in exposed mussels. *J Anal App Pyrolysis* 149: 104-836.

- ❖ **Fang Q, Hanna MA 2000.** Functional properties of polylactic acid starch-based loose-fill packaging foams. *Cereal Chem* 77: 779-783.
- ❖ **Farah S, Anderson DG, Langer R 2016.** Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review. *Adv Drug Deliv Rev* 107: 367-392.
- ❖ **Farrell P, Nelson K 2013.** Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environ Pollut* 177: 1–3.
- ❖ **Fent K, Weston AA, Caminada D 2006.** Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 76: 22-159.
- ❖ **Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E 2012.** Bisphenol A exposure, effects and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manage* 104: 19-34.
- ❖ **Fokina NN, Ruokolainen TR, Nemova NN, Bakhmet IN 2013.** Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect. *Biol Trace Elem Res* 154: 217-225.
- ❖ **Fossi MC 1998.** Biomarkers: strumenti diagnostici e prognostici di salute ambientale. In: Vighi M, Bacci E (eds), *Ecotossicologia*, UTET: 60-73.
- ❖ **Fossi MC 2000.** Biomarkers. Strumenti di diagnosi e prognosi ambientale. Rosini Editrice s.r.l., Firenze, Italia.
- ❖ **Fossi MC, Coppola D, Baini M, Giannetti M, Guerranti C, Marsili L, Panti C, De Sabata E, Clò S 2014.** Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: The case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar Environ Res* 100: 17–24.
- ❖ **Fossi MC, Leonzio C 1994.** *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, CRC Press, United States. pp. 345.
- ❖ **Fossi MC, Panti C, Guerranti C, Coppola D, Giannetti M, Marsili L, Minutoli R 2012.** Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar Pollut Bull* 64: 2374–2379.
- ❖ **Franzellitti S, Buratti S, Capolupo M, Du B, Haddad SP, Chambliss CK, Fabbri E 2014.** An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat Toxicol* 151: 14-26.
- ❖ **Franzellitti S, Buratti S, Donnini F, Fabbri E 2010.** Exposure of mussels to a polluted environment: insights into the stress syndrome development. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* 152: 24-33.

- ❖ **Franzellitti S, Canesi L, Auguste M, Wathsala RHGR, Fabbri E 2019.** Microplastic exposure and effects in aquatic organisms: a physiological perspective. *Environ Toxicol Pharmacol* 68: 37-51.
- ❖ **Fulton MH, Key PB 2001.** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as indicator of organophosphorus insecticides exposure and effects. *Environ Toxicol Chem* 20: 37-45.
- ❖ **Gadhav RV, Das A, Mahanwar PA, Gadekar PT 2018.** Starch based bio-plastics: the future of sustainable packaging. *Open J Polym Chem* 8: 21-33.
- ❖ **Galgani F, Hanke G, Maes T 2015.** Global distribution, composition and abundance of marine litter. In: Bergmann M, Gutow L, Klages M (eds) *Marine anthropogenic litter*. Springer, Cham.
- ❖ **Galgani F, Hanke G, Werner S, Oosterbaan L, Nilsson P, Fleet D, Kinsey S, Thompson R, Van Franeker J, Vlachogianni T, Liebezeit G 2013.** Monitoring guidance for marine litter in European seas. MSFD GES Technical Subgroup on Marine Litter. JRC Scientific and Policy Reports.
- ❖ **Galgani F, Souplet A, Cadiou Y 1996.** Accumulation of debris on the deep sea floor off the French Mediterranean coast. *Mar Ecol Prog Ser* 142: 225–234.
- ❖ **Gall SC, Thompson RC 2015.** The impact of debris on marine life. *Mar Pollut Bull* 92: 170-179.
- ❖ **Geller JB 1999.** Decline of a native mussel masked by sibling species invasion. *Conserv Biol* 13: 661-664.
- ❖ **Geret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno MJ, Cosson RP 2002a.** Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat Living Resour* 15: 61–66.
- ❖ **Geret F, Serafin A, Barreira L, Bebianno MJ 2002b.** Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. *Biomarkers* 7: 242–256.
- ❖ **GESAMP 2016.** Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part two of a global assessment. In: Kershaw PJ, Rochman CM (eds) (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), Vol. 93. Rep Stud GESAMP No, p. 220.

- ❖ **Geyer R, Jambeck JR, Law KL 2017.** Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* 3: 170-782.
- ❖ **Geyer H, Sheehan P, Kotzias D, Freitag D, Korte F (1982).** Prediction of ecotoxicological behaviour of chemicals: Relationship between physicochemical properties and bioaccumulation of organic chemicals in the mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 11: 1121-1134.
- ❖ **Giamberini L, Pihan JC 1997.** Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc. *Dis Aquat Org* 28: 221-227.
- ❖ **Gregory MR 2009.** Environmental implications of plastic debris in marine settings entanglement, ingestion, smothering, hangers on, hitch hiking and alien invasions. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 364: 2013–2025.
- ❖ **Groh KJ, Backhaus T, Carney-Almroth B, Geueke B, Inostroza PA, Lennquist A, Muncke J 2019.** Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. *Sci Total Environ* 651: 3253-3268.
- ❖ **Guilhermino L, Barros P, Silva MC, Soares AM 1998.** Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned. *Biomarkers* 3: 157–163.
- ❖ **Gunaalan K, Fabbri E, Capolupo M 2020.** The hidden threat of plastic leachates: A critical review on their impacts on aquatic organisms. *Water Res* 184: 116-170.
- ❖ **Halden RU 2010.** Plastics and health risks. *Annu Rev Public Health* 31: 179–194.
- ❖ **Halliwell B, Gutteridge JMC 1999.** *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- ❖ **Hamlin HJ, Marciano K, Downs CA 2015.** Migration of nonylphenol from foodgrade plastic is toxic to the coral reef fish species *Pseudochromis fridmani*. *Chemosphere* 139: 223–228.
- ❖ **Hammer J, Kraak MH, Parsons JR 2012.** Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology*. *Rev Environ Contam Toxicol* 29: 1–44.
- ❖ **Hansen E, Nilsson NH, Lithner D, Lassen C 2013.** Hazardous substances in plastic materials. COWI in cooperation with Danish Technological Institute/ Norwegian Environment Agency.
- ❖ **Harvell C, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus ADME, Overstreet RM, Porter JW, Smith GW, Vasta**

- GR 1999.** Emerging marine diseases climate links and anthropogenic factors. *Science* 285: 1505–1510.
- ❖ **Hermabessiere L, Dehaut A, Paul-Pont I, Lacroix C, Jezequel R, Soudant P, Duflos G 2017.** Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: a review. *Chemosphere* 182: 781-793.
 - ❖ **Hietanen B, Sunila I, Kristoffersson R 1988.** Toxic effects of zinc on the common mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in brackish water. Physiological and histopathological studies. *Ann Zool Fenn* 25: 341-347.
 - ❖ **Iheanacho SC, Adeolu AI, Nwose R, Ekpenyong J, Offu P, Amadi-Eke A, Ogunji J 2021.** Genotoxicity, oxidative stress and lysozyme induction in *Clarias gariepinus* chronically exposed to water-soluble fraction of burnt tire ash. *Ecotoxicology* 1-14.
 - ❖ **IPCC 2014.** Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva.
 - ❖ **Ismail NA, Mohd Tahir S, Yahya N, Abdul Wahid MF, Khairuddin NE, Hashim I, Abdullah MA 2016.** Synthesis and characterization of biodegradable starch-based bioplastics. *Mater Sci Forum* 84: 673-678.
 - ❖ **Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Law KL 2015.** Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347: 768–771.
 - ❖ **Juhel G, Bayen S, Goh C, Lee WK, Kelly BC 2017.** Use of a suite of biomarkers to assess the effects of carbamazepine, bisphenol A, atrazine, and their mixtures on green mussels, *Perna viridis*. *Environ Toxicol Chem* 36: 429-441.
 - ❖ **Kaewtatip K, Thongmee J 2013.** The effects of cross-linked starch on the properties of thermoplastic starch. *Mater Des* 45: 586-589.
 - ❖ **Kalambur S, Rizvi SS 2006.** An overview of starch-based plastic blends from reactive extrusion. *J Plast Film Sheeting* 22: 39-58.
 - ❖ **Karan H, Funk C, Grabert M, Oey M, Hankamer B 2019.** Green bioplastics as part of a circular bioeconomy. *Trends Plant Sci* 24: 237-249.
 - ❖ **Ke AY, Chen J, Zhu J, Wang YH, Hu Y, Fan ZL, Chen M, Peng P, Jiang SW, Xu XR, Li HX 2019.** Impacts of leachates from single-use polyethylene plastic bags on the early development of clam *Meretrix meretrix* (Bivalvia: Veneridae). *Mar Pollut Bull* 142: 54–57.

- ❖ **Kwan CS, Takada H 2016.** Release of additives and monomers from plastic wastes. In: Takada H, Karapanagioti HK (eds) *Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment*. Springer, Cham.
- ❖ **Lavers JL, Bond AL, Hutton I 2014.** Plastic ingestion by flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*): Implications for fledgling body condition and the accumulation of plastic-derived chemicals. *Environ Pollut* 187: 124–129.
- ❖ **Lebreton L, Andrady A 2019.** Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Commun* 5: 1-11.
- ❖ **Lebreton L, Slat B, Ferrari F, Sainte-Rose B, Aitken J, Marthouse R, Reisser J 2018.** Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Sci Rep* 8: 1-15.
- ❖ **Lee J, Hong S, Song YK, Hong SH, Jang YC, Jang M, Heo NW, Han GM, Lee MJ, Kang D 2013.** Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. *Mar Pollut Bull* 77: 349–354.
- ❖ **Lee DI, Cho HS, Jeong SB 2006.** Distribution characteristics of marine litter on the sea bed of the East China Sea and the South Sea of Korea. *Estuar Coast Shelf Sci* 70: 187–194.
- ❖ **Lee J, Kwon EE, Lam SS, Chen WH, Rinklebe J, Park YK 2021.** Chemical recycling of plastic waste via thermocatalytic routes. *J Clean Prod* 12: 9-89.
- ❖ **Li HX, Getzinger GJ, Ferguson PL, Orihuela B, Zhu M, Rittschof D 2016.** Effects of toxic leachate from commercial plastics on larval survival and settlement of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *Environ Sci Technol* 50: 924– 931.
- ❖ **Li HX, Huneault MA 2011.** Comparison of sorbitol and glycerol as plasticizers for thermoplastic starch in TPS/PLA blends. *J Appl Polym Sci* 119: 2439-2448.
- ❖ **Li Z, Lu G, Yang X, Wang C 2012.** Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. *Ecotoxicology* 21: 353-361.
- ❖ **Liddell HG, Scott R, Jones HS 1940.** *A Greek-English lexicon* / compiled by Henry George Liddell and Robert Scott.
- ❖ **Liquete C, Piroddi C, Drakou EG, Gurney L, Katsanevakis S, Charef A, Egoh B 2013.** Current status and future prospects for the assessment of marine and coastal ecosystem services: a systematic review. *PLoS One* 8: 67-73.
- ❖ **Lithner D, Damberg J, Dave G, Larsson A 2009.** Leachates from plastic consumer products – screening for toxicity with *Daphnia magna*. *Chemosphere* 74: 1195-1200.

- ❖ **Lithner D, Halling M, Dave G 2012.** Toxicity of electronic waste leachates to *Daphnia magna*: screening and toxicity identification evaluation of different products, components, and materials. Arch Environ Contam Toxicol 62: 579-588.
- ❖ **Lithner D, Larsson Å, Dave G 2011.** Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. Sci Total Environ 409: 3309–3324.
- ❖ **Liu H, Xie F, Yu L, Chen L, Li L 2009.** Thermal processing of starch-based polymers. Progr Polym Sci 34(12): 1348-1368.
- ❖ **Livingstone DR, Nasci C, Solè M, Da Ros L, O’Hara S, Peters L, Fossato V, Wootton AN, Goldfarb PS 1997.** Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2, 2’, 3, 4, 4’, 5’- hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. Aquat Toxicol 38: 205-224.
- ❖ **Lowe DM, Pipe RK 1994.** Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: as in vitro study. Aquat Toxicol 30: 357-365.
- ❖ **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.
- ❖ **Lu DR, Xiao CM, Xu SJ 2009.** Starch-based completely biodegradable polymer materials. Express Polym Lett 3: 366-375.
- ❖ **Lusher AL, Mchugh M, Thompson RC 2013.** Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. Mar Pollut Bull 67: 94-99.
- ❖ **Maire O, Amouroux JM, Duchêne JC, Grémare A 2007.** Relationship between filtration activity and food availability in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Mar Biol 152: 1293-1307.
- ❖ **Malham SK, Coulson CL, Runham NW 1998.** Effects of repeated sampling on the haemocytes and haemolymph of *Eledone cirrhosa* (Lam.). Comp Biochem Physiol 121: 431–440.
- ❖ **Marques-Santos LF, Grassi G, Bergami E, Faleri C, Balbi T, Salis A, Corsi I 2018.** Cationic polystyrene nanoparticle and the sea urchin immune system: biocorona formation, cell toxicity, and multixenobiotic resistance phenotype. Nanotoxicology 12: 847-867.
- ❖ **Martin-Diaz L, Franzellitti S, Buratti S, Valbonesi P, Capuzzo A, Fabbri E 2009.** Effect of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on

biomarker and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 94: 177-185.

- ❖ **Martínez-Gómez C, Bignell J, Lowe D 2015.** Lysosomal membrane stability in mussels. In: Aminot A, Rey F (eds) ICES Techniques in marine environmental sciences. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen.
- ❖ **Martínez-Gómez C, Robinson CD, Burgeot T, Gubbins M, Halldorsson HP, Albentosa M, Vethaak AD 2017.** Biomarkers of general stress in mussels as common indicators for marine biomonitoring programmes in Europe: The ICON experience. *Mar Environ Res* 124: 70-80.
- ❖ **Mato Y, Isobe T, Takada H, Kanehiro H, Ohtake C, Kaminum T 2001.** Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ Sci Technol* 35: 318–324.
- ❖ **McCarthy JF, Halbrook RS, Shugart LR 1991.** Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability. Publication no. 3072, ORNL/TM-11783. Environ Sci Div, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.
- ❖ **Mengoli A 1998.** Aspetti morfo-funzionali dei mitili. *Laguna* 4: 13-19.
- ❖ **Menicagli V, Balestri E, Lardicci C 2019.** Exposure of coastal dune vegetation to plastic bag leachates: a neglected impact of plastic litter. *Sci Total Environ* 683: 737–748.
- ❖ **Millet H, Vangheluwe P, Block C, Sevenster A, Garcia L, Antonopoulos R 2019.** The Nature of Plastics and Their Societal Usage. In: Hester RE, Harrison RM (eds), *Plastics and The Environment*. Royal Society of Chemistry, Londra.
- ❖ **Mimeault C, Trudeau VL, Moon TW 2006.** Waterborne gemfibrozil challenges the hepatic antioxidant defense system and down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor beta (PPAR β) mRNA levels in male goldfish (*Carassius auratus*). *Toxicology* 228: 140-150.
- ❖ **Moore MN 1988.** Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar Ecol Prog Ser* 46: 81-89.
- ❖ **Moore MN, Allen JI 2002.** A computational model of the digestive gland epithelial cell of the marine mussel and its simulated responses to aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res* 54: 579–584.

- ❖ **Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Leonard DP 2004.** An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res Fund-Mol M* 552: 247-268.
- ❖ **Moore MN, Koehler A, Lowe D, Viarengo A 2008.** Lysosomes and autophagy in aquatic animals. *Meth Enzymol* 451: 581-620.
- ❖ **Mordecai G, Tyler PA, Masson DG, Huvenne VA 2011.** Litter in submarine canyons off the west coast of Portugal. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 58: 2489–2496.
- ❖ **MSFD (Marine Strategy Framework Directive) 2008.** Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Marine Environmental Policy (OJ L 164/19. 22 pp. 25.06).
- ❖ **Munkittrick KR, McCarty LS 1995.** An integrated approach to aquatic ecosystem health: top-down, bottom-up or middle-out?. *J Aquat Ecosyst Health* 4: 77-90.
- ❖ **Murariu M, Dubois P 2016.** PLA composites: From production to properties. *Adv Drug Deliv Rev*, 107, 17-46.
- ❖ **Murray F, Cowie PR 2011.** Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Mar Pollut Bull* 62: 1207-1217.
- ❖ **Muthukumar T, Aravinthan A, Lakshmi K, Venkatesan R, Vedaprakash L, Doble M 2011.** Fouling and stability of polymers and composites in marine environment. *Int Biodeterior Biodegradation* 65: 276–284.
- ❖ **Nasci C, Nesto N, Monteduro RA, Da Ros L 2002.** Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (VE Italy). *Mar Environ Res* 54: 811–816.
- ❖ **Nielsen IR, Diment J, Dobson S 1993.** Environmental hazard assessment: Aniline. Toxic Substances Division, Department of Environment: London.
- ❖ **NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council 1987.** Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspect* 74: 3-9.
- ❖ **Oehlmann J, Fioroni P, Stroben E, Markert B 1996.** Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Sci Total Environ* 188: 205– 223.
- ❖ **Ogata Y, Takada H, Mizukawa K, Hirai H, Iwasa S, Endo S, Mato Y, Saha M, Okuda K, Nakashima A 2009.** International Pellet Watch: Global monitoring of

persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Mar Pollut Bull* 58: 1437–1446.

- ❖ **Olmedo P, Hernández AF, Pla A, Femia P, Navas-Acien A, Gil F 2013.** Determination of essential elements (copper, manganese, selenium and zinc) in fish and shellfish samples. Risk and nutritional assessment and mercury–selenium balance. *Food Chem Toxicol* 62: 299-307.
- ❖ **Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP 2006.** Biomarkers of exposure and reproduction related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Arch Environ Contam Toxicol* 50: 361–369.
- ❖ **Papaleo B, Caporossi L, Bernardini F, Cristadoro L, Bastianini L, De Rosa M, Capanna S, Marcellini L, Loi F, Battista G 2011.** Exposure to styrene in fiberglass-reinforced plastic manufacture: Still a problem. *J Occup Environ Med* 53: 1273–1278.
- ❖ **Payne JF, Fancey LL, Rahimtula AD, Porter EL 1987.** Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Compar Biochem Physiol* 86: 233-245.
- ❖ **Peakall DB, Shugart LR 1993.** Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. NATO ASI Series H: Vol. 68. Springer-Verlag, Heidelberg.
- ❖ **Pearse AGE 1972.** Histochemistry, theoretical and applied, Vol. 2. London: Churchill-Livingstone.
- ❖ **Pellerin-Massicotte J 1997.** Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive gland of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *J Rech Oceanogr* 22: 91–98.
- ❖ **Pham CK, Ramirez-Llodra E, Alt CH, Amaro T, Bergmann M, Canals M, Davies J, Duineveld G, Galgani F, Howell KL 2014.** Marine litter distribution and density in European seas, from the shelves to deep basins. *PLoS One* 9: 95-839.
- ❖ **Pipe RK, Coles JK 1995.** Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* 5: 581– 595.
- ❖ **Pizzimenti S, Toaldo C, Pettazoni P, Dianzani MU, Barrera G 2010.** The "two-faced" effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the hallmarks of cancer. *Cancers* 2: 338-363.
- ❖ **PlasticsEurope 2020.** The facts – An analysis of European Plastics Production, Demand and Waste data. Available at: <https://www.plasticseurope.org/it/>.

- ❖ **Prasetya G, Black K, De Lange W, Borrero J, Healy T 2012.** Debris dispersal modeling for the great Sumatra Tsunamis on Banda Aceh and surrounding waters. *Nat Hazards* 60: 1167–1188.
- ❖ **Prevenios M, Zeri C, Tsangaris C, Liubartseva S, Fakiris E, Papatheodorou G 2018.** Beach litter dynamics on Mediterranean coasts: Distinguishing sources and pathways. *Mar Pollut Bull* 129: 448-457.
- ❖ **Raftopoulou EK, Dimitriadis VK 2012.** Aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, in relation to lysosomal enzymes, lipofuscin presence and shell size: Contribution in the assessment of marine pollution biomarkers. *Mar Pollut Bull* 64: 182-188.
- ❖ **Rahmat AR, Rahman WA, Sin LT, Yussuf AA 2009.** Approaches to improve compatibility of starch filled polymer system: A review. *Mater Sci Eng* 29: 2370-2377.
- ❖ **Regoli F, Giuliani ME 2014.** Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar Environ Res* 93: 106-117.
- ❖ **Regoli F, Winston GW, Gorbi S, Frenzilli G, Nigro M, Corsi I, Focardi S 2003.** Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. *Environ Toxicol Chem* 22: 56–65.
- ❖ **Remberger M, Woldegiorgis A, Kaj L, Andersson J, Palm Cousins A, Dusan B, Ekheden Y, Brorström-Lundén E 2006.** Results from the Swedish Screening 2005. Subreport 2: Biocides. IVL report B1700.
- ❖ **Rendell-Bhatti F, Paganos P, Pouch A, Mitchell C, D’Aniello S, Godley BJ, Jimenez-Guri E 2021.** Developmental toxicity of plastic leachates on the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environ Pollut* 269: 11-74.
- ❖ **Rial R, González-Durruthy M, Somoza M, Liu Z, Ruso JM 2021.** Unraveling the Compositional and Molecular Features Involved in Lysozyme-Benzothiazole Derivative Interactions. *Molecules* 26: 55-58.
- ❖ **Rickwood CJ, Galloway TS 2004.** Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect: a study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquat Toxicol* 67: 45-56.
- ❖ **Ringwood AH, Hoguet J, Keppler C, Gielazyn M 2004.** Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters–*Crassostrea virginica*. *Mar Environ Res* 58: 151-155.

- ❖ **Rios LM, Moore C, Jones PR 2007.** Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar Pollut Bull* 54: 1230-1237.
- ❖ **Robinson TB, Griffiths CL 2002.** Invasion of Langebaan Lagoon, South Africa, by *Mytilus galloprovincialis* – effects on natural communities. *Afr Zool* 37: 151-158.
- ❖ **Robson AA, Garcia De Leaniz C, Wilson RP, Halsey LG 2010.** Behavioural adaptations of mussels to varying levels of food availability and predation risk. *J Molluscan Stud* 76: 348-353.
- ❖ **Rocher B, Le Goff J, Peluhet L, Briand M, Manduzio H, Gallois J, Devier MH, Geffard O, Gricourt L, Augagneur S, Budzinski H, Pottier D, Andre V, Lebailly P, Cachot J 2006.** Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquat Toxicol* 79: 65–77.
- ❖ **Rochman CM 2015.** The complex mixture, fate and toxicity of chemicals associated with plastic debris in the marine environment. In: Bergmann M, Gutow L, Klages M (eds) *Marine anthropogenic litter*. Springer, Cham.
- ❖ **Rochman CM, Hoh E, Hentschel BT, Kaye S 2013.** Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris. *Environ Sci Technol* 47: 1646–1654.
- ❖ **Roméo M, Gnassia-Barelli M 1997.** Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussates*. *Comp Biochem Physiol Part-C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118: 33-37.
- ❖ **Ross G, Ross S, Tighe BJ 2017.** Bioplastics: new routes, new products. In: Gilbert M (eds) *Brydson's Plastics Materials*, Vol.8. Elsevier, Oxford.
- ❖ **Ryan PG 2015.** A brief history of marine litter research. In: Bergmann M, Gutow L, Klages M (eds) *Marine anthropogenic litter*. Springer, Cham.
- ❖ **Ryan PG, Moore CJ, Van Graneker JA, Moloney CL 2009.** Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 1999–2012.
- ❖ **Sáenz LA, Seibert EL, Zanette J, Fiedler HD, Curtius AJ, Ferreira JF, Bainy ACD 2010.** Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicol Environ Saf* 73: 796-804.
- ❖ **Schiavo S, Oliviero M, Chiavarini S, Manzo S 2020.** Adverse effects of oxodegradable plastic leachates in freshwater environment. *Environ Sci Pollut Res* 27: 8586–8595.

- ❖ **Schlining K, Von Thun S, Kuhnz L, Schlining B, Lundsten L, Stout NJ, Chaney L, Connor J 2013.** Debris in the deep: Using a 22-year video annotation database to survey marine litter in Monterey Canyon, central California, USA. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 79: 96–105.
- ❖ **Seuront L 2018.** Microplastic leachates impair behavioural vigilance and predator avoidance in a temperate intertidal gastropod. *Biol Lett* 14: 201-453.
- ❖ **Sgaravatti ÂM, Magnusson AS, Oliveira AS, Mescka CP, Zanin F, Sgarbi MB, Dutra-Filho CS 2009.** Effects of 1, 4-butanediol administration on oxidative stress in rat brain: Study of the neurotoxicity of γ -hydroxybutyric acid in vivo. *Metab Brain Dis* 24: 271-282.
- ❖ **Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S 2008.** Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol Adv* 26: 246–265.
- ❖ **Shamsuddin IM, Jafar JA, Shawai ASA, Yusuf S, Lateefah M, Aminu I 2017.** Bioplastics as better alternative to petroplastics and their role in national sustainability: a review. *Adv Biosci Bioeng* 5: 63-78.
- ❖ **Siracusa V, Blanco I 2020.** Bio-Polyethylene (Bio-PE), Bio-Polypropylene (Bio-PP) and Bio-Poly (ethylene terephthalate) (Bio-PET): recent developments in bio-based polymers analogous to petroleum-derived ones for packaging and engineering applications. *Polymers* 12: 16-41.
- ❖ **Sjollema SB, Redondo-Hasselerharm P, Leslie HA, Kraak MHS, Vethaak AD 2016.** Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? *Aquat Toxicol* 170: 259–261.
- ❖ **Stebbing ARD 1985.** Organotins and water quality - Some lessons to be learned. *Mar Pollut Bull* 16: 383-390.
- ❖ **Stegeman JJ, Brouwer M, Richard TDG, Förlin L, Fowler BA, Sanders BM, van Veld PA 1992.** Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle PM, Bergman HL (eds) *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Hystological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.
- ❖ **Storz G, Imlayt JA 1999.** Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2: 188-194.
- ❖ **Storz H, Vorlop KD 2013.** Bio-based plastics: status, challenges and trends. *Appl Agric For Res* 63: 321-332.

- ❖ **Svendsen C, Spurgeon DJ, Hankard PK, Weeks JM 2004.** A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker?. *Ecotoxicol Environ Saf* 57: 20-29.
- ❖ **Tanaka K, Takada H, Yamashita R, Mizukawa K, Fukuwaka M, Watanuki Y 2013.** Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. *Mar Pollut Bull* 69: 219–222.
- ❖ **Tanaka K, Watanuki Y, Takada H, Ishizuka M, Yamashita R, Kazama M, Hiki N, Kashiwada F, Mizukawa K, Mizukawa H, Hyrenbach D, Hester M, Ikenaka Y, Nakayama SMM 2020.** In vivo accumulation of plastic-derived chemicals into seabird tissues. *Curr Biol* 30: 723–728.
- ❖ **Tetu SG, Sarker I, Schrameyer V, Pickford R, Elbourne LD, Moore LR, Paulsen IT 2019.** Plastic leachates impair growth and oxygen production in *Prochlorococcus*, the ocean’s most abundant photosynthetic bacteria. *Commun Biol* 2: 1-9.
- ❖ **Teuten EL, Saquing JM, Knappe DR, Barlaz MA, Jonsson S, Björn A, Takada H 2009.** Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 2027-2045.
- ❖ **Thakur S, Chaudhary J, Sharma B, Verma A, Tamulevicius S, Thakur VK 2018.** Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. *Curr Opin Green Sustain Chem* 13: 68-75.
- ❖ **Thomas M, Jon B, Craig S, Edward R, Ruth H, John B, Matthew S 2020.** The world is your oyster: low-dose, long-term microplastic exposure of juvenile oysters. *Heliyon* 6: 3-103.
- ❖ **Thompson RJ, Ratcliffe NA, Bayne BL 1974.** Effects of starvation on structure and function in the digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *J Mar Biolog Assoc UK* 54: 699-712.
- ❖ **Thompson RC, Swan SH, Moore CJ, VomSaal FS 2009.** Our plastic age. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 364: 1973–1976.
- ❖ **Tourinho PS, Do Sul JAI, Fillmann G 2010.** Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil?. *Mar Pollut Bull* 60: 396-401.
- ❖ **Tudor DT, Williams AT 2003.** Public perception and opinion of visible beach aesthetic pollution: the utilisation of photography. *J Coast Res* 45: 1104-1115.
- ❖ **UNEP 2015.** Biodegradable plastics and marine litter: misconceptions, concerns and impacts on marine environments. United Nations Environment Program, Nairobi.

- ❖ **UNEP 2019.** Legal Limits on Single-Use Plastics and Microplastics: A Global Review of National Laws and Regulations. United Nations Environment Programme, Nairobi.
- ❖ **UNEP 2009.** Marine litter: A global challenge. United Nations Environment Program, Nairobi.
- ❖ **UNEP 2016.** Marine plastic debris and microplastics. Global lessons and research to inspire action and guide policy change. United Nations Environment Programme, Nairobi.
- ❖ **UNEP/MAP-PlanBleu 2020.** State of the Environment and Development in the Mediterranean. United Nations Environment Programme/Mediterranean Action Plan and Plan Bleu, Nairobi.
- ❖ **UNEP/RAMOGÉ 1999.** Manual on The Biomarkers Recommended for The MED POL Biomonitoring Programme. United Nations Environment Programme, Athens, p. 94.
- ❖ **Valbonesi P, Sartor G, Fabbri E 2003.** Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Sci Total Environ* 312: 79–88.
- ❖ **Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.
- ❖ **Vandermeersch G, Van Cauwenberghe L, Janssen CR, Marques A, Granby K, Fait G, Devriese L 2015.** A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environ Res* 143: 46-55.
- ❖ **Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A 2007.** The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Physiol Part-C Toxicol Pharmacol* 146: 281–300.
- ❖ **Vink ET, Rabago KR, Glassner DA, Gruber PR 2003.** Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production. *Polym Degrad Stab* 80: 403-419.
- ❖ **Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou MJ, Valavanidis A 2007.** Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar Pollut Bull* 54: 1361-1371.

- ❖ **Von Moos N, Burkhardt-Holm P, Köhler A 2012.** Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ Sci Technol* 46: 11327–11335.
- ❖ **Wadhia K, Thompson KC 2007.** Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotest for potencia implementation of the Water Framework Directive. *Trend Anal Chem* 26: 300-307.
- ❖ **Walker CH 1998.** Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. *Environ Health Perspect Suppl* 106: 613-621.
- ❖ **Werner S, Budziak A, Van Franeker JA, Galgani F, Hanke G, Maes T, Vlachogianni T 2016.** Harm caused by marine litter. MSFD GES TG Marine litter Thematic report. JRC Technical report.
- ❖ **WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS) 1993.** Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.
- ❖ **Winston GW, Di Giulio RT 1991.** Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 19: 137-161.
- ❖ **Woldegiorgis A, Wiklund P, Remberger M, Kaj L, Viktor T, Lilja K, Brorström-Lundén E, IVL and Dye C, NILU 2008.** Results from the Swedish National Screening Programme 2007. Subreport 1: Amines. IVL report B1817.
- ❖ **Worm B, Barbier EB, Beaumont N, Duffy JE, Folke C, Halpern BS, Watson R 2006.** Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* 314: 787-790.
- ❖ **Xu H, Vanhooren HM, Verbeken E, Yu L, Lin Y, Nemery B, Hoet PH 2004.** Pulmonary toxicity of polyvinyl chloride particles after repeated intratracheal instillations in rats. Elevated CD4/CD8 lymphocyte ratio in bronchoalveolar lavage. *Toxicol Appl Pharmacol* 194: 122-131.
- ❖ **Yu JY, Lee SY, You YS 2018.** International Certification Marks Trends and Current Regulation Situation of Bio Plastics. *Korean J Packag Sci Technol* 24: 131-140.
- ❖ **Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler LA 2013.** Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ Sci Technol* 47: 7137–7146.
- ❖ **Zinkl JG, Lockhart WL, Kenny SA, Ward FJ 1991.** The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: Mineau P (eds) *Cholinesterase-Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment, Chemicals in Agriculture.* Elsevier, Amsterdam.

CAPITOLO 7

7. RINGRAZIAMENTI

Per suggellare la conclusione di questo tanto atteso traguardo, desidero rivolgere un sentito Grazie a tutti coloro i quali, con pazienza e dedizione, mi hanno teso la mano, accompagnandomi lungo la strada di un cammino a me tanto caro quanto ignoto.

Un ringraziamento particolare va alla professoressa Elena Fabbri, per la fiducia accordatami accettando il ruolo di relatrice di questa tesi, per la passione chiara e tangibile che è in grado di trasmettere ai suoi studenti, me compresa, verso il suo mestiere, nonché per le doti di professionalità e competenza con le quali mi ha guidato nella messa a punto di quest'elaborato.

Un dovuto, ma sentito ringraziamento non può che essere rivolto a Marco Capolupo, per il tempo dedicatomi, la disponibilità e la pazienza dimostrata nel redimere qualsivoglia mio dubbio nell'iter verso la laurea, così come per la gentilezza che lo contraddistingue; qualità, queste, che hanno senza dubbio contribuito ad arricchire ulteriormente la mia esperienza formativa.

Ringrazio, inoltre, uno ad uno i miei colleghi, compagni fedeli di avventure, alcuni dei quali sono fiera di poter definire amici, perché ognuno di loro ha contribuito a regalarmi una parte di sé, permettendomi di crescere sia umanamente che professionalmente. Vi ringrazio per avermi concesso il privilegio del confronto, per avermi quotidianamente inondato di stimoli, linfa vitale per me, così come per non aver mai smesso di farmi sentire a casa nel corso dei due anni di permanenza a Ravenna, nonostante mi trovassi a 553 km di distanza. La verità è che la realtà che ho vissuto ha superato di gran lunga le aspettative, ragion per cui ve ne sarò probabilmente per sempre grata. In particolar modo, ringrazio Clarissa, Enrico e Alessio, per essere stati parte integrante di questa realtà.

Grazie alle mie attuali coinquiline: Anastasia, Angela, Francesca e Benedetta, per la semplicità con la quale abbiamo fin dal principio instaurato un legame, fatto di premura e condivisione, di parole di conforto subito dopo uno sfogo, cene regionali e balli di gruppo fino a tarda sera. Vi ringrazio perché insieme, anche se per poco, siamo state una squadra.

Similmente ringrazio Martina, mia ineguagliabile coinquilina, per avermi permesso di assaporare il gusto di un'amicizia tra poli opposti, in grado, però, di sostenersi vicendevolmente

senza fatiche né dissapori. Grazie per aver saputo leggere nei miei occhi i più svariati stati d'animo, riconoscendo ogni attimo insieme come degno di esser vissuto intensamente.

Ringrazio mio fratello Alessio, perché, nonostante la bufera indomabile di emozioni contrastanti che provo nei suoi confronti, so che resterà sempre al mio fianco. Le nostre diversità si risolvono, da sempre, in una curiosa quanto bizzarra forma di unione inscindibile, motivo per cui sento di ringraziarti perché questa costituisce anno dopo anno una conferma ineluttabile.

Infine, un profondo ringraziamento va ai miei genitori, mia madre e mio padre, per non avermi mai ostacolato nella corsa verso i miei sogni, per quanto strampalati questi fossero, per avermi dato l'opportunità di esser viaggiatore, per aver compreso le mie esigenze senza opporre resistenza, per aver dimostrato di possedere lo straordinario dono di riconoscere e apprezzare le vittorie, accettando, al contempo, le inevitabili sconfitte insite nella natura umana. Vi sono riconoscente perché quel che sono oggi è, senza dubbio alcuno, frutto del vostro accurato, paziente e sacrificato lavoro. E soprattutto, cosa ben più importante, un grazie non sarà mai abbastanza per esprimere la gratitudine che provo nel sapere che, vada come vada, per voi io sarò sempre la vostra Tanya.

Immensamente, grazie.

Tanya