

Riassunto

Ad oggi l'inquinamento da plastiche in mare viene universalmente riconosciuto quale minaccia globale, in grado di indurre danni alla salute, generare perdite economiche, depauperare il paesaggio naturale, oltre che impattare sull'ambiente. Se agli albori dello studio di tale materia, la ricerca si focalizzava principalmente sull'indagine della frazione macroscopica del *marine litter*, negli ultimi anni, l'attenzione degli scienziati si è concentrata, viceversa, sulla frazione più piccola, cioè le micro- (MP, particelle < 5 mm) e nano-plastiche (NP, < 1µm). Le ragioni di tale interesse sono varie: i) organismi marini appartenenti ad ogni livello trofico, dai produttori primari ai più alti ordini di consumatori, risultano capaci di ingerire e/o interagire con le plastiche e subire impatti a diversi livelli dell'organizzazione biologica; ii) tale frazione rappresenta una forma di inquinamento di lunga durata poiché la frammentazione delle macroplastiche già presenti in mare continuerebbe a produrre microplastiche secondarie anche qualora cessasse l'afflusso di nuovi rifiuti; iii) in riferimento alle nanoplastiche, la scarsità delle attuali conoscenze scientifiche impedisce una reale analisi del problema e di conseguenza una valutazione del rischio ambientale.

Questo progetto di dottorato si sviluppa su due linee di ricerca, ciascuna delle quali focalizzata su una particolare frazione del *marine litter*: le MICROplastiche e le NANOpastiche.

Gli obiettivi della prima linea di ricerca sono volti alla descrizione della variabilità della tossicità di eluati e sospensioni di microplastiche di polietilene tereftalato (PET), eletto come polimero di riferimento, al variare di alcuni fattori abiotici e biotici sospettati, in letteratura, di influenzarne il rischio chimico e fisico. In particolare, nel primo lavoro pubblicato e interamente riportato nella tesi, sono state investigate le possibili interazioni fra gli eluati e le sospensioni di MP di diversa dimensione (5-3,000 µm) con il pH dell'acqua di mare (Acido = 7.5 vs. Standard = 8.0) e la disponibilità di cibo (presenza/assenza); il tutto tramite l'allestimento di un test multispecie composto da *Vibrio fischeri* (Beijerinck, 1889), *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin, 1898), e *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Le analisi sono state poi ulteriormente estese a teleostei marini: giovanili di pesce pagliaccio *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830), sono stati esposti per 3 giorni a sospensioni di MP in presenza di cibo. La risposta biologica si è basata sulla misura dell'attività enzimatica di singoli *biomarker* legati allo stress

ossidativo (catalasi; glutatione-s-transferasi) e sulla capacità totale di scavenger ossidoradicali per mezzo del saggio TOSCA.

Dai risultati ottenuti nella prima linea di ricerca, e alla luce delle concentrazioni testate, risulta una bassa tossicità legata alle microplastiche di PET. In particolare: *i*) le risposte sono state specie-specifiche; *ii*) gli eluati si sono dimostrati generalmente più tossici delle sospensioni; *iii*) la taglia più piccola delle MP non sempre ha causato risposte biologiche più evidenti; *iv*) il pH e le variazioni di cibo sono in grado di modulare le risposte ecotossicologiche degli echinodermi secondo meccanismi non dimostrabili allo stato attuale delle conoscenze; *v*) non è stata evidenziata una risposta concentrazione-dipendente nei giovanili di pesce pagliaccio, infatti la concentrazione più bassa di MP ha indotto effetti 1.87 volte superiori rispetto alla concentrazione più alta.

Nei primi mesi del dottorato, la letteratura sull'inquinamento da nanoplastiche era ancora ridotta (solo 32 lavori pubblicati) ma si percepiva un graduale aumento di interesse della comunità scientifica verso le plastiche sub-micrometriche. Tale interesse si è presto concretizzato in un sensibile aumento della produzione scientifica sul tema, da cui è nato il primo obiettivo di questa seconda linea di ricerca: l'analisi bibliografica. Nella *review* pubblicata e interamente riportata nella tesi, viene indagata la conoscenza scientifica dell'inquinamento da nanoplastiche: dalla degradazione dei polimeri alla loro presenza in campioni di acqua marina, passando attraverso le evidenze in laboratorio della formazione e rilascio di NP. Si è provveduto alla classificazione dei lavori presi in esame sulla base degli aspetti trattati, dedicando particolare attenzione a quelli riguardanti gli effetti ecotossicologici e inoltre sono stati forniti suggerimenti per studi futuri. Il secondo obiettivo, viceversa, ha previsto lo sviluppo di competenze tecnico-sperimentali tramite allestimento di test tossicologici presso laboratori di ricerca nazionali e stranieri. I frutti di tale attività vengono descritti nel secondo lavoro riportato nella tesi, in preparazione per essere sottomesso, in cui giovanili di pesce pagliaccio sono stati esposti a nanoplastiche di polistirene (PS-COOH) per 7 giorni. Le possibili implicazioni biologiche vengono indagate per mezzo di un approccio multidisciplinare basato sulla risposta biochimica connessa allo stress ossidativo in aggiunta a quella molecolare basata su tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) quali il sequenziamento del trascrittoma codificante (RNA-seq).

Da quanto appreso durante la preparazione della *review*, le nanoplastiche sembrerebbero essere un contaminante dagli effetti allarmanti, tuttavia, molte domande

(tra tutte, la quantificazione del fenomeno) rimangono irrisolte e dunque risulta prematuro prendere una posizione sul rischio reale che le NP eserciterebbero sulla biodiversità e sul funzionamento degli ecosistemi naturali. Il test realizzato su giovanili di pesce pagliaccio ha voluto colmare parzialmente la scarsità di conoscenze sugli effetti delle NP nei pesci marini (un target molto sottostudiato) ed ha evidenziato come: *i*) la catalasi, il glutatione-s-trasferasi, la glutatione reduttasi e il saggio TOSC idrossilico e perossilico, non siano stati significativamente alterati; *ii*) l'analisi integrata delle risposte biologiche (indice IBRv2) riporti una riduzione globale dello stato di salute dei pesci esposti alle NP dimostrando come tale indice possa rappresentare un approccio rapido, semplice ed informativo specialmente nel discriminare le differenze tra trattamenti che viceversa non verrebbero identificate dall'analisi statistica sui singoli *biomarker*; *iii*) la concentrazione più bassa sia in grado di suscitare risposte tossicogenomiche maggiori rispetto alle concentrazioni medie ed elevate, probabilmente a causa delle aggregazioni di NP a maggior concentrazione che si verificano nell'acqua di mare; *iv*) i geni con un cambiamento più elevato nei livelli trascrizionali siano stati quelli coinvolti nell'infezione virale e nella risposta infiammatoria (e in misura minore nella ciliogenesi, nel metabolismo energetico, nelle funzioni olfattive e riproduttive). In conclusione, questo studio ha rilevato una risposta minore allo stress ossidativo e ha contribuito a comprendere la cascata di eventi molecolari che vengono attivati dall'esposizione a PS-NP nei giovani del pesce pagliaccio.

Abstract

Nowadays, plastic pollution is recognised as a worldwide concern because it causes harm to the environment and generates adverse economic, health and aesthetic impacts. While at the beginning of the study of this subject, the research was focused mainly on the investigation of the macroscopic fraction of the marine litter, in recent years, the attention of scientists has extended also toward the smallest fraction, that is, the micro- (MP, particles < 5 mm) and nano- plastics (NP, < 1 µm). The reasons for such emerging interest are diverse: *i*) marine organisms belonging to every trophic level, from primary producers to higher-orders of consumers have been reported to ingest and/or interact with plastic and suffer impacts at different levels of biological organization; *ii*) this fraction is a long-term form of pollution since the fragmentation of macroplastics already present at sea would continue to produce secondary microplastics even if the influx of new waste will cease; *iii*) with regard to nanoplastics, the scarcity of current scientific knowledge prevents a real analysis of the problem and consequently an environmental risk assessment.

Hence, this PhD project was developed on two parallel lines of research, each of which concentrated on a specific fraction of the marine litter: the MICROplastic and the NANOplastic.

The objectives of the first line of research are aimed at describing the variability of the toxicity of leachates and suspensions of polyethyleneterephthalate (PET) microplastics, elected as the reference polymer, as some abiotic and biotic factors suspected, in the literature, of influencing their chemical and physical risk vary. In particular, in the first full paper reported in this thesis were investigated the possible interactions between leachates and suspensions of different size (5-3,000 µm) of PET microplastic, the water pH (Ac=7.5 and St=8.0) and food variations (presence/absence). All through the setting up of a multispecies test composed by *Vibrio fischeri* (Beijerinck, 1889), *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin, 1898) and *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). The analyses were subsequently extended also to marine teleosts: juveniles of *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830) were investigated in a 3-days water-exposure to suspensions of PET MPs under feeding conditions. Both single enzymes related to oxidative stress response

(catalase; glutathione-s-transferase) and total oxyradical scavenging capacity (TOSCA assay) were tested.

According to the final results obtained, considering the MP concentrations analyzed in these studies, a low toxicity is attributable to PET microplastics and, in particular: *i*) responses were species-specific; *ii*) leachates demonstrated to be more toxic than suspensions of MPs; *iii*) smaller sizes of plastics not always corresponded to stronger biological responses; *iv*) pH and food variations modulated the ecotoxicological responses of echinoderms according to mechanisms not demonstrable in the current state of knowledge; *v*) a concentration-dependent response was not evident in clownfish juveniles in which the lower concentration of MPs induced effects 1.87 times greater than the higher concentration.

Whereas the body of literature on nanoplastic pollution was very limited (only 32 published works) in the early months of the Doctorate, the scientific community's interest in plastic pollution gradually began to focus on sub-micrometric particles. This attention soon resulted in a significant increase in scientific production on the subject from which the first objective of this second line of research was born: bibliographical analysis. The first full paper reported in this thesis explores the scientific knowledge on the topic, from polymer degradation to occurrence in marine water, passing across laboratory evidence of nanoplastic formation. The works examined were classified on the basis of the aspects covered, with particular attention being paid to those relating to ecotoxicological effects, and suggestions were also made for future studies. The second objective, on the other hand, focused on the development of technical and experimental skills through the preparation of toxicological tests at national and foreign research laboratories. The fruits of this activity are described in the second work reported in the thesis, in preparation to be submitted, in which juveniles of clownfish were exposed to 100 nm polystyrene nanoplastics (PS-COOH) for 7 days. The possible biological implications were investigated by means of a multidisciplinary approach spanning from biochemical responses related to oxidative stress, to gene expression analysis by the Next Generation Sequencing (NGS) of the whole transcriptome (RNA-seq technique).

As we learn from the review, the framework on nanoplastics toxicity seems to be alarming. However, many knowledge gaps (quantification of the phenomenon first) still exist and therefore it is difficult to take a position about the risk they pose to the biodiversity and functioning of natural ecosystems. The experiment performed on

clownfish juveniles detected a minor response in oxidative stress and contributed in understanding the cascade of molecular events that are activated by the exposure to PS-NPs in the clownfish juveniles. Specifically: *i*) sensitive biomarkers such as catalase, glutathione S-transferase, glutathione reductase and TOSC Assay (hydroxylic and peroxylic) were not significantly altered; *ii*) the integrated analysis of biomarker responses reported a reduction in overall health status of fishes demonstrating how the IBRv2 index may represent a quick, useful and informative approach especially in discriminating against any differences between treatments that cannot be identified by statistical analysis on individual biomarkers; *iii*) RNA-seq analysis highlighted significant dysregulation of immune genes especially in the low condition which elicited higher toxicogenomic response than medium and high concentrations (likely due to NP aggregations occurring in sea water); *iv*) remarkably, the genes showing higher change in transcriptional levels were predominantly factors involved in viral infection and inflammatory response, and to less extent in ciliogenesis, energy metabolism, olfactory and reproductive functions.