



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/12

STUDIO DELLA BIODISTRIBUZIONE DI SOSTANZE BIOLOGICAMENTE ATTIVE IN ORGANISMI ACQUATICI

IL DOTTORE
Dott. DARIO SAVOCA

IL COORDINATORE
Prof.ssa GIOVANNA PITARRESI

IL TUTOR
Prof. ANDREA PACE

IL CO TUTOR
Dott.ssa RAFFAELLA MELFI

CICLO XXXIV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2022

INDICE

Premessa	7
1. Introduzione	8
1.1 La plastica: fonte e vettore di inquinanti	8
1.2 Gli inquinanti emergenti	13
1.2.1 Gli inquinanti organici persistenti (POPs)	15
1.2.1.1 I composti poli- e perfluorurati (PFCs)	16
1.2.1.2 Gli esteri ftalici (PAEs)	19
1.2.2 Gli antibiotici nell'ambiente e lo sviluppo dell'antibiotico-resistenza	23
1.3 I metalli pesanti	25
2. Stato dell'arte e metodologie	28
2.1 Bioaccumulo, biodistribuzione, tossicologia, modelli sperimentali e di biomonitoraggio	28
2.2 Tecniche di estrazione ed analisi	30
2.2.1 Estrazione solido-liquido, liquido-liquido ed in fase solida	31
2.2.2 Mineralizzazione ed ICP-MS	38
2.2.3 HPLC-MS, GC-MS, metodi di analisi spettrometrica ed estrazione cromatografica	39
2.2.4 PCR	44
2.3 Metodologie di rimozione degli inquinanti per il biorisamento: accumulo attraverso matrici organiche e fotodegradazione	46
3. Scopo del lavoro	49
4. Composti organofluorurati (PFCs) negli organismi acquatici	52
4.1 Composti organofluorurati (PFCs) negli organismi acquatici: un'analisi dello stato dell'arte	52
4.1.1 Solubilità, persistenza ed emivita dei PFCs	52
4.1.2 Potenziali di bioaccumulo: BCF, BAF, BSAF, BMF e TMF	54
4.1.3 Dati di bioaccumulo	59
4.1.3.1 Bioaccumulo in ambiente naturale	59

4.1.3.2 Bioaccumulo in condizioni sperimentali controllate	61
4.1.4 Biomonitoraggio nel biota acquatico	63
4.1.5 Profili di contaminazione e biodistribuzione	71
4.1.6 Effetti di esposizione ai PFCs	74
4.1.7 Aspetti critici e prospettive ambientali future	81
4.1.8 Abbreviazioni	83
4.2 <i>Paracentrotus lividus</i> : una specie sentinella nel biomonitoraggio ambientale del PFOA	84
4.2.1 Introduzione	84
4.2.2 Risultati e discussione	85
4.2.2.1 Analisi chimiche dell'acqua di mare e di torrente, <i>P. oceanica</i> , <i>P. lividus</i> e relativi fattori di concentrazione	85
4.2.2.2 Analisi statistiche: PCA e PERMANOVA	90
4.2.3 Materiali e metodi	93
4.2.3.1 Campagna di campionamento	93
4.2.3.2 Estrazione ed analisi del PFOA in differenti matrici organiche complesse	96
4.2.3.3 Elaborazioni statistiche e rappresentazione grafica dei dati	101
4.2.4 Conclusioni	102
4.3 Valutazione degli effetti di esposizione al PFOA in ambiente controllato su <i>Paracentrotus lividus</i>	104
4.3.1 Introduzione	104
4.3.2 Risultati	105
4.3.2.1 Analisi chimiche di acqua, fluido celomatico e gonadi	105
4.3.2.2 Osservazione morfologica degli embrioni	110
4.3.2.3 Effetti del PFOA sull'espressione genica in gonadi ed embrioni	116
4.3.3 Discussione	118
4.3.4 Materiali e metodi	122
4.3.4.1 Campionamento e disegno sperimentale	122
4.3.4.2 Materiali, attrezzature, software e tecniche di estrazione ed analisi del PFOA	124
4.3.4.3 Fecondazione in vitro e osservazione degli embrioni	124
4.3.4.4 Analisi dell'espressione genica	126
4.3.4.5 Analisi statistiche	126
4.3.5 Conclusione	127

5. Ftalati in organismi acquatici: studi di trasferimento e biorisanamento	128
5.1 Trasferimento materno ed ambientale di ftalati nelle uova di <i>Caretta caretta</i>	128
5.1.1 Introduzione	128
5.1.2 Risultati	131
5.1.3 Esperimento di trasferimento degli ftalati tra guscio ed acqua di mare	137
5.1.4 Discussione	139
5.1.5 Materiali e metodi	142
5.1.5.1 Raccolta dei campioni	142
5.1.5.2 Preparazione, estrazione ed analisi dei campioni	142
5.1.5.3 Analisi statistiche e rappresentazione grafica dei dati	144
5.1.6 Conclusioni	145
5.2 <i>Ulva lactuca</i> : una specie adatta per processi di biorisanamento fotodegradativo	146
5.2.1 Introduzione	146
5.2.2 Risultati e discussione	147
5.2.2.1 Analisi chimiche dell'uptake di PAEs in <i>U. lactuca</i>	147
5.2.2.2 Fotodegradazione di PAEs in <i>U. lactuca</i>	160
5.2.3 Materiali e metodi	162
5.2.3.1 Strumenti, attrezzature e software	162
5.2.3.2 Campagna di campionamento e operazioni pre-sperimentali	165
5.2.3.3 Disegno e condizioni sperimentali	167
5.2.3.4 Preparazione dei campioni ed estrazione dei PAEs	170
5.2.4 Conclusioni	171
6. Studi sul microbiota acquatico: organismi marini e rifiuti plastici come potenziali vettori di antibiotico-resistenza	172
6.1 <i>Caretta caretta</i> come potenziale vettore di microbiota antibiotico-resistenti	172
6.1.1 Introduzione	172
6.1.2 Risultati	173
6.1.2.1 Identificazione batterica	173
6.1.2.2 Resistenza antibiotica	174
6.1.2.3 Rilevazione dei geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti	177
6.1.3 Discussione	177

6.1.4	Materiali e metodi	182
6.1.4.1	Raccolta dei campioni	182
6.1.4.2	Isolamento batterico	184
6.1.4.3	Test di suscettibilità agli antibiotici e ricerca di geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti	185
6.2	Antibiotico-resistenza nel microbiota associato ai rifiuti plastici dispersi in ambiente acquatico	188
6.2.1	Introduzione	188
6.2.2	Risultati	189
6.2.2.1	Analisi di sequenziamento microbico	189
6.2.2.2	Composizione tassonomica	192
6.2.2.3	Analisi della resistenza	194
6.2.3	Discussione	196
6.2.4	Materiali e metodi	199
6.2.4.1	Area di studio e raccolta dei campioni	199
6.2.4.2	Estrazione del DNA, amplificazione PCR e sequenziamento	200
6.2.4.3	Individuazione di geni di resistenza agli antibiotici (ARGs)	201
6.2.5	Conclusioni	202
6.3	Valutazione dell'antibiotico-resistenza in ambiente marino	203
6.3.1	Introduzione	203
6.3.2	Risultati	204
6.3.2.1	Profilo di resistenza agli antibiotici e geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti	205
6.3.3	Discussione	206
6.3.4	Materiali e Metodi	209
6.3.4.1	Campagna di campionamento	209
6.3.4.2	Isolamento batterico, test di suscettibilità agli antibiotici e rilevazione dei geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti	210
6.3.4.3	Antibiotici e metodologie applicate per la loro determinazione	211
6.3.5	Conclusioni	214

7. Contaminazione da metalli pesanti in uova e tessuti di <i>C. caretta</i>	215
7.1 Introduzione	215
7.2 Risultati e discussione: analisi metalli pesanti essenziali e non essenziali	217
7.3 Materiali e metodi	230
7.3.1 Area studio, campionamento e pretrattamento	230
7.3.2 Analisi dei metalli pesanti su campioni di <i>C. caretta</i>	233
7.4 Conclusioni	237
8. Conclusioni	238
9. Appendice	241
10. Ringraziamenti	247
11. Bibliografia	248

Premessa

Le attività antropiche causano l'inquinamento ambientale che si ripercuote negli ecosistemi e negli organismi che ne fanno parte. L'ambiente acquatico e specialmente quello marino risentono particolarmente di tale contaminazione, poiché rappresentano in molti casi la destinazione finale di tutti i rifiuti. Tale ambiente costituisce un patrimonio prezioso che deve essere protetto, salvaguardato e, ove possibile, ripristinato al fine ultimo di mantenere la biodiversità e preservare la vitalità di mari e oceani che siano puliti, sani e produttivi. Purtroppo, oggi vi è una crescente preoccupazione dovuta alla diffusione ubiquitaria di sostanze chimiche potenzialmente pericolose che possono essere bioconcentrate e/o biomagnificate.

La contaminazione della rete trofica si riflette negativamente sulla salute delle sue componenti, uomo compreso. Gli effetti che si manifestano dipendono dalla biodistribuzione della sostanza bioattiva e dal complesso sistema integrato delle funzioni coinvolte. In questo contesto è necessario valutare l'entità dell'inquinamento attraverso studi di biomonitoraggio e adottare misure di mitigazione e compensazione intese a minimizzare la crescente dispersione di inquinanti emergenti ubiquitari. Tra le possibili soluzioni sostenibili vi è il biorisanamento attraverso l'utilizzo non invasivo di organismi bioaccumulatori (animali o vegetali) che rimuovono gli inquinanti dall'ambiente concentrandoli nelle loro matrici organiche. Queste ultime, come la biomassa algale, possono essere ripulite a loro volta dai composti accumulati attraverso metodi green rendendo possibile la creazione di un ciclo virtuoso di riutilizzo, dove la chiave per risolvere la problematica è data dalla ricerca scientifica, dallo sviluppo delle tecnologie e dalla natura stessa.

Tali tematiche sono state affrontate secondo metodo scientifico durante tutto il percorso di dottorato e raccolte in questa tesi.

1. Introduzione

1.1 La plastica: fonte e vettore di inquinanti

Il successo della plastica come materiale 'indispensabile' ha plasmato lo sviluppo della società moderna sostituendo i materiali tradizionali in ogni possibile campo tanto da poter definire il periodo storico che viviamo '*Età della plastica*' [Napper & Thompson, 2020; Shaikh & Shaikh, 2021].

La prima plastica sintetica, la bachelite (termoindurente fenolo formaldeide), è stata prodotta poco più di un secolo fa (inizio del XX secolo) ed era comunemente usata negli articoli per la casa, dai materiali da costruzione alle radio [Andrady & Neal, 2009].

Tuttavia, l'avvento più significativo delle materie plastiche coincide con gli anni '50, con una produzione annua di circa 1.5 milioni di tonnellate che esponenzialmente è aumentata arrivando ai 30 milioni di tonnellate annue nel 1988 e 360 milioni di tonnellate annue nel 2018 [Shaikh & Shaikh, 2021].

L'aumento crescente dell'offerta è stato determinato da due fattori interconnessi: 1) i vantaggi dell'utilizzo della plastica rispetto ad altri materiali, 2) la crescita demografica che ne ha amplificato la domanda.

Gli evidenti vantaggi delle materie plastiche derivano dalla loro proprietà, infatti, rispetto ai materiali sostituiti risultano essere più leggere, robuste, economiche, durevoli, resistenti alla corrosione, ecc.. Pur tuttavia, la caratteristica che più di tutte ha reso la plastica un materiale così impiegato è la sua versatilità; infatti, è possibile produrre una svariata gamma di prodotti, da articoli flessibili a rigidi, adesivi, schiume e fibre [Napper & Thompson, 2020].

La plastica è costituita da polimeri organici sintetici o semisintetici formati da unità strutturali chimiche ripetute (idrocarburi ottenuti da combustibili fossili come petrolio o gas); alcuni esempi di polimeri sono il polietilene (PE), il cloruro di polivinile (PVC), il polistirene (PS) e il polipropilene (PP). Inoltre, alle materie plastiche è possibile aggiungere un'ampia varietà di additivi (come riempitivi, plastificanti, ritardanti di fiamma, stabilizzanti termici, agenti antimicrobici e coloranti) per migliorarne le prestazioni e l'aspetto [Napper & Thompson, 2020]. A dispetto dei numerosi benefici di cui ha giovato l'umanità in tutti i settori, particolarmente evidenti nel campo della sanità, dell'agricoltura, dei trasporti, dell'edilizia e degli imballaggi, oggi il consumo intensivo ed estensivo della plastica (soprattutto monouso o considerata tale) e la conseguente produzione di rifiuti l'ha portata ad essere il maggior detrito antropogenico inquinante presente negli oceani. Tale risultato sta portando ad una crescente consapevolezza di accumulo di rifiuti di plastica sulla terraferma e negli habitat di acqua dolce. Questa, tuttavia, è solo la punta dell'iceberg, infatti la maggiore riserva di rifiuti plastici è costituita dal mare e

dagli oceani, che rappresentano la loro principale destinazione finale [Avio et al., 2017].

Infatti, i rifiuti marini sono costituiti per il 60-80% da plastica e si prevede che entro il 2050 il peso della plastica negli oceani supererà quello dei pesci [Shaikh & Shaikh, 2021].

Sebbene siano già state intraprese diverse misure intese a mitigare tale impatto antropogenico sia a livello locale che nazionale o internazionale [Napper & Thompson, 2020], i rifiuti di plastica continuano a disperdersi ed accumularsi nel fondo del mare o in superficie. Basti pensare alle immense estensioni delle emblematiche isole di plastica la cui abbondanza è sottostimata a causa di una mancata correlazione tra la quantità totale stimata di rifiuti presenti e la superficie misurata di queste isole. Ciò probabilmente è dovuto ai fenomeni di degradazione dei frammenti di plastica di differente densità che vengono condotti a differenti destini di diffusione ambientale [Vega-Moreno et al., 2021].

In questo modo la plastica si disperde (dalla superficie del mare alle maggiori profondità oceaniche, dalle calde spiagge ai ghiacciai) favorita dalle correnti atmosferiche e oceaniche [Evangelidou et al., 2020; Wang et al., 2021a]. Infatti, l'ubiquità delle materie plastiche fa sì che esse siano presenti dalle zone limitrofe alla fonte di inquinamento (oceaniche o terrestri) a quelle più remote, viaggiando grazie alla loro capacità di galleggiare e resistere alla degradazione.

Le fonti oceaniche includono tra le altre: la pesca e la nautica (inclusa la graduale rottura delle corde e delle vernici a base di polimeri); mentre le fonti terrestri includono l'industria primaria, i rifiuti, le acque reflue e le acque piovane [Napper & Thompson, 2020].

A queste fonti se ne aggiungono altre che in genere non sono considerate tali; ad esempio, si stima che oltre 700000 fibre di microplastica vengano rilasciate da un tipico lavaggio in lavatrice di 6 kg di indumenti sintetici [Napper & Thompson, 2016].

La plastica impiega da centinaia a migliaia di anni per degradarsi [Barnes et al., 2009; Gallo et al., 2018; Shaikh & Shaikh, 2021]. A differenza dei materiali naturali, la maggior parte delle plastiche convenzionali non è biodegradabile. Questi polimeri, infatti, subiscono processi di degradazione di varia natura (fisici, chimici e biologici) che portano ad una molto lenta formazione di frammenti di dimensioni inferiori [Wayman et al., 2021].

Tra i processi degradativi e di frammentazione si annoverano: la biodegradazione operata da organismi viventi (spesso microrganismi), la fotodegradazione (causata dalla radiazione solare che provoca l'ossidazione della matrice polimerica, con conseguente rottura dei legami chimici), la degradazione termossidativa (frequente in mare aperto a temperature moderate), la degradazione termica (relativa alle alte temperature), l'idrolisi (tipica reazione con l'acqua) e l'azione meccanica atmosferico-oceanica (abrasione, azione delle onde, turbolenze, etc.)

[Barnes et al., 2009; Danso et al., 2019; Beltrán-Sanahuja et al., 2020]. Ambienti ottimali che convogliano l'azione di questi processi di frammentazione plastica sono le spiagge (grazie della presenza di agenti atmosferici chimici che meccanici).

Al contrario, i tassi di degradazione nell'acqua di mare possono essere ridotti a causa della riduzione dei livelli di luce, delle temperature e alle condizioni di salinità della matrice ambientale [Ali et al., 2021].

In questi ambienti, la colonizzazione di microrganismi, piante, alghe ed altri organismi marini sul materiale plastico galleggiante (fouling) non sempre ne favorisce il deterioramento che anzi può inibirlo. La ragione di tale inibizione risiede nel fatto che ad esempio il biofilm può "schermare" la plastica dalla luce UV, o che le incrostazioni possono farla affondare limitando così la sua fotodegradazione [Napper & Thompson, 2020].

Di conseguenza la velocità di degradazione dipende dalla natura chimica del polimero e dall'ambiente cui si trova il rifiuto plastico.

Tali rifiuti possono essere visibili (macrolitter: macrorifiuti), difficilmente visibili o addirittura invisibili (microlitter: microrifiuti, di dimensioni inferiori a 5 mm).

Su base morfologica la categorizzazione è soventemente determinata dalla forma e dalla fonte che li origina. Si distinguono: pellet e microbeads (perline utilizzate in prodotti di igiene quotidiana), frammenti derivanti dalla disgregazione di rifiuti di maggiori dimensioni, fibre (filamenti sottili ed allungati maggiormente presenti nell'ambiente) schiume, pellicole (utilizzate nel packaging) e scaglie [Cole et al., 2011; Nelms et al., 2018; Zhang et al., 2022a]. Altri descrittori utilizzati sono il colore e il tipo di polimero, tuttavia quello di segnalazione più comune, poiché comprende tutti i tipi di plastica, è la dimensione.

Nonostante esista una terminologia ambigua, convenzionalmente, i rifiuti plastici si dividono nelle seguenti classi dimensionali: macroplastiche (diametro > 20 mm), mesoplastiche (5-20 mm), microplastiche (< 5 mm) e le sempre più segnalate nanoplastiche (< 1000 nm) [Napper & Thompson, 2020]. Queste ultime, favorite dalle loro più che ridotte dimensioni, meritano crescente attenzione per la loro capacità di attraversare le barriere biologiche come quella emato-encefalica o di entrare nel sistema circolatorio (se < di 20 μ m) [Prüst et al., 2020], causando in generale danni di varia natura e intensità [Smith et al., 2018].

L'inquinamento da materiale plastico (specialmente di minori dimensioni) è una minaccia planetaria, e, come accennato, ha molteplici incidenze negative sull'ambiente marino in particolare sulla biodiversità, la salute e l'integrità degli ecosistemi [Avio et al., 2017; Gallo et al., 2018].

Possiamo distinguere tre principali tipi di impatto: fisico, chimico e biologico.

Riguardo l'impatto di tipo fisico si annoverano:

- (1) l'impigliamento (spesso in attrezzi da pesca e corde, scartati o persi);
- (2) l'ingestione diretta, quando i frammenti plastici vengono scambiati per prede (es. sacchetti di plastica scambiati per meduse dalle tartarughe [Caracappa et al., 2017] o per calamari dai capodogli e altri predatori [Mascarenhas et al., 2004; Stamper et al., 2006; Mrosovsky et al., 2009; Schuyler et al., 2016]);
- (3) l'ingestione indiretta di organismi che a loro volta avevano ingerito plastica [Savoca et al., 2018].
- (4) l'ingestione accidentale, quando i frammenti entrano all'interno dell'organismo tramite respirazione e/o foraggiamento (ad esempio negli organismi filtratori o durante l'alimentazione delle balene 'bubble-net feeding') [Fossi et al., 2014].

Queste 4 tipologie di impatto fisico, tra gli altri, provocano effetti sulla capacità di muoversi, nutrirsi e respirare (soffocamento) e, come documentato in più di 700 specie di organismi marini, causano gravi danni fisici che li conducono spesso alla morte [Kühn & van Franeker, 2020]. Ad esempio, nelle tartarughe marine le cause di decesso più comuni sono ricondotte ad occlusioni o intussuscezioni (invaginazione di un tratto dell'intestino su sé stesso) da corpi estranei di natura plastica (spesso filo di nylon da pesca: lenza). Altri effetti più 'sottili' possono riguardare alterazioni nel comportamento e/o nelle interazioni ecologiche (ad esempio, la capacità di sfuggire ai predatori o migrare).

Un altro tipo di impatto fisico/biologico (5) riguarda l'invasione delle specie aliene, che spesso trovano nei rifiuti marini galleggianti un nascondiglio o mezzo di trasporto tramite il quale raggiungere nuovi ambienti, posti al di fuori dei loro confini naturali. A tal proposito, in aggiunta a pezzi di legno, gusci di frutta o altro materiale organico galleggiante, l'aumento di micro e macro-plastiche sulle superfici marine, secondo gli ultimi studi, sta raddoppiando le opportunità di questo tipo di migrazione, ad esempio, per quanto riguarda le specie aliene note del Mediterraneo, si pensa che più dell'80% potrebbero essere arrivate attraverso rifiuti marini [Rech et al., 2016; García-Gómez et al., 2021]. La comparsa in un dato ambiente di organismi alieni e la loro interazione con le componenti biotiche ed abiotiche provoca delle perturbazioni che modificano l'equilibrio di quell'ecosistema (come osservato per l'estinzione delle specie endemiche).

Riguardo l'impatto chimico delle plastiche, che inizialmente venivano considerate materiali biochimicamente inerti (in quanto il polimero se è puro non reagisce con le membrane cellulari degli organismi) [Avio et al., 2017], grazie allo sviluppo di tecnologie di rilevamento sempre più affidabili, si è scoperto che queste possono assorbire e/o rilasciare sostanze chimiche

tossiche per gli organismi [Teuten et al., 2009].

La plastica viene considerata come una spugna-vettore di inquinanti, in quanto può assorbire contaminanti dall'acqua circostante per poi renderli biodisponibili per le matrici biologiche coinvolte [Napper & Thompson, 2020]. In particolare, è capace di concentrare contaminanti incrementando i loro livelli di concentrazione un ordine di grandezza $> 10^7$ rispetto al mezzo acquoso in cui si trova [Koelmans et al., 2016] e fino a cento volte rispetto ai sedimenti [Fu et al., 2021]. Infatti, a causa del suo elevato rapporto volume/superficie e della natura idrofoba, può accumulare inquinanti organici persistenti (POPs) idrofobici come idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCBs) e dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), ma anche altri inquinanti persistenti come i composti poli- e perfluorurati (PFCs) [Wang et al., 2015a], farmaci [Wu et al., 2016], polibromodifenileteri (PBDE) [Wardrop et al., 2016], ed innumerevoli altri. Mentre l'assorbimento fisico dipende principalmente dalla grandezza della superficie specifica e dalla forza di Van der Waals, l'adsorbimento chimico dipende principalmente dalle maggiori affinità degli inquinanti organici per la superficie idrofoba della plastica rispetto all'acqua di mare [Fu et al., 2021]. I polimeri organici contengono generalmente regioni cristalline e regioni amorfe (Figura 1) ed è proprio in queste ultime che si verifica l'assorbimento di inquinanti organici [Menéndez-Pedriza & Jaumot, 2020; Fu et al., 2021].

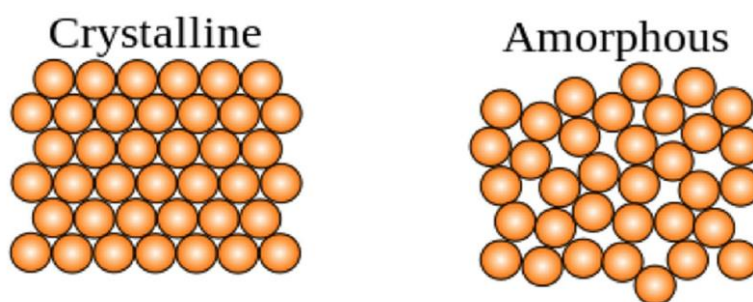


Figura 1. Regioni amorfe e cristalline di un polimero plastico

Inoltre, sebbene la plastica non sia facilmente biodegradabile, subisce vari processi di degradazione (fisica, chimica e biologica) che portano ad una formazione molto lenta di frammenti più piccoli [Wayman & Niemann, 2021] e quindi al rilascio di additivi plastici come ftalati, nonilfenoli, bisfenolo-A e ritardanti di fiamma [Hermabessiere et al., 2017].

Tale rilascio può generare fenomeni di adsorbimento, bioaccumulo, biomagnificazione e causare effetti negativi per la salute, tra i quali: deplezione del glicogeno epatico, vacuolizzazione dei grassi [Rochman et al., 2013], alterazioni complesse nei processi fisiologici come la sintesi proteica, l'accumulo di energia, la biotrasformazione [Ali et al., 2021],

malfunzionamento del sistema endocrino e cancerogenesi [Darbre, 2020].

In questo contesto possiamo dire che le microplastiche possono essere considerate microfoni di macroinquinanti chimici e non solo. Infatti, in merito all'impatto biologico, da qualche decennio si sta ponendo sempre più attenzione alla capacità della plastica di fungere da vettore di batteri resistenti agli antibiotici (ARBs).

È stato dimostrato infatti che i detriti plastici possono funzionare da substrato adatto per lo sviluppo di biofilm batterici. Questi frammenti, infatti, possono arricchirsi di agenti patogeni o ARBs [Yang et al., 2019]. Pertanto, il materiale plastico può essere considerato come una nuova nicchia microbiologica la cui composizione microbica viene indicata come "plastisfera" [Sucato et al., 2021].

La plastica può essere considerata quindi un hotspot di contatto batterico che facilita il trasferimento di geni di resistenza agli antibiotici (ARGs) e potrebbe rappresentare un vettore per la diffusione di ARB con risvolti negativi sia per l'ambiente marino che per l'uomo [Drudge et al., 2012; Imran et al., 2019; Laganà et al., 2019].

In questo contesto, considerando che l'antibiotico resistenza è considerata una delle più grandi minacce per la salute umana e degli animali (selvatici e di allevamento) è possibile che le comunità batteriche associate alla plastica presentino una diversità maggiore rispetto ai loro omologhi in acqua, aumentando il rischio di diffusione di un maggior numero di ceppi resistenti agli antibiotici negli ambienti acquatici [Sucato et al., 2021].

A tal proposito, proprio per la loro pericolosità, sia gli ARGs sia le microplastiche, sono stati recentemente classificati nel quadro operativo One Health come microinquinanti prioritari emergenti [Liu et al., 2021].

1.2 Gli inquinanti emergenti

I contaminanti emergenti sono composti chimici, scoperti solo recentemente, per i quali studi e valutazioni scientifiche hanno confermato la pericolosità per l'ambiente e per la salute umana. Si tratta di sostanze chimiche che non sono comunemente monitorate e che possono causare effetti negativi sia sulla salute umana che sugli ecosistemi (portando inoltre all'estinzione organismi autoctoni) [Geissen et al., 2015].

Nell'ambiente acquatico è presente un numero significativo di inquinanti emergenti (EP) derivanti da inquinamento puntiforme e diffuso. Basti pensare che, a livello mondiale, ogni giorno vengono scaricate due milioni di tonnellate di acque reflue, rifiuti industriali e agricoli (ossia l'equivalente del peso dell'intera popolazione umana) [UN WWAP, 2003].

Attualmente, i metodi per il campionamento e l'analisi non sono armonizzati, poiché si

focalizza l'attenzione soltanto su alcune classi di EP. Inoltre, per alcuni, i limiti di rilevanza sono troppo elevati, se si considera la loro pericolosità, per altri, lo sviluppo dei metodi analitici è agli inizi [Geissen et al., 2015].

Quindi, nei modelli che valutano il destino degli EP, mancano, e devono essere sviluppate, strategie specifiche ed integrate di analisi per un approccio ambientale che prenda in considerazione tutti i parametri e comparti ambientali (acqua, materiale sospeso, sedimenti e biota). Inoltre, tali analisi dovrebbero prendere anche in considerazione i metaboliti degli inquinanti emergenti che sfuggono spesso all'attenzione della ricerca.

In questo senso, risulta necessario arricchire le conoscenze relative all'impatto di queste sostanze attraverso lo sviluppo di nuovi metodi di ricerca analitica quali-quantitativa ed effettuare nuovi esperimenti volti a coprenderne gli effetti derivanti dalla loro singola o cumulativa esposizione.

Inoltre, si ritiene necessario sviluppare, oltre che nuove e sicure alternative, tecnologie innovative di rimozione degli EP. Gli EP, infatti, mettono in discussione sia i regolamenti politici tradizionali (ad es. nelle misure di gestione rispetto all'uso/emissioni di EP nell'ambiente, sistemi di monitoraggio, ecc.) che le infrastrutture di trattamento delle acque reflue esistenti, che non sono progettate per rimuoverli nonostante lo sviluppo di BAT (Best Available Techniques) per la prevenzione e il controllo dell'inquinamento industriale [Rizzo et al., 2020].

Pertanto, gli EP costituiscono una minaccia (percepita o veritiera) ed includono una vasta gamma di sostanze chimiche sintetiche importanti per lo sviluppo della società moderna e di uso globale, come i composti perfluorurati, le microplastiche, i sottoprodotti di disinfezione dell'acqua, additivi plastici industriali, pesticidi di nuova registrazione, prodotti farmaceutici, ecc. [Sauvé & Desrosiers 2014]. Di queste sostanze, secondo la rete NORMAN, nell'ambiente acquatico europeo ne sono state identificate almeno 700 classificate in 20 classi [Geissen et al., 2015].

Esistono diversi tipi di EP con proprietà fisico/chimiche molto diverse:

(i) sostanze organiche bioaccumulabili persistenti e tossiche (PBT) come gli inquinanti organici persistenti (POPs); (ii) sostanze organiche più polari e/o meno persistenti (es. pesticidi, prodotti farmaceutici, prodotti chimici industriali), (iii) composti inorganici e (iv) contaminanti particellari come nanoparticelle e microplastiche [Geissen et al., 2015].

In questa tesi verranno esplorati alcuni dei più importanti inquinanti emergenti di interesse crescente, alla cui esposizione, sia diretta che indiretta, infatti, sono correlati potenziali rischi per gli organismi viventi.

1.2.1 Gli inquinanti organici persistenti (POPs)

Gli inquinanti organici persistenti sono composti organici generalmente resistenti al degrado ambientale che opera attraverso processi chimici, biologici e fotolitici [Guo et al., 2019a]. La loro persistenza fa sì che impieghino molti anni prima di degradarsi in forme meno pericolose [Sun et al., 2020].

I POPs sono stati ampiamente utilizzati nelle pratiche agricole e industriali e vengono rilasciati, spesso inconsapevolmente, da molte attività antropiche in tutto il mondo [Guo et al., 2019a].

Questi inquinanti generalmente sono soggetti a processi ripetuti di evaporazione e deposizione e fenomeni di trasporto per grandi distanze attraverso correnti oceaniche o atmosferiche. Di conseguenza possono essere trovati in tutto il mondo, anche in regioni dove non sono mai stati utilizzati o prodotti e risulta molto difficile risalire alla fonte di origine [Nøst et al., 2018; Wong et al., 2021].

I POPs sono soggetti a fenomeni di biomagnificazione [Wong et al., 2021] e a causa della loro persistenza si bioaccumulano con potenziali impatti negativi sulla catena alimentare, sulla salute umana e sull'ambiente [Savoca & Pace, 2021].

La loro elevata lipofilia fa sì che questi si bioaccumolino soprattutto nei tessuti grassi, e sono noti per interrompere il normale funzionamento del sistema endocrino e riproduttivo [Guo et al., 2019a].

Gli effetti specifici dei POPs sulla salute includono: cancro, allergie e ipersensibilità, danni al sistema nervoso centrale e periferico, disturbi riproduttivi e disturbi del sistema immunitario. A causa della minaccia che rappresentano per la salute umana e l'ambiente, i POPs sono regolamentati dalla Convenzione di Stoccolma entrata in vigore nel 2004 [Fiedler & Sadia 2021].

Dal 1995, il Programma delle Nazioni Unite per l'ambiente (UNEP) ha ampliato le indagini sui POPs con un focus iniziale su quella che divenne nota come la "sporca dozzina". Si trattava di un gruppo di 12 POPs, sostanze chimiche altamente persistenti e tossiche: aldrin, clordano, DDT, dieldrin, endrin, eptacloro, esaclorobenzene, mirex, policlorobifenili, policlorodibenzo-p-diossine, policlorodibenzofurani e toxafene. Molti dei pesticidi di questo gruppo non sono più utilizzati per scopi agricoli, ma alcuni continuano ad essere utilizzati nei paesi in via di sviluppo [Maveekumbure et al., 2021]. A questi sono state successivamente aggiunte e regolamentate altre sostanze organiche persistenti in tre allegati: A (eliminazione), B (limitazione) e C (produzione non intenzionale). Tra i nuovi POPs inseriti sono presenti le sostanze poli-perfluoroalchiliche (PFAS): acido perfluoroottanossolfonico (PFOS) e acido perfluoroottanico (PFOA) [Prabhu & Lakshmi Praba, 2022 (Parte I e II)].

1.2.1.1 I composti poli- e perfluorurati (PFCs)

A partire dalla seconda metà del secolo scorso, le peculiari proprietà fisico-chimiche delle molecole organiche fluorurate hanno dato origine alla loro ampia diffusione [Suja et al., 2009]. Le sostanze poli- e perfluoroalchiliche (PFAS) sono molecole organiche contenenti diversi atomi di fluoro lungo lo scheletro carbonioso, da composti molto piccoli come l'acido trifluoroacetico (TFA): CF_3COOH a molto grandi come i polimeri fluorurati come il politetrafluoroetilene (PTFE) o “Teflon” e il polivinilidene fluoruro (PVDF). Secondo la nuova definizione dell'OECD i PFAS sono definiti come sostanze fluorurate che contengono almeno un gruppo metilico perfluorato ($-\text{CF}_3$) o gruppo metilenico perfluorato ($-\text{CF}_2$) (al quale non deve essere legato alcun atomo di idrogeno o alogeno tra cloro, bromo e iodio) [Wang et al., 2021b]. I precursori di primo grado ad es. n-etil perfluorooottano sulfonamminetanolo (EtFOSE) nell'ambiente degradano a precursori di secondo grado che hanno una stabilità intermedia fino a dare origine agli acidi perfluorurati caratterizzati dall'essere molto persistenti e per questo denominati “forever chemical” [Miner et al., 2021; Zhang et al., 2022b]. Mentre i precursori di primo e secondo grado sono molecole neutre, i prodotti finali sono più acidi e quindi composti ionici e solubili difficilmente removibili (persistenti e mobili) [Ateia et al., 2019].

Anche se la produzione degli acidi è stata limitata non se ne osserva un'effettiva diminuzione nell'ambiente perché, tra le altre fonti, questi derivano dalla degradazione dei precursori di primo grado [Chang et al., 2014].

Questa degradazione può inoltre portare a piccoli composti chiamati ‘ultra-short chain PFAS’ C2-C3, classe emergente di PFAS. Questi ultimi sono acidi con solubilità elevatissima nel comparto acqua e si riscontrano sia nelle piogge ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) che negli organismi ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) [Ateia et al., 2019]. L'origine degli ultra-short chain PFAS non è chiara, tuttavia, ad esempio, una possibile fonte può derivare da farmaci con gruppo CF_3 (che serve a diminuire la degradazione del farmaco nell'organismo e aumentarne l'efficacia farmacologica). Quando questi farmaci raggiungono i depuratori urbani liberano il TFA il quale probabilmente diverrà un nuovo contaminante emergente [Wallington et al., 2021].

I PFAS, grazie alla loro stabilità termica, chimica e alla loro natura anfifilica, sono stati utilizzati per svariate applicazioni commerciali ed in diversi prodotti come: refrigeranti, agenti espandenti di schiuma, soppressori di incendi, nonché in tessuti fluoropolimerici, vernici e altri materiali con caratteristiche di resistenza all'olio e all'acqua [Suja et al., 2009; Lesch et al., 2017; Sunderland et al., 2019]. Insieme alla loro diffusione industriale, questa famiglia di prodotti chimici, che comprende più di 5000 composti alifatici altamente fluorurati, ha trovato diverse applicazioni anche nei prodotti di consumo, dalle pentole e tappeti agli imballaggi alimentari,

all'elettronica [Buck et al., 2011; Lesch et al., 2017].

L'acronimo PFCs viene solitamente riferito a composti poli- e perfluorurati (o composti organofluorurati) in cui gli atomi di fluoro sono localizzati in diverse parti della molecola considerata (comprese le porzioni alchiliche), mentre il termine PFAS viene utilizzato per indicare una sottoclasse di PFCs costituita soltanto da sostanze poli- e perfluoroalchiliche.

Sfortunatamente negli ultimi decenni, il loro sottovalutato impatto ambientale ha causato un aumento del livello di contaminazione ambientale da PFCs, e in particolare da PFAS. Infatti, a causa della stabilità chimica del legame C-F, i PFAS sono resistenti alla degradazione (idrolisi, fotolisi e degradazione microbica) e rappresentano una delle principali classi di inquinanti organici persistenti (POPs) diffusi nell'ambiente [Buck et al., 2011; Zhang et al., 2019]. Tuttavia, il loro comportamento ambientale, bioaccumulo e attività tossicologica, di solito seguono percorsi diversi rispetto ad altri POPs ampiamente studiati (ad es. composti organoclorurati e organobromurati) [Conder et al., 2019]. La classe dei PFAS comprende gli acidi perfluoroalchilici (PFAA), gli acidi carbossilici perfluoroalcanoici (PFCA) e gli acidi perfluoroalcansulfonici (PFSA) [Sznajder-Katarzynska et al., 2019]. Nel nuovo millennio, le autorità, i laboratori di ricerca e le industrie si stanno impegnando nell'obiettivo comune di contrastare l'impatto ambientale attraverso il monitoraggio e la regolamentazione di questi inquinanti [Kwiatkowski et al., 2020].

Queste attività includono la valutazione dello stato qualitativo dell'ambiente, misurato da bioindicatori ecologici in particolare negli ambienti acquatici. Per minimizzare l'impatto dei PFAS negli ecosistemi acquatici e lungo le reti trofiche, è fondamentale verificarne la presenza nelle varie matrici ambientali [Kannan et al., 2002; Taniyasu et al., 2003; Houde et al., 2006, 2011; Suja et al., 2009] e studiarne gli effetti sugli organismi [Latała et al., 2009; Jeon et al., 2010; Mhadhbi et al., 2012; Gunduz et al., 2013; Lilienthal et al., 2017; Liew et al., 2018; Sznajder-Katarzynska et al., 2019].

Per la determinazione dei PFAS negli organismi acquatici, sono stati condotti diversi studi e recentemente sono stati sviluppati metodi di estrazione e analisi sensibili, rapidi e robusti [Villaverde-de-Sáa et al., 2012; Valsecchi et al., 2013, 2021; Rodriguez et al., 2020]. Inoltre, la letteratura sull'impatto ambientale dei PFAS è continuamente alimentata da nuove ricerche sulla loro bioconcentrazione [Burkhard, 2020], sui loro effetti sulla salute [Brase et al., 2021], esposizione umana e regolamentazioni relative ai limiti di legge [Sznajder-Katarzynska et al., 2019]. Come altri inquinanti organici persistenti, anche i PFAS a causa del trasporto atmosferico e oceanico, sono stati trovati in aree lontane dalla fonte di contaminazione [Prevedouros et al., 2006; Vierke et al., 2012]. In questo contesto, al giorno d'oggi, le acque e i

sedimenti sono considerati depositi di questi inquinanti persistenti [Yamashita et al., 2005; Dassuncao et al., 2017; Casal et al., 2017; Sunderland et al., 2019].

Il ciclo di trasporto del PFAS dipende dalla struttura e dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza stessa, nonché da diverse condizioni ambientali, tra cui il contenuto di carbonio organico, la temperatura, la salinità, ecc. [Martin et al., 2003; Ahrens & Bundschuh, 2014]. Nonostante i PFAS e i loro precursori possano essere soggetti a una varietà di trasformazioni ambientali e biologiche in diversi compartimenti [Martin et al., 2006; Butt et al., 2014], possiedono un notevole potenziale di bioaccumulo che varia sia in base alla natura dei diversi composti, che in base all'organismo coinvolto (con differenze intraspecifiche e interspecifiche), al sesso, allo stadio di sviluppo e ai meccanismi di trasporto attivo [EFSA, 2008, 2018]. Nella maggior parte degli studi che riportano matrici contaminate da PFAS, oltre all'acido perfluorooottansolfonico (PFOS), l'acido perfluoroottanoico (PFOA) è tra i composti più frequentemente rilevati a livelli di concentrazione significativamente superiori di altri inquinanti fluorurati [Kar et al., 2017; Dai & Zheng, 2019; Guo et al., 2019b]. Probabilmente questa situazione continuerà ad essere registrata nonostante il PFOS nel 2008 e il PFOA (suoi sali e relativi composti) nel 2019 siano stati aggiunti nell'allegato A della Convenzione di Stoccolma [Schulz et al., 2020].

Come già accennato, il destino dei PFAS, dopo il loro rilascio nell'ambiente, dipende dai loro processi di trasporto, ripartizione e trasformazione. In questo contesto risulta fondamentale valutare tali processi e il conseguente rischio di esposizione degli organismi (dalla base fino all'apice della catena alimentare), soprattutto considerando che l'assunzione avviene spesso per ingestione. Infatti, oltre all'esposizione legata alla contaminazione dell'ambiente fisico (aria, acqua, suolo), l'ingestione diretta di un alimento contaminato aumenta notevolmente l'assimilazione dell'inquinante [Haug et al., 2010; Wu et al., 2012; Squadrone et al., 2014; Vandermeersch et al., 2015; Alves et al., 2016; Habibullah-Al-Mamun et al., 2017; Rasmussen et al., 2017; Hu et al., 2018; Fattore et al., 2018]. Per l'uomo ad esempio oltre alle possibili vie di assunzione di PFAS per inalazione di polvere o particolato atmosferico da fonti industriali [Tittlemier et al., 2007; Ericson et al., 2008; Fromme et al., 2009; Kato et al., 2009, 2011; Haug et al., 2010; D'Hollander et al., 2010] la principale fonte di contaminazione è legata all'ingestione di bevande e alimenti contaminati, compresi i frutti di mare selvatici e di allevamento [Suja et al., 2009; Boone et al., 2019; Augustsson et al., 2021; Groffen et al., 2021]. A tal proposito, uno studio molto recente condotto in Tanzania ha riportato livelli di contaminazione da PFAS nel pesce e nei frutti di mare tali da esporre coloro che li consumano ad una quantità tripla di PFOS, rispetto alla dose tollerabile [Groffen et al., 2021]. Similmente

in Italia invece, uno studio simile ha riportato livelli di contaminazione di PFAS nei pesci (cefalo (*Mugil cephalus*), sgombro atlantico (*Scomber scombrus*), platessa (*Pleuronectes platessa*), nasello (*Merluccius merluccius*) e branzino (*Dicentrarchus labrax*)) al di sopra della dose giornaliera tollerabile per la dieta dei bambini [Barbarossa et al., 2016]. In questo contesto, nonostante l'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) abbia identificato più di 4500 sostanze correlate ai PFAS [Costello & Lee, 2019], solo alcune di esse (< 20) vengono regolarmente analizzate e monitorate, sottovalutando così la reale esposizione ad esse. Infatti, nel caso degli organismi acquatici è stato stimato che la percentuale di composti organofluorurati non identificati può variare dal 30 al 90% del totale delle sostanze fluorurate estratte dalle matrici organiche oggetto di analisi [Spaan et al., 2020, 2021]. A ciò si aggiunge che i livelli di contaminazione dei prodotti ittici sono anche dovuti ai loro processi di conservazione e trasformazione ed aumentano con la crescente domanda ben lontana dall'essere soddisfatta [Thompson & Darwish, 2019].

Per tutte le ragioni descritte in questo paragrafo, al fine di garantire la sicurezza alimentare ai consumatori ed in generale per la salute di tutti gli ecosistemi (specialmente quelli acquatici particolarmente coinvolti), considerando l'ingente diffusione dei PFAS nell'ambiente, è necessario valutare gli effetti dell'esposizione a queste sostanze attraverso esperimenti condotti in condizioni controllate e svolgere attività di monitoraggio costanti ed estese in ambiente naturale.

1.2.1.2 Gli esteri ftalici (PAEs)

Gli ftalati sono esteri dell'acido ftalico (PAEs), ottenuti per esterificazione dell'anidride dell'acido ftalico (acido 1,2-benzendicarbossilico) e un alcol (a catena lineare o ramificata). Queste sostanze a temperatura ambientale sono per lo più liquidi poco volatili generalmente incolori e inodori [Staples et al., 1997]. I PAEs possiedono una struttura di base costituita da un acido 1,2-benzendicarbossilico e si differenziano chimicamente per le diverse catene laterali R1 e R2 (che caratterizzano le loro proprietà chimico-fisiche) (Figura 2).

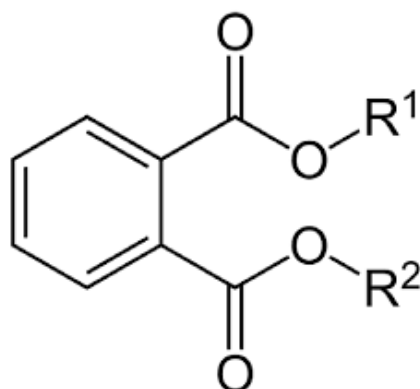


Figura 2. Struttura generale degli ftalati

Gli ftalati sono sostanze chimiche organiche sintetiche utilizzate per varie applicazioni industriali, tipicamente usate come additivi nelle plastiche (agenti plastificanti) ad esempio nel cloruro di polivinile (PVC) [Meeker et al., 2009; Wang et al., 2015b] ma anche come agenti non plastificanti in prodotti di consumo come profumi o pittura murale [Staples et al., 1997; Barreca et al., 2014]. In particolare, queste molecole conferiscono flessibilità, persistenza, resistenza e modellabilità al prodotto finale grazie alla loro capacità di interagire con il polimero con il quale sono mescolate. Le proprietà fisiche e quindi il loro campo di applicazione dipendono dalla lunghezza e dalla ramificazione delle catene laterali dialchiliche o alchil-ariliche (la parte alcolica dell'estere). Alcuni ftalati sono aggiunti a prodotti commerciali d'uso comune per trattenere il colore o la fragranza, aumentare la lucentezza, o, nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, per favorirne il rilascio controllato [Latini, 2005]. Alcuni esempi di prodotti nei quali vengono aggiunti sono: pellicole, teloni, rivestimenti per pavimenti, tubi, cavi, vernici, lacche, smalti per unghie, spray per capelli, lubrificanti senza grasso, agenti antischiuma, solventi ma anche come vettori liquidi in pesticidi, cosmetici e profumi [Hubinger, 2010; Manikkam et al., 2013].

La distribuzione nelle matrici ambientali degli ftalati deriva quindi sia dalle proprietà chimiche delle catene R1 e R2 che dal loro largo utilizzo in numerosi settori [Cheng et al., 2021a].

Tra tutte le possibili fonti di contaminazione, sicuramente, l'impatto delle plastiche nelle diverse matrici ambientali ha contribuito e contribuisce alla loro diffusione ubiquitaria. Questi, favoriti dalle piccolissime dimensioni delle micro- e nanoplastiche possono facilmente passare dai bassi livelli trofici della catena alimentare come il plancton, ai pesci e quindi fino all'uomo. Queste sostanze non sono legate covalentemente al materiale plastico, pertanto, vengono facilmente rilasciate nelle matrici organiche con le quali entrano a contatto [Savoca et al., 2018, 2021a]. La loro presenza è stata documentata anche in regioni lontane dalle aree di produzione a causa del trasporto atmosferico ed oceanico che contribuisce in modo significativo alla loro diffusione [Zeng et al., 2008]. Ciò vale soprattutto per gli ftalati a catena corta che sono, per

questo motivo, più volatili [Zeng et al., 2008]. Infatti, ad eccezione del di-metil ftalato (DMP), che ha il peso molecolare più basso, gli altri componenti di questa classe di composti sono inclusi generalmente tra i composti organici semivolatili (SVOCs) e si ripartiscono tra la fase gassosa e quella particolata [Staples et al., 1997].

I PAEs sono stati rilevati in aria, ambienti marini e continentali [Zeng et al., 2008; Zhang et al., 2015; Wang et al., 2019; Paluselli et al., 2019]. Inoltre, sono stati rilevati in organismi terrestri e marini, come in tartarughe marine [Savoca et al., 2018; 2021a], pesci [Cheng et al., 2013], alghe e cianobatteri [Babu & Wu, 2010], così come negli gli esseri umani [Net et al., 2015; Gao & Kannan., 2020]. Recentemente, è stato dimostrato che microplastiche [Ragusa et al., 2021] e quindi anche i PAEs [Grindler et al., 2018] possono passare attraverso la placenta, provocando l'esposizione del feto a questi inquinanti.

Gli organismi possono, dunque, assorbire queste sostanze in diversi modi:

- ingestione: cibi e bevande contaminati. Nel caso di ingestione di plastiche, i lunghi tempi di permanenza nell'intestino, possono portare a contaminazione chimica da PAEs a causa del loro assorbimento nei tessuti esposti [Oehlmann et al., 2009];
- inalazione: aria degli spazi interni (esalazioni provenienti dal pavimento o dal mobilio foderato con materiale plastico, polvere domestica). Diversi studi hanno dimostrato alte concentrazioni di ftalati nella polvere domestica associate a pavimenti in PVC [Bornehag et al., 2005; Orecchio et al. 2013; Zhang et al., 2020a];
- contatto con la pelle: oggetti d'uso (ad es. guanti in PVC, giocattoli, ecc.) [Dutta et al., 2020].

Negli organismi acquatici, l'esposizione a PAE porta a diversi livelli di tossicità sia cronica che acuta [Staples et al., 1997].

Esperimenti condotti su animali hanno dimostrato che gli ftalati interferiscono con i normali processi fisiologici mediati da ormoni essenziali per riproduzione, crescita e sviluppo (es. testosterone) portando alla cosiddetta "sindrome da ftalati" [Hliseníková et al., 2020].

Tra gli effetti si annoverano una produzione ridotta di spermatozoi, la sterilità, mammelle non del tutto sviluppate, il criptorchidismo, l'ipospadia e altre malformazioni degli organi di riproduzione [Lottrup et al., 2006]. L'esposizione a PAEs inoltre influisce negativamente sul comportamento e sulla salute dell'adulto e della sua prole [Dutta et al., 2020; Montazeri et al., 2021] causando, tra gli altri, epatotossicità, stress ossidativo, alterazioni del neurosviluppo, aberrazioni genetiche e riprogrammazione epigenetica [Grindler et al., 2018; Qian et al., 2018; Rowdhwal & Chen 2018; Dutta et al., 2020; Xu et al., 2020]. Gli effetti sopra descritti sono sintomatici di un disturbo dell'equilibrio ormonale, pertanto, gli ftalati che mostrano questi effetti vengono denominati *perturbatori, interferenti o distruttori* endocrini.

In generale, i distruttori endocrini possono agire in diversi modi:

- mimano l'azione dell'ormone naturalmente prodotto dall'organismo, inducendo una risposta eccessiva o in tempi sbagliati (effetto agonistico);
- bloccano il recettore, ovvero impedendo all'ormone di legarsi, così che non possa agire (effetto antagonistico);
- alterano la regolazione degli ormoni, agendo "a monte" sulla loro produzione;
- alterano il trasporto degli ormoni a livello del sangue.

In base agli effetti e ai livelli di esposizione i PAEs possono essere considerati fattori di rischio per molte patologie multifattoriali (ad esempio patologie riproduttive, alterazioni dello sviluppo ed embriogenesi, incluso il successo schiusa delle uova, sindromi metaboliche e tumori) [Sugawara, 1974; Liu et al., 2009; Sparling, 2016; Dutta et al., 2020].

Gli ftalati maggiormente presenti e studiati sono: DMP (dimetil-ftalato), DEP (dietil-ftalato), DBP (dibutil-ftalato), BBP (benzil-butil-ftalato), DEHP (di-2-etilesilftalato), DnOP (di-n-octilftalato).

DBP e DEHP, a causa del loro ampio utilizzo, sono solitamente gli ftalati più frequenti e abbondanti nell'ambiente. In particolare, il DBP viene utilizzato principalmente per impartire flessibilità alla plastica, come fissativo nei cosmetici, come componente di adesivi in lattice, come solvente per coloranti, ecc. [Talsness et al., 2009; Manikkam et al., 2013]. Invece il DEHP è frequentemente utilizzato come plastificante nel PVC [Api, 2001; Manikkam et al., 2013]. La pericolosità degli ftalati deriva proprio dalla loro capacità di interagire con le membrane cellulari, la quale è giustificata dalla loro affinità verso porzioni organiche. Questa proprietà può essere rappresentata dal coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, $\log K_{ow}$, ossia il rapporto tra la concentrazione di un soluto tra ottanolo e acqua che fornisce una stima della misura dell'idrofobicità di una data molecola (Tabella 1) e riesce a predire la tendenza di ripartizione di una sostanza chimica in acqua, lipidi, sedimenti e materia organica del suolo.

Tabella 1. principali ftalati con catene R1 e R2 e relativo $\log K_{ow}$.

PAEs	R1	R2	$\log K_{ow}$
DMP	CH ₃	CH ₃	1.47-2.12
DEP	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	2.47-2.51
DBP	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	4.57
BBP	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	4.84
DEHP	CH ₂ CH(C ₂ H ₅)(CH ₂) ₃ CH ₃	CH ₂ CH(C ₂ H ₅)(CH ₂) ₃ CH ₃	7.5
DnOP	(CH ₂) ₇ CH ₃	(CH ₂) ₇ CH ₃	> 7.5

La commissione europea e l'agenzia di protezione ambientale hanno riconosciuto questi come inquinanti prioritari per l'elevata presenza e tossicità ambientale [Jergensen et al., 2019].

Anche se non inseriti nella lista di Stoccolma, gli ftalati condividono molte delle caratteristiche delle sostanze chimiche presenti e possono essere considerate inquinanti organici persistenti. Infatti, nel 2016 l'Agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA) ha preparato una proposta di restrizione di quattro ftalati DEHP, BBP, DBP e DIBP. Annunciata nel Dicembre del 2018, la restrizione REACH dell'UE è entrata in vigore il 7 luglio 2020 e stabilisce che "le quattro sostanze saranno limitate a una concentrazione pari o inferiore allo 0,1% in peso singolarmente o in qualsiasi combinazione [Hilber & Gabbert, 2020].

1.2.2 Gli antibiotici nell'ambiente e lo sviluppo dell'antibiotico-resistenza

Il termine antibiotico, utilizzato per la prima volta dal premio Nobel Selman Waksman si riferisce a molecole prodotte da microrganismi antagoniste della crescita di altri [Clardy et al., 2009]. È ormai ben accettato che il termine antibiotico denoti qualsiasi sostanza chimica organica che inibisca o uccida i batteri mediante interazioni specifiche con i bersagli coinvolti.

Gli antibiotici appartengono a una classe di farmaci ampiamente utilizzati per trattare e prevenire malattie umane e animali, nonché per aumentare l'efficienza dei mangimi e migliorare il tasso di crescita nelle industrie di acquacoltura, bestiame e pollame [Andreozzi et al., 2004; Sarmah et al., 2006; Chen et al., 2011; Pan et al., 2011; Gao et al., 2012]. Essi sono in grado di agire efficacemente anche a concentrazioni basse e, nei casi di somministrazioni intra-corporali, ad essere espulsi dal corpo dopo brevi tempi di residenza.

Molti antibiotici dopo l'assunzione si distribuiscono nell'organismo e vengono parzialmente metabolizzati nel corpo prima di essere espulsi tramite urine e feci. Tuttavia, parte dell'antibiotico viene espulso come metabolita inattivo o alcuni dei metaboliti prodotti possono essere riconvertiti nei loro composti di origine [Jjemba, 2006].

In questo modo antibiotici e metaboliti finiscono nelle acque reflue e nei depuratori che non riescono a trattenere o degradare i tali principi attivi giungendo quindi nell'ambiente acquatico per poi degradarsi più o meno velocemente (generalmente da uno a vent'anni) [Grenni et al., 2018].

Dalla loro prima introduzione nelle applicazioni cliniche, gli antibiotici hanno salvato innumerevoli vite e tenuto sotto controllo la maggior parte delle malattie infettive.

Tuttavia, la produzione e l'uso su larga scala (soprattutto l'abuso) di antibiotici nella medicina clinica e veterinaria, nell'agricoltura, nell'acquacoltura e nell'orticoltura ha generato un loro accumulo significativo nell'ambiente [Senta et al., 2013].

Ricerche recenti hanno dimostrato che le concentrazioni di antibiotici nei diversi tipi di acque (reflue, superficiali, potabili, sotterranee) e solidi (fanghi, suolo e sedimenti) sono comprese tra $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [Puckowski et al., 2016; Chaturvedi et al., 2021].

Come accennato, una delle fonti che maggiormente contribuisce all'inquinamento ambientale è relativa alle frazioni di questi composti che vengono escrete dagli animali da allevamento. Queste molecole, che risiedono nel letame, oltre che giungere negli effluenti, possono essere diffuse su terreni agricoli come fertilizzante [Kümmerer, 2009]. Da lì possono entrare nell'ambiente acquatico attraverso deflusso o lisciviazione [Sarmah et al., 2006].

Gli antibiotici vengono classificati come microinquinanti organici emergenti pseudo-persistenti, sia perchè generalmente resistono alla biodegradazione a causa della loro natura antimicrobica, sia perchè la loro dispersione in ambiente è continua. Non sono necessariamente di nuova introduzione ma la loro pericolosità desta attualmente grandi preoccupazioni. Infatti, queste molecole polari o moderatamente polari tendono ad essere tossiche, bioaccumulabili e biomagnificabili [Liu et al., 2017].

In tutto il mondo, i prodotti farmaceutici (insieme ai loro metaboliti e prodotti di trasformazione) si trovano frequentemente nell'ambiente acquatico e sono biodisponibili per tutti gli organismi in esso presenti. Inoltre, vengono sempre più riscontrati residui farmaceutici nell'acqua potabile e nei prodotti alimentari [Wöhler et al., 2020].

Dal momento che, sia l'uso farmaceutico umano che quello veterinario continuano ad aumentare globalmente (a causa della crescita della popolazione, del consumo pro capite e della crescita del bestiame), è probabile che con il passare del tempo i problemi si aggravino [Wöhler et al., 2020].

Infatti, a differenza degli altri inquinanti organici convenzionali (PCBs, PFAS, PAEs, ecc), gli antibiotici non solo incidono negativamente sulla qualità dell'ambiente (dimostrata dagli effetti ecotossicologici osservati in diverse specie), ma provocano anche la comparsa e la rapida diffusione nell'ambiente di batteri resistenti agli antibiotici [Al-Bahry et al., 2009a; Pontes et al., 2009; Wöhler et al., 2020].

La diffusione dell'antibiotico resistenza è una minaccia mondiale ed è la causa principale dell'inefficacia del trattamento delle malattie infettive in tutto il mondo [Kraemer et al., 2019]. Pertanto, la contaminazione da antibiotici è fonte di crescente preoccupazione (tra l'opzione pubblica, i funzionari governativi e gli scienziati) sia per potenziali rischi ecologici che per la salute degli organismi.

Il fenomeno di antibiotico resistenza può essere dovuto a mutazioni geniche, al trasferimento genetico verticale o orizzontale di geni di resistenza, quest'ultimo anche tra batteri non

filogeneticamente correlati. Tale trasferimento può avvenire attraverso i plasmidi che possono portare al loro interno le informazioni necessarie per produrre degli enzimi in grado di conferire la resistenza ad alcuni antibiotici. Uno dei fattori principali è la pressione selettiva, ossia quell'evento suscitato dall'utilizzo frequente di antibiotici che elimina i batteri sensibili ma non i resistenti che hanno quindi la possibilità di crescere ed espandersi. In questo modo, nel tempo, i batteri possono acquisire uno o più resistenze, generando la cosiddetta multiresistenza.

L'acquisizione di geni di resistenza agli antibiotici (ARGs) può essere considerato un fenomeno naturale ed è il risultato dell'evoluzione, anche se può essere accelerato come spesso succede, dalle attività umane [Munita & Arias 2016]. Infatti, gli ospedali, le attività industriali ed agro-zootecniche, le comunità domestiche, gli impianti di acquacoltura e di trattamento delle acque reflue sono considerate le principali fonti della contaminazione, nelle quali i batteri sono esposti sia a dosi elevate e ripetute di antibiotici (e altri fattori di selezione delle resistenze) che di nutrienti che contribuiscono a ricreare le condizioni ambientali ottimali per la loro propagazione [Puckowski et al., 2016; Kraemer et al., 2019; Chaturvedi et al., 2021].

A tal proposito, i batteri resistenti ad una sostanza possono essere selezionati dall'uso di un'altra sostanza (co-selezione). Il fenomeno è dovuto alla presenza dei geni codificanti la resistenza alle due sostanze sullo stesso elemento genetico. Inquinanti come i metalli pesanti, ad esempio, esercitano una forte pressione selettiva che promuove tali fenomeni [Zhao et al., 2021].

1.3 I metalli pesanti

Non esiste una definizione universalmente accettata di metallo pesante basata sulle proprietà chimico-fisiche. Sono state proposte delle definizioni in base alla densità ($> 5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) o in base al numero atomico (elemento il cui numero atomico sia maggiore di 20) [Ali & Khan, 2018a]. D'altra parte, le principali caratteristiche chimiche dei metalli pesanti, ossia il carattere cationico con diversi stati di ossidazione e l'elevata attitudine a formare complessi molecolari nel citoplasma cellulare, fa includere nell'elenco dei metalli pesanti anche elementi, come il selenio e l'arsenico, che non sono metalli, sebbene siano dotati di proprietà fisiche e chimiche simili a quelle dei metalli in senso stretto per questo chiamati semimetalli. Per questi motivi è stato talora proposto di abbandonare la classificazione in base alla densità o al peso atomico in favore di una nuova classificazione tripartita degli elementi chimici a seconda che esibiscano una prevalente affinità per gli atomi di ossigeno, per quelli di azoto e zolfo, o infine un comportamento intermedio tra le due precedenti categorie [Hogan, 2010].

Alcuni metalli pesanti detti 'essenziali' (per le funzioni biologiche), si ritrovano all'interno delle cellule e sono necessari per la sopravvivenza delle stesse (ad es. all'interno dell'emoglobina nel

gruppo - EME e nel citocromo P450) tuttavia diventano tossici quando viene raggiunta una determinata soglia (per carenza o per eccesso). Questi includono alluminio (Al), selenio (Se), molibdeno (Mo), cobalto (Co), stagno (Sn), stronzio (Sr), vanadio (V), ferro (Fe), rame (Cu), manganese (Mn), zinco (Zn), nichel (Ni) boro (B) e cromo (Cr).

Invece i metalli pesanti ‘non essenziali’, non si dovrebbero ritrovare all'interno dell'organismo in quanto potenzialmente tossici (ad es. cancerogeni o interferenti endocrini) a causa della loro capacità di competere con i metalli essenziali nei siti di legame [Walker et al., 2006]. Tra questi si annoverano: il mercurio (Hg), il cadmio (Cd), il bario (Ba), il berillio (Be), il piombo (Pb), l'antimonio (Sb), il titanio (Ti), il tallio (Tl), argento (Ag) e arsenico (As).

I metalli pesanti possono formare legami covalenti con gruppi organici creando molecole lipofile capaci di attraversare le membrane cellulari e produrre composti ancora più tossici (ad es. piombo tetraalchilico, metilmercurio, forme metilate di arsenico, ecc.) oppure legarsi ai costituenti non metallici delle molecole cellulari, come i gruppi sulfurei delle proteine, causando effetti tossici [Walker et al., 2006].

Ne consegue che l'impatto sull'ambiente di questi inquinanti è legato alla spiccata tendenza dei metalli ad accumularsi nei tessuti animali e vegetali attraverso vie di esposizione come l'acqua, i sedimenti e l'aria [Rand, 1995].

In un organismo, la dieta, lo stadio di sviluppo, la fisiologia, le funzioni biochimiche influenzano il grado di tossicità di metalli e semimetalli così come la loro concentrazione e la durata dell'esposizione.

In ambiente acquatico, la qualità dell'acqua influenza la tossicità attraverso le interazioni di pH, durezza e salinità. Inoltre, sebbene la concentrazione di metalli nella colonna d'acqua sia generalmente bassa a causa della loro scarsa solubilità, la loro tendenza a precipitare sul fondo espone tutti gli organismi connessi ad esso a raggiungere livelli di contaminazione tali da causarne effetti tossici [Briffa et al., 2020].

I metalli pesanti hanno una distribuzione ubiquitaria e sono soggetti a fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione lungo la catena alimentare con implicazioni negative sulla fauna selvatica e sulla salute umana [Ali & Khan, 2018b]. Nell'uomo, questi possono entrare all'interno dell'organismo per ingestione o attraverso vie respiratorie e cutanee ed essere escreti tramite il sudore, l'urina, le feci, la desquamazione della cute ed infine tramite i capelli.

Le fonti di contaminazione possono riguardare sorgenti naturali (ad es. attività vulcaniche) o antropiche (attività minerarie, fonderie, raffinerie, inceneritori di rifiuti o dall'utilizzo di combustibili fossili, produzione di erbicidi, ecc) dalle quali i metalli pesanti si diffondono per dilavamento dai terreni o legati ai sedimenti, nei bacini acquatici [Ali et al., 2019]. Qui, come

già accennato, possono subire trasformazioni biologiche e chimiche, che ne comportano un accumulo nell'ambiente (sotto forma di sedimenti) e negli organismi, sia vegetali che animali. La maggior parte dei metalli pesanti non sono inquinanti emergenti; infatti, basti pensare che il saturnismo era diffuso sin dall'Antica Roma. Questa malattia cronica dovuta all'esposizione al piombo, principalmente causata dall'uso del diacetato di piombo, dolcificante molto utilizzato anche nel vino ha afflitto probabilmente diversi imperatori romani come Tiberio, Caligola, Claudio, Domiziano, Commodo e Nerone. Allo stesso modo anche la morte di personaggi famosi come Beethoven e Goya o i disturbi mentali di Van Gogh o Caravaggio, sono stati attribuiti al saturnismo. Per i pittori si presume che l'intossicazione cronica sia dovuta al loro contatto con i colori quando inumidivano i pennelli con la bocca [Montes-Santiago, 2013]. Altre figure professionali spesso vittime di intossicazione da metalli pesanti erano i cappellai, che ispirarono a Lewis Carroll la figura del Cappellaio Matto. Infatti, nel 1600 per rimuovere i peli di una pelliccia e trasformarla in feltro veniva utilizzata l'urina dei malati di sifilide che venivano curati con il cloruro mercurico. Quando si capì che era proprio il mercurio ad essere il segreto per la lavorazione ottimale si iniziò ad usare sotto forma di nitrato mercurico (solo nel 900 sostituito con il perossido di idrogeno), composto più performante che tuttavia veniva respirato in enormi quantità. La sindrome del cappellaio matto, chiamata *eretismo*, portava ad irritabilità, depressione, timidezza, deliri, tremori, spasmi e perdita di memoria [Waldron, 1983; O'Carroll 1995]. Oggi sappiamo che, oltre ai disturbi neurocomportamentali l'esposizione ai metalli pesanti è associata a molteplici patologie, con diversi gradi di severità e condizioni in base alla natura del metallo e alla sua concentrazione. Gli effetti negativi riguardano disfunzioni associate ai reni e alle ossa, inoltre possono agire come interferenti endocrini influenzando negativamente lo sviluppo e la fertilità o possono causare ipertensioni, ictus, e tumori.

2. Stato dell'arte e metodologie

2.1 Bioaccumulo, biodistribuzione, tossicologia, modelli sperimentali e di biomonitoraggio

Il bioaccumulo è definito come il processo tramite il quale la concentrazione chimica di una sostanza in un organismo (ad es. acquatico) raggiunge un livello che supera quello del mezzo contaminato (ad es. l'acqua) ed è il risultato dell'assorbimento chimico attraverso tutte le vie di esposizione chimica: alimentare, respiratorio, dermico [Arnot & Gobas, 2006].

L'accumulo di inquinanti da parte di cellule in attiva crescita è metabolismo-dipendente [Saravanan et al., 2021]. Infatti, digestione, assorbimento e assimilazione svolgono un ruolo centrale negli studi fisiologici ed ecologici sulla nutrizione e negli studi tossicologici sul bioaccumulo [Penry, 1998].

Lo studio dei fenomeni e dei livelli di bioaccumulo è fondamentale per comprendere il destino degli inquinanti ambientali. Le attività umane hanno drasticamente alterato le concentrazioni naturali di molte sostanze nell'ambiente e aggiunte numerose altre nuove.

La comprensione dei processi di bioaccumulo è di notevole importanza per diverse ragioni:

- il bioaccumulo nei tessuti degli organismi può aumentare la persistenza delle sostanze chimiche industriali nell'ambiente;
- i prodotti chimici immagazzinati non sono esposti a degradazione fisica, chimica o biochimica diretta;
- le sostanze biologicamente attive accumulate possono influenzare direttamente la salute di un individuo;
- i predatori di quegli organismi contaminati possono essere minacciati dagli effetti sostanze nocive in quanto possono a loro volta bioaccumulare, anche in concentrazioni maggiori (biomagnificare) tali sostanze [Streit, 1998].

A tal proposito i livelli di bioaccumulo variano in base all'organismo e al tessuto o matrice organica coinvolti. Differenze tra i profili di biodistribuzione e contaminazione di un inquinante nei diversi organismi possono essere infatti correlati alle caratteristiche dell'organismo (dieta, comportamento alimentare, meccanismi fisiologici di assimilazione, escrezione, ecc.) e del suo habitat (stato di inquinamento del sito, posizione geografica, parametri chimico-fisici dell'ambiente, ecc.) [Savoca & Pace, 2021].

Una volta che la sostanza bioattiva entra all'interno dell'organismo si distribuisce diversamente nei diversi tessuti (in base alla sua affinità verso questi), ne influenza le condizioni fisiologiche e porta ad effetti biomolecolari potenzialmente negativi nell'individuo coinvolto e nella sua progenie.

Gli organismi acquatici rappresentano ottimi modelli di studio, e il loro utilizzo in biotecnologie

e biomedicina, così come in farmacologia, tossicologia, eco-fisiologia e ambiente, sta contribuendo ogni giorno di più all'avanzamento della ricerca nelle scienze della vita, favorendo così il progresso scientifico.

Inoltre, sebbene sia risaputo che il modello umano o mammifero in generale [Lilienthal et al., 2017] possa essere lontano dai modelli acquatici, è altresì noto che questi ultimi forniscono da tempo informazioni utili per lo studio della biologia e dei suoi processi di base [Schmale et al., 2007], comprese le risposte biomolecolari che possono risultare simili a quelle umane [Amoatey et al., 2019].

In generale, un organismo ideale per studi tossicologici, di biomonitoraggio, di biodistribuzione e bioaccumulo dovrebbe soddisfare determinate caratteristiche, quali: facile campionamento, disponibilità tutto l'anno, ampia distribuzione su tutto il territorio, omogeneità genetica, sensibilità e tolleranza riconosciuta agli agenti inquinanti, resistenza alla variabilità ambientale, mobilità ridotta (es. specie sessili per una valutazione della contaminazione spaziale limitata), facile riconoscimento (ad esempio della specie o del sesso), ciclo vitale lungo per studi di biomonitoraggio e bioaccumulo o breve per determinati studi sperimentali. Per questi ultimi è importante che l'organismo modello abbia un rapido sviluppo, sia di facile manutenzione, stabulazione e che si abbiano conoscenze adeguate sui suoi meccanismi fisiologici e genetici e biomolecolari [Zhou et al., 2008; Parmar e al., 2016].

Modelli acquatici ideali sono: le alghe, gli invertebrati, i pesci e gli anfibi.

- Le alghe, come le piante, rappresentano i produttori primari delle reti trofiche e costituiscono quindi il primo livello della catena alimentare. Verificare gli effetti di sostanze inquinanti su di esse risulta quindi fondamentale per valutare sia le risposte biomolecolari di esposizione che le potenziali ricadute derivanti dall'impatto di tali sostanze su altri organismi connessi da relazioni ecologiche (ad es. nutrimento, nursery, ecc.) [Savoca & Pace, 2021].
- Gli invertebrati acquatici invece, negli ultimi anni, hanno ricevuto una attenzione crescente per la possibilità di essere utilizzati come modelli di ricerca per studiare gli effetti di vari tipi di sostanze tossiche [Savoca & Pace, 2021]. Il loro uso, infatti, costituisce una valida alternativa che minimizza le preoccupazioni etiche e offre la possibilità di osservare: comportamenti, anatomia, principi fisiologici, patologie, risultati di manipolazione genetica, meccanismi di azione farmacologica, ecc. [Wilson-Sanders, 2011].
- Per quanto riguarda i pesci, le conoscenze acquisite sulla loro fisiologia, permettono sia di comprendere gli effetti tossici di molecole bioattive in relazione alla loro bioconcentrazione e distribuzione specifica nei tessuti, sia di prevedere quella che può essere l'emivita della

sostanza oggetto di studio. Inoltre, questi studi consentono la creazione modelli farmacocinetici a base fisiologica che incorporano la biotrasformazione dei precursori delle sostanze finalizzata a predire simultaneamente la biodistribuzione nei diversi tessuti sia del precursore che dei suoi metaboliti [Savoca & Pace, 2021].

- Un'altra classe di organismi ampiamente utilizzati nei test di laboratorio è rappresentata dagli anfibi. Questi organismi sono ottimi modelli per lo studio di numerose patologie grazie alla loro facile gestione, allevamento, alta resistenza, e similitudine genetica con l'uomo [Savoca & Pace, 2021].

La ricerca sui modelli di organismi acquatici è utile quindi sia per salvaguardare l'equilibrio degli ecosistemi che per valutare gli effetti negativi e potenziali (ad esempio, biomolecolari, fisiologici, tossici: citotossici, genotossici, embriotossici, ecc.) in tutti gli organismi che fanno parte della rete trofica studiata.

In questo contesto, nella valutazione degli effetti di una sostanza bioattiva, oltre agli studi di biomonitoraggio, bioconcentrazione, bioaccumulo, biodistribuzione, risulta altrettanto importante indagare su gli eventuali cambiamenti di espressione genica indotti da essa.

La ricerca sull'espressione genica fornisce informazioni specifiche sulla fisiologia di una cellula, tessuto, organo ed organismo in un determinato momento [Singh et al., 2018]. In questo contesto, la valutazione dei cambiamenti nell'espressione di specifici marker (geni target) di specifici processi biologici, ad esempio a seguito di esposizioni ad una sostanza, risulta particolarmente importante per comprenderne gli effetti dal punto di vista biomolecolare. In questi studi solitamente vengono presi in considerazione geni coinvolti nei processi di sviluppo, nella risposta allo stress, nella detossificazione, nella sopravvivenza e numerosi altri in relazione al fenomeno indagato.

2.2 Tecniche di estrazione e di analisi

Le tecniche di estrazione e di analisi fanno parte di tutte quelle attività di ricerca e sviluppo utili per effettuare rilevazioni di carattere quali-quantitativo di specifici target o analiti sulle matrici analizzate. I criteri per la scelta dell'iter analitico dipendono dal tipo di target/analita, dal tipo di matrice da analizzare e dal tipo di applicazioni e strumentazioni presenti in laboratorio. A tal proposito risulta fondamentale sviluppare ed ottimizzare le metodologie di analisi mettendo in relazione metodiche convenzionali e innovative che siano in definitiva rapide, robuste e sensibili.

I metodi di analisi di matrici biologiche (cellule, tessuti, interi organismi) o ambientali (acqua, sedimento) utilizzati durante il triennio di dottorato possono essere classificati in:

- tecniche di preparazione del campione e di estrazione (estrazione solido-liquido, estrazione in fase solida, estrazione liquido-liquido);
- tecniche separative ed analisi spettroscopiche (cromatografia liquida ad alte prestazioni e gas cromatografia, entrambe accoppiate alla spettrometria di massa);
- tecniche biologiche (estrazione dell'RNA, quantificazione, rimozione DNA genomico, retrotrascrizione ed amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi)

2.2.1 Estrazione solido-liquido, liquido-liquido ed in fase solida

➤ Estrazione solido-liquido

L'estrazione solido-liquido è un processo che prevede diversi passaggi e presuppone l'utilizzo di strumentazioni di seguito brevemente descritte. Il primo step prevede la preparazione del campione, passaggio cruciale di un'analisi (nella ricerca di analiti in matrici complesse) che costituisce gran parte del tempo dell'iter analitico. Questo step include varie operazioni: omogeneizzazioni, dissoluzioni, diluizioni, filtrazioni, centrifugazioni, concentrazioni, rimozione o mascheramento di interferenti, ecc.

Durante l'intera procedura analitica viene eseguita un'accurata decontaminazione dei materiali e degli strumenti impiegati per il tramite di diversi cicli di avvinamento effettuati generalmente con stessi solventi utilizzati per le estrazioni. Nel caso delle analisi di PFAS e PAEs è stata posta particolare attenzione anche nel non utilizzare materiale di laboratorio costituito da plastica, al fine di evitare o ridurre le possibili contaminazioni.

Nel caso di matrici organiche complesse solide (es. tessuti) si procede inizialmente con l'**omogeneizzazione** meccanica del campione attraverso forbici, coltelli, mortai e pestelli finalizzata all'ottenimento di una poltiglia che, a differenza del tessuto compatto, possa più facilmente rilasciare l'analita favorendone i successivi processi di estrazione.

Per una corretta determinazione della sostanza all'interno del campione da analizzare è necessario effettuare alcune prove relative alla valutazione dell'effetto matrice e al recupero medio dell'analita aggiungendo al campione una certa quantità di standard. Queste operazioni saranno chiaramente descritte nei prossimi capitoli e paragrafi. In questo modo il campione fortificato seguirà lo stesso iter dei campioni senza standard e quindi sarà possibile capire quanto il dato analitico è influenzato da interferenti (effetto matrice) e quanto la procedura di estrazione abbia determinato perdite di analita (recupero), confrontando i risultati ottenuti dai campioni con e senza standard.

Inizialmente il campione viene reso omogeneo attraverso macinazioni di vario tipo, ne viene

prelevata e pesata un'aliquota che viene immessa in una provetta.

Nel caso dei campioni con standard aggiunto prima dell'estrazione è necessario che quest'ultimo si mescoli con la matrice e, per evitare qualsiasi tipo di dispersione o contaminazione è auspicabile evitare l'introduzione di strumenti (ad es. spatoline) all'interno della provetta contenente il campione e lo standard. Per questo motivo viene spesso utilizzato il Vortex. Gli agitatori **Vortex** (Figura 3) sono strumenti usati nei laboratori per la miscelazione o omogeneizzazione di componenti biologiche o chimiche solide, semisolide o liquide.



Figura 3. Agitatore Vortex: Techno Kartell TK3S.

Una volta che il campione viene omogeneizzato, un'altra tecnica di preparazione del campione che può seguire tale processo consiste nella rimozione del contenuto di acqua dal campione ossia la **liofilizzazione** nella quale campioni vengono congelati e inseriti all'interno del liofilizzatore (Figura 4).



Figura 4. Liofilizzatore ScanVac CoolSafe freeze dryers (immagine da labogene.com).

Il processo di liofilizzazione prevede la disidratazione per sublimazione, passaggio di fase da solido a gas a particolari condizioni di temperatura ($< 0^{\circ}\text{C}$) e pressione (sottovuoto), ottenendo prodotti con un peso ridotto (a causa della perdita dell'acqua che solitamente per i tessuti costituisce gran parte della massa del campione).

Da qui inizia il vero e proprio processo di estrazione, infatti, una volta omogeneizzato e liofilizzato al campione viene aggiunto il **solvente** di estrazione, scelto in base alla sua capacità di estrarre l'analita in maniera ottimale.

Una volta aggiunto il solvente al campione si può procedere con il processo di **sonicazione**. Di norma, questo tipo di estrazione viene condotta in bagni ad ultrasuoni (Figura 5) che permettono il trattamento di più campioni in un ciclo.



Figura 5. Bagno ad ultrasuoni: Ultrasonic Falc.

L'estrazione assistita in ultrasuoni è una tecnica green a basso costo nel quale il campione subisce l'emissione di onde sonore ad alta frequenza all'interno della vasca contenente acqua distillata.

Il processo di estrazione si basa sul disturbo creato dalle onde ultrasoniche trasmesse in un mezzo: se la radiazione viene ripetuta periodicamente, si creano dei cicli di espansione e compressione durante i quali si verifica il fenomeno della cavitazione. La cavitazione è un processo per cui le bolle, che si formano nei cicli di espansione, implodono e collassano. L'effetto prodotto nell'estrazione solido-liquido è l'aumento dell'efficacia di penetrazione del solvente all'interno della matrice e la conseguente erosione meccanica della stessa, che porta anche alla rottura delle particelle e ad un più efficiente trasferimento degli analiti dal solido al solvente organico. La sonicazione porta quindi ad un più stretto contatto della matrice solida con il liquido estraente, permettendo di ottenere un recupero maggiore degli analiti [Albero *et al.*, 2015].

Dopo aver sonicato il campione si procede con la **centrifugazione**. Questa tecnica si basa sul fenomeno della sedimentazione di un corpo solido ad alta densità (che precipita sul fondo) mescolato ad un fluido a densità più bassa (solvente organico surnatante).

Dopo aver utilizzato la centrifuga (Figura 6) il campione il surnatante viene raccolto e trasferito in un'altra provetta o vial per essere analizzato (o ricentrifugato ed analizzato).



Figura 6. Centrifuga: Labogene ScanSpeed 416.

Tuttavia, per la determinazione di analiti presenti nel campione a basse concentrazioni, al fine di rilevare maggiormente lo stesso è necessario concentrare la soluzione facendo evaporare il solvente. Il campione viene quindi ricostituito con un volume minore di solvente e inserito in specifici inserti (riduttori di volume) all'interno delle vials (Figura 7).



Figura 7. Inserto all'interno di una vial.

Tale evaporazione può essere effettuata attraverso flusso gentile di azoto (N₂) o evaporatore rotante (rotavapor).

Il **flusso d'azoto** riduce la pressione parziale del solvente velocizzando l'evaporazione e contribuendo a rimuovere il solvente man mano che questo evapora.

L'**evaporatore rotante** invece è uno strumento collegato ad un termocriostato ed una pompa da vuoto che favorisce l'aumento della velocità di evaporazione del solvente riducendo la pressione per abbassare il punto di ebollizione del solvente. Il pallone, all'interno del quale viene posta la soluzione, ruotando, aumenta la superficie di scambio del solvente che viene inoltre riscaldato attraverso un bagnetto termostato.

La soluzione così ottenuta dopo l'iter di estrazione (Figura 8) può essere analizzata mediante opportuna strumentazione di rilevazione e tecniche cromatografiche.

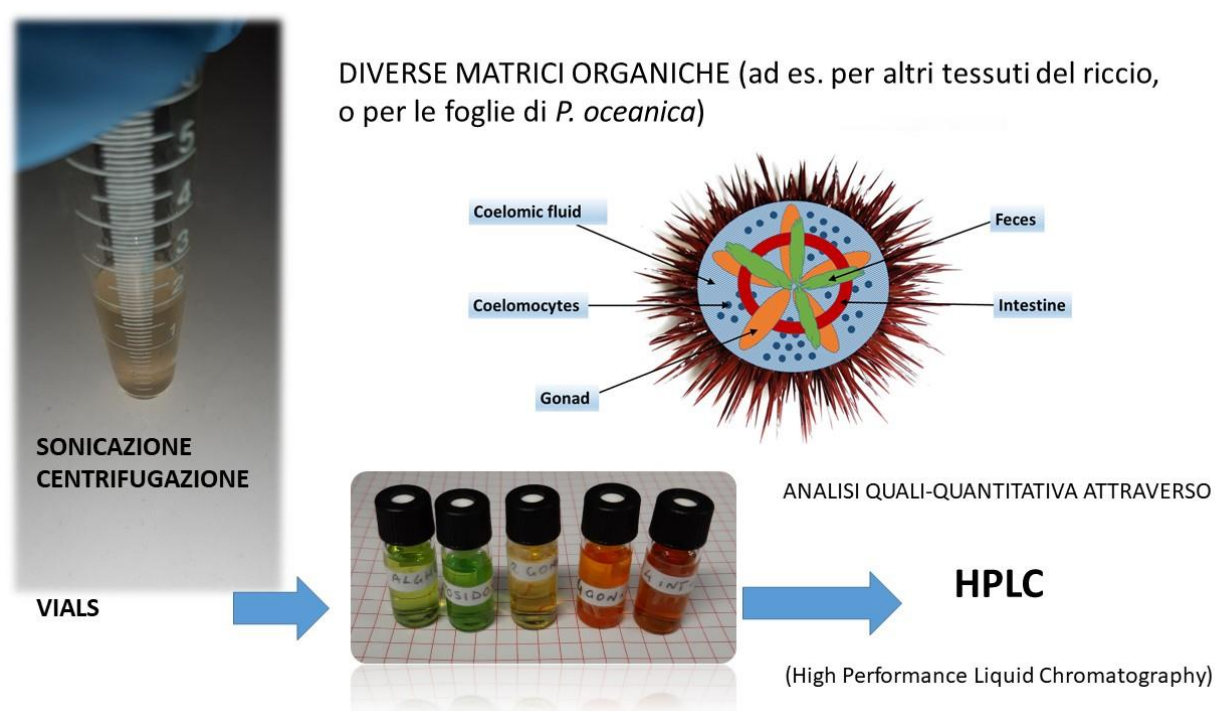


Figura 8. Esempio di iter di estrazione.

➤ Estrazione liquido-liquido

L'estrazione liquido-liquido è un metodo mediante il quale un composto viene estratto dal solvente A al solvente B dove i solventi A e B non sono miscibili (o lo sono parzialmente). I solventi più comunemente utilizzati in chimica organica sono l'acqua, l'esano, l'etere etilico, il cloroformio, il diclorometano, l'acetato di etile. Il principio che regola la distribuzione di una sostanza tra due solventi A e B non miscibili tra loro è la legge di ripartizione.

Se la soluzione di una sostanza in un solvente A viene posta a contatto con un altro solvente B

non miscibile con esso, la sostanza migra dalla prima fase (solvente A) alla seconda fase (solvente B) attraverso la superficie di contatto, fino al raggiungimento di un equilibrio di ripartizione caratterizzato da una costante K. Questa rappresenta il rapporto tra le concentrazioni della sostanza nei due solventi A e B: K detto coefficiente di ripartizione o di distribuzione ed è costante a temperatura costante.

La scelta del solvente più adatto per un'estrazione si basa sulle seguenti considerazioni: a) il coefficiente di ripartizione deve essere il più alto possibile; b) l'estrazione deve essere selettiva (il solvente di estrazione non deve estrarre altre sostanze eventualmente presenti nella miscela); c) il solvente deve poter essere facilmente allontanato dalla sostanza per permetterne il recupero; d) il solvente non deve essere miscibile con il solvente della soluzione da estrarre; e) i due solventi devono avere densità diverse perchè si abbia una rapida separazione delle fasi.

L'estrazione si effettua in imbuto separatore, accuratamente tappato, agitando vigorosamente in modo che i due liquidi non miscibili entrino in contatto, si favorisce così la dispersione l'uno nell'altro in forma di emulsione fine con piccole gocce. Lasciando la miscela a riposo le gocce di ciascun liquido si riuniscono (coalescenza) portando alla separazione dei due liquidi in due strati sovrapposti che possono essere separati. Una corretta separazione delle fasi prevede che la fase inferiore venga raccolta in un recipiente opportuno (beacker o beuta) per apertura del rubinetto dell'imbuto separatore. Quando tutta la fase inferiore è defluita (l'interfaccia delle fasi deve giungere sul fondo dell'imbuto) si recupera la fase superiore versandola dal collo dell'imbuto in un altro recipiente. Il recipiente di raccolta della fase organica deve essere asciutto. La posizione relativa dei solventi è determinata dalle rispettive densità: ad esempio, se i due solventi sono acqua ($d = 1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ed esano ($d = 0.66 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), quest'ultimo si stratifica nella parte superiore mentre la soluzione acquosa costituisce lo strato inferiore. Se il solvente organico è il diclorometano ($d = 1.325 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) questo costituirà la fase inferiore.

➤ Estrazione in fase solida

L'estrazione in fase solida (SPE, solid-phase extraction) rappresenta attualmente la tecnica di preparazione del campione più nota e utilizzata per le analisi chimiche in diversi settori (clinico, ambientale, farmaceutico e alimentare).

Questa tecnica permette l'estrazione, la purificazione e la concentrazione di analiti, prima della loro quantificazione. L'estrazione in fase solida previene la maggior parte dei problemi riscontrati nell'estrazione liquido-liquido e migliora le rese di recupero degli analiti.

Il processo di estrazione è basato sull'interazione degli analiti da estrarre, disciolti in una fase liquida, con una fase solida (adsorbente) [Khatibi et al., 2021].

L'estrazione in fase solida utilizza la differenza di affinità tra analita ed interferenze, presenti in una matrice liquida con la fase solida (solitamente polimerica) presente nella cartuccia. Tale affinità permette la separazione dell'analita target dalle impurità.

Una tipica estrazione in fase solida può essere suddivisa in quattro passaggi (Figure 9 e 10):

1. Condition/Equilibrate: innanzitutto le cartucce vengono equilibrate o condizionate con solventi al fine di inumidire il polimero.
2. Load: successivamente la soluzione di caricamento (campione), contenete l'analita, viene fatta percolare attraverso il polimero dove avviene la ritenzione dell'analita e di alcune impurità.
3. Wash: il polimero viene in seguito lavato per rimuovere le impurezze.
4. Elute: infine l'analita viene raccolto durante il processo di eluizione.

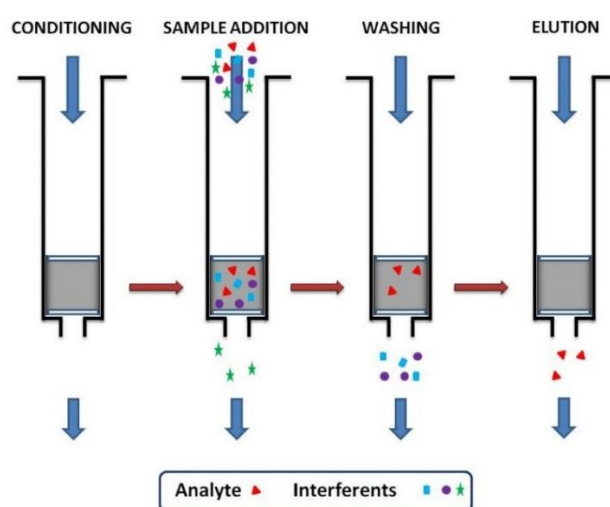


Figura 9. Grafico rappresentativo dei passaggi di estrazione in fase solida

Strata-X / Strata-XL Reversed Phase

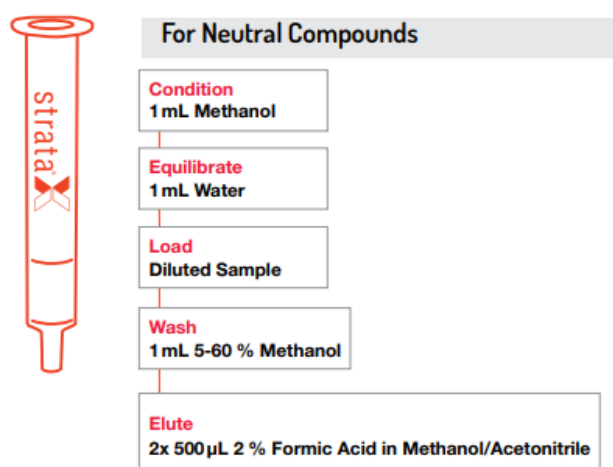


Figura 10. Rappresentazione schematica dei passaggi di caricamento delle diverse soluzioni

2.2.2 Mineralizzazione ed ICP/MS

Riguardo i metodi di estrazione dei metalli pesanti, solitamente si ricorre alla digestione acida o mineralizzazione. Per mineralizzazione si intende quel processo chimico con il quale si distrugge la parte organica di una matrice complessa avvalendosi dell'utilizzo di agenti chimici quali acido nitrico HNO_3 , acido fluoridrico HF , acido cloridrico HCl , acido solforico H_2SO_4 , perossido di idrogeno H_2O_2 sia da soli che in miscela e coadiuvati da una fonte energetica (microonde o calore diffuso).

La soluzione ottenuta viene solitamente filtrata ed analizzata attraverso tecniche spettroscopia atomica per determinare la concentrazione degli elementi oggetto di indagine.

La spettroscopia atomica comprende una serie di tecniche analitiche utilizzate per determinare la composizione elementare di un campione esaminandone lo spettro.

Nella spettrofotometria di assorbimento atomico (AAS Atomic Absorption Spectrometry) viene misurato assorbimento di energia: i livelli energetici atomici sono discreti; pertanto, le transizioni elettroniche permesse per effetto dell'eccitazione dovuta ad una sorgente di radiazione elettromagnetica sono caratteristiche per ogni elemento che assorbe energia ad una determinata lunghezza d'onda. Il grado di assorbimento dell'energia luminosa da parte di un elemento è proporzionale alla sua concentrazione.

La spettrometria di emissione atomica (AES) o optical emission spectroscopy (OES) è basata sull'analisi dello spettro luminoso caratteristico emesso dagli atomi di metallo eccitati.

Le procedure oggi utilizzate si distinguono per il metodo di eccitazione usato: a fiamma, a scintilla o al plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-AES).

Inoltre, se è presente energia a sufficienza, l'elettrone abbandona completamente l'atomo lasciando uno ione carico positivamente (ionizzazione). Tale principio viene sfruttato nella spettrometria di massa con sorgente al plasma ICP-MS. Attraverso questa tecnica il campione liquido introdotto viene nebulizzato (trasformato in aerosol) e trasportato all'interno del plasma dove è ionizzato. Questo è reso possibile dal gas Argon o Elio che all'interno di una torcia di quarzo viene scaldato attraverso un meccanismo che sfrutta radiofrequenze e magnetismo, fino a raggiungere temperature superiori ai $6.000\text{ }^\circ\text{C}$ (temperature, che in natura si riscontrano sulla superficie del sole o all'interno del nucleo terrestre), generando un plasma (uno dei 4 stadi della materia composto da elettroni liberi, ioni positivi e atomi o molecole con carica neutra). Nel caso dell'ICP-MS solo gli ioni caricati positivamente vengono selezionati per entrare nello spettrometro di massa mentre le specie neutre, prive di carica elettrica, vengono scartate tramite specifici meccanismi. All'interno dello spettrometro di massa, gli ioni entrano in uno spazio di vuoto in cui vengono sottoposti al sistema analizzatore (che sfrutta un

raffinatissimo campo elettrico che riesce a separarli con altissima precisione) che li indirizza al rivelatore (elettromoltiplicatore). Gli ioni colpiscono quindi il rivelatore che genera un segnale elettrico la cui intensità è proporzionale al numero di ioni incidenti. Maggiore sarà l'intensità di segnale di uno ione, maggiore sarà la sua concentrazione.

Elementi in comune delle tecniche ICP-AES e ICP-MS sono: il principio chimico-fisico di atomizzazione ed eccitazione con il plasma, l'analisi su un flusso continuo di campione, analisi simultanea di tutti gli elementi, la risposta dipendente dalla concentrazione. Invece tra le differenze si annoverano: il segnale analitico (intensità di emissione nell'ICP-AES e conteggio degli ioni nell'ICP-MS), orientazione della torcia (verticale o orizzontale nell'ICPAES e sempre orizzontale nell'ICP-MS), sensibilità (maggiore per ICP-MS), robustezza (maggiore per ICP-AES).

2.2.3 HPLC-MS, GC-MS, metodi di analisi spettrometrica ed estrazione cromatografica

➤ HPLC-MS

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è un tipo di cromatografia liquida che rappresenta l'evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna classica.

Si tratta di una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" (materiale assorbente, tipicamente silice granulare o polimero) posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" (miscela di solventi liquidi pressurizzati, spesso acqua, acetonitrile e/o metanolo) che fluisce attraverso essa. La fase mobile viene scelta in base al campione di interesse e alla composizione della fase stazionaria. L'ampia varietà di combinazioni di fasi stazionarie e fasi mobili consente di personalizzare una separazione per adattarla a molte soluzioni complesse. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

L'interazione chimica tra i componenti del campione, la fase stazionaria e la fase mobile influenza le velocità di migrazione e la separazione dell'analita attraverso la colonna LC.

Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" attraverso la fase stazionaria (dalla fase mobile) applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle della fase stazionaria siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10 μm), per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione se si vuole

mantenere una ragionevole velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato. Alla fine della colonna è situato un rilevatore (es. UV-VIS, spettrometro di massa) e un calcolatore che permettono un'analisi in continuo dall'uscita della colonna per poter quantificare e/o identificare le sostanze iniettate tramite apposito cromatogramma (Figura 11).

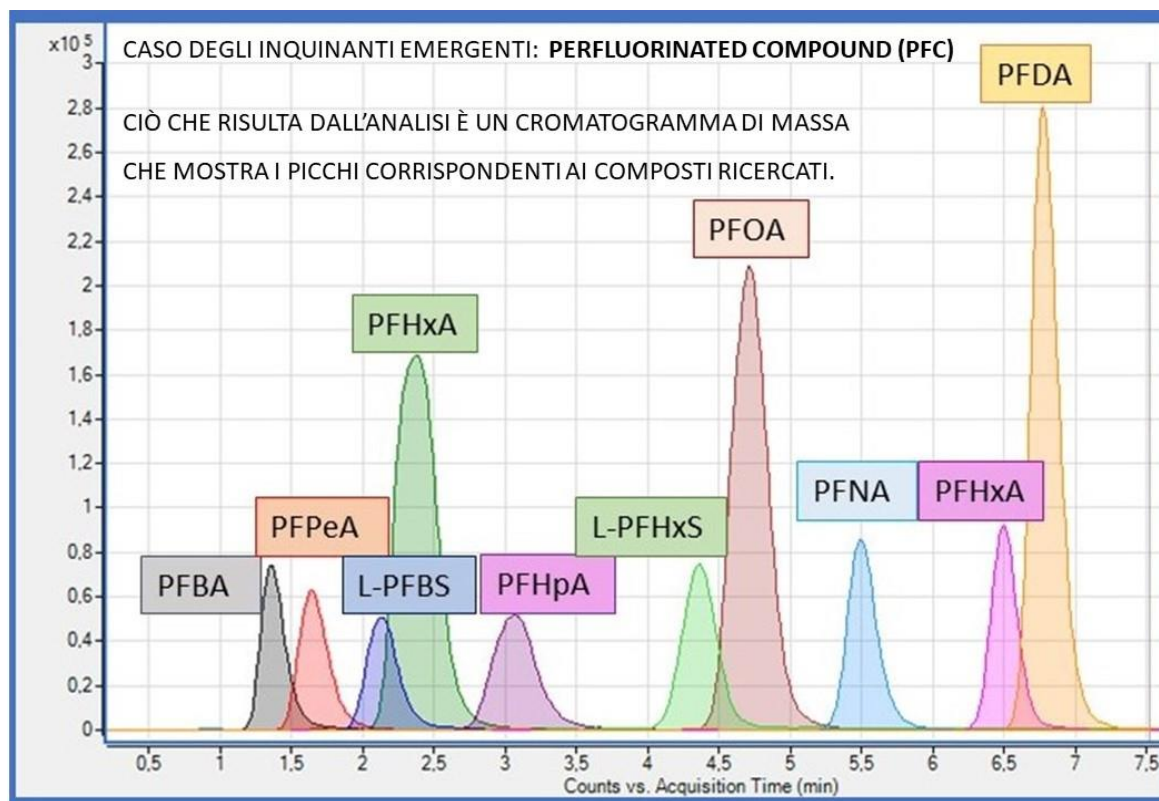


Figura 11. Esempio di cromatogramma risultante dall'analisi HPLC.

Gli spettrometri di massa operano convertendo le molecole dell'analita in uno stato carico (ionizzato), successivamente l'analisi degli ioni e degli eventuali frammenti di ioni prodotti durante il processo di ionizzazione viene effettuato in base al loro rapporto massa/carica (m/z) [Pitti, 2009].

La cromatografia liquida (LC) accoppiata alla spettrometria di massa (MS) è una potente tecnica analitica che combina il potere risolutivo della cromatografia liquida (che separa i componenti del campione) con la specificità di rilevamento della spettrometria di massa (crea e rileva gli ioni carichi). I dati LC-MS possono essere utilizzati per fornire informazioni sul peso molecolare, la struttura, l'identità e la quantità di specifici componenti del campione.

Lo spettrometro di massa, per un sistema LC-MS/MS, ha una sorgente di ionizzazione in cui l'effluente della colonna LC viene nebulizzato, desolvato e ionizzato (generalmente attraverso ionizzazione elettrospray - ESI) creando particelle cariche. Queste particelle cariche migrano poi sottovuoto spinte attraverso una serie di analizzatori di massa (quadrupolo) applicando

campi elettromagnetici. Uno specifico ione precursore massa/carica (o ione genitore) è destinato a passare attraverso il primo quadrupolo, escludendo tutte le altre particelle al di fuori di quel rapporto massa/carica. Nella cella di collisione, gli ioni di massa/carica selezionati vengono quindi frammentati in ioni prodotti (o ioni figli) per collisione con un gas inerte. Il terzo quadrupolo viene utilizzato per mirare a frammenti di ioni prodotti specifici. Gli ioni prodotti isolati risultanti vengono quindi quantificati con un moltiplicatore di elettroni altamente specifico per la struttura del composto di interesse che quindi fornisce un alto grado di selettività. La forza di questa tecnica risiede nel potere di separazione della cromatografia liquida per un'ampia gamma di composti combinata con la capacità della spettrometria di massa capace di quantificare composti con un alto grado di sensibilità e selettività basata sulle uniche transizioni massa/carica (m/z) di ciascun composto di interesse.

Operativamente, è possibile selezionare alcune soluzioni a concentrazione nota della molecola di interesse (diluizioni dello standard) creando la retta di taratura da analizzare per poter quantificare la risposta degli analiti presenti nel campione. Quindi le varie risposte (area del picco/valore numerico di integrale) possono essere tracciate rispetto alle concentrazioni nominali della molecola definendo la relazione tra risposta e concentrazione (Figura 12).

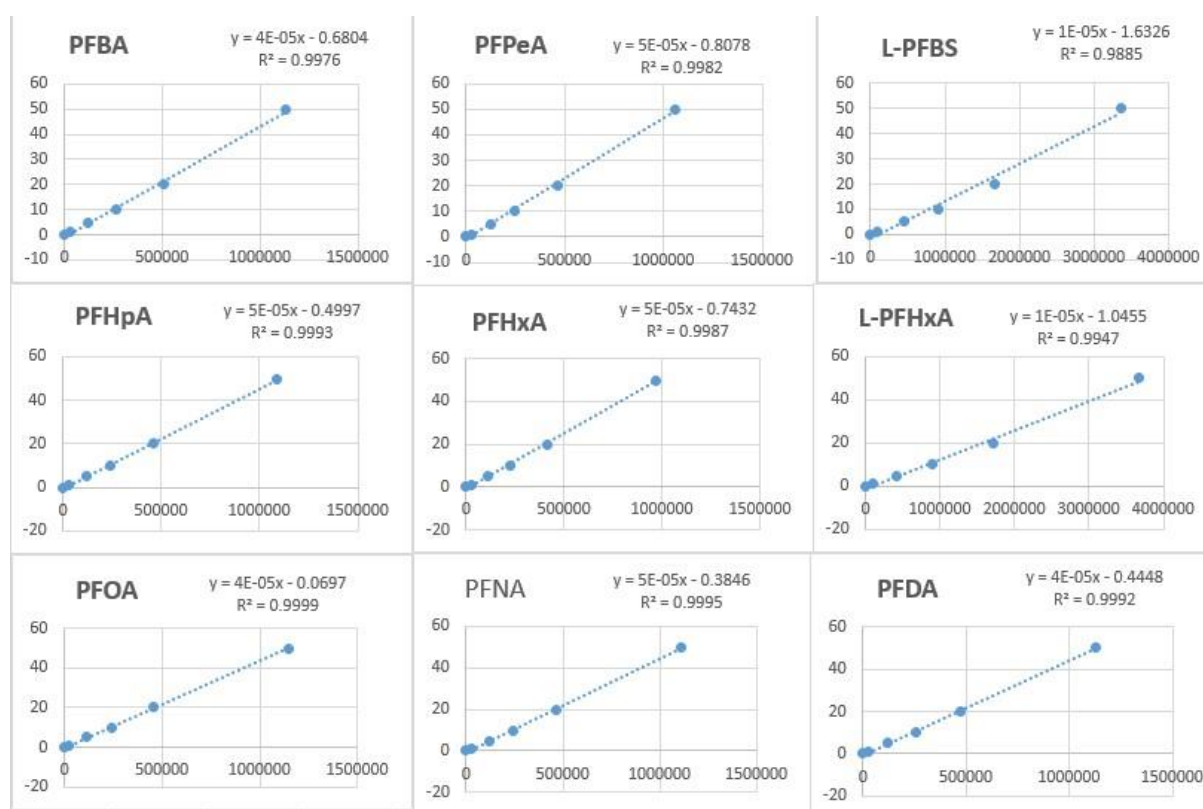


Figura 12. Esempi di rette di taratura che indicano la linearità della risposta strumentale (coefficiente di determinazione R^2) e l'equazione da applicare ai campioni a concentrazione incognita per la quantificazione.

Tra gli analizzatori di massa possiamo distinguere quelli a scansione come i quadrupoli dove l'analizzatore funge da filtro selettivo per il passaggio di determinati valori m/z al detector (non tutti gli ioni che arrivano all'analizzatore e giungono al detector) e simultanei come l'Orbitrap dove gli ioni che vengono indirizzati all'analizzatore vengono tutti e simultaneamente inviati al detector e rilevati.

L'Orbitrap è un analizzatore di massa a trappola ionica costituito da due elettrodi esterni e uno centrale, che gli consentono di agire sia come analizzatore che come rivelatore. Gli ioni che entrano nell'Orbitrap vengono catturati attraverso un "electrodynamic squeezing", dopodiché oscillano attorno all'elettrodo centrale e tra i due elettrodi esterni. Ioni diversi oscillano a frequenze diverse che determinano la loro separazione. Misurando le frequenze di oscillazione indotte dagli ioni sugli elettrodi esterni, vengono acquisiti e rilevati in tempo reale gli spettri di massa degli ioni. Grazie alle sue capacità l'Orbitrap è spesso l'analizzatore di massa preferito per ricercare nuovi composti o sostanze ad alta complessità anche a concentrazioni inferiori ai ppb. L'Orbitrap è spesso utilizzato in applicazioni di ricerca nei campi della proteomica, lipidomica, ricerca clinica e tossicologia forense, alimentare (cibo e bevande) e ambientale.

➤ GC-MS

La gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) è composta da due elementi costitutivi principali: il gascromatografo e lo spettrometro di massa. Questi due componenti, usati insieme, consentono un grado molto più preciso di identificazione della sostanza rispetto a entrambe le unità utilizzate separatamente. Il gascromatografo utilizza una colonna capillare le cui proprietà di separazione delle molecole dipendono dalle dimensioni della colonna (lunghezza, diametro, spessore) e dalle proprietà della fase. La differenza nelle proprietà chimiche tra diverse molecole in una miscela e la loro relativa affinità per la fase stazionaria della colonna favoriranno la loro separazione. Le molecole vengono trattenute dalla colonna e quindi eluite in tempi diversi, e ciò consente allo spettrometro di massa a valle di catturare, ionizzare, accelerare, deviare e rilevare separatamente le molecole ionizzate. Il principio di funzionamento prevede che il campione venga iniettato all'interno del sistema gas cromatografico costituito da una colonna capillare (in forno termostato) attraversata da un flusso di gas inerte (solitamente Elio). Le varie specie chimiche che costituiscono il campione vengono separate durante il percorso nella colonna e rilevate dallo spettrometro di massa (ad es. analizzatore triplo quadrupolo), che frammenta le molecole ionizzandole e separa gli ioni in base al rapporto massa/carica (m/z). Quest'ultimo è un elettromoltiplicatore che ha la funzione di amplificare la corrente ionica e di restituire il segnale analitico. Il risultato, come per la cromatografia liquida,

è rappresentato dallo spettro di massa che esprime quindi l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del rapporto massa/carica. Benchè entrambe le tecniche cromatografiche funzionano secondo gli stessi principi di base di separazione, identificazione e quantificazione dei composti, la gas cromatografia viene solitamente utilizzata per la rilevazione dei composti volatili.

➤ **I metodi di analisi spettrometrica ed estrazione cromatografica**

Sia per le strumentazioni HPLC-MS che GC-MS è possibile operare attraverso diverse modalità di analisi spettrometrica.

La modalità *Full Scan Analysis* è un tipo di scansione a singolo stadio che fornisce una scansione completa dello spettro di massa di ogni analita. L'analizzatore di massa viene impostato nell'intervallo di massa definito dall'operatore.

In questa modalità è possibile eseguire diversi tipi di estrazioni del cromatogramma; il Total Ion Chromatogram (TIC) mostra la somma dei segnali di tutte le masse in un dato spettro mentre l'Extracted Ion Chromatogram (EIC) mostra il segnale da una singola massa selezionata dall'utente indipendentemente dall'intensità della stessa rispetto alle altre; infine, il Base Peak Chromatogram (BPC) consente di separare il segnale dal rumore riportando i picchi più intensi di ogni spettro.

La modalità *Selected Ion Monitoring* (SIM) consente la rilevazione di analiti specifici con una maggiore sensibilità rispetto alla modalità Full Scan. In modalità SIM lo strumento è impostato per rilevare solo gli ioni (ioni molecolari e/o di frammento) specifici di ciascuno dei target analitici, piuttosto che eseguire la scansione su un ampio intervallo m/z, migliorando la risoluzione dell'analisi.

La modalità *Multiple-Reaction Monitoring* (MRM) invece permette di osservare più ioni prodotti da uno ione precursore attraverso l'impostazione di una specifica energia di transizione/collisione caratteristica della coppia ione precursore/frammento. In questo modo è possibile rilevare solo le transizioni selezionate eliminando tutti gli altri ioni non ricercanti e migliorando notevolmente sia l'accuratezza che i limiti di rilevazione. In merito alle estrazioni cromatografiche delle modalità SIM e MRM, a differenza della TIC, queste sono specifiche delle stesse e consentono di visualizzare cromatogrammi nei quali vengono quindi acquisiti solo i segnali di interesse.

2.2.4 PCR

La polymerase chain reaction (PCR) è una tecnica che consente di ottenere milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico. Infatti, la PCR è una reazione di amplificazione in vitro di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi-DNA dipendente termostabile. Gli elementi di innesco dell'attività della DNA polimerasi sono due oligonucleotidi a singolo filamento (primer) complementari alle estremità del segmento di DNA che si vuole amplificare, Altri elementi che fanno parte della reazione sono: i desossiribonucleotidi (dNTP) (necessari per la sintesi delle nuove eliche) ed il cloruro di magnesio ($MgCl_2$) (cofattore indispensabile per la DNA polimerasi). La reazione consiste nel susseguirsi di cicli di amplificazione durante i quali si alternano tre diverse fasi caratterizzate da specifiche temperature preimpostate in un termociclatore.

- 1) la denaturazione della doppia elica del DNA stampo in due singoli filamenti (a temperature superiori a $90^\circ C$) per rottura dei ponti idrogeno che tengono appaiate le basi complementari;
- 2) l'appaiamento dei primer alle sequenze complementari di DNA a singola elica localizzate alle estremità del frammento bersaglio (ad una temperatura in genere compresa tra i 50 ed i $65^\circ C$ che dipende dalla sequenza dei primers);
- 3) l'estensione dei primer ad opera dell'enzima DNA Polimerasi mediante aggiunta di nucleotidi nella direzione $5'-3'$ (ad una temperatura che dipende dall'enzima usato).

Per la sintesi di una nuova elica complementare al DNA stampo, l'enzima riconosce l'estremità $3'$ dei primer ibridati con i filamenti di DNA stampo, ed aggiunge i nucleotidi liberi presenti nella soluzione. In questo modo, ad ogni ciclo, il numero di nuove molecole di DNA aumenta in maniera esponenziale fino al raggiungimento di un plateau.

Questa tecnica, accoppiata alla retrotrascrizione degli RNA messaggeri, può essere utilizzata per amplificare specifici marker biomolecolari al fine di effettuare indagini relative alla valutazione del cambiamento di espressione genica in organismi esposti o meno a determinate sostanze biologicamente attive.

Per poter effettuare analisi di espressione genica è necessario innanzitutto estrarre l'RNA totale dal campione biologico e trasformarlo in DNA complementare a doppia elica (cDNA) per la successiva amplificazione con primers in grado di ibridare con gli specifici geni bersaglio.

La molecola di RNA è molto sensibile alla degradazione da parte di RNasi presenti nei liquidi biologici, sulle mani e quindi su quasi tutte le superfici che siano state toccate senza guanti sterili. Per evitare la contaminazione con ribonucleasi è importante dedicare strumentazione (pipette, puntali, provette etc.) e soluzioni appositamente sterilizzate alla sola manipolazione dell'RNA. La vetreria è sterilizzata in stufa a $180^\circ C$ per 3 ore mentre la plastica e le soluzioni

in autoclave per 30 min a 121°C alla pressione di 1 atmosfera.

La procedura di lisi del tessuto deve permettere la degradazione e la frammentazione delle cellule in modo da consentire la liberazione dell'acido nucleico senza deteriorarlo.

Generalmente vengono utilizzati kit (ad es. PureLink RNA mini-kit Thermofisher) che sfruttano per la lisi un agente caotropico, che protegge l'RNA dalla degradazione e, per la purificazione, delle colonnine con membrane in silice, altamente efficienti per isolare RNA rimuovendo la maggior parte del DNA genomico. Il DNA genomico residuo nella preparazione di RNA viene rimosso attraverso l'utilizzo di opportuni kit (ad es. RQ1 RNase-Free DNase - Promega) basati sull'azione di una DNasi. Una reazione di PCR, confrontando campioni trattati e non trattati con DNasi, rivelerà l'effettiva rimozione del DNA genomico. L'RNA isolato viene quantificato attraverso uno spettrofotometro, che consente di stabilirne anche la purezza. L'integrità dell'RNA si controlla tramite elettroforesi su gel di agarosio, tecnica che permette la separazione di molecole sottoposte ad un campo elettrico in base al peso molecolare. All'interno della cella elettroforetica, collegata a un alimentatore, la differenza di potenziale tra i due elettrodi determina un flusso di corrente che permette agli acidi nucleici (carichi negativamente a causa della presenza dei gruppi fosfato) di migrare verso il polo positivo attraverso il gel di agarosio (ottenuto sciogliendo lo zucchero in una soluzione salina). Al gel si aggiunge l'etidio bromuro che, intercalandosi tra le basi degli acidi nucleici, ne permette la visualizzazione ai raggi UV al termine della migrazione, avvenuta accanto ad un marker di peso molecolare.

Una volta ottenuto l'RNA puro ed integro si procede alla retrotrascrizione. La retrotrascrizione consiste nella sintesi di una molecola di DNA a singolo filamento (chiamata cDNA, DNA complementare) da parte della trascrittasi inversa che utilizza come stampo l'RNA. L'enzima per catalizzare la sintesi di una catena di cDNA complementare all'RNA, oltre all'RNA stampo, necessita di deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs) e un innesco costituito da un primer gene specifico o da random primers. La reazione si può assemblare con i reagenti di un kit (ad es. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit - Applied Biosystems™). Il cDNA ottenuto può essere conservato a -20 °C fino al suo utilizzo nelle reazioni di amplificazione mediante Real Time PCR con gli opportuni primers, specifici per i geni bersaglio.

2.3 Metodologie di rimozione degli inquinanti per il biorisanamento: accumulo attraverso matrici organiche e fotodegradazione

Le metodologie di rimozione degli inquinanti per biorisanamento (bioremediation) ambientale sono tutte quelle tecniche più o meno combinate che abbracciano diversi campi delle scienze: chimiche, fisiche, geofisiche, botaniche, microbiologiche e di biologia molecolare.

Queste tecnologie sono generalmente sostenibili (con impatto ambientale scarso o nullo) e vengono applicate per il recupero di ambienti contaminati. Per i processi di bioremediation, inizialmente, possono essere impiegati organismi (o microrganismi) di animali o vegetali, per accumulare e/o degradare gli agenti contaminanti pericolosi o detossificarli (biotrasformarli in composti meno tossici). In questo contesto l'efficienza di accumulo o degradazione dipende dalla natura e dalla quantità del contaminante, dal tipo di matrice organica utilizzata (es. batteri, piante, animali, funghi) e dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente.

A tal proposito, durante il mio percorso di dottorato, ho focalizzato l'attenzione su due metodologie di rimozione degli inquinanti, la prima basata sull'accumulo degli stessi da parte di matrici organiche vegetali (alghe) e la seconda basata sulla degradazione fotoindotta operata da radiazioni elettromagnetiche UV (fotodegradazione). Entrambe le metodologie o fasi sono strettamente legate e hanno l'obiettivo comune di rimuovere gli inquinanti in maniera sostenibile.

➤ **Accumulo attraverso matrici organiche:** Bioremediation con *Ulva lactuca*

Il biorisanamento rappresenta una scienza ambientale che tende ad amplificare le azioni biologiche naturali per bonificare zone con alti livelli di inquinanti (o agenti patogeni) come fluoruri, nitrati, fosfati, ammoniaca, ed altri composti, sia organici (PAEs, PFAS, antibiotici, ecc.) che inorganici (metalli pesanti) [Azubuike et al., 2016].

Generalmente questo processo si basa sul metabolismo degli organismi che stimolano la loro attività catabolica rendendosi capaci di utilizzare i contaminanti organici inquinanti come fonte di energia, o semplicemente di assorbirli o adsorbirli. La bioremediation può essere applicabile *in situ* (senza rimuovere la matrice ambientale contaminata) o *ex situ* (con la rimozione e il trattamento della matrice contaminata in un'area dedicata all'interno del sito).

Nell'ambiente acquatico, tra i diversi organismi utilizzati in maniera efficace e versatile vi sono le alghe. Queste ultime sono definite iperaccumulatori in quanto concentrano e bioaccumulano esponenzialmente specifici inquinanti in maniera direttamente proporzionale alla quantità degli stessi presenti nell'ambiente.

Durante il mio percorso di dottorato ho dedicato la mia attenzione alla specie *Ulva lactuca*

macroalga appartenente al phylum Chlorophyta, descritta da Linneo nel Mar Baltico nel XVII secolo. *U. lactuca* è in grado di crescere sessile o galleggiante e presenta due modalità di riproduzione: sessuata attraverso spore e asessuata o vegetativa per frammentazione ed accrescimento del tallo. Questa macroalga contiene elevate quantità di carboidrati (fino al 60%), medie/alte quantità di proteine (10-47%) e basse quantità di lipidi (1-3%) (Kraan et al., 2013). *U. lactuca* presenta tutte le caratteristiche per essere considerata un eccellente bio-accumulatore: è capace di resistere in ambienti fortemente contaminati, di accumulare inquinanti organici favorendo la loro rimozione dall'ambiente (inoltre è un'alga nitrofila), ha un elevato potenziale di sequestro dell'anidride carbonica (CO₂), è ampiamente distribuita nel territorio ed è di facile gestione in condizioni controllate. Tali caratteristiche ne fanno un modello ideale per effettuare opere di biorisanamento di matrici ambientali inquinate, come già dimostrato in letteratura [Cheney et al., 2014].

Inoltre, come descritto nei prossimi paragrafi nel lavoro dal titolo *Uptake e degradazione fotoindotta di esteri ftalici (PAEs) in Ulva lactuca evidenziano la sua potenziale applicazione nel biorisanamento ambientale*, a seguito dell'uptake, è stata associata una tecnica di rimozione degli stessi dalla biomassa algale che li ha accumulati: la fotodegradazione.

➤ **Fotodegradazione**

Negli ultimi anni la comunità scientifica ha indirizzato il suo interesse sui processi che possono essere applicati per degradare le sostanze pericolose [Barreca et al., 2013, 2014]. Tali sostanze a causa delle loro proprietà chimico-fisiche resistono alla degradazione, ad esempio, il DEHP viene degradato del 50% dopo oltre un anno ad opera del sole per fotodegradazione [Staples et al., 1997].

Il processo di fotodegradazione è dovuto principalmente alla componente UV della radiazione solare (UV-B ed UV-A, con lunghezza d'onda λ da 200 a 380 nm) che è la più energetica, anche se quella in percentuale minore. Dal punto di vista chimico, il processo di fotodegradazione genera una serie di complesse reazioni che sono specifiche della struttura chimica della molecola presa in esame. Tale processo inizia da una reazione di fotolisi generata in laboratorio da un reattore fotochimico (Figura 13), dove l'assorbimento dell'energia della radiazione UV ($h\nu$) da parte di un gruppo cromoforo porta alla formazione di uno stato eccitato R^* ad alto livello energetico, il quale forma poi per scissione omolitica il radicale $R\bullet$.



Figura 13. Reattore fotochimico RPR-100 (immagine da Rayonet.org)

Questi radicali possono facilmente reagire con l'ossigeno atmosferico generando idroperossidi R-OOH, i quali sono molto reattivi ed instabili e possono decomporsi (sempre per effetto della radiazione UV) generando radicali perossidi ROO• oppure radicali RO• e OH•, entrambi molto reattivi; questi ultimi vanno ad attaccare le specie chimiche, generando nuovi radicali liberi R• ed il processo si autoalimenta.

3. Scopo del lavoro

Tenuto conto di quanto finora descritto, durante il mio percorso di dottorato ho incentrato il lavoro di ricerca su quattro tematiche, le prime due suddivise per classi di composti chimici, saldate insieme dall'obiettivo comune dello *Studio della biodistribuzione di sostanze biologicamente attive in organismi acquatici*, le ultime, indirettamente connesse al cuore della tesi, sono inerenti alla più ampia materia ambientale.

In questo modo, durante questi anni di studio, orientandomi verso lo scopo della tesi, mi sono posto diverse domande (Figura 14) cui ho sistematicamente cercato di rispondere. Partendo dai risultati via via ottenuti ho cercato di aggiungere parallelamente sempre nuove informazioni finalizzate al raggiungimento degli obiettivi insiti alle relative tematiche e linee di ricerca affrontate.

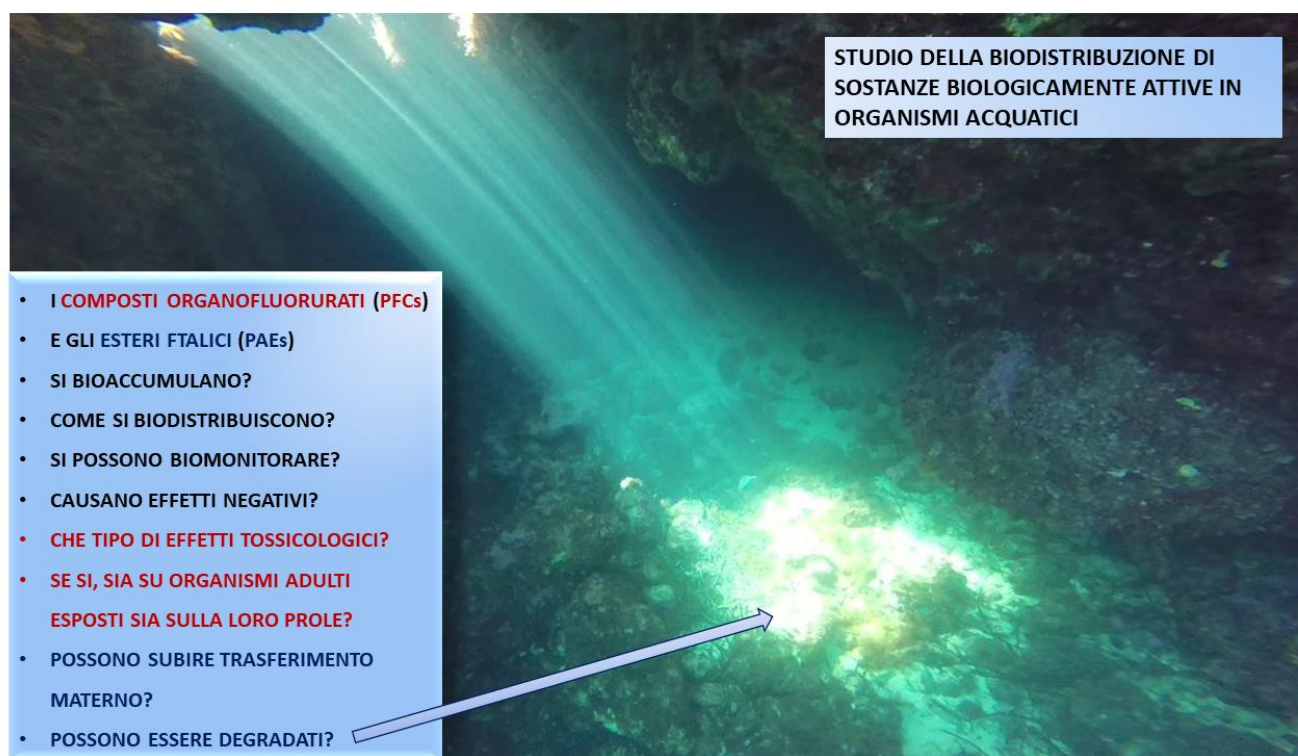


Figura 14. Alcune domande affrontate all'interno di questa tesi.

Su queste basi ho impostato il mio lavoro di tesi secondo le seguenti tematiche:

❖ **Tematica 1. Composti organofluorurati (PFCs) negli organismi acquatici**

Questa tematica affronta il tema della presenza dei PFCs negli organismi acquatici sia considerando tutti i fattori che ne influenzano la biodistribuzione e il bioaccumulo che proponendo degli studi sperimentali per il monitoraggio ambientale attraverso specie sentinella e per gli effetti da esposizione in ambiente controllato. In quest'ambito vengono trattati i seguenti sottotemi:

- ✓ Composti organofluorurati (PFCs) negli organismi acquatici: un'analisi dello stato dell'arte [Savoca & Pace, 2021].
- ✓ *Paracentrotus lividus*: una specie sentinella nel biomonitoraggio ambientale del PFOA [Savoca et al., 2021b].
- ✓ Valutazione degli effetti di esposizione al PFOA in ambiente controllato su *Paracentrotus lividus* [Savoca et al., 2022 Submitted].

❖ **Tematica 2. Ftalati in organismi acquatici: studi di trasferimento e biorisanamento**

Questa tematica si focalizza sulla presenza degli esteri ftalici negli organismi acquatici come conseguenza dell'inquinamento da plastiche negli ambienti marini. Viene studiato il trasferimento organismo/organismo e ambiente/organismo esplorando la possibilità di sfruttare quest'ultimo per approcci di biorisanamento. In quest'ambito vengono trattati i seguenti sottotemi:

- ✓ Trasferimento materno ed ambientale di ftalati nelle uova di *Caretta caretta* [Savoca et al., 2021a].
- ✓ *Ulva lactuca*: una specie adatta per processi di biorisanamento fotodegradativo [Savoca et al., 2022 Submitted].

❖ **Tematica 3. Studi sul microbiota acquatico: organismi marini e rifiuti plastici come potenziali vettori di antibiotico-resistenza**

Questa tematica è stata affrontata attraverso collaborazioni scientifiche con gruppi di ricerca che si occupano di antibiotico-resistenza. Sono stati presi in considerazione sia rifiuti plastici di polietilene dispersi nell'ambiente acquatico che specie acquatiche migratorie come *Caretta caretta* al fine di valutarne il ruolo di vettori di antibiotico-resistenza

prendendo come riferimento la presenza di microrganismi resistenti nelle rispettive acque di campionamento. In quest'ambito vengono trattati i seguenti sottotemi:

- ✓ *Caretta caretta* come potenziale vettore di microbiota antibiotico-resistenti [**Alduina et al., 2020**]
- ✓ Antibiotico-resistenza nel microbiota associato ai rifiuti plastici dispersi in ambiente acquatico [**Sucato et al., 2021**]
- ✓ Valutazione dell'antibiotico-resistenza in ambiente marino [**Gambino et al., 2022**]

❖ **Tematica 4. Contaminazione da metalli pesanti in uova e tessuti di *C. caretta***

Considerando gli effetti tossici di esposizione diretta ai metalli pesanti e il loro impatto indiretto nel favorire lo svilupparsi di fenomeni di antibiotico resistenza, questa tematica estende lo studio dell'esposizione di *Caretta caretta* a inquinanti tossici prendendo in considerazione anche la contaminazione con metalli pesanti [**Savoca et al., 2022**].

4. Composti organofluorurati (PFCs) negli organismi acquatici

4.1 Composti organofluorurati (PFCs) negli organismi acquatici: un'analisi dello stato dell'arte

Il presente lavoro è una revisione critica che indaga sui recenti progressi negli studi relativi all'impatto dei composti organici poli- e perfluorati (PFCs) negli organismi acquatici.

4.1.1 Solubilità, persistenza ed emivita dei PFCs

La solubilità dei PFCs e relative biodisponibilità come sostanze liberamente disciolte sia in acqua dolce che salata svolge un importante ruolo sia nelle contaminazioni ed effetti negli organismi coinvolti sia nelle possibili deviazioni (variazioni) tra le concentrazioni nominali e misurate (in condizioni sperimentali controllate) delle sostanze investigate, ponendo rischi potenziali di sottostima (e quindi sottovalutazione) degli effetti tossici dei PFCs [Rewerts et al., 2021]. Infatti, negli organismi, i lenti processi di dissoluzione possono portare a un lento bioaccumulo e metabolizzazione così come ad un aumento dell'emivita (o semivita) dei PFCs (dovuto al rimpiazzamento dei PFCs consumati con i nuovi PFCs dissolti). In ambiente naturale, in aggiunta all'alto tasso di assorbimento dei PFCs nella matrice organica dispersa in soluzione e/o nelle specie acquatiche, l'ubiquità e la persistenza dei PFCs in acqua (rispettivamente 40 e 90 anni per il PFOA e il PFOS), rendono queste molecole difficili da eradicare [Kucharzyk et al., 2017; Death et al., 2021].

All'interno di un organismo acquatico, l'emivita di un PFC può dipendere dal metabolismo (sia intra- che interspecifico) e dal tipo di molecola con relativi gruppi funzionali. Ad esempio, la presenza di porzioni di acidi sulfonici o carbossilici può aumentare l'emivita della sostanza (indipendentemente dalla lunghezza della catena del carbonio) [Death et al., 2021]. La semivita è anche influenzata dal tipo di isomero, come è stato osservato per gli isomeri del PFOA e dell'acido perfluorononanoico (PFNA) nella trota iridea [De Silva et., 2009].

In generale, il tempo di dimezzamento della concentrazione dei diversi PFCs e il tasso di eliminazione degli stessi dall'organismo acquatico variano in base a:

- 1) il tipo di PFC e i livelli di esposizione;
- 2) la specie e il sesso dell'organismo;
- 3) il tipo di percorso predominante di assunzione (ad esempio, acquoso o dietetico);
- 4) gli organi o tessuti coinvolti (ad esempio, branchie o parete intestinale);
- 5) il disegno sperimentale in condizioni controllate;
- 6) parametri chimico-fisici ambientali.

Infatti, per quanto riguarda il tipo di esposizione, è stato osservato che il PFOS ha un'emivita

più breve (11-17 giorni) nei pesci alimentati con cibi contaminati rispetto a quella registrata dopo esposizione attraverso il mezzo acquoso (29-35 giorni) [Hassell et., 2020].

In questo contesto è interessante notare che in base alla specie oggetto di studio varia la cinetica dei PFCs. Ad esempio, rispetto allo studio precedente [Hassell et., 2020], per tutti i PFCs studiati (PFOS, acido perfluorohexanesulfonico (PFHxS), PFOA e 6:2 fluorotelomero sulfonato (6:2 FTS)) nei girini delle rane leopardo settentrionali (*Rana pipiens*), sono stati registrati tassi di emivita inferiori (1.2 - 3.3 giorni) [Hoover et., 2017].

Occorre inoltre prestare particolare attenzione ai processi di biotrasformazione, poiché i metaboliti dei PFCs potrebbero avere emivite più lunghe dei loro precursori, divenendo così nuovi candidati per il biomonitoraggio ambientale [Houde et al., 2011]. I tempi di eliminazione dei PFCs dipendono anche dalle dimensioni degli organismi esposti, dalla loro dieta e dal loro livello trofico che potrebbe determinare un'assunzione alimentare cronica di PFCs (fattore cruciale nei processi di bioamplificazione o biomagnificazione). Ad esempio, nei delfini l'emivita del PFOS è stata di 5 mesi [Houde et al., 2006], nella trota iridea di 12-15 giorni (*Oncorhynchus mykiss*) [Martin et al., 2003] e di 29-31 giorni nella passera di mare (*Pseudopleuronectes yokohamae*) [Sakurai et al., 2013]. Tuttavia, è necessario tenere conto di diversi fattori, ad esempio, in esemplari giovani di trota iridea, l'emivita di alcuni PFCs (valutata attraverso esperimenti di washout/depurazione) variava da 3 a 43 giorni e aumentava con il numero di atomi di carbonio presenti nella sostanza chimica, mentre il bioaccumulo, che presentava una ripartizione preferenziale nel sangue e nel fegato, diminuiva nel seguente ordine: PFSA > PFCAs > perfluoroalkyl phosphonic acids (PFPA) [Lee et al., 2012].

Riguardo le differenze tra specie di allevamento o selvatiche, queste ultime generalmente subiscono nei loro tessuti una permanenza dei PFCs maggiore probabilmente a causa del continuo afflusso di questi inquinanti nell'ambiente. Ad esempio, in alcuni pesci selvatici sono stati osservati tassi di eliminazione del 50% del PFOS in un periodo superiore a 100 giorni [Yamashita et al., 2005; EFSA, 2008].

Infine, riguardo la persistenza dei composti chimici alternativi ai PFCs, la loro produzione non sembra rappresentare una soluzione ideale alle minacce poste dal loro impatto; infatti, è stato osservato che l'emivita di circa 10 giorni del solfonato di etere polifluorurato 6:2 (F-53B) (un composto fluorurato alternativo al PFOS) nelle larve di zebrafish indicava comunque un suo elevato potenziale di persistenza negli organismi acquatici [ECHA, 2017].

4.1.2 Potenziali di bioaccumulo: BCF, BAF, BSAF, BMF e TMF

Come accennato nei precedenti paragrafi, l'impatto ambientale derivante dalla contaminazione da inquinanti organici persistenti come i PFAS è amplificato dalla loro stabilità. Tale persistenza comporta gravi rischi di bioaccumulo in tutti gli organismi, in special modo acquatici, soprattutto negli animali appartenenti ai livelli superiori della rete trofica [Taniyasu et al., 2003; Houde et al., 2006]. Negli ultimi anni, indagini europee sulle sostanze tossiche persistenti nei prodotti ittici hanno valutato criticamente quali sono le potenziali minacce per la salute pubblica e le cause della loro assimilazione creando, di queste ultime, un database in continuo aggiornamento [Vandermeersch et al., 2015]. Per questi motivi, è importante valutare il potenziale di bioaccumulo di tali inquinanti persistenti in funzione delle specie, della loro dieta e dell'ambiente di vita, tenendo conto sia delle specie selvatiche [Houde et al., 2006] che di quelle allevate [Fattore et al., 2018].

Inoltre, in una data specie, risulta interessante comprendere in che modo sia avvenuta la sua contaminazione da PFAS ed in particolare se questa deriva da un fenomeno di diretta (assorbimento o ingestione) o indiretta (biomagnificazione) assimilazione. Per questo scopo risulta quindi fondamentale definire vari indicatori (e le loro differenze) che consentono una valutazione esaustiva e globalmente accettata dei potenziali di bioaccumulo.

Infatti, nonostante le definizioni univoche di tali indicatori da parte della European Chemical Agency [ECHA, 2017] e altri ricercatori del settore [Arnot & Gobas 2006; Mackay et al., 2013, 2018; Franklin, 2016], i fattori di bioconcentrazione, bioaccumulo e biomagnificazione non sono sempre determinati nello stesso lavoro di ricerca, rendendo difficile il confronto dei risultati tra diversi studi.

Nel corso del mio dottorato di ricerca ed in particolare durante la stesura della review ho cercato di organizzare e discutere in maniera critica la letteratura recente attraverso il confronto dei risultati di diversi studi secondo i concetti illustrati nella Figura 15 per i fattori di: bioconcentrazione (BCF), bioaccumulo (BAF), accumulo biota-sedimento (BSAF), biomagnificazione (BMF) e fattori di magnificazione trofica (TMF) rielaborando definizioni o equazioni mostrate nei prossimi paragrafi.

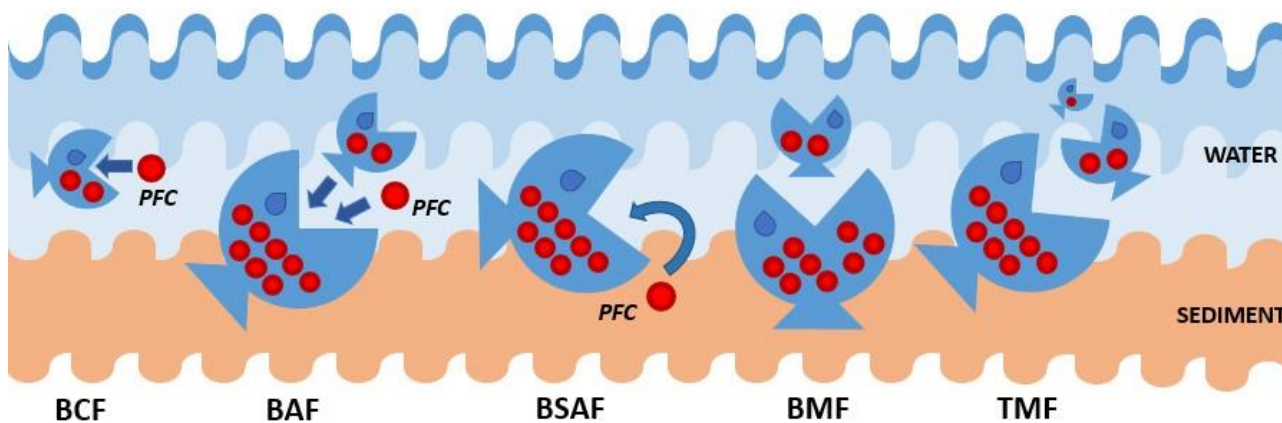


Figura 15. Illustrazione dei processi di bioaccumulo

➤ **Bioconcentration factor (BCF)**

Il fattore di bioconcentrazione (BCF) intende valutare l'uptake di una sostanza chimica in un organismo attraverso la sua esposizione, con l'esclusione dell'assunzione tramite la dieta. La determinazione del BCF richiede condizioni controllate di esposizione, è determinabile in laboratorio e tiene conto solo dell'assorbimento respiratorio che è governato dalla costante cinetica $k_{\text{Respiratory}}$. D'altra parte, i processi di eliminazione (egestione fecale, biotrasformazione metabolica, eliminazione delle branchie e diluizione da crescita) sono presi in considerazione dalla costante cinetica di eliminazione cumulativa $k_{\text{Elimination}}$. Così, il BCF è definito come il rapporto tra la costante cinetica di assorbimento respiratorio e quella di eliminazione (equazione (1)).

$$\text{BCF (L} \cdot \text{kg}^{-1}) = k_{\text{Respiratory}}/k_{\text{Elimination}} \quad (1)$$

Quando la concentrazione della specie chimica in un tessuto o campione specifico ($[\text{Substance}]_{\text{Organism}}$) raggiunge un valore costante (cioè stato stazionario: SS o plateau) dopo un'esposizione prolungata alla sostanza chimica, a causa dell'equilibrio tra i processi di assorbimento e di eliminazione, il BCF può essere misurato secondo l'equazione (2).

$$\text{BCF}_{\text{SS}} (\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}) = [\text{Substance}]_{\text{Organism}}/[\text{Substance}]_{\text{Water}} \quad (2)$$

Nell'equazione 2, $[\text{Substance}]_{\text{Organism}}$ è espresso come un rapporto "peso della sostanza"/"peso del campione umido" utilizzando come unità $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ppm) [ECHA, 2017] o $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [Arnot and Gobas 2006]; $[\text{Substance}]_{\text{Water}}$ è la concentrazione della specie chimica completamente disciolta in acqua (mezzo circostante) (escludendo le sostanze chimiche precipitate o adsorbite

nei sedimenti), alla quale l'organismo è esposto ed è espresso come rapporto "peso della sostanza"/"volume del mezzo" utilizzando come unità $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ppm) [ECHA, 2017] o $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [Arnot and Gobas 2006].

➤ **Bioaccumulation factor (BAF)**

A differenza del BCF, che richiede condizioni controllate ed esclude il contributo dell'assunzione tramite la dieta, il BAF esprime il bioaccumulo di una sostanza in un organismo attraverso tutte le possibili vie di esposizione, compresa la dieta, in cui l'assorbimento alimentare è regolato dalla costante cinetica k_{Dietary} . Pertanto, il BAF può essere definito secondo l'equazione (3) dove $[\text{Substance}]_{\text{Diet}}$, se nota in condizioni controllate, è la concentrazione della sostanza chimica studiata nella dieta, espressa in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

$$\text{BAF} (\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}) = (k_{\text{Respiratory}} + k_{\text{Dietary}} [\text{Substance}]_{\text{Diet}} / [\text{Substance}]_{\text{Water}}) / k_{\text{Elimination}} \quad (3)$$

Il BAF, dopo aver raggiunto uno stato stazionario, può essere inoltre misurato secondo l'equazione (4).

$$\text{BAF}_{\text{SS}} (\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}) = [\text{Substance}]_{\text{Organism}} / [\text{Substance}]_{\text{Water}} \quad (4)$$

In condizioni di laboratorio controllate, lo stato stazionario è raggiunto quando $[\text{Substance}]_{\text{Organism}}$ raggiunge un plateau senza ulteriori variazioni. Per gli esperimenti sul campo, si presume che lo stato stazionario sia raggiunto al momento del monitoraggio.

È importante osservare che, sebbene misurati con gli stessi elementi (vedi equazioni 2 e 4) il BAF e il BCF non possono essere determinati nello stesso esperimento poiché il BCF esclude l'assunzione alimentare delle sostanze chimiche studiate (cioè non considera l'apporto della sostanza tramite dieta, quindi gli organismi non sono alimentati con cibi contaminati) mentre il BAF considera l'assunzione alimentare sia che questa sia nota (in condizioni controllate) ($[\text{Substance}]_{\text{Diet}}$) che sconosciuta (nelle misurazioni sul campo).

Le differenze tra BCF e BAF sono concettualmente cruciali poiché questi due fattori potrebbero essere confusi l'uno con l'altro a causa del modo simile di determinarli quando si è in condizioni stazionarie [ECHA, 2017; Arnot and Gobas 2006; Mackay et al., 2013, 2018; Franklin, 2016].

➤ **Biota-sediment accumulation factor (BSAF)**

Il fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF), sebbene meno comune, è un altro potenziale di bioaccumulo misurabile anche sul campo. Questo descrittore esprime la relazione tra la concentrazione della sostanza in esame nell'organismo e la concentrazione della stessa sostanza nei sedimenti ($[Substance]_{Sediment}$) [Arnot and Gobas 2006]; il BSAF può essere determinato secondo l'equazione (5)

$$BSAF = [Substance]_{Organism} / [Substance]_{Sediment} \quad (5)$$

➤ **Biomagnification factor (BMF)**

Diverso dai processi di bioconcentrazione e bioaccumulo che coinvolgono un singolo tipo di tessuto o organismo, il processo di biomagnificazione si riferisce all'incremento di concentrazione di una sostanza chimica tossica lungo la catena alimentare, ad esempio, tra la preda e il suo predatore. Se la dieta del predatore è costituita da un solo tipo di preda, è possibile determinare BMF, sul campo o in condizioni controllate in laboratorio, secondo l'equazione (6), come rapporto tra la concentrazione di una sostanza nell'organismo predatore $[Substance]_{Predator}$ con quella trovata nella sua preda $[Substance]_{Prey}$ [Mackay et al., 2013].

$$BMF = [Substance]_{Predator} / [Substance]_{Prey} \quad (6)$$

Inoltre, considerando le definizioni di BAF e BCF di cui sopra, il BMF potrebbe essere valutato anche secondo l'equazione (7) [Mackay et al., 2013].

$$BMF = BAF_{Predator} / BAF_{Prey} \quad (7)$$

Se la dieta del predatore è variabile, il BMF può ancora essere calcolato in condizioni controllate allo stato stazionario [ECHA, 2017; Arnot and Gobas 2006]. Ad esempio, gli "dietary BMFs" possono essere determinati in esperimenti di laboratorio secondo l'equazione (8) ponendo l'organismo monitorato in acqua non contaminata ed esponendolo alla sostanza studiata unicamente attraverso la dieta dell'organismo [Franklin, 2016].

$$BMF = [Substance]_{Organism} / [Substance]_{Diet} \quad (8)$$

Al contrario, in regime alimentare variabile (comune in ambiente naturale), la determinazione

del BMF potrebbe essere più difficile e, in questi casi, l'uso del Trophic magnification factor (TMF) sarebbe più appropriato.

➤ **Trophic magnification factor (TMF)**

Mentre il BMF considera la biomagnificazione da un livello di una catena trofica al livello superiore successivo (vale a dire, specie contigue nella rete trofica), il TMF è utilizzato per identificare il processo di biomagnificazione su un'intera catena alimentare o parte di essa [Arnot and Gobas 2006]. In particolare, i TMFs empirici sono dedotti dalle misurazioni in campo, rappresentano una media ponderata dei BMFs su diversi livelli trofici [Franklin, 2016] e possono essere determinati dalla pendenza del $\log_{10} [\text{Substance}]_{\text{Organism } n}$ vs. la posizione (n) dell'organismo nella catena trofica o calcolati secondo l'equazione (9) [Conder et al., 2008; Mackay et al., 2018].

$$\text{Log}_{10} \text{TMF} = (\log_{10}[\text{Substance}]_{\text{Organism } n} - \log_{10}[\text{Substance}]_{\text{Organism } 1}) / (n - 1) \quad (9)$$

L'elaborazione di tutti i fattori di cui sopra può essere influenzata dalla scelta di utilizzo di peso secco o umido dei campioni di organismi/tessuti che è stata effettuata nella determinazione delle concentrazioni delle sostanze di interesse. Inoltre, dovrebbe essere presa in considerazione la tendenza delle sostanze chimiche organiche ad accumularsi nei tessuti lipidici o proteici mediante la normalizzazione lipidica/proteica [Franklin, 2016]. Nel caso dei PFAS, considerate sostanze proteinofile, la normalizzazione proteica può essere effettuata dividendo la concentrazione chimica per la percentuale proteica dell'animale o dell'organo in esame [Weisbrod et al., 2009; Franklin, 2016].

In generale, l'utilizzo opportuno dei descrittori di bioaccumulo di cui sopra, se si riscontrano concentrazioni significative di una sostanza chimica nel biota in aree remote, può essere molto utile per valutare la persistenza della sostanza, in particolare per le indagini relative ad eventuali trasporti a lunga distanza.

In questo contesto, una sostanza soddisfa il criterio di bioaccumulo quando il BCF o il BAF nelle specie acquatiche è superiore a 2000 ($\log_{10} \text{BAF}$ o $\log_{10} \text{BCF} > 3.3$) ed è considerata "molto bioaccumulabile" quando il BCF o il BAF supera 5000 ($\log_{10} \text{BAF}$ o $\log_{10} \text{BCF} > 3.7$). D'altro canto, per quanto riguarda il BMF o il TMF, i valori superiori a 1 sono considerati significativamente elevati [ECHA, 2017].

4.1.3 Dati di bioaccumulo

Molti studi hanno dimostrato che in ambienti fortemente antropizzati i descrittori empirici sopra citati soddisfano i criteri che definiscono i PFCs come sostanze bioaccumulabili [Burkhard, 2021; Wang et al., 2019], sebbene per alcune sostanze specifiche come il PFOA, i valori di BCF e BAF non siano sempre superiori alla soglia di bioaccumulo [ECHA, 2017].

Poiché un qualsiasi fattore di bioaccumulo è determinato in base allo specifico organismo/tessuto considerato dallo studio e può essere valutato in diverse aree geografiche, è importante analizzare i dati provenienti da diversi studi per definire il potenziale di bioaccumulo reale di una specifica sostanza organica poli- perfluorurata.

Per questi motivi, nei paragrafi seguenti, gli studi di bioaccumulo sono raggruppati in base alle condizioni di monitoraggio come studi condotti in ambiente naturale o in condizioni sperimentali controllate.

4.1.3.1 Bioaccumulo in ambiente naturale

I potenziali di bioaccumulo dei PFCs dipendono dalle loro proprietà fisico-chimiche (ad esempio se sono strutturalmente ramificati, lineari e/o diversamente funzionalizzati) che determinano quindi affinità diverse per tessuti e organismi.

➤ Bioaccumulo nella flora acquatica

A dispetto dell'elevato potenziale di bioaccumulo dei PFCs e della natura sedentaria/stanziale degli organismi vegetali (che ne fanno ottimi modelli di studio), esistono solo pochi lavori sul bioaccumulo dei PFC che riguardano la micro- o macroflora acquatica. In uno di questi studi, condotto nel Mare di Xiamen, il BFC calcolato per le alghe kelp (*Thallus laminariae*) era nel range di 2900-4600 L·kg⁻¹ per i PFOS e 6700-14300 L·kg⁻¹ per il PFOA. Per quest'ultimo, il BCF calcolato era superiore a quello della fauna proveniente dalla stessa area di indagine [Dai & Zeng 2019]. Al contrario, valori di BFC inferiori (circa 1000 L·kg⁻¹) sono stati trovati nelle alghe bentoniche dei fiumi del Michigan (Stati Uniti) [Kannan et al., 2005]. Infine, sono stati calcolati valori elevati di BAF per alcune piante galleggianti nel lago Baiyangdian [Shi et al., 2012]. In particolare, i log₁₀BAF per PFOS, PFOA, PFNA e acido perfluorodecanoico (PFDA) erano rispettivamente 3.0-4.1, 1.9-3.7, 2.9-4.4 e 3.2-4.2 [Shi et al., 2012]. I valori dei fattori di bioaccumulo degli studi di cui sopra sono simili (se non superiori) a quelli calcolati per la fauna acquatica (vedi sotto) suggerendo che la flora acquatica potrebbe offrire ottimi modelli di biomonitoraggio che dovrebbero quindi essere ulteriormente utilizzati e studiati. Tuttavia, considerando che fattori come BMF e TMF non possono essere investigati solo su questi

organismi vegetali l'approccio comparativo e simultaneo di flora e fauna risulterebbe essere quello più opportuno poiché potenzialmente più esaustivo.

➤ **Bioaccumulo nella fauna acquatica**

In generale, nel biota acquatico, i PFCs a catena lunga hanno un potenziale di bioaccumulo più elevato di quelli a catena corta. Tale fenomeno è stato osservato in alcune specie ittiche del lago di Asan (Corea del Sud) dove PFDA e PFOS hanno mostrato un valore di BAF di $\log_{10} > 3.0$ [Lee et al., 2020] rispetto ad altri PFCs a catena più corta che hanno mostrato un potenziale di bioaccumulo minore.

Allo stesso modo, nel Mare di Xiamen, i BCF calcolati per organismi appartenenti a diversi livelli trofici erano in un range che andava da 3300-8000 $L \cdot kg^{-1}$ (per il PFOS) a 6400-9700 $L \cdot kg$ (per il PFOA) [Dai & Zeng, 2019].

Elevati valori di BAF sono stati determinati anche nella carpa selvatica *Carassius carassius* pescata nel fiume Yubei (Cina), con valori medi \log_{10} BAF di 3.06 (nel muscolo) e 4.14 (nel sangue) per il p-perfluorononenoxybenzenesulfonato (OBS), simili ai valori \log_{10} BAF registrati per i PFOS nella stessa specie [Shi et al., 2020].

Tuttavia, al fine di comprendere ed esplorare nel modo più completo possibile lo status di inquinamento da PFAS e le loro caratteristiche di bioaccumulo in un dato ambiente è auspicabile indagare quante più matrici possibili. Un esempio di tale ricerca riguarda un recente studio condotto nella zona costiera della baia di Jiaozhou (Cina) nel quale sono stati analizzati 19 diversi PFAS in acqua di mare, sedimenti, e biota (*Ruditapes philippinarum*) [Cui et al., 2019]. Grazie a questa analisi è stato determinato sia un intervallo \log_{10} BAF di 2.53-4.32 sia un intervallo \log_{10} BSAF di 1.30-2.50 che hanno permesso di notare che questi fattori di bioaccumulo erano correlati con il numero di atomi di carbonio presenti nelle catene dei diversi PFAS. In particolare, i valori di \log_{10} BAF aumentavano all'aumentare della lunghezza della catena carboniosa, mentre i valori \log_{10} BSAF al diminuire della catena di carbonio (fino a C₈) [Cui et al., 2019] poiché i PFAS a catena più lunga hanno una maggiore affinità per i sedimenti. Questi potenziali di bioaccumulo relativamente elevati, sono stati registrati anche in aree lontane ed apparentemente incontaminate; ad esempio, nell'ecosistema antartico è stato osservato un trasferimento trofico di PFAS a catena lunga per biomagnificazione ecologica.

Infatti, i valori di BMF di acido perfluorobutanoico (PFBA), acido perfluoroeptanoico (PFHPA), PFHXS e PFOS tra Archaeogastropoda e Neogastropoda nel range: 0.7 e 3.3 indicavano che i PFAS a catena corta non vengono facilmente bioamplificati lungo la catena alimentare [Gao et al., 2020].

I fenomeni di biomagnificazione sono stati valutati anche nell'estuario della Gironda (Francia) sulla base delle concentrazioni di PFCs riscontrate nei mysidi e nei copepodi con BMF > 1 per PFOS, perfluorooctanesulfonamide (FOSA) e acidi carbossilici perfluorinati a catena lunga (PFCAs) [Munoz et al., 2019]. Allo stesso modo valori di TMF > 1 sono stati riscontrati in ambiente fluviale urbano (Orge, Francia) dove sono stati presi in considerazione diversi PFC: C₉-C₁₄ PFCA, C₇-C₁₀ PFSA e diversi PFAS come i fluorotelomeri solfonati 8:2 e 10:2 [Simonnet-Laprade et al., 2019].

4.1.3.2 Bioaccumulo in condizioni sperimentali controllate

Gli studi condotti in condizioni controllate sono di fondamentale importanza per capire quali sostanze, in quanto tempo e a quale concentrazione si bioaccumulano e per comprendere le differenze di tra specie e tessuti diversi.

Ad esempio, in recenti ricerche, alcuni pesci bentonici (*Pseudogobius sp.*) sono stati alimentati per tre settimane con prede contaminate da PFOA, PFOS o ammonio 2,3,3,3-tetrafluoro-2-(eptafuoropropossi)-propanoato di ammonio (GenX). Dopo un periodo di purificazione di 42 giorni, è stato osservato che l'assimilazione di PFOA è stata bassa (22%) corrispondente a un BMF basso di 0.021. Al contrario, il PFOS ha mostrato un tasso di assimilazione molto più elevato (del 60%) con BMF pari a 0.346, mentre il GenX non si è accumulato nei pesci durante l'esposizione [Hassell et al., 2020].

Nel pesce zebra (*Danio rerio*) esposto a 10 µg·L⁻¹ di acido perfluorottanoico radiomarcato (¹⁴C-PFOA), è stato osservato un BCF compreso tra 20 e 30 [Ulhaq et al., 2015].

Invece negli embrioni di zebrafish esposti a tre diverse concentrazioni di tre PFAS, sono stati determinati i seguenti range di BCF: 113-193 per PFOS, 125-358 per F-53B e 20-48 per OBS; inoltre, questi fenomeni di accumulo sono stati messi in relazione con diversi livelli anomalie dello sviluppo che saranno discussi nei prossimi paragrafi [Tu et al., 2019].

Come accennato, differenze tra i valori di BCF dipendono dal tipo di PFAS studiato, ad esempio, negli anfibi (*Rana pipiens*, *Anaxyrus americanus* e *Ambystoma tigrinum*) è stato osservato un intervallo di BCF per il PFOS (47-259) superiore a quello registrato per il PFOA (0.46-2.5) [Abercrombie et al., 2019].

Analogamente, nei girini di *R. pipiens* esposti per 40 giorni a tre diverse concentrazioni di PFOS, PFHXS, PFOA e 6:2 fluorotelomero solfonato (6:2 FTS), il valore di BCF maggiore è stato raggiunto dal PFOS ed era compreso tra 19.6 e 119.3, mentre altri PFAS avevano BCF < 1.0 [Hoover et al., 2017]. Una tendenza analoga è stata osservata anche per il BAF e il BSAF, calcolati di recente sulle larve di *R. pipiens*, in cui il PFOS si bioaccumulava a un tasso

superiore al PFOA e in cui il BSAF era inferiore di due ordini di grandezza rispetto al BAF [Flynn et al., 2021]. Un valore di potenziale di bioaccumulo ancora più elevato è stato osservato in *Holothuria tubulosa* esposta a 6 PFAS ad una concentrazione di 1 ppm, dove il \log_{10} BAF variava da 0.45 (per l'acido perfluorobutanico (PFBuA) a 5.52 (per i PFOS) nelle gonadi e da 1.11 (per i PFBuA) a 5.54 (per i PFOS) nell'intestino; invece, il \log_{10} BSAF variava da 1.1 (per PFOA) a 2.28 (per PFOS) nelle gonadi e da 0.87 (per PFOS) a 3.56 (per PFOA) nell'intestino [Martín et al., 2019]. Come suggerito da diversi protocolli, in genere, i tempi di esposizione sono di circa 28 giorni o fino al raggiungimento dello stato stazionario, tuttavia, questa condizione varia a seconda del tasso di eliminazione ed emivita della sostanza chimica in questione.

Poiché l'assorbimento dei PFAS può essere raggiunto tra 22 e 38 giorni, diversi organismi possono accumulare questi inquinanti negli ambienti naturali dove periodi di esposizione maggiori (sebbene a concentrazioni solitamente inferiori rispetto a quelle utilizzate negli esperimenti di laboratorio) creano con maggiore probabilità fenomeni di biomagnificazione (oltre che effetti sulla salute legati a tossicità cronica).

Infatti, come è possibile notare da studi precedenti, i valori dei potenziali di bioaccumulo calcolati per gli studi in campo sono generalmente più elevati di quelli ottenuti in condizioni controllate. I fattori quali il tempo e la concentrazione di esposizione, favoriscono i processi di assorbimento dei contaminanti negli organismi per i quali hanno una maggiore affinità rispetto all'acqua. In questo modo gli organismi sarebbero in grado di tollerare il crescente bioaccumulo dell'inquinante, senza raggiungere definitivamente lo stato stazionario a causa del sistema aperto in cui vivono.

Tuttavia, gli esperimenti di laboratorio, se integrati con approcci biomolecolari, potrebbero fornire informazioni chiare ed esaustive su queste minacce ambientali emergenti. Ad esempio, recenti studi di tossicologia predittiva basati su metodi computazionali innovativi hanno valutato le differenze tra alcune specie nell'affinità di legame tra i PFAS e la proteina di legame degli acidi grassi del fegato (LFABP) nella ricerca di meccanismi di bioaccumulo di PFAS simili per gli organismi studiati. La valutazione ha dimostrato che la trota iridea, gli esseri umani, i ratti e i polli hanno affinità di legame simili per ciascun PFAS, mentre i pesci medaka hanno un'affinità di legame significativamente più debole per alcuni PFAS [Cheng et al., 2021b]. Per la valutazione dei potenziali di bioaccumulo risulta quindi necessario combinare diversi tipi di esperimenti ed approcci e, in questo contesto, le analisi di dinamica molecolare attraverso l'utilizzo di strumenti computazionali, possono essere utili per simulare o sostenere studi in cui il campionamento di specie rare o in via di estinzione sarebbe difficile.

4.1.4 Biomonitoraggio nel biota acquatico

➤ Biomonitoraggio della flora

Come accennato per i descrittori di bioaccumulo, rispetto al numero di studi sulla presenza dei PFCs nella fauna (vedi il punto successivo), i dati sul biomonitoraggio relativi alla flora acquatica sono di numero esiguo. Uno di questi è stato condotto nei fiumi del Michigan e ha dimostrato che le alghe bentoniche avevano concentrazioni di PFOS, FOSA, PFOA e acido perfluorohexanesulfonico (PFHS) rispettivamente di: 2.6-3.1, < 1, < 0.2 e < 2 ng·g⁻¹ [Kannan et al., 2005]. Diversamente, nell'area del Mare di Xiamen, gli studi sulle alghe kelp (*Thallus laminariae*) hanno mostrato concentrazioni di 1.64-4.36 ng·g⁻¹ per il PFOA e 1.42-3.58 per il PFOS, mentre la somma delle concentrazioni di tutti i PFAS investigati ([PFAS]_{TOT}) variavano tra 8.15 e 12.98 ng·g⁻¹ [Dai and Zeng 2019]. Infine, nelle piante galleggianti *Ceratophyllum demersum* L., *Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer e *Salvinia natans* raccolte nel lago Baiyangdian (Cina) sono stati registrati alti livelli di concentrazione di PFCs totali (valore di mediana: 19.2 ng·g⁻¹) con una prevalenza di PFOA (valore massimo di 10.4 ng·g⁻¹) e PFNA (valore massimo di 20.1 ng·g⁻¹) seguito da PFDA, PFOS e acido perfluoropentanoico (PFPeA), mentre non sono stati rilevati PFHpA, acido perfluorobutanesulfonico (PFBS), PFHxS [Shi et al., 2012].

➤ Biomonitoraggio della fauna

Gli organismi acquatici che vivono in ambienti contaminati (naturali o artificiali) tendono ad accumulare l'inquinante in misura maggiore rispetto all'acqua in cui vivono e, in particolare, i PFAS in un organismo acquatico possono essere trasferiti dall'acqua contaminata, dal cibo o dal sedimento in sospensione [Lee et al., 2020]. Come già accennato, sebbene la biodistribuzione dei PFAS dipenda dalla molecola e dal diverso tessuto e specie, uno dei fattori comuni che svolge un ruolo importante nella contaminazione del biota è l'area di origine geografica degli organismi analizzati. È noto che i livelli di contaminazione da PFAS negli organismi catturati in acque soggette ad inquinamento antropico sono generalmente superiori alle concentrazioni rilevate negli organismi che vivono negli oceani [Berger et al., 2009; Schuetze et al., 2010; Guo et al., 2019]. Questa correlazione emerge in diversi casi: ad esempio in un'importante zona di molluschicoltura del Mare di Bohai (Cina), dove la contaminazione da PFAS è stata verificata in diverse specie di molluschi campionati nei vari allevamenti, con livelli di contaminazione maggiori nei campioni prelevati in prossimità degli spot di attività industriale [Guo et al., 2019b].

In generale le concentrazioni riscontrate nelle matrici organiche sono maggiori rispetto a quelle

rilevate nelle matrici ambientali (es. acqua). Ad esempio, nella stessa zona di campionamento situata nel Mar Cantabrico (Spagna settentrionale), ed in particolare nei pressi di porti e acque reflue, sono stati riscontrati livelli di concentrazione totali di PFAS molto inferiori nell'acqua di mare (da 0.06 a 10.9 ng·L⁻¹) rispetto ai sedimenti (0.01-0.13 ng·g⁻¹) e ai mitili (0.01-0.06 ng·g⁻¹) [Gómez et al., 2011].

Analogamente, nel fiume Orge (Francia), i valori di [PFAS]_{TOT} nell'acqua di mare (73 ng·L⁻¹) e nei sedimenti (8.4 ng·g⁻¹) erano molto inferiori rispetto a quelli trovati nei pesci (*Leuciscus cephalus*) che variavano da 43.1 a 4997.2 ng·g⁻¹; con un valore massimo log₁₀ BAF in L·kg⁻¹ registrato per l'acido perfluorododecanoico (PFDoA) nell'ordine seguente: plasma (6.7), fegato (5.7), branchie (5.7), gonadi (5.5) e muscoli (5.0) [Labadie et al., 2011].

Allo stesso modo, in un altro studio condotto in prossimità di una zona di acque reflue nel lago Tana (Etiopia), è stato osservato che le medie di [PFAS]_{TOT} erano di 2.9 ng·L⁻¹ per le acque superficiali, di 0.30 ng·g⁻¹ per i sedimenti superficiali e di 1.2 ng·g⁻¹ per tutte le specie ittiche [Ahrens et al., 2016]. Una tendenza analoga è stata osservata in Vietnam, dove il livello di [PFAS]_{TOT} in acqua (vicino ad un canale di scarico) era di 107 ng·L⁻¹. Questo rappresenta il massimo [PFAS]_{TOT} registrato per l'acqua in questi tipi di ricerca; tuttavia, resta sempre di tre ordini di grandezza inferiore a [PFAS]_{TOT} nei campioni biologici [Lam et al., 2017].

In altro caso studio, condotto nella costa della baia di Jiaozhou (Cina), le analisi di 35 PFAS effettuate in acqua di mare, sedimenti e animali (*Ruditapes philippinarum*) hanno mostrato, rispettivamente, il seguente intervallo di concentrazione: 21.1-38.0 ng·L⁻¹, 0.459-1.20 g·kg⁻¹ e 15.5-27.5 g·kg⁻¹ [Cui et al., 2019].

Inoltre, come accennato in precedenza, in base al tipo di campione analizzato, esistono differenze significative tra i livelli di PFAS e tra i profili di contaminazione rilevati. Ad esempio, nel lago Baiyangdian (Cina) il PFC più abbondante nell'acqua era il PFOA (1.70-73.5 ng·L⁻¹), mentre nei sedimenti e negli animali acquatici era il PFOS il quale è stato rilevato rispettivamente per queste matrici negli intervalli di concentrazione di 0.06-0.64 ng·g⁻¹ e 0.57-13.7 ng·g⁻¹ [Lee et al., 2020].

Differenze significative sono state rilevate anche tra specie selvatiche ed allevate. Ad esempio, i livelli di PFAS registrati nella spigola selvatica *Dicentrarchus labrax* erano più elevati (PFOS: 112-12405 ng·kg⁻¹; PFOA: 9-487 ng·kg⁻¹) di quelli riscontrati nei pesci allevati della stessa specie [Barbarossa et al., 2016]. È interessante notare che, tra le spigole d'allevamento, i pesci allevati intensivamente presentavano valori PFAS inferiori (PFOS: 11-105 ng·kg⁻¹; PFOA: 9-51 ng·kg⁻¹) rispetto a quelli allevati in maniera estensiva [Barbarossa et al., 2016]. Questi risultati inattesi sono stati osservati anche in uno studio condotto su 246 pesci e frutti di mare raccolti in

vari ambienti acquatici dei Paesi Bassi, dove il livello di [PFAS]_{TOT} più elevato è stato osservato nelle anguille (43.6 ng·g⁻¹) seguito da gamberetti (6.7 ng·g⁻¹), pesci marini selvatici (spigole) (4.5 ng·g⁻¹) e pesci d'allevamento (trota, pesce gatto, rombo, salmone, tilapia, pangasio) (0.06 ng·g⁻¹) [Zafeiraki et al., 2019a].

Questi studi concordano con altri nei quali specie ittiche d'allevamento hanno mostrato una minore contaminazione da PFAS rispetto a pesci selvatici d'acqua dolce o marina [Koponen et al., 2015; Brambilla et al., 2015; Mwakalapa et al., 2018].

La ragione di tali tendenze di contaminazione, che sembra contrastare l'idea di quanto ci si possa aspettare (ossia che specie selvatiche siano meno contaminate delle rispettive di allevamento), potrebbe risiedere nel processo di trasporto di inquinanti (attraverso o meno vettori di contaminazione) tramite correnti oceaniche o mediante fonti di inquinamento non individuate. Questi fenomeni di trasporto possono causare un maggiore inquinamento nelle aree più lontane rispetto a quelle più vicine alle attività industriali. Ad esempio, nell'ecosistema antartico sono stati riscontrati livelli significativi di [PFAS]_{TOT} (4.97 ± 1.17 ng·g⁻¹) in alcuni organismi (Neogastropoda) [Gao et al., 2020].

Coerentemente con quanto precedentemente riferito, per una valutazione completa dello stato di contaminazione di un'area, è necessario analizzare il contenuto dell'inquinante in qualsiasi organismo e comparto ambiente dell'area e acquisire tutte le informazioni utili sull'ecosistema (componenti biotiche e abiotiche). Tuttavia, poiché tutte le opportune indagini potrebbero risultare difficili (se non impossibili) da condurre durante gli screening di monitoraggio in ambiente selvatico, la ricerca dovrebbe concentrarsi su una o più specie che siano ideali bioindicatori specifici della/e sostanze oggetto di indagine. Come già accennato, quest'ultimo dovrebbe rispondere a determinate caratteristiche ed in sintesi dovrebbe essere capace di bioaccumulare in misura maggiore di altri organismi presenti nell'area l'inquinante o la classe di sostanze ricercate [Zhou et al., 2008; Parmar et al., 2016].

In questo modo, anche se generalmente si riscontrano valori di contaminazione più elevati negli organismi che vivono nelle aree caratterizzate da attività antropica, alcune specie bioaccumulano più di altre ad esempio perché l'inquinante vi entra più facilmente per l'assimilazione diretta (ad esempio, organismi filtratori) [Catherine et al., 2019] o per l'assimilazione indiretta (come nei fenomeni di biomagnificazione dove livelli di contaminazione maggiore si riscontrano nelle specie che si trovano al vertice della catena alimentare, ad es. top predator). Di conseguenza, se non viene correttamente scelto l'organismo da analizzare, può verificarsi una sottostima dell'inquinamento perché si prendono in considerazione specie che accumulano diversamente l'inquinante. Per questo motivo, per la

valutazione di uno stesso inquinante, sarebbe auspicabile utilizzare la stessa specie al fine di confrontare correttamente lo stato di inquinamento di siti diversi, unitamente a ciò dovrebbero essere registrati tutti quei parametri ambientali fisico-chimici che potrebbero giustificare o influenzare differenti livelli di accumulo.

In ogni caso, qualsiasi esso sia il bioindicatore preso in considerazione per valutare la contaminazione di PFAS, questo fornisce di per sé già molte informazioni sulla qualità di un ambiente e, le concentrazioni riscontrate nei suoi tessuti riflettono (anche se con valori molto più elevati) i livelli di contaminazione ambientale [Nakayama et al., 2019].

In questo contesto, al fine di fornire un'idea dei livelli di concentrazione fino ad ora acquisiti dai dati di biomonitoraggio, viene riportata una panoramica dei valori di [PFAS]_{TOT} riscontrati in vari organismi acquatici campionati in diversi paesi del mondo Tabella 2.

Tabella 2. Numero di PFCs (PFAS) monitorati e loro concentrazione totale in funzione delle specie studiate in diverse ambienti selvatici del mondo.

Fish	Location in wild	Samples analysed	¹[PFAS]_{TOT} (ng·g⁻¹)	Ref.
Red seabream (<i>Pagrus major</i>)	China Seawater	Muscle	Σ9 PFAS: 0.04-2.14	[Gao et al., 2020]
Chameleon goby (<i>Tridentiger trigonocephalus</i>)	China Seawater	Muscle	Σ6 PFAS: 10.97-12.93	[Dai & Zeng, 2019]
Baltic cod (<i>Gadus morhua</i>)	Baltic Sea Seawater	Liver	Σ28 PFAS: 6.03-23.9	[Schultes et al., 2020]
Shortfin mako shark (<i>Isurus oxyrinchus</i>)	Greece Seawater	Muscle, Gills, Heart	Σ15 PFAS: 3.2-10.3	[Zafeiraki et al., 2019b]
Angular roughshark (<i>Oxynotus centrina</i>)	Greece Seawater	Muscle, Liver	Σ15 PFAS: 17.9-85.1	[Zafeiraki et al., 2019b]
Giant devil ray (<i>Mobula mobular</i>)	Greece Seawater	Muscle, Gills	Σ15 PFAS: 1.5-4.4	[Zafeiraki et al., 2019b]
Smalltooth sand tiger (<i>Odontaspisferox</i>)	Greece Seawater	Gills, Liver	Σ15 PFAS: 62.2-65.4	[Zafeiraki et al., 2019b]
Bigeye thresher (<i>Alopias superciliosus</i>)	Greece Seawater	Muscle, Gills, Liver, Heart	Σ15 PFAS: 3.1-48.1	[Zafeiraki et al., 2019b]
Sharpnose sevengills shark (<i>Heptranchias perlo</i>)	Greece Seawater	Muscle, Gills, Liver, Gonad, Heart	Σ15 PFAS: < LOQ-35	[Zafeiraki et al., 2019b]

Bluntnose sixgills shark (<i>Hexanchus griseus</i>)	Greece Seawater	Muscle, Gills, Liver, Gonad, Heart	Σ15 PFAS: 1.1-66.3	[Zafeiraki et al., 2019b]
Blue shark (<i>Prionace glauca</i>)	Greece Seawater	Muscle, Gills, Liver, Heart	Σ15 PFAS: 0.3-15.5	[Zafeiraki et al., 2019b]
Atlantic croaker (<i>Micropogonias undulatus</i>)	South Caro- lina Seawater	Whole fish	Σ11 PFAS: 15.2-21.3	[Fair et al., 2019]
Red drum (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	South Caro- lina Seawater	Whole fish	Σ11 PFAS: 11.3-66.1	[Fair et al., 2019]
Spot (<i>Leiostomus xanthurus</i>)	South Caro- lina Seawater	Whole fish	Σ11 PFAS: 14.7-67.8	[Fair et al., 2019]
Spotted seatrout (<i>Cynoscion nebulosus</i>)	South Caro- lina Seawater	Whole fish	Σ11 PFAS: 17.3-85.4	[Fair et al., 2019]
Striped mullet (<i>Mugil cephalus</i>)	South Caro- lina Seawater	Whole fish	Σ11 PFAS: 6.2-20.7	[Fair et al., 2019]
Yellow croaker (<i>Larimichthys polyactis</i>)	China Freshwater	Liver, Muscle	Σ8 PFAS: 8.99-87.9	[He et al., 2015]
Mandarin fish (<i>Siniperca chuatsi</i>)	China Freshwater	Liver, Mus- cle, Eggs	Σ8 PFAS: 3.02-51.2	[He et al., 2015]
Crucian Carp (<i>Carassius carassius</i>)	China Freshwater	Muscle	Σ8 PFAS: 3.15-4.09	[He et al., 2015]
Crucian Carp (<i>Carassius carassius</i>)	South Korea Freshwater	Muscle	Σ19 PFAS: 17.6 ± 10.0	[Cui et al., 2019]
Common Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	South Korea Freshwater	Muscle	Σ19 PFAS: 50.6 ± 71.6	[Cui et al., 2019]
Grass carp (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	China Freshwater	Muscle	Σ6 PFAS: 8.87-10.66	[Dai & Zeng, 2019]
Barbel steed <i>Hemibarbus labeo</i>	South Korea Freshwater	Muscle	Σ19 PFAS 16.7 ± 2.7	[Cui et al., 2019]
Bass (<i>Micropterus salmoides</i>)	South Korea Freshwater	Muscle	Σ19 PFAS: 40.3 ± 13.7	[Cui et al., 2019]
Bass (<i>Micropterus salmoides</i>)	China Freshwater	Muscle	Σ8 PFAS: 3.02	[He et al., 2015]
Bluegill	South Korea	Muscle	Σ19 PFAS:	[Cui et al., 2019]

<i>(Lepomis macrochirus)</i>	Freshwater		32.4 ± 11.0		
Skygager <i>(Chanodichthys dabryi)</i>	South Korea Freshwater	Muscle	Σ19 PFAS: 30.5 ± 25.3	[Cui et al., 2019]	
Tilapia <i>(Oreochrommic niloticus)</i>	Vietnam Freshwater	Liver, Muscle	Σ13 PFAS: 0.5-10.6	[Lam et al., 2017]	
Stripped snakehead <i>(Chana striata)</i>	Vietnam Freshwater	Liver, Muscle	Σ13 PFAS: 0.18-1.01	[Lam et al., 2017]	
Dusky sleeper <i>(Eleotris fusca)</i>	Vietnam Freshwater	Whole body	Σ13 PFAS: 0.92	[Lam et al., 2017]	
Shark catfish <i>(Pangasius elongatus)</i>	Vietnam Freshwater	Whole body	Σ13 PFAS: 0.3	[Lam et al., 2017]	
Flying barb <i>(Esomus danricus)</i>	Vietnam Freshwater	Whole body	Σ13 PFAS: 0.91	[Lam et al., 2017]	
Ninespine stickleback <i>(Pungitius pungitius)</i>	Alaska Freshwater	Whole body	Σ31 PFAS: 3.66-15.6	[Zheng et al., 2020]	
European eel <i>(Anguilla anguilla)</i>	Netherlands Freshwater	Muscle	Σ16 PFAS: 4.7-172	[Zafeiraki, et al., 2019a]	
Crustacea					
Ghost crab <i>(Ocytopode stimpsoni)</i>	China Seawater	Soft tissues	Σ6 PFAS: 7.8-10.47	[Dai & Zeng, 2019]	
Hermit crab <i>(Clibanarius infraspinatus)</i>	China Seawater	Soft tissues	Σ6 PFAS: 7.73-8.06	[Dai & Zeng, 2019]	
Asian paddle crab <i>(Charybdis japonica)</i>	Vietnam Freshwater	Soft tissues	Σ13 PFAS: 0.61	[Lam et al., 2017]	
Giant prawn <i>(Macrobrachium rosenbergii)</i>	Vietnam Freshwater	Soft tissues	Σ13 PFAS: 0.24-0.58	[Lam et al., 2017]	
Shrimp <i>(Palaemon longirostris)</i>	France Estuarine areas	Whole body	Σ22 PFAS: 4.5 ± 1.2	[Munoz et al., 2019]	
Brown shrimp <i>(Crangon crangon)</i>	France Estuarine areas	Whole body	Σ22 PFAS: 11 ± 2	[Munoz et al., 2019]	
Mysid shrimps <i>(Mysidacea, ind.)</i>	France Estuarine areas	Whole body	Σ22 PFAS: 7.2 ± 2.0	[Munoz et al., 2019]	
Copepods	France	Whole body	Σ22 PFAS:	[Munoz et al.,	

<i>(Copepoda, ind.)</i>	Estuarine areas		2.9 ± 0.8	2019]
Zooplankton <i>(Copepoda, Cladocera)</i>	Italy Freshwater	Whole body	Σ12 PFAS: 7.6	[Pascariello et al., 2019]
Mollusca				
Shellfish <i>(Ruditapes philippinarum)</i>	China Seawater	Soft tissues	Σ19 PFAS: 15.5-27.5	[Cui et al., 2019]
Oyster <i>(Cassostrea gigas)</i>	China Seawater	Soft tissues	Σ6 PFAS: 12.45-12.76	[Dai & Zeng, 2019]
Quagga mussels <i>(Dreissena bugensis)</i>	Belgium Freshwater	Soft tissues	Σ15 PFAS: 21.88	[Teunen et al., 2021]
Asian clam <i>(Corbicula fuminea)</i>	Belgium Freshwater	Soft tissues	Σ15 PFAS: 20.79	[Teunen et al., 2021]
Golden clam <i>(Corbicula fluminea)</i>	Vietnam Freshwater	Soft tissues	Σ13 PFAS: 0.73	[Lam et al., 2017]
Golden apple snail <i>(Pomacea canaliculata)</i>	Vietnam Freshwater	Soft tissues	Σ13 PFAS: 0.22-0.6	[Lam et al., 2017]
Mammalian				
Killer whales <i>(Orcinus orca)</i>	Greenland Seawater	liver	Σ36 PFAS: 614 ± 49	[Spaan et al., 2020]
Harbor seals <i>(Phoca vitulina)</i>	Sweden Seawater	liver	Σ36 PFAS: 640 ± 51	[Spaan et al., 2020]
Ringed seals <i>(Phoca hispida)</i>	Sweden Seawater	liver	Σ36 PFAS: 536 ± 43	[Spaan et al., 2020]

¹Valori (ng·g⁻¹) riferiti alla concentrazione totale di PFAS espressa come media, media ± deviazione standard o range di concentrazione min-max. Il simbolo Σ precede il numero di PFAS che contribuisce alla concentrazione totale.

I livelli di concentrazione dei PFAS sono correlati in modo variabile nei diversi tessuti, sia in base all'affinità dei singoli PFAS per le diverse matrici sia a causa dei vari meccanismi fisiologici intra- e interspecifici di assorbimento ed eliminazione dell'inquinante.

Su queste basi, i valori dei fattori di bioaccumulo fornirebbero una più profonda comprensione dell'affinità di un dato PFC verso tessuti specifici. Tuttavia, non tutti gli studi di biomonitoraggio di cui sopra contengono questo tipo di informazioni. Di conseguenza vengono di seguito riportati e discussi i valori dei potenziali di bioaccumulo in funzione del tipo di tessuto/organismo analizzato.

Ad esempio, nel muscolo di alcune carpe catturate in ambienti d'acqua dolce dello Xiamen sono stati registrati valori di BFC compresi tra 8160 e 9680 L·kg⁻¹ per il PFOA e tra 6430 e 7960 L·kg⁻¹ per il PFOS [Dai and Zeng, 2019]. D'altro canto, nello stesso lavoro, in ambiente marino, i tessuti molli del granchio *Ocypode stimpsoni* presentavano un BCF di 6490-7440 L·kg⁻¹ per PFOA e 3270-4240 L·kg⁻¹ per PFOS, mentre nei tessuti molli dell'ostrica *Ostrea gigas* i BCF variavano tra 6410-9680 (PFOA) e 4180-6430 L·kg⁻¹ (PFOS) [Dai and Zeng, 2019].

Nella baia di Jiaozhou (Cina) i tessuti molli della vongola (*Ruditapes philippinarum*) hanno mostrato log₁₀BAF compresi tra 2.53-4.32 L·kg⁻¹ per tutti i 19 tipi di PFAS rilevati con valori positivamente correlati alla lunghezza della catena di carbonio (C₈-C₁₃) [Cui et al., 2019]. Al contrario, sono stati osservati elevati valori di log₁₀BAF per piccoli crostacei (mysidi e copepodi) in un'area zona di estuario francese. In particolare, l'analisi condotta sull'intero corpo degli individui, ha mostrato che il valore maggiore è stato rilevato per L-FOSA (4.1 per i copepodi e 4.9 L·kg⁻¹ per i mysidi). Tali risulti confermano che i PFC costituiscono una grande minaccia per gli ecosistemi a causa del loro potenziale di bioaccumulo (e biomagnificazione) anche nei piccoli organismi che costituiscono la base della catena alimentare [Munoz et al., 2019]. Invece, in uno screening di biomonitoraggio condotto su diversi organismi acquatici e tessuti in Vietnam, è stato scoperto che in sette specie di pesci i valori di BCF erano sempre più elevati nel fegato (valore massimo di BCF trovato in tilapia per l'acido enoicosafluoroundecanoico (PFUnDA) di 142764 L·kg⁻¹ seguito da PFDA di 22953 L·kg⁻¹, PFDoA di 7729 L·kg⁻¹ e PFOS di 3551 L·kg⁻¹) rispetto ai muscoli (valore massimo di BCF trovato in tilapia per PFUnDA di 9169 L·kg⁻¹) e a tutto l'intero corpo analizzato (valore massimo di BCF trovato in dusky sleeper (*Eleotris fusca*) per PFNA di 1627 L·kg⁻¹) [Lam et al., 2017]. D'altra parte, nello stesso studio, i valori di BCF erano più elevati nei tessuti molli dei bivalvi (valore massimo di BCF trovato nelle vongole 'golden freshwater clam' per PFHxS di 2781 L·kg⁻¹) rispetto a quelli riscontrati nei crostacei (valore massimo di BCF trovato nel granchio 'paddle crab' per PFHpA di 1523 L·kg⁻¹) e nei gasteropodi (valore massimo di BCF trovato nei gasteropodi 'golden applesnail' per PFHxS di 1606 L·kg⁻¹) [Lam et al., 2017]. Questi dati sui potenziali di bioaccumulo riportati sono in accordo con i dati discussi nella recente review di Burkhard [Burkhard, 2021] nella quale sono riportate differenze tra i valori di BFC calcolati per diversi PFCs, organismi acquatici e tessuti.

4.1.5 Profili di contaminazione e biodistribuzione

I profili di distribuzione e contaminazione dei PFAS negli organismi acquatici sono coerenti con i risultati degli studi sopradescritti, dai quali è emerso che la distribuzione può essere influenzata da diverse variabili, quali: la contaminazione ambientale, il metabolismo specifico e la dieta [Fang et al., 2014; Stahl et al., 2014; Ahrens et al., 2016]. Pertanto, oltre alle differenze dovute alla posizione geografica, gli studi di biodistribuzione dovrebbero comparare specie vicine tra loro, poiché variabili quali la dieta o i meccanismi fisiologici sono intrinsecamente diverse tra le differenti specie.

➤ Profili di contaminazione

Uno studio che ha confrontato specie con un diverso tipo di alimentazione ha mostrato che i pesci erbivori e onnivori, come *Labeobarbus intermedius*, *Oreochromis niloticus* e *Clarias gariepinus*, contenevano una maggiore proporzione di PFAS a catena corta rispetto ai pesci piscivori *Labeobarbus megastoma* e *Labeobarbus gorguari*. Questi ultimi, tuttavia, contenevano complessivamente una concentrazione totale di PFAS più elevata e una percentuale maggiore di PFAS a catena lunga rispetto alle specie non piscivore [Ahrens et al., 2016]. Al contrario, nel plasma del lamantino erbivoro delle Indie occidentali (*Trichechus manatus*) sono state registrate in proporzione concentrazioni più elevate di PFAS a catena lunga [Palmer et al., 2019]. Il profilo di contaminazione, infatti, potrebbe variare anche in funzione del sito di campionamento, anche se lo studio viene condotto nella stessa area. Ad esempio, un lavoro di ricerca sulla presenza di 23 PFCs nei molluschi del bacino semichiuso di Bohai (Cina) ha evidenziato differenze significative tra i limitrofi siti di acquacoltura. In questo studio il PFOA era il composto più abbondante (87% dei PFAS presenti) ed ha mostrato una frequenza di rilevazione (ossia la percentuale di campioni in cui è stato rilevato PFOA) del 98%, seguita da PFNA, acido perfluorodecansolfonico (PFDS) e PFOS [Guo et al., 2019b]. In effetti, i PFCs più frequentemente rilevati nei vari tessuti di organismi acquatici sono i PFAS a catena lunga, quali il PFOS [Guerranti et al., 2013; Fang et al., 2014; Barbarossa et al., 2016; Palmer et al., 2019; Spaan et al., 2020; Villanger et al., 2020] e il PFOA [Dai and Zeng, 2019; Cui et al., 2019; Guo et al., 2019b]. Questa frequenza è particolarmente importante quando si parla di organismi consumati direttamente dall'uomo o da specie in via di estinzione. Tali preoccupazioni sono emerse in uno studio incentrato sull'analisi di 11 PFAS su diverse specie di pesci commestibili (cefali, corvine, spot, red drum, trote e rombi) campionati nella Carolina del Sud. In tale lavoro la presenza del PFOS era dominante (tra il 25.5 e il 69.6% del totale dei PFAS rilevati) con livelli di concentrazione superiori ai limiti di soglia consentiti per il consumo alimentare [Fair et

al., 2019].

I livelli di concentrazione di uno specifico PFC nei diversi tessuti della stessa specie (ad esempio, PFOA nel fegato della specie A vs. PFOA nel plasma della specie A) sono di solito correlati tra i diversi individui della stessa area. Tuttavia, questa correlazione può non sussistere per lo stesso PFC analizzato negli stessi organi di specie diverse (ad esempio, PFOA nel fegato della specie A vs. PFOA nel fegato della specie B). Ciò può essere in parte dovuto alle differenze tra le specie e relative proteine tessuto-specifiche, ai meccanismi di circolazione del flusso sanguigno, ai pathways di depurazione e alla dieta [Fang et al., 2014]. Ad esempio, in uno studio condotto nello stesso sito di campionamento, il PFOS rappresentava l'87.6% del totale dei PFCs nelle uova di minnow, mentre contribuiva solo per il 42.6% del totale dei composti fluorurati nelle uova di gamberetti bianchi [Fang et al., 2014]. Lo stesso ragionamento può essere applicato anche per le specie filogeneticamente vicine, e per la somma delle concentrazioni di PFAS rilevate. In un recente lavoro, ad esempio, considerando la stessa area marina ma diverse specie (di molluschi) analizzate, i livelli di [PFAS]_{TOT} hanno mostrato che le specie maggiormente contaminate erano in ordine: vongole > cozze > capesante > ostriche [Guo et al., 2019b]. In generale, gli individui della stessa specie provenienti da siti di campionamento differenti dovrebbero accumulare i diversi PFAS, seppur in misura maggiore, nella stessa proporzione di quelli presenti nell'ambiente circostante, riflettendo così la contaminazione da PFAS del loro habitat locale. Ad esempio, nel granchio *Ocyropode stimsoni* il rapporto tra PFOA e PFOS trovato nei tessuti era lo stesso che è stato riscontrato nell'acqua e nei sedimenti di due diverse aree di campionamento dello Xiamen [Dai and Zeng, 2019].

Tuttavia, questa correlazione tra organismo e habitat di appartenenza non è sempre verificata probabilmente a causa del fatto che l'organismo potrebbe essere più selettivo nell'assorbimento di alcuni PFAS piuttosto che altri mostrando quindi un profilo di contaminazione diverso rispetto al sito di campionamento. Ad esempio, nell'acqua e nei sedimenti di due aree di campionamento dello Xiamen, nonostante la predominanza del PFOS rispetto al PFOA, l'ostrica *Cassostrea gigas* presentava livelli di concentrazione di PFOA più elevati rispetto ai PFOS [Dai and Zeng, 2019]. Analogamente, in una ricerca di biomonitoraggio condotta in Vietnam, le concentrazioni di PFOA e PFOS nell'acqua erano dominanti rispetto agli altri 11 PFAS; tuttavia, nei campioni biologici di vari organismi analizzati, PFUnDA era quello maggiormente presente (in particolare nel fegato del pesce tilapia) [Lam et al., 2017]. Inoltre, in uno screening di biomonitoraggio condotto in una zona costiera occidentale della Corea, le concentrazioni di PFAS più elevate sono state rilevate nei pesci rispetto a quelle riscontrate in granchi, gasteropodi e bivalvi; tuttavia, PFHpA e PFOS che erano maggiormente presenti in

acqua, a causa della diversa affinità per gli organismi, non mostravano gli stessi profili di contaminazione riscontrati nelle altre componenti ambientali esaminate [Naile et al., 2013].

Per questo motivo, è molto importante validare qualsiasi studio di biomonitoraggio per determinare la significatività della correlazione tra il livello di contaminazione dell'organismo, come segnale di contaminazione ambientale, e il suo profilo di contaminazione (contributo di ciascun PFC alla contaminazione).

Mentre un organismo contaminato è generalmente un indicatore affidabile dello status di inquinamento di un sito, il profilo di contaminazione dell'organismo rappresenterebbe quello del relativo ambiente di campionamento solo nel caso in cui siano presenti, per i diversi contaminanti, valori simili di fattori di bioaccumulo.

➤ Biodistribuzione

Oltre alle variazioni dei livelli di bioaccumulo esistenti tra le specie, generalmente in base al tipo di assimilazione, i PFCs sono anche biodistribuiti in modo variabile tra i diversi tessuti all'interno dello stesso organismo. Gli studi di biodistribuzione possono essere condotti sia sul campo che in ambienti controllati di esposizione. Va notato che, negli esperimenti di esposizione con alimenti contaminati, i livelli di concentrazione più elevati vengono solitamente registrati nel fegato seguiti da sangue e reni; mentre negli studi di esposizione acquosa sono stati riscontrate concentrazioni più elevate nel sangue seguito da reni e fegato [Hassell et al., 2020] (Figura 16).

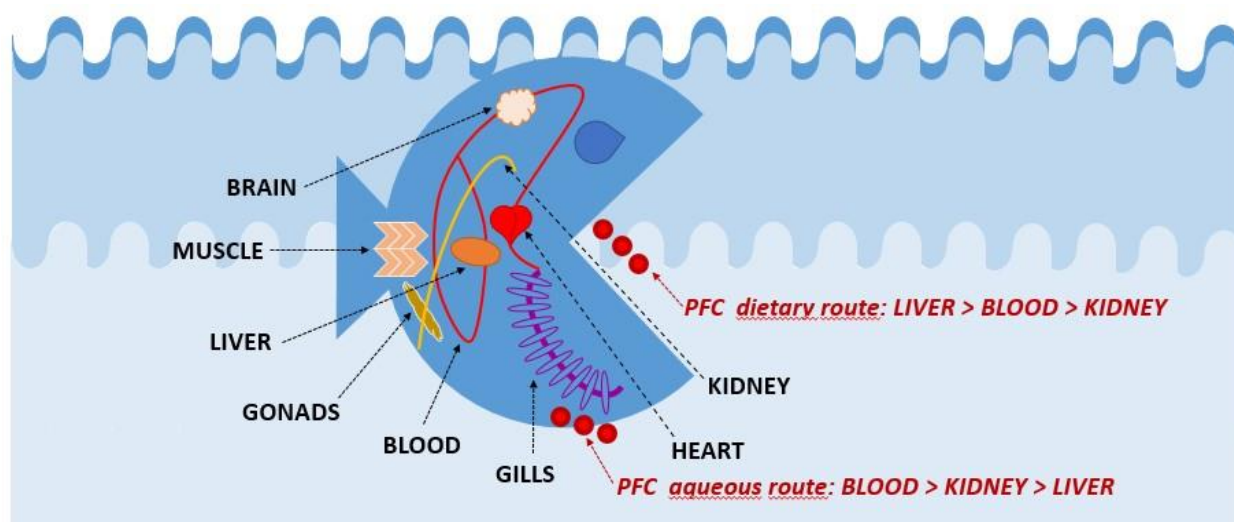


Figura 16. Schema di biodistribuzione tissutale dei PFCs nei pesci.

Tuttavia, in base alla specie e al tipo di condizioni di esposizione si osservano significative

variazioni rispetto a tali tendenze. Ad esempio, in uno screening di analisi di tessuti di alcuni squali catturati in natura, i PFAS sono stati trovati a diversi livelli di concentrazione nel seguente ordine di biocumulo: gonadi > cuore > fegato > branchie > muscolo [Alves et al., 2016; Lam et al., 2017]. Similmente, nei tessuti del cavedano europeo (*Leuciscus cephalus*), i tessuti maggiormente contaminati erano: plasma > fegato > branchie > gonadi > muscolo [Labadie et al., 2011]. Anche nel bacino idrico del Danjiangkou e nel fiume Hanjiang (Cina), sono state analizzate diverse specie e tessuti di pesci, ed è stata evidenziata una maggiore concentrazione di PFAS nel fegato e nelle uova rispetto ai muscoli degli stessi individui [He et al., 2015]. Analogamente, in Vietnam, due specie di pesci hanno mostrato una maggiore contaminazione dei PFCs nel fegato piuttosto che nei muscoli [Lam et al., 2017]. Allo stesso modo, nei diversi tessuti dei pesci catturati nei laghi di alcune zone alpine si è osservato che le contaminazioni da PFAS erano più elevate nel sangue e nel fegato rispetto a quelle riscontrate nei muscoli [Valsecchi et al., 2021]. Infine, anche nel lago di Taihu (Cina) un'indagine sui diversi tessuti di vari organismi acquatici ha mostrato la più alta concentrazione di PFAS nel fegato e nelle uova, mentre la più bassa è stata rilevata nel muscolo [Fang et al., 2014].

Riguardo gli esperimenti condotti in condizioni controllate invece, uno studio su zebrafish esposto a ¹⁴C-PFOA, ha dimostrato (anche attraverso gli autoradiogrammi) che la più alta incidenza di PFOA riguardava la bile, l'intestino (per circolazione enteroepatica) ed è stata osservata anche nella maturazione degli ovociti vitellogeni [Ulhaq et al., 2015].

All'interno dello stesso organismo quindi, l'inquinante si biodistribuisce in modo diverso nei diversi tessuti, influenzando le sue condizioni fisiologiche e spesso portando a effetti biomolecolari che incidono negativamente sull'individuo. Pertanto, gli studi sulla biodistribuzione rappresentano una grande preoccupazione per la salute degli organismi esposti, poiché i PFCs hanno un'elevata affinità per la maggior parte degli organi o dei tessuti che sono coinvolti nelle funzioni vitali.

4.1.6 Effetti di esposizione ai PFCs

Gli effetti degli inquinanti emergenti perfluoroalchilici sono preoccupanti in quanto coinvolgono le funzionalità di diversi organi e sono generalmente più gravi con un aumento del tempo di esposizione e della concentrazione della sostanza biologicamente attiva [Sznajder-Katarzynska, et al., 2019; Brase et al., 2021; Haug et al., 2010; Bil et al., 2021].

Rispetto al modello sperimentale umano, lo studio degli effetti biomolecolari dei PFCs negli organismi acquatici può coinvolgere una maggiore varietà di esperimenti e può quindi costituire un panorama più ampio delle possibili conseguenze di esposizione a queste sostanze [Li, 2009;

Ye et al., 2009; Mhadhbi et al., 2012; Gunduz et al., 2013; Stefani et al., 2014; Ulhaq et al., 2015; Ding et al., 2015; Cui et al., 2015; Barmantlo et al., 2015; Jantzen et al., 2016; Yeh et al., 2017; Mittal et al., 2018; Ayanda et al., 2018].

In questo contesto, è importante analizzare i dati relativi ai descrittori di tossicità EC_{50} , LC_{50} e IC_{50} , definiti di seguito.

- EC_{50} (concentrazione efficace) è la stima della concentrazione di una sostanza tossica necessaria per produrre un effetto osservabile (endpoint) nel 50% degli organismi esposti alla sostanza.
- LC_{50} (concentrazione letale) è un caso speciale di EC_{50} in cui l'effetto registrato o l'endpoint è la morte dell'organismo [Sebaugh et al., 2011; Hemmer et al., 2011].
- Infine, l' IC_{50} (concentrazione inibitoria) è la concentrazione del composto chimico necessaria per inibire il processo o la componente biologica nel 50% del gruppo di organismi esposti alla sostanza [Sebaugh et al., 2011].

Anche su queste basi, tutti gli effetti riportati di seguito sono stati organizzati e presentati in funzione degli organismi acquatici studiati.

➤ **Effetti di esposizione ai PFCs nei vegetali**

Come accennato, piante e alghe sono i produttori primari della rete trofica che costituiscono il primo livello della catena alimentare. Pertanto, in tali organismi è importante verificare gli effetti dei composti perfluorurati sia per conseguenze sugli stessi, sia perchè il bioaccumulo dei PFCs nelle piante e nelle alghe può avere un impatto negativo sugli individui che si nutrono di esse o può influire negativamente su qualsiasi organismo che è legato al sistema di relazione ecologica che le coinvolge.

I parametri da considerare nella valutazione dell'ecotossicità nelle macrofite possono includere tassi di allungamento delle radici, inibizione della crescita e fotosintesi.

Ad esempio, l'esposizione a sette PFAS (PFBA, 2,2,3,3,4,4,5,5-ottatetrafluoro-1-pentanololo (5H 4:1 FTOH), PFOA, PFNA, PFDA, acido perfluoroundecanoico (PFUnA) e PFDoA) ha prodotto alterazioni sull'allungamento delle radici dei semi di *Lactuca sativa* (EC_{50} range: 0.14-4.19 mM) e sulla fotosintesi di *Pseudokirchneriella subcapitata* (EC_{50} range: 0.39-4.85 mM). I risultati hanno dimostrato che gli effetti tossici sono più gravi in relazione alla lunghezza della catena degli atomi di carbonio fluorurati, ad eccezione dell'PFBA in *P. subcapitata* [Ding et al., 2012]. Una correlazione analoga è emersa in un test di tossicità su specie rappresentative della flora algale del Mar Baltico (*Chlorella vulgaris*, *Skeletonema marinoi* e *Geitlerinema amphibium*). In particolare, l'effetto dei PFCs (acido perfluorohexanoico (PFHxA), PFHpA, PFOA e PFNA) di

inibizione sulla crescita a 72 ore, espresso come valori EC_{50} , variava da 0.28 mM a 12.84 mM [Latała et al., 2009].

Similmente, il test di tossicità al PFOS sulle alghe verdi *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris* e la macrofita galleggiante *Lemna gibba*, ha permesso di osservarne effetti di inibizione della crescita. In particolare, i valori di NOEC (No Observed Effect Concentration) erano rispettivamente 5.3, 8.2 e 6.6 $mg \cdot L^{-1}$ per *S. capricornutum*, *C. vulgaris* e *L. gibba*; mentre l'organismo più sensibile, in base all' IC_{50} , era *L. gibba*, con un valore di IC_{50} di 31 $mg \cdot L^{-1}$ [Boudreau et al., 2003].

Analogamente in alcune microalghe, il valore di tossicità acuta di $EC_{50/72}$ h in *Isochrysis Galbana* era di 37.5 $mg \cdot L^{-1}$ per il PFOS, mentre per il PFOA era di 163.6 $mg \cdot L^{-1}$ [Mhadhbi et al., 2012].

Le soglie tossicologiche osservate sono superiori alle concentrazioni di PFCs registrate solitamente in ambiente naturale, che di solito si attestano da poche unità di $ng \cdot L^{-1}$ nei siti meno contaminati a centinaia di $ng \cdot L^{-1}$ in quelli maggiormente contaminati [Zhang et al., 2019; Banzhaf et al., 2017]. Tuttavia, tale constatazione non dovrebbe favorire una dispersione incurante dei PFCs nell'ambiente, poiché queste sostanze hanno dimostrato un potenziale di bioaccumulo molto elevato che determina un aumento, rispetto alla concentrazione ambientale, dei livelli di contaminazione nell'organismo di vari ordini di grandezza. Piuttosto gli indicatori tossicologici registrati per gli organismi vegetali ci suggeriscono che questi ultimi resistono anche ad elevati livelli di esposizione e potrebbero essere utilizzati in applicazioni di biorisanamento ambientale da PFCs.

➤ **Effetti di esposizione ai PFCs negli invertebrati**

Come accennato, negli ultimi decenni, gli invertebrati acquatici sono sempre più utilizzati come organismi modello di ricerca per studio degli effetti di vari tipi di sostanze.

Negli anni sono state acquisite molte informazioni sulle loro caratteristiche biologiche e genetiche grazie alla loro semplice gestione ed utilizzo, anche da punto di vista etico, nelle attività di sperimentazione. Come osservato per altri organismi, a seguito di esposizione a sostanze poli-perfluoroalchiliche gli organismi rispondono attraverso cambiamenti rispetto ad un set point omeostatico mostrando stress o alterazioni di varia natura.

Uno studio sugli effetti genotossici di PFOS, PFOA, PFNA e PFDA in mitili (*Perna viridis*) ha dimostrato che l'esposizione a queste sostanze potrebbe danneggiare il materiale genetico dell'organismo in misura variabile, comprese le rotture dei filamenti di DNA, e apoptosi. In particolare, il PFOS presentava una genotossicità più elevata rispetto agli altri composti testati e

sebbene il danno primario al DNA fosse recuperabile dopo aver cessato l'esposizione, il danno genetico si è rivelato permanente [Liu et al., 2014].

Nei ricci di mare *Glyptocidaris crenularis*, l'esposizione al PFOS (seguita da un periodo di purificazione) ha causato una diminuzione delle capacità motorie, della nutrizione e la caduta delle spine. L'esposizione a questa sostanza ha inoltre modificato l'attività del superossido dismutasi nel fluido celomatico, l'attività delle catalasi e i tassi di metilazione e demetilazione nelle gonadi [Ding et al., 2015].

Negli embrioni di *Paracentrotus lividus* invece, i descrittori tossicologici EC₅₀ e LC₅₀ hanno mostrato che concentrazioni crescenti di PFOS e di perfluorooctanesulfonyl fluoride (POSF) causano un'elevata embriotossicità. Infatti, basse concentrazioni di questi PFCs portavano a malformazioni nel sistema scheletrico e alte concentrazioni inibivano la crescita degli embrioni nelle prime fasi di vita, in particolare, il POSF (EC_{50/72h} di 1.074 mg·L⁻¹) era più tossico del PFOS (EC_{50/72h} di 1.795 mg·L⁻¹) [Gunduz et al., 2013].

In un altro studio sugli embrioni di *P. lividus*, che ha preso in considerazione effetti biologici diversi rispetto al precedente studio (plutei con ritardi nello sviluppo, malformazioni scheletriche [Gunduz et al., 2013] rispetto all'effetto inibitorio sulla crescita [Mhadhbi et al., 2012]), sono stati determinati sia i valori di EC_{50/96 h} per PFOS (20 mg·L⁻¹) e PFOA (110 mg·L⁻¹) [Mhadhbi et al., 2012]. Invece negli embrioni del riccio di mare *Strongylocentrotus purpuratus* i livelli EC/LC_{50/96h} per PFOS e PFOA erano rispettivamente di 1.7 mg·L⁻¹ e 19 mg·L⁻¹ [Hayman et al., 2021].

Analogamente, nei crostacei *Siriella armata*, i valori di tossicità acuta EC_{50/96 h} erano di 6.9 mg·L⁻¹ per il PFOS e 15.5 mg·L⁻¹ il PFOA [Mhadhbi et al., 2012], mentre in un'altra specie appartenente alla famiglia dei misidiacei, *Americamysis bahia*, i livelli di EC/LC_{50/96 h} per PFOS e PFOA erano rispettivamente 5 e 24 mg·L⁻¹ [Hayman et al., 2021].

Per quanto concerne lo sviluppo degli embrioni di *Mitilus galloprovincialis*, i valori di EC_{50/96 h} erano di 1.1 mg·L⁻¹ per il PFOS e di 12 mg·L⁻¹ per il PFOA; invece riguardo la sopravvivenza, i valori di LC_{50/48h} erano 1.07 per il PFOS e 9.98 per il PFOA [Hayman et al., 2021]. D'altra parte, effetti genotossici significativi sono stati registrati anche negli adulti di *Mytilus edulis* esposti al PFOA che hanno mostrato alterazione dell'attività di enzimi antiossidanti e di numerosi altri processi, compresi quelli relativi al metabolismo dei lipidi, degli amminoacidi e dei carboidrati [Li et al., 2021].

Effetti tossici del PFOA e del PFOS sono stati osservati anche in specie di acqua dolce come *Dugesia japonica*, *Physa acuta*, *Daphnia magna* e *Neocaridina denticulate* [Li et al., 2009]. In quest'ultimo studio, è stato osservato che il PFOS (LC_{50/96 h} compreso tra 23 e 178 mg·L⁻¹) era

più tossico del PFOA ($LC_{50}/96h$ compreso tra 337 e 672 $mg \cdot L^{-1}$) e la specie d'acqua dolce più sensibile al PFOS era *N. denticulate* ($LC_{50}/96h$ di 10 $mg \cdot L^{-1}$) mentre *P. acuta* ha mostrato la maggiore resistenza all'esposizione [Li et al., 2009].

I piccoli invertebrati (come la già citata *Daphnia magna*) costituiscono la base della catena alimentare e possono contaminare l'intera rete trofica attraverso il fenomeno della biomagnificazione. Inoltre, gli esperimenti condotti su questi organismi sono importanti per valutare il tasso di sopravvivenza in condizioni di stress e per analizzare gli effetti biologici dei PFCs in sistemi modello facili da gestire. Ad esempio, nelle larve dei moscerini (*Chironomus riparius*) esposte a sedimenti contenenti vari PFAS, sono stati osservati fenomeni di bioaccumulo principalmente durante la fase di crescita esponenziale delle larve [Bertin et al., 2014]. Per quanto riguarda gli effetti derivanti dall'esposizione a PFOS e PFBS, *C. riparius* ha mostrato che effetti di mutagenicità diretta o altre condizioni di stress indotte possono costituire la base per un aumento del tasso di mutazione con conseguenze evolvuzionistiche negative [Stefani et al., 2014].

Nei rotiferi, i saggi di riproduzione hanno indicato che l'esposizione a PFOS e PFOA inibiva la crescita degli organismi, la produzione e schiusa delle uova [Zhang et al., 2014]. In *D. magna*, l'esposizione a PFBA, PFHxA e PFOA ha indicato che la tossicità acuta diminuiva al diminuire della lunghezza della catena di carbonio [Barmentlo et al., 2015].

Analogamente, in *Daphnia carinata*, esposta a varie concentrazioni di PFOA e PFOS, i test di tossicità acuta (48 ore) e cronica (21 giorni) hanno mostrato che il PFOS esprime una maggiore tossicità provocando, tra gli altri effetti, aberrazioni geniche. In particolare, i valori di $LC_{50}/48 h$ per PFOA e PFOS erano rispettivamente 78.2 $mg \cdot L^{-1}$ e 8.8 $mg \cdot L^{-1}$. Inoltre, l'esposizione cronica al PFOS (0.001 $mg \cdot L^{-1}$) ha evidenziato effetti di mortalità e ha influenzato negativamente i processi riproduttivi [Logeshwaran et al., 2021].

Come osservato per le alghe per la riduzione o inibizione della crescita (IC_{50}), gli endpoint di un esperimento di tossicità possono essere di diverso tipo. Pertanto, gli studi devono essere basati sulla risposta più rappresentativa allo stress (derivante dal processo biologico più sensibile) indotto dall'esposizione alla sostanza. Ad esempio, nei dinoflagellati bioluminescenti *Pyrocystis lunula* trattati con PFOA ($EC_{50}/24 h$: 18 $mg \cdot L^{-1}$) e PFOS ($EC_{50}/24 h$: 4.9 $mg \cdot L^{-1}$), l'endpoint scelto riguardava la più bassa emissione luminosa (bioluminescenza) rispetto a un controllo corrispondente, questo segnale, caratteristico della specie, è stato scelto per mostrare la reazione avversa dell'organismo all'esposizione a prodotti chimici [Hayman et al., 2021].

➤ Effetti di esposizione ai PFCs nei pesci

Gli studi sugli effetti tossici di esposizione ai PFAS nei pesci possono essere molto utili per prevedere la persistenza e valutare il rischio ambientale di queste sostanze chimiche. In questo contesto, i pesci ed i loro embrioni rappresentano modelli interessanti poiché offrono la possibilità di eseguire analisi ad alto rendimento su piccola scala. Numerosi lavori hanno valutato gli effetti degli PFAS sui pesci permettendo di comprendere ed arricchire le conoscenze relative alle conseguenze biologiche relative all'esposizione a tali sostanze.

Ad esempio, in uno studio condotto sui salmoni (*Oncorhynchus tshawytscha*) esposti ad una miscela di 16 sostanze, compresi tre composti perfluorinati (PFDA, PFOS, FOSA), si è osservata l'insorgenza di disturbi sulla funzione mitocondriale del fegato ed altre alterazioni di processi fisiologici ad esso connessi [Yeh et al., 2017].

Analogamente, un altro studio sulla valutazione degli effetti citotossici e genotossici del PFDoA sul pesce medaka giapponese (*Oryzias latipes*) ha mostrato che l'esposizione subcronica a tale composto ha causato danni al DNA con induzione simultanea di diverse anomalie sugli eritrociti [Ayanda et al., 2018].

Invece, allo stesso modo di quanto osservato negli studi sugli invertebrati, in *Psetta maxima* i valori di EC₅₀ a seguito di esposizione al PFOS (0.11 mg·L⁻¹) erano superiori a quelli di esposizione al PFOA (11.9 mg·L⁻¹) [Mhadhbi et al., 2012].

Negli embrioni di zebrafish invece, l'esposizione subletale a PFOS, PFNA e PFOA ha causato una diminuzione della lunghezza totale del corpo, ha aumentato l'espressione di un gene di regolazione dello sviluppo muscolare (*tfc3a*), ha causato iperattività locomotoria e cambiamenti comportamentali che sono rimasti permanenti negli adulti [Jantzen et al., 2016].

Questi risultati sono ragionevolmente connessi all'accumulo chimico nelle proteine del tuorlo negli ovociti [Ulhaq et al., 2015], con conseguenti rischi sullo sviluppo embrionale e sulla salute della prole; infatti, PFOS e PFOA sono noti per inibire lo sviluppo degli embrioni, causarne anomalie e morte [Li et al., 2009]. Inoltre, l'esposizione a questi due PFAS in zebrafish ha determinato l'inibizione della crescita delle cellule epatiche e aumentato significativamente la percentuale di apoptosi cellulare [Cui et al., 2015].

Relativamente ad altri effetti sulle larve di zebrafish esposte a F-53B, PFOS, e OBS, è stato osservato che queste aumentavano il loro dispendio energetico, riducevano la loro assunzione alimentare (in funzione dell'aumento di concentrazione degli inquinanti) e, ad eccezione dell'OBS, gli inquinanti avevano determinato una riduzione dell'espressione dei geni coinvolti in alcune vie metaboliche a livello di trascrizione e traduzione [Tu et al., 2019]. È interessante notare che, attraverso studi computazionali di docking molecolare è stato possibile rivelare che

le affinità di legame dei PFAS alla glucochinasi diminuiscono seguendo l'ordine F-53B > PFOS > OBS. I risultati sperimentali hanno confermato che F-53B, nonostante costituisca l'alternativa al PFOS di recente produzione, ha determinato il più alto potenziale di bioconcentrazione causando inoltre i maggiori disturbi metabolici [Tu et al., 2019].

Inoltre, l'esposizione a perfluoropolieteri (PFPeS), al PFHxS, all'acido perfluoroeptanesolfonico (PFHpS) e al PFOS ha portato alla formazione di un fenotipo di tossicità comune caratterizzato da difetti dell'asse corporeo e della vescica natatoria, ed ha indotto inoltre iperattività [Gaballah et al., 2020]. Anche qui, è interessante notare che la neurotossicità dello sviluppo osservata è direttamente proporzionale all'aumento della lunghezza della catena del carbonio [Gaballah et al., 2020].

Un altro studio sull'esposizione a PFAS negli embrioni di zebrafish e nelle cellule embrionali, ha evidenziato che la tossicità degli acidi solfonici era superiore a quella degli acidi carbossilici, ed in particolare, per questi ultimi, è stato osservato che il tasso di mortalità aumentava con la lunghezza della catena del carbonio (PFOA > PFHxA >> PFBA) [Wasel et al., 2021].

Questa scoperta è in accordo con studi precedenti che hanno evidenziato un $LC_{50}/48h$ di 1005 $mg \cdot L^{-1}$ per il PFOA e di 107 $mg \cdot L^{-1}$ per il PFOS [Ye et al., 2009].

È interessante notare che, mentre l'esposizione al PFOS negli embrioni di zebrafish ha mostrato una maggiore tossicità rispetto al PFOA, l'esposizione a una miscela dei due PFCs ha determinato effetti interattivi complessi che variano da effetti sinergici, antagonistici e, infine, di nuovo ad effetti sinergici, con conseguente aumento dei rapporti molari del PFOS [Ding et al., 2013].

➤ **Effetti di esposizione ai PFCs negli anfibi**

Un'altra classe di organismi ampiamente utilizzati nei test di laboratorio è rappresentata dagli anfibi. Questi sono ottimi modelli per lo studio delle malattie grazie della loro facile gestione, allevamento, alta resistenza, e similarità genetica con l'uomo. Inoltre, questi modelli sono particolarmente utili quando deve essere investigato l'impatto di concentrazioni elevate di PFCs nell'ambiente.

Ad esempio, da un lavoro di ricerca sull'influenza dei PFCs sul sistema nervoso delle rane leopardo settentrionali (*Lithobates pipiens*), è emerso che queste sostanze dovrebbero essere studiate maggiormente per la loro potenziale attività nelle malattie che hanno come target la produzione di dopamina. In particolare, i livelli di dopamina sono diminuiti significativamente nel cervello delle rane trattate con PFOA (1000 ppb) e PFOS (100 e 1000 ppb) [Foguth et al., 2019].

Invece, un recente studio di esposizione cutanea ai PFCs (mediante contatto con muschio secco contenente PFAS a 0, 80, 800 e 8000 ppb), sono stati valutati diversi effetti su tre specie di anfibi ossia rospi (*Anaxyrus americanus*), salamandre (*Ambystoma tigrinum*) e rane (*Rana pipiens*). In questo studio sono stati riscontrati scostamenti significativi dalle condizioni di controllo (in base alla specie e al composto) per seguenti parametri: sopravvivenza, crescita, effetti sulla lunghezza finale del muso (SVL), indice di massa corporea (SMI) ed altre misurazioni relative alle condizioni corporee [Abercrombie et al., 2021].

Inoltre, negli embrioni di *Xenopus laevis*, durante una valutazione della tossicità per lo sviluppo e della teratogenicità di PFHxA e PFHpA, sono stati osservati gravi disturbi al fegato e al cuore. In quest'ultimo studio PFHpA, che ha atomo di carbonio in più rispetto al PFHxA, ha prodotto effetti più gravi che hanno determinato un aumento della fosforilazione della chinasi regolata dai segnali extracellulari (ERK) e della chinasi N-terminale c-Jun (JNK) [Kim et al., 2015]. Invece, nei girini di *X. laevis*, l'esposizione a livelli crescenti di concentrazione di PFOS e PFBS (da 100 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ha mostrato effetti epatotossici e, nonostante l'assenza di conseguenze significative sulla sopravvivenza e sulla crescita, il PFOS ha causato degenerazione spermatogonica [Lou et al., 2013]. Infine, nei girini di *Rana pipiens*, l'esposizione a PFOS, PFHxS, PFOA e 6:2 FTS a diverse concentrazioni ha determinato ritardi nello sviluppo [Hoover et al., 2017].

4.1.7 Aspetti critici e prospettive ambientali future

L'impatto negativo dei PFCs sull'ambiente acquatico è una grande preoccupazione per l'intero ecosistema che si basa sui delicati equilibri tra acqua, fondali, litorali e le specie che in questi vivono. L'effetto della contaminazione da PFCs dipende dalle condizioni di esposizione (correnti, temperatura, tempo di esposizione, concentrazione, ecc.) e dai meccanismi fisiologici degli organismi coinvolti. Confrontando organismi acquatici tassonomicamente diversi, è emerso che micro-e macrofite hanno mostrato una maggiore resistenza agli effetti causati dall'esposizione ai PFCs. Le alghe, in generale, sono più inclini a sopravvivere in ambienti inquinati e a bioaccumulare tali sostanze; inoltre essendo organismi solitamente sessili sono più adatti di altri indicatori biologici per effettuare studi di biomonitoraggio locale.

Tuttavia, non sono state esenti dagli effetti negativi di esposizione ai PFCs, come osservato per l'inibizione della crescita o anomalie di sviluppo. Inoltre, questi organismi, una volta contaminati, tendono a ripristinare il loro stato di iniziale eliminando la sostanza in tempi generalmente che sono più lunghi per i PFAS a catena lunga.

Nel regno animale, invece, tra gli effetti di esposizione ai PFCs si annoverano: danni al DNA,

aberrazioni nell'espressione genica, alterazioni del sistema endocrino e anomalie morfologiche e funzionali. Quando l'esposizione ha coinvolto gli embrioni di pesci o echinodermi, tali effetti sono stati più severi; tra questi sono stati osservati: l'inibizione della crescita, le anomalie dello sviluppo, e il decesso. Infatti, la tolleranza nei confronti dell'esposizione ai PFCs aumenta con le dimensioni degli organismi, sia tra specie diverse che all'interno di individui della stessa specie. Ciò è particolarmente vero quando individui di dimensioni diverse sono esposti alla stessa concentrazione a causa di fenomeni di diluizione dovuti alle dimensioni (o alla crescita) o di variazioni della tossicocinetica legate all'ontogenesi.

In questo contesto, gli elevati fattori di bioaccumulo e gli effetti negativi registrati dopo un'esposizione prolungata a basse concentrazioni di PFCs pongono seri interrogativi sulla valutazione del limite di contaminazione tollerabile indicato nelle normative ambientali.

Inoltre, considerando che gli studi ecotossicologici sono limitati ad alcune valutazioni e specie, determinati effetti potrebbero essere sottovalutati (perché non presi in considerazione o in quanto un altro organismo potrebbe rispondere in maniera differente), specialmente nel caso di questi inquinanti emergenti.

Un'elevata variabilità di bioaccumulo ed effetti tossici è stata osservata tra individui di specie diverse soprattutto in base alle variabili condizioni di esposizione (acqua contaminata, cibo contaminato, sedimenti contaminati).

Oltre che per valutare i fenomeni di biomagnificazione, i risultati degli studi di bioaccumulo su organismi appartenenti alla stessa rete trofica sono utili per evidenziare quali sono le specie meno inclini a bioconcentrare la sostanza monitorata, suggerendo quindi strategie di consumo o allevamento preferenziale.

Tuttavia, a causa della variabilità delle condizioni ambientali e del tipo di esposizione (acuta, cronica, diffusa, localizzata, ecc.), il confronto dei risultati derivanti da diversi studi richiede un attento trattamento e/o normalizzazioni dei dati.

Inoltre, nonostante l'impatto negativo dei PFCs abbia determinato limitazioni normative al loro utilizzo e alla loro produzione, lo sviluppo di nuovi ed alternativi PFCs, in antitesi con la proposta di soluzione ai rischi derivanti da quelli tradizionali, pone l'attenzione a nuove potenziali minacce ambientali.

Per prevenire effetti indesiderati, in questi casi, gli studi di ecotossicità effettuati in condizioni controllate su modelli animali sono fondamentali per valutare tutti i rischi derivanti dall'uso di PFCs alternativi. In questa ottica, tra gli studi di biodegradazione stanno emergendo misure di contrasto all'inquinamento correlato ai PFCs, ad esempio mediante l'utilizzo di microrganismi che li degradano. Dunque, si auspicano delle politiche alternative che si occupino non solo delle

limitazioni di produzione di queste sostanze o della corretta gestione dei rifiuti relativi ad esse (sia del singolo cittadino che a livello industriale), ma soprattutto delle misure di compensazione, contrasto e prevenzione all'inquinamento ormai diffuso al fine di minimizzare la dispersione dei PFCs in tutti gli ambienti.

4.1.8 Abbreviazioni

Perfluorohexanesulfonic acid (PFHS); 2,2,3,3,4,4,5,5-Octafluoro-1-pentanol (5H 4:1 FTOH); 6:2 fluorotelomer sulfonate (6:2 FTS); 6:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate (F-53B); 8:2 fluorotelomer carboxylic acid (8:2 FTCA); ammonium 2,3,3,3-tetrafluoro-2-(heptafluoropropoxy)propanoate (GenX); bio-accumulation factor (BAF); bio-concentration factor (BCF); biomagnification factor (BMF); biota-sediment accumulation factor (BSAF); effective concentrations (EC); extracellular signal-regulated kinase (ERK); final length of the muzzle (SVL); heneicosafleuroundecanoic acid (PFUnDA); inhibitory concentration (IC); kinetic constant (k); lethal concentration (LC); liver fatty acid binding protein (LFABP); mass index of the scale (SMI); No observed effect concentration (NOEC (No Observed Effect Concentration)); N-terminal c-Jun (JNK); Organization for Economic Cooperation and Development (OECD); perfluoroalkane sulphonic acids (PFSA); perfluoroalkanoic carboxylic acids (PFCA); perfluoroalkyl phosphonic acid (PFPA); perfluoroalkylic acids (PFAA); perfluorobutanesulfonic acid (PFBS); perfluorobutanoic acid (PFBuA); perfluorobutyric acid (PFBA); perfluorodecane sulfonic acid (PFDS); perfluorodecanoic acid (PFDA); perfluorododecanoic acid (PFDoA); perfluorohexanoic acid (PFHxA); perfluoroheptanesulfonic acid (PFHpS); perfluoroheptanoic acid (PFHpA); perfluoroheptanesulfonic acid (PFHxS); perfluorononanoic acid (PFNA) perfluorononanoic acid (PFNA); perfluorononenoxybenzenesulfonate (OBS); perfluorooctane sulfonamide (FOSA); perfluorooctanesulfonic acid (PFOS); perfluorooctanesulfonyl fluoride (POSF); perfluorooctanoic acid (PFOA); perfluoropentanoic acid (PFPeA); perfluoropolyethers (PFPeS); perfluoroundecanoic acid (PFUnA); persistent organic pollutants (POPs); physiologically based pharmacokinetic (PBPK); polyand perfluoroalkyl substances (PFAS); poly- and perfluorinated compounds (PFCs); steady state bio-accumulation factor (BAF_{SS}); steady state bio-concentration factor (BCF_{SS}); trophic magnification factors (TMF).

4.2 *Paracentrotus lividus*: una specie sentinella nel biomonitoraggio ambientale del PFOA

Nel presente lavoro viene riportata la prima determinazione sulla presenza e biodistribuzione del PFOA in novanta esemplari di ricci di mare *Paracentrotus lividus* provenienti da due siti contaminati situati nella zona costiera di Palermo (Sicilia).

4.2.1 Introduzione

Gli inquinanti organici emergenti e persistenti (POPs) rappresentano una minaccia per l'ambiente marino e sono necessarie strategie per il loro monitoraggio periodico e sostenibile [Rig  t et al., 2019; Gavrilesco et al., 2015]. Le sostanze perfluoroalchiliche (PFAS), sottoclasse di POPs, sono ampiamente distribuite e persistenti (dovuta alla forza e stabilit   del legame carbonio-fluoro) nell'ambiente a causa del loro ampio utilizzo in un'ampia variet   di applicazioni e prodotti [Suja et al., 2009; Valsecchi et al., 2013]. I PFAS hanno un'elevata affinit   sia per i sedimenti e la materia organica [Lam et al., 2017; Sunderland et al., 2019]. In particolare, sono stati trovati nella fauna selvatica [Yeung et al., 2019; Loi et al., 2011] e spesso in pesci e frutti di mare [Vandermeersch et al., 2015; Dai & Zeng, 2019; Guo et al., 2019b]. I PFAS hanno dimostrato effetti negativi sulla salute; ad esempio, l'esposizione al PFOA    associata al cancro ai reni e ai testicoli nell'uomo [Kar et al., 2017].

Nella maggior parte degli studi che riportano matrici contaminate da PFAS [Dai & Zeng, 2019; Guo et al., 2019b, Chen et al., 2020] l'acido perfluorooctanoico (PFOA)    tra i composti rilevati con maggiore frequenza a livelli di concentrazione significativamente pi   elevati rispetto ad altri inquinanti fluorurati.

In questo contesto il monitoraggio del PFOA nell'ambiente potrebbe fornire una valutazione pi   affidabile della contaminazione degli inquinanti fluorurati anche perch   tale sostanza pu   anche derivare dalla degradazione di altri composti fluorurati [Teaf et al., 2019].

Riguardo le attivit   di biomonitoraggio per la valutazione dei livelli di contaminazione da PFOA, sono stati indagati diversi organismi marini [Nakata et al., 2006; Fernández-Sanjuan et al., 2010; Lam et al., 2017; EFSA, 2018]. Tuttavia, in genere vengono effettuati campionamenti invasivi e non tutte le specie sono indicative dello stato di inquinamento dell'area di raccolta. Infatti, come gi   accennato, le caratteristiche di mobilit   di un animale, la sua sedentariet   e longevit   sono cruciali nell'approccio agli studi di biomonitoraggio poich   un bioindicatore ideale dovrebbe essere fortemente connesso all'ambiente locale e sopravvivere tanto da consentire un esteso campionamento periodico multiplo [Zhou et al., 2008; Parmar et al., 2016]. In questo contesto, va sottolineato che il PFOA    presente in mare ad una concentrazione media che varia da poche unit   a centinaia di ng  L⁻¹ con valori pi   elevati registrati nei bacini fluviali

e nelle aree costiere delle città industriali [Banzhaf et al., 2017; Zhang et al., 2019]. Nell'ambito della nostra ricerca sulla presenza di POPs negli animali marini [Savoca et al., 2018], abbiamo concentrato il nostro studio sul riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), echinoderma ampiamente utilizzato negli studi ecotossicologici per la sua ampia distribuzione, stile di vita sedentario e longevità (circa 15 anni) [Tomšić et al., 2010]. Inoltre, le gonadi di *P. lividus* sono comunemente raccolte nelle regioni dell'Oceano Atlantico orientale ed apprezzate come frutti di mare in diversi paesi del Mediterraneo, rappresentando se contaminate, una potenziale minaccia per la salute umana [Machado et al., 2019]. In questo contesto *P. lividus* costituisce un ottimo modello di analisi anche per la possibilità di effettuare campionamenti non invasivi del fluido celomatico e celomociti. Questi ultimi infatti sono cellule che circolano liberamente nella cavità celomatica di *P. lividus* e possono essere utilizzati come biosensori di stress ambientale [Matranga et al., 2005; Pinsino et al., 2008; Stabili & Pagliara, 2015]. Recentemente sono stati riportati livelli di contaminazione di diversi inquinanti analizzati in questa specie [Rocha et al., 2018]; tuttavia, non sono mai stati condotti studi sulla biodistribuzione e sull'assorbimento di inquinanti fluorurati da parte di esemplari adulti di *P. lividus* provenienti dall'ambiente marino. Lo scopo di questa ricerca è stato quindi di indagare la presenza e la biodistribuzione del PFOA in *P. lividus*, *Posidonia oceanica* (Delile, 1813), campioni di acqua marina e salmastra raccolti in una zona costiera vicino Palermo (Sicilia).

4.2.2 Risultati e discussione

4.2.2.1 Analisi chimiche dell'acqua di mare e di torrente, *P. oceanica*, *P. lividus* e relativi fattori di concentrazione

Attraverso differenti tecniche di estrazione sono state analizzate le diverse matrici per la rivelazione del loro contenuto di PFOA.

➤ Analisi dell'acqua di mare e di torrente

La concentrazione di PFOA nell'acqua di mare del sito A variava da 1 a 4 ng·L⁻¹ con un valore di mediana di [PFOA]_{seawater} = 2 ng·L⁻¹; questo valore era tre volte inferiore rispetto a quello riscontrato nel sito B (mediana [PFOA]_{seawater} = 6 ng·L⁻¹ con un intervallo di 3-13 ng·L⁻¹). Il test t di Welch ($\alpha = 0.05$; valore p < 0.001) ha sostenuto l'ipotesi che, tra i due siti, vi era una contaminazione chimica significativamente diversa. Inoltre, la mediana [PFOA]_{creek} = 16 ng·L⁻¹ con range di concentrazione 5-34 ng·L⁻¹ suggeriva che il torrente potesse essere una delle possibili fonti di inquinamento da PFOA nel sito B.

➤ **Analisi di *P. oceanica***

Il diverso stato di inquinamento da PFOA dei due siti è stato confermato anche dalle analisi di *P. oceanica* (Tabella 3) (t-test di Welch: $\alpha = 0.05$; p-valore = 0.006) che ha mostrato una frequenza di contaminazione del 45% nei campioni del sito B, con una media di $[PFOA]_{P. oceanica} = 67 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, mentre solo un campione del sito A risultava essere contaminato e con un contenuto di PFOA ($13 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) molto inferiore.

Tabella 3. PFOA in *P. oceanica*: valori di concentrazione dai due siti di campionamento.

<i>P. oceanica</i> Sample #	Sampling Site	[PFOA] _{<i>P. oceanica</i>} (ng·g ⁻¹)	Sampling Site	[PFOA] _{<i>P. oceanica</i>} (ng·g ⁻¹)
1	A	0	B	13
2	A	0	B	7
3	A	0	B	6
4	A	0	B	294
5	A	0	B	41
6	A	0	B	71
7	A	0	B	6
8	A	0	B	794
9	A	13	B	0
10	A	0	B	0
11	A	0	B	0
12	A	0	B	0
13	A	0	B	0
14	A	0	B	0
15	A	0	B	0
16	A	0	B	0
17	A	0	B	0
18	A	0	B	107
19	A	0	B	0
20	A	0	B	0

È interessante notare che i livelli di contaminazione in *P. oceanica* erano superiori di tre ordini di grandezza rispetto a $[PFOA]_{\text{seawater}}$ del sito corrispondente, suggerendo quindi la capacità di *P. oceanica* di bioaccumulare l'inquinante (Tabella 3).

➤ Analisi di *P. lividus* e relativi fattori di concentrazione

Per quanto riguarda le analisi di *P. lividus*, la presenza di PFOA è stata rilevata nel 96% degli individui raccolti dal sito B e solo nel 47% degli esemplari di *P. lividus* del sito A. La presenza di PFOA negli esemplari del sito A è probabilmente giustificata dalla contaminazione dell'acqua di mare dello stesso sito. Inoltre, il test t di Welch ha confermato che la distribuzione dei valori di concentrazione totale di PFOA stimata per gli interi individui ($[PFOA]_{TOT}$) catturati nel sito B era significativamente diversa ($p < 0.001$) da quella registrata in quelli del sito A. I valori di mediana delle concentrazioni di PFOA per i campioni raccolti dal Sito A erano 0 (per tutte le matrici), mentre per i campioni raccolti dal Sito B erano: 21 (in CF), 153 (in CC) e 73 $ng \cdot g^{-1}$ (in GoM) (Figura 17).

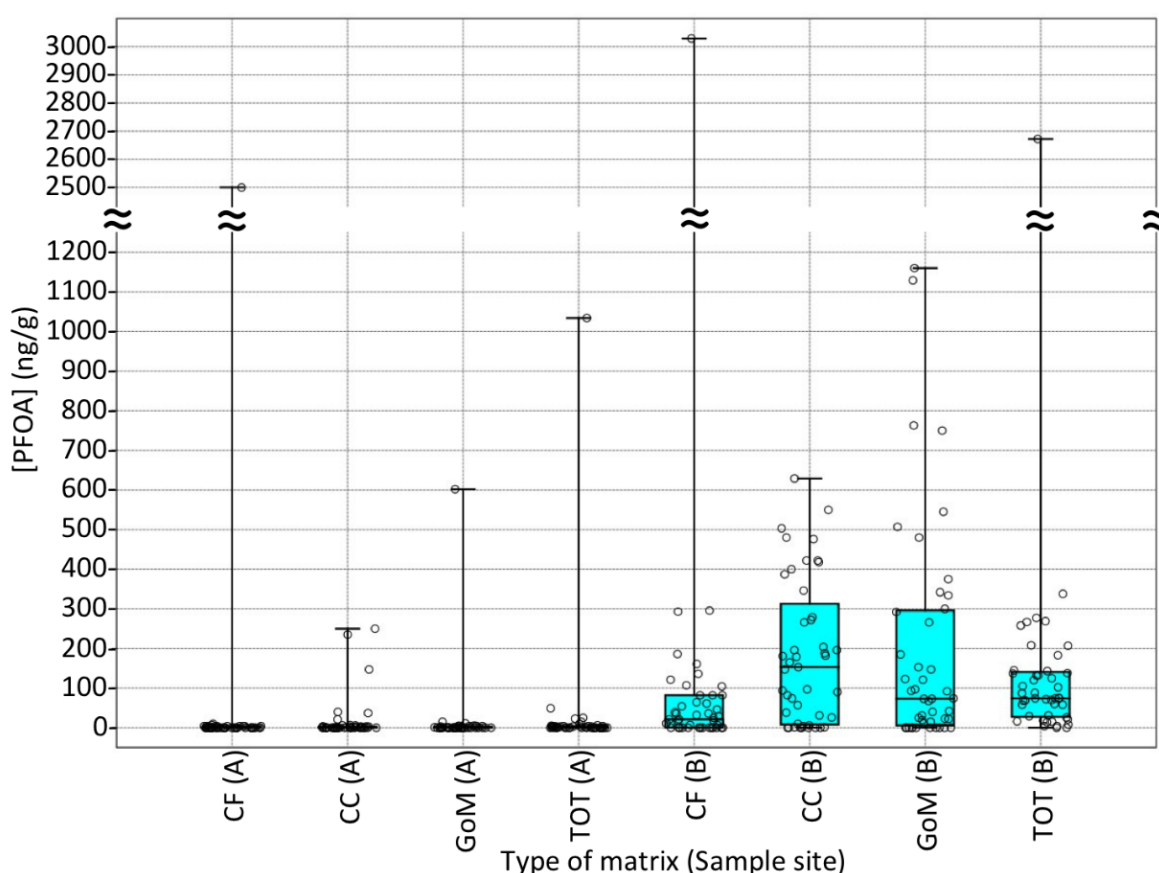


Figura 17. Grafico Box e jitter che mostra le concentrazioni di PFOA nel fluido celomatico (CF) celomociti (CC) e gonadi o organi misti (GoM), nonché la concentrazione totale di PFOA (TOT), in 45 esemplari di *P. lividus* catturati nel Sito A (lato sinistro) e in 45 esemplari di *P. lividus* raccolti dal Sito B (lato destro).

Queste concentrazioni erano di almeno tre ordini di grandezza superiori a quelle registrate nell'acqua di mare dei siti di campionamento, suggerendo l'opportunità di utilizzare questa specie come bioindicatore di contaminazione da PFOA.

Considerando l'ampia gamma di concentrazioni registrate (che non seguono distribuzioni normali), il livello medio di contaminazione da PFOA nelle varie matrici è stato valutato calcolando i valori di mediana delle concentrazioni di PFOA seguiti dal range dei livelli di concentrazione.

Tali valori mediani di [PFOA] nei ricci di mare raccolti dal sito A (meno contaminato) erano 0 per tutte le matrici a causa di un numero estremamente limitato di esemplari contaminati, con un ampio intervallo di concentrazione di 0-2500 ng·g⁻¹ in CF, 0-250 ng·g⁻¹ in CC, 0-602 ng·g⁻¹ in G, 0-1034 ng·g⁻¹ in TOT.

Poiché il raggio di spostamento di *P. lividus* nel suo areale è limitato a pochi metri per mese [Hereu, 2005], la nostra ipotesi è che alte concentrazioni riscontrate sporadicamente in esemplari provenienti dal sito A potrebbero essere dovute a contaminazioni episodiche (ad es. grazing di detriti o materiale contenente PFOA). D'altra parte, nei campioni raccolti dal sito B, i valori mediani [PFOA] erano 21 ng·g⁻¹ in CF (intervallo: 0-3029 ng·g⁻¹), 153 ng·g⁻¹ in CC (intervallo: 0-629 ng·g⁻¹), 195 ng·g⁻¹ in G (intervallo: 0-1160 ng·g⁻¹) e 74 ng·g⁻¹ in TOT (intervallo: 0-2672 ng·g⁻¹). A questo proposito, il potenziale di bioaccumulo del PFOA è stato valutato calcolando il fattore di bioconcentrazione (BCF) secondo l'equazione 2 [Savoca & Pace, 2021]:

$$\text{BCF (L} \cdot \text{kg}^{-1}) = [\text{PFOA}]_{\text{MATRIX}} (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}) / [\text{PFOA}]_{\text{seawater}} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}).$$

I risultati ($\log_{10}\text{BCF}$) ottenuti sono stati utilizzati per valutare il comportamento di bioaccumulo di PFOA in *P. lividus* e *P. oceanica* come mostrato in Tabella 4.

Tabella 4. Fattori di bioconcentrazione (BCF) calcolati per ogni matrice analizzata raccolta da campioni del sito B.

Matrix – Species	$\log_{10}\text{BCF}$
<i>P. oceanica</i> seagrass	
leaves	4.05
<i>P. lividus</i> sea urchin	
coelomic fluid	4.28
coelomocytes	4.48
gonads	4.50
mixed organs	4.51
entire individual	4.41

Considerando il criterio di bioaccumulabilità dell'Unione europea [Arnot & Gobas, 2006], che

definisce una soglia $\log_{10}\text{BCF}$ di 3.7 come indice di elevata bioaccumulabilità, i dati riportati nella Tabella 4 confermano tale natura del PFOA nelle matrici di *P. lividus* e *P. oceanica*. Per approfondire questa opportunità di monitoraggio non invasivo del PFOA, è stata effettuata un'analisi statistica intesa a valutare la correlazione tra le concentrazioni di PFOA trasformato in logaritmo in una data matrice ($\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{MATRIX}}$) rispetto alla concentrazione stimata totale ($\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$) in ciascun riccio di mare (per valutare quanto la matrice indicata potesse essere rappresentativa della contaminazione da PFOA dell'intero riccio) (Figura 18).

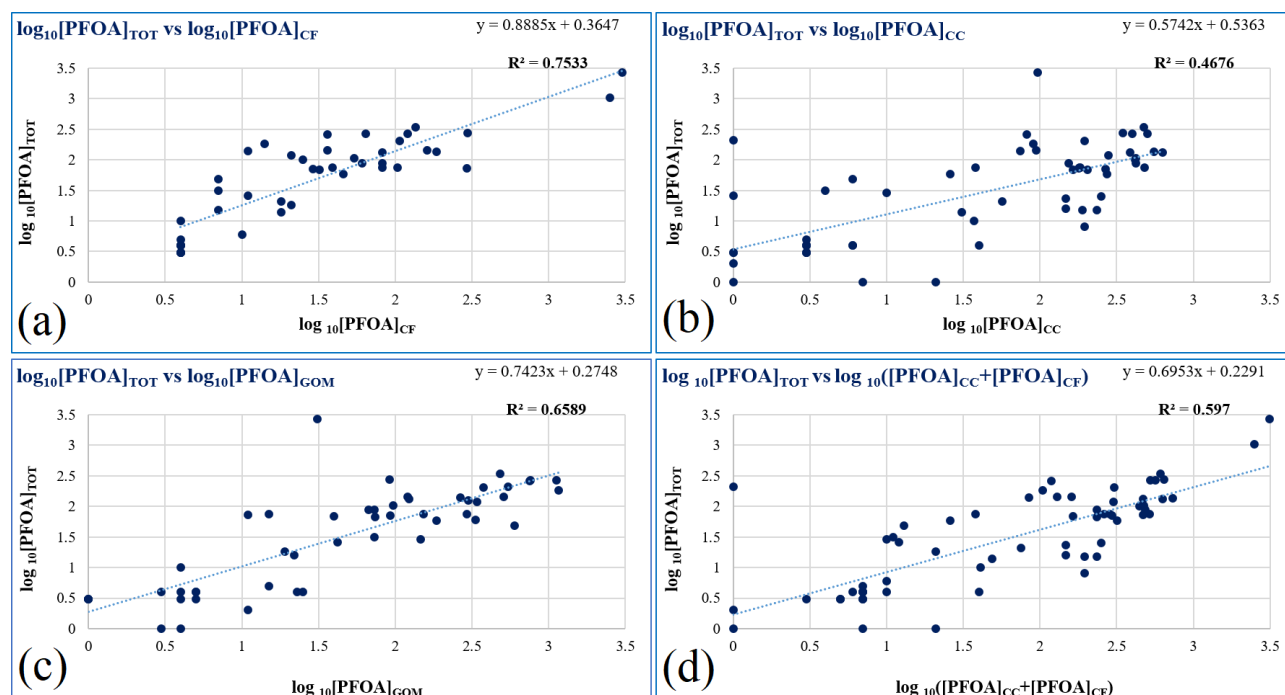


Figura 18. Grafici di correlazione tra $\log_{10}[\text{PFOA}]$ in un dato tipo di matrice (asse x) come: (a) CF = fluido celomatico, (b) CC = celomociti, (c) GoM = gonadi o organi misti, (d) CC + CF, rispetto alla concentrazione totale nell'intero riccio di mare espressa come $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ (asse y).

Per tutte le correlazioni sono stati esclusi i valori di $[\text{PFOA}] = 0$ a causa del valore logaritmico risultante indefinito. Tutte le correlazioni osservate sono risultate significative.

La correlazione di $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ vs $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{CF}}$ (Figura 18a) ha mostrato un $R^2 = 0.75$ (quindi un coefficiente di correlazione $R = 0.86$). Tale correlazione è stata elaborata su 44 dati di concentrazione. Quando il numero di osservazioni è pari a 44, la probabilità di ottenere $R > 0.7$ da due variabili non correlate è $p \ll 0.05\%$ [Taylor, 1982].

La correlazione di $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ vs $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{CC}}$ (Figura 18b) ha mostrato un $R^2 = 0.46$ (quindi un coefficiente di correlazione $R = 0.68$) ed è stata eseguita su 58 campioni. Quando il numero di osservazioni è uguale a 58, la probabilità di ottenere $R > 0.45$ da due variabili non

correlate è $p \ll 0.05\%$ [Taylor, 1982].

La correlazione di $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ vs $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{GoM}}$ (Figura 18c) ha mostrato un $R^2 = 0.66$ (quindi un coefficiente di correlazione $R = 0.81$) ed è stata eseguita su 49 valori di concentrazione. Quando il numero di osservazioni è pari a 49, la probabilità di ottenere $R > 0.45$ da due variabili non correlate è $p \ll 0.05\%$ [Taylor, 1982].

La correlazione di $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ vs $\log_{10}([\text{PFOA}]_{\text{CC}} + [\text{PFOA}]_{\text{CF}})$ (Figura 18d) ha mostrato un $R^2 = 0.59$ (quindi un coefficiente di correlazione $R = 0.77$) ed è stata eseguita su 62 livelli di contaminazione. Quando il numero di osservazioni è uguale a 62, la probabilità di ottenere $R > 0.45$ da due variabili non correlate è $p \ll 0.05\%$.

Di tutte le combinazioni (Figura 18) realizzate tramite l'intero dataset di 90 individui di *P. lividus*, ad esclusione dei dati corrispondenti a $[\text{PFOA}] = 0$, $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{CF}}$ ha mostrato la migliore correlazione con $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ ($R^2 = 0.7533$) (Figura 18a).

L'analisi di cui sopra suggerisce che $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{CF}}$ potrebbe essere utilizzato per valutare la contaminazione da PFOA in *P. lividus*. Tale risultato è stato inoltre convalidato dall' F-test con un livello di significatività di 0.05 e un p-value di 0.879. Tuttavia, guardando il dataset (vedi Tabella 1 in appendice), ci sono alcuni casi in cui, sebbene rilevato in altre matrici organiche (tessuti/cellule) dello stesso riccio, il PFOA non viene riscontrato nel fluido celomatico; pertanto, l'analisi del solo CF produrrebbe il 23.3% di falsi negativi.

Ragionevolmente, poiché il campionamento del fluido celomatico consente intrinsecamente anche il campionamento dei celomociti, la scelta più affidabile per il monitoraggio non invasivo del PFOA sarebbe analizzare sia la matrice CF che CC. Infatti, se consideriamo la somma di $[\text{PFOA}]_{\text{CF}}$ e $[\text{PFOA}]_{\text{CC}}$, successivamente trasformati in valori logaritmici (Figura 18 d), il rischio di falsi negativi scende al 3.3%.

4.2.2.2 Analisi statistiche: PCA e PERMANOVA

L'insieme di dati (Tabella 1 in appendice) contenente i valori di cinque variabili per ogni riccio di mare, nello specifico: dimensione, $[\text{PFOA}]_{\text{CF}}$, $[\text{PFOA}]_{\text{CC}}$, $[\text{PFOA}]_{\text{GoM}}$, e $[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$, è stato sottoposto anche all'analisi delle componenti principali (PCA) (Tabella 2 in appendice) che ha generato cinque fattori (F1-F5) tra cui i primi tre rappresentano il sistema con un 89% di variabilità cumulativa (vedi Tabella 2a in appendice). Nel grafico 2D, relativo alla distribuzione dei valori degli autovettori (componenti principali) F1-F2 (Figura 19a) ed F1-F3 (Figura 19b), è possibile osservare la separazione tra i punti derivanti dai dati relativi agli individui raccolti nel Sito A meno contaminato (simboli blu in Figura 19) e quelli risultanti da campioni raccolti nel sito B (simboli rossi in Figura 19) più contaminato.

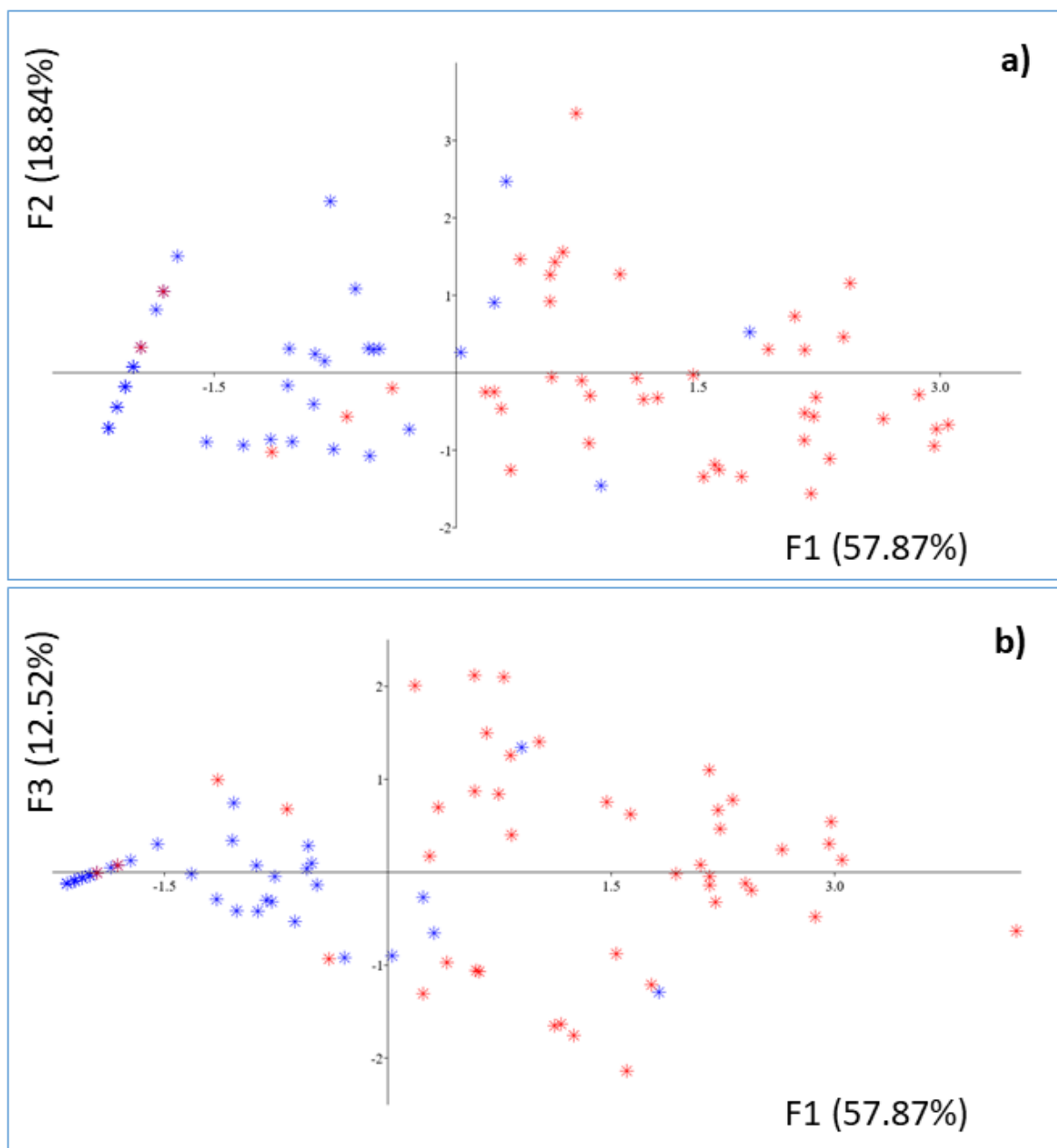


Figura 19. Distribuzione dei dati PCA: (a) grafico a dispersione 2D delle prime due componenti principali (F1-F2); (b) 2D-scatter plot della prima e della terza componente principale (F1-F3). I simboli blu riguardano i dati relativi ai ricci del sito A in rosso i ricci sito B.

Tuttavia, mentre gli esemplari provenienti dal sito meno contaminato sono per lo più distribuiti nella regione negativa dell'asse F1 (Figura 19 punti blu), gli esemplari del sito B sono più sparsi e, con poche eccezioni, occupano principalmente la regione positiva di F1 (Figura 19 punti in rosso). A tal proposito, in ambiente naturale, all'interno dello stesso sito di raccolta, tra i possibili fenomeni che possono determinare differenze nel livello di contaminazione possono essere considerati: l'ingestione di sedimenti contaminati da PFOA, lo spawning dei gameti e la

diversa esposizione alle correnti. L'analisi PCA sembra mostrare una separazione tra i due siti di campionamento, anche se non vi è una chiara clusterizzazione. Al contrario, l'analisi PERMANOVA, ha mostrato una differenza significativa tra i due siti ($p = 0.001$).

Per tale ragione, attraverso lo stesso dataset processato nell'analisi PCA, è stato elaborato un grafico PCA-3D che ha permesso di osservarne la distribuzione da un'altra prospettiva (utilizzando ben 3 componenti principali). I risultati mostrano una migliore clusterizzazione e minore dispersione del dataset (in ogni caso più elevata per i punti in rosso relativi ai campioni del sito B) (Figura 20).

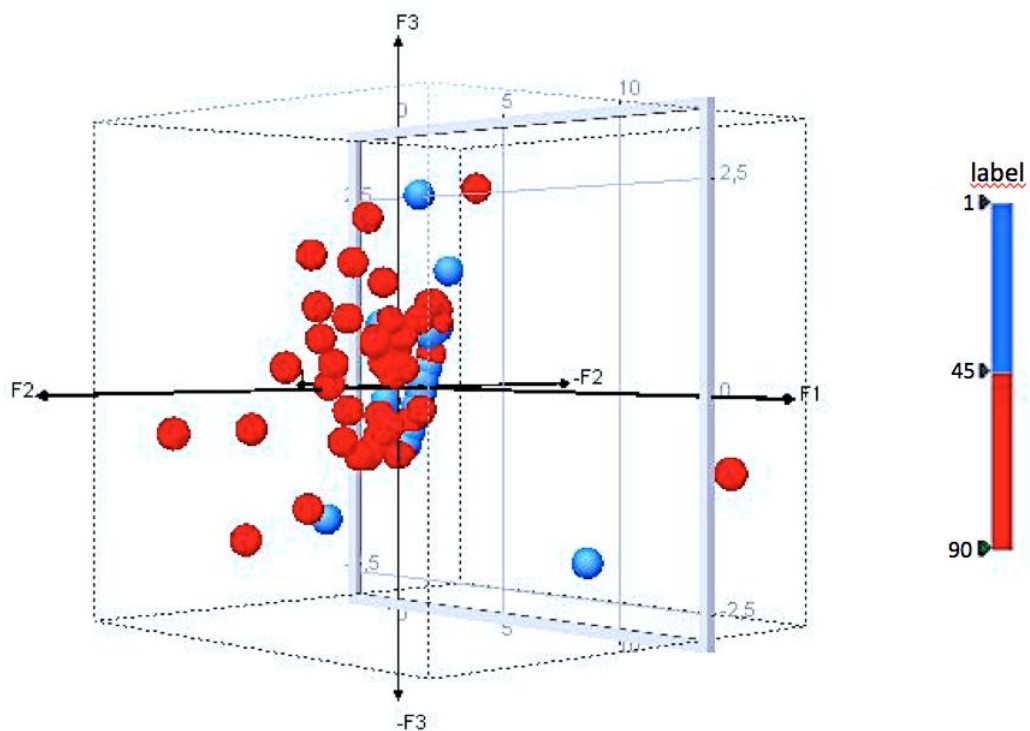


Figura 20. Clustering dei dati per grafico a dispersione 3D risultante dall'analisi PCA delle prime tre componenti principali (autovettori F1-F3).

In questo modo i dati PCA potrebbero essere utilizzati anche come sistema modello per l'applicazioni di biomonitoraggio basate sull'analisi di campioni di *P. livdus* relativi a potenziali contaminazioni da PFOA in ambiente marino. Infatti, in Figura 20, è possibile identificare due diversi cluster che mostrano una buona differenziazione. In questo grafico 3D, i dati posizionati nelle regioni con F2 positivo indicherebbero un sito contaminato da PFOA con solo una bassa frequenza (4.7 %) di falsi positivi (a causa della presenza dei punti blu negli ottanti F2 positivi).

4.2.3 Materiali e metodi

4.2.3.1 Campagna di campionamento

Sono state effettuate tre campagne di campionamento nei due siti (A e B) localizzati sulla costa della Sicilia nord-occidentale (Figura 21).

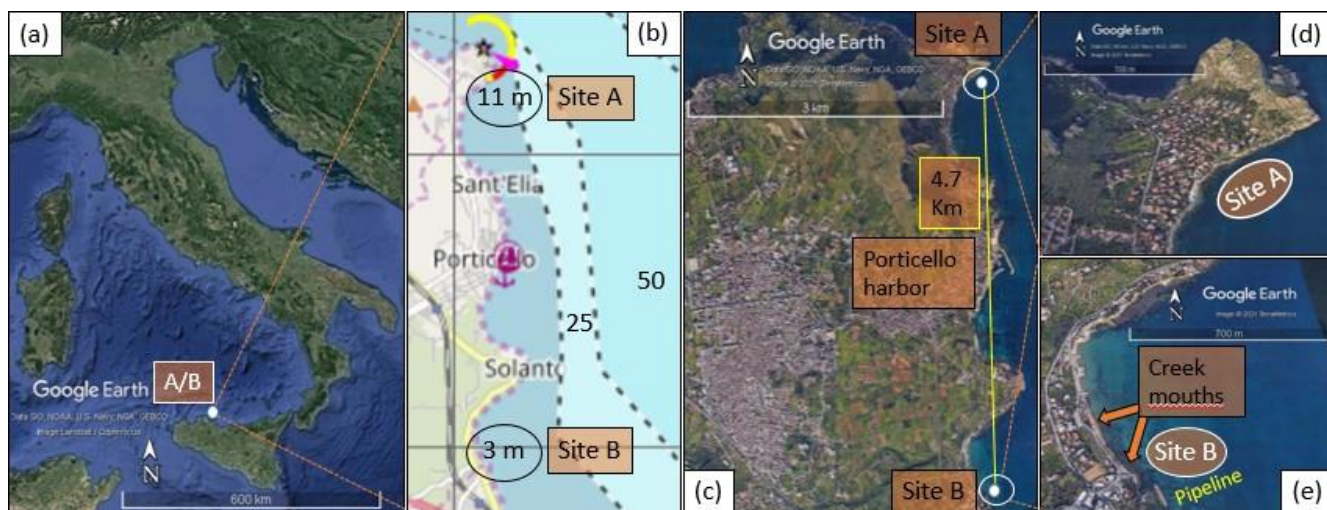


Figura 21. Mappa del sito di campionamento. (a) Area geografica, (b) carta batimetrica, (c) distanza relativa tra siti di campionamento, (d, e) primi piani di siti di campionamento. (Immagini ottenute per gentile concessione di Google Earth Pro e map.openseamap.org).

Le caratteristiche principali dei siti e i dettagli del campionamento sono riassunti nella Tabella 5.

Tabella 5. Caratteristiche del sito e dettagli del periodo di campionamento

Sampling Site	Geographical Coordinates	Seabed	Max Depth (m)	Water streams (creeks) from inland	Bathing restrictions due to pollution
Site A	38°03'54"N 13°32'22"E	Mostly rocky	11	NO	NO
Site B	38°06'27"N 13°32'19"E	Mostly sandy	3	YES	YES

Sampling	Sampling	Sample	Collected Samples
----------	----------	--------	-------------------

Campaign	Period	Site	Seawater (liters)	Creek 1 (liters)	Creek 2 (liters)	seagrass: <i>Posidonia oceanica</i> (# of samples)	sea urchins: <i>Paracentrotus lividus</i> (# of specimens)
Campaign I	October 2018	A	5	-	-	10	15
Campaign I	October 2018	B	5	5	5	10	15
Campaign II	March 2019	A	5	-	-	5	15
Campaign II	March 2019	B	5	5	5	5	15
Campaign III	July 2019	A	5	-	-	5	15
Campaign III	July 2019	B	5	5	5	5	15

In totale nei due siti sono stati raccolti e analizzati 90 esemplari di ricci di mare *Paracentrotus lividus* (45 esemplari per sito), 30 L di acqua di mare (15 L per sito), 40 campioni (20 per sito) di *Posidonia oceanica* (frammenti di foglie di lunghezza inferiore a 5 cm di, secondo le linee etiche istituzionali e nazionali) mentre solo per il sito B sono stati prelevati 30 L di acqua salmastra (15 L da ciascun torrente). L'attività di campionamento è stata autorizzata dalla Capitaneria di Porto di Palermo con numero di protocollo: 0029430. In assenza di dati locali sulla presenza di PFOA nella relazione più recente sulla contaminazione da queste sostanze chimiche [Abita et al., 2010], la scelta dei siti di campionamento è stata effettuata sul presunto diverso stato di inquinamento degli stessi in base alla loro posizione geografica e alla vicinanza di attività antropiche (ad es. ristoranti, condutture, fognature, ecc.). Il sito A (Figura 21d), è stato scelto assumendo uno stato di inquinamento inferiore in base alla sua posizione in prossimità di Capo Zafferano, all'estremità settentrionale della baia di Sant'Elia, con una profondità media di 11 m e fondali rocciosi (Figura 21b e Tabella 5). Al contrario, il Sito B (Figura 21e) è stato scelto nella stessa area costiera (solo 4.7 km di distanza dal Sito A) assumendo uno stato di inquinamento più elevato a causa della sua posizione situata sul lato meridionale del promontorio di Solanto, vicino ad una pipeline e agli estuari di due piccoli

torrenti, con un fondale sabbioso poco profondo (3 m) e in cui era presente un'ordinanza di divieto di balneazione [San Filippo, 2017] (Figura 21b, c, e, Tabella 5).

La biodistribuzione del PFOA nelle varie matrici dei ricci di mare è stata valutata analizzando ciascuno dei campioni singolarmente, questi consistevano di: celomociti (CC) (90 campioni), fluido celomatico (CF) (90 campioni), gonadi (G) (63 campioni di 32 ricci di mare raccolti nel sito A e 31 del sito B) o gli organi misti (MIX) (27 campioni di 13 ricci di mare raccolti nel sito A e 14 del sito B). Questi ultimi erano costituiti da una miscela omogeneizzata di matrici interne del riccio, e sono stati campionati quando le gonadi non erano sviluppate a sufficienza per essere analizzate (< 100 mg); la rappresentazione schematica delle matrici del riccio di mare analizzate è illustrata in Figura 22.

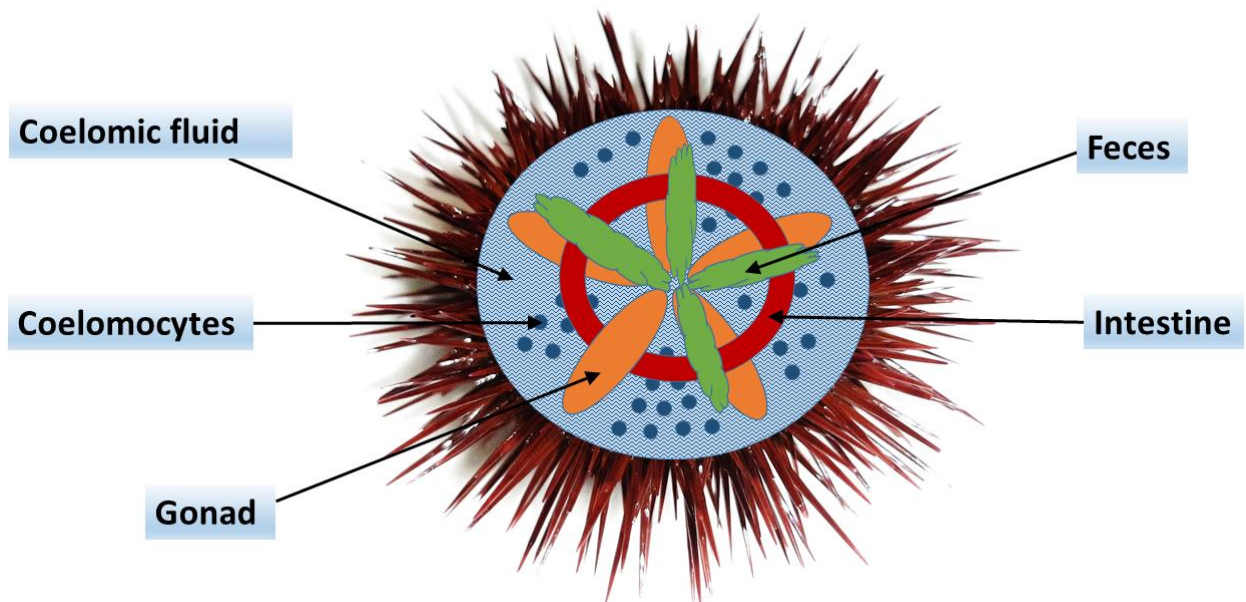


Figura 22. Rappresentazione grafica delle matrici campionate del riccio di mare oggetto di indagini.

A causa della loro natura mutuamente esclusiva, gli ultimi due set di dati (G e MIX) sono stati fusi insieme ed etichettati come "gonadi o organi misti" (GoM) sia per analisi statistiche che per le rappresentazioni grafiche che necessitavano di un set di dati uniforme di 45 elementi per sito.

Riguardo la matrice intestino/feci (39 campioni del sito A e 28 del sito B) le analisi hanno mostrato una percentuale di recupero estremamente bassa e sono stati esclusi dallo studio.

Il sesso di ogni esemplare è stato determinato solo quando le gonadi isolate erano sessualmente mature ed è stato quindi possibile osservare l'emissione dei gameti femminili o maschili. A tal

proposito, l'insieme degli individui di *P. lividus* consisteva di 27 maschi (19 dal Sito A, 8 dal Sito B), 16 femmine (6 dal Sito A, 10 dal Sito B) mentre per i restanti 47 esemplari (20 dal Sito A, 27 dal Sito B) le gonadi non erano mature o sufficientemente sviluppate per cui non è stato possibile determinare il sesso.

Gli esemplari di *P. lividus* sono stati catturati e portati immediatamente in laboratorio tramite un contenitore (ghiacciaia) all'interno del quale sono stati inseriti senza farli emergere dall'acqua di mare (per evitare lo spawning dei gameti). Il campionamento delle varie matrici (dissezioni e prelievi) ha avuto inizio entro l'ora successiva. Quando l'estrazione del PFOA non si è potuta effettuare immediatamente dopo la raccolta, le matrici sono conservate a -20 °C e sono state processate entro le successive 72 ore.

Le dimensioni dei ricci di mare (diametro orizzontale senza spine) variavano tra 30 e 51 mm, indicando gli esemplari che avevano vissuto approssimativamente da 3 a 5 anni [Tomšić, et al., 2010].

4.2.3.2 Estrazione ed analisi del PFOA in differenti matrici organiche complesse

Il metanolo di qualità LC-MS (di Honeywell) è stato utilizzato per le estrazioni (incluso il condizionamento e l'eluizione delle cartucce SPE) e le analisi HPLC-MS. L'acqua di grado LC-MS (da Panreac Applichem) è stata utilizzata per le analisi HPLC-MS e per il condizionamento o il lavaggio delle cartucce SPE. L'acetato di ammonio (da Aldrich) è stato usato come additivo per le fasi mobili dell'HPLC. Lo standard analitico dell'acido perfluorooctanoico (> 98% da Aldrich), una volta solubilizzato, è stato utilizzato sia per verificare la linearità delle rette di taratura che per essere addizionato in ogni tipologia di matrice al fine di verificare il recupero dell'analita. Le cartucce SPE Strata TM-X-AW (33 µm polymeric weak anion, tubi da 200 mg - 6 mL) (da Phenomenex) sono state utilizzate per l'estrazione del PFOA nei campioni di acqua marina e salmastra.

I puntali delle micropipette in polipropilene (PFOA free) sono stati utilizzati per prelievi quantitativi di piccoli volumi.

Per evitare qualsiasi tipo di contaminazione da PFOA, tutti gli strumenti utilizzati per il campionamento e per le procedure di estrazione sono stati lavati con diversi cicli di metanolo (grado LC-MS).

Le analisi sono state eseguite in triplicato attraverso un HPLC Infinity 1260 collegato a un rivelatore ESI-QTOF 6540 UHD MS Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies) dotato di una sorgente Dual AJS ESI operante nella modalità di monitoraggio degli ioni negativa. Un volume di 10 µL di soluzione ottenuta da estratti o diluizioni dello standard è

stato iniettato in una colonna Poroshell (EC-C18 3.0 x 50 mm, particle size: 2.7 μm) ed eluito con una miscela di acqua (contenente acetato di ammonio 4 mM), e metanolo (MeOH) con un flusso fisso di 0.4 mL \cdot min $^{-1}$. Per l'eluizione è stato utilizzato il seguente gradiente: da acqua/MeOH: 50/50 (vol/vol) a 5/95 in 2 min, poi 2/98 in 1 minuto dopo il quale è stato mantenuto costante il rapporto per ulteriori 4 minuti, poi 2/98 in 1 minuto, 95/5 in 2 minuti e mantenuto costante per ulteriori 5 minuti prima di tornare alle condizioni iniziali in 3 min. I dati sono stati analizzati utilizzando il programma Agilent Masshunter Workstation. Il PFOA è stato identificato attraverso lo spettro di massa (monitoraggio [M-H] $^{-}$ ione a 412.9664 \pm 0.0005 Dalton) e targeted MS/MS (monitoraggio del 412.966 \pm 0.002 Dalton per il precursore => 368.976 \pm 0.002 Dalton per il frammento), e ha mostrato un tempo di ritenzione di 4.5 min.

Il PFOA non è stato rilevato nel bianco (MeOH) il quale è stato iniettato ogni due corse, a conferma dell'assenza di contaminazione incrociata. I controlli di qualità (quality checks) sono stati condotti analizzando una soluzione standard di PFOA a 10 ppb ogni dieci campioni.

Le procedure di estrazione del PFOA sono state adattate al tipo di matrice da analizzare. Le percentuali di recupero (R %) sono state controllate per ogni lotto di analisi aggiungendo a campioni non contaminati diverse quantità di standard analitico prima della procedura di estrazione [Paiano et al., 2012].

I campioni fortificati sono stati sottoposti alla stessa procedura di estrazione dei campioni senza standard e la percentuale di recupero R è stata calcolata in base all'equazione 10, dove C_{spike} è la concentrazione nota di PFOA aggiunto, D_{spiked} è la risposta analitica strumentale (LC-MS) del campione fortificato (la concentrazione "rilevata"), D_{unspiked} è la risposta analitica del campione non fortificato.

$$R\% = 100 \times \frac{(D_{\text{spiked}} - D_{\text{unspiked}})}{C_{\text{spike}}} \quad (10)$$

R è stato poi utilizzato nell'equazione 11 per calcolare i valori effettivi di [PFOA] dei campioni analizzati nei quali non è stato aggiunto lo standard.

$$[\text{PFOA}] = \frac{100 \times D_{\text{unspiked}}}{R} \quad (11)$$

Ad eccezione delle concentrazioni di PFOA in acqua di mare ($[\text{PFOA}]_{\text{seawater}}$) e quelle relative all'acqua di torrente $[\text{PFOA}]_{\text{creek}}$, che sono espresse in ng \cdot L $^{-1}$ (ppt), tutte le altre concentrazioni di PFOA sono espresse in ng \cdot g $^{-1}$ (ppb).

La retta di taratura, ottenuta attraverso diluizioni seriali in metanolo nel range da 0.1 a 1000 ppb, è stata analizzata prima di ogni lotto di analisi ed ha mostrato una risposta lineare ($R^2 > 0.99$). Le deviazioni standard relative (RDS) su tre repliche erano inferiori al 10% mentre il limite di rilevazione (LOD: 0.1 ppb) e il limite di quantificazione (LOQ: 1.0 ppb) sono stati quantificati con il metodo IUPAC.

Parallelamente all'analisi del PFOA in tutte le matrici di *P. lividus*, per ciascun individuo, è stata calcolata una stima della concentrazione totale di PFOA, $[PFOA]_{TOT}$ in $ng \cdot g^{-1}$, considerando il peso (W) in grammi di ciascun campione (equazione 12):

$$[PFOA]_{TOT} = (W_{CF} [PFOA]_{CF} + W_{CC} [PFOA]_{CC} + W_{GoM} [PFOA]_{GoM}) / (W_{CF} + W_{CC} + W_{GoM}) \quad (12)$$

➤ Estrazione in fase solida del PFOA nei campioni di acqua

Durante ciascuna delle tre campagne di campionamento sono stati raccolti 2 campioni di acqua di mare (5 L dal sito A e 5 L dal sito B) e 2 campioni di acqua salmastra (5 L da ciascuna foce di torrente nel sito B) per un totale di 6 campioni di acqua di mare e 6 campioni di acqua salmastra. I campioni sono stati analizzati per verificare la presenza di PFOA mediante estrazione in fase solida (SPE) seguita da un'analisi LC-MS [Hong et al., 2015].

Riguardo l'iter di estrazione, le cartucce SPE (Strata TM-X-AW) sono state preconizionate utilizzando 5 mL di metanolo (conditioning) seguiti da 5 mL di acqua (equilibration). Poi, 500 mL di acqua di mare (o di torrente) sono stati fatti passare attraverso la cartuccia (sample addition) ad una velocità di 2 gocce al secondo. La cartuccia è stata poi lavata con 6 mL di acqua e lasciata asciugare. La frazione contenente l'analita è stata eluita con 10 mL (2 x 5 mL) di metanolo e concentrata ad 1 mL con rotavapor.

I campioni con lo standard aggiunto sono stati preparati aggiungendo 20 μ L di una soluzione madre acquosa di 1 $mg \cdot L^{-1}$ di PFOA a 500 mL di acqua di mare o di torrente. La percentuale di recupero calcolata è stata $R = 120\%$.

➤ Estrazione del PFOA in *P. oceanica*

Un totale di 40 campioni di foglie è stato raccolto da diversi individui di *P. oceanica* (20 campioni dal sito A e 20 campioni dal sito B). Ogni campione è stato tagliato in piccoli pezzi e omogeneizzato con mortaio d'agata e pestello, successivamente le aliquote di 0.5 g sono state trasferite nei tubi di vetro per l'estrazione.

Dopo l'aggiunta di metanolo (5 mL) ogni campione di *P. oceanica* è stato sonicato per 20 minuti a temperatura ambiente, centrifugato per 15 minuti a 3500 giri al minuto, infine il

surnatante (1 mL) è stato prelevato per l'analisi HPLC. I campioni fortificati sono stati preparati aggiungendo 50 μL di una soluzione madre acquosa di 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ di PFOA all'aliquota di pianta omogeneizzata (0.5 g). La percentuale di recupero, calcolata era $R = 70\%$.

➤ **Campionamento del fluido celomatico e dei celomociti ed estrazione del PFOA**

Il fluido celomatico, contenente anche la popolazione di celomociti, è stato prelevato da tutti i novanta individui raccolti (45 per sito) inserendo un ago molto sottile (32G: 0.26 mm x 12 mm) di una siringa da 1 mL attraverso la membrana peristomale (Figura 23) [Arizza et al., 2013].



Figura 23. Prelievo del fluido celomatico da *Paracentrotus lividus*

Tutti i campioni sono stati centrifugati a 4 °C e 1500 giri al minuto per 5 minuti in una centrifuga refrigerata 5804R (Eppendorf, Germania) separando così il surnatante: fluido celomatico (CF) dal pellet sottostante: celomociti (CC). I campioni di CF e CC sono stati quindi pesati e posti in diversi tubi di vetro per le successive estrazioni del PFOA (Figura 24).

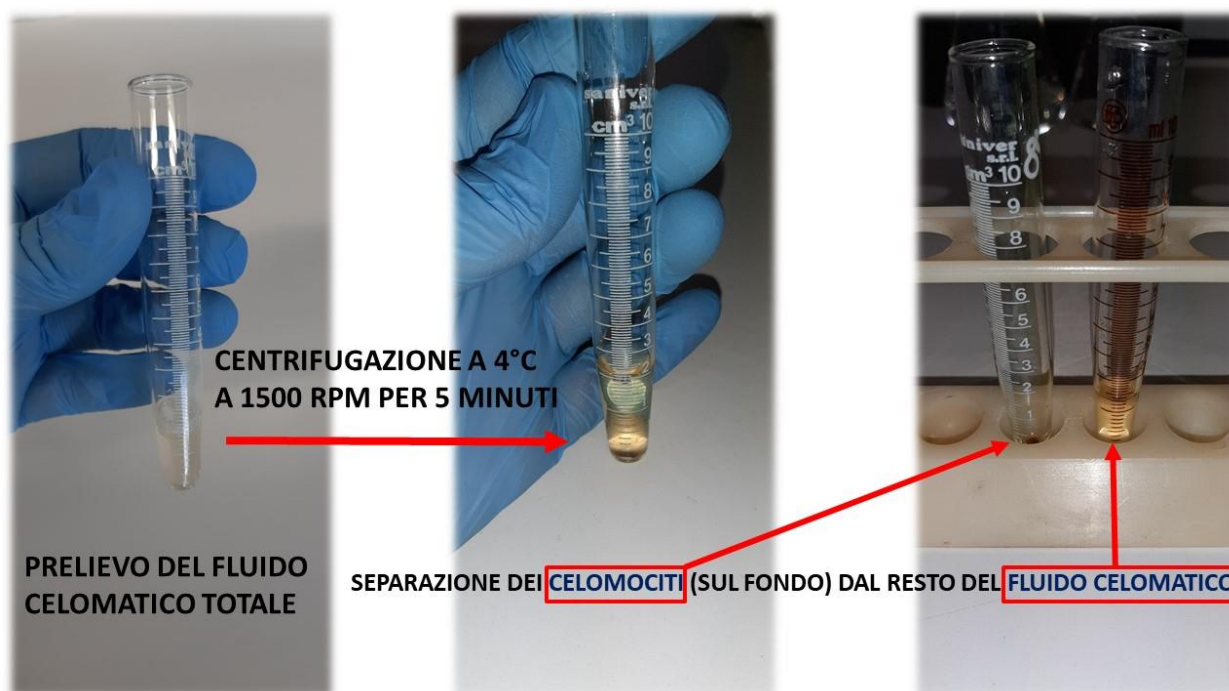


Figura 24. Separazione del fluido celomatico dai celomociti.

L'estrazione del PFOA è stata effettuata aggiungendo metanolo (5 mL per i campioni superiori a 0.5 g; 2.5 mL per i campioni compresi tra 0.1 g e 0.5 g) al campione in una provetta di vetro e sonicando la miscela risultante per 20 minuti a temperatura ambiente. La miscela di estrazione è stata poi centrifugata per 15 minuti a 3500 giri al minuto. Successivamente, una parte del surnatante dell'estratto (1 mL) è stata aggiunta ad una vial di vetro per l'analisi LC-MS.

Le analisi sono state eseguite in triplicato e, quando il PFOA non è stato rilevato, sono state ripetute le analisi dopo aver concentrato il campione 10 volte sotto flusso gentile di azoto. In questo modo, i campioni nei quali è stato confermato che il PFOA era al di sotto del limite di rilevazione sono stati considerati come zero sia nei grafici che nelle analisi statistiche.

I campioni fortificati sono stati preparati aggiungendo 50 μL di una soluzione madre acquosa di 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ di PFOA a 0.5 g di campioni di CF o CC.

La percentuale di recupero calcolata era $R = 28\%$ per CF, mentre per CC: $R = 68\%$.

➤ Estrazione del PFOA nelle gonadi ed organi mixati

L'estrazione del PFOA dai 63 campioni di gonadi (32 dal sito A e 31 dal sito B) è stata effettuata con metanolo di grado LC-MS mediante lo stesso procedimento utilizzato per CF e CC. Riguardo la percentuale di recupero, sono stati utilizzati 20 campioni da 0.25 g (10 per sito) di gonadi provenienti dai ricci che ne presentavano una maggiore quantità. A tali campioni è stato aggiunto un volume di 25 μL di una soluzione standard acquosa di 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ di PFOA.

La percentuale di recupero di PFOA dalle gonadi era $R = 73\%$.

In 27 esemplari di ricci di mare (13 dal Sito A e 14 dal Sito B), lo stato di sviluppo delle gonadi non era sufficiente per raccogliere almeno 0.1 g. Per questi individui, gli organi rimasti dopo la raccolta di CF e CC, principalmente intestino e gonadi non sviluppate, sono stati mescolati insieme ed è stata condotta l'estrazione del PFOA con le stesse modalità utilizzate per le altre matrici. La percentuale di recupero di PFOA da organi mixati (MIX) era di $R = 20\%$.

4.2.3.3 Elaborazioni statistiche e rappresentazione grafica dei dati

I grafici box e jitter sono stati creati utilizzando il software PAST 3.25, così come il test F e l'analisi delle componenti principali (PCA) [Hammer et al., 2001]. I grafici scatter plot, le correlazioni lineari e i test t di Welch sono stati realizzati con Excel 2016 (Microsoft). Il 3D-plot per la PCA è stato creato utilizzando XLSTAT versione Pro 2016 (Addinsoft) ed Origin versione Pro 2016 (Electronic Arts).

La distribuzione delle concentrazioni di PFOA in tutte le matrici campionate dei ricci di mare raccolti è mostrata graficamente da un diagramma box e jitter in cui il 25° e 75° percentile, perpendicolari all'asse y, sono rappresentati rispettivamente dai lati inferiori e superiori dei box; minimo e massimo sono mostrati delle linee sottili (baffi) posti alle estremità della barra che attraversa il box, mentre la mediana è segnata come una linea orizzontale nel boxfitting.

Sono state condotte prove statistiche per valutare la significatività delle differenze e delle correlazioni dei dati; in particolare il test t di Welch è stato utilizzato per evidenziare differenze significative tra i valori di $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{seawater}}$ registrati nei due siti di campionamento (sito A e sito B) e per verificare (confrontando le mediane) se i valori di $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ delle due popolazioni di *P. lividus* raccolte dal sito A (esemplari 1-45) o dal sito B (esemplari 46-90) potessero essere considerati uguali (ipotesi nulla) o significativamente diversi (ipotesi alternativa). Prima della trasformazione di $[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ in $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$, tutti i valori di $[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ sono stati aumentati di 1 ppb per evitare il verificarsi di valori indefiniti di $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ relativi alle concentrazioni pari a 0.

Inoltre, per l'intero gruppo di 90 ricci, sono stati utilizzati grafici a dispersione e di correlazione per verificare l'esistenza di correlazioni tra il $\log_{10}[\text{PFOA}]$ in una data matrice di *P. lividus* e $\log_{10}[\text{PFOA}]_{\text{TOT}}$ nello stesso individuo. Sono stati eseguiti i test F di significatività generale per verificare se tali modelli di regressione lineare fornissero una migliore adattabilità ai dati rispetto a un modello che non contiene variabili indipendenti.

L'analisi permutazionale multivariata della varianza PERMANOVA [Anderson & Walsh, 2013] è stata eseguita per valutare le differenze tra i profili di contaminazione da PFOA tra i ricci di

mare raccolti dal sito A e dal sito B. Per tale elaborazione, il progetto sperimentale comprendeva un fattore (sito) con due livelli (fissi e ortogonali) e quattro variabili corrispondenti alle concentrazioni di PFOA in ciascun tipo di matrice organica analizzata (celomociti, fluido celomatico, gonadi o organi misti), compresa la concentrazione totale stimata $[PFOA]_{TOT}$. Nell'analisi ogni termine è stato testato da 999 permutazioni casuali. Infine, l'analisi delle componenti principali (PCA) è stata eseguita su un set di dati contenente cinque variabili, ossia le dimensioni del riccio di mare e le concentrazioni di PFOA in ogni tipo di campione (CF, CC e GoM) nonché nell'intero riccio di mare (TOT), per verificare la natura multivariata dei dati in un numero relativamente piccolo di dimensioni, limitando così la perdita di informazioni.

4.2.4 Conclusioni

Questo studio rappresenta la prima valutazione dei livelli di PFOA in diverse matrici organiche di ricci di mare adulti provenienti dall'ambiente selvatico, dimostrando il suo bioaccumulo nelle cellule e nei tessuti di *P. lividus*. Le analisi sulle foglie di *P. oceanica* hanno evidenziato la presenza di PFOA nella rete trofica, con un tasso elevato di bioconcentrazione rispetto ai livelli di PFOA nell'acqua di mare del sito di raccolta (Figura 25).

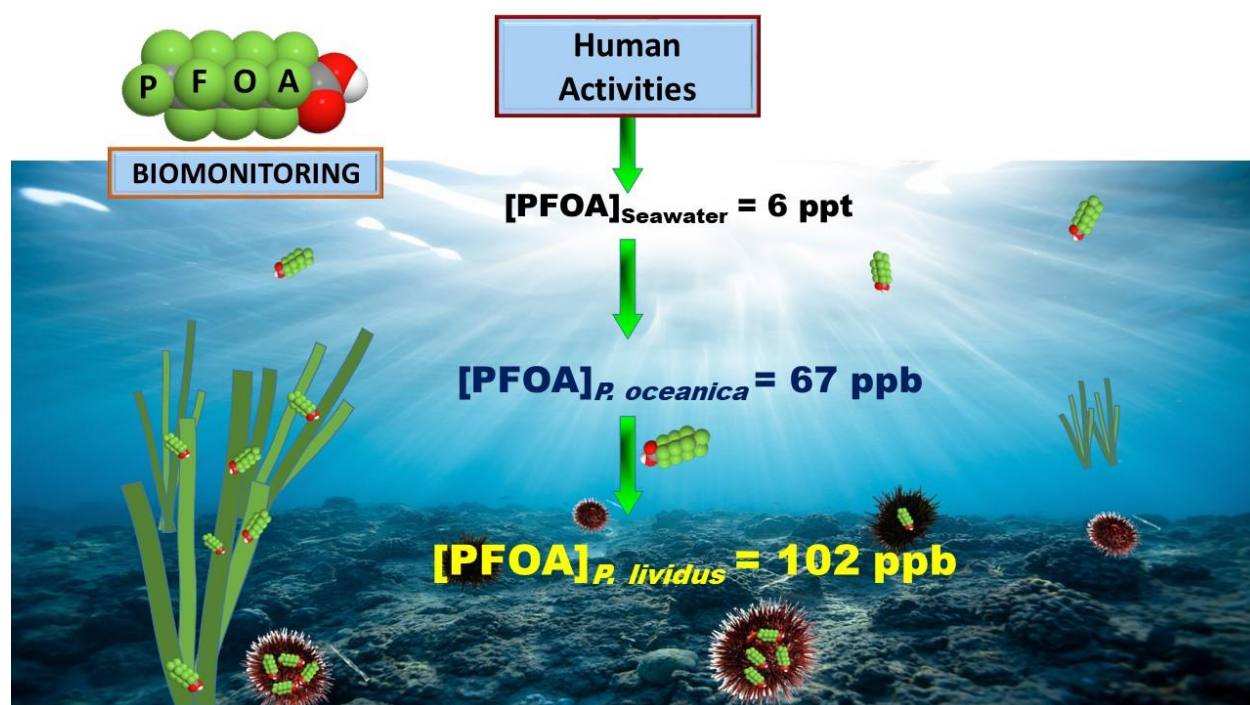


Figura 25. Illustrazione dei livelli medi di concentrazione di PFOA in due organismi (*P. oceanica* e *P. lividus*) in ambiente marino contaminato.

I dati sulla biodistribuzione nelle diverse cellule/tessuti di *P. lividus* hanno mostrato che i celomociti e le gonadi accumulavano maggiormente l'inquinante oggetto di indagine. Inoltre, i dati sul bioaccumulo in *P. lividus* ($\log_{10}BCF > 3.7$) hanno confermato la natura 'molto bioaccumulativa' del PFOA.

Il contenuto di PFOA nel fluido celomatico (CF) e nei celomociti (CC) è correlato alla quantità totale di PFOA presente nel riccio di mare suggerendo che è possibile effettuare campionamenti periodici non distruttivi per fini di biomonitoraggio ambientale.

Inoltre, l'analisi PCA, l'analisi PERMANOVA e i test t di Welch hanno dimostrato che il livello di contaminazione da PFOA era significativamente diverso tra i due siti di campionamento, evidenziando, ulteriormente, la possibilità di utilizzare *P. lividus* come bioindicatore della contaminazione da PFOA nell'ambiente marino.

4.3 Valutazione degli effetti di esposizione al PFOA in ambiente controllato su *Paracentrotus lividus*

Nel presente lavoro di ricerca è stato studiato il bioaccumulo, a diverse concentrazioni e tempi di esposizione, del PFOA nel riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

4.3.1 Introduzione

Il PFOA è uno dei composti più rappresentativi delle sostanze poli -perfluoroalchiliche (PFAS) che comprendono un ampio gruppo di oltre 4700 prodotti chimici artificiali [Xiao, 2017; EFSA, 2018] utilizzati da oltre 70 anni per diverse applicazioni nel settore industriale e domestico.

L'ampio utilizzo del PFOA e dei suoi precursori, insieme alla sua persistenza, ha portato ad una contaminazione ambientale diffusa che si verifica attraverso i processi di bioaccumulo nelle catene alimentari acquatiche e terrestri [EFSA, 2018; Savoca & Pace, 2021].

Nello studio descritto nel paragrafo precedente (4.2), è stata determinata la presenza di PFOA in *Paracentrotus lividus*, modello ideale per studi di biomonitoraggio [Savoca et al., 2021b] e sperimentali [Soualili et al., 2008].

I ricci di mare possono ingerire direttamente acqua di mare o cibo contaminati da PFOA, ma un'altra possibile origine di contaminazione è rappresentata dall'ingestione di prodotti fluorochimici, microplastiche o fibre contaminate da PFOA [Harada & Koizumi, 2009; Gallo et al., 2018].

Oltre ai tessuti, la cui analisi richiede il sacrificio dell'organismo, *P. lividus* offre la possibilità di utilizzare il fluido celomatico per monitorare l'assunzione di sostanze chimiche nel tempo [Savoca et al., 2021b]. Infatti, i celomociti, che circolano nel fluido che riempie la cavità celomatica degli echinodermi, svolgono una serie di funzioni diverse, tra cui la digestione, lo stoccaggio, il trasporto e l'eliminazione delle sostanze [Tahseen, 2009]. Pertanto, in analogia con altri echinodermi [Martín et al., 2019], è ragionevole supporre che anche i celomociti di *P. lividus* entrino a contatto con gli inquinanti accumulati dall'organismo. In questo contesto, nonostate siano riportati alcuni studi sul bioaccumulo di PFOA in organismi viventi acquatici esposti ad acqua contaminata [Ulhaq et al., 2014; Savoca & Pace, 2021], compresi studi di tossicità sugli embrioni di *P. lividus* [Mhadhbi et al., 2012], non esistono informazioni sulla cinetica di uptake del PFOA nell'adulto *P. lividus* né sui potenziali effetti di tale esposizione.

Pertanto, abbiamo deciso di valutare attraverso l'utilizzo dei ricci di mare l'uptake del PFOA e la sua biodistribuzione nel tempo e di valutare i cambiamenti dell'espressione genica nelle gonadi degli adulti esposti al PFOA e nella loro progenie allo stadio larvale.

4.3.2 Risultati

4.3.2.1 Analisi chimiche di acqua, fluido celomatico e gonadi

Per ogni acquario, i campioni di acqua di mare sono stati prelevati ogni settimana e controllati per la presenza di PFOA attraverso estrazione in fase solida (SPE) seguita da analisi LC-MS [Hong et al. 2015]. La media dei livelli di concentrazione di PFOA in tutti gli acquari, prima dell'aggiunta dell'inquinante, era inferiore a 10 ppt ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) così come negli acquari di controllo (X, Y, Z). In tutti gli acquari, la concentrazione di PFOA, durante l'intero periodo sperimentale, non ha mostrato particolari fluttuazioni bensì era stazionaria e vicina a quella nominale.

L'analisi chimica di $[\text{PFOA}]_{\text{CF}}$ nei ricci di mare esposti a 10 e 100 ppm ha dimostrato che questi bioaccumulano l'inquinante in modo variabile. In particolare, la prima settimana tutti gli animali hanno accumulato PFOA, mostrando un rapido assorbimento; tuttavia, da giorno 7 a giorno 14 i livelli registrati hanno mostrato tendenze di accumulo variabili sia tra gli individui esposti a concentrazioni diverse sia tra i diversi individui esposti alla stessa concentrazione. Relativamente agli individui esposti a 100 ppm, due ricci (F3 e F4) sono morti durante la prima settimana. Inoltre, tutti i ricci di mare degli acquari E ed F sono morti tra il 7° ed il 14° giorno, mentre i ricci di mare dell'acquario D (D1-D4) non sono sopravvissuti più di 21 giorni (Figura 26 e 27).

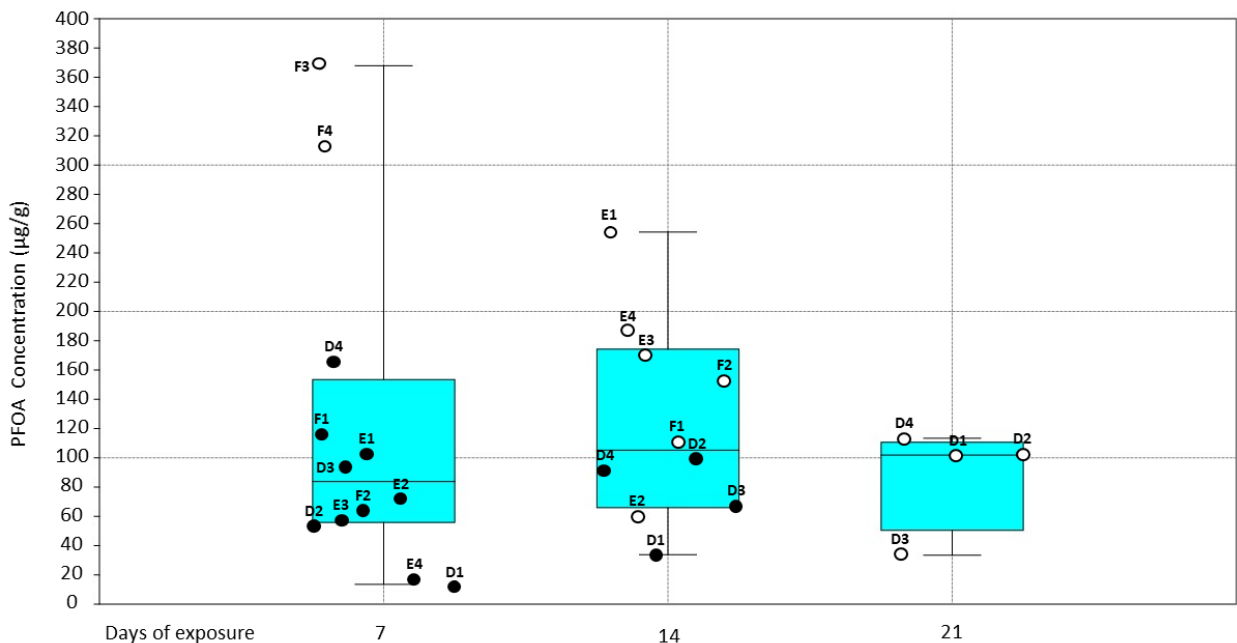


Figura 26. Distribuzione di $[\text{PFOA}]_{\text{CF}}$ in ogni riccio di mare esposto a 100 ppm. I punti vuoti indicano gli individui morti, quelli pieni gli individui in vita. Nell'asse x, vengono mostrati i giorni di campionamento del fluido celomatico (la dispersione dei punti lungo l'asse x all'interno dello stesso gruppo di campionamento è stata scelta arbitrariamente per evitare la

sovrapposizione dei punti), nell'asse y la concentrazione misurata è espressa in ppm.

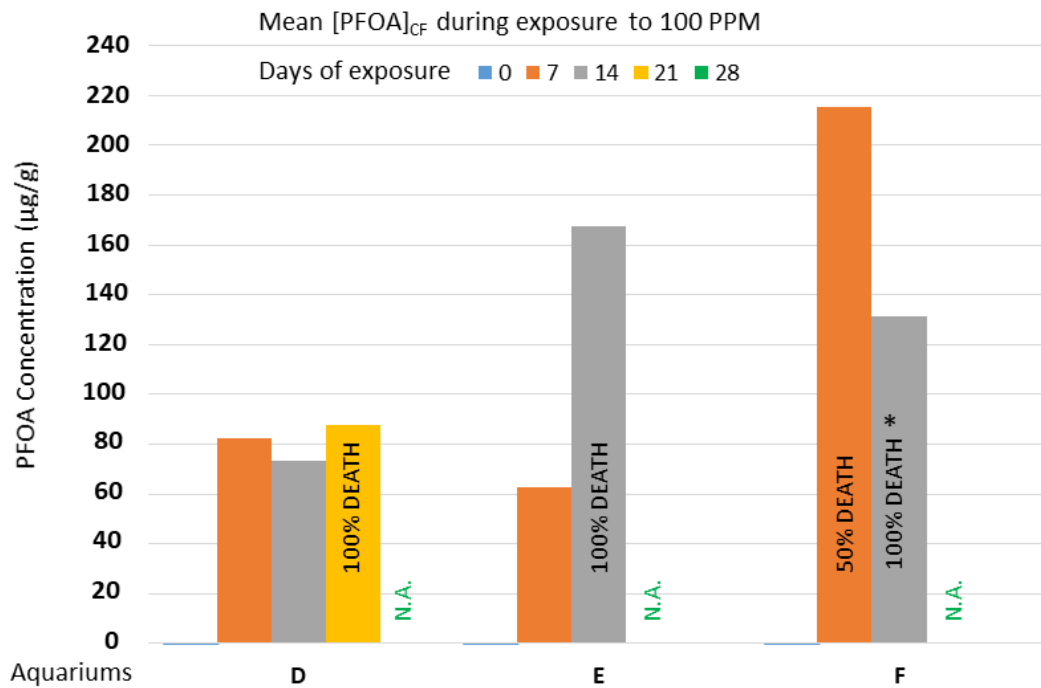


Figura 27. Media di [PFOA]_{CF}, misurata settimanalmente (giorni 0, 7, 14, 21, 28) in individui esposti a 100 ppm di PFOA appartenenti alla stessa vasca (D, E, o F). N.A = non disponibile a causa del tasso di mortalità del 100%. *La media di [PFOA]_{CF} misurata al 14° giorno nell’acquario F si riferisce solo a due campioni (F1 e F2).

I ricci di mare degli acquari A, B e C, dove la concentrazione nominale di PFOA era di 10 ppm, sono sopravvissuti fino alla fine del periodo sperimentale (28 giorni), giorno in cui è stata registrata in tutti i campioni la concentrazione massima di PFOA (Figura 28).

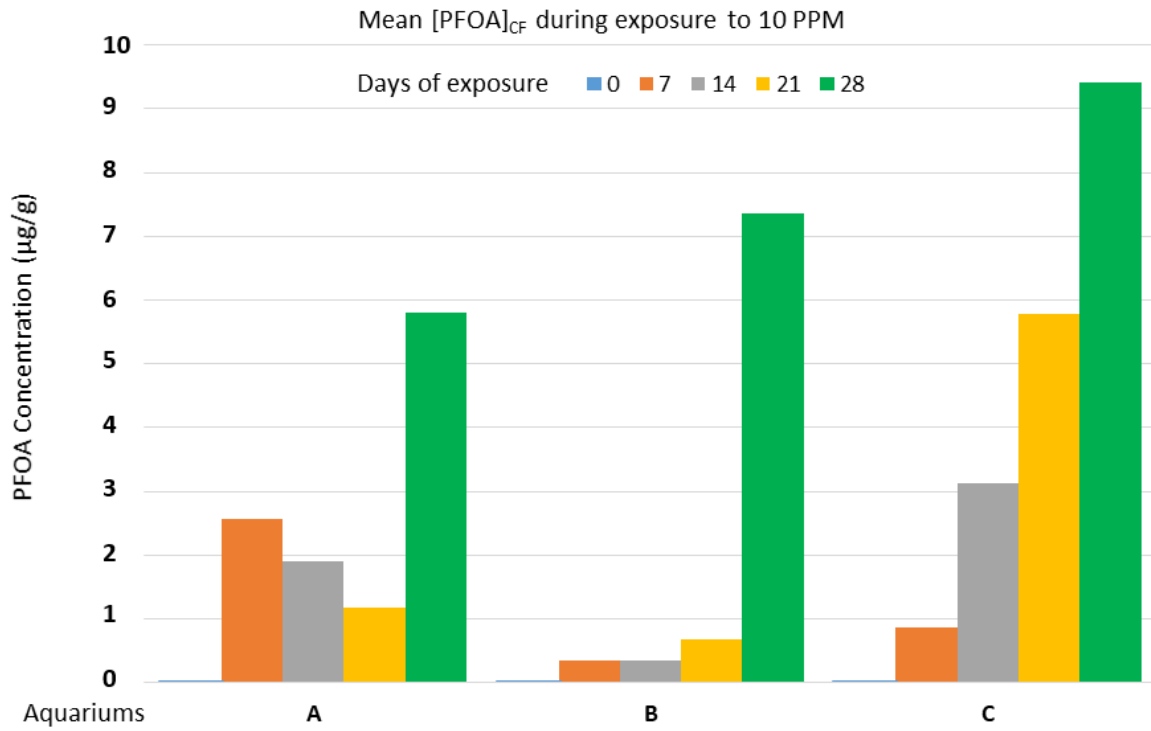


Figura 28. Media di [PFOA]_{CF} misurata settimanalmente (giorni 0, 7, 14, 21, 28) degli individui appartenenti alla stessa vasca (A, B, o C) contenente 10 ppm di PFOA.

Come previsto, [PFOA]_{CF} nei ricci di mare degli acquari di controllo non ha mostrato variazioni particolari, rimanendo sempre nell'ordine di pochi ppb (Figura 29).

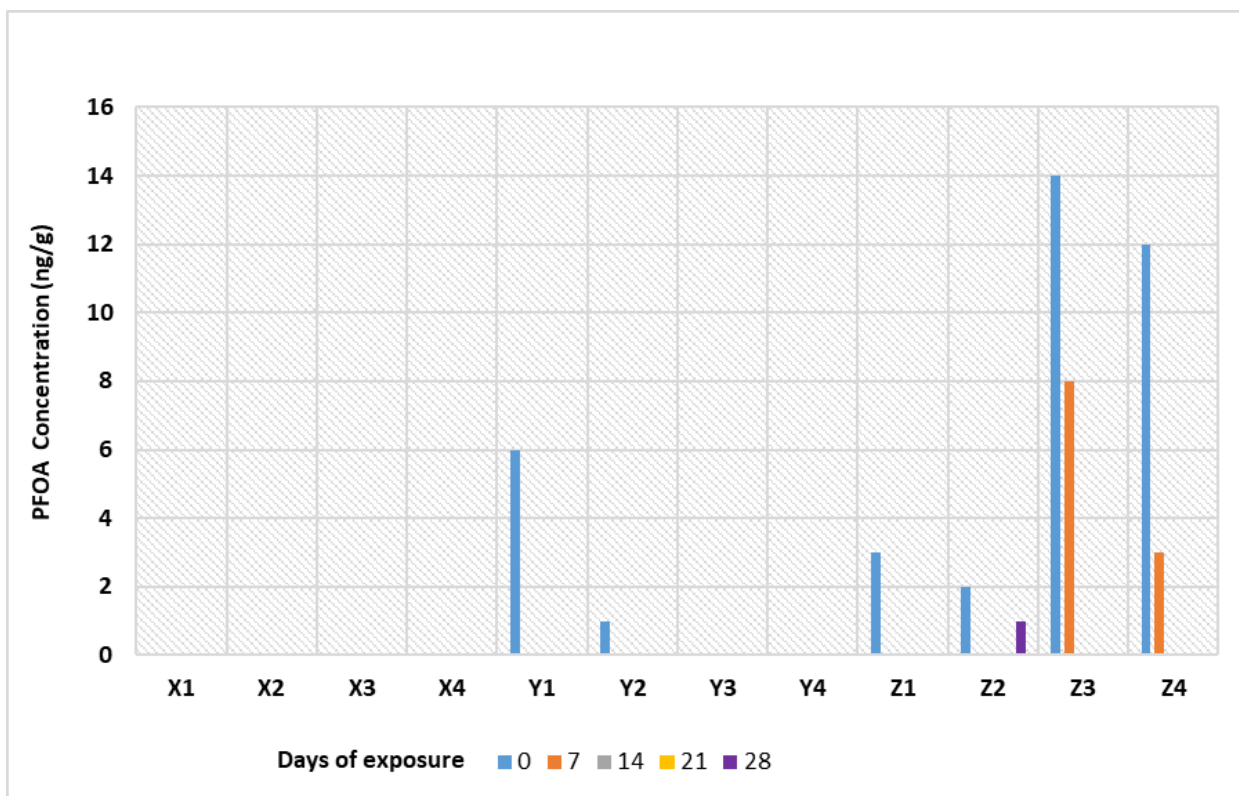


Figura 29. Andamento del $[PFOA]_{CF}$ nei singoli ricci di mare analizzati settimanalmente provenienti dagli acquari di controllo in cui il PFOA non è stato aggiunto.

Per verificare la biodistribuzione dell'inquinante in tutte le matrici coinvolte ed il possibile trasferimento dello stesso agli embrioni, la concentrazione di PFOA nelle gonadi $[PFOA]_G$ è stata analizzata al giorno 28 o al giorno "28+2" dopo il lavaggio (poiché per il campionamento di questa matrice è necessario sacrificare l'animale). Nelle gonadi dei ricci di mare appartenenti ai gruppi di controllo, non esposti all'inquinante, non sono state rilevate tracce significative di PFOA (Tabella 6).

Tabella 6. Concentrazione di PFOA in ppb nel fluido celomatico e nelle gonadi degli individui di controllo al giorno della morte (28) mediante sacrificio (S). M: Maschio; F: Femmina.

Individuals not exposed (0 PPM)	Day of death	$[PFOA]_{CF}$	$[PFOA]_G$
X1 (M)	S (28)	0	0
X2 (F)	S (28)	0	0
X3 (M)	S (28)	0	0
X4 (F)	S (28)	0	0
Y1 (M)	S (28)	0	0

Y2 (F)	S (28)	0	0
Y3 (M)	S (28)	0	0
Y4 (M)	S (28)	0	0
Z1 (F)	S (28)	0	0
Z2 (F)	S (28)	1	0
Z3 (M)	S (28)	0	0
Z4 (M)	S (28)	0	0

A differenza del gruppo di controllo, nei ricci provenienti dagli acquari trattati, in generale, [PFOA]_G era superiore al valore [PFOA]_{CF} con una sola eccezione (si veda A1 in Tabella 7); inoltre, i ricci di mare degli acquari D, E ed F esposti a 100 ppm, morti una o più settimane prima della fine dell'esperimento, mostravano valori molto più elevati [PFOA]_G rispetto a quelli esposti a 10 ppm di PFOA (Tabella 7).

Tabella 7. Concentrazione di PFOA in ppm nel fluido celomatico e nelle gonadi degli individui esposti a 10 o 100 ppm rilevata al giorno del decesso (7, 14, 21 o 28) o dopo il washout (28+2). (N): morte naturale; (S): sacrificato; (M): maschio; (F): femmina; (U): indeterminato; riquadro in grigio: non misurabile; n.a.: non disponibile.

Individuals exposed to 10 ppm	Day of death	[PFOA] _{CF} at day 28	[PFOA] _{CF} after washout	% Decontamination	[PFOA] _G at day 28	[PFOA] _G after washout
A1 (F)	(S) 28	5.66			4.56	
A2 (M)	(S) 28+2	9.96	0.90	91 %		6.62
A3 (F)	(S) 28	0.57			4.41	
A4 (U)	(S) 28+2	6.99	0.42	94 %		n.a.
B1 (F)	(S) 28+2	25.43	5.19	80 %		n.a.
B2 (M)	(S) 28	0.41			40.54	
B3 (U)	(S) 28+2	2.89	0.09	97 %		23.83
B4 (M)	(S) 28	0.67			11.39	
C1 (M)	(S) 28	10.08			13.02	
C2 (F)	(S) 28+2	17.25	6.49	62 %		16.92
C3 (U)	(S) 28+2	5.43	0.04	99 %		16.18
C4 (F)	(S) 28	4.90			8.80	

Individuals exposed to 100 ppm	Day of death	[PFOA]_{CF}	[PFOA]_G
D1	(N) 21	102.55	511.06
D2	(N) 21	101.24	609.38
D3	(N) 21	33.49	354.25
D4	(N) 21	113.32	497.81
E1	(N) 14	254.23	346.37
E2	(N) 14	60.04	370.42
E3	(N) 14	170.24	277.22
E4	(N) 14	186.32	661.36
F1	(N) 14	110.00	464.58
F2	(N) 14	152.62	223.57
F3	(N) 7	367.92	388.28
F4	(N) 7	312.24	884.14

Dopo 28 giorni di esposizione a 10 ppm, la decontaminazione (washout) dal PFOA è stata verificata spostando sei dei dodici individui (due da ciascuno dei tre acquari: A, B e C) in un acquario con acqua di mare filtrata (FSW) incontaminata e analizzando sia il fluido celomatico che le gonadi dopo 2 giorni di washout (28+2 in Tabella 7). La percentuale di decontaminazione è stata calcolata come $100 \times (1 - [\text{PFOA}]_{\text{CF}28+2} / [\text{PFOA}]_{\text{CF}28})$ e i risultati hanno mostrato una decontaminazione media del fluido celomatico dell'87 % (Tabella 7).

4.3.2.2 Osservazione morfologica degli embrioni

La presenza di alterazioni dello sviluppo è stata studiata in embrioni ottenuti dalla fecondazione in vitro di gameti provenienti da gonadi di individui di *P. lividus* esposti a 10 ppm di PFOA e individui provenienti dagli acquari di controllo sacrificati al giorno 28. In particolare, le uova sono state isolate dalle gonadi mature di tre femmine dagli acquari A, B e C, e di tre femmine dagli acquari di controllo X, Y e Z, che sono state fecondate con spermatozoi di un maschio appartenente allo stesso acquario di trattamento o di controllo.

Il successo della fecondazione è stato superiore al 98% in tutti i batch di uova e, gli stadi di sviluppo, così come gli embrioni, sono stati monitorati con attenzione fino allo stadio pluteo (48 ore dall'avvenuta la fecondazione (p.f.)). Ogni fecondazione è stata effettuata in triplicato e sono stati contati e analizzati morfologicamente 300 embrioni per lotto. In questo modo, per

scoprire se l'esposizione al PFOA del genitore possa portare a difetti dello sviluppo nella progenie, sono stati osservati al microscopio ottico 900 embrioni per ciascuno dei 6 casi (Figure 30 e 31).

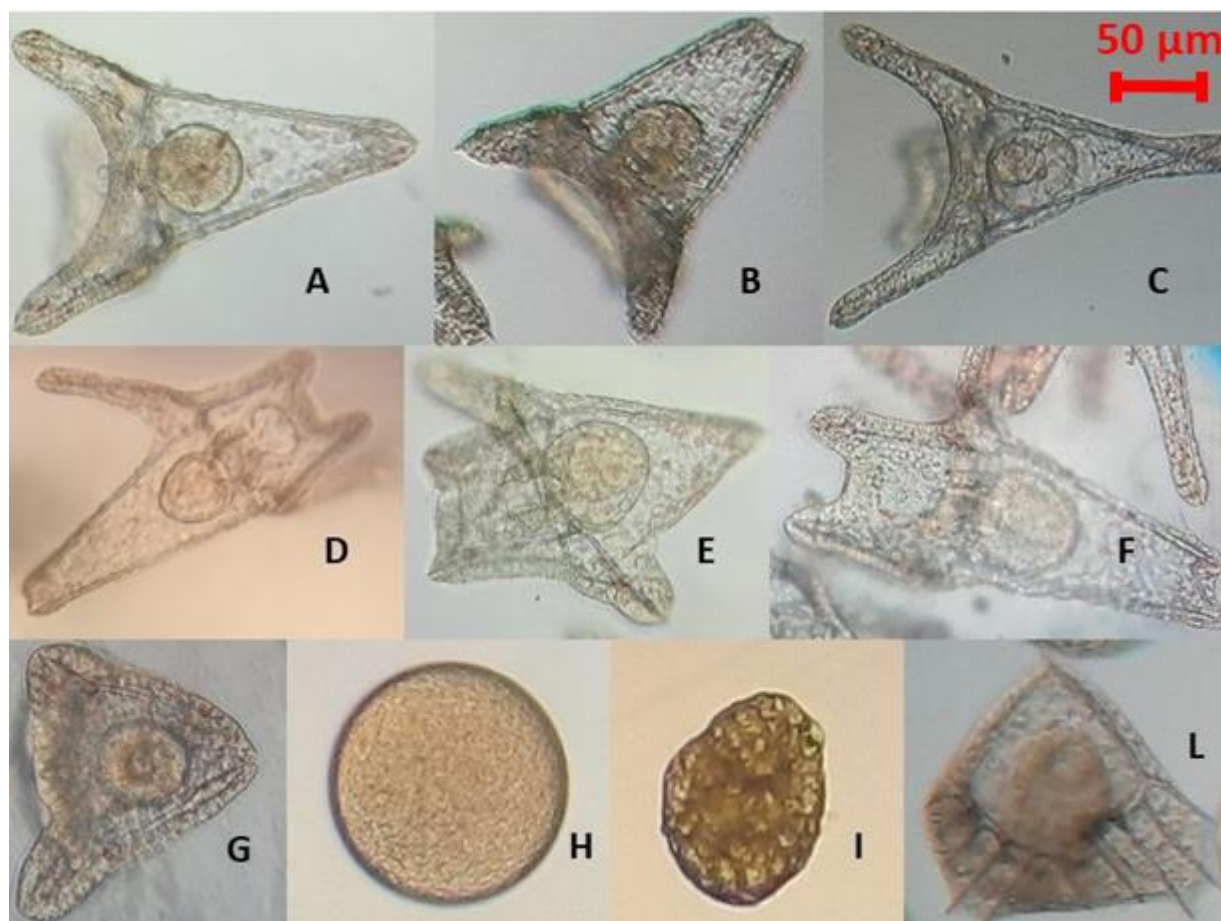


Figura 30. Immagini rappresentative di embrioni e uova ottenute da genitori esposti a 10 ppm di PFOA e non esposti (controllo). A: pluteo normale; B: livello 1- posizione errata degli assi scheletrici (spicole separate); C: livello 1- posizione errata degli assi scheletrici (spicole incrociate); D-E: livello 1- posizione errata degli assi scheletrici (variabile); F: livello 2- assi scheletrici incompleti o assenti (ectoderma fratturato); G: livello 3- sviluppo bloccato (prisma/prepluteo, stadi non sviluppati). Livelli non classificati: (H: uovo non fecondato; I: uovo/embrione degradato; L: sviluppo aberrante, malformazione non specifica).

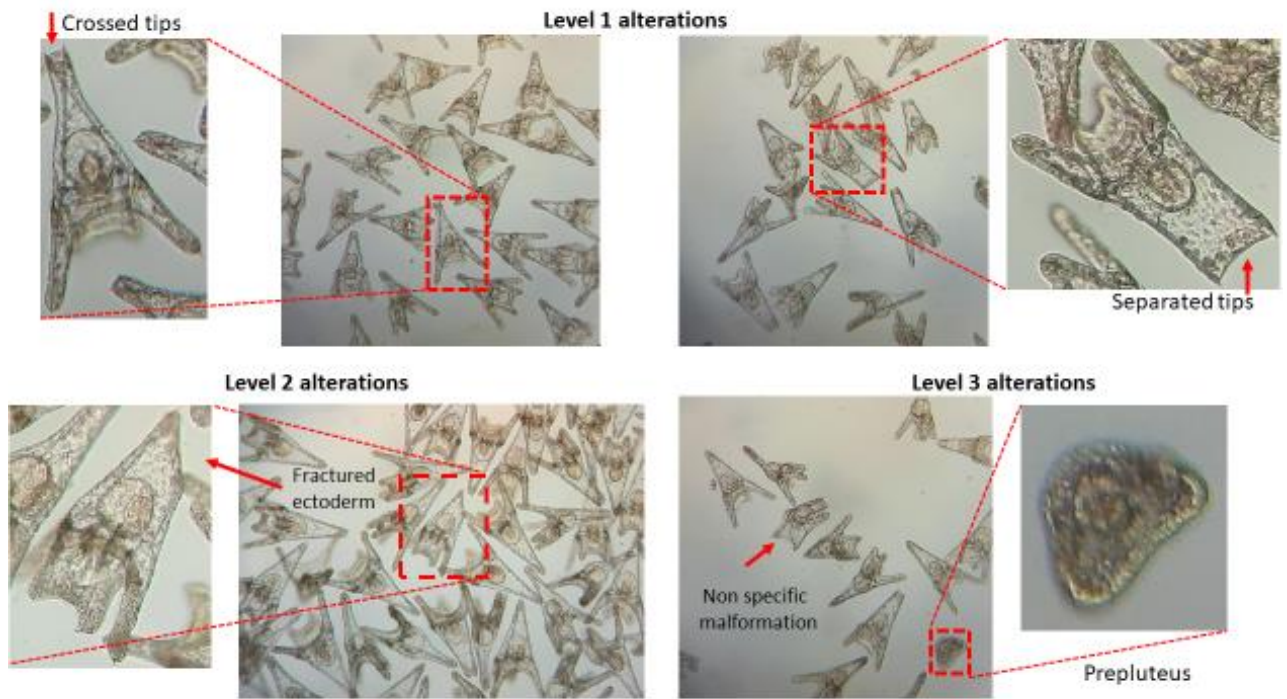


Figura 31. Esempi di presenza e alterazioni dello sviluppo osservati negli embrioni di *P. lividus* allo stadio di pluteo (ingrandimento 10x).

Le alterazioni delle larve sono state valutate utilizzando una classificazione a tre livelli secondo Carballeira et al. [2012] (Figura 32).

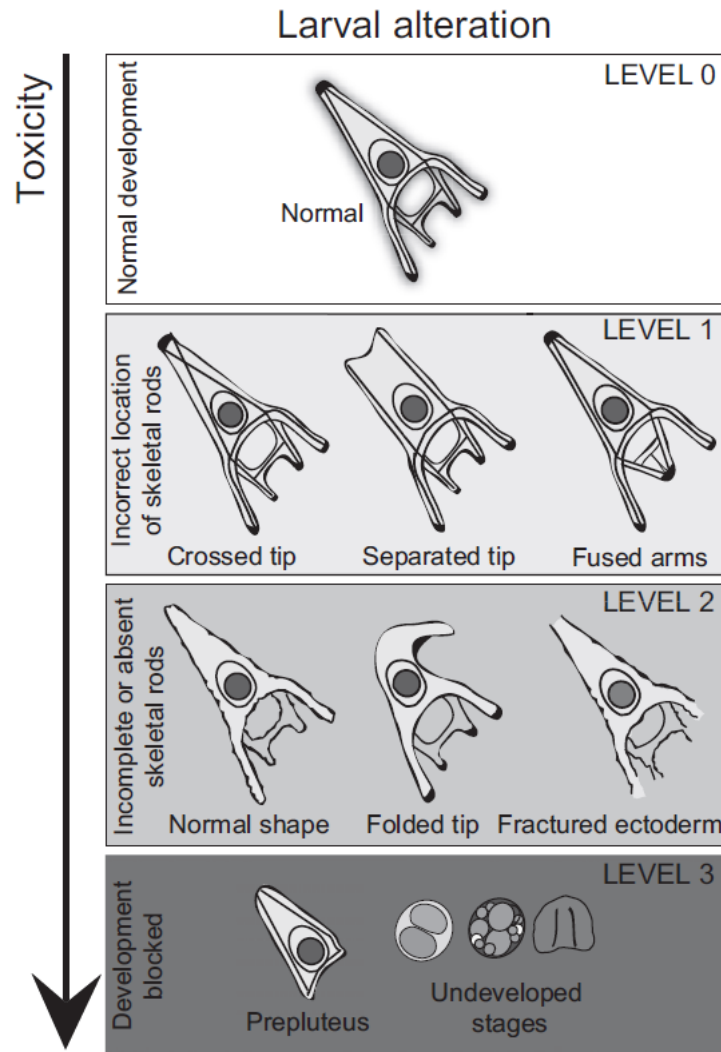


Figura 32. Classificazione delle malformazioni larvali in base al grado di alterazione secondo Carballeira et al. [2012].

La percentuale di anomalie riferita a ciascun livello di severità è stata calcolata dopo aver osservato un totale di circa 6000 embrioni ottenuti dalle gonadi di ciascuna femmina di riccio di mare (Figura 33). Le uova non fecondate e gli embrioni degradati non sono stati considerati nelle osservazioni perché erano meno del 2% in tutti i gruppi osservati.

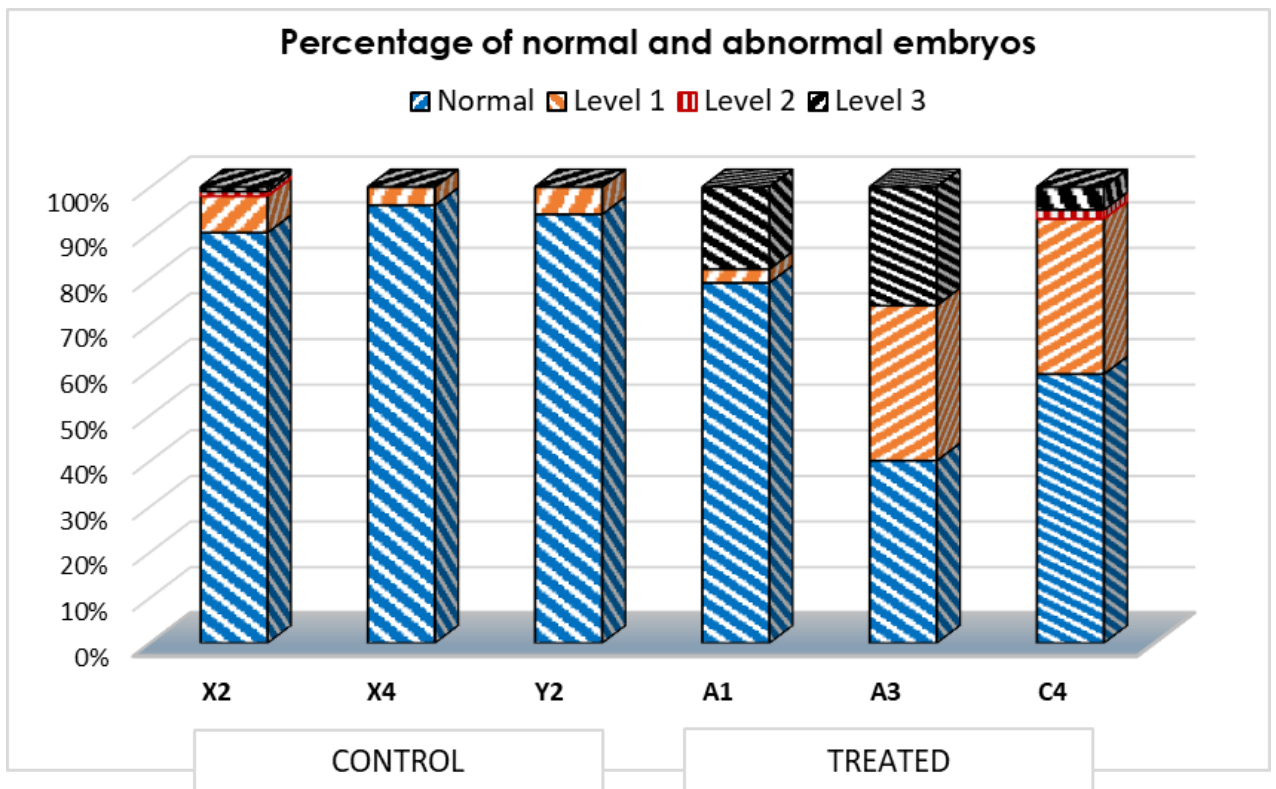


Figura 33. Pannello rappresentativo delle percentuali di anomalie per ciascun livello di severità (livello 1, 2, 3), osservate in embrioni a 48h p.f. ottenuti da ricci di mare non esposti all'inquinante: X2, X4, Y2 ed in embrioni ottenuti da ricci di mare esposti a 10 ppm di PFOA: A1, A3, C4.

Confrontando il numero di larve con anomalie dello sviluppo ottenute dagli individui trattati (a 10 ppm) e non trattati (controllo) con PFOA, sono state rilevate differenze significative, in particolare si raggiunge il 60% dei difetti nel primo caso (ad es. A3 in Figura 33) e solo fino al 10% nel secondo (X2 in Figura 33).

Tuttavia, al fine di indagare ulteriormente le anomalie di tutti i gruppi di embrioni, sono stati anche considerati i diversi gradi di malformazione di livello 1: basso grado (L) medio (M) alto grado (H) (Figura 34).

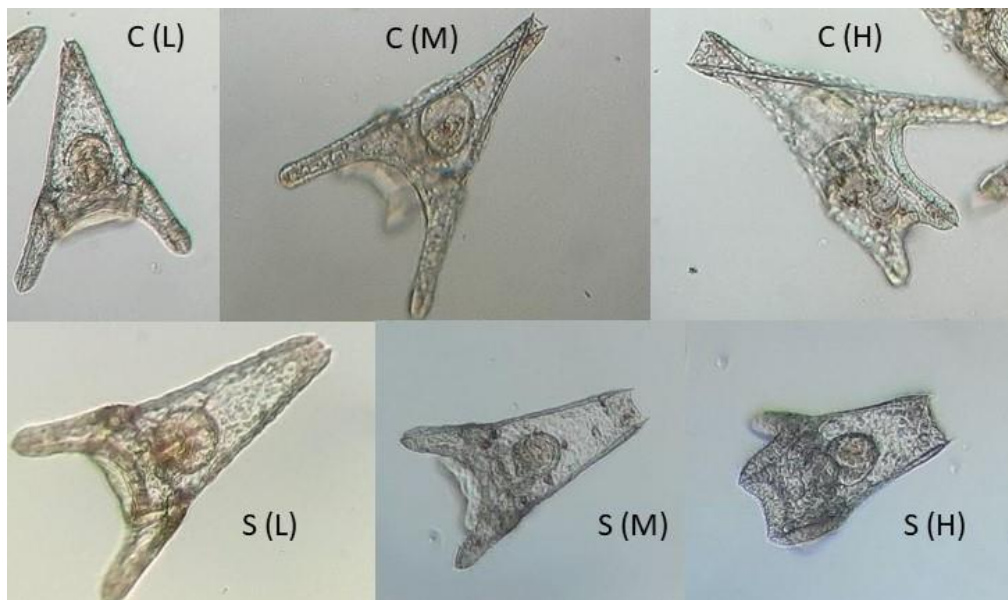


Figura 34. Sottocategoria delle anomalie di livello 1 con severità variabile dal grado basso (L) medio (M) all'alto grado (H) negli embrioni con spicole incrociate: C e separate: S.

Questa analisi ha evidenziato un grado di severità di malformazione di livello 1 più elevato negli embrioni ottenuti da ricci di mare esposti a PFOA rispetto ai gruppi di controllo (Figura 35).

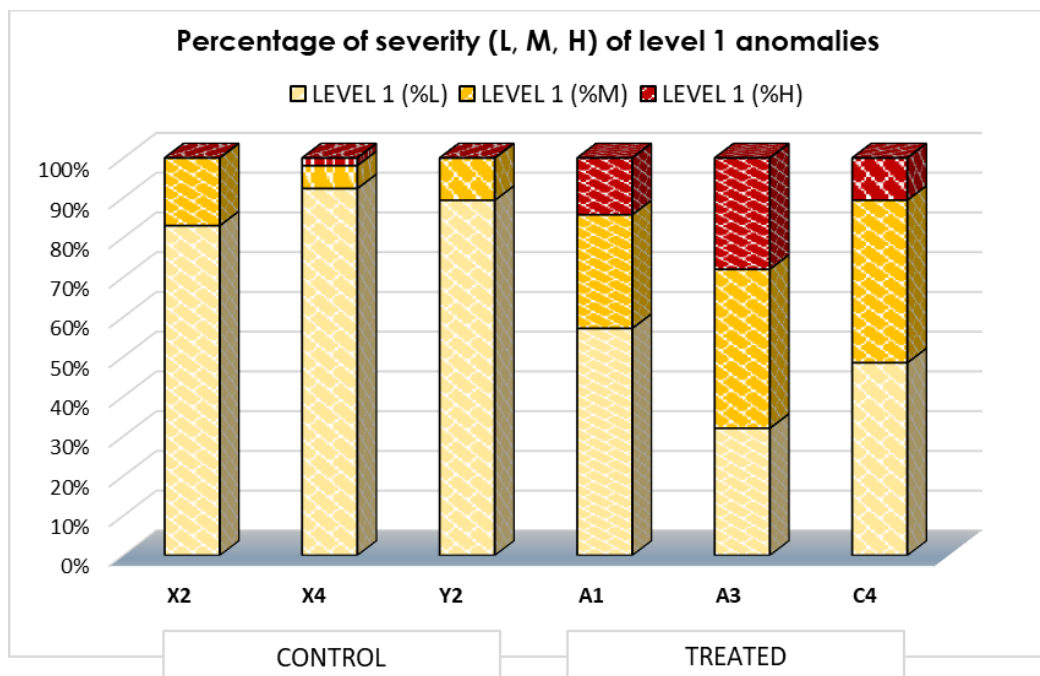


Figura 35. Pannello rappresentativo delle percentuali di anomalie di livello 1: grado basso (L), medio grado (M), alto grado (H), osservate in embrioni a 48h p.f. ottenuti da ricci di mare degli acquari di controllo: X2, X4, Y2 ed in embrioni ottenuti da ricci di mare esposti a 10 ppm di PFOA: A1, A3, C4.

4.3.2.3 Effetti del PFOA sull'espressione genica in gonadi ed embrioni

Per valutare gli effetti dell'esposizione per 28 giorni a 10 ppm di PFOA è stata inoltre analizzata l'espressione di alcuni geni marcatori, legati a pathways di sopravvivenza o sviluppo nelle gonadi e negli embrioni dei ricci di mare.

➤ Profilo di espressione genica nelle gonadi

In questa analisi è stato osservato che l'espressione genica ha subito variazioni in funzione dell'accumulo dell'inquinante nelle gonadi, mostrando, in generale, una upregolazione dei geni target per livelli di assorbimento superiori a 10 ppm e una downregolazione per valori di bioaccumulo inferiori a tale concentrazione. Il profilo di espressione di sei diversi geni nelle gonadi è mostrato in Figura 36.

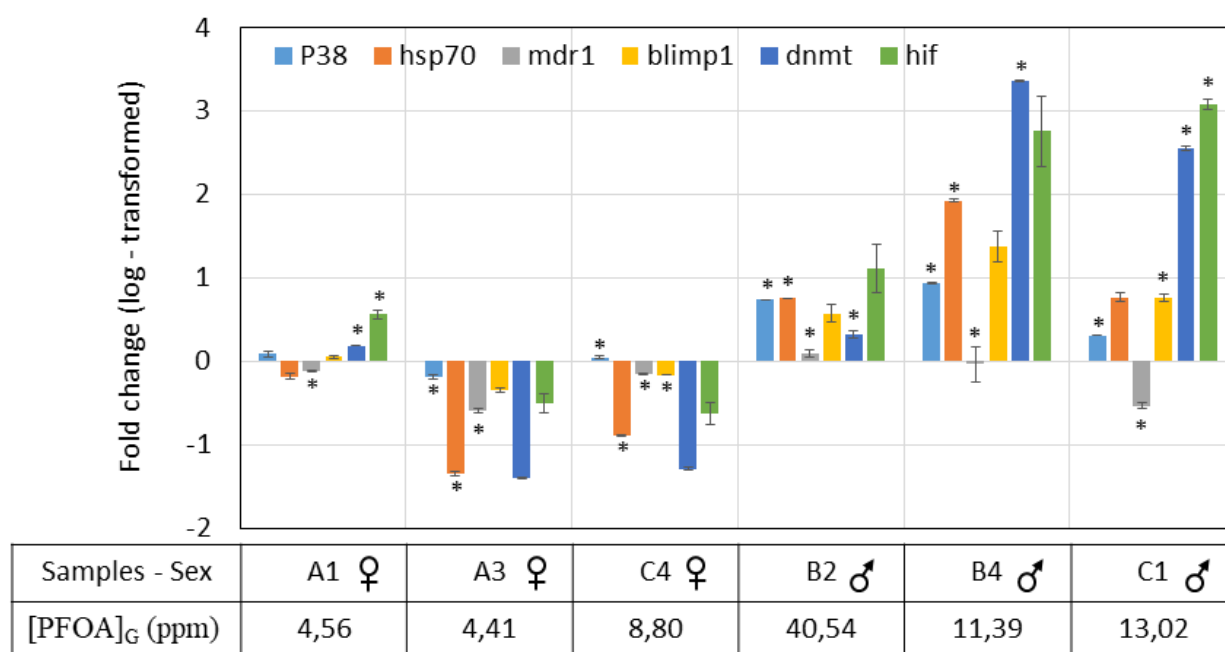


Figura 36. Alterazioni dell'espressione genica nelle gonadi dei ricci di mare esposti a 10 ppm di PFOA. Rappresentazione grafica che mostra le differenze del livello di espressione di ciascun gene analizzato nelle gonadi di *P. lividus* trattati rispetto alle gonadi degli individui di controllo, normalizzata con l'espressione del gene *I8S*

Asse y: scala dei valori logaritmici del fold change; asse x: nomi dei campioni, sesso e concentrazione di PFOA rilevata per i relativi campioni. Le barre rappresentano i valori medi delle tre diverse repliche tecniche \pm SD. La significatività statistica per ciascun gene target tra i valori dei cicli di quantificazione (Cq) in triplicato del controllo e del campione trattato è indicata con l'asterisco (*: $p < 0.05$).

I due geni coinvolti nei meccanismi di risposta canonici allo stress, *P38 MAPK* (P38 chinasi proteiche attivate dal mitogeno) e *HSP70* (proteine da shock termico 70), sono stati up o downregolati, con diversa intensità, in base al sesso degli individui. Infatti, *P38 MAPK* è stato upregolato in tutte le gonadi, con l'eccezione della femmina A3, ma con valori più elevati nei maschi. Allo stesso modo, *HSP70* è stato upregolato nelle tre gonadi maschili (B2, B4 e C1) e downregolato nelle femmine (A1, A3 e C4). Dei due geni coinvolti nei meccanismi di detossificazione e sopravvivenza, *MDR1* (proteina di resistenza multifarmaco 1) e *HIF1A* (fattore di trascrizione alfa dell'ipossia-inducibile 1), il primo è stato downregolato in 5 campioni su 6 (leggermente upregolato solo in B2), mentre il secondo gene, diversamente, è stato upregolato nelle tre gonadi maschili ma downregolato nelle femmine tranne in A1. Analogamente, i geni coinvolti nella regolazione trascrizionale, *BLIMP1* (proteina di maturazione indotta dai linfociti B 1), e *DNMT1* (DNA metiltransferasi 1) sono entrambi upregolati nei maschi e downregolati in due delle tre gonadi femminili (A3 e C4) mentre in A1 sono entrambi molto debolmente upregolati (Figura 36).

➤ Profilo di espressione genica negli embrioni

Le alterazioni dei patterns di espressione genica negli embrioni ottenuti da coppie di genitori esposti a 10 ppm di PFOA sono riportate nella Figura 37.

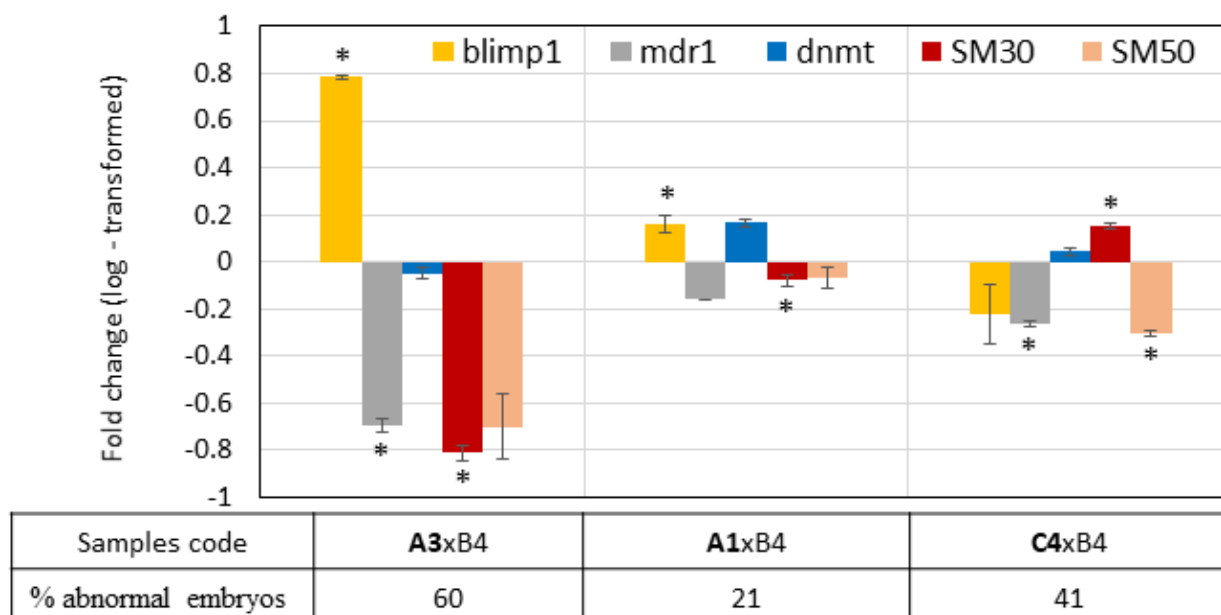


Figura 37. Alterazioni dell'espressione genica in embrioni ottenuti da ricci di mare esposti a 10 ppm di PFOA. Rappresentazione grafica che mostra differenze del livello di espressione dei geni target rispetto agli embrioni di controllo, normalizzata con l'espressione del gene *18S*.

Asse y: la scala dei valori logaritmici del fold change, asse x: nomi dei campioni degli embrioni (A1xB4, A3xB4, C4xB4) e la percentuale di embrioni anormali. Le barre rappresentano i valori medi di Cq delle tre diverse repliche tecniche \pm SD. La significatività statistica per ciascun gene bersaglio tra valori Cq (in triplicato) del controllo e del campione trattato è indicata con asterischi (*: $p < 0.05$).

Rispetto alle variazioni delle espressioni geniche registrate nelle gonadi, quelle registrate negli embrioni sono state meno significative. *BLIMP1* è stato upregolato in A1xB4 e A3xB4 e downregolato in C4xB4, *MDR1* è stato downregolato nei tre campioni analizzati mentre *DNMT1* non ha subito evidenti up o downregolazioni (solo leggermente upregolato in A1xB4). Per quanto riguarda i due geni embrione-specifici coinvolti nella morfogenesi delle larve dei ricci di mare, *SM30* e, *SM50*, la qRT-PCR ha rivelato che in tutti gli embrioni *SM50* era downregolato, mentre *SM30* era downregolato in A1xB4 e A3xB4 e upregolato in C4xB4.

4.3.3 Discussione

Questo studio fornisce i primi dati, ottenuti da esperimenti in condizioni controllate, sul bioaccumulo e sugli effetti del PFOA nel riccio di mare *P. lividus* e indirettamente sulla sua progenie allo stato larvale.

L'analisi chimica del [PFOA]_{CF} nei ricci di mare esposti a 10 e 100 ppm ha mostrato un effetto dose-dipendente di bioaccumulo dell'inquinante. Infatti, i ricci di mare esposti a 100 ppm, che sono morti durante prima settimana, dopo aver presentato progressivi segni debilitazione (perdita delle spine) (Figura 38), hanno mostrato valori di concentrazione di PFOA nel fluido celomatico e nelle gonadi molto più alti rispetto agli individui che sono sopravvissuti più a lungo (Tabella 7).



Figura 38. Esemplare di *P. lividus* esposto a PFOA che mostra la sua progressiva debilitazione (spine perse a causa dello stress indotto dal PFOA).

Questi risultati suggeriscono che la mortalità precoce, tra le altre possibili cause, è stata probabilmente dovuta all'eccessivo assorbimento dell'inquinante. Ad esempio, nei ricci di mare F3 e F4, morti la prima settimana, il $[PFOA]_{CF}$ era almeno tre volte più alto rispetto agli individui morti dopo tre settimane.

Abbiamo anche rilevato che i valori di concentrazione di PFOA nelle gonadi degli animali trattati (con 10 o 100 ppm di PFOA) erano in generale relativamente superiori rispetto a quelli riscontrati nel fluido celomatico prelevato lo stesso giorno dallo stesso individuo. Così, la morte precoce al 14° giorno di E2 esposto a 100 ppm di PFOA, che mostra valori relativamente bassi di PFOA nel fluido celomatico è stata probabilmente dovuta ad un più alto tasso di bioaccumulo dell'inquinante nelle gonadi. Gli individui della vasca D (100 ppm di PFOA) che sono sopravvissuti più a lungo (21 giorni) possono avere bioaccumulato l'inquinante nelle gonadi ad un tasso inferiore, ma il più lungo tempo di esposizione li ha comunque portati alla morte dopo sole tre settimane.

Così, nonostante la capacità differente degli individui di accumulare l'inquinante mostrata dai valori diversi di $[PFOA]_{CF}$ (Figura 39) e di $[PFOA]_G$, è possibile supporre che un tasso di assorbimento più elevato (acquario E e F) o un periodo di esposizione più lungo (vasca D) ad una così elevata concentrazione di PFOA (100 ppm) abbia portato alla morte di tutti gli individui prima della fine dell'esperimento di esposizione.

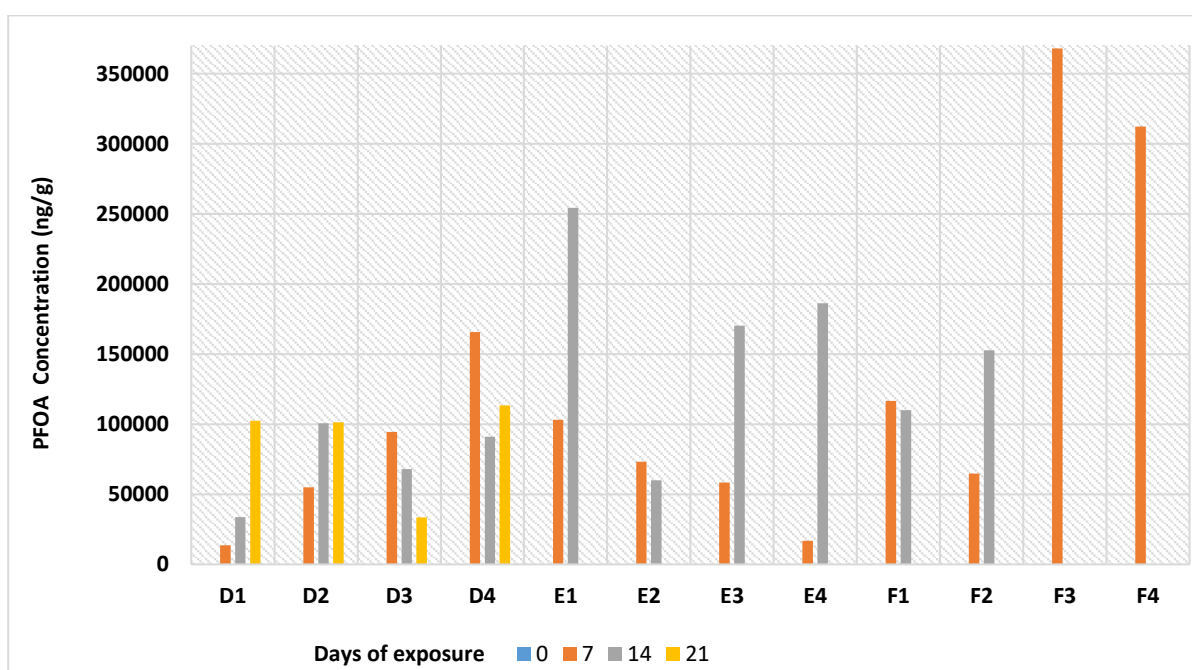


Figura 39. Gli istogrammi mostrano l'andamento del $[PFOA]_{CF}$ per ogni singolo riccio di mare analizzato settimanalmente durante il periodo di esposizione al PFOA ad una concentrazione nominale in FSW di 100 ppm.

Anche nel caso dei ricci di mare esposti a 10 ppm, la tendenza di assorbimento è stata differente nei diversi acquari e persino negli stessi soggetti nel tempo (Figura 39) probabilmente secondo i meccanismi di trasporto intraspecifici del PFOA (assimilazione ed eliminazione) mediati anche dai celomociti che svolgono un ruolo chiave nelle reazioni di difesa e in importanti funzioni immunitarie, come l'endocitosi e l'esocitosi [Smith et al. 2010].

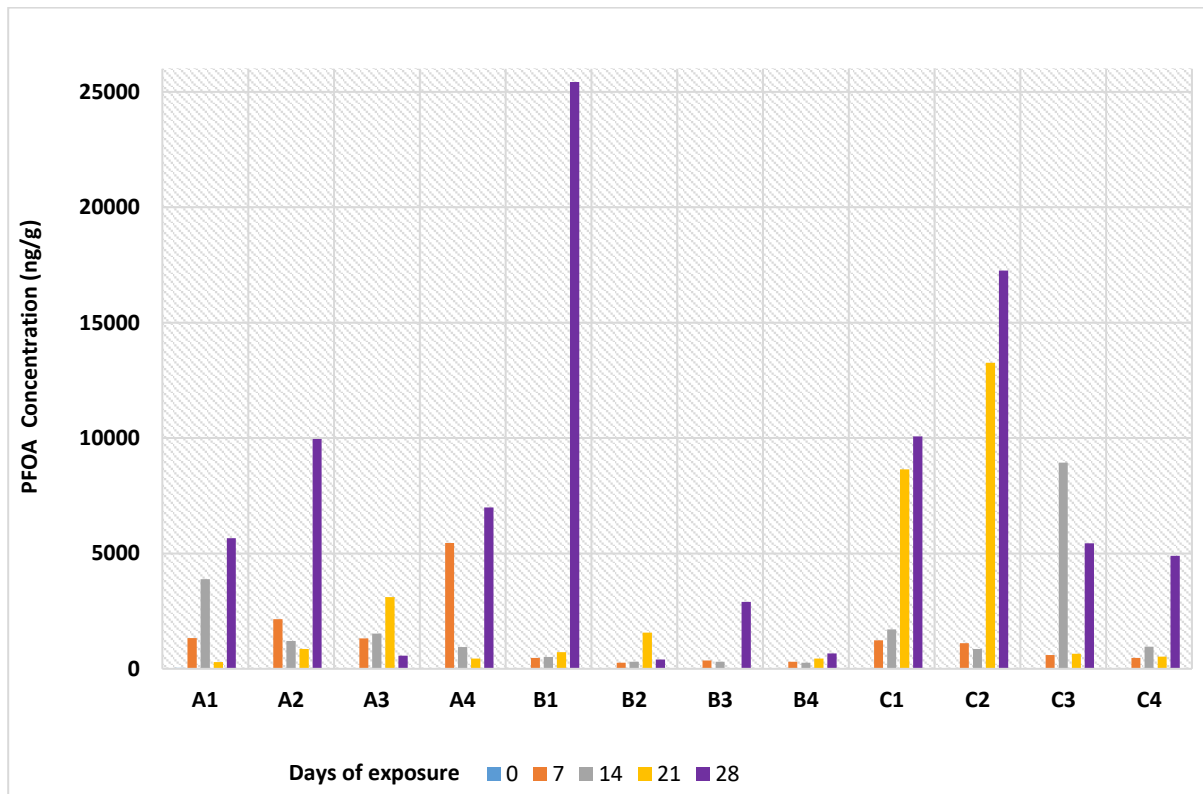


Figura 39. Gli istogrammi mostrano l'andamento del [PFOA]_{CF} per ogni singolo riccio di mare analizzato settimanalmente durante il periodo di esposizione al PFOA ad una concentrazione teorizzata in FSW di 10 ppm.

È importante notare che gli individui di *P. lividus* possono assorbire rapidamente l'inquinante nel fluido celomatico e nelle gonadi, tuttavia, se trasferiti in un ambiente pulito, possono attivare rapidamente processi di decontaminazione che eliminano significativamente il PFOA. Infatti, dopo 2 giorni di washout, la riduzione di PFOA nel fluido celomatico dei ricci esposti a 10 ppm per 28 giorni era compresa tra il 62% e il 99% (Tabella 7).

È interessante osservare che nei quattro soggetti esposti a 100 ppm, tra il giorno 7 e il giorno 14 (D3, D4, F1, E2), e in uno dell'acquario D (D3), tra il giorno 7 e il giorno 21, la concentrazione di PFOA nel fluido celomatico è diminuita (Figure 27 e 39), probabilmente a causa dell'attivazione di meccanismi di eliminazione dell'inquinante.

Attraverso l'analisi dei dati relativi ai livelli di PFOA nel fluido celomatico prima e dopo il

washout (negli stessi individui) e quelli delle gonadi prima e dopo il washout (in individui diversi) è possibile ipotizzare che il fluido celomatico subisca una decontaminazione da PFOA maggiore rispetto alle gonadi.

Riguardo le alterazioni di sviluppo embrionale, dalle osservazioni effettuate negli embrioni provenienti dai ricci trattati e non trattati sono state osservate sia larve normali che gravemente alterate (Figura 33). Tuttavia, gli embrioni ottenuti da ricci di mare esposti all'inquinante hanno mostrato un'incidenza e una severità maggiore di malformazioni. La distribuzione disomogenea dei livelli di anomalie era probabilmente dovuta ad un'elevata variabilità nella capacità di recupero dei singoli embrioni, come osservato per gli adulti. Questo risultato rappresenta la prima prova dei possibili effetti morfologici sulla progenie dei ricci di mare esposti al PFOA ed è in accordo con una precedente relazione di Mhadhbi et al. [2012] nella quale tuttavia l'inquinante è stato somministrato direttamente sugli embrioni.

Inoltre, al termine dell'esperimento di esposizione, una certa influenza del PFOA è stata osservata nel profilo di espressione di alcuni geni target sia nelle gonadi che negli embrioni. Nelle gonadi sono stati analizzati sei diversi geni marker (Figura 36). *P38 MAPK*, che svolge un ruolo essenziale nella regolazione dei meccanismi di difesa cellulare in risposta allo stress [Park et al. 2020] e *HSP70*, classe di chaperon molecolari che partecipano alla risposta allo stress e all'acclimatazione ambientale [Zuo et al., 2017], sono stati entrambi influenzati dal PFOA. In particolare, per entrambi è stata osservata una certa correlazione con il sesso e con la concentrazione di PFOA nelle gonadi oggetto di indagine. Analogamente ai nostri risultati, una upregolazione di *P38 MAPK* è stata osservata sia in alcuni granchi esposti ad altri POPs [Park et al., 2020] che (in funzione della concentrazione) in embrioni di rana esposti al PFOS [San-Segundo et al., 2016].

La stessa tendenza di up o downregolazione legata al sesso e all'assorbimento è stata osservata nelle gonadi anche per *MDRI*, componente chiave nei sistemi di difesa indotta da vari tipi di stress ossidativo associato all'esposizione agli xenobiotici [Gökirmak et al., 2012] e per *HIF1A*, gene coinvolto nella regolazione della risposta omeostatica cellulare e sistemica all'ipossia [Majmundar et al., 2010]. I geni coinvolti nella regolazione trascrizionale, *BLIMP1*, che svolge un ruolo chiave nei processi che portano alla specializzazione dei tessuti e alla determinazione della linea germinale [Ohinata et al., 2005], e *DNMT1*, che è responsabile del mantenimento dei pattern di metilazione del DNA [Schulz et al., 2018], erano entrambi upregolati nei maschi e principalmente downregolati nelle gonadi femminili. Tale deregolazione di *DNMT1* è attesa poiché è noto che l'esposizione a sostanze tossiche influenza l'espressione della DNA metiltransferasi (*DNMT*), alterando il complesso modello di metilazione [Di Natale et al., 2019]

ed è stato già stato reso noto che, nel riccio di mare *Glyptocidaris crenularis*, il PFOS ha indotto alterazioni nella metilazione del DNA [Ding et al., 2015].

Nel presente studio sono stati analizzati anche i cambiamenti nei profili di espressione genica di embrioni ottenuti da coppie di individui esposti a 10 ppm di PFOA (Figura 37). L'espressione del gene *DNMT1*, per lo più inalterata, ha mostrato una leggera downregolazione solo negli embrioni A3xB4 in cui è stata rilevata la maggiore quantità di anomalie totali (60%). Invece, entrambi i profili di espressione genica di *MDR1* e *BLIMP1* differiscono dai controlli, come ci si può aspettare se si considera la loro funzione di detossificazione. In particolare, *MDR1* è stato downregolato in tutti e tre i campioni, come già osservato in un altro studio di esposizione ad altri inquinanti che inducono malformazioni negli embrioni di *P. lividus* e che ne attivano diversi meccanismi di difesa [Ruocco et al., 2016].

Nel caso di *SM50*, che svolge un ruolo chiave nella definizione dello spazio extracellulare in cui si verifica la deposizione delle spicole, e *SM30*, coinvolto nella secrezione delle componenti delle spicole [Urry et al., 2000], le differenze rispetto all'espressione negli embrioni di controllo potrebbero spiegare le percentuali di malformazione legate alla forma e al numero delle spicole. Questa tendenza generale di downregolazione dei geni specifici coinvolti nei processi di scheletogenesi (*SM30* e *SM50*) è in linea con altri studi condotti su larve di ricci di mare dove sono state osservate anomalie nella morfogenesi scheletrica indotte da inquinanti [Duloquin et al., 2007; Marrone et al., 2012; Varrella et al., 2014]. Più in generale, è interessante notare che l'intensità del cambiamento di espressione di tutti i geni, escludendo *DNMT1*, riflette la percentuale di anomalie morfologiche.

4.3.4 Materiali e metodi

4.3.4.1 Campionamento e disegno sperimentale

Un totale di 36 esemplari adulti di ricci di mare (*Paracentrotus lividus*) sono stati raccolti nella costa nord-occidentale della Sicilia vicino a Capo Zafferano (38° 06' 4"N; 13° 32' 14"E) e immediatamente trasportati (secondo le stesse modalità descritte nel lavoro precedente [Savoca et al., 2021b]) in laboratorio. Il sito è stato scelto sulla base delle analisi chimiche dell'acqua di mare precedentemente condotte che hanno mostrato una minima contaminazione da PFOA [Savoca et al., 2021b]. All'arrivo in laboratorio, prima della stabulazione, è stato prelevato un campione di fluido celomatico da ciascun riccio di mare per valutare la concentrazione iniziale di PFOA. Analogamente, è stata analizzata l'acqua di mare utilizzata per gli esperimenti. I risultati hanno mostrato che le concentrazioni di PFOA nel fluido celomatico erano inferiori a 5 ppb ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e in acqua di mare erano inferiori a 10 ppt ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$).

Gli echinodermi sono stati stabulati per 8 giorni in un acquario da 200 litri riempito con acqua di mare filtrata con membrane Millipore da 30 micrometri. La salute dei ricci di mare è stata monitorata attraverso un'osservazione continua e non si è verificata alcuna mortalità durante il periodo di acclimatazione. I ricci di mare sono stati poi trasferiti per un periodo di 28 giorni in nove acquari, ciascuno riempito con 15 litri di FSW senza (controllo) o con una concentrazione nota di PFOA. Le vasche sono state preparate in triplicato: 3x "no-PFOA" (controllo), 3x "10 ppm PFOA" (10 mg·L⁻¹ PFOA) e 3x "100 ppm PFOA" (100 mg·L⁻¹ PFOA). Le soluzioni madre di PFOA sono state preparate usando lo standard analitico dell'acido perfluorooctanoico (> 98% da Aldrich) solubilizzato in un volume di FSW. L'acqua di mare filtrata è stata monitorata settimanalmente in ogni acquario per controllare i livelli di PFOA.

Quattro individui di *P. lividus* sono stati posti in ogni acquario e sono stati annotati i dati di: colore, peso e dimensione (diametro senza le spine misurato perpendicolarmente all'asse orale-laborale (Figura 40)) di ogni riccio di mare al fine di riconoscere gli individui durante l'intero periodo sperimentale.



Figura 40. Misurazione delle dimensioni di un individuo di *P. lividus*.

Per non influenzare l'assorbimento dell'inquinante nei ricci di mare, all'interno degli acquari non sono stati aggiunti sistemi di filtrazione o mangimi. Salinità ($35 \pm 1\%$), temperatura (17.0 ± 1.0 °C), fotoperiodo (12h: 12h - luce: buio) ed aerazione continua sono stati monitorati giornalmente; in aggiunta, alcuni parametri fisico-chimici (NO₂-, NO₃-, KH, GH, Cl₂) sono stati misurati settimanalmente utilizzando strisce di prova con metodo colorimetrico.

Ogni settimana e al termine del periodo sperimentale (giorno 28), un campione di fluido

celomatico è stato preso da ogni individuo per valutare l'assorbimento di PFOA.

Al 28° giorno o 30°, cioè dopo 2 giorni di washout, i ricci di mare sono stati sezionati per la raccolta delle gonadi e del fluido celomatico. Dopo il riconoscimento sessuale, da ogni individuo sacrificato al 28° giorno, un terzo delle gonadi è stato immediatamente utilizzato per recuperare uova o spermatozoi e il tessuto rimanente è stato diviso in 2 tubi e conservato a -80 °C per essere poi utilizzato per le indagini chimiche e di biologia molecolare.

I campioni prelevati dopo il washout sono stati utilizzati esclusivamente per analisi chimiche finalizzate alla valutazione della capacità di decontaminazione dall'inquinante.

4.3.4.2 Materiali, attrezzature, software e tecniche di estrazione ed analisi del PFOA

Tutti gli strumenti e le apparecchiature di laboratorio utilizzate per le estrazioni e le analisi, così come l'iter analitico, i programmi di elaborazione dei dati e i risultati di calibrazione e sensibilità strumentale sono gli stessi di quelli riportati nel paragrafo 4.2.3.2..

Riguardo le procedure di estrazione del PFOA, rispetto al suddetto paragrafo, sono state applicate alcune piccole modifiche in base al tipo di matrice oggetto di analisi e alle diverse finalità. In particolare, riguardo l'estrazione del PFOA dall'acqua di mare con cartucce SPE (vedi paragrafo 4.2.3.2), una volta ottenuti gli eluati e ridotti ad 1 mL, quelli relativi ai campioni degli acquari di controllo (0 ppm di PFOA) sono stati analizzati tal quale, mentre gli eluati relativi ai campioni provenienti da acquari contenenti 10 ppm e 100 ppm di PFOA sono stati diluiti con metanolo di grado LC-MS rispettivamente in rapporto 1:10 e 1:100.

Ulteriore differenza rispetto alle metodiche descritte nel sottoparagrafo 4.2.3.2, inerente all'estrazione del PFOA dal fluido celomatico, è stata la mancata separazione del fluido celomatico dai celomociti che sono quindi stati analizzati insieme. Inoltre, il volume di fluido celomatico prelevato da ogni riccio nel presente lavoro è stato di 0.3 mL ed il recupero per questa matrice, calcolato secondo l'equazione 10, è stato del 70%.

4.3.4.3 Fecondazione in vitro e osservazione degli embrioni

Le uova sono state ottenute immergendo le gonadi in 30 mL di acqua di mare filtrata (FSW). Una volta rilasciate, le uova sono state separate dal tessuto mediante filtrazione con un retino di seta e sono state lavate due volte con FSW, lasciandole depositare per gravità ad ogni lavaggio. Infine, sono state risospese in 250 mL di FSW per la fecondazione. Le gonadi maschili sono state messe in tubi da 10 mL per mantenere gli spermatozoi a secco in ghiaccio fino al loro utilizzo.

Poco prima della fecondazione, 25 µL di spermatozoi sono stati diluiti in 5 mL di FSW, e una

goccia è stata aggiunta alla sospensione di uova. In questo modo è stato possibile osservare l'avvenuta la fecondazione (sollevamento della membrana di fecondazione) (Figura 41).



Figura 41. Sollevamento della membrana di fecondazione che circonda l'uovo osservabile pochi secondi dopo la fecondazione.

Tutte le procedure sono state eseguite con vetreria da laboratorio e utensili in acciaio inox, evitando l'uso di plastica. Gli embrioni sono stati mantenuti in FSW ad una temperatura costante di 18 gradi °C, con una delicata agitazione meccanica (Figura 42) e lasciati crescere fino allo stadio di pluteo (48 h p.f.).



Figura 42. Sistema di agitazione meccanica dell'acqua di mare contenente gli embrioni di riccio di mare in camera termostata a 18°C.

Prima delle osservazioni morfologiche, le larve natanti sono state bloccate con 5 µl di formaldeide al 37% in 20 mL di FSW e immediatamente fotografate (microscopio ottico Leica DMI associato a una fotocamera Leica DFC 320, utilizzando ingrandimenti x10, x20 e X40).

4.3.4.4 Analisi dell'espressione genica

Le gonadi e gli embrioni ottenuti dai ricci marini esposti a PFOA e da quelli di controllo sono stati raccolti e conservati a - 80 °C per le successive analisi di espressione genica. Gli RNA totali sono stati estratti dai campioni attraverso l'utilizzo di un kit commerciale (mini-kit PureLink RNA, Invitrogen) e, a seguito di quantificazione (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer and 1% Agarose/1X TBE gel migration) e rimozione del DNA genomico (RQ1 RNase-Free Dnase, Promega), 1 µg per campione è stato utilizzato per la trascrizione inversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems).

L'espressione genica è stata investigata attraverso la 'real-time polymerase chain reaction' (qRT-PCR) con il sistema ABIPRISM 7500 (Applied Biosystems, Forster City, USA) e Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Forster City, USA) come indicato dal produttore. Ogni reazione è stata eseguita in triplicato e come riferimento è stato usato il gene codificante l'RNA ribosomiale *18S*.

Tutti i geni e le sequenze dei primers utilizzati in questo studio sono stati già descritti in altri lavori [Ragusa et al., 2013; Migliaccio et al., 2014; Ruocco et al., 2016; Ragusa et al., 2017a, b; Di Natale et al., 2019; Masullo et al., 2021].

Le condizioni di amplificazione sono state: denaturazione iniziale e attivazione enzimatica 10 min a 95 °C, seguita da 40 cicli, composti ciascuno da 15s a 95 °C e 60s a 60 °C. Alla fine dell'amplificazione, è stata eseguita l'analisi della curva di melting (da 65 °C a 95 °C). La variazione dei livelli di espressione è stata calcolata come rapporto di espressione relativo dei geni analizzati nel campione trattato rispetto a quelli del campione di controllo.

I risultati di espressione genica, presentati nelle Figure 36 e 37, sono stati calcolati secondo l'equazione 13 tramite metodo di quantificazione relativa [Schmittgen & Livak, 2008] ('comparative C_T method' (C_T = threshold cycle), anche denominato ' $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method') utilizzando come riferimento il gene codificante l'RNA ribosomiale *18S*.

Il fold-change è stato calcolato secondo l'equazione:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{[(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ treated sample} - (C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ control sample}]}{(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ control sample}} \quad (13)$$

4.3.4.5 Analisi statistiche

Come nel lavoro precedente [Savoca et al., 2021b], la distribuzione delle concentrazioni di PFOA nel fluido celomatico dei ricci di mare esposti a 100 ppm è rappresentata graficamente dal box e jitter (Figura 26) (per l'interpretazione del grafico si veda il paragrafo 4.2.3.3). Per le

analisi di espressione genica, i livelli relativi di mRNA sono indicati come media \pm deviazione standard (n= 3). Il test t di Student è stato utilizzato per determinare le differenze tra i gruppi trattati e i rispettivi gruppi di controllo. In particolare, la significatività statistica per ciascun gene bersaglio tra i triplicati valori Cq del controllo e del campione trattato è indicata con l'asterisco (*: $p < 0.05$).

4.3.5 Conclusione

I nostri risultati hanno dimostrato che il bioaccumulo del PFOA nei ricci di mare è evidente fin dalla prima settimana di esposizione all'inquinante, anche se, durante il periodo di esposizione, i livelli variavano anche nello stesso individuo. Questa variabilità potrebbe essere attribuita a diversi meccanismi immunofisiologici (probabilmente mediati anche dai celomociti) e al sesso degli individui oggetto di indagine.

In questo contesto, è possibile ipotizzare che durante il periodo di esposizione *P. lividus* attivi meccanismi di autodifesa, generalmente innescati da condizioni esterne avverse, per proteggersi dagli effetti negativi del PFOA. Questi meccanismi che portano anche all'eliminazione del PFOA sono probabilmente limitati da una soglia di saturazione/accumulo oltre la quale potrebbe verificarsi la morte dell'individuo coinvolto.

Il PFOA ha anche indotto variazioni nell'espressione di alcuni geni che regolano diversi processi biologici, sia nelle gonadi che negli embrioni, suggerendo che gli effetti dell'esposizione parentale possono riflettersi nella successiva generazione, influenzandone i processi di sviluppo (inducendo malformazioni e alterazioni nell'espressione genetica). È importante sottolineare che gli esperimenti di washout hanno dimostrato che *P. lividus* è in grado di attivare meccanismi di decontaminazione quando viene trasferito da un ambiente contaminato a un ambiente incontaminato, rendendo così questa specie potenzialmente resistente a condizioni di contaminazione sporadica.

Tuttavia, la nostra osservazione sperimentale non può essere paragonabile ad una situazione di contaminazione dell'ambiente naturale, poiché in quest'ultimo i livelli di PFOA rilevati nell'acqua di mare sono generalmente molto più bassi.

Infine, considerando che il PFOA può accumularsi nei tessuti animali nel tempo, il riccio di mare può essere considerato un bioindicatore ideale per ambienti contaminati da PFOA. Allo stesso tempo, poiché la quantità di PFOA presente nei ricci di mare provenienti da ambienti inquinati può variare nel tempo, occorre prestare grande attenzione quando questi animali sono destinati direttamente al consumo umano.

5. Ftalati in organismi acquatici: studi di trasferimento e biorisanamento

5.1 Trasferimento materno ed ambientale di ftalati nelle uova di *Caretta caretta*

Il lavoro di ricerca sugli ftalati nelle uova di *Caretta caretta* intende dare un contributo sui dati relativi all'incidenza di queste sostanze in una specie protetta ed è stato condotto in prosecuzione del lavoro di ricerca degli stessi inquinanti nei tessuti di *C. caretta* e *Dermochelys coriacea* [Savoca et al., 2018].

Durante le attività di monitoraggio dei nidi di *Caretta caretta* sull'isola di Linosa, sono state raccolte 30 uova provenienti da quattro nidi per studiare la presenza di ftalati nelle loro tre componenti (guscio, tuorlo e albume).

5.1.1 Introduzione

L'inquinamento da plastica è una minaccia che coinvolge tutti gli ambienti in particolare quelli marini, i suoi ecosistemi e gli organismi che ne fanno parte [Avio et al., 2017; Gall e Thompson, 2015].

Una volta che le plastiche raggiungono il mare, la loro persistenza può portare a conseguenze ambientali negative per decenni a causa della loro lenta degradazione che porta alla formazione di micro e nanoplastiche [GESAMP, 2016; Bellasi et al., 2020]. A causa della sua più che diffusa presenza, la plastica può essere ingerita direttamente dagli organismi marini [Taylor et al., 2016; Nelms et al., 2018]. L'ingestione di detriti plastici è stata osservata in molti taxa, specialmente nelle tartarughe marine [Nelms et al., 2016; Caracappa et al., 2017; Duncan et al., 2019; Thomas et al., 2020]. L'alta frequenza di detriti plastici nel tratto gastrointestinale delle tartarughe marine, anche nelle giovani da poco schiuse [Nelms et al., 2016; Eastman et al., 2020], ha portato a denificare le tartarughe marine bioindicatori per i rifiuti marini nella direttiva quadro dell'Unione europea sulla strategia per l'ambiente marino (MSFD) [Matiddi et al., 2017]. Tra i gravi effetti negativi, i lunghi tempi di permanenza della plastica nell'intestino possono portare a contaminazione chimica dell'organismo [Oehlmann et al., 2009]. Questa contaminazione si verifica a causa dell'assorbimento nei tessuti di composti plastificanti, come il bisfenolo A e gli ftalati [Savoca et al., 2018], o altri composti tossici accumulati dalla plastica che vengono rilasciati durante la digestione [Nelms et al., 2016].

In questo contesto gli esteri dell'acido ftalico (PAEs), sono una classe di distruttori endocrini di particolare preoccupazione a causa della loro sempre più frequente rilevazione ambientale [Braun, 2017; Radke et al., 2020]. Nonostante sia nota la presenza di diversi inquinanti organici persistenti (POPs) nelle tartarughe marine adulte [Camacho et al., 2013; Guerranti et al., 2014; Savoca et al., 2018] e i loro potenziali effetti negativi sullo sviluppo della prole, ci sono pochi

studi riguardanti la presenza e gli effetti dei POPs sulle loro uova [Keller et al., 2005; Alava et al., 2006; Van De Merwe et al., 2009, 2010a; Keller, 2013].

Una recente comunicazione ha riportato l'identificazione dei metaboliti degli ftalati come marcatori di contaminazione nelle uova di *Dermochelys coriacea* e *C. caretta* [Velasco et al., 2017], tuttavia, non esiste uno studio sugli effetti e sulla biodistribuzione degli ftalati nelle uova di *C. caretta*. Solo una ricerca in questo campo ha segnalato la presenza di tre PAEs (DMP, DBP, e DnOP) nei tuorli di alcune uova di tartarughe marine (*D. coriacea* e *Lepidochelys olivacea*) raccolte in alcune spiagge di nidificazione del Messico [Ceròn et al., 2000] senza però differenziare e ricercarne la presenza nel guscio e nell'albume.

Nel lavoro precedente alla ricerca descritta in questo paragrafo (5.1) sono stati analizzati i tessuti di tredici esemplari di tartarughe marine, (un individuo di *Dermochelys coriacea* e dodici di *Caretta caretta*) ritrovati morti lungo le coste siciliane nel 2016 [Savoca et al., 2018]. In *D. coriacea* sono stati trovati quattro ftalati (DEP, DBP, BBP e DEHP) a diverse concentrazioni significative nel fegato e nelle gonadi, mentre solamente il DBP è stato trovato nei tessuti muscolari, tuttavia, ad una concentrazione quattro volte inferiore rispetto agli altri. Nessuna traccia di DEP è stata rilevata nei tessuti di *C. caretta* dove invece è stato anche rivelato anche il DnOP. La presenza di ftalati nei campioni di grasso di *C. caretta* ha mostrato una prevalenza degli ftalati più lipofili DEHP e DnOP. La concentrazione totale di tutti gli ftalati analizzati, ha mostrato valori elevati in tutti i tessuti, i cui risultati sono riportati in Figura 43.

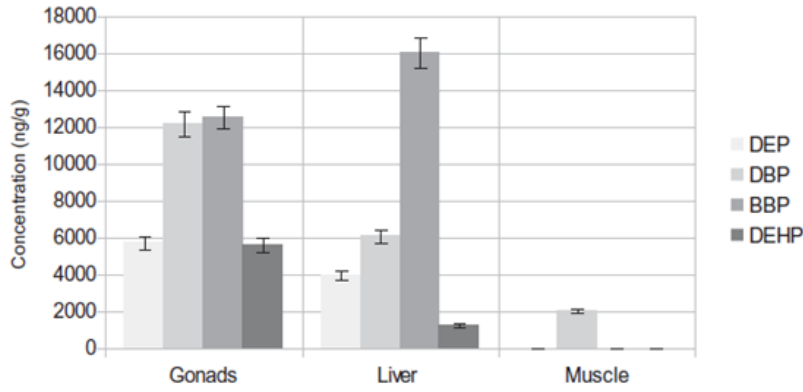


Fig. 1. Phthalates concentration in tissues in one specimen of *Dermochelys coriacea*.

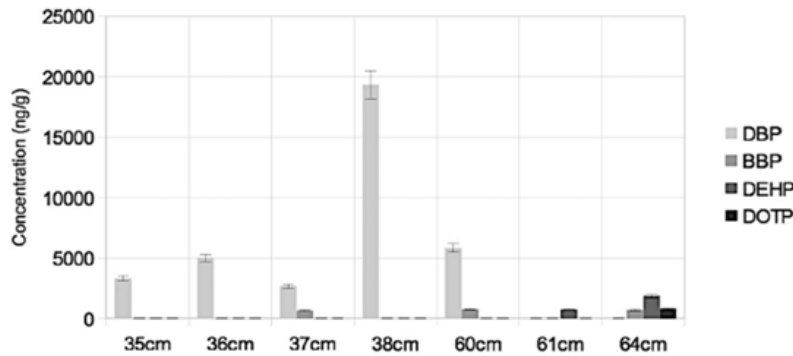


Fig. 2. Phthalates concentration in gonad tissues of seven specimens of *Caretta caretta* of various sizes. Each size class corresponds to an individual.

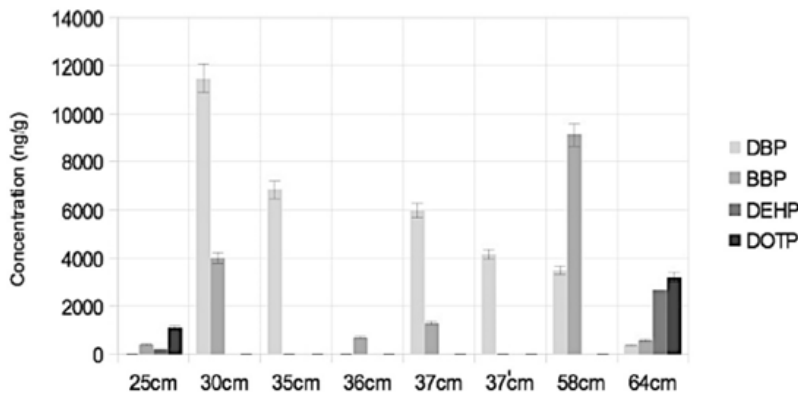


Fig. 3. Phthalates concentration in liver tissues of eight specimens of *Caretta caretta* of various sizes (OCL). Each size class corresponds to an individual.

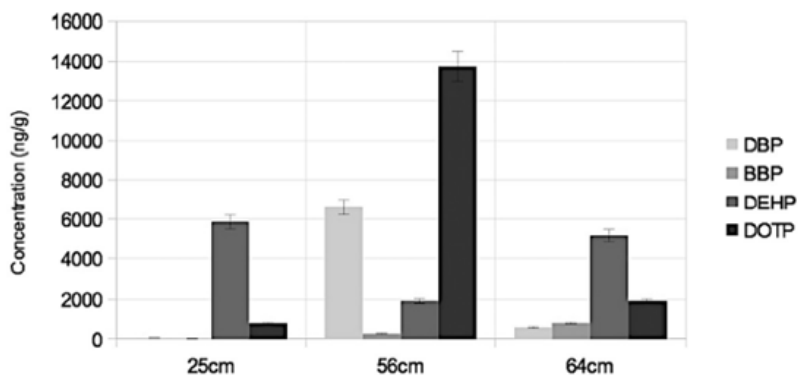


Fig. 4. Phthalates concentration in fat tissues of three specimens of *Caretta caretta* of various sizes (OCL). Each size class corresponds to an individual.

Figura 43. Valori di concentrazione di PAEs in tessuti di tartarughe marine.

Questi valori di concentrazione così elevati suggeriscono la possibilità di effettuare campionamenti non distruttivi del tessuto adiposo (con manipolazioni accurate) nelle tartarughe marine ai fini del monitoraggio ambientale.

I risultati ottenuti in questo primo lavoro sulla determinazione dei PAEs nei tessuti di *C. caretta* suggeriscono che tale forte contaminazione possa coinvolgere anche le uova e quindi la progenie delle tartarughe marine; per questa ed altre ragioni di seguito descritte, ho dedicato l'attenzione alle indagini sulla presenza di questi composti nelle uova di *C. caretta*.

Pertanto, in base alla disponibilità di uova non schiuse di tartarughe marine *C. caretta* raccolte da quattro diversi nidi in una spiaggia dell'isola di Linosa (Mar Mediterraneo) "Pozzolana di Ponente" sono state effettuate delle analisi volte a verificare la presenza e la compartimentazione dei PAEs nelle tre componenti delle uova: tuorlo, albume e guscio.

5.1.2 Risultati

Le analisi hanno evidenziato la presenza di soli quattro PAEs (DEP, DBP, DEHP, DnOP), anche se le loro frequenze e concentrazioni di rilevazione erano variabili; invece non sono state registrate tracce di DMP o BBP.

In tutte le componenti delle uova analizzate, i PAEs riscontrati più frequentemente erano il DBP, con un valore massimo registrato di $[\text{DBP}]_{\text{eggshell}} = 262 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, e il DEHP, con un valore massimo registrato di $[\text{DEHP}]_{\text{yolk}} = 276 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tabella 8).

Tabella 8. Riepilogo delle statistiche (incidenza, mediana e intervalli di concentrazione) degli ftalati trovati nel guscio, nel tuorlo e nell' albume delle uova di *Caretta caretta*.

Type of egg component	Statistics	DEP	DBP	DEHP	DNOP	Σ PAEs
EGGSHELL	<i>N. of samples</i>	30	30	30	30	30
	<i>N. of samples > LOD</i>	14	30	18	11	30
	<i>Min (ng·g⁻¹)</i>	< LOD	2	< LOD	< LOD	2
	<i>Max (ng·g⁻¹)</i>	71	262	206	122	375
	<i>Median (ng·g⁻¹)</i>	< LOD	26	12.5	< LOD	58.5
YOLK	<i>N. of samples</i>	30	30	30	30	30
	<i>N. of samples > LOD</i>	12	30	22	11	30
	<i>Min (ng·g⁻¹)</i>	< LOD	4	< LOD	< LOD	9
	<i>Max (ng·g⁻¹)</i>	79	122	276	28	398
	<i>Median (ng·g⁻¹)</i>	< LOD	40.5	7	< LOD	67

ALBUMEN	<i>N. of samples</i>	17	17	17	17	17
	<i>N. of samples > LOD</i>	3	13	5	6	14
	<i>Min (ng·g⁻¹)</i>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	<i>Max (ng·g⁻¹)</i>	1	32	52	29	77
	<i>Median (ng·g⁻¹)</i>	< LOD	13	< LOD	< LOD	17

Le distribuzioni dei valori di mediana dei diversi ftalati nel guscio erano tra loro significativamente diverse (Kruskal-Wallis Test, $\chi^2 = 27.95$; $p = 1.57 \times 10^{-6}$ post hoc Dunn's: $p = 0.043$), ad eccezione di [DEP] e [DNOP] i cui valori mediани erano entrambi 0 (Figura 44).

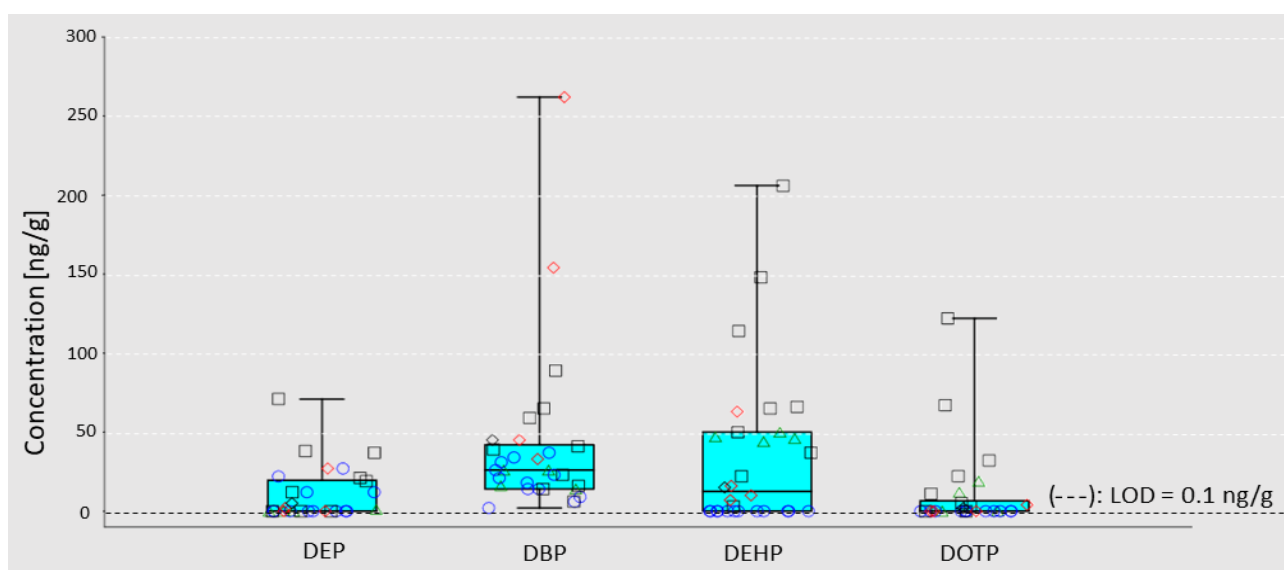


Figura 44. Box and jitter rappresentativo delle concentrazioni degli ftalati [$\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$] (intero intervallo delle concentrazioni in asse y) riscontrate nei campioni di **guscio** di 30 uova di *Caretta caretta*. I percentili 25 e 75 sono indicati dal box; i valori di minimo e massimo sono mostrati alla fine delle linee che attraversano i box; la mediana è contrassegnata come una linea orizzontale nel box plot; il LOD è mostrato come una linea tratteggiata orizzontale; l'origine dei campioni è differenziata dai simboli: (Δ) nido 1, (\circ) nido 2, (\bullet) nido 3, (\diamond) nido 4.

Le analisi nel guscio hanno evidenziato una prevalenza di di-n-butil ftalato, con una mediana di [DBP] = $26 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, seguita da bis(2-etilesil) ftalato con una mediana di [DEHP] = $12.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

Anche nel tuorlo, le distribuzioni mediane di PAEs erano diverse: (Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 51.84$; $p = 7.78 \cdot 10^{-12}$ post hoc Dunn's: $p = 0.031$). I valori mediани per DEP e DNOP erano 0, mentre livelli di concentrazione più elevati sono stati trovati per [DBP] = $40.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ seguito da [DEHP] = $7 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 45).

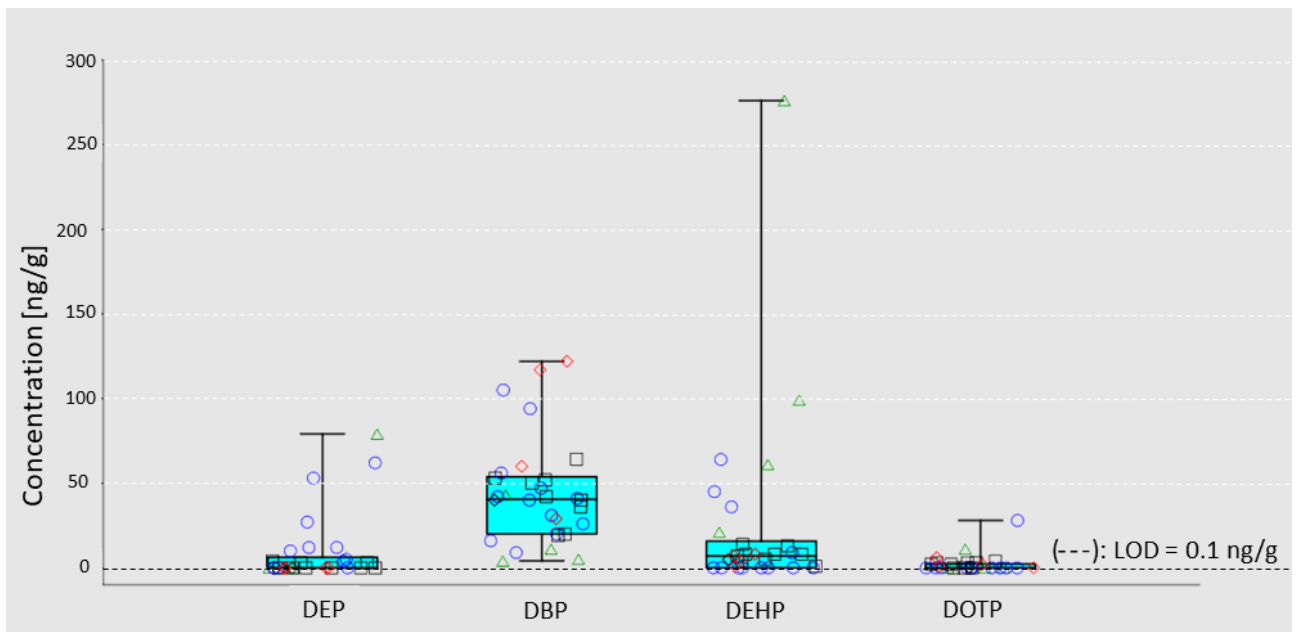


Figura 45. Box and jitter delle concentrazioni degli ftalati [ng/g] (intero intervallo delle concentrazioni in asse y) riscontrate nei campioni di **tuorlo** di 30 uova di *Caretta caretta*. I percentili 25 e 75 sono indicati dal box; i valori di minimo e massimo sono mostrati alla fine delle linee che attraversano i box; la mediana è contrassegnata come una linea orizzontale nel box plot; il LOD è mostrato come una linea tratteggiata orizzontale; l'origine dei campioni è differenziata dai simboli: (Δ) nido 1, (\circ) nido 2, (\bullet) nido 3, (\diamond) nido 4.

Per quanto riguarda i 17 campioni di albume, solo il valore mediano di [DBP] = 13 ng·g⁻¹ era significativamente diverso dagli altri ftalati la cui concentrazione mediana era per tutti 0 ng·g⁻¹ (Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 11.87$; $p = 1.65 \times 10^{-3}$; post hoc Dunn's: $p = 0.016$) (Figura 46).

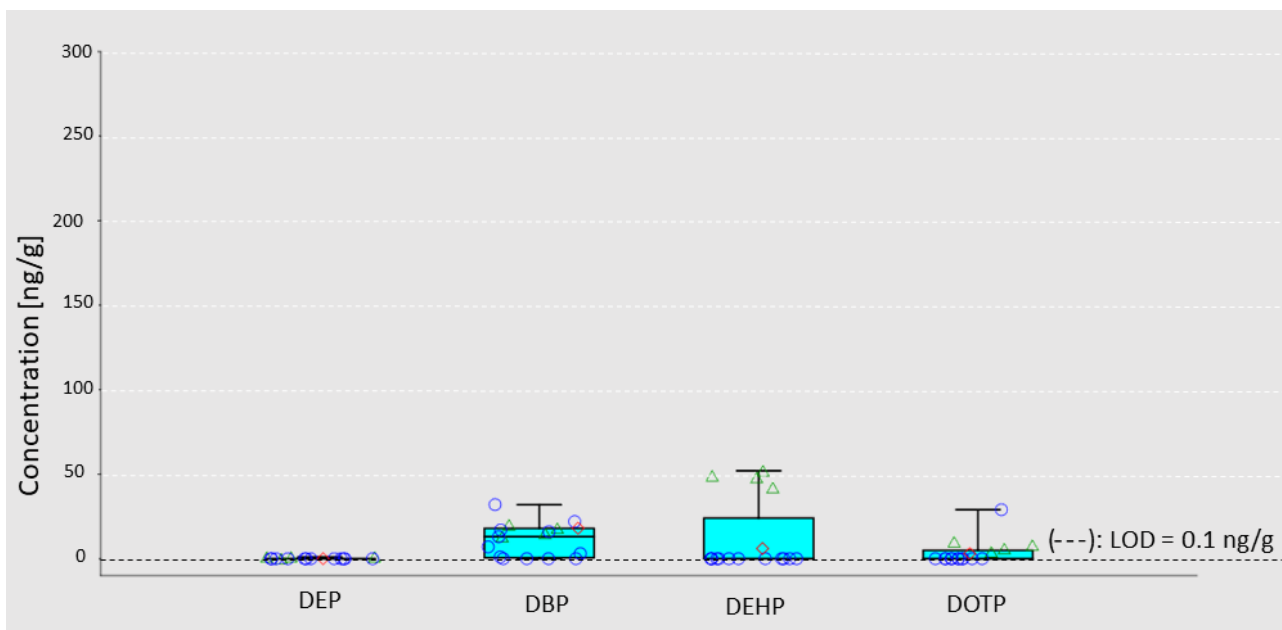


Figura 46. Box and jitter delle concentrazioni degli ftalati [$\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$] (intero intervallo delle concentrazioni in asse y) riscontrate nei campioni di **albume** di 30 uova di *Caretta caretta*. I percentili 25 e 75 sono indicati dal box; i valori di minimo e massimo sono mostrati alla fine delle linee che attraversano i box; la mediana è contrassegnata come una linea orizzontale nel box plot; il LOD è mostrato come una linea tratteggiata orizzontale; l'origine dei campioni è differenziata dai simboli: (Δ) nido 1, (\circ) nido 2, (\bullet) nido 3, (\diamond) nido 4.

Inoltre, le concentrazioni totali di tutti gli ftalati erano significativamente diverse (Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 15.65$; $p = 3.99 \times 10^{-4}$) in ogni tipo di componente dell'uovo, con i valori mediani per il tuorlo ($[\text{PAEs}]_{\text{tuorlo}} = 67 \text{ ng/g}$) superiori a quelli riscontrati in guscio d'uovo ($[\text{PAEs}]_{\text{eggshell}} = 58.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) e albume ($[\text{PAEs}]_{\text{albumen}} = 17 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) (Figura 47).

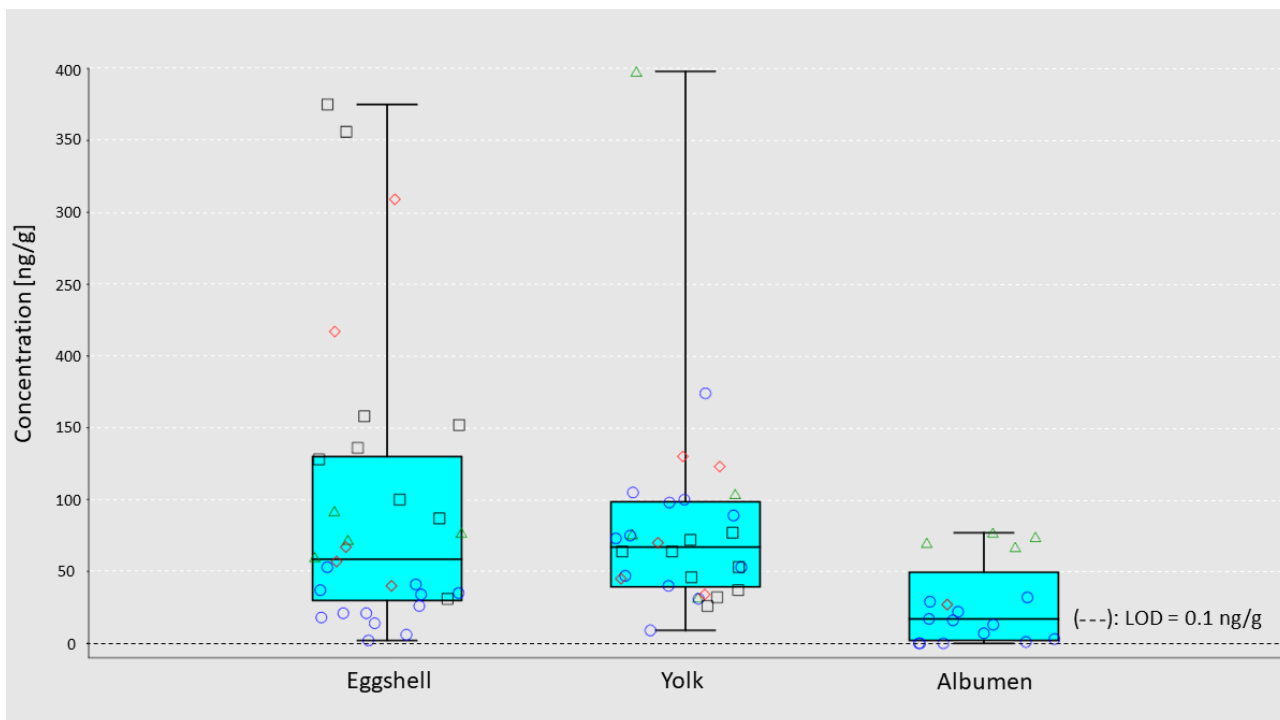


Figura 47. Box and jitter delle concentrazioni totali degli ftalati [PAEs] [$\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$] (full range in asse y) riscontrate in ciascun componente delle uova di *Caretta caretta*. I percentili 25 e 75 sono indicati dal box; i valori di minimo e massimo sono mostrati alla fine delle linee che attraversano i box; la mediana è contrassegnata come una linea orizzontale nel box plot; il LOD più è mostrato come una linea tratteggiata orizzontale; l'origine dei campioni è differenziata dai simboli: (Δ) nido 1, (\circ) nido 2, (\bullet) nido 3, (\diamond) nido 4.

Le differenze significative tra le concentrazioni di PAEs nei gusci d'uovo e negli albumi, così come le differenze tra le concentrazioni di PAEs nei tuorli e negli albumi, sono state confermate dai Dunn's test post hoc ($p = 0.0008$).

Invece, l'analisi di Spearman ha evidenziato correlazioni significative ($p < 0.05$) (illustrate in Figura 48) forti ($r_s = 0.6-0.79$) o molto forti ($r_s = 0.8-1.0$) [Akoglu, 2018] in 8 delle 66 possibili combinazioni.

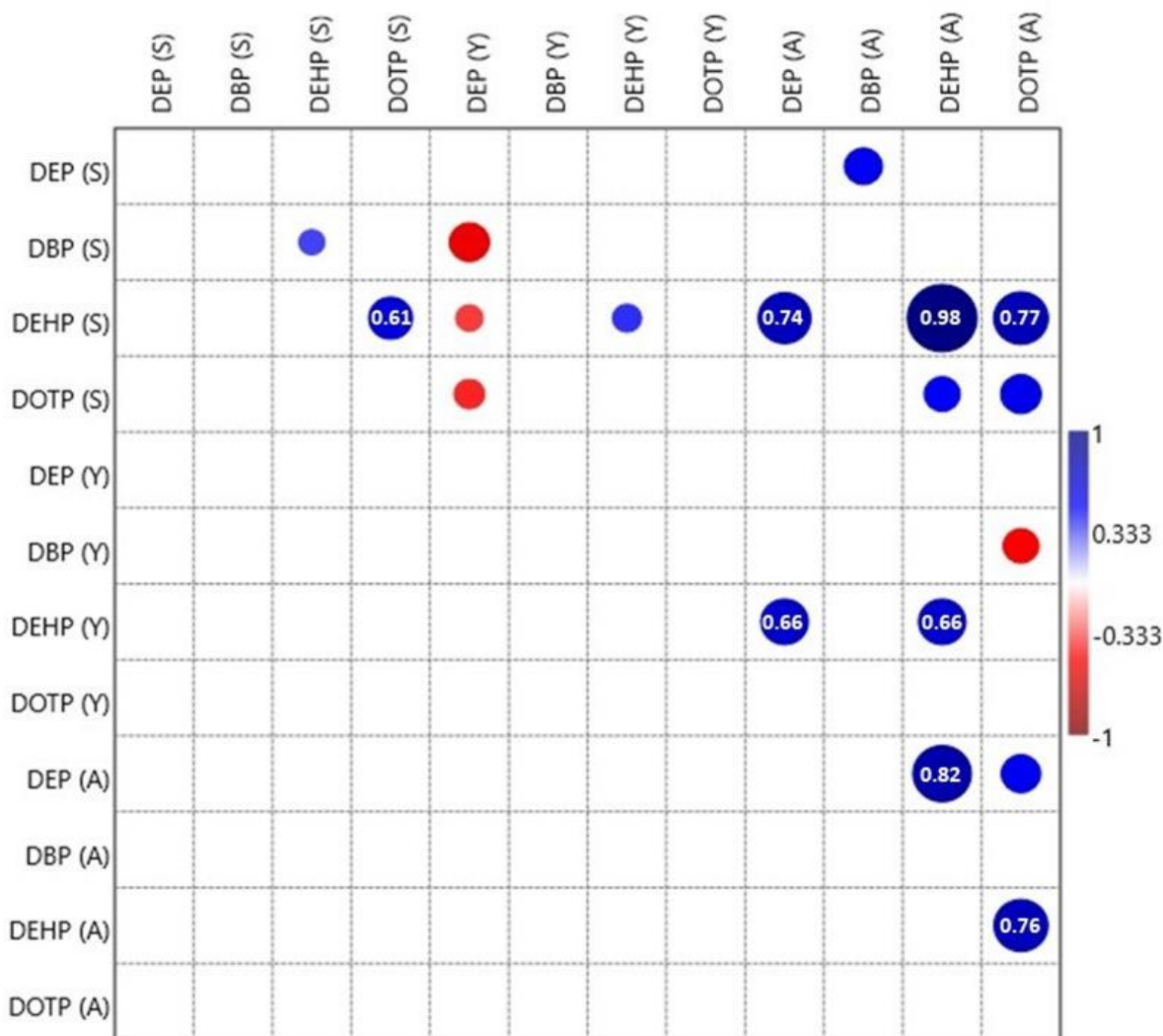


Figura 48. Grafico del test di correlazione di Spearman che mostra correlazioni significative ($p < 0.05$). Gli indici di correlazione di Spearman forti ($r_s = 0.6 - 0.79$) o molto forti ($r_s = 0.8 - 1.0$) [Akoglu, 2018] sono specificamente indicati come valori all'interno dei cerchi blu nel grafico.

Due di queste correlazioni riguardavano sia lo stesso ftalato in componenti d'uovo diverse (es. DEHP nell'albume e DEHP nel guscio, $r_s = 0.98$; DEHP nell'albume e DEHP nel tuorlo, $r_s = 0.66$), sia tra diversi ftalati nello stesso tipo di componente uovo (es. DEHP e DnOP in guscio d'uovo, $r_s = 0.61$; DEHP e DEP in albume, $r_s = 0.82$; DEHP e DnOP in albume, $r_s = 0.76$).

Inoltre, l'analisi PERMANOVA, che confronta coppie di set di dati, ha mostrato una differenza significativa ($p = 0.01$) nei profili di contaminazione di PAEs tra le uova raccolte da nidi diversi. Al contrario, l'analisi PCoA, che elabora set di dati al fine di verificare differenze graficamente osservabili (per riduzione delle dimensioni del dataset), non è stata in grado di evidenziare visivamente tali differenze per i quattro nidi (Figura 49a) e per i tre tipi (componenti dell'uovo) (Figura 49b), utilizzando le prime due coordinate che rappresentano il 75% della variazione totale.

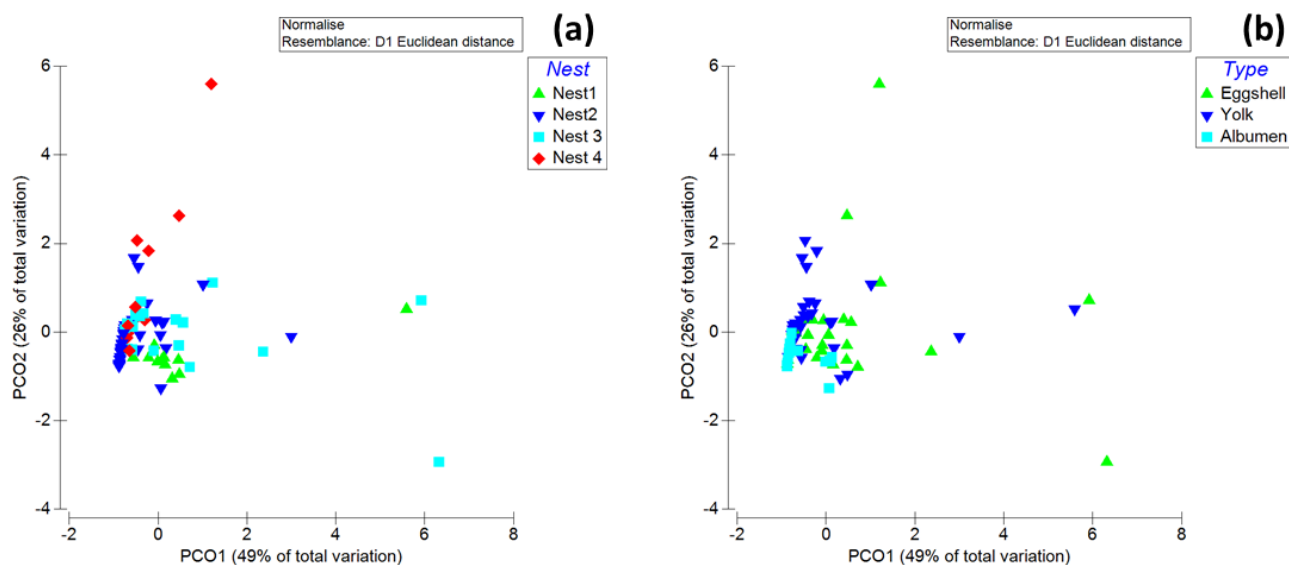


Figura 49. Analisi delle coordinate principali (PCoA) che mostra i profili di contaminazione relativi ai fattori Nido (a) e Tipo (componenti dell'uovo: guscio, tuorlo e albume) (b).

5.1.3 Esperimento di trasferimento degli ftalati tra guscio ed acqua di mare

Una volta riscontrata la presenza e approfondita la biodistribuzione degli ftalati nelle uova di *C. caretta*, restava ancora da verificare quale fosse l'origine (se interna o esterna) di tale contaminazione. Per dare valore alla più plausibile ipotesi (formulata nel paragrafo successivo) riguardante il trasferimento dei PAEs dalla madre attraverso vitellogenesi, piuttosto che attraverso contaminazioni esterne avvenute dopo la deposizione, sono state effettuate delle prove preliminari utili per chiarire quale fosse il processo più probabile.

In particolare, una porzione di guscio è stata inserita all'interno di un becker di vetro in modo tale che solo la parte esterna entrasse a contatto con una soluzione contenente acqua di mare (SW) e il mix di standard interno (SI) di ftalati (SW+SI), invece nella parte interna è stata aggiunta solo SW senza l'aggiunta di standard interno (SW-SI) (Figura 50).

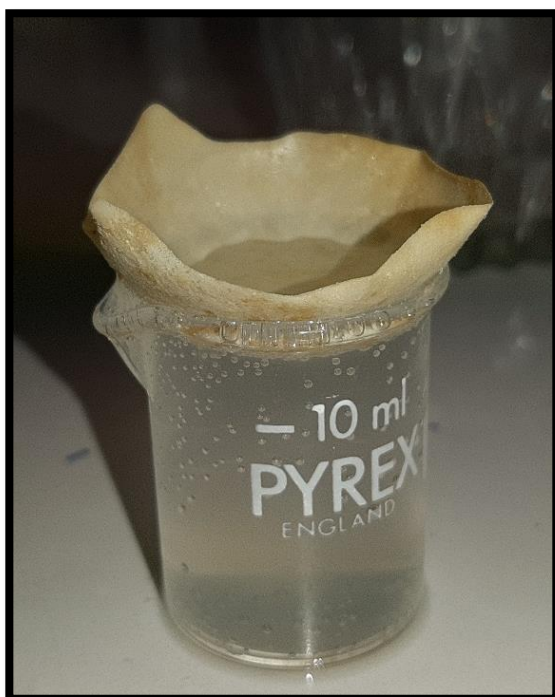


Figura 50. Guscio d' uovo di *Caretta caretta* esposto ad una soluzione di acqua di mare contenente standard mix di ftalati nella parte sottostante e solo acqua di mare nella parte sovrastante.

Sono stati effettuati prelievi della soluzione sottostante il guscio (SW+SI), quella sovrastante (SW-SI) per determinare (in 24, 48, 72, 96 e 168h) quali e quanti ftalati si fossero trasferiti dalla parte esterna del guscio a quella interna. L'estrazione dei PAEs delle soluzioni acquose è stata effettuata attraverso la tecnica liquido-liquido e, dall'analisi di queste, i risultati di trasferimento mostrano che in SW-SI erano presenti in concentrazione maggiore DMP e DEP; invece, il tasso di trasferimento è stato di circa 10 volte inferiore per DBP e BBP, infine DEHP e DNOP non sono stati rilevati (Tabella 9).

Tabella 9. Valori di concentrazione di PAEs sotto e sopra e sotto il guscio analizzati ai diversi tempi di monitoraggio.

Valori espressi in ppb ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHP	DNOP
tempo 0 SW + SI	406.71	483.02	879.70	874.81	1090.50	1368.41
24 h SW (controllo negativo)	0	0	0	0	0	0
24 h SW - SI	310.82	384.34	48.70	34.45	0	0
24 h SW + SI	334.13	413.09	533.86	571.75	694.75	665.38
48 h SW - SI	338.88	375.78	49.50	34.94	0	0

48 h SW + SI	339.88	418.75	505.57	545.24	760.04	880.83
72 h SW - SI	284.97	348.04	47.27	35.11	0	0
72 h SW + SI	339.00	413.33	438.06	483.55	751.87	797.79
96 h SW - SI	355.69	384.51	39.20	33.49	0	0
96 h SW + SI	354.62	429.17	453.72	493.39	840.76	969.88
168 h SW - SI	345.30	427.54	56.93	44.49	0	0
168 h SW + SI	344.77	423.81	393.09	435.50	837.08	1053.09

Correlando i risultati ottenuti ai livelli di concentrazione rilevati alle uova e nei tessuti [Savoca et al., 2018, 2021a] è interessante notare che negli studi di biomonitoraggio erano maggiormente presenti (in termini di frequenza e media di concentrazione) oltre al DBP (debolmente trasferito in SW-SI nell'esperimento) i composti che non si ritrovano in SW-SI (DEHP e DNOP); di conseguenza diviene ancora più probabile l'ipotesi che il trasferimento di questi inquinanti sia di tipo materno. Tuttavia, non potendo effettuare delle prove su tali specie a rischio e non avendo a disposizione uova e tessuti provenienti dalla stessa tartaruga, l'ipotesi resta ancora da verificare. Inoltre, i risultati ottenuti in quest'ultimo esperimento preliminare dovrebbero essere ripetuti numerose volte e in diverse condizioni e parametri ambientali.

5.1.4 Discussione

I risultati indicano che tra gli ftalati ricercati nelle tre componenti delle uova di *C. caretta* il DBP e il DEHP avevano maggiori frequenze di rilevazione e livelli di concentrazione. D'altra parte, la loro presenza può essere giustificata dal loro ampio e comune utilizzo (in svariate applicazioni); in particolare, DBP è utilizzato principalmente per conferire flessibilità alle materie plastiche [Manikkam et al., 2013], come fissativo nei cosmetici, come componente negli adesivi in lattice, come solvente per coloranti [Talsness et al., 2009; Manikkam et al., 2013], mentre il DEHP è spesso utilizzato come plastificante nel cloruro di polivinile (PVC) [Manikkam et al., 2013]. Inoltre, l'Agenzia per la protezione dell'ambiente e la Commissione europea considerano il DBP un inquinante prioritario per la sua elevata presenza e tossicità ambientale [Jergensen et al., 2019]. Riguardo il DEHP, recenti studi di esposizione a questa sostanza hanno anche confermato negativi effetti endocrini, testicolari, ovarici, neurali, oltre che attività epatotossiche e cardiotoxiche [Rowdhwal e Chen, 2018].

La maggior parte dei lavori di ricerca relativi alle analisi degli inquinanti nelle uova di tartaruga, si concentra solo sul tuorlo, in quanto è la componente dell'uovo più ricca in lipidi e

potenzialmente più contaminata dalle sostanze lipofile [Alava et al., 2006].

Il presente studio considera per la prima volta, la presenza di ftalati in tutti e tre le componenti: il guscio (con la sua membrana organica sottostante), il tuorlo e l'albume, nel tentativo di comprendere e valutare in maniera più completa la distribuzione di questi inquinanti nelle uova. L'alta concentrazione di PAEs trovata nei gusci delle uova (circa lo stesso livello di contaminazione del tuorlo), potrebbe indicare la capacità del guscio di accumulare tali composti a causa della funzione fisiologica [Ackerman, 1977], della natura della sua composizione e porosità [Al-Bahry et al., 2011a]. Infatti, il guscio d'uovo ha una superficie di contatto maggiore con l'ambiente esterno e potrebbe adsorbire molecole organiche attraverso interazioni non covalenti con la struttura inorganica di carbonato di calcio. Inoltre, la membrana organica interna del guscio (che è stata analizzata insieme allo strato esterno) è di natura fibrosa e potrebbe avere una buona affinità per gli ftalati, sia che questi abbiano un'origine esterna che interna.

Invece, la presenza di DBP e DEHP nel tuorlo potrebbe essere dovuta alla sua maggiore composizione lipidica rispetto all'albume che è ricco di acqua e proteine e ha quindi una minore affinità di legame per gli ftalati lipofili.

Inoltre, il test di Spearman sulle concentrazioni di DEHP in tuorlo, albume e guscio d'uovo, conferma l'esistenza di una correlazione tra le componenti dell'uovo che sono anatomicamente in contatto (es. tuorlo-albume, guscio-albume).

A dispetto del fatto che i risultati dei test di Kruskal-Wallis e Dunn post hoc confermano che le concentrazioni mediane del totale degli ftalati erano diverse tra albume, tuorlo e guscio, e che la concentrazione di ogni PAE era significativamente diversa (l'una dall'altra) all'interno della stessa componente dell'uovo, l'analisi PERMANOVA non è stata in grado di differenziare i profili quali-quantitativi dei PAEs rilevati tra tali diverse componenti (type). D'altra parte, l'analisi PERMANOVA ha permesso di differenziare il profilo di contaminazione delle uova raccolte dai quattro nidi diversi, anche se tale differenziazione non era abbastanza forte da essere evidenziata visivamente anche dall'analisi PCoA. Per quanto riguarda le fonti di contaminazione da ftalati nelle uova di *C. caretta*, è possibile che le alte temperature estive possano facilitare il passaggio di questi inquinanti dai sedimenti alle uova [Al-Rawahy et al., 2007; Tapilatu et al., 2020].

Tuttavia, il coinvolgimento di fonti di contaminazione esterne, compresi i sedimenti della spiaggia di nidificazione, sembra improbabile se confrontato con la possibilità di trasferimento materno (interno) [Munoz e Vermeiren, 2020].

La nostra ipotesi di trasferimento materno è supportata da altri studi dove è stata osservata una

forte correlazione tra gli inquinanti chimici trovati nel sangue materno delle tartarughe marine rispetto a quelli trovati nelle loro uova [Van De Merwe et al., 2010a; Stewart et al., 2011; Sinaei & Bolouki, 2017]. Inoltre, le concentrazioni degli inquinanti riscontrate nei sedimenti sono generalmente più basse rispetto a quelle degli organismi (o le loro uova) che vivono in questi ambienti [Keller, 2013].

Inoltre, in alcuni esperimenti di esposizione a inquinanti organici clorurati (TCDD, PCB, DDE, dieldrin, clordano) applicati localmente su uova di rettili come *Trachemys scripta elegans* [Gale et al., 2002] e *Alligator mississippiensis* [Muller et al., 2007] è stato osservato che i tassi di trasferimento degli inquinanti all'interno dell'uovo erano molto bassi.

Per analogia, i risultati degli studi sopra citati in condizioni di contaminazione delle uova simili a quelle ipotizzate per un potenziale trasferimento esterno, suggeriscono che nel presente studio l'incidenza degli ftalati all'interno delle uova di tartaruga potrebbe derivare da processi di vitellogenesi. Inoltre, come già accennato, questi PAEs sono stati trovati nei tessuti adiposi, nel fegato e nei tessuti gonadici di tartaruga marine come *C. caretta* e *Dermochelys coriacea* [Savoca et al., 2018] rendendo ancora più plausibile il loro trasferimento dalla madre alle uova. Infatti, il fegato costituisce la fonte di riserva per la sintesi dei precursori delle proteine del tuorlo e delle vitellogenine, che vengono trasportate attraverso il sangue fino all'ovaio per la deposizione nel tuorlo [Munoz e Vermeiren, 2020].

Poiché il processo di vitellogenesi si verifica principalmente durante il periodo di foraggiamento delle tartarughe marine, e considerando la frequenza e il livello di ingestione di plastica registrati per gli esemplari di *C. caretta* provenienti dal Mar Mediterraneo [Tomás et al., 2002; Caracappa et al., 2018; Duncan et al., 2019; Digka et al., 2020] è altamente probabile che la presenza di PAEs nelle uova di *C. caretta* derivi dalla madre e dal rilascio degli ftalati (durante i processi digestivi) contenuti nella plastica da questa ingerita. Inoltre, il trasferimento materno degli ftalati è sostenuto anche da precedenti studi riguardanti altri inquinanti organici e inorganici [Muñoz & Vermeiren, 2020; Sinaei & Bolouki, 2017; Stewart et al., 2011; Van De Merwe et al., 2010a], tuttavia, per convalidare tale ipotesi, sono necessari ulteriori studi che includano campioni prelevati sia dalle uova che dalla rispettiva madre.

5.1.5 Materiali e metodi

5.1.5.1 Raccolta dei campioni

Un totale di 30 uova non schiuse di *C. caretta* sono state raccolte da quattro nidi diversi in due diverse stagioni di nidificazione, in particolare sedici uova da due nidi (otto uova da ogni nido) e quattordici uova dagli altri ulteriori due nidi (sette uova da ogni nido). Questi campionamenti sono effettuati durante le attività di monitoraggio dei nidi condotte nell'Area Marina Protetta delle "Isole Pelagie" nella spiaggia di "Pozzolana di Ponente" (35° 86' 33" N, 12° 85' 48" E) di Linosa (Mar Mediterraneo) nell'estate del 2018 e del 2019. La raccolta delle uova è stata effettuata in rigoroso rispetto delle raccomandazioni del "Ministero dell'Ambiente e Tutela del Territorio e del Mare" (Prot. n.17054 del 25/07/2018). Una volta raccolte, le uova sono state poste in fogli di alluminio per evitare contaminazioni e sono state conservate a -20 °C prima della dissezione, della separazione delle loro componenti, e della successiva estrazione e analisi.

5.1.5.2 Preparazione, estrazione ed analisi dei campioni

La procedura per l'estrazione dei PAEs è stata adattata dal precedente lavoro di analisi dei tessuti di *C. caretta* [Savoca et al., 2018]. Durante tutto l'iter di estrazione sono stati utilizzati solo utensili da laboratorio in vetro, ceramica o acciaio inossidabile, precedentemente puliti con acetone (1x) ed esano (1x).

Le uova, pur essendo ancora congelate, sono state sezionate con un bisturi al fine di poter riconoscere e separare chiaramente le componenti dell'uovo (Figura 51).



Figura 51. A sinistra sezione di un uovo (mostrato a destra nella sua interezza) di *Caretta caretta* dove è possibile distinguere guscio tuorlo e albume.

Tuttavia, a causa della mancanza di integrità del guscio di 13 uova, l'albume è stato isolato solo in 17 delle 30 uova analizzate.

Le tre principali componenti di ogni uovo, guscio d'uovo (guscio esterno più la sottostante membrana organica), albume e tuorlo, sono stati omogeneizzati separatamente in tubi di vetro.

La miscela di sei standards di ftalati commerciali in esano (EPA Phthalate Esters Mix), contenente butilbenzil ftalato (BBP), di-n-butile ftalato (DBP), dietil-ftalato (DEP), bis(2-etilesile) ftalato (DEHP), di dimetil-ftalato (DMP) e di-n-octil ftalato (DnOP), ad una concentrazione di $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2000 ppm), è stata utilizzata sia come riferimento per la retta di taratura, sia come standard aggiunto nei diversi campioni prima delle estrazioni.

La retta di taratura, preparata in un intervallo da 10-0.001 ppm è stata analizzata prima di ogni batch di analisi ed ha mostrato risposte lineari $R^2 > 0.99$.

Per eseguire un duplicato di estrazione con e senza la miscela di standard, in ogni uovo, le rispettive componenti (guscio d'uovo, tuorlo e albume) sono state omogeneizzate e divise in quattro aliquote di 200 mg (peso umido). Un volume di 5 μL di una soluzione 10 ppm contenente lo standard mix di ftalati è stato aggiunto e miscelato a due delle quattro aliquote di ogni matrice. I campioni senza standard hanno subito la stessa procedura di estrazione di quelli con lo standard. Ai campioni omogeneizzati (200 mg) sono stati aggiunti 5 mL di esano (LC-MS grade) come solvente di estrazione all'interno delle provette di vetro successivamente sigillate e sono stati sonicati per 20 minuti a temperatura ambiente in un bagno ad ultrasuoni.

Quindi la miscela di estrazione è stata centrifugata per 15 minuti a 3500 rpm e il surnatante (1 mL) analizzato attraverso HPLC/LC-MS.

Invece per l'acqua di mare dell'esperimento di trasferimento degli ftalati attraverso il guscio d'uovo, le singole aliquote prelevate (150 μL a campione) sono state diluite a 1.5 mL di FSW. La soluzione risultante è stata trasferita in imbuti separatori da 10 mL all'interno dei quali sono stati aggiunti 6 mL di esano. In questo modo, dopo diverse agitazioni della soluzione è stato possibile recuperare la fase chiaramente separata contenente gli analiti di interesse. Quest'ultima (esano) è stata portata a secco sotto flusso gentile di azoto, ricostituita con 150 μL di esano (posto all'interno di un inserto per vial) ed analizzata tramite HPLC/LC-MS.

Le analisi LC-MS sono state effettuate in triplicato attraverso un HPLC-ESI/TOF Agilent 6540, in modalità di monitoraggio ionico positivo iniettando 20 μL del campione in una colonna da 2.7 micron (Poroshell 120 EC-C18 3.0x50 mm). I solventi di eluizione utilizzati erano costituiti da una miscela di acqua con acido formico allo 0,1% (v/v) e acetonitrile con acido formico allo 0,1% (v/v) a flusso fisso di $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ con il seguente gradiente: da acqua (40%) ACN (60%) al 100% di ACN in 8 min, rimanendo al 100% di ACN per ulteriori 3 min prima di tornare alle condizioni iniziali. Gli esteri ftalici sono stati monitorati come protonati ($M + H$, a $m/z = MW + 1$) e addotti molecolari sodiati ($M + Na$, a $m/z = MW + 23$) in condizioni di selected ion

monitoring.

Dai risultati delle analisi è emerso che la maggiore formazione riguardava quelli protonati [M + H], di conseguenza questi ultimi sono stati utilizzati per la quantificazione.

Al fine di evitare qualsiasi tipo di contaminazione incrociata (tra campioni in successione) durante le analisi l'HPLC-MS, ogni due iniezioni di campione sono stati iniettati il solvente bianco (esano) seguito da *no injection* (operazione che permette ai solventi di eluizione di fluire all'interno della colonna). I quality checks sono stati effettuati analizzando $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (10 ppb) di una soluzione standard ogni quattro campioni preceduti e seguiti da un'iniezione di solvente in bianco e da un'analisi *no injection*. In alcuni casi, nell'analisi del bianco, sono state trovate tracce di DEHP che sono state opportunamente prese in considerazione sottraendo il valore dell'integrale dal cromatogramma di analisi del campione. Le RDS su quattro repliche di quality checks erano inferiori al 10% e le analisi dei campioni sono state di conseguenza corrette. Il limite di rilevazione (LOD) era $0.1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ per DEP, DBP, BBP e DEHP, $0.2 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ per DnOP e $0.3 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ per DMP; invece, per tutti gli ftalati analizzati il limite di quantificazione (LOQ) era di $1.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (calcolo ottenuto utilizzando il metodo IUPAC). Come già descritto nel lavoro precedente (paragrafo 4.2.3.2) la percentuale di recupero R è stata calcolata per ciascuno degli ftalati e tipo di matrice secondo l'equazione 10.

R è stato poi utilizzato nell'equazione 14 per calcolare i valori effettivi di ciascuna concentrazione di PAEs nei campioni analizzati ai quali non è stato aggiunto lo standard.

Inoltre, per ciascun campione analizzato, è stata calcolata la concentrazione totale degli ftalati rilevati [PAEs] sommando i valori di concentrazione espressi in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ secondo equazione 15.

$$[\text{"Phthalate abbreviation"}] (\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}) = 100 \times D_{\text{unspiked}}/R \quad (14)$$

$$[\text{PAEs}] (\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}) = [\text{BBP}] + [\text{DBP}] + [\text{DEP}] + [\text{DEHP}] + [\text{DMP}] + [\text{DNOP}] \quad (15)$$

5.1.5.3 Analisi statistiche e rappresentazione grafica dei dati

Per verificare se i dati di concentrazione dei PAEs seguissero una distribuzione normale è stato effettuato il test Shapiro-Wilk dal quale è emerso che tali valori di concentrazione non erano normalmente distribuiti ($p < 0.05$) ad eccezione del DBP nell'albume ($p = 0.076$).

Considerato che la distribuzione aveva tale andamento, è stato eseguito il Kruskal-Wallis test per determinare se vi fossero differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) sia tra le concentrazioni di ciascuno ftalato in un dato tipo di componente dell'uovo, sia tra i diversi componenti uovo considerando la concentrazione totale di ftalati. Queste elaborazioni sono

state opportunamente verificate anche dal test post hoc di Dunn.

Inoltre, è stata effettuata la correlazione di Spearman per ranghi al fine di esaminare nelle 3 diverse matrici analizzate le relazioni esistenti tra i 4 PAEs individuati.

Per valutare eventuali differenze significative nel profilo di contaminazione (ossia la presenza e il livello dei diversi PAEs) tra nidi o tra componenti dell'uovo (tipo) diversi, è stata condotta un'analisi multivariata permutazionale della varianza PERMANOVA [Anderson et al., 2008; Anderson e Walsh, 2013]. Il disegno sperimentale ha previsto l'utilizzo di due fattori [Nido (quattro livelli, fissi e ortogonali) e Tipo (guscio d'uovo, albume e tuorlo, tre livelli, fissi e ortogonali)] e quattro variabili corrispondenti alle molecole di ftalati rilevate (DEP, DBP, DEHP, DnOP). Ogni termine nell'analisi è stato testato da 999 permutazioni casuali.

Infine, è stata effettuata l'analisi di coordinate principali (PCoA) al fine di visualizzare le possibili similarità o dissimilarità tra i campioni. Sia l'analisi PERMANOVA che PCoA sono state eseguite utilizzando il pacchetto software PRIMER 6 [Clarke e Gorley, 2006] sulla base della distanza euclidea normalizzando i dati relativi alle matrici ambientali.

5.1.6 Conclusioni

In questo studio è stata condotta una valutazione della presenza di esteri di acido ftalico nelle uova di *C. caretta* e la loro biodistribuzione in guscio tuorlo e albume.

Considerando i livelli significativi di contaminazione riscontrati (la concentrazione media della somma dei PAEs in ogni tipo di componente dell'uovo era nell'intervallo di 27 e 94 ng·g⁻¹) è necessario porre ancor più attenzione all'incidenza diffusa dell'inquinamento legato alla plastica. Inoltre, il basso tasso di trasferimento degli inquinanti, se applicati localmente sul guscio, e le concentrazioni di PAEs trovate nel tuorlo, rendono improbabile che la contaminazione possa essere avvenuta da fonti esterne.

È nostra opinione che l'origine della presenza di PAEs all'interno delle uova di *C. caretta* sia legata a un trasferimento degli stessi dalla madre. I nostri risultati evidenziano che la presenza di ftalati nelle uova di tartaruga marina potrebbe compromettere lo stato di conservazione di questa specie che è attualmente inclusa nella lista rossa della IUCN come specie vulnerabile (<https://www.iucnredlist.org>) ed in declino demografico.

Nel complesso, gli effetti negativi degli inquinanti bioattivi richiedono diverse attività di monitoraggio per valutarne la distribuzione geografica e biologica degli stessi; in questo contesto le indagini riguardanti le specie a rischio potrebbero aiutare a sostenere politiche e normative ambientali intese ad intervenire positivamente per quantomeno compensare tale inquinamento.

5.2 *Ulva lactuca*: una specie adatta per processi di biorisanamento fotodegradativo

Nella presente ricerca è stato studiato il bioaccumulo di ftalati in frammenti di *Ulva lactuca* esposti a sedimenti contaminati a diverse concentrazioni e la successiva fotodegradazione degli esteri adsorbiti.

5.2.1 Introduzione

La dispersione e il bioaccumulo di inquinanti organici persistenti nell'ambiente è una preoccupazione globale di crescente interesse per gli effetti sulla salute degli ecosistemi. Queste sostanze possono essere trasportate dal materiale plastico o contenute in esso sin dalla sua produzione e con il tempo essere rilasciate. Tra queste, gli ftalati a causa della loro natura chimica, ubiquitarietà e persistenza ambientale sono soggetti a processi di bioaccumulo, bioconcentrazione e biomagnificazione lungo la catena alimentare [Staples et al., 1997; Cheng et al., 2021a].

Alla luce dei noti effetti negativi derivanti dall'esposizione degli ftalati e nonostante le norme che hanno limitato o vietato l'uso di queste sostanze come additivi, l'inquinamento da ftalati continuerà a destare preoccupazione a causa dell'entità dell'inquinamento da plastica.

In questo contesto, è necessario valutare l'entità dell'inquinamento attraverso studi di biomonitoraggio e, soprattutto, adottare misure di mitigazione e compensazione volte a minimizzare l'impatto della crescente dispersione di questi inquinanti.

Tuttavia, ad oggi, i metodi di rimozione dei contaminanti più utilizzati comprendono una serie di azioni e opere di bonifica ad alto impatto economico-ambientale e impegno sociale, ad esempio, il dragaggio di sedimenti contaminati, le operazioni di stoccaggio di matrici inquinate, il trasferimento in discarica e adozioni di numerosi trattamenti [Eggleton & Thomas, 2004; Parelo, 2010; Cheney et al., 2014].

Tra le possibili soluzioni non dannose per ambiente ed economia, la bioremediation (biorisanamento o biobonifica), ovvero l'insieme di tecniche eco-sostenibili (in situ o ex situ), si concentra sull'utilizzo di bioaccumulatori (bioremediators) o processi biologici (ad esempio: microrganismi, funghi, piante, alghe, ecc.) per rimuovere i contaminanti dall'ambiente [Kensa et al., 2011].

I bioremediators quali le alghe sono candidati ideali, infatti, la 'fitoconcentrazione' ha dimostrato un'ampia efficacia nei confronti di una vasta gamma di inquinanti come mercurio, solventi clorurati, IPA, PCB, ecc. [McCutcheon & Schnoor, 2004; Pilon-Smits, 2005].

In questo contesto *U. lactuca* è tra le specie più utilizzate negli studi di biomonitoraggio sia in campo che in ambiente controllato per le sue ideali caratteristiche che la rendono inoltre un

modello ideale per la realizzazione di opere di biorisanamento, come già dimostrato in letteratura [Cheney et al., 2014].

Inoltre, la biomassa algale, una volta espletata la sua funzione principale, può essere ripulita a sua volta da composti accumulati attraverso metodi green (degradazione fotoindotta, biocatalisi, uso di solventi bio-based, ecc.), scelti in base alle caratteristiche delle molecole da degradare presenti nelle matrici da trattare. In particolare, il processo di fotodegradazione è particolarmente adatto per molecole organiche fotosensibili come i PAEs [Barreca et al., 2013, 2014]. In particolare, la degradazione fotoindotta degli esteri dell'acido ftalico a 254 nm comporta decarbossilazione, idrossilazione, dealchilazione e scissione di legami C-O, C-C e O-alchile [Lau et al., 2005] con efficienza di rimozione dimostrata fino al 90% [Wang et al., 2019]. Nonostante il grande potenziale di applicazione della tecnica sulla biomassa algale, ad oggi non ci sono studi presenti in letteratura.

Lo scopo di questo lavoro di ricerca è quello di arricchire le conoscenze scientifiche relative a questo settore emergente di interesse, attraverso la determinazione qualitativa e quantitativa di sei PAEs particolarmente diffusi nelle matrici ambientali: DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e DnOP in *Ulva lactuca* per verificarne la sua capacità di bioaccumularli. Questa è stata valutata nel tempo durante esperimenti in condizioni controllate di esposizione a diverse concentrazioni. Inoltre, una volta verificato l'uptake, è stata valutata l'efficacia della degradazione fotoindotta dei PAEs dalla matrice algale. Questo lavoro rappresenta la prima valutazione dell'adsorbimento di PAEs in *U. lactuca* in condizioni controllate e l'applicazione di una tecnica sostenibile per la rimozione degli stessi inquinanti in questo tipo di matrici biologiche per applicazioni di biobonifica ambientale.

5.2.2 Risultati e discussione

5.2.2.1 Analisi chimiche dell'uptake di PAEs in *U. lactuca*

Per ogni livello di esposizione e giorno di campionamento, sono state analizzate alghe e sedimenti al fine di valutare come si ripartiscono gli ftalati in funzione del tempo e delle concentrazioni sperimentali. Inoltre, i diversi valori delle costanti di partizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) [Ellington, 1999] intrinseci di ciascun estere ftalico sono stati correlati ai risultati di uptake delle alghe. I dati raccolti, in generale, hanno dimostrato che gli ftalati con valori di $\log K_{ow}$ più elevati erano presenti a concentrazioni più elevate (Figure da 52 a 56).

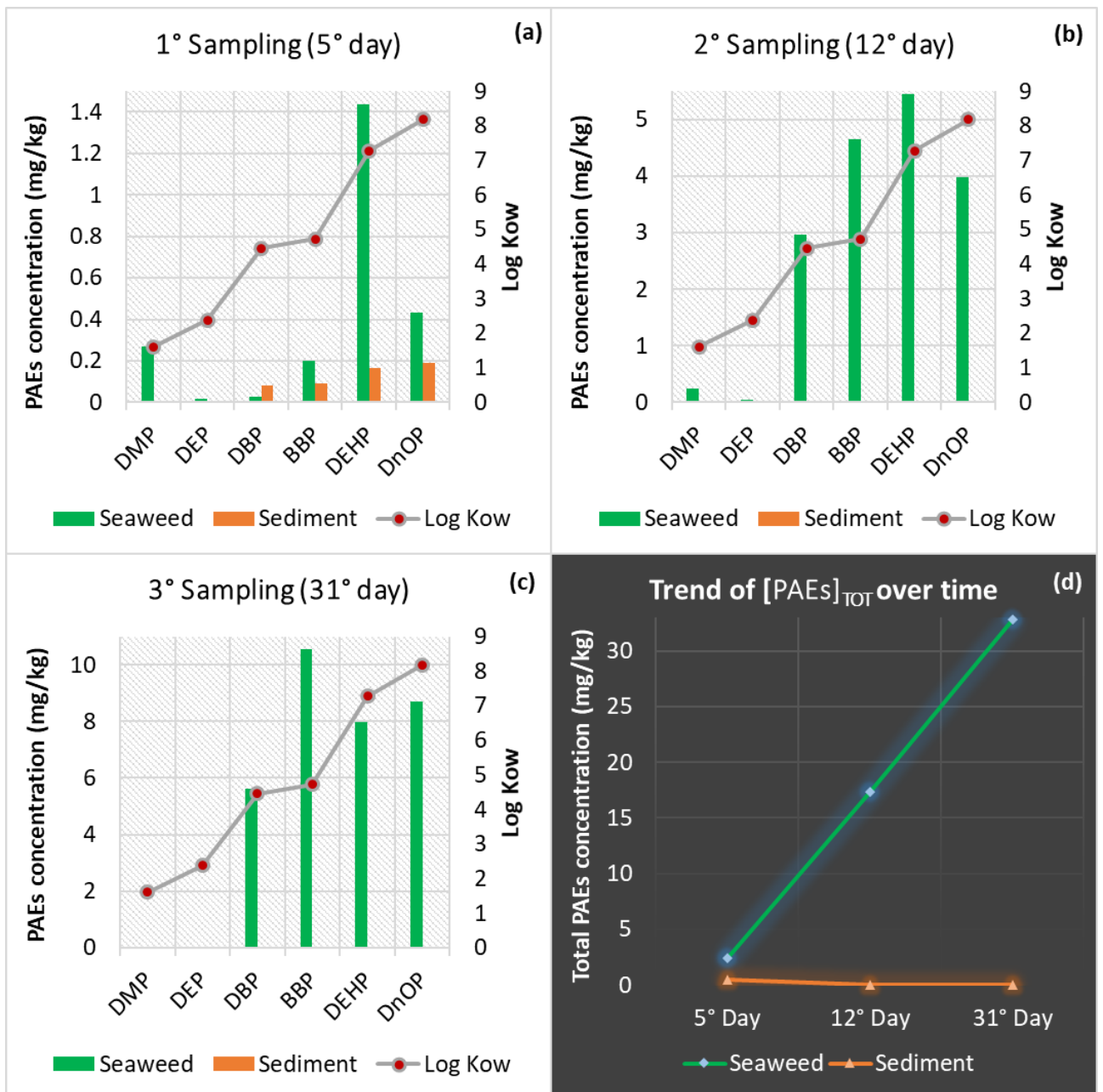


Figura 52. Esperimento di controllo (0 ppm): valori di concentrazione (asse y) per ciascuno dei sei ftalati (asse x) rappresentati dai box e analizzati ai giorni di campionamento 5 (a), 12 (b), e 31 (c), rispetto al coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) (rappresentato dai punti rossi connessi dalla linea grigia). Valori di concentrazione della somma dei sei ftalati ($[PAES]_{TOT}$) (d) misurati in campioni *U. lactuca* e sedimenti analizzati durante i tre giorni di monitoraggio.

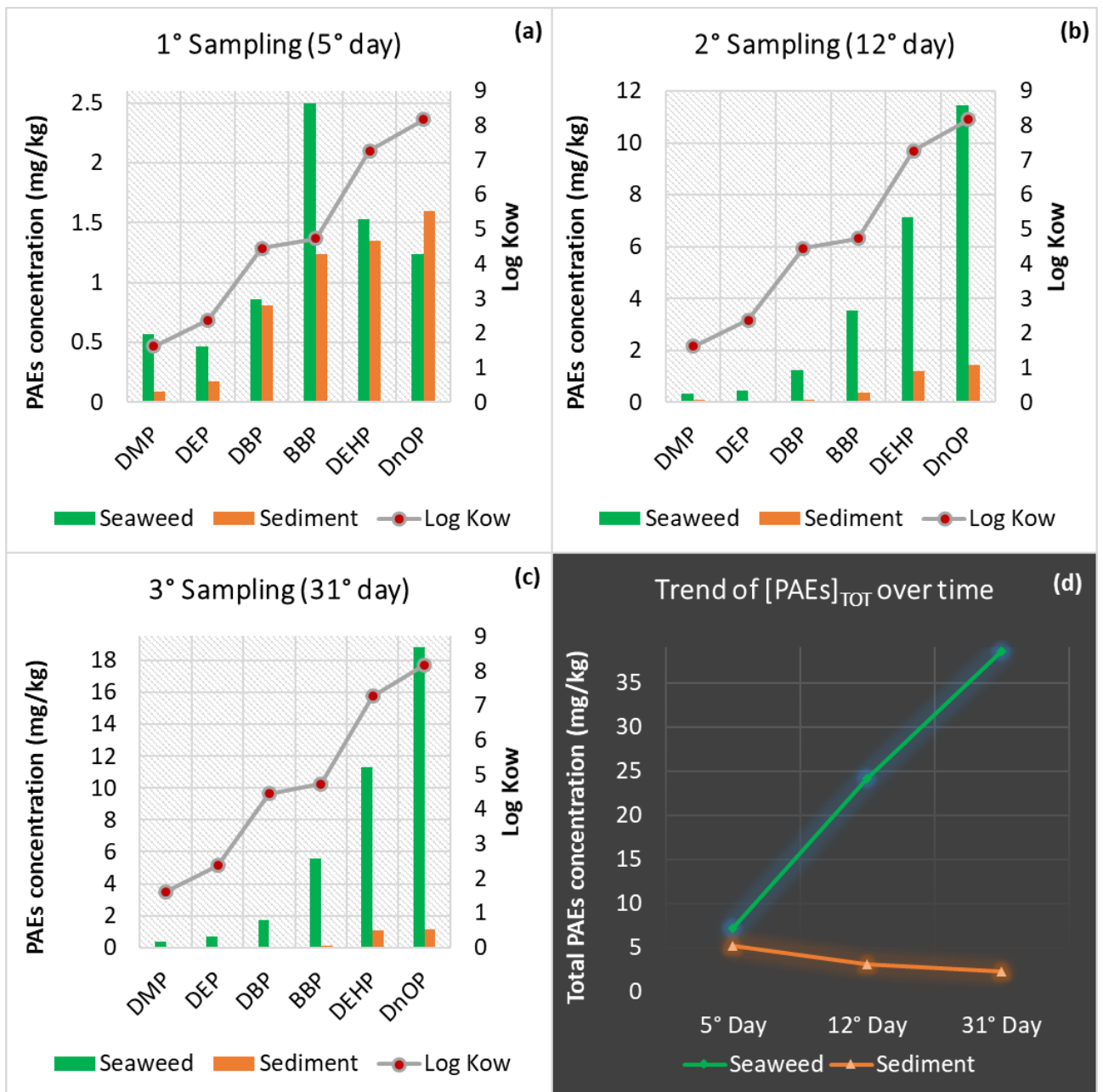


Figura 53. Esperimento di esposizione a 5 ppm: valori di concentrazione (asse y) per ciascuno dei sei ftalati (asse x) rappresentati dai box e analizzati ai giorni di campionamento 5 (a), 12 (b), e 31 (c), rispetto al coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) (rappresentato dai punti rossi connessi dalla linea grigia). Valori di concentrazione della somma dei sei ftalati ($[PAES]_{TOT}$) (d) misurati in campioni *U. lactuca* e sedimenti analizzati durante i tre giorni di monitoraggio.

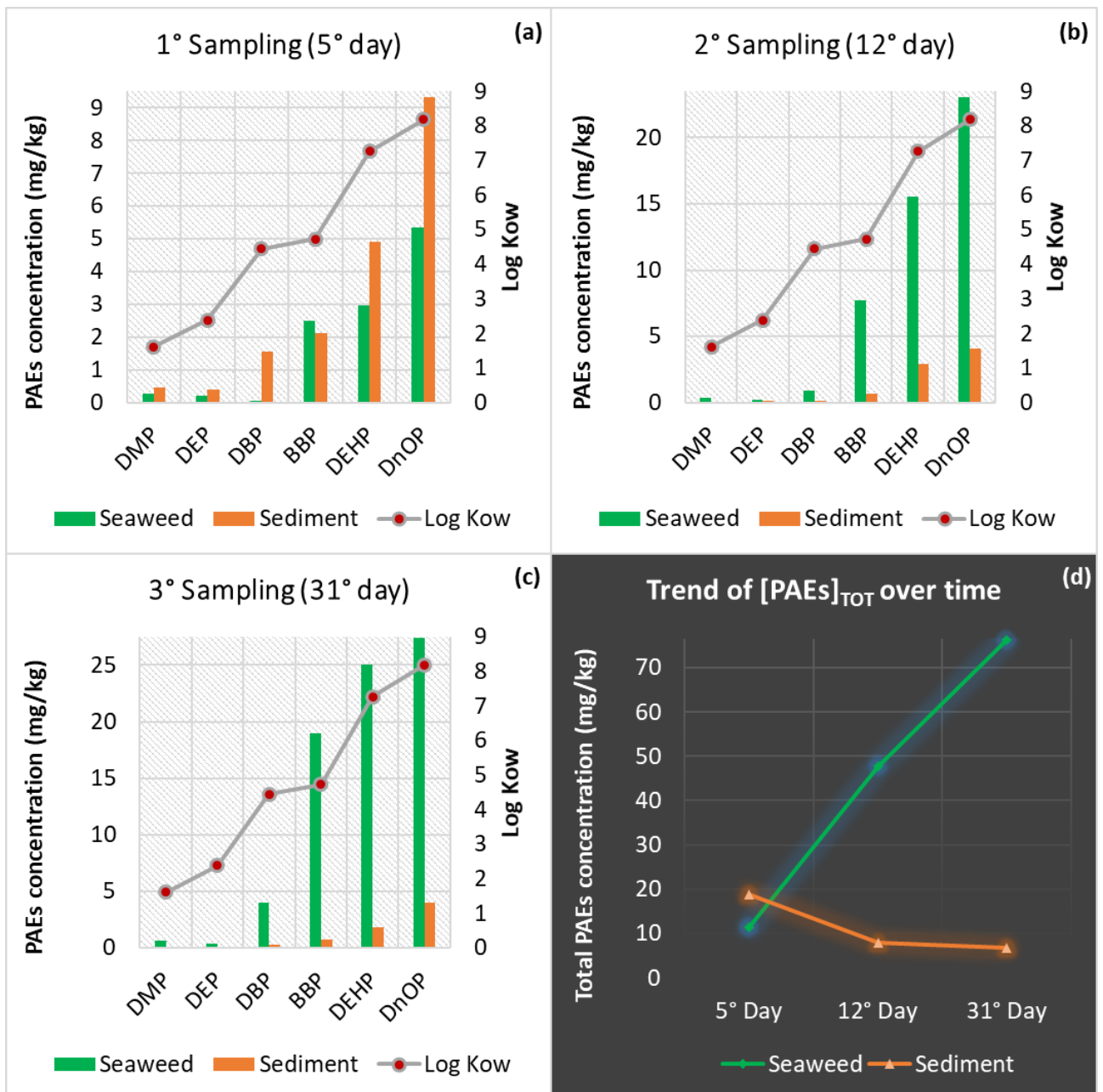


Figura 54. Esperimento di esposizione a 10 ppm: valori di concentrazione (asse y) per ciascuno dei sei ftalati (asse x) rappresentati dai box e analizzati ai giorni di campionamento 5 (a), 12 (b), e 31 (c), rispetto al coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) (rappresentato dai punti rossi connessi dalla linea grigia). Valori di concentrazione della somma dei sei ftalati ($[PAES]_{TOT}$) (d) misurati in campioni *U. lactuca* e sedimenti analizzati durante i tre giorni di monitoraggio.

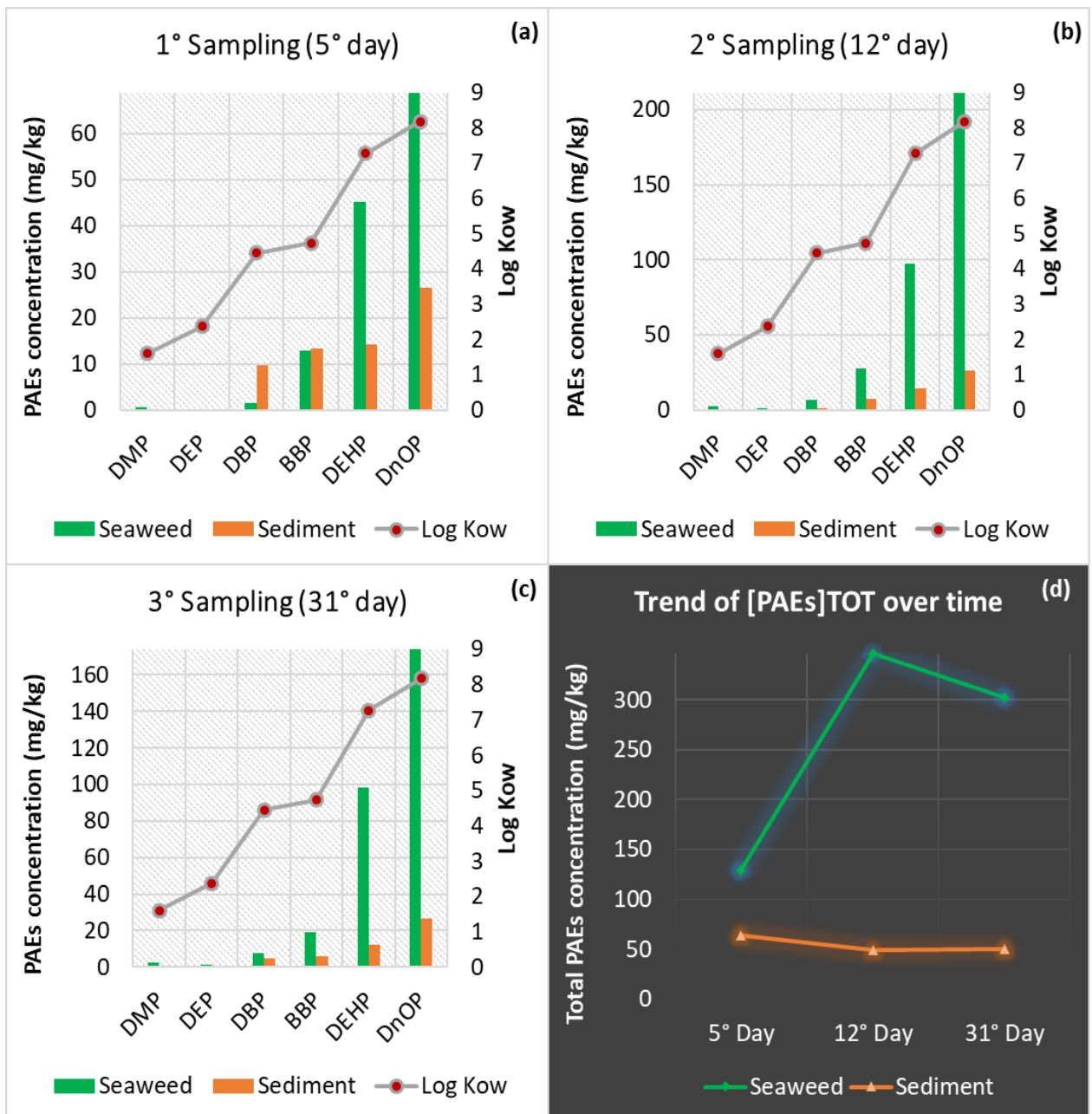


Figura 55. Esperimento di esposizione a 50 ppm: valori di concentrazione (asse y) per ciascuno dei sei ftalati (asse x) rappresentati dai box e analizzati ai giorni di campionamento 5 (a), 12 (b), e 31 (c), rispetto al coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) (rappresentato dai punti rossi connessi dalla linea grigia). Valori di concentrazione della somma dei sei ftalati ($[PAES]_{TOT}$) (d) misurati in campioni *U. lactuca* e sedimenti analizzati durante i tre giorni di monitoraggio.

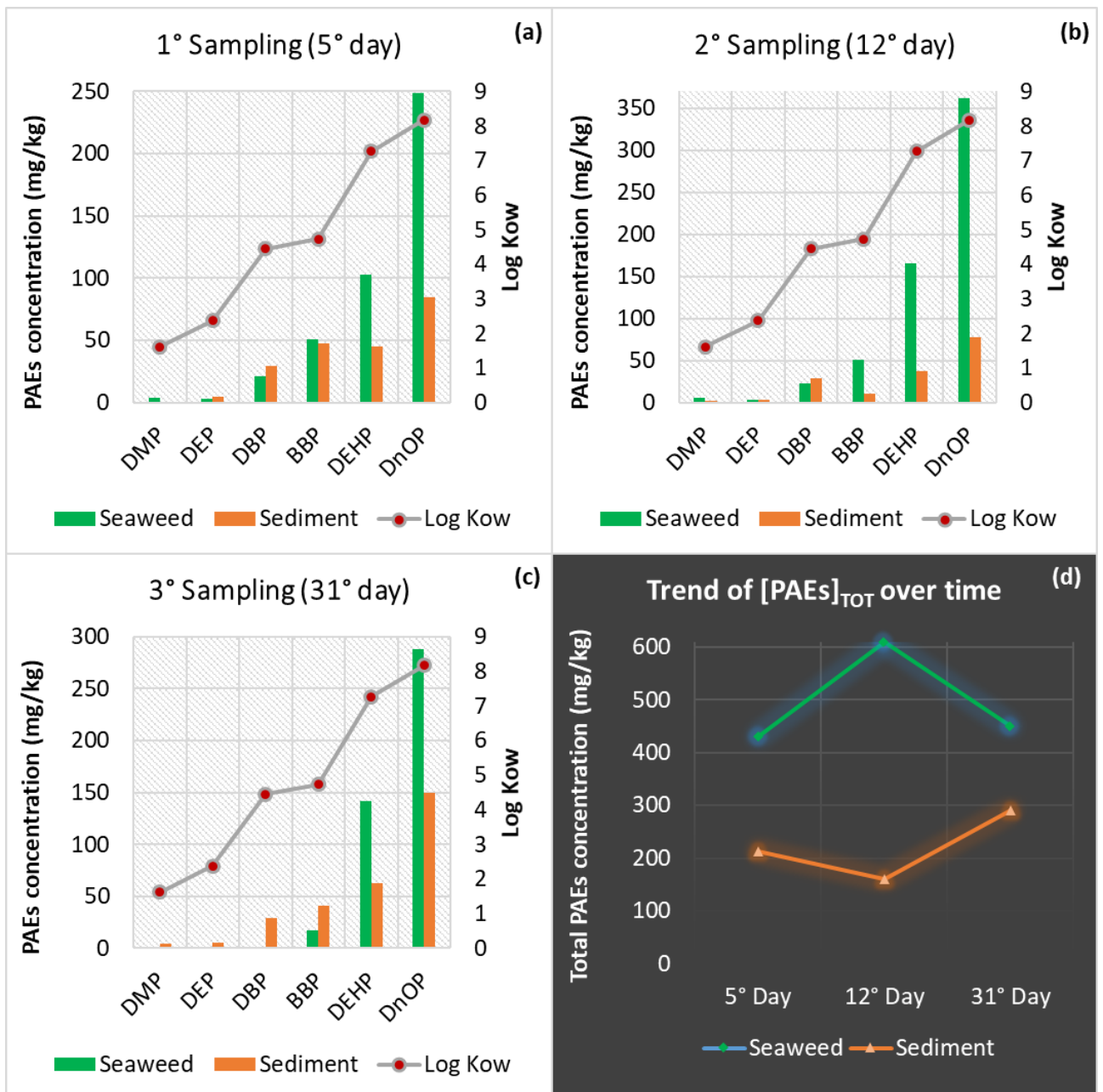


Figura 56. Esperimento di esposizione a 100 ppm: valori di concentrazione (asse y) per ciascuno dei sei ftalati (asse x) rappresentati dai box e analizzati ai giorni di campionamento 5 (a), 12 (b), e 31 (c), rispetto al coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) (rappresentato dai punti rossi connessi dalla linea grigia). Valori di concentrazione della somma dei sei ftalati ($[PAEs]_{TOT}$) (d) misurati in campioni *U. lactuca* e sedimenti analizzati durante i tre giorni di monitoraggio.

L'analisi chimica dei [PAEs] nelle alghe esposte (o non esposte: controllo) a diversi livelli di concentrazione tramite sedimenti contaminati ha mostrato alti livelli di bioaccumulo degli inquinanti, in proporzione maggiore per gli esperimenti di esposizione a concentrazione minore. Infatti, l'esperimento di controllo, al primo campionamento (giorno 5), ha mostrato

inaspettatamente una contaminazione dei sedimenti con una media di $[PAEs]_{TOT}$ di 0.53 ppm, dove le concentrazioni più elevate sono state riscontrate per BBP, DEHP e DnOP con intervalli che andavano da 0.09 a 0.19 ppm (Figura 57).

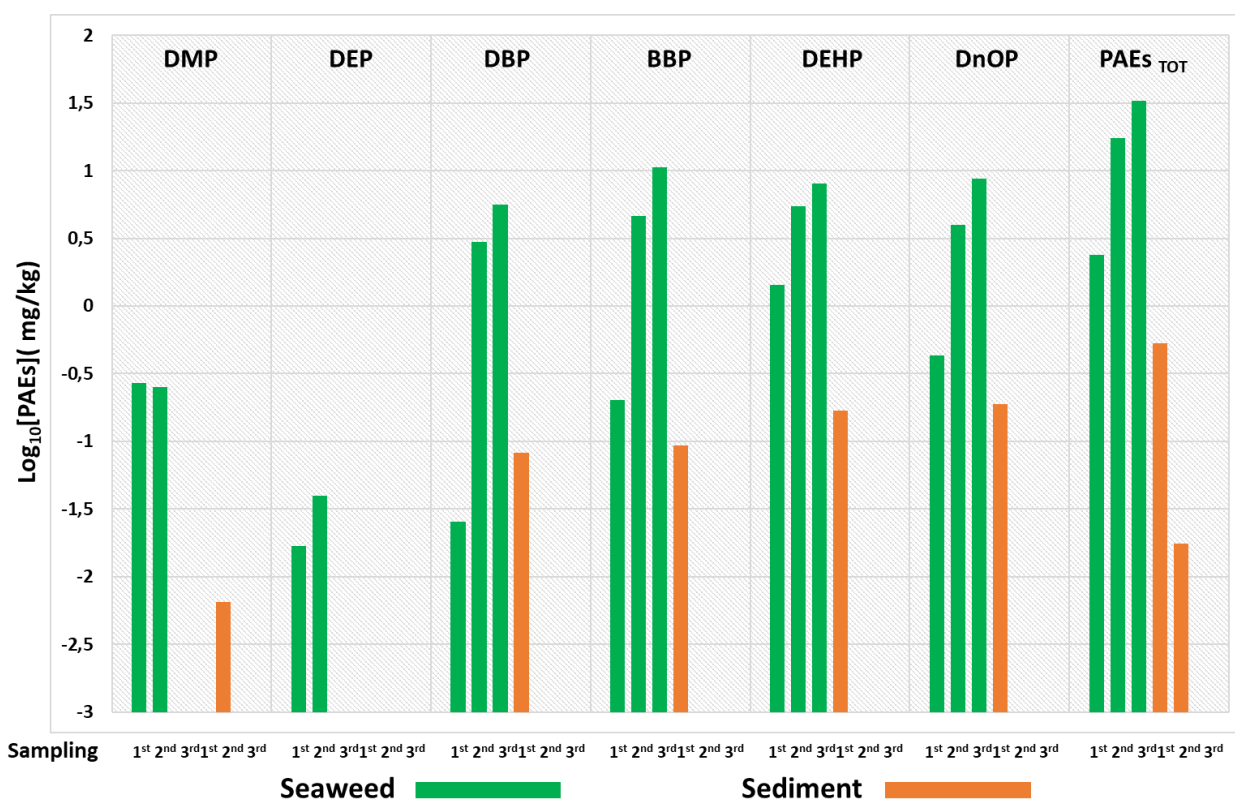


Figura 57. Esperimento di controllo (0 ppm): livelli di concentrazione trasformati in logaritmo (scala dei valori a sinistra dell'asse y) misurati per ciascuno dei sei ftalati e per la loro somma ($PAEs_{TOT}$) (parte superiore dell'asse x) in campioni *U. lactuca* (box in verde) e sedimenti (box in arancione) relativi a ciascuno dei microcosmi analizzati durante il periodo sperimentale nei 3 tempi di campionamento (parte inferiore dell'asse x).

Sorprendentemente, sempre nel gruppo di controllo, tra il primo e il terzo campionamento, vi è stato invece un decremento dei livelli di $[PAEs]$ nei sedimenti del 100% (Figure 52b - 52c, 57) e un conseguente aumento di $[PAEs]_{TOT}$ in *U. lactuca* di circa 14 volte (Figure 52d, 57). Le concentrazioni più elevate registrate durante il secondo campionamento riguardavano DBP, BBP, DEHP e DnOP nell'intervallo da 2.96 ppm per DBP a 5.45 ppm per DEHP (Figure 52b, 57); mentre durante il terzo campionamento questi quattro ftalati sono stati gli unici ad essere rilevati in un range di concentrazione che andava da 5.6 ppm di DBP a 10.56 ppm di BBP (Figure 52c, 57). Inoltre, sebbene nel microcosmo di controllo (nel quale non sono stati aggiunti gli ftalati), le concentrazioni di partenza erano le più basse rispetto a tutti gli altri esperimenti di

esposizione (Figure 53-56 e 59-62), al termine del periodo sperimentale si sono registrati i valori più elevati di \log_{10} BSAF (Figura 58) (range: da 3.75 a 4.02), ad eccezione degli ftalati DMP e DEP (a causa delle basse concentrazioni iniziali e al di sotto dei limiti di rilevabilità dovute probabilmente a fenomeni di biodegradazione [Net et al., 2015]).

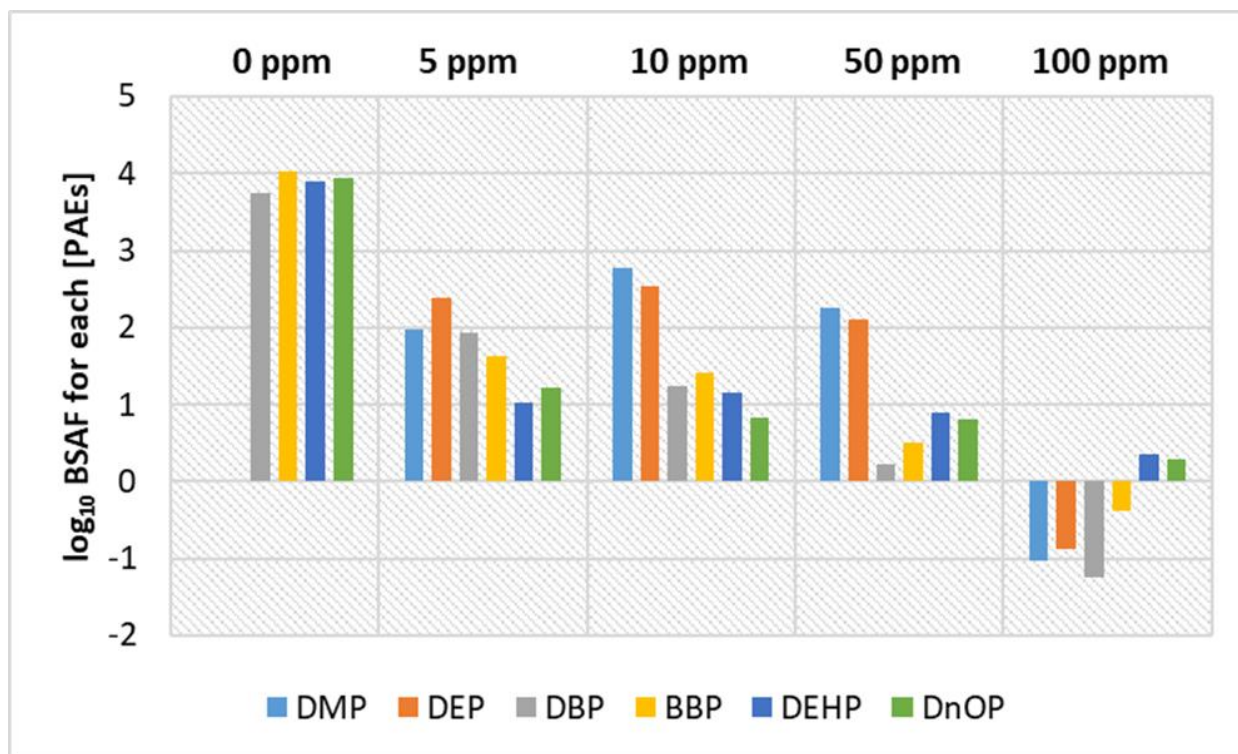


Figura 58. Grafico che mostra i valori del \log_{10} BSAF (asse y) calcolati al termine dell'esperimento (giorno 31) per ogni PAEs (colore diverso di barre), e microcosmi/concentrazioni di esposizione (es. 0 ppm, 5 ppm, ecc.) (parte superiore dell'asse x).

Da tale elaborazione si evince l'elevato grado di bioaccumulabilità dei PAEs nella matrice algale; in particolare, al 31° giorno, i valori di \log_{10} BSAF più elevati degli ftalati più lipofilici erano relativi all'esperimento di controllo, mentre per altri microcosmi i valori registrati erano progressivamente più bassi con l'aumento della concentrazione di esposizione.

In questo contesto, sono stati registrati anche alti valori \log_{10} BSAF (intervallo 0.83-2.78) negli esperimenti a 5 e 10 ppm nei quali, diversamente, DEP e DMP hanno mostrato i livelli di \log_{10} BSAF più elevati.

Riguardo l'analisi di tutte quelle matrici esposte allo standard mix, la concentrazione di esposizione a 5 ppm è stata la più bassa cui sono stati sottoposti i microcosmi e, anche a questo livello di concentrazione, è stata osservata l'elevata capacità di *U. lactuca* di bioaccumulare e concentrare gli esteri addizionati ai sedimenti (Figura 59).

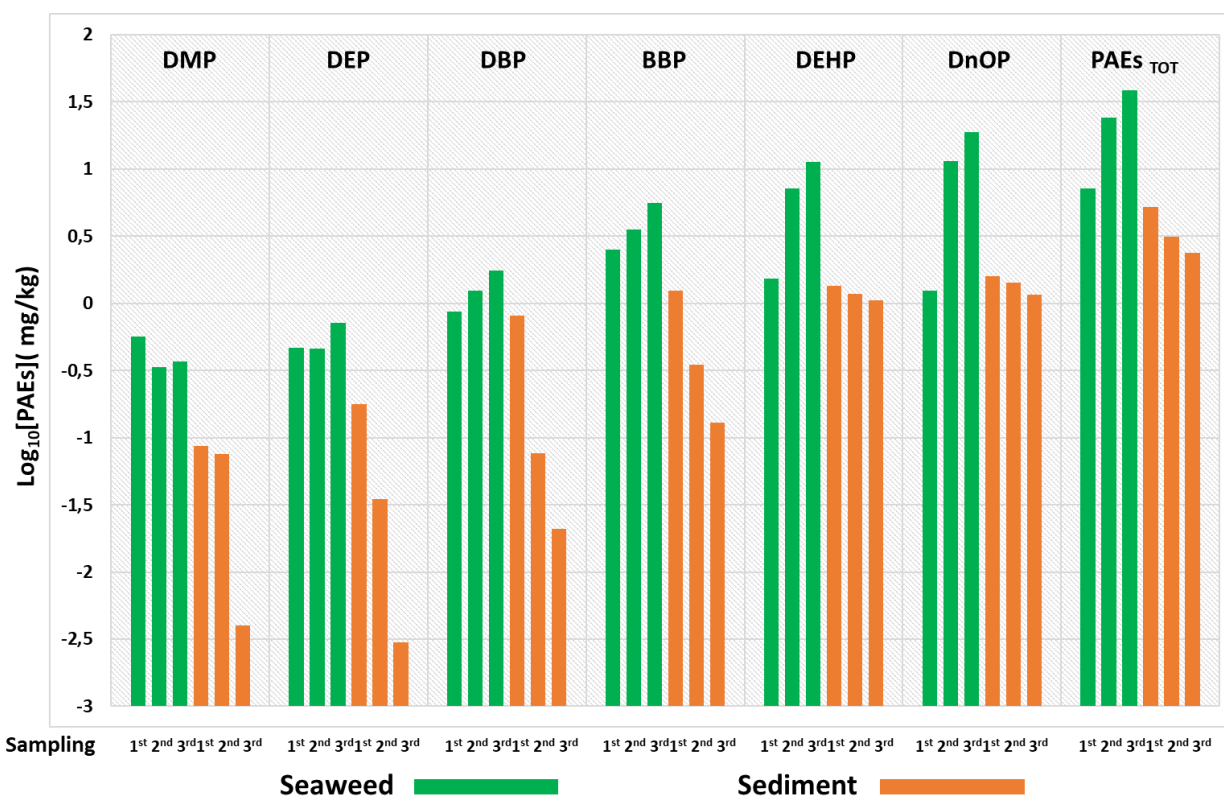


Figura 59. Esperimento di esposizione a 5 ppm: livelli di concentrazione trasformati in logaritmo (scala dei valori a sinistra dell'asse y) misurati per ciascuno dei sei ftalati e per la loro somma (PAEs_{TOT}) (parte superiore dell'asse x) in campioni *U. lactuca* (box in verde) e sedimenti (box in arancione) relativi a ciascuno dei microcosmi analizzati durante il periodo sperimentale nei 3 tempi di campionamento (parte inferiore dell'asse x).

I risultati ottenuti nell'arco di tempo che va da 1° al 3° campionamento hanno mostrato una tendenza di incremento esponenziale dei livelli di concentrazione dei PAEs nelle alghe, con una diminuzione percentuale di [PAEs]_{TOT} nei sedimenti del 53%.

Sebbene il primo giorno di campionamento sia stato rilevato un accumulo totale di PAEs di 7.15 ppm in *U. lactuca* (valore massimo registrato per BBP di 2.5 ppm) (Figure 53, 59), il tasso di adsorbimento più elevato è stato registrato tra il secondo e il terzo giorno di campionamento, che ha mostrato rispettivamente livelli di [PAEs]_{TOT} di 24.14 ppm e 38.54 ppm (Figure 53d, 59). In particolare, in questi ultimi due campionamenti, i livelli più elevati sono stati registrati per il DEHP (7.12 ppm nel 2° campionamento e 11.29 ppm nel 3° campionamento) e per il DnOP (11.45 ppm nel 2° campionamento e 18.84 ppm nel 3° campionamento) (Figure 53b - 53c, 59). Analogamente, nell'esperimento di esposizione a 10 ppm (Figure 54, 60), dal 1° al 3° giorno di campionamento è stata osservata diminuzione di [PAEs]_{TOT} nei sedimenti del 64%.

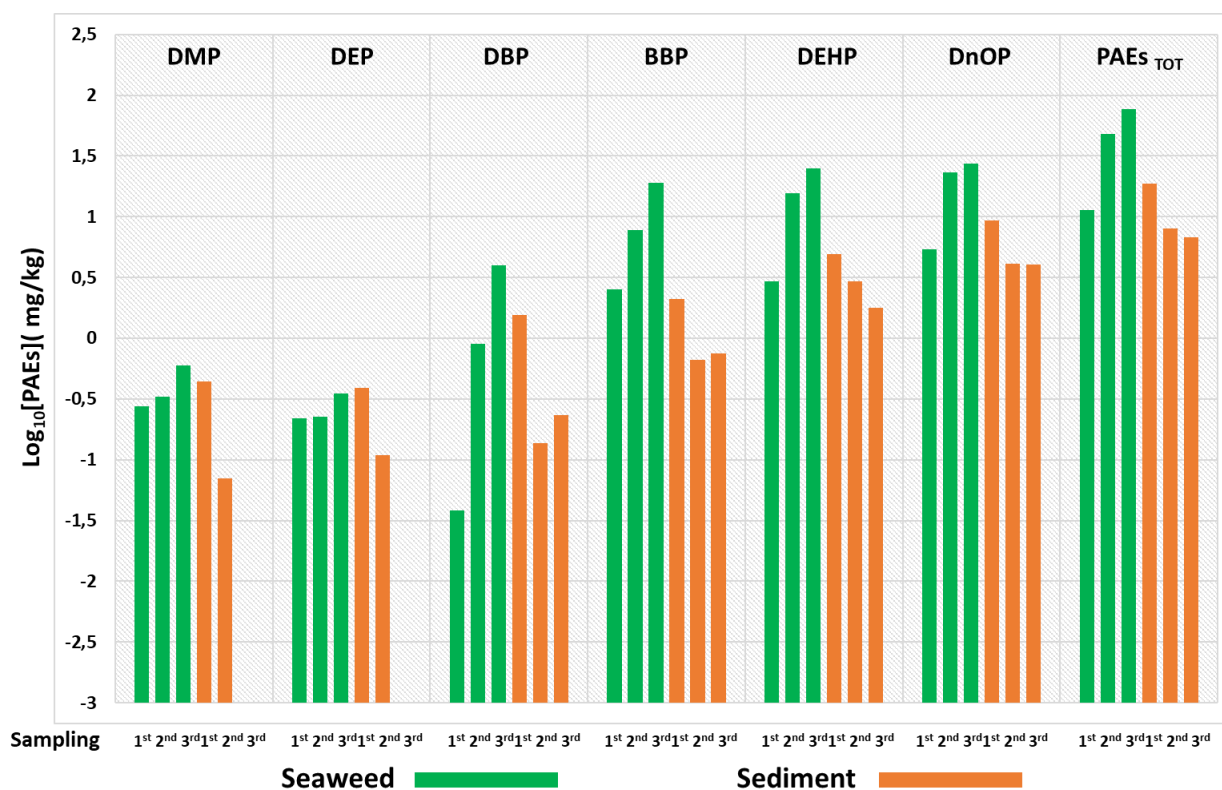


Figura 60. Esperimento di esposizione a 10 ppm: livelli di concentrazione trasformati in logaritmo (scala dei valori a sinistra dell'asse y) misurati per ciascuno dei sei ftalati e per la loro somma (PAEs_{TOT}) (parte superiore dell'asse x) in campioni *U. lactuca* (box in verde) e sedimenti (box in arancione) relativi a ciascuno dei microcosmi analizzati durante il periodo sperimentale nei 3 tempi di campionamento (parte inferiore dell'asse x).

In questo esperimento, anche se nel primo campionamento sono stati registrati livelli di concentrazione più elevati nei sedimenti rispetto alle alghe ([PAEs]_{TOT} = 18.74 ppm nei sedimenti vs ([PAEs]_{TOT} = 11.33 ppm nelle alghe) ad eccezione di BBP (Figure 54a, 60), nel secondo campionamento è stato segnalato un aumento significativo di [PAEs] in *U. lactuca* e una conseguente diminuzione dei sedimenti (Figure 54b, 60). Infatti, durante il secondo campionamento [PAEs]_{TOT} nelle alghe era 47.87 ppm mentre [PAEs]_{TOT} nei sedimenti era 7.96 ppm, invece, durante il terzo campionamento [PAEs]_{TOT} nelle alghe era 76.2 ppm mentre [PAEs]_{TOT} nei sedimenti era 6.8 ppm (Figure 54d, 60).

In entrambi le matrici, le analisi hanno mostrato che il maggior contributo proveniva da BBP, DEHP e DnOP (Figure 54b,c, 60).

Nei microcosmi in cui i sedimenti sono stati preparati a concentrazioni di 50 (Figure 55, 61) e 100 ppm (Figure 56, 62), nonostante l'elevato tasso di uptake registrato in *U. lactuca* tra il primo ([PAEs]_{TOT} = 129.34 ppm per l'esperimento a 50 ppm e 430.58 ppm per l'esperimento a 100 ppm) e il secondo giorno di campionamento ([PAEs]_{TOT} = 346.95 ppm per l'esperimento a

50 ppm e 608.37 ppm per quello a 100 ppm), nel terzo campionamento la tendenza di aumento dei livelli di concentrazione di tutti e 6 i PAEs nelle alghe non è stata osservata (come visto per gli esperimenti precedentemente riportati).

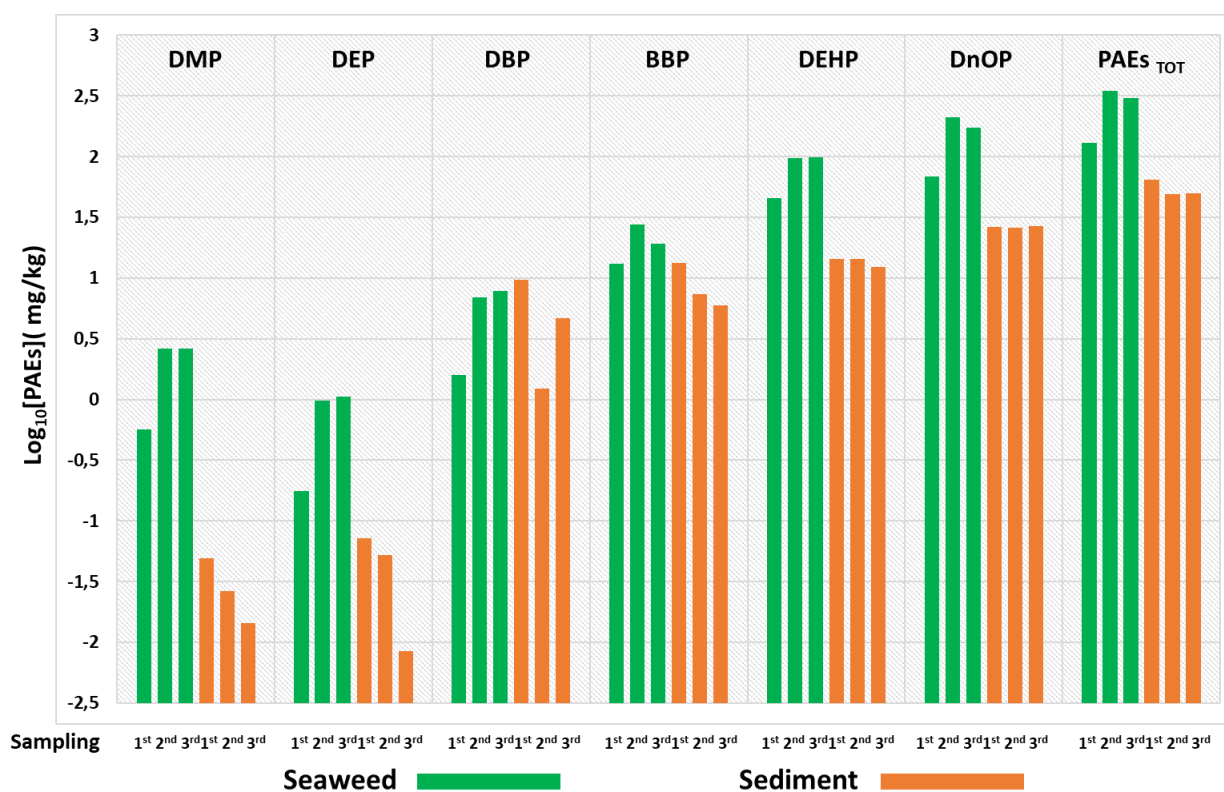


Figura 61. Esperimento di esposizione a 50 ppm: livelli di concentrazione trasformati in logaritmo (scala dei valori a sinistra dell'asse y) misurati per ciascuno dei sei ftalati e per la loro somma (PAE_{STOT}) (parte superiore dell'asse x) in campioni *U. lactuca* (box in verde) e sedimenti (box in arancione) relativi a ciascuno dei microcosmi analizzati durante il periodo sperimentale nei 3 tempi di campionamento (parte inferiore dell'asse x).

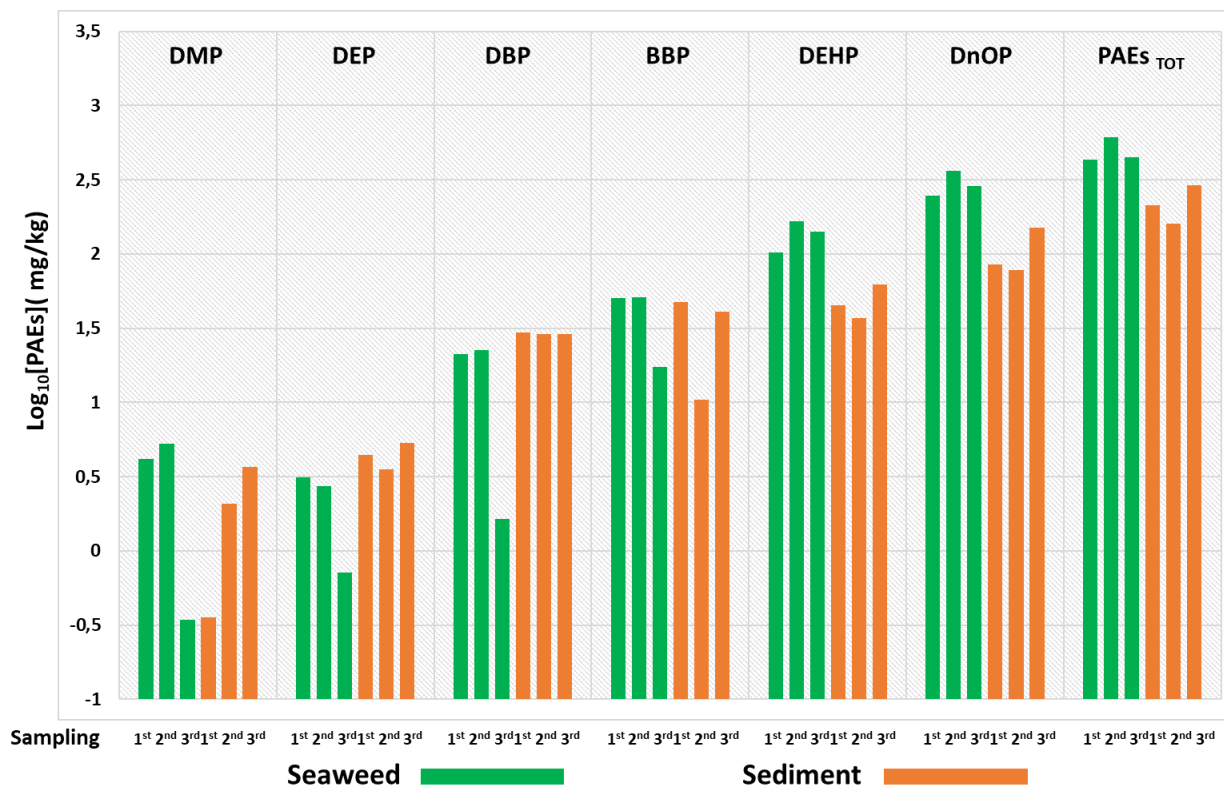


Figura 62. Esperimento di esposizione a 100 ppm: livelli di concentrazione trasformati in logaritmo (scala dei valori a sinistra dell'asse y) misurati per ciascuno dei sei ftalati e per la loro somma (PAE_{TOT}) (parte superiore dell'asse x) in campioni *U. lactuca* (box in verde) e sedimenti (box in arancione) relativi a ciascuno dei microcosmi analizzati durante il periodo sperimentale nei 3 tempi di campionamento (parte inferiore dell'asse x).

Infatti, il primo giorno di campionamento, sono stati registrati valori elevati per DEHP e DnOP (rispettivamente 45.21 e 68.79 ppm per l'esperimento a 50 ppm (Figure 55a, 61) e 102.78 e 248.79 ppm per l'esperimento a 100 ppm (Figure 56a, 62))

Analogamente, il secondo giorno di campionamento i livelli più elevati erano relativi a DEHP e DnOP con valori rispettivamente di 97.66 e 211.3 ppm per l'esperimento a 50 ppm (Figure 55b, 61), e 165.22 e 361.55 ppm per quello a 100 ppm (Figure 56b, 62).

Tuttavia, il giorno successivo al campionamento (terzo) i valori di concentrazione DEHP e DnOP sono diminuiti per entrambi i microcosmi (più per l'esperimento a 100 ppm che per l'esperimento a 50 ppm).

Inoltre, durante l'intero periodo, i sedimenti dei microcosmi a 50 ppm e 100 ppm non hanno mostrato un elevato tasso di decontaminazione del totale dei PAEs, il quale è stato osservato solo tra il primo e il secondo giorno di campionamento (23.4% per 50 ppm e 24.5% per 100 ppm). In questa matrice, infatti, tra il secondo e il terzo giorno di campionamento i livelli di concentrazione totale di ftalati sono rimasti simili per l'esperimento a 50 ppm (da 49.1 a 49.67

ppm) mentre sono aumentati nell'esperimento a 100 ppm (da 159.97 a 290.63 ppm), probabilmente per il rilascio dei PAEs dalla matrice algale ai sedimenti. Degno di nota che, in entrambi i microcosmi, tra il secondo e il terzo giorno di campionamento, è stata registrata la morte di tutte le matrici algali coinvolte (indicata da un forte odore caratteristico della loro decomposizione [Nedergaard et al., 2002]).

In questo modo i PAEs con valori più alti di $\log K_{ow}$ si sono concentrati maggiormente nelle porzioni organiche, con conseguenti effetti negativi sulla salute dell'organismo coinvolto come osservato in altre ricerche in diversi organismi vegetali [Adams et al., 1995; Staples et al., 1997; Jonsson & Baun, 2003; Net et al., 2015; Gu et al., 2017]. D'altra parte, sia in ambiente naturale che in condizioni controllate, i valori più elevati di fattore di bioconcentrazione (BCF) sono stati registrati per gli ftalati con valori di $\log K_{ow}$ e peso molecolare più elevati come DEHP e DnOP al contrario di DEP e DMP che mostrano bassi livelli di bioaccumulo (Net et al., 2015) come osservato in questo studio.

Allo stesso modo, nella presente ricerca, di tutti gli ftalati presenti nei microcosmi, i livelli di concentrazione più elevati erano relativi al DEHP e al DnOP così come analogamente osservato da altri ricercatori in alcune specie di alghe che hanno mostrato un'elevata efficienza di rimozione del DEHP [Chan et al., 2014], lo ftalato più utilizzato in Europa negli anni '90 [Peijnenburg, 2008].

Invece, una probabile spiegazione alla bassa presenza di DMP e DEP potrebbe essere dovuta alla loro relativamente elevata solubilità in acqua (rispettivamente 4200 e 1100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e quindi al loro potenziale trasferimento dai sedimenti alla fase acquosa, a differenza di DBP e BBP che sono stati moderatamente adsorbiti (solubilità in acqua rispettivamente di 11.2 e 2.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e soprattutto del DEHP scarsamente solubile (solubilità in acqua: 0.003 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e del DnOP (solubilità in acqua 0.0005 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) [Staples et al., 1997].

Inoltre, DMP e DEP possono essere più facilmente biodegradati nel tempo (Net et al 2015) e/o fotodegradati (Barreca et al., 2014). Ad esempio, il DEP (rilevato nel biota acquatico a livelli modesti) non viene solitamente biomagnificato poiché 'facilmente' degradato all'interno degli organismi come osservato nei pesci nei quali ha mostrato 2 giorni di emivita [Net et al., 2015].

Infine, considerando che per tutti i livelli di esposizione è stato registrato un apprezzabile processo di adsorbimento sin dal primo campionamento (giorno 5) questo è stato scelto parallelamente anche per effettuare i test di fotodegradazione relativi agli esperimenti di controllo (0 ppm), 10 e 100 ppm.

5.2.2.2 Fotodegradazione di PAEs in *U. lactuca*

Sebbene siano disponibili pochi studi sulla fotodegradazione degli esteri ftalici senza l'uso di catalizzatori [Barreca et al., 2014, Lau et al., 2005; Wang et al., 2019], è stato dimostrato che gli ftalati possono subire la degradazione per fotolisi diretta (assorbimento di radiazioni UV) o indirettamente per reazione con specie attivate (ossigeno singoletto o radicali idrossili) prodotte dall'interazione tra radiazioni UV e le sostanze naturali presenti nell'acqua [Staples et al., 1997]. Il nostro studio ha focalizzato la sua attenzione sulla fotodegradazione diretta nella matrice algale essiccata.

A tal proposito, le alghe non esposte (controllo) o esposte a concentrazioni di 10 e 100 ppm, raccolte ed analizzate il quinto giorno per la valutazione dell'uptake, sono state utilizzate anche per le prove di fotodegradazione degli ftalati a 3 tempi di irradiazione (Figura 63).

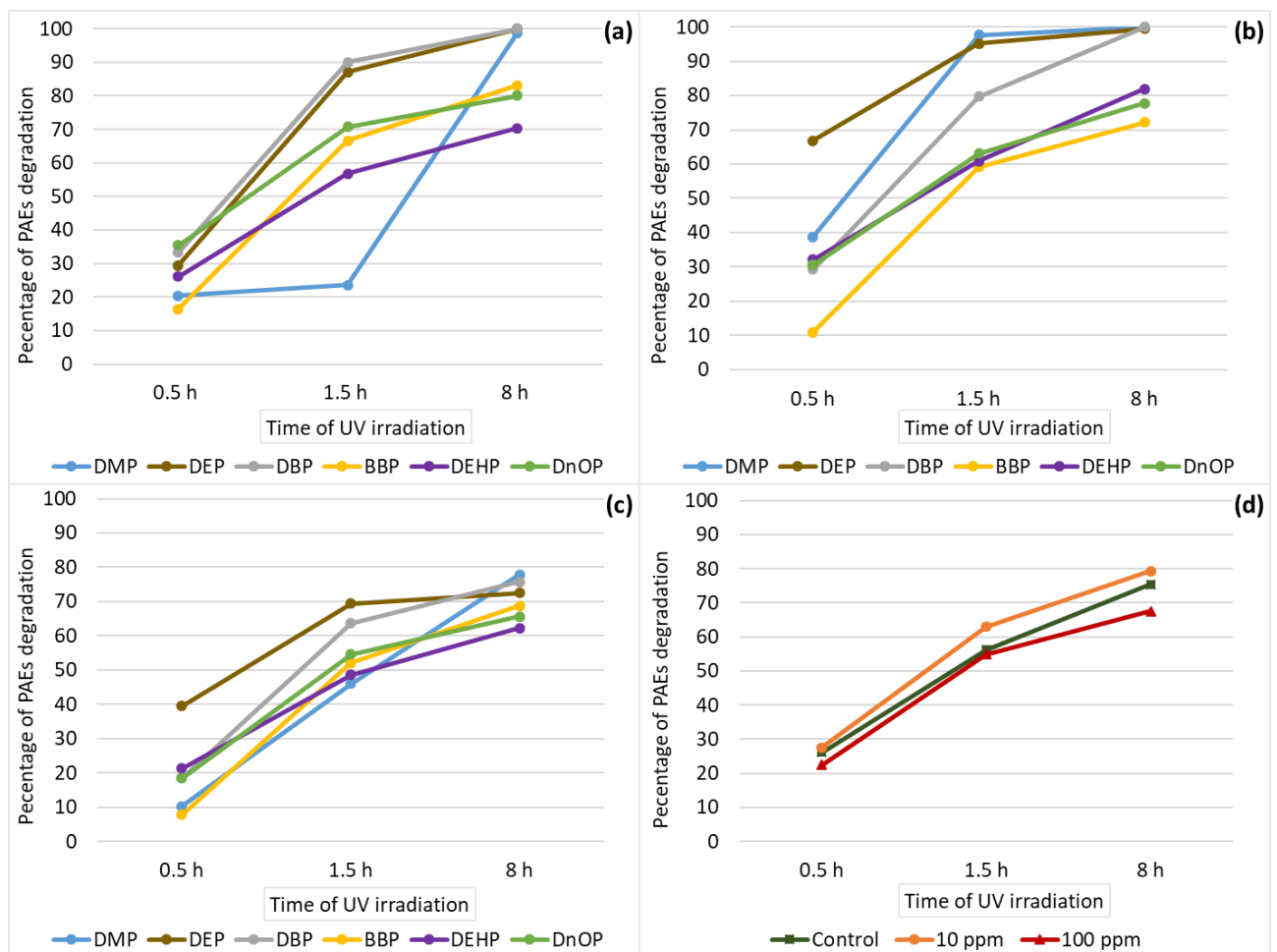


Figura 63. Medie delle percentuali di fotodegradazione (asse y) a 3 diversi tempi di irradiazione: 0.5h, 1.5h e 8h (asse x) di ciascun PAEs accumulato nelle alghe dopo esposizione a 3 livelli di concentrazione sperimentale: 0 ppm (a); 10 ppm (b); 100 ppm (c); per questi tre livelli è mostrata anche la percentuale di fotodegradazione del totale dei sei PAEs (d).

Nelle alghe dell'esperimento di controllo, a 0.5h, la percentuale di rimozione di PAEs era compresa tra il 16.4% (per BBP) e il 35.4% (per DnOP) (Figura 63a), mentre la rimozione totale dei sei PAEs esaminati era del 26.1% (Figura 63d). Nello stesso esperimento, dopo 1.5 ore di emissione di radiazioni UV, la percentuale di rimozione relativa al totale dei sei PAEs è aumentata al 56.1% (Figura 63d) dove il valore minimo di degradazione è stato registrato per il DMP (23.6%) e il massimo per il DBP (90%) (Figura 63a). Analogamente, dopo 8 ore di irradiazione, per tutti gli ftalati è stato osservato un aumento dei valori di rimozione, dal 70% di DEHP al 100% di DEP e DBP (Figura 63a) con una media di fotodegradazione per tutti gli ftalati del 88.7% e una percentuale di degradazione di [PAEs]_{TOT} del 75.3% (Figura 63d).

Analogamente, per le alghe esposte a 10 ppm, è stato osservato un aumento della degradazione a partire da 0.5 h. In particolare, a questo tempo di irradiazione, l'intervallo di fotodegradazione andava dall'11% (per BBP) al 66.9% (per DEP) con una rimozione di [PAEs]_{TOT} del 27.6%. A 1.5h invece quest'ultima percentuale è aumentata al 63% (minimo 59.2% per BBP massimo 97.7% per DMP) per aumentare ulteriormente dopo 8h di irradiazione al 79.4% (minimo 72.2% per BBP e massimo 100% del DBP) con una rimozione percentuale media per i sei PAEs dell'88.5%.

Differentemente, per le matrici algali esposte a 100 ppm, dopo la fotodegradazione sono state ottenute rimozioni percentuali inferiori. Infatti, a 0.5h la rimozione di [PAEs]_{TOT} è stata del 22.5% (minimo 10.2% per DMP massimo 39.5% per DEP) mentre a 1.5h è stata del 54.8% (minimo 46% per DMP, massimo 69.4% per DEP). Infine, ad 8 ore di esposizione alla radiazione UV, la rimozione di [PAEs]_{TOT} è stata del 67.6% (minimo 65.6 per DnOP massimo 77.9% per DMP) con una rimozione media dei sei PAEs del 70.5%.

Nel presente studio è stato osservato che la fotodegradazione è più efficiente nelle matrici algali di controllo unitamente a quelle esposte a una concentrazione di 10 ppm rispetto a quelle esposte a 100 ppm. In generale, è stato osservato che una minore concentrazione di PAEs in *U. lactuca* corrispondeva ad una maggiore efficienza di fotodegradazione. Probabilmente le alte concentrazioni di PAEs determinano l'inibizione del processo di degradazione fotoindotta a causa del numero di molecole adsorbite e presenti nella matrice trattata che schermano dall'irradiazione UV.

Infatti, sia nelle alghe di controllo che in quelle esposte a 10 ppm dopo 8 ore di irradiazione, DMP e DEP (insieme con DBP) vengono rimossi quasi completamente (nel range del 98.78 - 100%) mentre nelle alghe provenienti dall'esperimento di esposizione a 100 ppm, anche se alta, la rimozione per questi tre PAEs era inferiore (nel range del 72.47 - 77.9%). Al medesimo tempo di irradiazione la percentuale di fotodegradazione di BBP, DEHP e DnOP è stata più

elevata per le alghe di controllo e 10 ppm (intervallo 70.12 - 83.06 %) rispetto a quelle dell'esperimento di esposizione a 100 ppm (intervallo 62.25 - 68.81 %).

Alla luce di questi risultati, e considerando che in media gli ftalati tendono a bioconcentrare notevolmente sugli organismi vegetali [Staples et al., 1997], in questo lavoro viene evidenziato l'uso potenzialmente efficace di *U. lactuca*, anche in ambienti fortemente inquinati (ad es. microcosmo a 10 ppm). In questo modo, sarebbe possibile adottare misure di biorisanamento per la rimozione di PAEs e potenzialmente altri inquinanti dall'ambiente, come è stato osservato per i PCBs da Chasey et al. [2014], così come l'uso di tecniche green di degradazione fotoindotta per eliminarli dalle matrici algali che li ha accumulati.

5.2.3 Materiali e metodi

5.2.3.1 Strumenti, attrezzature e software

La procedura per l'estrazione di PAEs è stata adattata da un precedente lavoro del 2018 [Savoca et al., 2018]. Per tutti gli step di estrazione sono stati utilizzati solo strumenti di laboratorio in quarzo, vetro, ceramica o acciaio inossidabile, precedentemente puliti con acetonitrile (1x), esano (1x) e acetonitrile (1x).

Una miscela standard di sei ftalati commerciali in esano (EPA Phthalate Esters Mix), contenente DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e DnOP, ad una concentrazione di 2000 mg·L⁻¹ (2000 ppm) ciascuno, è stata utilizzata sia come riferimento per la taratura nell'intervallo 10-0.001 ppm prima di ogni batch di analisi con risposta lineare $R^2 > 0.99$, sia come standard aggiunto nei campioni prima dell'estrazione per verificare la percentuale di recupero.

La procedura analitica ha previsto il confronto dei risultati ottenuti dopo e senza l'aggiunta di standards (spike) al fine di ottenere la percentuale media di recupero (R%).

I campioni con standard aggiunto di ciascuna matrice (alghe marine, sedimenti) sono stati sottoposti alla stessa procedura di estrazione dei campioni degli esperimenti di uptake /fotodegradazione. Le percentuali di recupero (R %) sono state controllate per ciascun lotto di analisi aggiungendo diverse concentrazioni della soluzione di standard mix nei campioni senza standard prima della procedura di estrazione; in particolare, sono state effettuate prove di recupero in triplicato per matrici algali e sedimenti, aggiungendo lo standard ai campioni per ottenere concentrazioni nominali finali di 5, 10, 50, 100 ppm.

La percentuale di recupero è stata calcolata secondo l'equazione 10 ed il risultato è stato applicato per definire i valori effettivi di ciascun analita nei campioni, attraverso l'equazione 13. Inoltre, la concentrazione totale di ftalati misurata ($[PAEs]_{TOT}$) è stata calcolata per ciascun campione analizzato, espressa in ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) secondo l'equazione 15.

La determinazione dei PAEs è stata effettuata in duplicato mediante strumentazione analitica Agilent Technologies 7000C GC/MS - TQ (Triple Quad) equipaggiata con colonna DB-5MS (lunghezza 30 m; diametro 0.250 mm; film 0.25 µm; limite di temperatura: 350 °C)

Le analisi sono state condotte in modalità di monitoraggio a reazione multipla (MRM) con i seguenti parametri strumentali: flusso 1 mL·min⁻¹; temperatura del forno: da 220 a 310 °C; MSD transfer line temperature: 270°C; temperatura della sorgente: 250 °C; energia degli elettroni: -70 eV; solvent delay: 2.25 min; pressione: 28.2 psi. Questi parametri sono stati disegnati considerando i frammenti di ogni PAEs riportati in Tabella 10.

Tabella 10. Tempo di ritenzione (RT), frammentazione (precursore e prodotto) selezionata nel monitoraggio della reazione multipla (MRM), dwell time e parametri di energia di collisione utilizzati per ogni ftalato.

PAEs	RT (min)	MRM	Dwell time (ms)	Collision energy (eV)
DMP	2.4	163 , 133	30	10
DEP	2.7	149 , 65	30	30
DBP	3.6	149 , 65	30	30
		223 , 149	30	10
BBP	4.8	149 , 65	30	30
DEHP	5.4	149 , 65	30	30
		279 , 149	30	20
DnOP	6.3	149 , 65	30	30
		279 , 149	30	20

Per quanto riguarda le condizioni della rampa di temperatura del forno, inizialmente questa è stata programmata a 220 °C (mantenuta per 1 min), seguita da un aumento di 40 °C·min⁻¹ fino a 310 °C (mantenuta per 5 min). I controlli di qualità (quality check) sono stati effettuati analizzando una soluzione standard di 500 ng·mL⁻¹ (500 ppb) ogni quattro campioni preceduti e succeduti da un'iniezione di acetonitrile (ACN).

Allo stesso modo, ai campioni iniettati in doppio, sono stati intervallate le iniezioni di una soluzione di solvente ACN per evitare contaminazioni crociate. In ogni caso, il programma strumentale prevedeva il lavaggio della siringa con n-esano tre volte prima dell'iniezione e una volta dopo. Il volume di iniezione è stato di 1 µL per campione.

In alcuni casi, nelle analisi del bianco, sono state rilevate tracce di BBP, DEHP e DnOP (non più di 1 ppb) e sono state considerate sottraendo il valore integrale dal cromatogramma dell'analisi del campione.

Le deviazioni standard relative (RSD) su quattro repliche dei controlli di qualità erano inferiori al 5% e le analisi dei campioni sono state corrette di conseguenza.

LOD e LOQ sono stati quantificati con il metodo IUPAC; LOD era $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per DMP e DEHP, $0.15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per DEP e DBP, $0.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per BBP e $0.3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ DnOP; valori di LOQ compresi tra 0.1 e $0.7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ sono stati determinati per tutti gli ftalati.

Per tutti gli analiti determinati, i recuperi medi variavano dal 71% al 164% per i sedimenti e dal 15% all'84% per *U. lactuca* (Tabella 11).

Tabella 11. Percentuali medie di recupero di sei ftalati ottenute da campioni *U. lactuca* e sedimenti cui è stato aggiunto lo standard mix.

PAEs	% R <i>U. lactuca</i>	% R Sediments
DMP	20,00	71
DEP	15,00	111
DBP	46,00	161
BBP	56,00	111
DEHP	84,00	82
DnOP	79,00	72

Questi valori di recupero sono stati utilizzati per quantificare la presenza dei PAEs, sia per la valutazione dell'accumulo durante i tre campionamenti, sia per l'analisi della rimozione di inquinanti attraverso il processo fotochimico. Quest'ultimo consisteva in una strumentazione specifica: reattore fotochimico-Rayonet-RPR-100 dotato di lampade che emettono radiazioni

UV (con lunghezza d'onda principale di 254 nm), all'interno del quale sono stati collocati tubi di quarzo contenenti il campione da trattare.

Il calcolo utilizzato per ottenere la percentuale di fotodegradazione nei campioni di *U. lactuca* è stato realizzato utilizzando l'equazione 16.

$$\% [PAE] Removal = 100 - 100 \times \left(\frac{[PAE]_{tf}}{[PAE]_{t0}} \right) \quad (16)$$

Dove $[PAE]_{tf}$ è la concentrazione di PAEs al tempo finale (tf): post-irradiazione; mentre $[PAE]_{t0}$ è la concentrazione dei PAEs al tempo zero (t0): pre-irradiazione.

Invece, per determinare il fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF) al 31 ° giorno, in conformità con il nostro lavoro precedente (Savoca & Pace, 2021) è stata utilizzata l'equazione 17.

$$\log_{10} BSAF = \log_{10} \left(\frac{[PAE]_{Seaweed} + 0.001 \frac{mg}{kg}}{[PAE]_{Sediment} + 0.001 \frac{mg}{kg}} \right) \quad (17)$$

Per i grafici di uptake e per il grafico di valutazione del BSAF presenti nelle Figure 57-62, tutti i livelli di concentrazione sono stati trasformati in valori logaritmici per una migliore visualizzazione grafica delle tendenze di concentrazione. Per le suddette elaborazioni, tutte le medie dei valori di concentrazione dei PAEs sono state aumentate di 1 ppb per evitare il verificarsi di valori indefiniti di $\log_{10}[PAEs]$ relativi a quei casi in cui la concentrazione era pari a zero (< LOD). A differenza degli esperimenti di uptake, nei quali in diversi casi i PAEs erano sotto il di sotto del limite di rilevazione ($\log_{10}[PAEs] = -3$), per il grafico BSAF, i valori uguali a zero sono stati registrati solo in pochi casi: nell'esperimento di controllo per DMP e DEP in entrambe le matrici (alghe e sedimenti), e negli stessi microcosmi, solo per i sedimenti, questi sono stati registrati anche in DBP, BBP e DEHP, mentre nell'esperimento 10 ppm, nei sedimenti $[PAE]$ era pari 0 per DMP e DEP.

5.2.3.2 Campagna di campionamento e operazioni pre-sperimentali

I campioni di *Ulva lactuca* consistevano in piccoli frammenti di foglie (3-5 cm), raccolte nei pressi della baia di Solanto (Figura 64) (Palermo - Sicilia - Mar Mediterraneo) in un'area di 20 x 10 metri (38 ° 4' 37.88' N; 13 ° 32' 33.83" E) durante il mese di maggio 2021 insieme a sedimenti (ghiaia di granulometria < 0.5 cm di diametro).

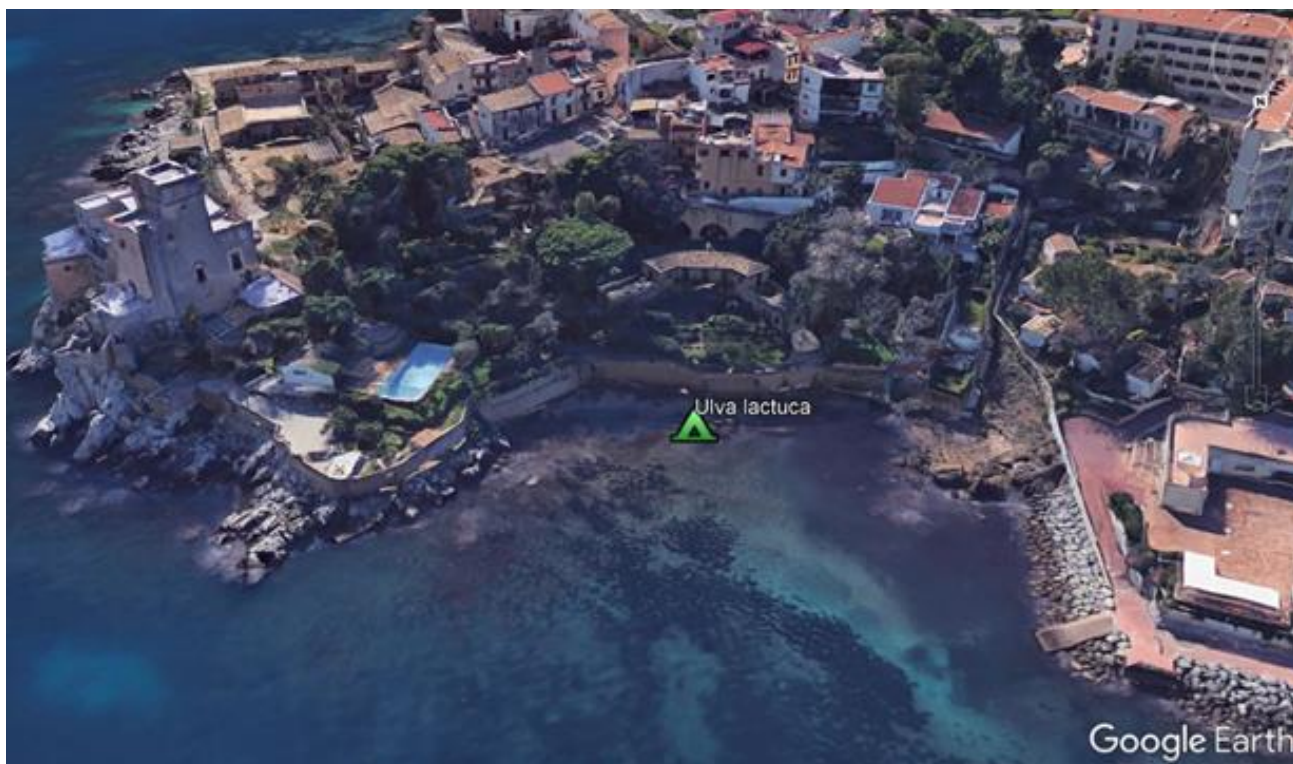


Figura 64. Sito di campionamento – Baia di Solanto (Google Earth)

Campioni di alghe e sedimenti sono stati raccolti manualmente a pochi centimetri dalla superficie ed entro 10 metri dalla costa; mentre l'acqua di mare è stata presa ad una profondità di 5 metri lontano 1 miglio dalla costa. Tutti i campioni sono stati sigillati in barattoli/bottiglie di vetro precedentemente puliti con tre cicli di lavaggio (acetone-trile-esano-acetone-trile) al fine di evitare contaminazioni. I campioni di alghe sono stati immediatamente portati in laboratorio e conservati all'interno di un acquario (volume: 50 L), dotato di un ossigenatore, posto all'interno di una camera termostata a 16 °C. Per ricreare un ciclo di luce naturale, è stato utilizzato un neon (45W; 15cm; 18"; 4500K), collegato a un timer con 12 ore di luce e 12 ore di buio.

In questo modo i campioni sono stati stabulati per un totale di sette giorni prima dell'inizio dell'esperimento. I sedimenti e i campioni di alghe sono stati controllati e lavati con la stessa acqua di mare utilizzata per tutti gli esperimenti per rimuovere materiale indesiderato (piccoli rami, conchiglie, frammenti di altre matrici vegetali, ecc.). Per effettuare una valutazione dello stato di inquinamento iniziale, sono stati raccolti e analizzati 20 frammenti di *U. lactuca*, che hanno mostrato per ogni frammento un intervallo di contaminazione da 0 a 1 ppm.

5.2.3.3 Disegno e condizioni sperimentali

Inizialmente sono state fatte diverse prove (esperimenti pilota) per la scelta delle quantità di matrici, di standard e del tipo di contenitore da utilizzare. Al fine di valutare il trasferimento degli inquinanti dai sedimenti ad *U. lactuca* sono state inizialmente utilizzate delle beute da 50 mL (Figura 65).

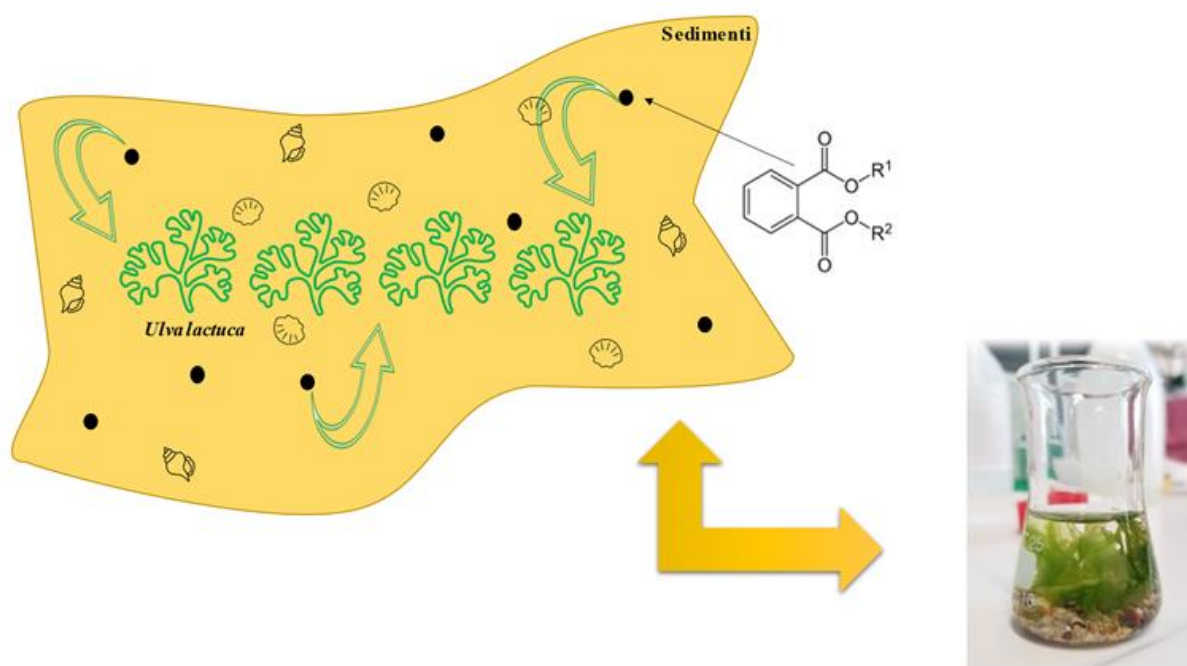


Figura 65. Illustrazione e descrizione del processo di bioaccumulo all'interno di una beute.

Tuttavia, in questa prova, l'utilizzo delle beute ha determinato un forte trattenimento dei PAEs nelle pareti di vetro che avrebbe causato una forte dispersione degli stessi nei passaggi di trasferimento delle matrici da processare nelle provette. Per tale ragione si è scelto di utilizzare dei tubi di vetro da 10 mL e di procedere come di seguito descritto.

Un totale di 1 grammo di *U. lactuca* è stato posto in ciascuno dei tubi di vetro contenenti 1 grammo di sedimento contaminato a 5 diverse concentrazioni nominali: 0 ppm ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 5 ppm ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 10 ppm ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 50 ppm ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 100 ppm ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e 5 mL di acqua di mare (Figura 66).



Figura 66. Immagine dei microcosmi: provette contenenti sedimenti, alghe e acqua di mare.

Dalla soluzione madre standard ($2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mediante diluizioni in serie con esano, sono stati preparati quattro matracci da 10 mL per soluzioni di PAEs da 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm e 5 ppm. Da ognuna di queste soluzioni è stato prelevato 1 mL che è stato aggiunto a ciascuna provetta contenente 1 g di sedimento secco, allo stesso modo 1 mL di esano è stato aggiunto ad 1 grammo di sedimenti del microcosmo di controllo. In ogni provetta, il contenuto è stato omogeneizzato per 30' attraverso vortex ed il solvente è stato fatto evaporare con un leggero flusso di azoto (N_2).

L'esperimento è durato un totale di 31 giorni, con 3 campionamenti di monitoraggio nei giorni 5 (primo campionamento), 12 (secondo campionamento) e 31 (terzo campionamento).

Al fine di valutare il modello di uptake dei PAEs contenuti nei sedimenti delle alghe, durante i 31 giorni di sperimentazione, queste due matrici sono state analizzate per ciascun microcosmo. Tuttavia, i campioni di *U. lactuca* del primo campionamento (giorno 5) sono stati utilizzati sia per lo studio dell'uptake che per l'esperimento di degradazione fotoindotta (per quest'ultimo test solo per concentrazioni di 0, 10 e 100 ppm). Mentre l'esperimento di uptake è stato condotto almeno in duplicato, per le prove di degradazione fotoindotta (in cui è stato anche valutato anche il bioaccumulo), considerando i 3 tempi di esposizione (0.5 h, 1.5 h, 8 h) alle radiazioni, sono stati predisposti altri sei tubi (#1-6 per controllo, #17-22 per l'esperimento a 10 ppm e #33-38 per l'esperimento a 100 ppm). In tutti i casi, tutti i valori di concentrazione riportati nei risultati e nella discussione si riferiscono a valori di media.

Il disegno sperimentale era costituito da 42 tubi è mostrata nella Tabella 12.

Tabella 12. Descrizione schematica del setup sperimentale

		Timeline					
		First sampling (5th day)				Second sampling (12th day)	Third sampling (12th day)
		hv irradiation					
# glass tube (microcosms)	Concentration (mg·L ⁻¹)	0 h	0.5 h	1.5 h	8 h		
1	0	ANALYSIS	ANALYSIS				
2	0	ANALYSIS	ANALYSIS				
3	0	ANALYSIS		ANALYSIS			
4	0	ANALYSIS		ANALYSIS			
5	0	ANALYSIS			ANALYSIS		
6	0	ANALYSIS			ANALYSIS		
7	0					ANALYSIS	
8	0					ANALYSIS	
9	0						ANALYSIS
10	0						ANALYSIS
11	5	ANALYSIS					
12	5	ANALYSIS					
13	5					ANALYSIS	
14	5					ANALYSIS	
15	5						ANALYSIS
16	5						ANALYSIS
17	10	ANALYSIS	ANALYSIS				
18	10	ANALYSIS	ANALYSIS				
19	10	ANALYSIS		ANALYSIS			
20	10	ANALYSIS		ANALYSIS			
21	10	ANALYSIS			ANALYSIS		
22	10	ANALYSIS			ANALYSIS		
23	10					ANALYSIS	
24	10					ANALYSIS	
25	10						ANALYSIS
26	10						ANALYSIS
27	50	ANALYSIS					
28	50	ANALYSIS					
29	50					ANALYSIS	
30	50					ANALYSIS	
31	50						ANALYSIS
32	50						ANALYSIS
33	100	ANALYSIS	ANALYSIS				

34	100	ANALYSIS	ANALYSIS				
35	100	ANALYSIS		ANALYSIS			
36	100	ANALYSIS		ANALYSIS			
37	100	ANALYSIS			ANALYSIS		
38	100	ANALYSIS			ANALYSIS		
39	100					ANALYSIS	
40	100					ANALYSIS	
41	100						ANALYSIS
42	100						ANALYSIS

5.2.3.4 Preparazione dei campioni ed estrazione dei PAEs

Le due matrici (sedimento e alghe) contenute in ciascuna provetta dell'impianto sperimentale sono state estratte con la stessa procedura analitica, al fine di valutare specificamente l'accumulo, la distribuzione temporale dei PAEs e i livelli di concentrazione dopo il trattamento con radiazione UV.

In breve, dopo il periodo di esposizione, le due matrici di ciascun sistema sono state trasferite in provette (accuratamente avvinate con acetonitrile ed esano) e inizialmente sottoposte a un processo di liofilizzazione (essiccatore Scancvac Cool Safe) per eliminare il contenuto di acqua ed evitare interferenze analitiche dovute alla presenza di sali in soluzione acquosa. In questo modo tutti i valori di concentrazione riportati nel lavoro sono relativi al peso secco dei campioni.

In particolare, i frammenti di *U. lactuca* sono stati pesati nella bilancia analitica per valutare il peso della biomassa disidratata (la perdita media del contenuto di acqua dei campioni è stata di $87.4\% \pm 0.2$).

Dalle singole matrici liofilizzate i PAEs sono stati estratti a temperatura ambiente con 2 mL di ACN, poi in bagno ad ultrasuoni per 20 min ed infine centrifugate per 10 minuti a 4000 rpm min^{-1} (Labogene Scanspeed 416); un'aliquota di surnatante è stata trasferita in una vial da 1.5 mL per l'analisi strumentale GC/MS. Nel caso specifico di campioni da 50 e 100 ppm, alla fine del processo di estrazione e prima dell'analisi cromatografica, l'aliquota surnatante ottenuta è stata diluita 1:10 con ACN.

I frammenti liofilizzati di *U. lactuca* contenuti in ciascuna provetta relativi al primo campionamento ed in particolare ai microcosmi di controllo, 10 e 100 ppm, sono stati divisi in 2 parti: una utilizzata per la valutazione dell'uptake (tempo zero), l'altra per test di degradazione fotoindotta mediante irradiazione UV (in tubo di quarzo).

Riguardo l'acqua di mare, benchè sia stata analizzata, i dati non sono stati riportati in quanto l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di determinare l'adsorbimento dei PAEs in *U.*

lactuca dai sedimenti. Tuttavia, per questa matrice sono state inizialmente provate in triplicato (per gli stessi livelli di concentrazione utilizzati nei microcosmi) due tecniche di estrazione: la prima, uguale a quella utilizzata per alghe e sedimenti (descritta precedentemente in questo sotto paragrafo) ha previsto inizialmente un processo di liofilizzazione dei 5 mL di acqua di mare (opportunamente congelata) seguito da estrazione in ACN, sonicazione e centrifugazione; l'altra tecnica utilizzata invece è stata l'estrazione liquido-liquido. Per quest'ultima, 5 ml di acqua di mare sono stati addizionati a 20 mL di esano in un imbuto separatore e, una volta recuperato, il solvente di estrazione è stata portato a secco sotto flusso gentile di azoto all'interno di un box contenente ghiaccio per prevenire eventuali volatilizzazioni. Entrambe le tecniche sono risultate efficaci in termini di estrazione di PAEs ed hanno mostrato percentuali di recupero simili a quelle ottenute per le altre matrici precedentemente mostrate; tuttavia, si è scelto di utilizzare la prima tecnica perché più rapida.

5.2.4 Conclusioni

Gli esteri ftalici rappresentano una minaccia crescente e più che attuale per la salute umana, ed in generale per tutti gli organismi, a causa della loro capacità di bioaccumularsi nei tessuti degli stessi. Tale preoccupazione riflette la necessità di monitorare la distribuzione di queste sostanze lungo le catene trofiche e trovare una soluzione innovativa e sostenibile per rimuovere queste molecole dalle matrici ambientali.

Anche se non figurano nell'elenco di Stoccolma, gli ftalati condividono molte delle caratteristiche delle sostanze chimiche in esso presenti e vengono considerati inquinanti organici persistenti (POPs). In natura, l'ingestione di organismi contaminati da PAEs che stanno alla base della catena alimentare, come le alghe, può portare alla contaminazione dell'intera rete trofica. In questo contesto, i risultati di adsorbimento mostrano livelli di concentrazione più elevati per le specie chimiche con un valore $\log K_{ow}$ più elevato (BBP, DEHP, DnOP) e potenzialmente maggiormente biomagnificabili.

Questo lavoro mostra un'elevata capacità dell'alga *U. lactuca* di accumulare i PAEs; i maggiori livelli di uptake, così come i più alti tassi di fotodegradazione, erano correlati a livelli inferiori di contaminazione (simili a quelli ambientali). Inoltre, considerando il rapido processo di bioaccumulo e di fotodegradazione dei PAEs in *U. lactuca*, questi risultati mostrano promettenti e potenziali applicazioni di bioremediation ambientale. Tale studio pone le basi per ulteriori ricerche relative allo sviluppo e l'ottimizzazione di sistemi di biobonifica, ad esempio: prove di fotodegradazione in condizioni ambientali diverse (ad es. in soluzione acquosa) ed indagini utili per l'identificazione dei prodotti di trasformazione di questi inquinanti post-irradiazione.

6. Studi sul microbiota acquatico: organismi marini e rifiuti plastici come potenziali vettori di antibiotico-resistenza

Questa tematica comprende ricerche svolte in collaborazione con altri gruppi e per le quali ho dato il mio contributo nelle analisi degli antibiotici (sviluppo, ottimizzazione e applicazione di tecniche e metodologie di estrazione ed analisi HPLC) nella ricerca bibliografica, nell'editing degli articoli e nel campionamento delle matrici da analizzare.

6.1 *Caretta caretta* come potenziale vettore di microbiota antibiotico-resistenti

Le tartarughe marine possono essere considerate una specie sentinella per il monitoraggio della salute degli ecosistemi marini, agendo, allo stesso tempo, come vettori di microrganismi. Infatti, queste possono acquisire il microbiota dai loro siti riproduttivi e dalla loro alimentazione, contribuendo alla diffusione di ceppi resistenti agli antibiotici in ambienti incontaminati. Questo studio mira a rivelare la presenza di batteri resistenti agli antibiotici in (i) tartarughe marine *Caretta caretta* spiaggiate lungo le coste della Sicilia (Mar Mediterraneo), (ii) uova non schiuse e/o schiuse, (iii) sabbia dal nido delle tartarughe e (iv) acqua di mare.

6.1.1 Introduzione

La resistenza agli antimicrobici (AMR) può essere vista come una diretta conseguenza dell'uso improprio di antibiotici che porta inesorabilmente all'acquisizione di caratteri di tale resistenza (geni di resistenza agli antibiotici: ARGs) da parte dei microrganismi [Carroll et al., 2015].

Le acque reflue provenienti dall'agricoltura, dagli ospedali, dalle fattorie o dagli impianti di trattamento delle acque reflue urbane potrebbero contenere batteri resistenti che, a causa di fenomeni di infiltrazione, possono contribuire a contaminare ambienti dove gli ARGs possono essere trasferiti ad altri batteri ivi presenti attraverso i ben noti meccanismi di trasferimento genico orizzontale [Al-Bahry et al., 2009b; 2009c; Pontes et al., 2009].

Poiché gli ARGs sono spesso associati a cassette geniche contenenti integroni di classe I [Seiler & Berendonk, 2012; Di Cesare et al., 2013; 2016a; 2016b], responsabile del trasferimento genico coniugato-mediato [Deng et al., 2015], la presenza concomitante di ARG e del gene *intI* nei campioni di DNA di metagenomico rappresenta una allarmante preoccupazione.

Pertanto, sia negli ambienti marini che in quelli terrestri, la fauna selvatica può entrare in contatto diretto con la maggior parte degli antibiotici, anche a concentrazioni sub-inibitorie [Duarte et al., 2019], portando alla selezione di un microbiota resistente agli antibiotici. In questo contesto, la fauna selvatica rappresenta un potenziale serbatoio, o vettore, di patogeni resistenti e ARGs [Wallace et al., 2013; Stewart et al., 2014; Kraemer et al., 2019]; pertanto,

nello studio della diffusione dell'AMR, può essere utile valutare il ruolo delle specie selvatiche migratorie, che possono portare un microbiota resistente.

Le tartarughe marine sono considerate un eccellente bioindicatore dell'inquinamento marino [Foti et al., 2009; Al-Bahry et al., 2011b; Ahasan et al., 2017; Savoca et al., 2018; Pace et al., 2019a; 2019b]. A causa della loro alimentazione, abitudini riproduttive, longevità e consueta presenza nelle zone costiere colpite da attività antropiche, potrebbero acquisire microrganismi autoctoni resistenti agli antibiotici.

Caretta caretta è la specie di tartaruga marina più abbondante del Mediterraneo ed è oggetto di numerosi studi e programmi di ricerca finalizzati alla sua protezione e conservazione. Molti eventi, quali le catture accidentali mediante la pesca [Caracappa et al., 2018; Pulcinella et al., 2019], l'inquinamento delle acque [Savoca et al., 2018], la presenza di funghi nei nidi delle uova [Gambino et al., 2020] e i cambiamenti climatici globali, incidono sullo stato sanitario e sulla conservazione delle tartarughe marine [Caracappa et al., 2016]. Per quanto ne sappiamo, poche ricerche [Foti et al., 2009; Fichi et al., 2016; Pace et al., 2019a; 2019b] hanno valutato la frequenza dei batteri resistenti agli antibiotici isolati dalle tartarughe marine adulte del Mar Mediterraneo. Lo scopo del presente studio è stato di valutare il profilo di resistenza antibiotica dei batteri isolati da: tartarughe marine *Caretta caretta* spiaggiate lungo le coste della Sicilia, uova da schiuse e/o non schiuse, sabbia e acqua di mare, combinando analisi microbiologiche e molecolari per la rilevazione di geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti.

6.1.2 Risultati

6.1.2.1 Identificazione batterica

Tra tutti i campioni raccolti, attraverso test biochimico-enzimatici, sono stati isolati e identificati un totale di 44 ceppi batterici appartenenti a 12 diversi generi tra Gram-negativi (n = 8) e Gram-positivi (n = 4). In generale, gli isolati più abbondanti appartenevano ai seguenti generi: *Aeromonas spp.* (n = 20), *Citrobacter spp.* (n = 5), *Enterobacter spp.* (n = 4), *Vibrio spp.* (n = 4), *Bacillus spp.* (n = 3), *Streptococcus spp.* (n = 2); per altri generi è stato isolato un solo ceppo (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus faecium*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas spp.*). In particolare, i ceppi batterici maggiormente presenti (isolati da ogni categoria di campioni e prevalentemente nei diversi tipi di tamponi raccolti) erano quelli appartenenti ai generi *Aeromonas* (Figura 67).

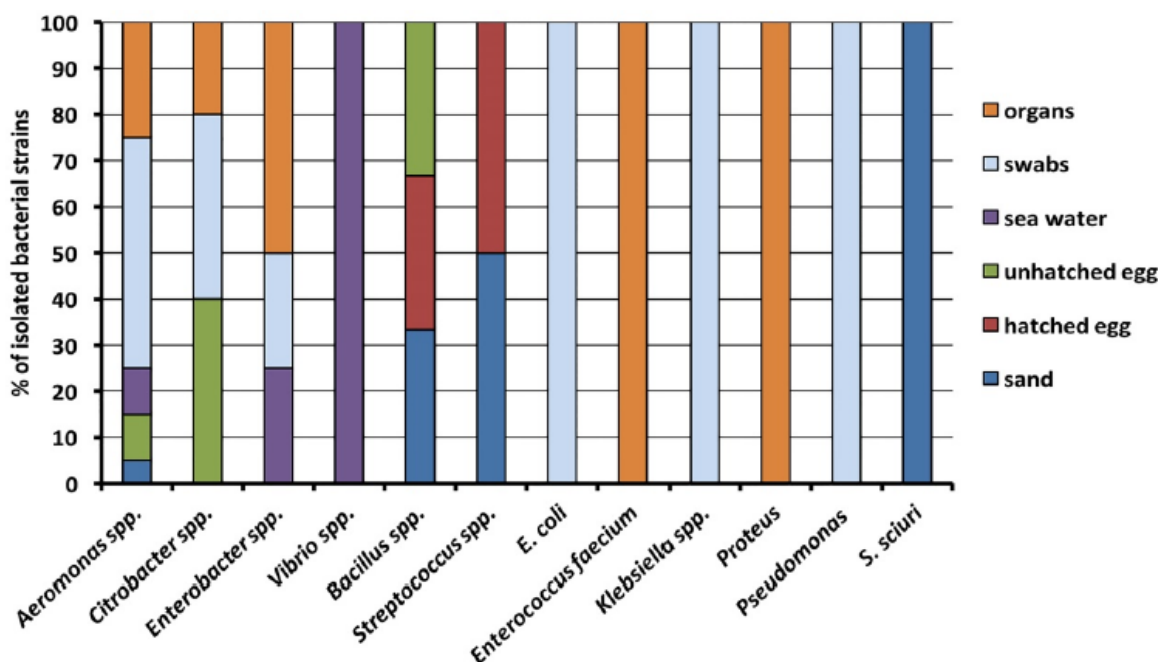


Figura 67. Distribuzione percentuale dei generi batterici in organi, tamponi, acqua di mare, uova e sabbia.

I batteri *Citrobacter* sono stati isolati dalle uova non schiuse (tuorlo e guscio d'uovo interno), da un tampone orale e da un tampone cloacale di due diverse tartarughe marine vive, nonché dall'intestino di una morta. Ceppi di *Enterobacter spp.* sono stati invece riscontrati in un campione di acqua marina, in un tampone cloacale e in due organi di due tartarughe marine morte. Riguardo i microrganismi appartenenti ai generi *Bacillus* e *Streptococcus*, questi sono stati isolati da campioni prelevati da sabbia e uova. *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Pseudomonas spp.* sono stati isolati rispettivamente da un tampone cloacale, uno orale e uno di pelle di tartarughe marine vive, mentre *Enterococcus faecium* e *Proteus vulgaris* sono stati ritrovati solo negli organi. Infine, *Staphylococcus sciuri* e *Vibrio spp.* sono stati trovati rispettivamente solo in un campione di sabbia e in due diversi campioni di acqua marina.

6.1.2.2 Resistenza antibiotica

Il test di resistenza agli antibiotici ha dimostrato che quasi tutti gli isolati microbici (eccezione fatta per uno intermedio e suscettibile isolato dall'acqua di mare) erano resistenti alla cefazolina (95.5%), mentre il 43.2% degli isolati mostrava resistenza alla streptomina. In ordine percentuale decrescente, gli isolati erano resistenti all' amoxicillina/acido clavulanico e colistina (entrambi per il 34.1%), ceftriaxone e tetraciclina (entrambi 18.2%), sulfametossazolo/trimethoprim (15.9%) ed enrofloxacin (13.6%). Inoltre, sono state trovate elevate percentuali di batteri che mostravano una resistenza intermedia all'amoxicillina/acido

clavulanico e colistina (entrambi 36.4%), enrofloxacin (29.5%) e streptomycin (27.3%) (Figura 68).

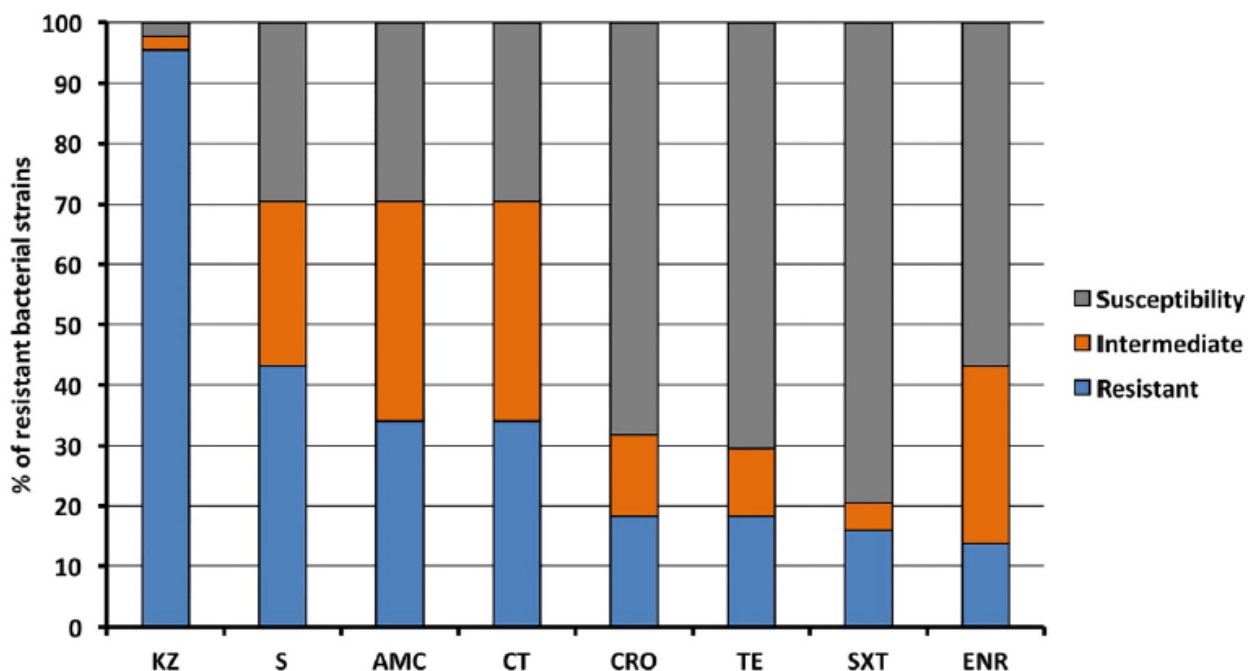


Figura 68. Percentuale di isolati resistenti, intermedi o sensibili agli agenti antimicrobici. KZ, cefazolina; S, streptomycin; AMC, amoxicillina/acido clavulanico; CT, colistina; CRO, ceftriaxone; SXT, sulfametossazolo/trimethoprim; TE, tetraciclina; ENR, enrofloxacin.

Gli organi delle tartarughe marine morte contenevano batteri resistenti a tutti gli antibiotici testati, e, allo stesso modo, anche le uova schiuse, con unica eccezione della tetraciclina. Una tendenza simile è stata osservata anche per i ceppi batterici isolati dai campioni di sabbia, ad eccezione del sulfametossazolo/trimethoprim e della tetraciclina. Il tampone orale e le uova non schiuse insieme ai tamponi cloacali contenevano rispettivamente isolati resistenti contro sei e cinque antibiotici. Infine, i campioni di acqua di mare contenevano batteri resistenti alla cefazolina, la streptomycin e al sulfametossazolo/trimethoprim, mentre i tamponi di pelle contenevano batteri resistenti a cefazolina, streptomycin e amoxicillina/acido clavulanico (Figura 69).

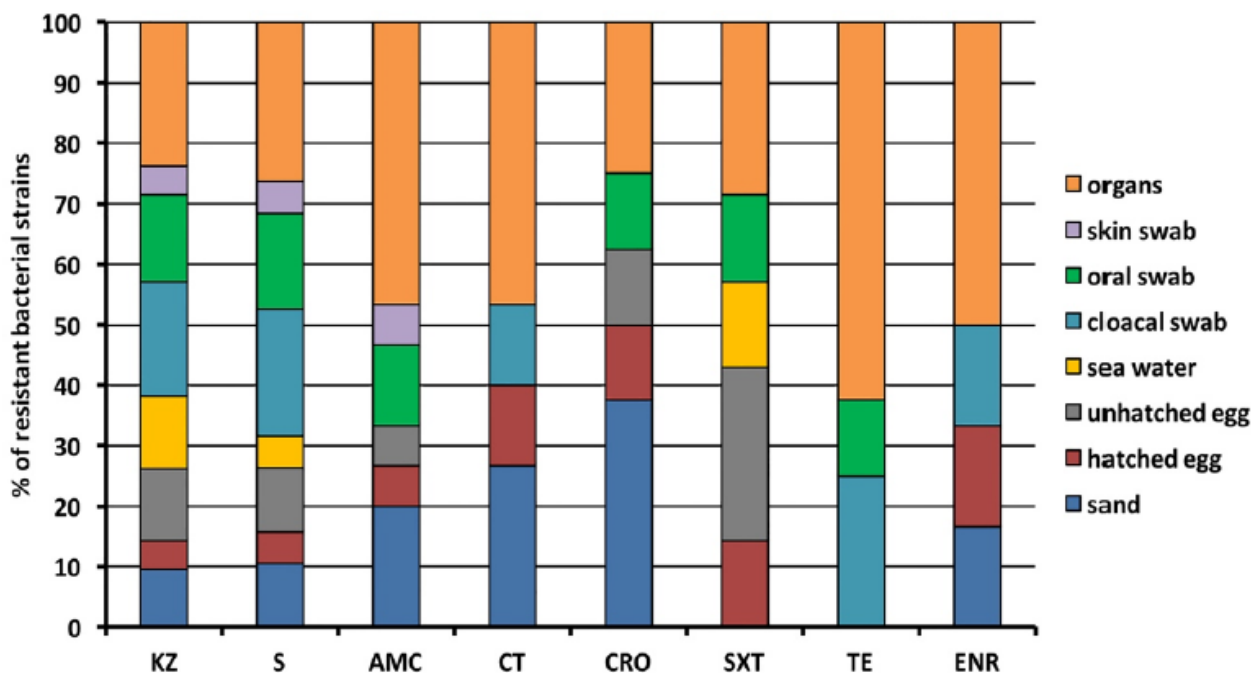


Figura 69. Distribuzione percentuale di isolati resistenti di diversa origine. KZ, cefazolina; S, streptomycin; AMC, amoxicillina/acido clavulanico; CT, colistina; CRO, ceftriaxone; SXT, sulfametossazolo/trimethoprim; TE, tetraciclina; ENR, enrofloxacin.

Questa analisi ha dimostrato che 13 isolati batterici erano resistenti a due dei sette antibiotici testati. D'altra parte, gli isolati resistenti a tre, quattro e cinque antibiotici erano significativamente più bassi, ossia, cinque, sette e sette specie, rispettivamente. In particolare, un solo ceppo batterico era resistente a sei o sette antibiotici (Figura 70).

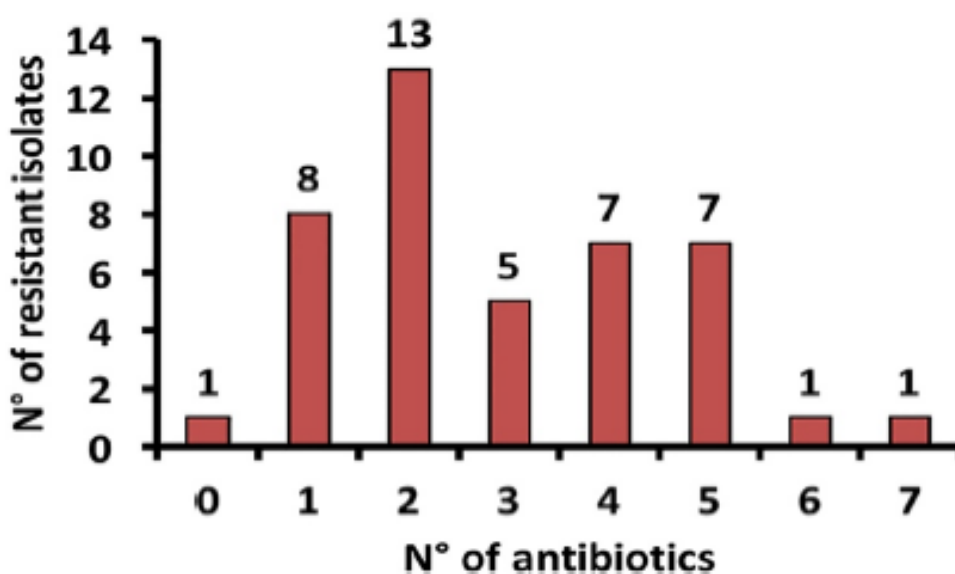


Figura 70. Numero di batteri con resistenza multipla agli antibiotici.

6.1.2.3 Rilevazione dei geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti

Il DNA metagenomico è stato estratto da 16 campioni scelti a caso e analizzato tramite PCR per i geni *blaTEM*, *blaCTXM*, *qnrS*, *sulII* e *tetA*, che sono imputati più frequentemente alla resistenza agli antibiotici (Tabella 13). Inoltre, è stata studiata la presenza dell'elemento mobile *int1*, così come i geni *czcA* e *arsB* per i metalli pesanti. Quasi tutti i campioni (81.25%) erano positivi per la presenza del gene *blaTEM*, responsabile della resistenza agli antibiotici β -lattamici, mentre una percentuale inferiore (31.25%) di metagenomi era positiva per il gene della resistenza ai sulfamidici (*sulII*), e solo due campioni provenienti da tartarughe vive, sono risultati positivi per la resistenza a chinoloni (*qnrS*) e tetracicline (*tetA*). Invece non è stato rilevato nessun gene *blaCTXM*. Per quanto riguarda la resistenza ai metalli pesanti, la metà dei campioni (50%) è risultata positiva per il *czcA* (resistenza al cadmio, al cobalto e allo zinco) e il 12.5% erano positivi per i geni *arsB* (resistenza all'arsenico) (Tabella 13). Sorprendentemente, il gene *int1*, che codifica l'elemento mobile integrone di classe 1, è stato trovato in 15 dei 16 metagenomi testati.

Tabella 13. Sintesi della presenza/assenza di ARGs, HMRGs e *int1* nei 16 campioni di metagenoma analizzati.

Sample	<i>blaTEM</i>	<i>qnrS</i>	<i>sulII</i>	<i>tetA</i>	<i>blaCTXM</i>	<i>czcA</i>	<i>arsB</i>	<i>int1</i>
Dead Turtle (n = 3)	2	ND ¹	1	ND	ND	1	ND	2
Live Turtle (n = 3)	2	1	2	1	ND	1	ND	3
Sand (n = 3)	3	ND	ND	ND	ND	3	ND	3
Eggshell (n = 3)	2	ND	1	ND	ND	1	2	3
Yolk (n = 2)	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1
Seawater (n = 2)	2	ND	1	ND	ND	2	ND	2

*ND indica che non è stato ottenuto il corretto prodotto di amplificazione.

6.1.3 Discussione

In questo studio viene riportato il profilo di resistenza agli antibiotici di batteri isolati da campioni di acqua di mare, organi e uova di tartarughe marine loggerhead (*C. caretta*) e sabbia dello stesso nido provenienti dal Mar Mediterraneo.

L'antibiotico resistenza tra ceppi batterici isolati da specie marine selvatiche è un argomento di principale ed emergente interesse. È importante sottolineare che gli animali oggetto delle indagini non hanno avuto precedenti trattamenti antibiotici per scopo terapeutico. L'abuso di antibiotici nella medicina umana e veterinaria, nel secolo scorso, ha dimostrato di avere un

impatto negativo in diverse nicchie ambientali, che sono costantemente descritte come una fonte di batteri resistenti agli antibiotici, che contribuisce alla diffusione dei geni corrispondenti [Fitzpatrick & Walsh, 2016]. Alcuni studi condotti sulle tartarughe verdi hanno mostrato la presenza di batteri resistenti [Al-Bahry et al., 2011a; 2011b; Zavala-Norzagaray et al., 2015; Ahasan et al., 2017; Delli Paoli Carini et al., 2017; Cardoso-Brito et al., 2019; Chuen-Im et al., 2019], tuttavia, considerando la crescente preoccupazione correlata a tali fenomeni, la ricerca fin'ora effettuata risulta essere limitata. In particolare, nelle tartarughe marine *C. caretta* è esiguo il numero di report scientifici che riguardano la resistenza agli antibiotici [Foti et al., 2009; Fichi et al., 2016; Pace et al., 2019a; 2019b; Cardoso-Brito et al., 2019].

I risultati del presente studio contribuiscono ad arricchire lo stato dell'arte oggetto del lavoro. In particolare, questi confermano che i batteri Gram-negativi si trovano più frequentemente nei campioni provenienti dall'ambiente marino, mentre la presenza di batteri Gram-positivi è generalmente correlata all'ambiente terrestre [Di Ianni et al., 2015]. *Aeromonas spp.* è stato isolato in tutti i campioni testati, ed era presente principalmente negli organi e tamponi relativi alle tartarughe marine. Similmente, *Aeromonas hydrophila*, patogeno emergente, viene spesso isolato in ambienti marini e costieri [Dumontet et al., 2000]. Sebbene non sia possibile effettuare rilevazioni statistiche a causa del basso numero di campioni analizzati, abbiamo ipotizzato che la prevalenza di *Aeromonas* possa essere dovuta sia alle condizioni di salute delle tartarughe sia alle condizioni di contaminazione ambientale della costa mediterranea siciliana. Quest'ultima ipotesi è sostenuta anche dalla presenza di *Aeromonas spp.* nelle uova non schiuse, nella sabbia e nei campioni di acqua di mare, ed è concorde alle conclusioni di una precedente relazione [Gambino et al., 2020].

La presenza di *Citrobacter spp.* nei campioni era in linea con altri lavori di ricerca in quanto questi batteri sono stati spesso isolati da tartarughe marine sia allo stato selvatico che in condizioni di stabulazione, nonché da campioni prelevati da tamponi di diversi organi [Foti et al., 2009; Fichi et al., 2016; Pace et al., 2019a; 2019b; Cardoso-Brito et al., 2019; Chuen-Im et al., 2019].

Gli isolati batterici erano resistenti all'antibiotico β -lattamico di prima generazione: cefazolina (95.5%), in accordo con i livelli di resistenza riportati in precedenza per i microrganismi trovati nei tamponi cloacali e orali (rispettivamente 92.6% e 94.7%) [Foti et al., 2009; Pace et al., 2019b]. Allo stesso modo, le somiglianze dei ceppi resistenti con quelli riportati dagli stessi autori sopra menzionati [Foti et al., 2009; Pace et al., 2019b] si estendono anche ai livelli di streptomicina (43%) e di sulfametossazolo/trimetoprim (16%). Sorprendentemente, gli isolati di questo studio hanno mostrato un livello di resistenza inferiore alla tetraciclina (18%) e

all'enrofloxacin (13.6%) rispetto agli studi precedenti [Foti et al., 2009; Pace et al., 2019b] che riportano percentuali di resistenza più elevate per questi antibiotici. Degno di nota è l'enrofloxacin, questo antibiotico veterinario viene utilizzato durante la terapia nei centri di recupero e, dal momento che i ceppi resistenti enrofloxacin sono stati trovati nella sabbia e uova non schiuse, è possibile che la diffusione di questi batteri resistenti in ambiente marino, possa essere aumentata a causa dei trattamenti con enrofloxacin sulle tartarughe marine che, non appena ristabilite, vengono liberate in mare.

Supponiamo che le tartarughe marine possano acquisire sia ARGs che batteri resistenti agli antibiotici dall'acqua marina e dalla sabbia contaminata, sebbene fiumi, laghi e acqua di mare siano ambienti con una densità batterica inferiore rispetto ai suoli. Tuttavia, diversi studi hanno rilevato che esiste un notevole carico di resistenza anche negli ambienti acquatici [Hatosy et al., 2015].

Durante la deposizione delle uova, ARGs e batteri resistenti agli antibiotici potrebbero essere trasferiti dalla madre alle uova/sabbia del nido; pertanto, sulla base di questa ipotesi, le tartarughe marine potrebbero essere considerate un vettore di resistenza antibiotica. In linea con quanto ipotizzato, è stato osservato che gli organi delle tartarughe morte e i campioni di sabbia del nido possedevano il più alto livello di ceppi resistenti agli antibiotici. Inoltre, dal momento che non tutti gli isolati della stessa specie (ad esempio, *Aeromonas spp.*) erano resistenti allo stesso antibiotico, sono state effettuate correlazioni tra il rilevamento dei batteri isolati resistenti agli antibiotici e la contaminazione antibiotica di origine antropica. Se si fosse verificato un processo di immunità naturale, questo dovrebbe essere presente in tutti gli isolati della stessa specie.

La resistenza multiantibiotica è stata evidenziata principalmente negli isolati provenienti da organi di tartarughe marine morte; infatti, due isolati hanno mostrato resistenza a sei e sette dei sette antibiotici testati (Figura 69). Inoltre, isolati microbici resistenti a cinque antibiotici sono stati trovati sia nelle uova che nella sabbia, suggerendo che la contaminazione antibiotica di natura antropica potrebbe generare un ambiente tale che le uova entrino a contatto con antibiotici o geni di resistenza agli antibiotici rendendole "ospiti ideali" per i batteri che di conseguenza possono diffondersi. Al contrario, gli isolati meno resistenti sono stati trovati nei campioni di acqua marina; in particolare questi campioni hanno mostrato resistenza principalmente ad un antibiotico, mentre solo un isolato era resistente a due antibiotici e un altro era sensibile a tutti gli antibiotici testati (Figura 69). Ragionevolmente, l'acqua di mare, che ha una densità batterica inferiore, potrebbe contenere isolati meno resistenti [Zhang et al., 2009]. La resistenza agli antibiotici riscontrata nei campioni del presente studio, così come per

quelli investigati da altri autori [Foti et al., 2009; Pace et al., 2019b], potrebbe essere il risultato dell'abuso e del conseguente rilascio nell'ambiente di antibiotici utilizzati in campo medico umano e veterinario, come anche in acquacoltura e in zootecnia. Tale utilizzo diffuso contribuirebbe quindi a generare un aumento dei batteri resistenti agli antibiotici in diversi habitat marini [Schmidt et al., 2000]. Inoltre, la presenza di batteri resistenti agli antibiotici in alcuni pesci è legata a eventi di sversamento in mare di acque reflue urbane [Al-Bahry et al., 2009c].

I ceppi resistenti agli antibiotici presenti nelle uova e nel tuorlo aprono prospettive non molto confortanti. Le possibili implicazioni per la salute degli organismi marini e per la salute umana potrebbero essere potenzialmente devastanti. Questo quadro drammatico viene ancor più enfatizzato dalla presenza di ceppi multiresistenti trovati nei due campioni di acqua costiera lontani dagli sversamenti di rifiuti urbani. A tal proposito è degno di nota il riscontro scientifico ottenuto in altri lavori nei quali è stata evidenziata la presenza di batteri resistenti nei surfisti dovuta all'ingestione accidentale dell'acqua di mare contaminata [Leonard et al., 2018]. In questo contesto, le tartarughe marine possono essere considerate come "concentratori" di batteri resistenti agli antibiotici poiché trasportano un microbiota resistente in ambienti meno contaminati. Questa resistenza renderebbe difficile ai veterinari di riuscire efficacemente a trattare individui di tartarughe marine spiaggiate con gravi patologie. Inoltre, la presenza di ceppi resistenti agli antibiotici nei nidi, causati dal contatto tra l'ovidutto della madre e l'uovo (guscio e tuorlo) [Al-Bahry et al., 2009a], potrebbe dipendere direttamente dall'acqua di mare, che, nel nostro caso, può raggiungere i nidi durante il periodo di incubazione attraverso tempeste e mareggiate. Ciò significa che le tartarughe marine sin dai primi giorni di vita posseggono un microbiota antibiotico-resistente acquisito che potrebbe in qualche modo interferire con la risposta immunitaria naturale, facilitando l'insorgenza di patologie.

Inoltre, questi batteri potrebbero diffondersi ulteriormente attraverso l'ingestione di carne di tartaruga marina ancora consumata in alcuni paesi [Aguirre et al., 2006].

Infine, dobbiamo considerare che le tartarughe marine potrebbero essere predate da squali e altri pesci con una preoccupante probabilità di diffondere ceppi resistenti agli antibiotici nella catena alimentare.

A ciò si aggiunge che la diffusione di ceppi resistenti nelle specie marine potrebbe essere accentuata dalla diffusione di ARGs nei vari ambienti [Sultan et al., 2018]. A questo proposito, gli ARGs rilevati conferiscono resistenza contro quattro diversi gruppi di antibiotici dei cinque testati: tetracicline (*tetA*), β -lattamici (*blaTEM*), sulfamidici (*sulI*) e chinoloni (*qnrS*) con una prevalenza quantitativa di *blaTEM*. Inoltre, non sorprende la presenza degli stessi ARGs in aree

a basso impatto antropico; infatti, gli ARGs sono stati trovati anche in aree remote (ghiacciai artici) [Segawa et al., 2013], nonché in campioni attribuibili all'era pre-antibiotica [D'Costa et al., 2011]. Le alte percentuali del gene *int1* in quasi tutti i campioni analizzati sono veramente preoccupanti, dal momento che l'elemento mobile codificato può determinare il trasferimento genico, esasperando così la diffusione di ARGs nel prossimo futuro.

I risultati del presente lavoro contribuiscono ad arricchire le informazioni riportate da precedenti studi su specie marine (provenienti da diversi ambienti) delle quali viene discussa la presenza di batteri resistenti agli antibiotici. Ad esempio, sono stati isolati batteri resistenti provenienti da guscio, albume e tuorlo di uova della tartaruga verde (*Chelonia mydas*) [Al-Bahry et al., 2009a], da tamponi fecali e sfiatatoi di delfini tursiopi selvatici (*Tursiops truncatus*) [Stewart et al., 2014]. Inoltre, sono stati rilevati ceppi resistenti in campioni fecali di foche sudamericane (*Arctocephalus australis*) e in foche subantartiche (*Arctocephalus tropicalis*) [Santestevan et al., 2015], nonché in campioni dello stesso tipo in altre specie marine selvatiche [Prichula et al., 2019]. Per quanto ne sappiamo, questo è il primo report sull'antibiotico-resistenza che riguarda campioni di tartarughe marine, eccezion fatta per un lavoro sulla presenza di geni di resistenza all'ampicillina trovati in *Citrobacter sp.* isolati da tartarughe della specie *C. mydas* [Al-Bahry et al., 2012].

Questi studi indicano che gli organismi marini erano, e sono ancora esposti, ad effluenti inquinati durante le loro rotte migratorie e di foraggiamento. Pertanto, la resistenza batterica in questi animali evidenzia l'impatto delle attività umane sia nell'ambiente in *sensu lato* che nella resistenza antibiotica in *sensu stricto* [Wright, 2007].

Una conoscenza approfondita della persistenza e della diffusione degli antibiotici, nonché di diversi geni resistenti agli antibiotici nell'ambiente, è ben lungi dall'essere raggiunta, né a livello locale né su scala globale [Sengupta et al., 2013; Berendonk et al., 2015]. La comprensione del ruolo ecologico, della diffusione e della persistenza dell'antibiotico resistenza sia in termini di ceppi resistenti agli antibiotici sia di ARGs nell'ambiente sono passi cruciali per sviluppare un'efficace azione di controllo. Pertanto, questi studi sulle specie marine forniscono informazioni che possono dare un contributo finalizzato a migliorare consapevolmente tutte quelle misure di protezione e conservazione di queste specie (e non solo) e dell'ambiente marino stesso.

6.1.4 Materiali e Metodi

6.1.4.1 Raccolta dei campioni

I batteri sono stati isolati da organi (polmone, cuore, intestino, fegato, milza e rene) di otto tartarughe marine *C. caretta* trovate morte. Inoltre, per lo stesso scopo, sono stati effettuati anche otto tamponi cloacali, sei orali e due in campioni di pelle di 14 individui in vita della stessa specie. Tutte le tartarughe marine sono state conferite durante gli anni 2018-2019 al personale del Centro Regionale per il Recupero delle Tartarughe Marine dell'Istituto Veterinario di Sanità Pubblica di Sicilia (IZSSi).

Dati biomorfometrici come il sesso, il peso corporeo e la lunghezza curva del carapace (CCL) sono stati registrati ed elencati in Tabella 14.

Tabella 14. Dettagli del campionamento dei tamponi ed organi di *C. caretta*

Sample	Sex	CCL ¹	Weight (Kg)	Stranding Location	Isolate
Cloacal swab	F	68	29	Siracusa (SR)	<i>Aeromonas</i> spp.
	F	41	18		<i>Citrobacter</i> spp.
	F	38	19	Lipari (ME)	<i>Escherichia coli</i>
	-	13	4	Augusta (SR)	<i>Aeromonas</i> spp.
	-	25	8		<i>Enterobacter</i> spp.
	-	30	16		<i>Aeromonas</i> spp.
	M	25	11		<i>Aeromonas</i> spp.
	-	46	23	Milazzo (ME)	<i>Aeromonas</i> spp.
Oral swab	F	54	23	Milazzo (ME)	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp.
	F	38	14	Lipari (ME)	<i>Aeromonas</i> spp.
	M	54	23	Palermo (PA)	<i>Aeromonas</i> spp.
	M	48	26	Filicudi (ME)	<i>Aeromonas</i> spp.
	Skin swab	F	31	10	Ustica (PA)
-		28	10	Porticello (PA)	<i>Aeromonas</i> spp.
F		51	34	Milazzo (ME)	<i>Aeromonas</i> spp.
-	27	4	<i>Enterococcus faecium</i>		
-	38	35	<i>Aeromonas</i> spp.		
-	38	35	<i>Proteus vulgaris</i>		
Organs	F	68	29	Siracusa (SR)	<i>Aeromonas</i> spp.
	F	44	31	Terrasini (PA)	<i>Aeromonas</i> spp.
	F	48	21		<i>Aeromonas</i> spp.
	-	-	-		<i>Citrobacter</i> spp.
	M	43	19	Messina (ME)	<i>Enterobacter</i> spp.
	M	23	3.5		<i>Enterobacter</i> spp.

Gli individui ricoverati sono stati stabulati separatamente in vasche, precedentemente pulite e disinfettate con candeggina, e contenenti acqua di mare così come descritto in un altro lavoro [Arizza et al., 2019]. Durante il periodo di recupero, le tartarughe sono state alimentate due volte a settimana con piccoli pesci pelagici, ogni due giorni le vasche sono state pulite ed è stata sostituita l'acqua. Tuttavia, la raccolta dei campioni è stata effettuata entro due giorni dall'arrivo delle tartarughe al centro di recupero. Riguardo gli individui deceduti, durante le autopsie, lo stato del campione è stato valutato da veterinari specializzati del centro al fine di campionare solo organi freschi per evitare contaminazioni microbiche indesiderate a causa dell'avanzamento della decomposizione. Successivamente gli organi sono trasferiti in contenitori sterili e quindi portati in laboratorio. Circa 1 g dell'organo è stato inoculato nel brodo di arricchimento (9 mL). Per la semina delle piastre, è stata effettuata un'incisione con bisturi e pinzette sterili ed è stato introdotto l'anello successivamente utilizzato per la semina su specifiche piastre di agar.

Inoltre, i batteri sono stati isolati da tamponi di uova, in particolare, dal guscio, dal tuorlo, da frammenti provenienti da uova non schiuse, e da quattro campioni di sabbia provenienti dai nidi monitorati sull'isola di Linosa (Mar Mediterraneo) nell'estate del 2018. Di questi ultimi, due sono stati raccolti superficialmente mentre gli altri due sono stati campionati a 40 cm di profondità. Infine, due campioni da 1 L di acqua di mare sono stati raccolti lungo la costa meridionale e settentrionale del Mar Mediterraneo utilizzando contenitori di vetro precedentemente sterilizzati. I campioni sono stati trasferiti all'IZSSI in sacchetti biologici sterili per le analisi di laboratorio e tenuti a 4 °C fino al loro utilizzo per le analisi.

Per chiarezza, tutti i campioni studiati in questo lavoro sono riportati nelle Tabelle 14 e 15. La raccolta dei campioni è stata condotta nel rigoroso rispetto delle raccomandazioni della Regione Sicilia e del Ministero della Salute (legge regionale n. 6067/2013 e legge nazionale n. 96/2016 e 0017054.25-07-2018).

Tabella 15. Dettagli del campionamento di uova, sabbia e acqua

Sample	Location	Bacterial Isolates
Bottom sand	Linosa	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Aeromonas hydrophyla/cavie</i>
Top sand		<i>Bacillus sp.</i> ; <i>Streptococcus sp.</i>
Hatched egg		<i>Bacillus sp.</i> ; <i>Streptococcus sp.</i>
Unhatched egg		<i>Aeromonas hydrophyla/cavie</i> ; <i>Citrobacter freundii</i> ; <i>Bacillus sp.</i>
Yolk		<i>Aeromonas hydrophyla/cavie</i> ; <i>Citrobacter freundii</i> ;
Seawater	South coast	<i>Enterobacter sp.</i> ; <i>Vibrio alginolyticus</i> ; <i>Aeromonas sp.</i>
	North coast	<i>Vibrio neocaledonicus</i> ; <i>Vibrio sp.</i>

6.1.4.2 Isolamento batterico

L'isolamento microbico è stato eseguito seminando ogni campione su Columbia Agar con il 5% di sangue di ovino, nonché su mezzi selettivi, vale a dire: (i) Mannitol Salt agar per isolare *Staphylococcus spp.* e (ii) agar Macconkey per le specie Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* e *Aeromonas*. L'isolamento di *Salmonella spp.* è stato eseguito da colture di arricchimento da 1 g di organo messo in 9 mL di brodo di acqua peptonata alcalina, Selenite Cistina, o brodo Rappaport Vassiliadis a 37 °C per 24-48 h a 180 giri al minuto. Successivamente, aliquote di colture sono state distribuite sull'agar xilosio lisina desossicolato e sull'agar verde brillante, le piastre sono state incubate a 37 °C per 24-48 ore in modalità statica. Tutti i mezzi di coltura sono stati acquistati da Oxoid. I ceppi isolati sono stati identificati mediante test biochimico-enzimatici quali catalasi, ossidasi, mobilità, indolo, fermentazione dello zucchero, metabolismo del citrato e dell'urea, come descritto in un altro studio [Gambino et al., 2020]. Quando l'analisi biochimica non è stata esaustiva, sono state effettuate l'amplificazione e il sequenziamento del frammento di 464 bp dell'rDNA 16S. Un'aliquota (2 µL) del lisato batterico, preparata come descritto in un altro studio [Vitale et al., 2019], è stata utilizzata per amplificare il frammento interno (464 bp del rDNA 16S) attraverso la One Taq DNA polimerasi (NEB) tramite le coppie di primer alle corrispondenti temperature di annealing elencate nella Tabella 16.

Tabella 16. Lista dei primers e altri parametri utilizzati in questo studio

Target Name	Primer Sequence (5'-3')	Annealing Temperature	Amplicon Size (bp)	Reference
16SrDNA	CGGTGAATACGTTTCYCGG GGHTACCTTGTTACGACTT	55	142	Di Cesare et al., 2016b
tetA	GCTACATCCTGCTTGCCCTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	64	210	Ng et al., 2001
blaTEM	TTCCGTTTTTGCTCACCCAG CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	60	112	Bibbal et al., 2007
blaCTXM	CTATGGCACCACCAACGATA ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT	60	103	Marti et al., 2013a
qnrS	GACGTGCTAACTTGCGTGAT TGGCATTGTTGGAAACTTG	62	118	Marti et al., 2013b
suIII	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	60	191	Pei et al., 2006
czcA	TCGACGGBGCCGTGGTSMTBGTCGAGAA GTVAWSGCCAKCGGVBBGAACA	63	232	Roosa et al., 2014
arsB	G TSAARCCSTTYTCGATGGC GCRAASGCSAHSAYCATGAT	56.5	226	Roosa et al., 2014
int1	GGCTTCGTGATGCCTGCTT CATTCTGGCCGTGGTTCT	59	148	Luo et al., 2010
16S rDNA	CCTACGGGNBGCASCAG GACTACNVGGGTATCTAATCC	55	464	Takahashi et al., 2014

Dopo la conferma mediante elettroforesi su gel di agarosio (1% p/v), i prodotti di reazione a catena della polimerasi (PCR) sono stati purificati e sequenziati con Macrogen Inc. (Seoul, Corea, sequencer). Le sequenze nucleotidiche sono state identificate usando il database: nucleotide BLAST di NCBI.

6.1.4.3 Test di suscettibilità agli antibiotici e ricerca di geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti

➤ Test di suscettibilità agli antibiotici

La suscettibilità antibiotica dei ceppi batterici isolati è stata eseguita con il metodo Kirby-Bauer su agar Muller Hinton, testando la loro sensibilità a otto antibiotici, vale a dire amoxicillina/acido clavulanico (AMC, 30 µg), cefazolina (KZ, 30 µg), ceftriaxone (CRO, 30 µg), colistina (CT, 10 µg), streptomina (S, 10 µg), enrofloxacin (ENR, 5 µg), sulfametossazolo/trimethoprim (SXT, 25 µg) e tetraciclina (TE, 30 µg), come descritto in un precedente studio [Vitale et al., 2018]. L'interpretazione dei risultati è stata effettuata facendo riferimento al range del 2018 del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). I dischi antimicrobici sono stati ottenuti da Oxoid (Regno Unito).

➤ **Ricerca di geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti**

Il DNA metagenomico è stato estratto da campioni di tre tartarughe marine vive o morte, da tre frammenti di guscio d'uovo, dal tuorlo di due uova non lavate, da tre campioni di sabbia e da due campioni di acqua di mare secondo il protocollo di una precedente ricerca [Arizza et al., 2019].

- Nel caso dell'**acqua** di mare la procedura è stata la seguente:
 1. aggiungere 5 mL del campione in un tubo da 50 mL e incubare 1 ora a 70° C;
 2. aggiungere biglie e omogeneizzare con vortex;
 3. aggiungere 10 mg di lisozima e incubare 1 ora a 37 °C;
 4. aggiungere 200 µL di proteinasi K e 600 µl di SDS 10 %, incubare 90-120 minuti a 55 °C;
 5. aggiungere 2 ml di NaCl 5 M e 5 mL di cloroformio, agitare per 30 min a 20 °C;
 6. centrifugare 4500 rpm 30 minuti a 20 °C;
 7. trasferire il surnatante in tubi nuovi;
 8. aggiungere 0.6 mL di isopropanolo;
 9. centrifugare 13000 rpm 30 minuti a 4 °C;
 10. rimuovere ed eliminare il surnatante;
 11. aggiungere 2 ml di etanolo 70% e omogeneizzare con vortex;
 12. centrifugare 13000 rpm 10 minuti a 4 °C, Speed vacuum fino a quando completamente asciutto, risospendere in 100/200 µl di acqua sterile.
- L'estrazione del DNA dai campioni di **guscio** ha previsto lo stesso iter sopradescritto a differenza dei cambiamenti apportati ai seguenti punti:
 1. aggiungere 3 ml di acqua sterile al frammento di guscio;
 3. incubare a temperatura ambiente anziché 70°C;
 5. dopo tale step il guscio è stata rimosso.
- Allo stesso modo per l'estrazione del DNA da campioni di **sabbia** variavano i punti:
 1. aggiungere ad un tubo sterile 1 g di sedimento e 1 mL di acqua sterile;
 3. aggiungere 10 mg di lisozima e incubare 1 ora a temperatura ambiente in agitazione.
- Infine, per l'estrazione da campioni di **tuorlo** o stomaco di piccoli hatchling o pipping variava esclusivamente il primo step:
 1. aggiungere ad un tubo sterile il campione e 1 mL di acqua sterile.

L'estrazione del DNA da tutti i campioni (compreso i controlli negativi) è stata effettuata in

duplicato, mentre le analisi PCR in triplicato. Il DNA metagenomico è stato utilizzato come modello per amplificare i geni, quali *tetA*, *sulII*, *blaTEM*, *blaCTXM* e *qnrS*, che codificano per i prodotti responsabili della resistenza agli antimicrobici. Inoltre, sono stati studiati i geni *int1*, *arsS* e *czcA*. Tutte le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando temperature di annealing e coppie di primer elencate nella Tabella 16. La presenza del prodotto di amplificazione previsto è stata considerata come campione positivo. Come controllo, è stato utilizzato il frammento di DNA 142 bp del gene 16S rDNA (Tabella 16).

6.2 Antibiotico-resistenza nel microbiota associato ai rifiuti plastici dispersi in ambiente acquatico

Negli ultimi anni, è stata dedicata una crescente attenzione alla caratterizzazione batterica dei detriti plastici marini. In questo studio, è stato confrontato il profilo di composizione microbica, di resistenza agli antibiotici e la presenza di ARGs in acqua e frammenti di polietilene (PE) (raccolti da un ruscello e in mare) in una zona costiera della Sicilia nordoccidentale.

6.2.1 Introduzione

Le materie plastiche sono attualmente considerate la forma più comune e abbondante di detriti marini. Oltre agli innumerevoli impatti negativi di tipo fisico e chimico, i detriti plastici possono fungere da substrato adatto allo sviluppo di biofilm batterici, che possono contenere patogeni o ARBs [Yang et al., 2019]. Ad oggi, poche pubblicazioni hanno esplorato la composizione delle comunità microbiche sui rifiuti di PE e la presenza di ARBs. Tale presenza, nelle matrici naturali, può contribuire alla diffusione di ARGs tra i batteri.

La distribuzione di batteri resistenti agli antibiotici attraverso detriti plastici negli ecosistemi acquatici è sottostimata. La presenza di antibiotici e ARGs nelle matrici ambientali può contribuire a determinare caratteri di resistenza tra i batteri presenti in tali ambienti [Peterson & Kaur, 2018; Vitale et al., 2018; 2019; Pace et al., 2019a; 2019b; Yang et al., 2020; Alduina et al., 2020; Gambino et al., 2020; Yoshizawa et al., 2020; Ekwanzala et al., 2020; Liu et al., 2020].

Nonostante l'aumento dello studio delle *plastisfere*, non è stato raggiunto alcun accordo sul fatto che le comunità associate alla plastica presentino una maggiore o minore diversità rispetto alle loro controparti in acqua [Oberbeckmann & Labrenz, 2020]. In particolare, la nostra ipotesi era di valutare se la plastica, in particolare i frammenti di polietilene (PE), potesse fungere da vettore di comunità microbiche e geni di resistenza agli antibiotici aumentando la diffusione di ceppi resistenti agli antibiotici in ambienti acquatici.

Lo studio si propone quindi di valutare il profilo microbico e di resistenza dei campioni di acque e di PE prelevati contemporaneamente da un corso d'acqua salmastra e dall'acqua di mare campionati in una zona costiera delimitata della Sicilia nordoccidentale.

6.2.2 Risultati

6.2.2.1 Analisi di sequenziamento microbico

In totale, 466246 letture di alta qualità ($Q > 33$ e 470 bp) sono state filtrate da 658687 letture grezze ottenute da tredici campioni. Utilizzando QIIME2 sono state identificate con successo 3264 unità tassonomiche operative uniche (OTUs) (Tabella 17) che sono state classificate a livello di famiglia utilizzando una soglia di somiglianza del 97% rispetto al database "Silva".

Tabella 17. Numero totale di OTUs risultanti dal set di dati della pipeline QIIME2.

Tag*	Total Reads	Merged Reads	Filtered Reads	Chimeras	OTUs
SP1	26675	16644	18340	270	592
SP2	111375	80453	67895	6599	410
SP3	47278	23472	37537	1212	659
SW1	85593	52885	60866	8000	211
SW2	80494	55120	60922	6563	213
SW3	73051	45744	53042	8863	204
SW4	6414	4040	4471	127	165
FP1	8556	5250	5401	18	144
FP2	51174	26681	40353	5480	331
FP3	43526	25192	34954	5000	293
FW1	47811	29800	34770	2281	204
FW2	69353	40831	47251	4153	234
FW3	7387	142	444	0	14

*SW: acqua di mare, FW: acqua dolce, SP: plastica raccolta in acqua di mare, e FP: PE/plastica raccolta in acqua dolce.

La stima delle curve di rarefazione ha indicato un livello soddisfacente di campionamento della diversità (Figura 71).

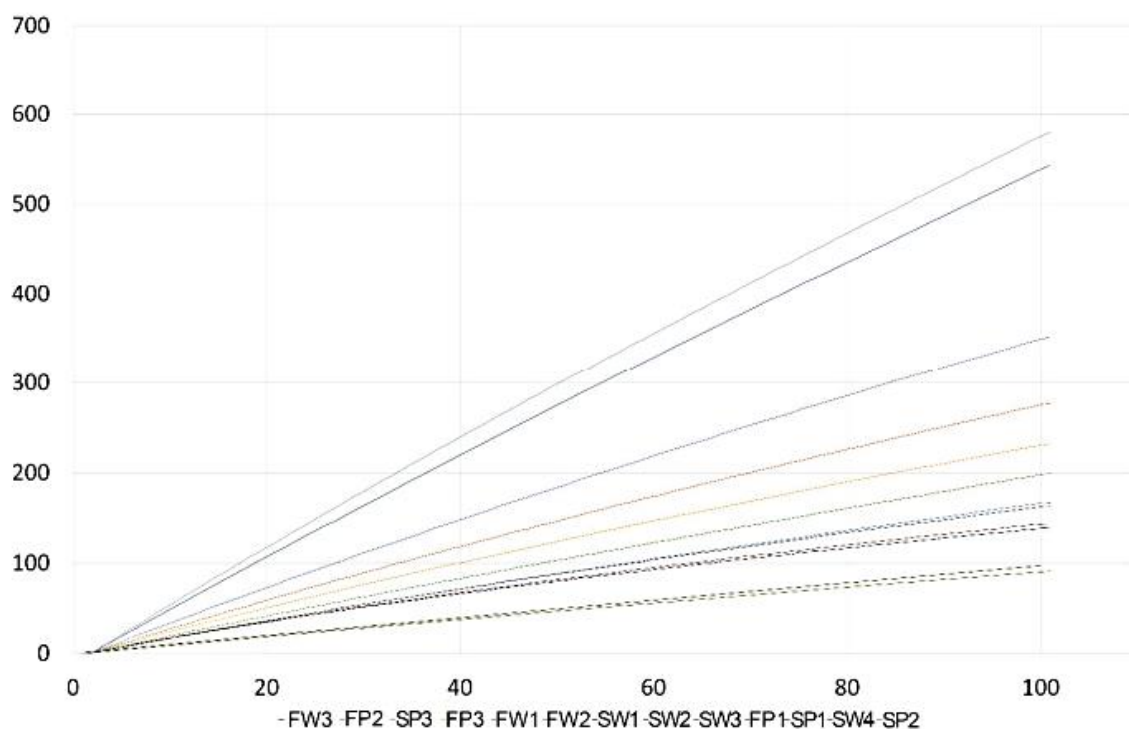


Figura 71. Stima delle curve di rarefazione.

La Tabella 19 mostra una good's coverage, che stima la completezza del campionamento, con un livello elevato (0.959-0.996) di identificazione dei gruppi batterici, ad eccezione del campione FW3 (0.901) che è stato escluso di conseguenza dalle ulteriori analisi. Il numero medio di OTUs e il coefficiente di variazione di ciascun campione hanno indicato una maggiore variabilità tra i campioni di rifiuti di PE rispetto a quelli di acqua (Tabella 19).

Tabella 19. Indici di diversità dei campioni studiati. **S** è il numero totale di famiglie; **Chao1** e **ACE** sono stimatori di ricchezza basati sull'abbondanza; **α** è la diversità alfa; **1-D** è l'indice di Simpson; **H'** è la diversità di Shannon-Wiener; **e** è l'uniformità.

Sample	S	Good's coverage	Chao1	ACE	A	1-D	H'	e
SP1	146	0.96	285.32	281.79	4.05	0.05	4.04	0.81
SP2	53	0.99	288.36	286.13	7.71	0.1	2.88	0.72
SP3	119	0.97	202.39	205.51	5.53	0.07	3.46	0.72
SW1	64	0.99	264.68	260.92	3.29	0.03	3.68	0.88
SW2	64	0.99	274.20	269.82	3.25	0.04	3.59	0.86
SW3	67	0.99	276.49	274.66	3	0.02	3.76	0.89
SW4	75	0.96	288.09	284.83	2.20	0.04	3.81	0.88
FP1	53	0.97	280.71	278.42	2.71	0.04	3.49	0.88
FP2	81	0.99	180.05	189.58	4.08	0.06	3.49	0.79
FP3	70	0.99	227.11	227.53	4.18	0.07	3.28	0.77

Sample	S	Good's coverage	Chao1	ACE	A	1-D	H'	e
FW1	69	0.99	237.77	236.87	2.96	0.04	3.63	0.85
FW2	71	0.99	251.34	248.52	3.28	0.06	3.49	0.82
FW3	13	0.90	129.16	137.30	1.07	0.02	2.41	0.95

La diversità batterica stimata dall'indice di Shannon-Wiener variava da 2.88 a 4.04 ad eccezione del campione FW3 (Tabella 19), che, come accennato in precedenza, non è stato preso in considerazione. L'indice di Simpson e l'uniformità non hanno mostrato differenze significative tra i campioni. Inoltre, gli stimatori di ricchezza basati sull'abbondanza, Chao1 e ACE, hanno mostrato diversi filotipi (da 129 a 288) (Tabella 19). È interessante notare che nei rifiuti di PE raccolti dall'acqua di mare (SP) è stata ottenuta una media di 554 ± 128.9 OTUs, mentre i corrispondenti campioni di acqua di mare (SW) contenevano quasi tre volte meno OTUs (198 ± 22.5); invece la differenza in OTUs era meno pronunciata tra FW (219 ± 21.2) e i corrispondenti rifiuti PE (256 ± 99) (Tabella 18).

Tabella 18. Numero medio e coefficiente di variazione degli OTUs rilevati in campioni di acqua e plastica.

Sample	Mean \pm Std.dev	C.v. OTUs
Seawater (SW1-SW4)	198 ± 22.5	11.3
Freshwater (FW1-FW2)	219 ± 21.2	9.7
Seawater plastic (SP1-SP3)	554 ± 128.9	23.3
Freshwater plastic (FP1-FP3)	256 ± 99	79.2

L'analisi ANOVA (one-way) ha mostrato che i quattro gruppi erano significativamente diversi con un valore p di 0.002 (Tabella 20).

Tabella 20. ANOVA unidirezionale basata sull'abbondanza dei campioni. Livello di significatività $\alpha = 0.05$. DF, grado di libertà; Adj SS, somma rettificata dei quadrati; Adj MS, media rettificata dei quadrati; Valore F, statistica F.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-value	p-value
Sample	3	303233	101078	11.00	0.002
Error	9	82728	9192		
Total	12	385961			

6.2.2.2 Composizione tassonomica

L'analisi tassonomica di tutti i campioni ha prodotto un totale di 28 phyla, 57 classi, 142 ordini e 248 famiglie. Le materie plastiche mostravano la maggior diversità tassonomica rispetto ai corrispondenti campioni di acqua; infatti, i campioni SP e FP contenevano rispettivamente 24 e 20 phyla, mentre 14 e 12 phyla sono stati identificati rispettivamente nei campioni SW e FW (Figura 72). Proteobacteria era il phylum dominante in SW (66%) e FW (61%), mentre in SP e FP questo phylum rappresentava rispettivamente il 47% e il 51%, (Figura 72a).

Il secondo phylum maggiormente presente era rappresentato da Bacteroidetes con il 12% nei campioni SW e FW, e il 28% e il 20% rispettivamente in SP e FP. Sebbene Firmicutes fosse il phylum meno rappresentato tra quelli maggiormente presenti, la sua rilevazione, sia nei campioni di acqua che in FP, è stata notevole. Actinobacteria e Patiscibacteria invece erano ben rappresentati soprattutto nei campioni di acqua (dolce e marina). Inoltre, il phylum Chlamydiae è stato trovato solo nel campione di acqua dolce, mentre Dadabacteria, Elusimicrobia, e Hydrogenedentes erano associati esclusivamente alla plastica proveniente dal mare.

Tra le classi invece, Gammaproteobacteria era dominante nei campioni: SW (40%), FW (47%), e FP (32%) (Figura 72b). Diversamente, in SP, Bacteroidia era la classe più rappresentata (26%) seguita da Alphaproteobacteria (23%) e Gammaproteobacteria (20%). In SW e FW, anche Alphaproteobacteria era ben rappresentata (24 e 13%) seguita da Bacteroidia (12%), mentre in FP la classe Bacteroidia (20%) era più abbondante di Alphaproteobacteria (17%).

Tra gli ordini (Figura 72c), Flavobacteriales era il più abbondante in SW (8%) ed in entrambi i campioni di plastica (17 e 10% rispettivamente in SP e FP), mentre era meno abbondante in FW (6%). I campioni SW erano caratterizzati principalmente da Oceanospirillales (7%), Pseudomonadales (5%), Alteromonadales (5%), clade SAR11 (5%), Rhizobiales (5%) e Rhodobacterales (4%). FW invece conteneva, come componenti dominanti, una percentuale uguale di Betaproteobacteriales e Pseudomonadales (ca. 10%), seguita da Flavobacteriales (6%), Rhizobiales (6%) Alteromonadales (5%) e Aeromonadales (4%). I campioni PS erano composti principalmente da Rhodobacterales (10%), Chitinophagales (6%) e Caulobacterales (5%).

FP, infine, conteneva oltre a Flavobacteriales, Betaproteobacteriales (11%), Rhodobacterales (7%), Alteromonadales (7%) e Pseudomonadales (6%). A livello di famiglia, tutti i campioni contenevano percentuali diverse di Flavobacteriaceae (5.6-8.7%), Rhodobacteraceae (2.1-6.8%), Burkholderiaceae (0.9-9.1%), mentre in SW e SP sono stati trovati principalmente Vibrionaceae (Figura 72d).

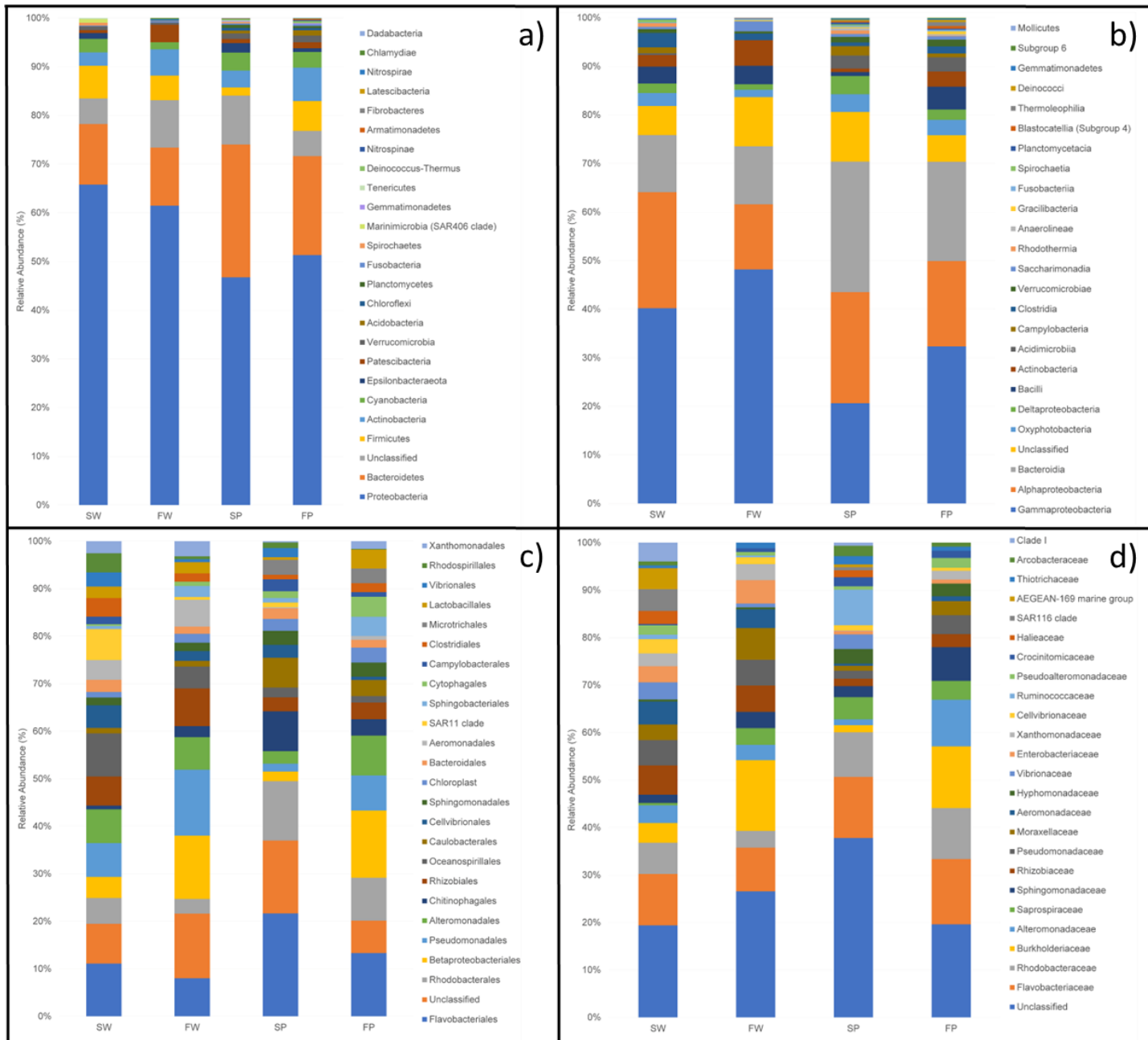


Figura 72. Grafici a barre che riportano la percentuale relativa di abbondanza dei phyla batterici (a), classi (b), ordini (c) e famiglie (d) in acqua di mare (SW), acqua dolce (FW) e i corrispondenti rifiuti PE (SP e FP). Ogni barra rappresenta la media dei campioni e la composizione microbica è stata determinata tenendo conto solo dei 25 taxa più abbondanti.

Il grafico dell'analisi delle coordinate principali (PCoA) basato sulla matrice di distanza Bray-Curtis ha mostrato che i quattro campioni formavano due gruppi, uno costituito da rifiuti di PE (simboli blu nella Figura 73) e acqua (simboli rossi) raccolti dal mare, e l'altro contenente rifiuti di PE e acqua raccolti nel torrente. Solo i campioni FW3 (rimossi dall'analisi precedente) e SP2 possono essere considerati valori anomali (outliers) (Figura 73).

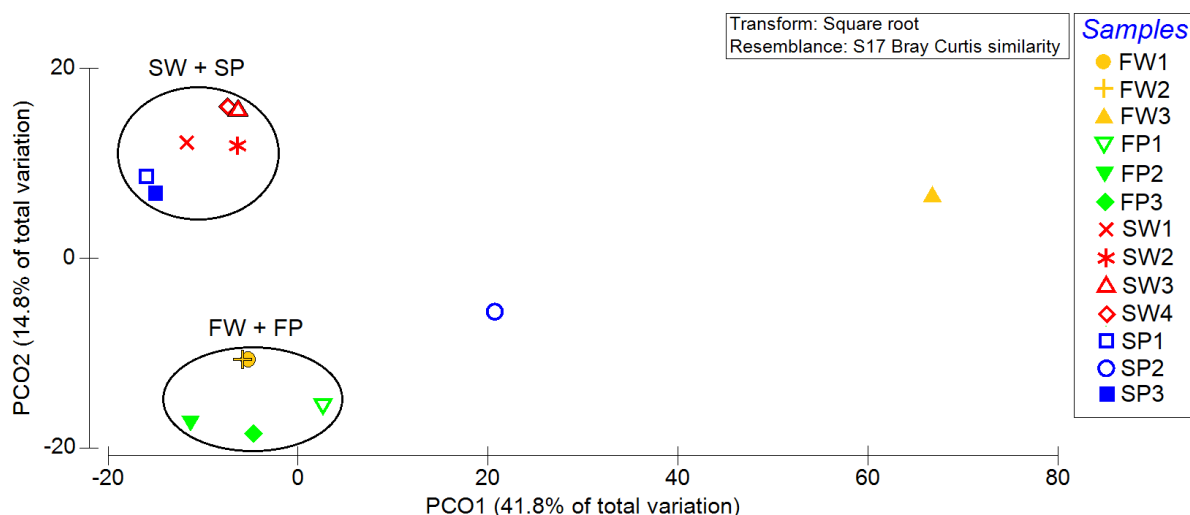


Figura 73. Grafico PCoA che evidenzia il raggruppamento dei campioni microbici. SW, FW, SP, e FP stanno rispettivamente per: acqua di mare, acqua dolce, PE raccolto in acqua di mare e PE raccolto in acqua dolce. I campioni FW3 e SP2 non sono riportati.

6.2.2.3 Analisi della resistenza

I DNA metagenomici derivanti da ciascun campione sono stati raggruppati e analizzati con analisi PCR per i seguenti geni: *blaTEM*, *blaCTXM*, *ermB*, *qnrS*, *sulII*, *tetA* e *tetW*; questi sono indicatori di fenomeni di resistenza ad antibiotici molto comuni nel Mar Mediterraneo [Alduina et al., 2020; Blasi et al., 2020; Vitale et al., 2018; Vitale et al., 2019; Pace et al., 2019a; 2019b]. Tutti i campioni sono risultati positivi alla presenza del gene *blaTEM*, mentre il gene *blaCTXM* è stato rilevato solo nei rifiuti di PE raccolti in acqua di mare. I geni *ermB*, *qnrS*, *sulII* e *tetA* sono stati rilevati solo nei campioni di rifiuti PE raccolti sia in acqua di mare che in quella dolce, mentre il *tetW* è stato trovato solo nei rifiuti di PE in acqua dolce. Inoltre, il gene *int1* è stato amplificato da tutti i campioni analizzati (Tabella 20 e Figura 74).

Tabella 20. Sintesi della presenza/assenza di ARGs e del gene *int1* rilevati in campioni di DNA metagenomico estratto da campioni di acqua e di rifiuti di PE raccolti in acqua dolce e marina.

Sample	<i>blaTEM</i>	<i>blaCTXM</i>	<i>ermB</i>	<i>qnrS</i>	<i>sulII</i>	<i>tetA</i>	<i>tetW</i>	<i>int1</i>
Seawater (SW1-SW4)	+	-	-	-	-	-	-	+
Freshwater (FW1-FW3)	+	-	-	-	-	-	-	+
Seawater plastic (SP1-SP3)	+	+	+	+	+	+	-	+
Freshwater plastic (FP1-FP3)	+	-	+	+	+	+	+	+

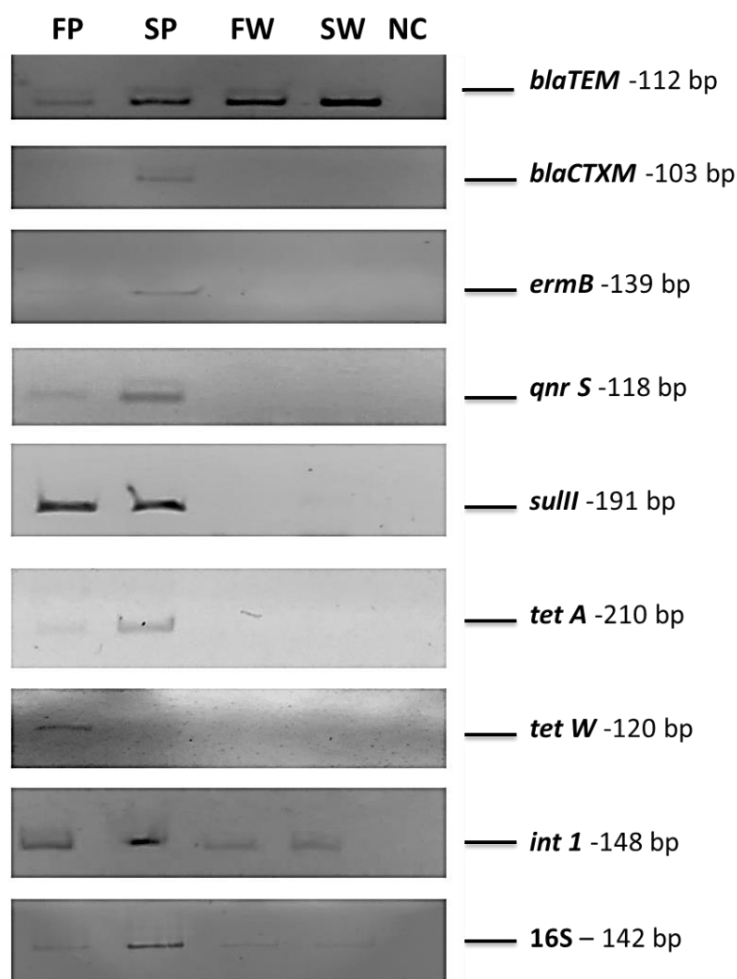


Figura 74. Gel della PCR che mostra le bande amplificate ottenute. La stessa quantità di DNA (10 ng) è stata usata in ogni reazione. SW, FW, SP e FP si riferiscono rispettivamente a: acqua di mare, acqua dolce, PE raccolta in acqua di mare, PE raccolta in acqua dolce. NC indica il controllo negativo (acqua invece di DNA come campione aggiunto).

6.2.3 Discussione

In questo studio viene evidenziato che i frammenti di rifiuti di PE analizzati erano più ricchi di termini di diversità batterica e ARGs rispetto ai corrispondenti campioni di acqua.

Come già suggerito in un altro studio [Leonard et al., 2018] i nostri risultati confermano che l'area di campionamento ha un ruolo importante nel determinare differenze nelle composizioni batteriche.

Queste differenze potrebbero essere attribuite a diverse condizioni ambientali (salinità, temperatura, pH, ecc.) o a una durata differente nel periodo di persistenza dei rifiuti di PE in acqua, mentre i campioni di acqua potrebbero subire condizioni ambientali più stabili e una minore presenza (in termini di quantità) di nutrienti (N, P, ecc.).

I nostri risultati suggeriscono che i rifiuti in PE rappresentano un habitat ideale che funziona da ottimo substrato di colonizzazione batterica e sono in accordo con una recente ricerca in cui sono state osservate associazioni batteriche in substrati di questo tipo [Tu et al., 2020].

Proteobacteria, Bacteroidetes, e Firmicutes rappresentano i phyla dominanti in tutti i campioni, e rappresentavano dal 76 al 83% del totale dei batteri presenti.

Gli Actinobacteria e i Patescibatteri erano invece maggiormente presenti nei campioni di acqua, suggerendo che la loro origine derivi dal suolo. Recentemente infatti, gli Actinobacteria, noti come batteri del suolo produttori di antibiotici, sono stati isolati in campioni d'acqua [Zothanpuia et al., 2018], mentre i Patescibacteria prosperano preferenzialmente in condizioni oligotrofiche [Herrmann et al., 2019]. Anche Clamidia, noti come agenti patogeni intracellulari obbligati per l'uomo, sono stati trovati solo in un campione di acqua dolce [Collingro et al., 2020], mentre alcuni phyla come Dadabacteria e Hydrogenedentes, sono stati trovati solo nei rifiuti PE in acqua di mare. I nostri risultati confermano quelli ottenuti da recenti studi su Dadabacteria, considerati batteri cosmopoliti dell'ambiente marino [Graham & Tully 2021] e Hydrogenedentes, conosciuti per la loro attività di degradazione di composti del carbonio come l'idrolisi degli ftalati [Momper et al., 2018].

Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Bacteroidia invece rappresentano in maniera omogenea le classi microbiche dominanti contribuendo ad oltre il 69% delle comunità totali. Tale risultato è in accordo con quelli di una recente ricerca che considera queste tre classi il microbioma centrale dei biofilm associati al PE [Tu et al., 2020].

La classe Alphaproteobacteria era maggiormente presente nei campioni di acqua marina rispetto a quelli di acqua dolce. Questa classe comprende anche il clade SAR11, noto anche come Pelagibacterales, trovato in percentuale maggiore in acqua di mare rispetto agli altri campioni. Si ritiene che i membri di quest'ordine svolgano un ruolo importante nella mineralizzazione del

carbonio organico disciolto e siano coinvolti nell'assorbimento del fosfato, processo importante poiché il fosforo rappresenta un nutriente limitante nelle zone oligotrofiche marine [Bougouffa et al., 2013].

Flavobacteriaceae, presente in tutti i campioni, rappresenta la componente principale del batterioplancton negli ambienti marini [Kirchman et al., 2003].

La famiglia delle Rhodobacteraceae era più abbondante nei campioni di rifiuti di PE poiché i suoi membri sono identificati come i colonizzatori primari delle superfici durante le prime fasi della formazione del biofilm [Elifantz et al., 2013].

Infine, la famiglia delle Burkholderiaceae, presente in grandi quantità nei campioni di acqua dolce, comprende alcuni patogeni Gram-negativi che sono generalmente presenti nei suoli o nelle acque superficiali non trattate [Baker et al., 2013].

La possibilità di trovare batteri resistenti agli antibiotici nelle acque marine ad oggi è un fenomeno ben documentato [Alduina, 2020].

Nel presente studio, il gene *bla_{TEM}* è stato trovato in tutti i campioni analizzati. Tale risultato può essere ricondotto alla frequente presenza di fenomeni di resistenza ai β -lattamici negli ecosistemi marini [Pace et al., 2019a; 2019b; Alduina, 2020; Blasi et al., 2020]; in particolare questa è stata osservata spesso in acqua di mare, nei pesci e in altri organismi marini selvatici come le tartarughe marine [Alves et al., 2014; Hong et al., 2018; Alduina et al., 2020].

Diversamente, il gene *bla_{CTXM}* è stato trovato solo nei rifiuti di PE raccolti in acqua di mare, mentre i geni *tetA* e *sulIII* sono stati trovati esclusivamente nei campioni di rifiuti di PE, a differenza di altre ricerche che attestano la loro presenza prevalente nelle acque superficiali [Stoll et al., 2012; Jiang et al., 2018].

Il gene *intI* è stato trovato in tutti i campioni, indicando una preoccupante diffusione di ARB e ARGs, come già indicato altrove [Alduina, 2020]. Inoltre, è stato ipotizzato che la frequenza di rilevazione degli integroni di classe I sia indice di inquinamento antropico ambientale [Gillings et al., 2015].

In effetti, la presenza diffusa del gene *intI* nei nostri campioni evidenzia il potenziale trasferimento di ARGs tra i diversi ceppi batterici e la loro migrazione tra sistemi acquatici collegati. La loro diffusione negli ambienti marini aumenterebbe i rischi per la salute umana a causa dell'inefficacia degli antibiotici nel trattamento delle malattie batteriche infettive [Jiang et al., 2018; Amarasiri et al., 2020]. Inoltre, abbiamo trovato un numero maggiore di ARGs (sei dei sette geni analizzati) nei campioni di rifiuti di PE raccolti sia in acqua di mare che in acqua dolce. Abbiamo ipotizzato che tali rifiuti, che permangono a lungo nell'acqua dolce che contiene sia ARB e ARGs, possono essere trasportati dal torrente fino al mare dove possono

stanziano ancora più a lungo aumentando la densità batterica.

I rifiuti di PE raccolti dalle acque dolci contenevano anche un elevato numero di ARGs, indicando il ruolo antropogenico negativo sulla contaminazione delle acque. L'acqua di mare e l'acqua dolce contenevano solo geni *bla_{TEM}* e *int1*, mentre i rifiuti di acqua dolce di PE contenevano il gene *tetW*. Le tetracicline sono comunemente utilizzate sia nel trattamento delle infezioni umane sia negli allevamenti, ad esempio di suini e bovini [Zhou et al., 2013; Vitale et al., 2018; 2019]. In un altro lavoro il gene *tetW* è stato rilevato in un bacino idrografico del fiume Pearl in Cina, fortemente influenzato dalle attività umane [Jiang et al., 2018].

Un'altra importante fonte di resistenza agli antibiotici, spesso trascurata, deriva dalla maricoltura (gabbie galleggianti) in cui gli operatori utilizzano farine di pesce ottenute da specie animali potenzialmente contaminate [Han et al., 2017] o effettuano trattamenti antibiotici. Infatti, la resistenza agli antibiotici potrebbe essere acquisita da organismi marini selvatici direttamente dall'acqua inquinata o attraverso mangimi non consumati durante la somministrazione degli stessi nelle specie di allevamento (di solito spigola, orata, o salmone); questi mangimi tendono a depositarsi e accumularsi nel substrato o vengono dispersi nella colonna d'acqua. Tutte queste particelle alimentari residue si muovono lungo la catena alimentare, raggiungendo infine l'uomo come consumatore finale. Pertanto, la resistenza agli antibiotici può essere acquisita sia attraverso il consumo di organismi contaminati selvatici o di allevamento sia per contatto diretto con l'acqua di mare.

Ad esempio, lungo le coste inquinate della Campania è stata riscontrata resistenza antibiotica in diverse specie marine come pesci e molluschi [Smaldone et al., 2014] ma anche in altre specie terrestri di allevamento [Han et al., 2017]. Considerando che gli ambienti di allevamento possono rappresentare un importante fonte di contaminazione, nel complesso, occorre prestare particolare attenzione alla zona in cui sono presenti impianti di maricoltura o allevamenti intensivi di bovini o di pollame.

In questo contesto, l'eccessiva presenza di plastica [Momper et al., 2018] costituisce un altro possibile vettore di ARGs che desta preoccupazione considerando che la quantità effettiva di plastica è fortemente sottodimensionata a causa dell'assenza di analisi di quantificazione di microplastiche nella stima del loro carico totale [Bougouffa et al., 2019].

I nostri risultati hanno dimostrato che i rifiuti di PE raccolti dall'acqua di mare erano i più ricchi in termini di diversità batterica e ARGs che potrebbero essere quindi trasportati passivamente attraverso le correnti marine. Pertanto, in linea con altri recenti studi [Yang et al., 2020; Moore et al., 2020], confermiamo che i rifiuti di PE potrebbero rappresentare un serbatoio per la resistenza agli antibiotici che contribuisce alla diffusione di batteri resistenti nell'acqua di mare.

6.2.4 Materiali e metodi

6.2.4.1 Area di studio e raccolta dei campioni

Nel corso di una campagna di campionamento condotta nell'ottobre 2019, sono stati raccolti tre campioni di rifiuti PE sul fondo di un piccolo torrente ("freshwater PE" (FP)), denominato Vallone Casteldaccia, situato nella Sicilia nordoccidentale (Italia, $38^{\circ} 03' 52.69''N$; $013^{\circ} 32' 16.35''E$) insieme a tre campioni d'acqua ("freshwater" (FW)) provenienti da diversi punti vicini dello stesso corso d'acqua. Tutti i campioni sono stati prelevati all'interno di un raggio di circa 5 m ad una profondità di circa 20 cm.

La mappa dei siti di campionamento (Figura 75) è stata creata utilizzando il software QGIS v.2.18.2 (<http://www.qgis.org>, accesso il 19 gennaio 2021).

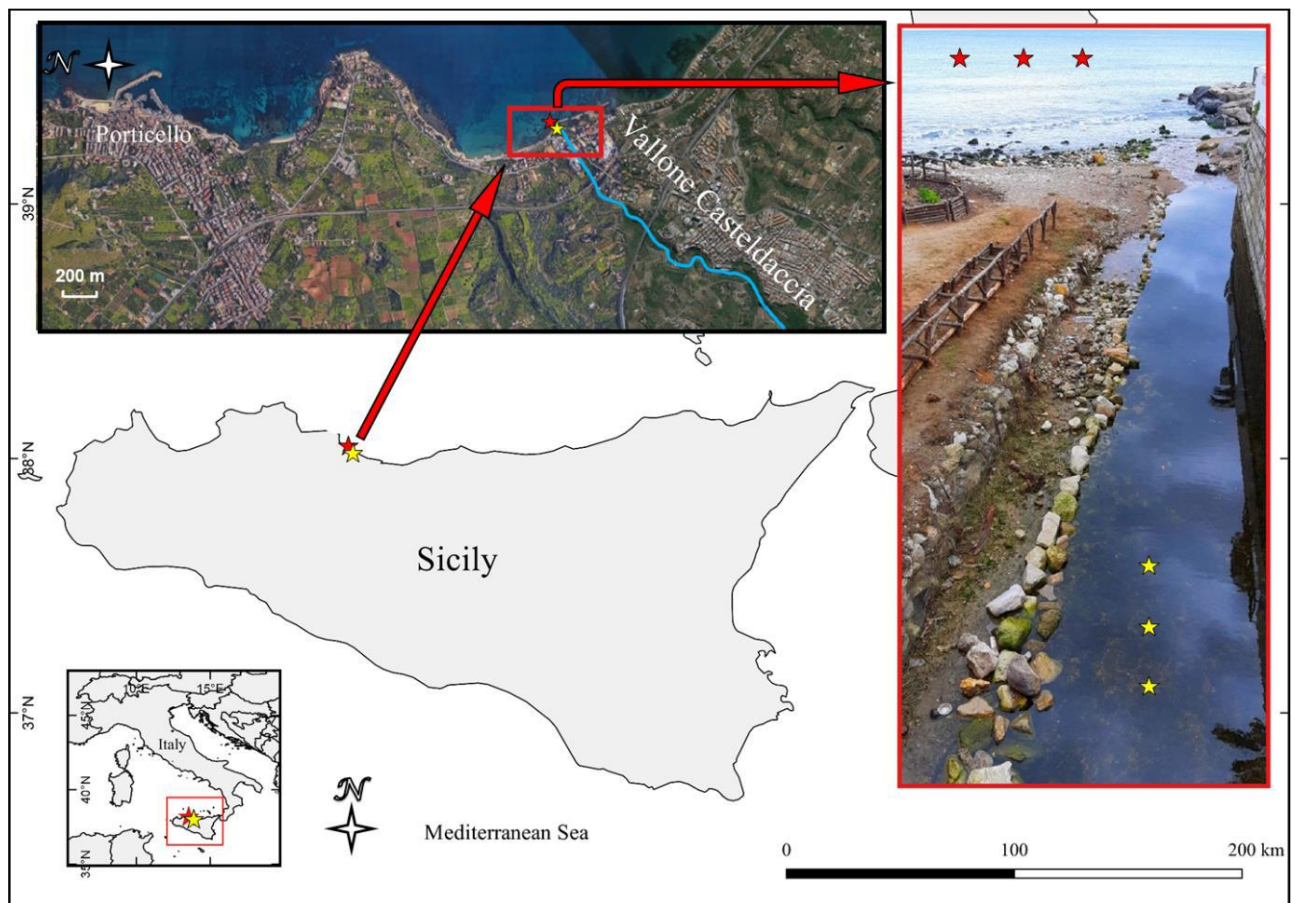


Figura 75. Mappa del sito di campionamento. I simboli rossi indicano il sito di campionamento dell'acqua e dei rifiuti PE provenienti dal mare e quelli gialli il sito di campionamento dal torrente.

Inoltre, di fronte al ruscello ed in particolare a 20 metri di distanza alla costa ad una profondità di 1.5 m, sono stati raccolti tre frammenti di rifiuti di PE, indicati come "seawater PE" (SP) e quattro campioni di "seawater" (SP). Ogni campione di plastica era costituito da rifiuti di PE

della dimensione di 5-10 cm mentre i campioni di acqua erano del volume di un litro. I campioni di PE e di acqua sono stati conservati in contenitori di vetro sterili da un litro, posti al buio in una ghiacciaia fino al trasporto al laboratorio.

6.2.4.2 Estrazione del DNA, amplificazione PCR e sequenziamento

L'estrazione del DNA totale è stata effettuata attraverso qualche piccola modifica ad un metodo già descritto in letteratura [Arizza et al., 2019]. In particolare, per l'acqua di mare è stato seguito il protocollo riportato nel paragrafo 6.1.4.3, mentre per i singoli piccoli pezzi di rifiuti di PE (della stessa dimensione del tappo della falcon da 50 mL) è stata utilizzata la stessa procedura descritta per i gusci d'uovo nel paragrafo 6.1.4.3.. I frammenti di PE sono stati selezionati con pinzette sterili e risciacquati due volte con acqua distillata sterile prima dell'estrazione del DNA.

La purezza e la quantità di DNA sono state valutate tramite spettrofotometria (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Una volta quantificato è stata usata una quantità equivalente di DNA per ogni rifiuto di PE e campione di acqua (10 ng). Il DNA estratto è stato utilizzato per amplificare un frammento di 464 bp corrispondente alla regione V3-V4 dell'rDNA 16S utilizzando i primer descritti da Takahashi et al. [Takahashi et al., 2014], e per il sequenziamento del DNA gli ampliconi sono stati inviati a BMR Genomics srl, Padova (PD) - metodo illumina (MiSeq).

Le sequenze grezze sono state importate su QIIME2 [Bolyen et al., 2019] (<https://qiime2.org>, accesso il 10 settembre 2020). Il plug-in DADA2 è stato utilizzato per filtrare, rimuovere le chimere e per denominare tutte le sequenze al fine di ottenere l'OTU (unità tassonomica operativa). Ad ogni OTU è stata assegnata una tassonomia utilizzando il classificatore SINA sull'ultimo set di dati SILVA disponibile [Pruesse et al., 2019] (<https://www.arb-silva.de/silvangs/>, accesso l'11 settembre 2020). L'analisi di rarefazione è stata effettuata tracciando il numero di OTUs osservati rispetto al numero totale di letture filtrate per ciascun campione. Le differenze in termini di abbondanza tra i campioni studiati (SP, SW, FP, e FW) sono state analizzate tramite l'analisi ANOVA (one-way) utilizzando il software statistico MINITAB 17. Inoltre, al fine di valutare le variazioni tra i campioni, è stata eseguita l'analisi di coordinate principali (PCoA) utilizzando il pacchetto software PRIMER 6 [Clarke & Gorley, 2006]. Le analisi si basavano sulla matrice di distanza Bray-Curtis. Gli indici di diversità sono stati eseguiti come descritto in Arizza et al. [Arizza et al., 2019]. Le sequenze sono state depositate a Genbank (Bioproject PRJNA662461).

6.2.4.3 Individuazione dei geni di resistenza agli antibiotici (ARG)

10 ng del DNA metagenomico sono stati utilizzati come template per amplificare i geni codificanti per i prodotti responsabili della resistenza agli antimicrobici. Tutte le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando temperature di annealing e coppie di primer elencate nella Tabella 21. La presenza del prodotto di amplificazione previsto è stata considerata come campione positivo. I primer riportati nella Tabella 21 sono stati utilizzati per controllare la qualità del DNA per amplificare un frammento di DNA di 142 bp del gene rDNA 16S.

Tabella 21. Elenco dei primer utilizzati in questo studio.

Target Name	Primer Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (C°)	Reference
<i>16S rDNA for V3-V4 sequencing</i>	cctacgggnbgcascag gactacnvgggtatctaatcc	464	55	[Takahashi et al., 2014]
<i>16S rDNA</i>	cggtgaatacgttcycgg gghtacctgttacgactt	142	55	[Di Cesare et al., 2016]
<i>tetA</i>	gtacatcctgcttgccttc catagatcgccgtgaagagg	210	64	[Ng et al., 2001]
<i>bla_{TEM}</i>	ttcctgttttgcaccag ctcaaggatcttaccgctgtt	112	60	[Bibbal et al., 2007]
<i>bla_{CTXM}</i>	ctatggcaccaccaacgata acggcttctgccttaggtt	103	60	[Marti et al., 2013]
<i>qnrS</i>	gacgtgctaactgcgtgat tggcattgttgaaacttg	118	62	[Marti & Balcazar, 2013]
<i>sulII</i>	tccggtggaggccggtatctgg cgggaatgccatctgccttgag	191	60	[Pei et al., 2006]
<i>ermB</i>	ccgaacactagggttgctc atctggaacatctgtggtatg	139	55	[Di Cesare et al., 2013]
<i>tetW</i>	acatcattgatactccaggtcacg ttcactttgtggttgaaccctc	120	56	[Zambri et al., 2019]
<i>intI</i>	ggcttcgtgatgcctgctt cattcctggccgtggttct	148	59	[Luo et al., 2010]

6.2.5 Conclusioni

In questo studio, abbiamo descritto la comunità microbica presente nell'acqua e quella presente nei frammenti di PE raccolti nelle stesse acque analizzate (sia di mare che di torrente).

I risultati hanno dimostrato che la plastisfera presenta una biodiversità microbica più ricca dell'acqua corrispondente. Inoltre, i frammenti di plastica contenevano un numero maggiore di geni resistenti agli antibiotici rispetto ai corrispondenti campioni d'acqua, indicando che questi potrebbero rappresentare una minaccia allarmante per l'ambiente marino e gli organismi viventi. In questo contesto nell'orizzonte previsionale, occorrerà considerare i rifiuti plastici come fattori determinanti della dispersione di batteri e resistenza agli antibiotici e intervenire adottando strategie e misure di intervento adeguate all'entità del pericolo emergente.

6.3 Valutazione dell'antibiotico-resistenza in ambiente marino

L'acqua di mare potrebbe essere considerata un mezzo di diffusione di batteri resistenti e quindi geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti. In questo lavoro è stato determinato il profilo di resistenza di ceppi batterici in campioni di acqua di mare prelevati da diverse coste della Sicilia.

6.3.1 Introduzione

La resistenza agli antibiotici è una delle maggiori sfide per la salute pubblica in tutti i paesi del mondo [Waseem et al., 2018; Kraemer et al., 2019]. I costi economici dovuti agli interventi clinici e alle perdite di produttività ammontano a 9 miliardi di EUR (in Europa) e 20 miliardi di USD (negli Stati Uniti). Oggi la presenza di ARB e ARGs è abbastanza comune anche nei batteri che non hanno mai subito trattamenti antibiotici [Alduina, 2020]. La concomitante presenza di geni resistenti ai metalli pesanti e agli antibiotici può favorire la selezione di batteri multi-resistenti [Di Cesare et al., 2016b]. Diversi studi hanno segnalato la presenza di ARB e/o ARGs in diversi ambienti acquatici, quali le acque superficiali [Stoll et al., 2012; Sucato et al., 2021], le acque reflue [Gwenzi et al., 2020], le acque costiere ricreative [Belding & Boopathy, 2018], e anche in gli ambienti (ad esempio i ghiacciai [Segawa et al., 2013]) e organismi (ad es. diversi animali marini [Pace et al., 2019b; Alduina et al., 2020; Blasi et al., 2020]) che in linea teorica non dovrebbero essere stati influenzati da fattori antropici di contaminazione.

In particolare, nelle acque costiere, influenzate dall'intensa attività umana, dalla presenza di effluenti e impianti di trattamento delle acque reflue, i batteri e gli ARGs multi-resistenti potrebbero essere indicatori essenziali di contaminazione [Bondarczuk & Piotrowska-Seget, 2019; Zhang et al., 2020b].

Pertanto, come accennato, questo studio mira a valutare il profilo di resistenza agli antibiotici di batteri isolati dall'acqua di mare provenienti da diverse località costiere della Sicilia, combinando test microbiologici e analisi molecolari per la rilevazione di geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti con l'obiettivo, da un lato, di conoscere la diffusione di ARBs e ARGs nelle acque marine della costa tirrenica della Sicilia, e, dall'altro, per scattare un'istantanea della situazione reale che potrebbe essere utilizzata per confronti futuri.

6.3.2 Risultati

Lo screening di monitoraggio chimico di tutti i campioni di acqua non ha rilevato alcuna traccia degli antibiotici studiati, come risultato, tutti gli analiti erano sotto il limite di rilevazione.

In questo studio, in totale 29 ceppi batterici sono stati isolati da 6 campioni di acqua di mare e successivamente identificati da test biochimico-enzimatici o PCR. Le analisi microbiologiche hanno portato all'isolamento di 5 diversi generi di batteri con una maggiore percentuale, tra tutti gli isolati, di Gram-negativi (91%) (Tabella 22).

Tabella 22. Ubicazione del sito di campionamento e relativi generi e numeri di isolati batterici

Location	Coordinate	Isolated bacterial genera	Number of isolates
Lipari W3	38°29'13.3"N 14°57'59.2"E	<i>Vibrio</i>	3
		<i>Bacillus</i>	2
Casteldaccia W5	38°03'21.3"N 13°32'38.9"E	<i>Vibrio</i>	1
		<i>Escherichia coli</i>	2
S. Flavia W6+W1	38°03'53.3"N 13°32'17.2"E	<i>Vibrio</i>	2
	+	<i>Aeromonas</i>	7
Acqua dei Corsari W7	38°03'52.7"N 13°32'16.5"E	<i>Escherichia coli</i>	1
		38°05'54.8"N 13°24'49.6"E	<i>Vibrio</i>
Levanzo W8	37°59'33.1"N 12°21'01.6"E	<i>Klebsiella</i>	1
		<i>Vibrio</i>	1
Rometta W4	38°14'16.5"N 15°24'50.0"E	<i>Aeromonas</i>	2
		<i>Enterobacter</i>	1
		<i>Vibrio</i>	3

I ceppi batterici isolati maggiormente riscontrati appartenevano ai generi *Vibrio* (44.8%) e *Aeromonas* (31%); *Vibrio spp.* è stato isolato da tutti i campioni, mentre *Aeromonas spp.* solo dai campioni di acqua di S. Flavia e Levanzo. Inoltre, *Aeromonas spp.* era il genere predominante nei campioni di S. Flavia, rappresentando il 70% degli isolati da campioni d'acqua provenienti da questo sito. Altri tre generi, *Bacillus*, *Klebsiella* ed *Enterobacter*, sono stati ritrovati rispettivamente nei campioni di Lipari (40%), Acqua dei Corsari (25%) e Levanzo (25%); invece, *E. coli* è stato trovato nei campioni di S. Flavia (10%) e Casteldaccia (67%) mentre *Salmonella spp.* non è stata riscontrata in nessuno dei campioni esaminati.

6.3.2.1 Profilo di resistenza agli antibiotici e geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti

➤ Profilo di resistenza agli antibiotici

Il test di antibiotico resistenza ha mostrato che in quasi tutti gli isolati microbici (con eccezione di due isolati sensibili, uno da acqua dei corsari e uno da Levanzo) erano resistenti alla cefazolina (89.6%) mentre il 37.9% degli isolati ha mostrato resistenza all'amoxicillina/acido clavulanico e il 31% alla streptomicina (Figura 76).

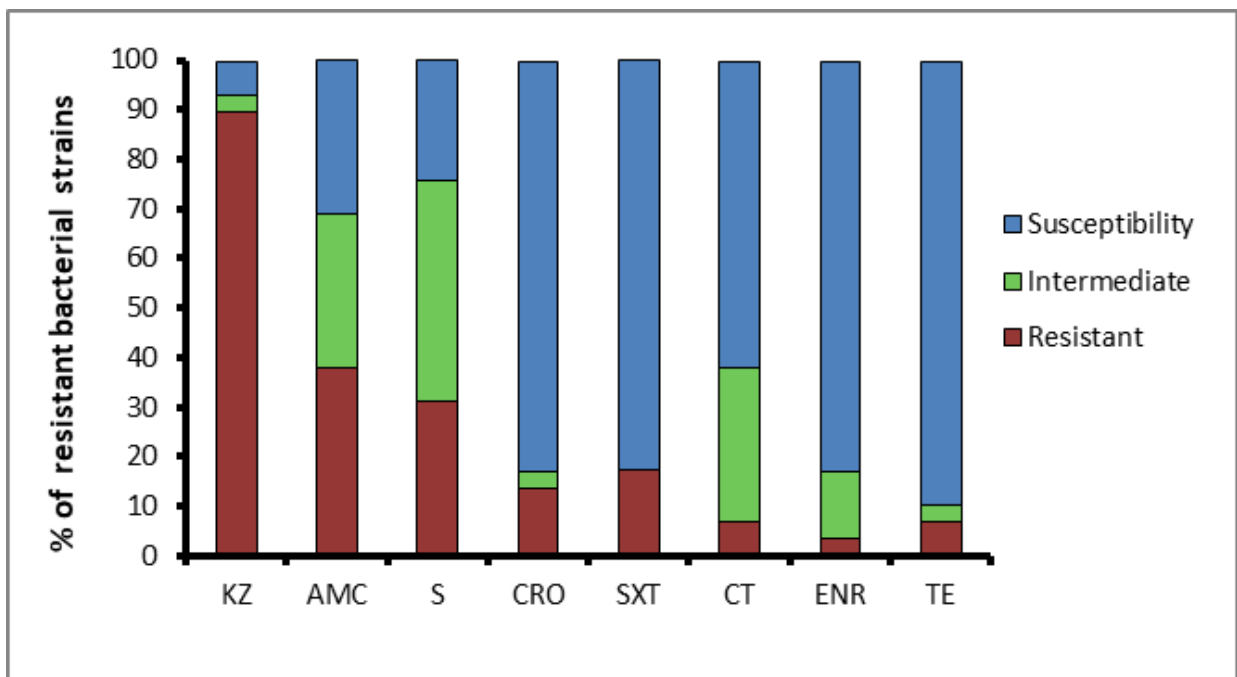


Figura 76. Percentuale di isolati resistenti, intermedi o sensibili agli agenti antimicrobici. KZ, cefazolina; S, streptomicina; AMC, amoxicillina/acido clavulanico; CT, colistina; CRO, ceftriaxone; SXT, sulfametossazolo/trimethoprim; TE, tetraciclina; ENR, enrofloxacin.

Al contrario, sono stati riscontrati bassi tassi di resistenza agli antibiotici per sulfametossazolo/trimethoprim (17.2%), ceftriaxone (13.7%), colistina e tetraciclina (entrambi 6.8%) ed enrofloxacin (3.4%). Sorprendentemente, sono state trovate elevate percentuali di batteri che mostrano una resistenza intermedia alla streptomicina (44.8%), amoxicillina/acido clavulanico e colistina (entrambi 31%) (Figura 76). Inoltre, la maggior parte dei batteri isolati (N = 11) non ha mostrato resistenza multipla, bensì ad un solo antibiotico. Tuttavia, un buon numero di isolati (N=7) risultavano resistenti a due degli otto antibiotici testati, e un piccolo numero di loro erano resistenti a tre (N=3), quattro (N=4) e cinque (N=2) antibiotici. In particolare, nessuno ceppo batterico era resistente a sei o sette antibiotici.

➤ Geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti

Il DNA metagenomico è stato estratto da tutti i campioni e analizzato mediante PCR per i geni *bla_{TEM}*, *bla_{CTXM}*, *qnrS*, *sulII* e *Tet(A)* (Tabella 23).

Tabella 23. Sintesi della presenza/assenza di ARGs, HMRGs e del gene *int1* nei 6 campioni metagenomici analizzati.

Location	<i>bla_{TEM}</i>	<i>qnrS</i>	<i>sulII</i>	<i>tet(A)</i>	<i>bla_{CTXM}</i>	<i>czcA</i>	<i>arsB</i>	<i>int1</i>
Lipari W3	+	ND ¹	+	ND	ND	+	ND	+
Casteldaccia W5	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	+
S. Flavia W6	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	+
Acqua dei corsari W7	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
Levanzo W8	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	+
Rometta W4	+	ND	+	ND	ND	+	ND	+

¹ ND indicates that the correct amplification product was not obtained.

Tutti i campioni sono risultati positivi alla presenza del gene *bla_{TEM}*, a differenza del gene *bla_{CTXM}* che non è stato rilevato. Solo pochi campioni (n = 3) relativi alle acque costiere di Lipari, Rometta e Casteldaccia sono risultati positivi al gene *sulII*. Non è stato rilevato alcun gene *Tet(A)* e *qnrS*, a causa al minor numero di batteri resistenti isolati. Inoltre, è stata studiata la presenza dell'elemento mobile *int1*, nonché dei geni *czcA* e *arsB* relativi ai metalli pesanti. Il gene *int1*, è stato trovato in tutti i campioni, mentre più della metà dei campioni (66.6 %) è risultata positiva per la resistenza al cadmio (cadmio, cobalto e zinco) e nessuno è risultato positivo per i geni *arsB* (resistenza all'arsenico) (Tabella 23).

6.3.3 Discussione

In questo studio, viene riportato il profilo di resistenza di batteri isolati dalle acque marine provenienti da diverse località della costa tirrenica della Sicilia. Il consumo globale di antibiotici si riflette direttamente nella loro presenza in vari comparti ambientali, compreso quello acquatico. Di conseguenza, questi ambienti, e soprattutto le acque costiere, sono riconosciuti come dei *réservoirs* che favoriscono la diffusione della resistenza agli antibiotici [Su et al., 2020]. In Italia sono stati condotti diversi studi sulla presenza di batteri resistenti negli animali marini [Foti et al., 2009; Smaldone et al., 2014; Alduina et al., 2020; Blasi et al., 2020], ma pochi hanno fatto altrettanto per le acque marine [Dumontet et al., 2000; Di Cesare et al., 2012; Alduina et al., 2020; Sucato et al., 2021].

I nostri risultati confermano che i batteri Gram-negativi, e in particolare i generi *Aeromonas* e

Vibrio, si trovano più frequentemente nei campioni provenienti dall'ambiente marino. La presenza di questi due generi nelle acque costiere dell'Italia meridionale è già stata valutata da altri studi [Dumontet et al., 2000; Maugeri et al., 2004; Alduina et al., 2020]. Le loro caratteristiche fisiologiche, infatti, li rendono parte della microflora autoctona delle acque marine, con conseguente contaminazione degli organismi acquatici [Dumontet et al., 2000; Pace et al., 2019b]. L'incidenza di questi due generi nei nostri campioni è in accordo con quanto precedentemente rilevato da Pace et al. [2019b] che riporta, in tamponi orali di tartarughe marine nella costa tirrenica del sud Italia, una maggiore incidenza di *Vibrio spp.* (53.4%) rispetto ad *Aeromonas spp.* (17%) [Pace et al., 2019b]. Differentemente, due studi più recenti condotti in Sicilia hanno riportato una maggiore incidenza di *Aeromonas spp.* che *Vibrio spp.* negli ambienti costieri siciliani [Alduina et al., 2020; Gambino et al., 2020].

L'abbondanza di *Aeromonas spp.* (70%) nel sito di S. Flavia potrebbe essere dovuta a fattori di origine terrestre, in quanto si tratta di un sito vicino all'estuario di un torrente, ambiente in cui la presenza di queste specie è elevata [Evangelista-Barreto et al., 2010].

Inoltre, l'assenza di *Vibrio spp.* e *Aeromonas spp.* negli altri campioni potrebbe essere dovuta alle caratteristiche dell'acqua, come il livello di salinità, il pH e la temperatura, che potrebbero influenzarne la distribuzione come dimostrato da studi precedenti [Silva et al., 2014; Serratone et al., 2016]. Tuttavia, l'assenza di informazioni su questi parametri dell'acqua e il basso numero di campioni analizzati non consentono di spiegare la diversa distribuzione tra i vari siti.

Infine, la presenza di *E. coli* nei campioni prelevati da S. Flavia e Casteldaccia, ospiti naturali del microbiota intestinale dell'uomo e degli animali, potrebbe essere un'indicazione della contaminazione fecale dovuta alla presenza di scarichi in prossimità di questi due siti di campionamento [Pereira et al., 2013; Alves et al., 2014].

Gli isolati batterici erano resistenti a cefazolina (89.6%), amoxicillina/acido clavulanico (37.9%) e streptomina (31%) in accordo con i livelli di resistenza (rispettivamente 95.5%, 34.1% e 43.2%) riportati in un precedente studio condotto in Sicilia su specie marine selvatiche e campioni d'acqua [Alduina et al., 2020]. Inoltre, anche nelle acque marine dalla costa meridionale della Turchia sono state segnalate elevate percentuali di resistenza a cefazolina e streptomina [Matyar, 2012]. Invece, i tassi più bassi di resistenza agli antibiotici erano relativi al sulfametossazolo/trimetoprim (17.2%), tetraciclina (6.8%) ed enrofloxacin (3.4%). La bassa resistenza al sulfametossazolo/trimetoprim è un risultato interessante, sia in considerazione del diffuso utilizzo di questo antibiotico sia, soprattutto, perché in un altro recente studio condotto sulle specie marine in Sicilia sono stati registrati valori di resistenza più elevati (37%) [Blasi et al., 2020]. Le basse percentuali di resistenza a tetraciclina ed enrofloxacin erano conformi a

quelle allo studio di Alduina et al. [2020]. Solo un ceppo ha mostrato resistenza all'enrofloxacin, un dato con implicazioni positive per l'ambiente marino se si considera che questo antibiotico è generalmente utilizzato per terapie in centri veterinari; quindi, una possibile diffusione di resistenza per questo antibiotico potrebbe influenzare negativamente la fauna locale. Invece, la bassa percentuale di resistenza alla tetraciclina può essere dovuta alla sua natura fotosensibile e conseguente degradazione fotochimica dovuta alle condizioni di esposizione alla luce [Graham et al., 2011]. Questo fattore potrebbe quindi diminuire la sua diffusione e resistenza; tuttavia, una valutazione più approfondita dei livelli di tetraciclina nelle acque siciliane potrebbe essere utile per chiarire questo aspetto.

In generale, le modeste quantità di isolati resistenti potrebbero essere ragionevolmente collegate alla minore densità batterica dell'acqua di mare [Zhang et al., 2009; Alduina et al., 2020]. Tuttavia, la presenza di ceppi multi-resistenti nei campioni di acque costiere evidenzia le drammatiche conseguenze per la salute sia degli organismi marini che dell'uomo [Leonard et al., 2018; Alduina et al., 2020]. Nonostante le limitazioni sul numero di campioni del presente studio, supponiamo che la raccolta di campioni da più siti potrebbe confermare tali risultati, inoltre ulteriori indagini che prendano in considerazione il periodo di raccolta (diverse stagioni) e considerino le dinamiche delle acque potrebbero essere molto utili.

Anche se la coltivazione classica associata all'identificazione biochimica e molecolare è di fondamentale importanza perché consente analisi di successo sui ceppi batterici isolati, prendendo in considerazione il profilo di resistenza agli antibiotici, questa potrebbe essere ostacolata dalla bassa densità dei campioni marini e dalla difficoltà di coltivare batteri diversi con diverse esigenze di crescita. Utilizzando l'analisi di metagenomica dell'rDNA 16S, abbiamo rilevato più di 100 generi in alcuni campioni analizzati in un precedente lavoro [Sucato et al., 2021].

Allo stesso modo, nel presente lavoro abbiamo analizzato campioni di acqua con l'obiettivo principale di valutare la presenza di ARGs ed avere quindi una visione più approfondita di tale resistenza. Tutti i campioni sono risultati positivi alla presenza del gene *bla_{TEM}*, mentre non è stato rilevato alcun gene *bla_{CTXM}*. La resistenza ai β -lattamici è stata spesso osservata nell'ecosistema marino (nell'acqua di mare, nei pesci e nelle specie marine selvatiche come le tartarughe marine), in particolare quella conferita dalla presenza del gene *bla_{TEM}* [Alves et al., 2014; Alduina et al., 2020; Baothman et al., 2020]. L'assenza del gene *bla_{CTXM}* nelle acque marine siciliane era in linea con uno studio precedente [Alduina et al., 2020], mentre l'assenza dei geni *Tet(A)* e *sulIII* è sorprendente se confrontata con i ritrovamenti di alcuni lavori che attestano la loro presenza prevalente nelle acque superficiali di tutto il mondo (Australia,

Germania e Cina) [Stoll et al., 2012; Yang et al., 2017], negli allevamenti ittici e negli ambienti costieri [Pepi & Focardi, 2021].

È interessante notare che il gene *int1*, è stato trovato in tutti i campioni e studi precedenti su alcuni isolati batterici provenienti da campioni di acqua, sedimenti e gamberetti, hanno trovato correlazioni positive tra l'abbondanza degli integroni di classe I e la resistenza contro alcuni metalli (come Cd, Zn e Pb) [Rosewarne et al., 2010; Di Cesare et al., 2016b; He et al., 2016]. Inoltre, la frequenza dei integroni di classe I è stata ipotizzata come un indicatore dell'inquinamento antropico ambientale [Gillings et al., 2015].

Per quanto riguarda l'analisi chimica (dati non mostrati nell'articolo), nonostante il ritrovamento di isolati resistenti nei campioni d'acqua, nessuna traccia di antibiotici è stata rilevata. Questo risultato, apparentemente in conflitto, si riferisce a due eventi che non si escludono a vicenda. Infatti, l'assenza di antibiotici nei campioni è probabilmente dovuta all'azione di diversi meccanismi di degradazione che operano su tali molecole (generalmente presenti nell'ambiente a bassi livelli di concentrazione) che hanno contribuito, prima della loro degradazione, alla formazione di fenomeni di resistenza agli antibiotici nei batteri ivi presenti. Infatti, considerando che l'emivita della maggior parte degli antibiotici varia da ore a giorni [Ben et al., 2019], e che questi sono solitamente considerate sostanze semi-persistenti a causa del continuo afflusso di emissioni, una volta arrivati in mare, queste molecole sarebbero più facilmente disperse e degradate (in misura maggiore nel caso di emissioni interrotte) a differenza dell'ARBs che può persistere.

6.3.4 Materiali e Metodi

6.3.4.1 Campagna di campionamento

I batteri sono stati isolati dall'acqua di mare analizzata durante le attività di routine presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia. Il campionamento è stato effettuato durante i mesi di maggio, giugno e luglio 2019 in 6 diverse località balneari sulla costa tirrenica della Sicilia prossime ad attività umane e centri residenziali. Campioni di acqua di mare (1L) sono stati raccolti a 5 metri dalla riva a Lipari, Casteldaccia, S. Flavia, Rometta, Levanzo e Acqua dei Corsari (Figura 77).

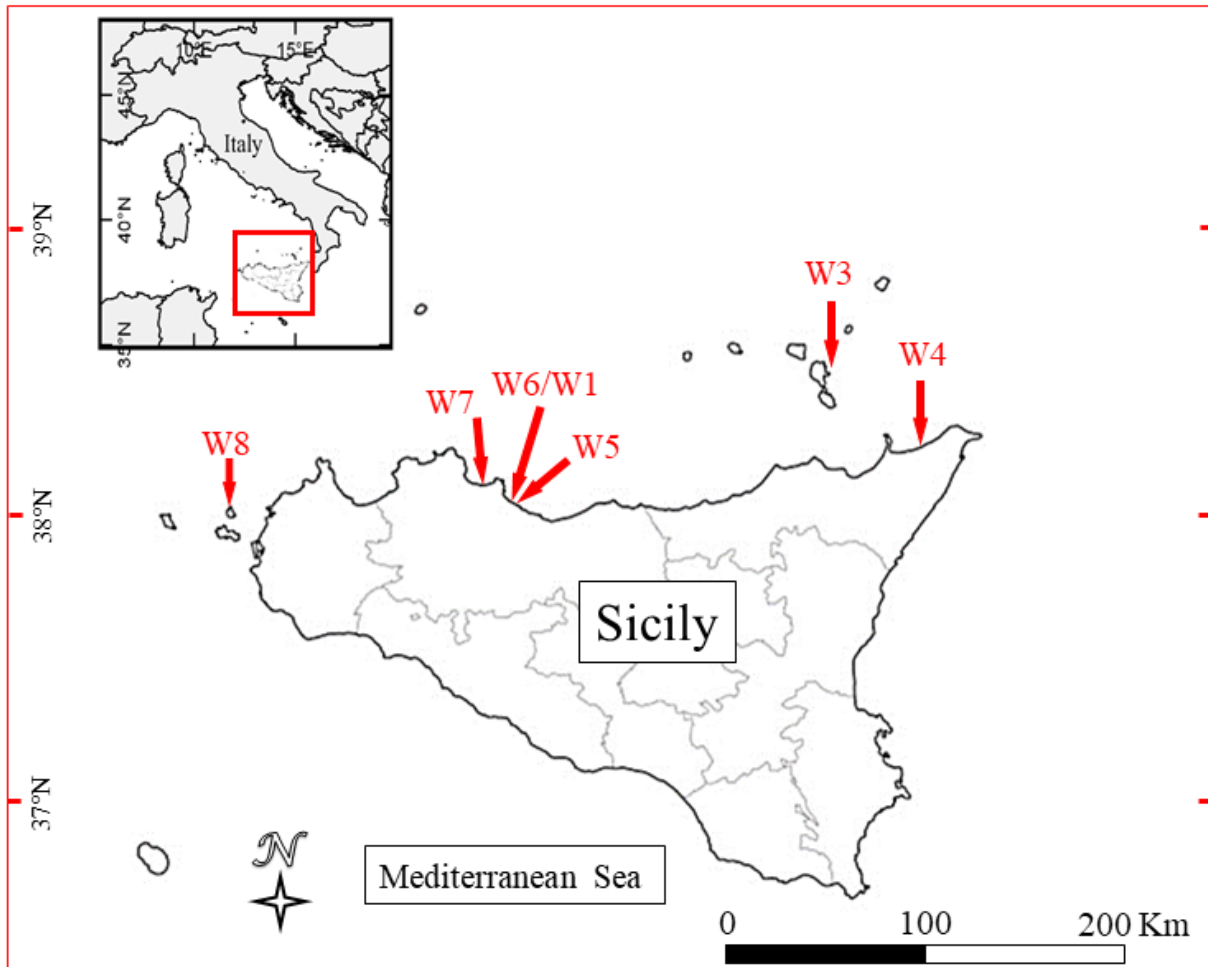


Figura 77. Mappa del sito di campionamento: Santa Flavia (W1/W6); Lipari (W3); Rometta (W4); Casteldaccia (W5); Acqua dei corsairi (W7); Levanzo (W8).

I campioni sono stati trasferiti in bottiglie sterili per analisi di laboratorio, mantenuti a 4 °C fino alla loro elaborazione. Tutti i campioni studiati in questo studio sono riportati nella Tabella 22.

6.3.4.2 Isolamento batterico, test di suscettibilità agli antibiotici e rilevazione dei geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti

Per l'isolamento batterico, l'acqua è stata filtrata con membrane di 0.45 µm (\pm 0.02 µm) di diametro. Le membrane sono state poi collocate in tubi contenenti 10 mL di acqua peptonata alcalina e incubate a 37 °C per 24-48 ore. Ogni campione è stato poi seminato su Columbia Agar con 5% di sangue ovino e terreni selettivi, vale a dire: (i) Mannitol Salt agar, (ii) MacConkey agar, (iii) TCBS (tiosolfato-citrato-bile-saccarosio) agar. Inoltre, per isolare *Salmonella spp.*, eventualmente presente, prima della semina in agar xilosio lisina desossicolato e agar verde brillante, è stato effettuato un secondo arricchimento in brodo di Selenite Cistina e Rappaport Vassiliadis, incubando entrambi i brodi e le piastre a 37 °C per 24-48 h. Tutti gli altri

dettagli metodologici per l'isolamento batterico così come quelli dei test di suscettibilità agli antibiotici sono analoghi a quelli descritti nel paragrafo 6.1.4.3.

➤ **Rilevazione dei geni di resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti**

Il DNA metagenomico è stato estratto da 6 campioni di acqua utilizzando il protocollo riportato in un altro lavoro [Arizza et al., 2019] (vedi paragrafo 6.1.4.3). Il DNA metagenomico è stato utilizzato come modello per amplificare i geni che codificano per i prodotti responsabili della resistenza agli antimicrobici (*Tet(A)*, *sulII*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTXM}*, *qnrS*) e ai metalli pesanti (*int1*, *arsB* e *czcA*). Come controllo, è stato utilizzato il frammento di DNA (142 bp) del gene rDNA 16S. L'estrazione del DNA da tutti i campioni (compreso i controlli negativi) è stata effettuata in duplicato, mentre le analisi PCR in triplicato. Tutte le reazioni PCR sono state eseguite utilizzando la temperatura di annealing e coppie di primer elencate in un lavoro precedente [Alduina et al., 2020]. La presenza del prodotto di amplificazione previsto è stata considerata come un campione positivo.

6.3.4.3 Antibiotici e metodologie applicate per la loro determinazione

Questo paragrafo contiene i dettagli delle analisi chimiche che non sono stati mostrati nel presente articolo.

Prima dell'analisi dei campioni, sono state effettuate diverse prove di estrazione per la rilevazione degli stessi antibiotici di cui si è trovata antibiotico resistenza (AMP, AMC, KZ, CRO, CT, S, ENR, SXT, T) attraverso l'utilizzo di cartucce SPE (strata-X SPE a fase inversa). In particolare, prima di eseguire la separazione dell'analita tramite SPE, a 250 mL di campione (acqua di mare filtrata con carta da filtro alla quale è stato addizionato o meno lo standard mix di antibiotici) sono stati aggiunti 5 mg di Na₂EDTA (utilizzato per chelare gli ioni metallici presenti nella matrice) e 10 µl di acido formico al fine di stabilizzare la forma neutra degli analiti. Le cartucce SPE sono state collegate a un sistema "vacuum manifold" (Figura 78) che ha permesso di mantenere un flusso costante di 3 mL·min⁻¹ regolandone la pressione.

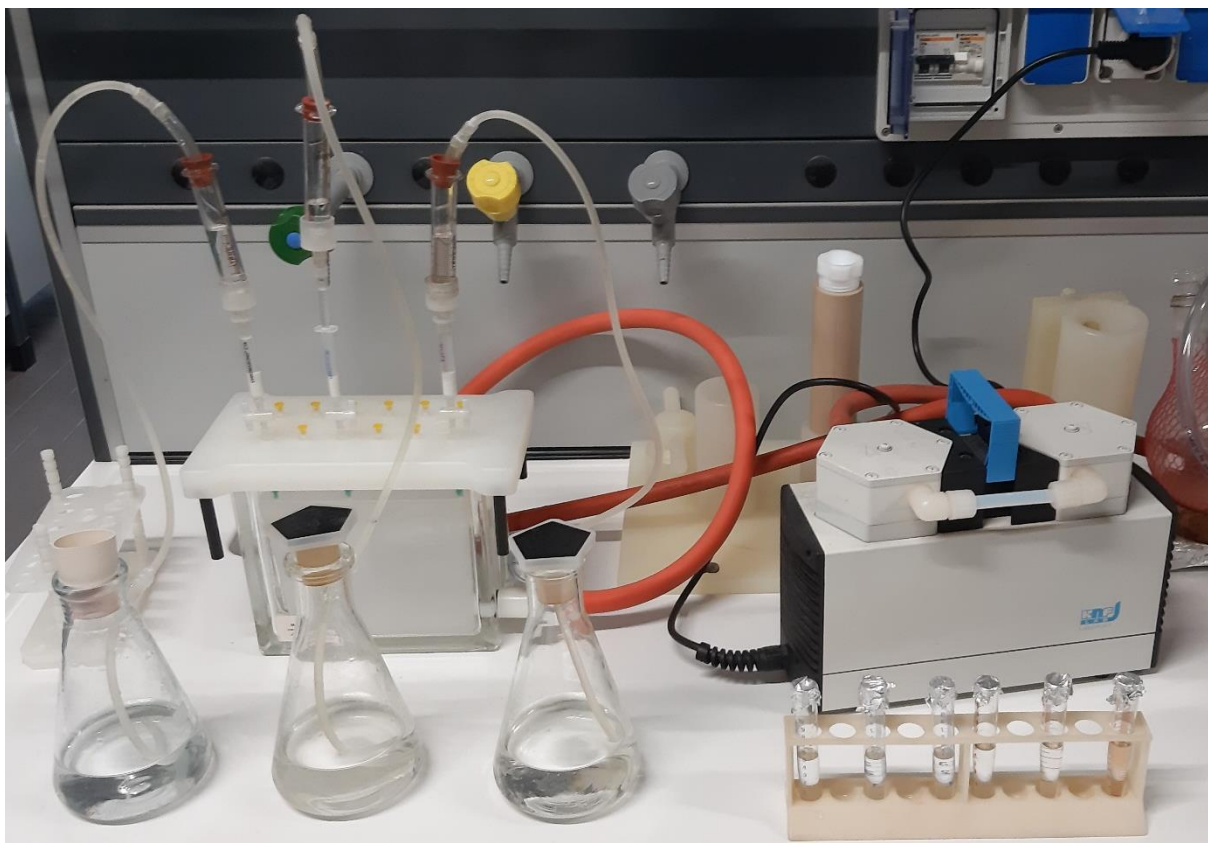


Figura 78. Fotografia rappresentativa del sistema di estrazione in fase solida nel quale le beute contenenti i campioni da estrarre sono collegati alle cartucce SPE interite in un collettore da vuoto con regolatore di pressione per il passaggio delle soluzioni.

La cartuccia è stata condizionata (conditioning) con 6 mL di MeOH (grado LC-MS) e 6 mL di H₂O (grado LC-MS) (equilibration) in successione, poi è stato caricato il campione e, senza portare la cartuccia a secco, si è passati alla procedura di lavaggio (clen-up) con 5.5 mL di H₂O + 0.5 mL di metanolo. Dopo il lavaggio, la cartuccia è stata portata a secco per dieci minuti in modo da eliminare eventuali interferenti. L'eluizione è avvenuta mediante l'utilizzo di 10 mL di metanolo con acido formico allo 0,1% (v/v) portando a secco 2 volte (5 mL x2). Degli eluati ottenuti sono state fatte diverse prove: portati a secco sia attraverso flusso d'azoto sia attraverso evaporatore rotante, ricostituiti con piccoli volumi di metanolo (250 o 500 µl) in modo da concentrare la soluzione da analizzare ed applicare un fattore di correzione che permetteva di concentrare gli analiti dal campione iniziale di 500 o 1000 volte. Dopo aver sviluppato un metodo di analisi HPLC-MS operante in modalità positiva e con un range di massa da analizzare ristretto agli analiti oggetto di indagine è stato osservato (facendo l'estrazione cromatografica EIC delle masse relative agli analiti) che alcuni antibiotici non riuscivano ad essere correttamente rilevati. In particolare, nelle prove di recupero, sono stati acquisiti segnali deboli durante la rilevazione di S e KZ, mentre nessun segnale è stato registrato per CT.

Per tale ragione si è scelto di utilizzare altri metodi e strumenti analitici, inoltre, per ottimizzare i protocolli di estrazione/analisi quali-quantitative e per ampliare la gamma di indagini chimiche sugli antibiotici, è stata preparata una miscela standard contenente i 58 antibiotici.

I seguenti antibiotici appartenevano a diverse classi: n.10 macrolidi: Josamicina, Spiramicina, Tilmicosina, Tilosina, Eritromicina, Gamithromycin, Neospiramicina, Oleandomicina, Tildipirosina, Tulathromycin; n.6 tetraciline: Clorotetraciclina, Doxiciiclina, 4-Ilortetraciclina, Epitetraciclina, Tetraciclina, Rolitetraciclina; n.17 sulfonamidici: Sulfamometossina, Sulfachloropyridazina, Sulfamethoxyipyridazine, Sulfaquinoxalina, Sulfamerazina, Sulfamethazine, Sulfathiazole, Sulfadimethoxine, Sulfachloropyridazine, Sulfadoxine, Sulfaclozine, Sulfaphenazole, Sulfamethoxazole, Sulfapyridine, Sulfabenzamide, Sulfamethoxazole, Sulfafurazole; n.15 chinoloni: Difloxacin, Enrofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Oxolinic acid, Mefluquine, Nalidixic acid, Danofloxacin, Enoxacin, Levofloxacin, Floxalolome, Marbofloxacin, Nadifloxacin, Orbifloxacin, Sarafloxacin; n.5 penicilline: Cloxacillina, Penicillina V, Penicillina G, Piperacillina, Amoxicillina; n.2 cefalosporina: Ceftriaxone, Cefazolina; n.2 aminoglicosidi: Gentamicina, Streptomina; n.1 glicopide: Vanycopein.

Per la taratura (con risposta lineare $R^2 > 0.99$) e per l'analisi della percentuale di recupero sono state utilizzate soluzioni standard nell'intervallo di concentrazione da 0.1 a 2 ng·mL⁻¹ preparate con la diluizione della miscela standard in acqua con acido formico allo 0,1% (v/v) (per tutti gli analiti i recuperi medi variavano dal 55% al 90%). Le deviazioni standard relative (RSD) su cinque repliche di controlli di qualità sono state inferiori al 10%. Per tutti gli antibiotici LOD e LOQ sono stati quantificati con il metodo IUPAC ed erano nel range da 0.01 a 0.1 µg·L⁻¹ per il LOD e da 0.05 a 0.5 µg·L⁻¹ per il LOQ.

Prima dell'iniezione, i campioni sono stati passati attraverso filtri a siringa (PTFE: 0.25 µm), mentre come fase mobile nelle analisi cromatografiche sono stati utilizzati metanolo e acqua di grado HPLC e acido formico di purezza 99.9%.

I campioni sono stati analizzati sia attraverso il sistema LC-MS/MS utilizzando un Thermo Fisher LC - Triple Quad MS/MS sia attraverso la spettrometria di massa ad alta risoluzione Orbitrap (Orbitrap-HRMS, Thermo Fisher, San Jose, CA, USA) connesso allo strumento in modalità di monitoraggio ionico positivo. Il Thermo Q-Exactive Orbitrap era dotato di una sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI) la cui tensione è stata impostata a 3.50 kV in modalità positiva mentre la temperatura capillare e la temperatura del vaporizzatore sono state impostate a 330 °C e 280 °C. Gli ioni precursori sono stati filtrati dal quadrupolo che operava in una finestra di isolamento di 1 m/z. La frammentazione dei precursori è stata ottimizzata come

energia di collisione normalizzata a tre step (NCE) (20, 35 e 45 eV).

La separazione cromatografica è stata effettuata attraverso una colonna Hypersil Gold (50 mm, 2.1 mm ID, 1.9 μm) utilizzando una fase mobile costituita da una miscela di (A) acqua con acido formico allo 0.1% (v/v) e (B) metanolo con acido formico allo 0.1% (v/v) con un flusso fisso di $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ operanti al seguente gradiente: solvente A al 95% fino a 1 min, portato al 10 % a 9 min per poi ritornare al 95% in 15 min.

Due transizioni MS/MS sono state acquisite per ogni composto, utilizzando la più sensibile (Q) per quantificazione e l'altra (q) per conferma.

I composti sono stati quantificati in una singola prova analitica e le transizioni di Multiple Reaction Monitoring (MRM) riportate in vari riferimenti sono state testate e ottimizzate per ciascun analita.

6.3.5 Conclusioni

I fenomeni di resistenza agli antibiotici nelle acque marine sono ormai ben documentati.

Le acque marine possono diventare una possibile fonte di resistenza agli antibiotici non solo per gli organismi marini selvatici e per le specie allevate nelle piante di maricoltura (di solito molluschi, spigole, orate o salmoni) ma anche per l'uomo. Infatti, possiamo acquisire resistenza agli antibiotici attraverso il consumo di specie marine commestibili, come pesci e molluschi, o attraverso il contatto diretto con l'acqua di mare. I nostri dati hanno mostrato che i campioni d'acqua raccolti in alcuni siti costieri della Sicilia prossimi ad attività umane, zone di balneazione e centri residenziali, contengono geni di resistenza agli antibiotici e che questi sono maggiormente presenti nei siti più inquinati.

I risultati di questo studio potrebbero essere un punto di partenza per ulteriori indagini, al fine di valutare la diffusione di batteri resistenti agli antibiotici nell'ambiente marino, i loro meccanismi di dispersione e i potenziali fattori coinvolti nel trasferimento genico orizzontale nel mezzo acquatico.

7. Contaminazione da metalli pesanti in uova e tessuti di *C. caretta*

Nel presente lavoro sono stati analizzati diversi tessuti di 9 individui di *C. caretta*, ritrovati spiaggiati lungo le coste di Messina, e 6 uova della stessa specie ottenute da campionamenti effettuati durante le attività di monitoraggio dei nidi condotte nell'Area Marina Protetta di Linosa.

7.1 Introduzione

L'inquinamento marino è aumentato nel corso degli anni e, sebbene ci si adoperi per contrastarlo, non è arrestabile nel breve tempo. Ciò è causato dalla crescita della popolazione umana e dal relativo aumento di produzione di rifiuti ed inquinanti generati delle diverse attività antropiche (sia industriali che domestiche).

A causa del loro ampio utilizzo e trasporto a lungo raggio da fiumi e aria, i metalli pesanti sono tra gli inquinanti più comuni nell'ecosistema marino e, nonostante il crescente numero di report ambientali ed accordi politici sia nazionali che internazionali, tale contaminazione continua a persistere [Yipel et al., 2017].

In particolare, riguardo gli elementi essenziali (naturalmente presenti sia nelle componenti biotiche e abiotiche degli ecosistemi), a causa dell'industrializzazione ne vengono rilasciate quantità innaturali che alterano l'equilibrio biologico naturale [Jerez et al., 2010]. Infatti, questi elementi, che vengono generalmente regolati all'interno degli organismi, possono essere tossici se presenti al di sopra di determinate soglie di esposizione [Jerez et al., 2010]. Invece, gli elementi non essenziali possono essere tossici anche a basse concentrazioni [Ross et al., 2017]. D'altra parte, i metalli pesanti si accumulano generalmente lungo la catena alimentare aumentando il loro potenziale ecotossicologico [Bucchia et al., 2015; Mattei et al., 2015; Yipel et al., 2017; Martínez-López et al., 2021]. Infatti, questi elementi, in base alle loro caratteristiche chimiche (ad es. lipofilia), tendono a bioaccumularsi e biodistribuirsi diversamente nei tessuti [Novillo et al., 2017] e, a differenza degli inquinanti organici come ad esempio i pesticidi, non sono biodegradabili.

Pertanto, risulta fondamentale adottare opportuni strumenti e strategie di biomonitoraggio che consentano di comprenderne lo status di inquinamento. Tra le specie sentinella che meglio rispecchiano la contaminazione di inquinanti sia organici [Savoca et al., 2018, 2021] che inorganici vi è la tartaruga marina *C. caretta*.

Questa specie è la più abbondante tra le tartarughe marine nel Mar Mediterraneo e in altre parti del mondo [Esposito et al., 2020] ed è in grado ad accumulare (da cibo, sedimenti e acqua) elevate quantità di contaminanti nei suoi tessuti. Inoltre, grazie a caratteristiche quali longevità,

dieta, lunga permanenza in foraggiamento e natura migratoria [Mattei et al., 2015; Novillo et al., 2017], *C. caretta* è considerata un bioindicatore ideale di buono stato ecologico marino [Yipel et al., 2017].

In particolare, lo studio dell'accumulo dei metalli pesanti in *C. caretta* risulta fondamentale per valutarne gli effetti potenzialmente tossici e stimare il tipo e grado di esposizione [Cardellicchio et al., 2000].

Questi possono essere tossici o sub-tossici in tutte le fasi di sviluppo delle tartarughe marine. Gli effetti tossici sistemici, ad esempio teratogenicità, citotossicità e genotossicità [Martínez-López et al., 2021], possono causare danni multipli nel sistema riproduttivo, immunitario e nervoso, possono influire sul comportamento e determinare carcinogenesi [García-Fernández et al., 2009]. Inoltre, i metalli pesanti possono agire da interferenti endocrini alterando l'equilibrio gli ormoni steroidei gonadici, surrenali e tiroidei [García-Fernández et al., 2009] ed essere causa di morte per alcune popolazioni particolarmente sensibili o vulnerabili.

Come altri inquinanti, possono contribuire alla diminuzione della capacità immunitaria e allo sviluppo di infezioni di varia natura come quelle prodotta da virus da che causano il fibropapilloma nelle tartarughe marine [da Silva et al., 2016], solitamente rilevate nelle zone costiere ad intensa attività umana e bassi tassi di rinnovamento dell'acqua [García-Fernández et al., 2009].

Le differenze nei profili di concentrazione nei diversi tessuti sono indice di differenti fonti di contaminazione e possono variare in funzione della dieta e dell'area geografica [Anan et al., 2001; Torrent et al., 2004]. In questo contesto, il Mediterraneo può essere considerato un hotspot di contaminazione in quanto è un bacino semichiuso circondato da 22 paesi le cui attività antropiche, insieme al traffico marittimo pesante, ne causano elevato inquinamento [Yipel et al., 2017].

Diversi studi nel Mediterraneo hanno riportato dati relativi sulle concentrazioni di questi inquinanti inorganici in *C. caretta* e discusso i loro potenziali effetti tossici [Storelli et al., 1998, 2005; Torrent et al., 2004; Storelli & Marcotrigiano, 2003; Franzellitti et al., 2004; Antoniou et al., 2004; Maffucci et al., 2005; Andreani et al., 2008; García-Fernández et al., 2009; Yipel et al., 2017; Novillo et al., 2017; Esposito et al., 2020; Martínez-López et al., 2021].

Sebbene così come ricercate tramite ICP-MS non siano sostanze, i metalli pesanti possono essere elementi essenziali o non essenziali per un organismo presentandosi spesso al suo interno come composti organometalli (sostanze in cui è presente un legame carbonio-metallo). Inoltre, benché la contaminazione da metalli pesanti non sia considerata emergente, i livelli registrati e gli effetti di questi inquinanti persistenti sono sempre di interesse molto attuale. Infine, in

aggiunta all'inquinamento ambientale da antibiotici quello da metalli pesanti innesca processi di co-selezione e aumenta anche il livello di tolleranza agli antibiotici grazie alla co-regolazione dei geni di resistenza [Seiler & Berendonk 2012].

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di determinare le concentrazioni di 18 metalli pesanti (V, Co, Cu, B, Mn, Zn, Fe, Se, As, Cr, Ni, Sn, Ba, Hg, Ag, Sb, Cd, Pb) in alcuni tessuti e uova di *C. caretta* del Mediterraneo per offrire uno screening istantaneo sui livelli di contaminazione presenti.

7.2 Risultati e discussione: analisi dei metalli pesanti essenziali e non essenziali

Nel presente lavoro sono stati determinati i livelli di concentrazioni di elementi essenziali (V, Co, Cu, B, Mn, Zn, Fe, Se, Cr, Ni, Sn) (Tabella 24) e non essenziali (As, Ba, Hg, Ag, Sb, Cd, Pb) (Tabella 25) in diversi tessuti (cervello, cuore, fegato, gonadi, grasso, reni e milza) e uova (tuorlo e guscio) di tartarughe marine *Caretta caretta*. Tutti i valori di concentrazione riportati nelle Tabelle 24 e 24 si riferiscono al peso secco (d.w.) del campione e l'acronimo BLQ si riferisce a valori al di sotto del limite di quantificazione così come riportato da Faust et al. [2014] e Morão et al. [2022]. Inoltre, in questo studio i livelli di concentrazione di altri lavori citati a fini di confronto e originariamente espressi in peso umido sono stati convertiti in peso secco supponendo una percentuale del contenuto di acqua per ciascun tessuto così come riportato nella review di Ross et al. [2017]. Tale trasformazione viene solitamente adottata in diversi lavori per favorire un confronto più immediato dei dati [García-Fernández et al., 2009; Novillo et al., 2017].

I risultati suggeriscono una certa biodistribuzione degli elementi nei diversi i tessuti, in particolare Hg, Ag, Sb, V, Cu, Mn, Fe, Se, Cr erano maggiormente presenti nel fegato, Co, Cd, As, Ni, Pb nei reni, Zn nel cuore, B nel guscio d'uovo e Ba nel tuorlo d'uovo.

➤ Metalli pesanti essenziali

A differenza di altri metalli pesanti è stato osservato che selenio, rame, ferro, zinco e manganese possono essere regolati dalle tartarughe *C. caretta* attraverso processi omeostatici in un equilibrio tra esigenze metaboliche e prevenzione degli effetti tossici [Maffucci et al., 2005; Andreani et al., 2008], mentre tracce di elementi come nichel, cromo, cobalto, stagno, boro e vanadio svolgono un ruolo essenziale nel metabolismo e nella crescita dei tessuti. Le concentrazioni ottimali variano sostanzialmente per le diverse specie, ma gli intervalli per questi micronutrienti sono di solito molto ristretti [Alloway, 2013].

Nel presente lavoro si è potuto constatare che i livelli di concentrazione variano a seconda

dell'elemento e del tessuto analizzato (Tabella 24).

Tabella 24. Concentrazione media ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) \pm deviazione standard e intervallo di concentrazione (minimo e massimo) rilevati per ogni tessuto ed elemento essenziale analizzato.

BLQ= below quantification limit: < LOQ.

Tissues		V	Co	Cu	B	Mn	Zn	Fe	Se	Cr	Sn	Ni
Brain (n=1)		BLQ	0.10	6.56	BLQ	1.19	BLQ	554.55	27.60	BLQ	BLQ	BLQ
Heart (n=5)	Mean	0.05	0.04	13.91	6.55	2.01	209.24	399.24	13.54	BLQ	BLQ	BLQ
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm			
	SD	0.04	0.02	2.39	7.49	0.28	31.74	203.35	3.42			
Liver (n=8)	Min	BLQ -	0.03	10.57-	BLQ	1.61	176.23	224.91	10.64-	BLQ	BLQ	BLQ
	-	0.10	-	17.13	-	-	-	-	19.16			
	Max		0.8		16.99	2.39	259.96	647.70				
Gonads (n=2)	Mean	0.46	0.18	64.57	5.24	8.63	127.11	4096.55	37.33	0.12	BLQ	BLQ
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm		
	SD	0.59	0.12	89.19	5.37	5.30	67.72	3510.14	19.28	0.35		
Fat (n=3)	Min	0.02	0.02	7.83	BLQ	2.49	60.17	379.38	12.58	BLQ	BLQ	BLQ
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Max	1.84	0.37	279.63	13.48	18.17	243.11	10572.81	76.90	0.99		
Spleen (n=2)	Mean	0.15	0.76	5.10	3.95	5.78	33.35	278.92	25.31	BLQ	BLQ	0.57
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm			\pm
	SD	0.03	0.42	0.32	0.19	6.04	47.16	10.59	11.63			0.81
Kidneys (n=3)	Min	0.13	0.47	4.88	3.82	1.51	BLQ	271.43	17.09	BLQ	BLQ	BLQ
	-	-	-	-	-	-	-	-	-			-
	Max	0.17	1.06	5.32	4.09	10.05	66.7	286.41	33.53			1.15
Spleen (n=2)	Mean	0.005	0.02	0.20	7.63	0.06	89.79	22.82	2.4	BLQ	BLQ	BLQ
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm			
	SD	0.009	0.04	0.34	2.82	0.09	82.79	15.34	1.54			
Spleen (n=2)	Min	BLQ	0.003	BLQ	5.31	BLQ	BLQ	6.34	1.15	BLQ	BLQ	BLQ
	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	Max	0.02	0.06	0.60	10.76	0.13	161.95	36.67	4.13			
Spleen (n=2)	Mean	0.12	0.03	3.15	1.53	2.00	196.10	594.03	15.80	0.12	BLQ	BLQ
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm		
	SD	0.12	0.01	0.59	2.17	1.99	155.94	414.72	1.00	0.17		
Kidneys (n=3)	Min	0.03	0.02	2.74	BLQ	0.59	85.83	300.77	15.09	BLQ	BLQ	BLQ
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Max	0.20	0.04	3.57	3.06	3.41	306.36	887.28	16.50	0.24		
Kidneys (n=3)	Mean	0.16	2.64	12.74	BLQ	5.61	100.97	205.86	25.04	BLQ	BLQ	0.70
	\pm	\pm	\pm	\pm		\pm	\pm	\pm	\pm			\pm
	SD	0.12	2.50	13.16		7.22	20.75	30.08	7.98			0.60
Kidneys (n=3)	Min	0.03	0.03	4.68	BLQ	1.06	83.68	172.28	19.47	BLQ	BLQ	BLQ
	-	-	-	-		-	-	-	-			-

	Max	0.26	5.01	27.93		13.94	123.98	214.95	34.19			1.05
Egg yolk (n=6)	Mean	0.05	0.02	3.83	BLQ	0.49	93.38	71.55	4.61	BLQ	BLQ	BLQ
	±	±	±	±		±	±	±	±			
	SD	0.04	0.01	0.67		0.20	9.13	23.60	1.50			
	Min	BLQ	0.01	2.66	BLQ	0.16	81.78	33.48	2.86	BLQ	BLQ	BLQ
	-	-	-	-		-	-	-	-			
	Max	0.10	0.03	4.54		0.77	104.92	100.44	6.62			
Egg Shell (n=3)	Mean	0.48	0.73	7.40	8.12	2.14	BLQ	118.08	4.35	BLQ	BLQ	BLQ
	±	±	±	±	±	±		±	±			
	SD	0.40	0.41	1.26	10.20	1.21		95.58	3.19			
	Min	0.20	0.39	6.03	BLQ-	0.97	BLQ	44.37	1.61	BLQ	BLQ	BLQ
	-	-	-	-	19.57	-		-	-			
	Max	0.93	1.18	8.50		3.39		227.42	7.86			

Come già mostrato in altri studi, **selenio** e **rame** tendono ad accumularsi maggiormente nel fegato ed i livelli medi di concentrazione riscontrati per questo tessuto nel presente lavoro (rispettivamente $64.57 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. e $37.33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) erano in linea o superiori a quelli riportati in precedenti lavori relativi a *C. caretta* del Mediterraneo [Franzellitti et al., 2004; Torrent et al., 2004; Storelli et al., 2005, Andreani et al., 2008; García-Fernández et al., 2009; Jerez et al., 2010; Yipel et al., 2017]. Invece, sempre nel fegato, il **ferro** aveva dei valori medi nettamente superiori (media: $4096.55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w., valore massimo $10572.81 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) rispetto al valore medio più elevato, registrato tra i suddetti lavori da Yipel et al. [2017] di $1650.86 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in d.w..

Sia il rame che il ferro svolgono ruoli cruciali nel trasporto di ossigeno, nella produzione energia e nell'attività enzimatica [Andreani et al., 2008]. Quando i livelli di Cu e di Fe sono in eccesso, i metalli sono immagazzinati nel fegato come forme non tossiche: Cu-metallotioneina [Suzuki et al., 2002] e Fe-ferritina [Sargent et al., 2005]. In questo modo gli organismi regolano i livelli di Cu e Fe anche per evitarne effetti tossici, osservati nel fegato di *Chelonia mydas* da Valdivia et al. [2007], tra i quali la produzione di radicali liberi di ossigeno, responsabili dell'ossidazione delle proteine, del DNA e dei lipidi [Andreani et al., 2008].

Lo **zinco** invece è essenziale per la struttura e la funzione di molte proteine e viene mantenuto costante dai meccanismi omeostatici [Cousins et al., 2006].

Nel presente studio i valori medi rilevati per lo zinco indicano che questo era maggiormente presente nel cuore ($209.24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), seguito da milza ($196.10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), fegato ($127.11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e reni ($100.97 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). I valori registrati per il cuore erano simili a quanto riportato da Andreani et al. [2008] per lo stesso tessuto analizzato in *C. caretta* ($186 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.).

Riguardo la milza, è stato osservato il valore massimo di Zn tra tutti i tessuti analizzati ($306.36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), mentre i valori medi ($196.10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), risultavano simili a quelli registrati da Storelli et al. [2005] ($199.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.).

Allo stesso modo, la concentrazione media di zinco nel fegato ($127.11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) era dello stesso ordine di grandezza di quella riscontrata da García Fernandez et al. [2009] ($107.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) i quali, rispetto ad altre ricerche analoghe [Storelli et al., 2005; Maffucci et al., 2005; Andreani et al., 2008; Jerez et al., 2010; Bucchia et al., 2015], hanno registrato i livelli più elevati.

Invece, nei reni sono stati ottenuti risultati simili ($100.97 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) a quelli di Maffucci et al. [2005] ($97 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) che hanno registrato i livelli più elevati tra tutte le ricerche degli autori sopramenzionati.

Come già osservato da Andreani et al. [2008], anche nel presente studio lo zinco era il metallo più abbondante nel tessuto adiposo (probabilmente associato a pigmenti responsabili del colore verdastro correlati a proprietà antiossidanti di prevenzione alla perossidazione lipidica [Tapiero & Tew, 2003]). Anche il **manganese** svolge diversi ruoli nei sistemi biologici, tuttavia elevate concentrazioni possono causare effetti tossici influenzando, ad esempio, le trasmissioni neuromuscolari [Antoniou et al., 2004]. Nella presente ricerca le concentrazioni medie rilevate per ogni tessuto erano simili a quelle di altri lavori [Antoniou et al., 2004; Andreani et al., 2008] ad eccezione di quella relativa alle gonadi che era superiore ($5.78 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) a quella registrata in Andreani et al. [2008] ($2.46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.).

Per questi elementi, sono assenti studi relativi a limiti di tossicità ma, considerando i livelli medi riscontrati nei diversi lavori come limiti fisiologici, ipotizziamo che le concentrazioni medie del presente studio, prossime ai suddetti livelli, non dovrebbero comportare rischi per la salute delle tartarughe marine.

Il **nicel** nei tessuti era sotto il limite di rilevazione ad eccezione di gonadi e reni (rispettivamente valori medi di 0.57 e $0.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). Questi risultati erano inferiori rispetto a quanto ritrovato in Turchia da Kaska et al. [2004] (valori medi di $9.63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nei reni e $11.56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ nel fegato) e nel Mar Adriatico del nord da Franzellitti et al. [2004] (valori medi di $15.10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nel fegato e $23.46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nel grasso). Allo stesso modo, nel nostro lavoro il nichel nelle uova era sotto il limite di quantificazione a differenza di quanto riportato in Turchia per *C. mydas* da Çelik et al. [2006] (concentrazioni medie nel guscio di $3.64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e da Alam & Brim [2000] e Stoneburner et al. [1980] in Florida nel tuorlo di uova di *C. caretta* (intervallo di concentrazione media rispettivamente di $0.50 - 0.67$ e $0 - 2.28 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). Queste differenze potrebbero essere dovute alla diversa contaminazione da Ni

negli ambienti di foraggiamento e di deposizione delle uova delle tartarughe adulte.

Benché il nichel risulti essere tossico e cancerogeno [Mondragón et al., 2021], ed alcuni suoi composti siano associati a danni ossidativi al DNA, alle proteine e all'inibizione delle difese immunitarie [Franzellitti et al., 2004], in questo studio i livelli di concentrazione riscontrati nei tessuti e nelle uova non destano particolari preoccupazioni.

Analogamente, il **Cromo** risultava sotto il limite di quantificazione per tutti i tessuti ad eccezione di fegato e milza che avevano entrambi un valore medio di $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.. Questi valori risultavano inferiori a quelli riscontrati in Turchia da Yipel et al. [2017] nei reni e nel fegato ($0.50 - 0.52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) di *C. caretta*. Invece, sempre in Turchia, in un altro lavoro sono state trovate concentrazioni medie di Cr più elevate sia per il fegato ($2.77 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) che per i reni ($2.06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) [Kaska et al., 2004]. Allo stesso modo, in alcuni individui trovati spiaggiati nelle coste pugliesi (Italia - Mar Adriatico del sud) la concentrazione media di Cr era $1.05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nel fegato e $1.57 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nei reni [Storelli et al., 1998].

Riguardo la presenza di Cr nelle uova, nel nostro studio le concentrazioni erano sotto il limite di quantificazione mentre, in Florida, i valori medi di Cr nel tuorlo risultavano nel range $1.04 - 1.71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [Stoneburner et al., 1980] e $0.51 - 3.00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [Alam & Brim, 2000].

Così come altri elementi essenziali, il **Cobalto**, anche se non viene prodotto dall'organismo, è considerato fondamentale a basse concentrazioni per i processi fisiologici e lo sviluppo degli animali [du Preez et al., 2018]. Nel presente studio i livelli medi più elevati sono stati riscontrati nei reni ($2.64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), nelle gonadi ($0.76 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e nei gusci d'uovo ($0.73 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). Questi valori sono paragonabili a quelli rilevati in media nei reni ($2.03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) di alcuni individui di *C. mydas* trovati moribondi sulle coste australiane [Van de Merwe et al., 2010b] nei quali il fegato ha mostrato valori più elevati ($5.17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) rispetto a quanto da noi riscontrato ($0.18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.).

Invece, sempre in Australia, individui apparentemente sani di *Natator depressus* mostravano livelli di cobalto nel sangue inferiori a $0.005 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [Ikonomopoulou et al., 2011].

Nel nostro lavoro, il tuorlo ha mostrato per il Co livelli di concentrazione di $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w., analogamente a quanto riscontrato in Florida per il tuorlo della stessa specie ($0 - 0.07 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) [Stoneburner et al., 1980]. Invece valori più bassi di Co sono stati riscontrati in Sud Africa per l'intero contenuto delle uova di *C. caretta* e *Dermochelys coriacea* (rispettivamente di 0.27×10^{-3} e $0.12 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) [du Preez et al., 2018]. Allo stesso modo in quest'ultimo lavoro sono stati trovati in media livelli inferiori di Co nei gusci delle uova di *C. caretta* e *D. coriacea* (rispettivamente di 0.64×10^{-3} e $0.54 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) [du Preez et al., 2018], rispetto a quanto da noi riscontrato ($0.73 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). Più recentemente, nelle uova di *D.*

coriacea provenienti da nidi di St. Kitts (USA), il cobalto non è stato rilevato [Dennis et al., 2020]. Analogamente in Messico, Cortés-Gómez et al. [2018] hanno mostrato livelli di Co sotto il limite di rilevazione per muscolo, cervello, ossa e uova (analizzate separatamente nelle 3 componenti: guscio, tuorlo e albume) in *Lepidochelys olivacea*. Inoltre, in quest'ultimo lavoro, i livelli medi di Co nel fegato ($1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) erano superiori a quelli registrati nel nostro studio, mentre nei reni risultavano inferiori ($0.35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) [Cortés-Gómez et al., 2018].

Per quel che riguarda **stagno** e **boro**, esistono pochi studi relativi alla loro presenza nei tessuti di *C. caretta*.

In particolare, per lo stagno non sono stati trovati studi relativi a tessuti o uova di *C. caretta*, tuttavia, per tutti i campioni analizzati nel nostro studio i livelli di concentrazione erano al di sotto il limite di quantificazione per cui ipotizziamo che non vi siano particolari preoccupazioni. Risultati analoghi sono stati osservati in Australia da Ikonopoulou et al. [2011] per sangue e uova di *Natator depressus*, mentre in Messico in *Eretmochelys imbricata* sono stati rilevati livelli di Sn nel sangue di $1.15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [Mondragón et al., 2021].

I livelli più elevati di boro sono stati trovati nel guscio d'uovo ($8.12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) seguiti dai tessuti di grasso ($7.63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), cuore ($6.55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e fegato ($5.24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). Il boro è un micronutriente essenziale per il mantenimento delle funzioni della membrana cellulare e per il metabolismo di altri elementi come calcio e magnesio e potrebbe avere indirettamente un ruolo fondamentale nello sviluppo [Cortés-Gómez et al., 2018], tuttavia viene ricercato nelle tartarughe marine solo in due lavori [Alam & Brim, 2000; Cortés-Gómez et al., 2018]. In particolare, i livelli medi di boro rilevati da Alam & Brim [2000] nel contenuto di alcune uova di *C. caretta* in Florida variavano da 4.90 a $11.73 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. ed erano leggermente superiori a quelli riscontrati nel nostro studio per il tuorlo ($3.83 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). Similmente, in Messico sono stati trovati valori medi di B in *L. olivacea* di $4.05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nel tuorlo e $10.49 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nel guscio [Cortés-Gómez et al., 2018]. In quest'ultimo studio, tuttavia le concentrazioni più elevate sono stata riscontrata nelle ossa ($16.25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w) e nel cervello ($52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w) mentre il fegato ha mostrato una media di poco superiore ($6.55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) a quella da noi riscontrata per lo stesso tessuto.

Anche per il **vanadio** sono poche le ricerche condotte su *C. caretta*.

Per quanto riguarda i tessuti degli individui adulti, la concentrazione media più elevata di V è stata riscontrata nel fegato ($0.46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), tuttavia confrontando i livelli misurati in tutti i tessuti analizzati con quelli di altre ricerche che hanno analizzato carapaci di *C. mydas* ($1.03-1.08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) [Barraza et al., 2019], o campioni di fegato ($4.27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), reni ($3.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), muscolo ($6.43 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e sangue ($5.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) [Faust et al., 2014], i nostri risultati

sembrano essere poco preoccupanti.

Riguardo le uova, la concentrazione media di V nel tuorlo era di $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w., mentre nel guscio di $0.48 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.. In Florida, nelle uova di *C. caretta*, questo elemento era sotto il limite di rivelazione [Alam & Brim, 2000], invece in Africa, guscio e tuorlo, hanno presentato una concentrazione media di $2.4 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. e $0.86 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [du Preez et al., 2018]. Sempre in Africa, nel guscio e nel tuorlo di uova di *D. coriacea* sono stati trovati rispettivamente livelli di $0.47 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. e $0.70 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [du Preez et al., 2018], mentre a St. Kitts in uova o embrioni della stessa specie la media era $2.01 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [Dennis 2020]. Infine, in Cina, tuorli e gusci di uova di *C. mydas* hanno mostrato rispettivamente livelli medi di $0.59 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w e $0.19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w [Lam et al., 2006].

➤ Metalli pesanti non essenziali

Cadmio, mercurio, arsenico, bario, piombo, antimonio e argento sono metalli pesanti non essenziali che destano grande preoccupazione a causa della loro potenziale tossicità e sono stati trovati a diversi livelli di concentrazione (Tabella 25).

Tabella 25. Concentrazione media ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) \pm deviazione standard e intervallo di concentrazione (minimo e massimo) rielvati per ogni tessuto ed elemento non essenziale analizzato. BLQ= below quantification limit: < LOQ.

Tissues		Ba	Hg	Ag	Sb	Cd	Pb	As
Brain (n=1)		7.06	0.11	BLQ	BLQ	0.51	BLQ	185.81
Heart (n=5)	Mean	BLQ	0.36	0.05	BLQ	1.90	BLQ	70.58
	\pm		\pm	\pm		\pm		\pm
	SD		0.10	0.04		0.45		30.03
	Min	BLQ	0.23	BLQ	BLQ	1.31	BLQ	41.47
-		-	-		-		-	
Max		0.45	0.1		2.38		106.86	
Liver (n=8)	Mean	0.52	1.05	0.45	0.02	10.21	0.12	77.27
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	SD	1.02	0.89	0.29	0.03	11.04	0.24	45.21
	Min	BLQ	0.18	0.12	BLQ	2.04	BLQ	35.15
-		-	-		-		-	
Max	2.70	2.88	0.94	0.08	34.60	0.67	161.06	
Gonads	Mean	BLQ	0.14	0.01	BLQ	8.14	BLQ	112.36
	\pm		\pm	\pm		\pm		\pm
	SD		0.08	0.01		5.55		65.19

(n=2)	Min	BLQ	0.09	BLQ	BLQ	4.21	BLQ	66.26
	-		-	-		-		-
	Max		0.20	0.02		12.06		158.46
Fat (n=3)	Mean	BLQ	0.04	BLQ	0.01	0.12	BLQ	32.15
	±		±		±	±		±
	SD		0.01		0.004	0.13		27.02
	Min	BLQ	BLQ -	BLQ	BLQ -	0.01	BLQ	6.17
	-		0.05		0.01	-		-
	Max					0.26		60.11
Spleen (n=2)	Mean	BLQ	0.25	0.03	BLQ	2.69	BLQ	58.13
	±		±	±		±		±
	SD		0.13	0.016		2.17		4.24
	Min	BLQ	0.16	0.02	BLQ	1.16	BLQ	55.13
	-		-	-		-		-
	Max		0.35	0.04		4.22		61.12
Kidneys (n=3)	Mean	BLQ	0.44	0.12	0.01	39.96	0.19	166.17
	±		±	±	±	±	±	±
	SD		0.36	0.18	0.01	41.86	0.32	74.74
	Min	BLQ	0.15	BLQ	BLQ	1.08	BLQ	108.31
	-		-	-	-	-		-
	Max		0.84	0.33	0.02	84.27		250.56
Egg yolk (n=6)	Mean	11.30	0.02	0.03	BLQ	0.02	BLQ	3.11
	±	±	±	±		±		±
	SD	6.54	0.01	0.01		0.003		1.85
	Min	3.18	BLQ	0.02	BLQ	0.02	BLQ	0.74
	-	-	-	-		-		-
	Max	18.21	0.02	0.05		0.03		4.62
Egg Shell (n=3)	Mean	1.86	BLQ	0.01	BLQ	BLQ	BLQ	0.89
	±	±		±				±
	SD	3.23		0.01				0.76
	Min	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.84
	-	-		-				-
	Max	5.59		0.02				1.67

Come riportato in altri studi il **cadmio** tende a bioaccumularsi maggiormente nei reni e nel fegato [Storelli et al., 1998; Maffucci et al., 2005; García-Fernández et al., 2009; Novillo et al., 2017]. Anche nel nostro studio i livelli di concentrazione di Cd più elevati sono stati rilevati, in ordine decrescente, nei reni, nel fegato e nelle gonadi (Figura 79).

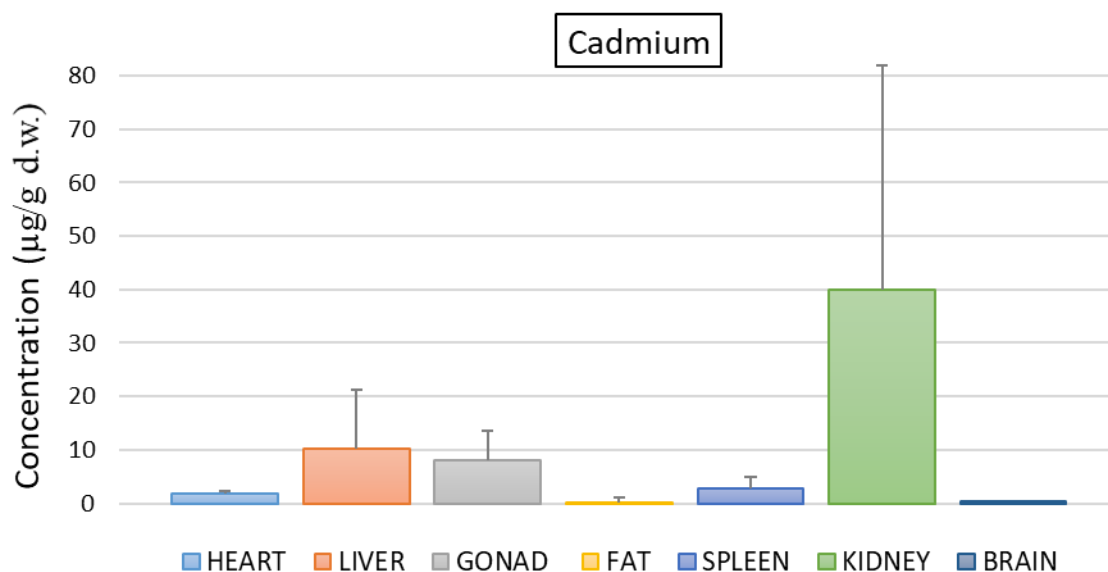


Figura 79. Concentrazione media e deviazione standard del cadmio nei tessuti di nove individui di *C. caretta*

La ragione di tale organotropismo nei reni risiede nel fatto che il Cd non svolge alcun ruolo noto nei sistemi biologici, ed è solo scarsamente escreto, con conseguente stoccaggio a lungo termine nei reni. Inoltre, si ritiene che, in caso di esposizione cronica, la concentrazione renale di cadmio (che verrebbe quindi scarsamente eliminato) sarebbe superiore a quella del fegato [García-Fernández et al., 2009].

Secondo quanto sopra riportato, nel nostro lavoro due delle tre tartarughe avrebbero subito un'esposizione cronica al Cd in quanto i reni presentavano livelli di concentrazione maggiori rispetto al fegato (34.52 µg·g⁻¹ d.w. nei reni contro 4.34 µg·g⁻¹ d.w. nel fegato e 84.27 µg·g⁻¹ nei reni d.w. contro 15.43 µg·g⁻¹ d.w. nel fegato) mentre per la terza tartaruga, i livelli di contaminazione sono più bassi e mostrano una differenza meno marcata (1.08 µg·g⁻¹ nei reni contro 2.04 µg·g⁻¹ d.w. nel fegato).

Riguardo le gonadi, sono pochi gli studi che hanno effettuato analisi in questo tipo di tessuto in *C. caretta* del Mediterraneo. Ad esempio, Andreani et al. [2008] hanno riscontrato concentrazioni medie di 1.3 µg·g⁻¹ d.w. contro il valore medio di 8.14 µg·g⁻¹ d.w. da noi registrato.

Questo dato risulta preoccupante considerando che, nella tartaruga d'acqua dolce *Chrysemys picta*, è stato osservato il trasferimento materno del cadmio dai tessuti gonadici alle uova [Rie et al., 2001]. A ciò si aggiunge che anche l'accumulo di Cd nel fegato, sito di sintesi delle proteine precursori del tuorlo d'uovo (vitellogenine), può contribuire alla contaminazione del tuorlo

attraverso il trasporto del Cd mediato dal flusso sanguigno dal fegato alle gonadi e quindi dell'embrione [Rie et al., 2001]. Nel presente lavoro, a dispetto dei valori elevati registrati per i diversi tessuti (in particolare nelle gonadi), non sono state rilevate tracce di Cd nel guscio d'uovo mentre nel tuorlo le concentrazioni erano molto basse ($0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), ciò non sorprende considerando che le uova non derivano dagli individui adulti dei quali sono stati analizzati i tessuti.

Le concentrazioni di Cd rilevate sono state simili a quelle riscontrate precedentemente in altri individui di *C. caretta* provenienti da altre aree del bacino del Mediterraneo [Storelli & Marcotrigiano, 2003; Storelli et al., 2005, Franzellitti et al., 2004; Kaska et al., 2004; Maffucci et al., 2005; García-Fernández et al., 2009], mostrando che, nel tempo, l'esposizione a questo metallo non è variata notevolmente.

Tuttavia, la deviazione nelle concentrazioni di cadmio all'interno di ogni tessuto implica che i livelli di questo metallo non possono essere regolati dalle tartarughe che di conseguenza rifletterebbero il livello di esposizione alle fonti di contaminazione, probabilmente determinato dall'ingestione di prede contaminate [Maffucci et al., 2005]. È quindi probabile che la contaminazione da Cd nelle tartarughe marine sia condizionata dall'area geografica in cui vivono [Storelli et al., 2005].

Riguardo gli effetti tossici, un esperimento di esposizione a cloruro di cadmio su una specie di tartaruga dolce (*Chrysemys picta*) ha suggerito che concentrazioni di cadmio di $11.59 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nel fegato e $21.17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nei reni erano abbastanza alti da influenzare negativamente anche la salute di tartarughe marine come *C. caretta* [Storelli et al., 2005].

In questo senso, le concentrazioni da noi rilevate per questi tessuti sono superiori e potrebbero aver determinato o determinare in futuro effetti avversi. Un altro studio ha suggerito possibili correlazioni tra elevate concentrazioni di Cd ($320 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nei reni e $49 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nel fegato) e abbassamento della capacità di risposta del sistema immunitario con conseguente insorgenza di parassitosi [García Fernández et al., 2009].

A dispetto della nota tossicità del cadmio per tutte le forme di vita a concentrazioni relativamente basse, dal punto di vista biomolecolare, l'accumulo di Cd nel tessuto renale potrebbe essere meno dannoso grazie alla presenza delle metallotioneine (MTs) che giocano un ruolo fondamentale nello stoccaggio e nella disintossicazione dei metalli come osservato da Andreani et al. [2008] che hanno trovato in *C. caretta* correlazioni positive tra i livelli di concentrazioni di Cu e Cd e relative MTs epatica e renale.

Generalmente, i livelli più alti di **mercurio** sono stati trovati nel fegato [Storelli et al., 1998, 2005; Maffucci et al., 2005; Esposito et al., 2020]. Anche se Hg è noto per essere

biomagnificato, grazie alla loro dieta a base di organismi quali bivalvi, gasteropodi, crostacei e celenterati che si trovano ad un basso livello trofico [Jerez et al., 2009], le tartarughe marine *C. caretta* hanno un basso apporto di Hg rispetto agli animali che hanno una dieta a base di pesce come i mammiferi marini in cui questo metallo può essere trovato a concentrazioni molto più elevate [Torrent et al., 2004].

Nel nostro studio, la più alta concentrazione di Hg è stata trovata nel fegato (media $1.05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w., valore massimo $2.88 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) seguito dai reni (media $0.44 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w., valore massimo $0.84 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). Quest'ultimo tessuto, in un altro lavoro condotto su *C. caretta*, era quello maggiormente contaminato e mostrava concentrazioni medie uguali alle nostre [Jerez et al., 2010]. La presenza di mercurio nei reni indica una maggiore esposizione ai sali inorganici di questo metallo, dal momento che, come organometallo, avrebbe affinità e livelli di concentrazione maggiori nel cervello ($0.11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) o nel grasso ($0.04 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) dovuti alla sua maggiore liposolubilità. In generale, i valori registrati erano in linea con quelli riscontrati in altri lavori condotti su *C. caretta* del Mediterraneo [Maffucci et al., 2005; Storelli et al., 2005; Jerez et al., 2010; Bucchia et al., 2015; Yipel et al., 2017; Esposito et al., 2020]. Inoltre, come osservato da Storelli & Marcotrigiano [2003], tali livelli di nei tessuti sembrano non essere così alti da influenzare la salute delle tartarughe marine.

Tuttavia, considerando che contaminazioni da questo metallo possono portare gravi disturbi al sistema nervoso centrale, endocrino ed immunitario delle tartarughe marine [Esposito et al., 2020], occorrerebbe investigare ulteriormente sugli effetti tossici del mercurio anche in relazione alla presenza di altri contaminanti [Camacho et al., 2013].

Tutti i tessuti analizzati hanno mostrato concentrazioni notevoli di **arsenico** con valori maggiori in ordine decrescente nel cervello ($185.81 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) seguito da reni ($166.17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), gonadi ($112.36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), fegato ($77.27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e cuore ($70.58 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) (Figura 80).

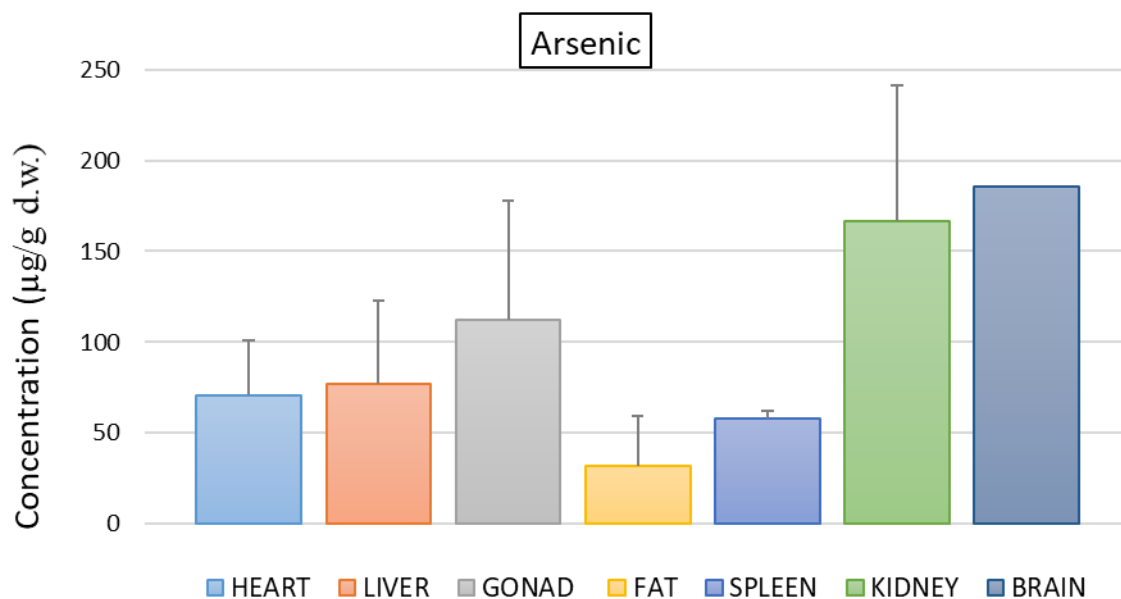


Figura 80. Concentrazione media e deviazione standard dell'arsenico nei tessuti di nove individui di *C. caretta*

Riguardo fegato e reni, i valori di As erano più elevati di quelli rilevati per gli stessi tessuti (rispettivamente 33.62 e 29.93 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) in un recente lavoro su individui di *C. caretta* arenati nei pressi di Murcia (Spagna) [Martinez-Lopez et al., 2021].

In *C. caretta*, alte concentrazioni di arsenico nei reni e nel sistema nervoso negli esemplari adulti possono essere indicative di esposizione cronica [Jerez et al., 2010], mentre alte concentrazioni nel fegato possono essere correlate direttamente al tipo di dieta (elevate ad esempio nei crostacei che rappresentano un elevato rischio di contaminazione) [Storelli & Marcotrigiano, 2003].

Anche se le informazioni sulle soglie di tossicità per l'arsenico nei rettili ed in particolare nelle tartarughe marine sono scarse [Talavera-Saenz et al., 2007], va tenuto conto che le forme inorganiche di arsenico, presenti solitamente dal 2 al 10%, sono quelle con la maggiore tossicità e tendono ad accumularsi maggiormente nel fegato [Storelli & Marcotrigiano, 2003; Martinez-Lopez et al., 2021].

Poiché l'arsenico organico (arsenobetaina, AB) e l'acido dimetilarsinico (DMA) sono le forme dominanti nella maggior parte delle specie marine, comprese le tartarughe, il rischio per questi animali dovrebbe essere basso, nonostante l'elevata presenza di arsenico nei loro tessuti [Martinez-Lopez et al., 2021].

Concentrazioni epatiche di arsenico superiori a 130 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ possono determinare degenerazioni epatiche diffuse in *C. caretta*, presumibilmente causate dall'arsenico inorganico [Torrent et al.,

2004]. Sulla base delle scarse conoscenze esistenti sulla tossicità dell'arsenico nelle tartarughe marine, i livelli medi riscontrati nel nostro studio sono di poco inferiori a quelli responsabili dei danni al fegato.

Tuttavia, le elevate concentrazioni di arsenico riscontrate nei tessuti delle tartarughe di questa zona del Mar Mediterraneo supportano l'ipotesi che quest'area possa essere un hotspot per l'inquinamento da arsenico.

Riguardo i restanti quattro gli elementi non essenziali: argento, piombo, antimonio e bario, quest'ultimo ha mostrato i livelli più elevati.

I valori di **bario** di più elevati sono stati trovati nel tuorlo (11.30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w., valore massimo 18.21 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) seguito dal cervello (7.06 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) dal guscio d'uovo (1.86 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e dal fegato (0.52 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), mentre in tutti gli altri tessuti le concentrazioni erano sotto il limite di quantificazione. Non sono presenti studi condotti nel Mediterraneo che ricercano tale elemento, invece, in un lavoro condotto in Florida, alcune uova di *C. caretta* provenienti da 6 nidi presentavano concentrazioni medie di Ba nel range: 2.14 – 3.16 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. con un valore massimo di 8.17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [Alam & Brim, 2000]. Nella stessa area le concentrazioni medie di Ba trovate all'interno delle uova di *C. caretta* provenienti da 4 nidi variavano da 2.09 a 6.87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [Stoneburner et al., 1980]. In Brasile, Souza et al. [2018] hanno osservato che i livelli di bario presenti all'intero dell'uovo (1.51 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e negli embrioni (2.29 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) di *C. caretta* erano molto simili a quelli riscontrati in *C. mydas* (1.57 e 4.11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. rispettivamente per contenuto dell'uovo ed embrioni) mentre nelle uova di *D. coriacea* provenienti da St. Kitts le concentrazioni medie erano 3.24 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. per il tuorlo e 4.44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. negli embrioni [Dennis et al., 2020].

I valori di bario riscontrati nei tuorli erano superiori ai lavori precedentemente citati [Stoneburner et al., 1980, Alam & Brim, 2000, Souza et al., 2018, Dennis et al., 2020].

Sebbene a concentrazioni relativamente basse, **l'argento** era presente in tutti i campioni ad eccezione di cervello e grasso, con il valore più elevato registrato nel fegato (0.45 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). Le concentrazioni rilevate erano inferiori a quelle registrate in Giappone nel fegato di *C. mydas* (3.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) ed *E. imbricata* (1.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) [Anan et al., 2001] ed in Brasile nel sangue di *C. mydas* (2.61 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) [da Silva et al., 2016]. Non vi sono studi effettuati su *C. caretta* ad eccezione di un lavoro condotto in Sud Africa [du Preez et al., 2018]. In quest'ultimo i livelli medi di Ag riscontrati nel contenuto delle uova di *C. caretta* e *D. coriacea* erano rispettivamente di 0.94×10^{-3} e 0.46×10^{-3} $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. mentre nel guscio erano rispettivamente di 2.3×10^{-3} e 0.33×10^{-3} $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.. Questi valori erano più bassi rispetto a quelli da noi rilevati nel tuorlo (0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e nel guscio (0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) di *C. caretta*.

Concentrazioni di argento dello stesso ordine di grandezza sono state trovate da Lam et al. [2006] ad Hong Kong nelle uova di *C. mydas* ($0.07 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nel tuorlo e $0.08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. nel guscio). Invece nel golfo di Guinea (Africa - Atlantico) in alcuni campioni di sangue di *C. mydas* i livelli di Ag erano inferiori ai limiti di rilevazione [Morão et al., 2022], mentre in Messico lo stesso tipo di campioni in *E. imbricata* mostravano una concentrazione media di Ag di $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w. [Mondragón et al., 2021].

Il **piombo** è stato rilevato solo nei reni ($0.19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e nel fegato ($0.12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) indicando che le matrici analizzate erano meno contaminate rispetto a quelle di altri studi [Storelli et al., 2005; García-Fernández et al., 2009; Novillo et al., 2017; Esposito et al., 2020]. Questi risultati confermano ulteriormente la diminuzione dell'inquinamento Pb nel Mediterraneo, dovuta alla limitazione del suo utilizzo come additivo nella benzina [Esposito et al., 2020]. Inoltre, le concentrazioni da noi rilevate nel fegato e nei reni non dovrebbero essere considerate tossiche in quanto altri autori [Storelli et al., 2005; Esposito et al., 2020] suggeriscono che per queste matrici i livelli soglia preoccupanti sono quelli $\geq 1.67 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.. Anche l'**antimonio** è stato rilevato in basse concentrazioni, in particolare, questo era presente solo nel fegato ($0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.), nel grasso e nei reni (entrambi di $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.). Invece, in Turchia sono stati registrati livelli più elevati per questo elemento nel tessuto renale di *C. caretta* ($2.35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) e *C. mydas* ($1.46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.) a differenza del tessuto epatico nel quale erano sotto il limite di rilevazione [Kaska et al., 2004].

7.3 Materiali e metodi

7.3.1 Area studio, campionamento e pretrattamento

Nove individui di *C. caretta* sono stati ritrovati morti lungo le coste di Messina. Durante le analisi necroscopiche, effettuate presso l'Ospedale Veterinario Didattico dell'Università di Messina (Centro di Primo soccorso per tartarughe marine), tali individui sono stati sezionati attraverso procedure standardizzate al fine di ottenere campioni dei seguenti differenti tessuti (non gli stessi tessuti per ogni individuo): fegato, gonadi, grasso, reni, cuore, cervello e milza.

Le uova invece sono state raccolte durante le attività di monitoraggio dei nidi nell'Area Marina Protetta delle "Isole Pelagie" nella spiaggia di "Pozzolana di Ponente" ($35^{\circ} 86' 33''$ N, $12^{\circ} 85' 48''$ E) di Linosa (Mar Mediterraneo). In particolare, le sei uova analizzate provenivano da tre differenti nidi (due per nido) e sono state raccolte nelle seguenti date: nido # 1 il 23.06.2019, nido # 2 il 05.07.2018 e nido # 3 il 05.10.2018.

La raccolta delle uova è stata effettuata nel rigoroso rispetto delle raccomandazioni del

"Ministero dell'Ambiente e Tutela del Territorio e del Mare" (Prot. n.17054 del 25/07/2018).

Tutti gli strumenti utilizzati erano costituiti da materiale plastico monouso o debitamente avvinato con diversi cicli di lavaggio in acqua.

Tutti i campioni (in totale 33) di tessuto e uova sono stati pesati, omogeneizzati (Figura 81) e conservati separatamente in provette sterili di polipropilene e congelati a -20°C fino alla loro liofilizzazione, di conseguenza i risultati di concentrazione riportati successivamente si riferiscono al peso secco.

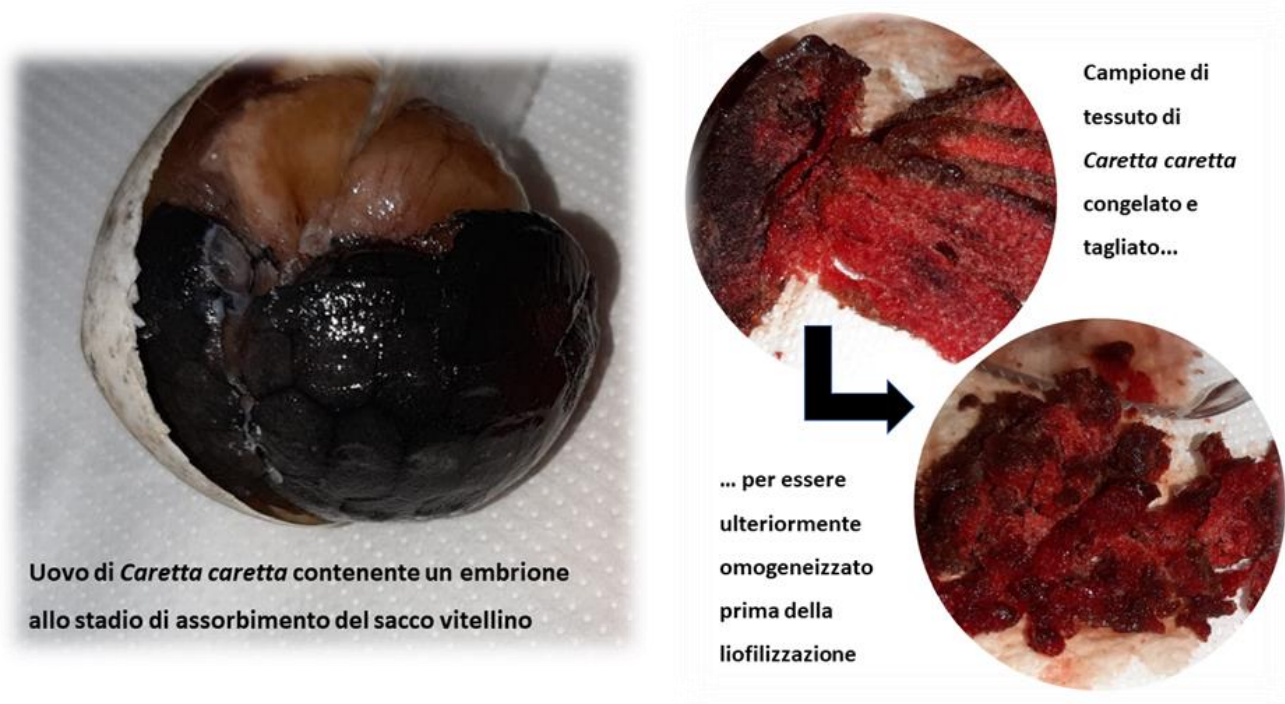


Figura 81. Campionamento ed omogenizzazione del campione.

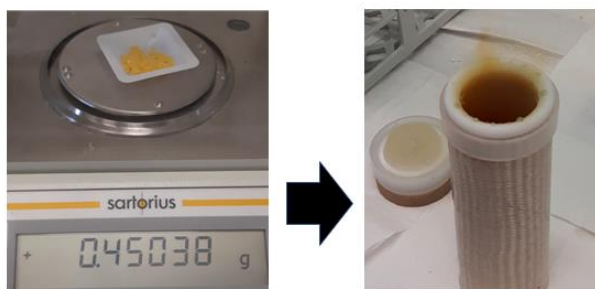
Una volta liofilizzati è stato registrato il peso di ogni campione al fine di ricavare la percentuale di acqua persa per tessuto durante il processo (Tabella 26).

Tabella 26. Rimozione media dell'acqua per ogni tessuto.

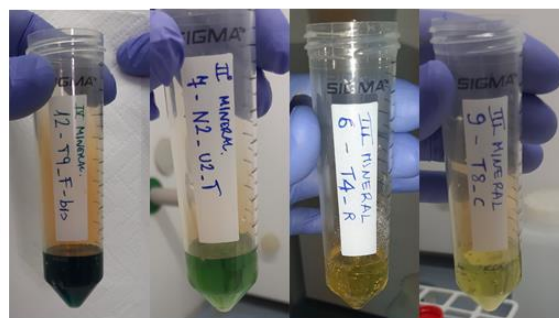
<i>Tessuto</i>	<i>% PERDITA MEDIA ACQUA</i>
CERVELLO	86.83
CUORE	81.91
FEGATO	70.98
GONADI	76.67
GRASSO	27.79
RENI	82.00
MILZA	78.56
TUORLO D'UOVO	62.85
GUSCIO D'UOVO	34.42

Successivamente, secondo il metodo EPA 3052, è stata eseguita la mineralizzazione acida dei campioni con il sistema a microonde Mars 5 della CEM equipaggiato con 12 contenitori (Figura 82): ~ 0.45 g di ogni campione liofilizzato sono stati digeriti completamente usando una miscela contenente 8 mL di acido nitrico ($\text{HNO}_3 \geq 69,0\%$, TraceSELECT™ per analisi in tracce, Fluka™) e 2 mL di perossido di idrogeno ($\text{H}_2\text{O}_2 \geq 30,0\%$, TraceSELECT™ Ultra per analisi in tracce, Fluka™) nei contenitori in teflon (materiale resistente agli acidi e ad elevate pressioni: fino a 200 psi) di seguito chiusi per evitare la perdita di elementi volatili, come As e Hg.

1. Al campione liofilizzato sono stati aggiunti 2 mL di H₂O₂ e 8 mL di NO₃ all'interno di vessel in teflon di seguito posto all'interno di un forno microonde per la mineralizzazione



2. Il risultato è una soluzione priva di residui solidi



3. Successivamente diluita a 20 mL con acqua milli-Q, filtrata ed analizzata attraverso ICP-MS

Figura 82. Schema dell'iter di mineralizzazione

Per ogni ciclo di mineralizzazione sono stati preparati campioni, bianchi e materiali certificati (quality control samples: DORM-4: Fish e NIST-1566b: Oyster Tissue).

Considerando che non vi erano differenze significative tra le risposte ottenute dai 2 materiali certificati è stato scelto uno di essi come riferimento (NIST-1566b) poiché vi erano un numero maggiore di elementi presenti.

La digestione acida è stata effettuata utilizzando un sistema di riscaldamento controllato da computer fino a 180 °C.

Dopo il raffreddamento, i campioni sono stati portati ad un volume di 20 mL con acqua Milli-Q (resistività > 18,2 MΩ cm), conservati a 4°C e filtrati con siringhe in PP munite di filtri in acetato di cellulosa (pore size: 0.45 μm, diameter: 25 mm, AISIMÔ). Infine, si è proceduto all'analisi dei campioni tramite spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (Agilent 7800 ICP- MS con autocampionatore SPS4).

7.3.2 Analisi dei metalli pesanti su campioni di *C. caretta*

La procedura analitica utilizzata è stata quella dell'EPA 200.8 integrata dalla EPA 6020b.

Per ogni misura sono state eseguite tre repliche.

Per diminuire l'effetto matrice è stata applicata la tecnica dell'aggiunta dello Standard Interno (SI). Tale standard interno è stato ottenuto diluendo opportunamente l'ICP-MS Internal

Standards Stock Solution 10 mg·L⁻¹ each of Bi, Ho, In, 6Li, Sc, Tb, Y, Rh in HNO₃ 2%.

Per ogni campione analitico, compreso quelli di taratura, è stato aggiunto (durante l'analisi attraverso la pompa peristaltica dell'ICP-MS) un volume costante di SI alla concentrazione di 200 ppb.

Per la correzione delle interferenze molecolari isobariche, che comunemente si riscontrano nell'analisi di matrici complesse, sono state utilizzate diluizioni appropriate di soluzioni di controllo delle interferenze: Interference Check Mix A contains 11 component: 21215 ppm of Cl-, 3000 ppm of Ca, 2500 ppm of Fe and Na, 2000 ppm of C, 1000 ppm of Al, K, Mg, P, S, 20 ppm of Mo and Ti; Matrix = 5% HNO₃/trHF; and Interference Check Mix B contains 11 component: 20 ppm of Cr, Co, Cu, Mn, Ni and V, 10 ppm of As, Cd, Se, and Zn, 5 ppm of Ag; Matrix = 5% HNO₃.

Per verificare eventuali contaminazioni del sistema di misura, sono state inserite all'interno della worklist diverse Rinse blank solution (1-5% HNO₃ and 0.3-1% HCl) e, nel caso specifico del mercurio, al fine di evitare l'effetto memoria dovuto alla sua presenza nei campioni sono state intervallate soluzioni di oro (200 ppb di Au in HNO₃ al 7%).

Le condizioni strumentali ICP-MS per la calibrazione (tuning dello spettrometro di massa) sono mostrate nella Tabella 27.

Tabella 27. Condizioni strumentali ICP-MS con e senza l'utilizzo del gas elio

IPC-MS Parameter	Condition	
Plasma		
RF power	1550 W	
Plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹	
RF matching	1.8 V	
Auxiliary gas flow rate	0.9 L min ⁻¹	
Nebulizer gas	0.99 L min ⁻¹	
Nebulizer pump	0.10 rps	
S/C temperature	2° C	
Cell		
Use Gas	yes	no
He Flow	4.2	0.0

	mL·min ⁻¹	mL·min ⁻¹
OctP Bias	-18 V	-8 V
OctP RF	200 V	190 V
Energy Discrimination	5 V	
QP		
Mass Gain	133	
Mass Offset	126	
Axis Gain	1.0008	
Axis Offset	0.01	
QP Bias	-13 V	-3 V
Lens		
Extract 1	0.0 V	
Extract 2	- 200 V	
Omega Bias	- 85 V	
Omega Lens	10.5 V	10.8 V
Cell Entrance	-40 V	-30 V
Cell Exit	-60 V	-50 V
Deflect	2.0 V	14 V
Plate Bias	-55 V	- 35 V

La taratura multielementare per la determinazione degli elementi è stata effettuata partendo dalle soluzioni standard dei singoli analiti (concentrazione iniziale: 1000 ppm).

I coefficienti di correlazione hanno mostrato un'eccellente correlazione lineare ($R^2 = 0.999$ per ciascun elemento). L'intervallo di calibrazione utilizzato è stato 0 - 160 ppb per tutti gli elementi ad eccezione del mercurio per il quale sono state scelte concentrazioni più diluite nell'intervallo da 0 a 4 ppb.

I controlli di qualità e precisione sono stati assicurati dall'analisi parallela di bianchi procedurali e dei materiali standard certificato che hanno mostrato RDS inferiori al 10%.

Le percentuali di recupero (R) per ogni elemento sono state ricavate attraverso l'analisi del CRM (materiale certificato di riferimento) secondo l'equazione 18

$$R = \frac{100 \times D_{MC} \times \left(\frac{V_{MC}}{W_{MC}} \right)}{C_{MC}} \quad (18)$$

D_{MC} = concentrazione rilevata del campione relativo al materiale certificato ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

V_{MC} = volume finale utilizzato per la mineralizzazione del campione relativo al materiale certificato (L)

W_{MC} = peso del campione del materiale certificato (g)

C_{MC} = concentrazione nominale dell'analita presente nel materiale certificato ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

In questo modo, per ogni elemento sono stati calcolati i fattori di correzione (CF): $100/R$.

Per verificare il livello di interferenze nei campioni e per la determinazione dei limiti di rilevazione (LOD) e quantificazione (LOQ) sono stati misurati 10 bianchi reagenti

Per ogni elemento, LOD e LOQ sono stati calcolati come la concentrazione equivalente alla media dei segnali della massa analitica selezionata +3 (LOD) o +10 (LOQ) la deviazione standard (di una serie di 10 misurazioni ripetute dei bianchi).

Considerando che i valori di LOD o LOQ, espressi in $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, variano in base al peso del campione, al volume finale della soluzione mineralizzata e al differente recupero di ogni elemento analizzato, queste variabili sono state prese in considerazione, secondo l'equazione 19, per la determinazione di LOD e LOQ relativi a ciascun campione analizzato ($\text{LOD}_{\text{Sample}}$ o $\text{LOQ}_{\text{Sample}}$) quindi espressi in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tabella 28).

$$\text{LOD}(or\ \text{LOQ})_{\text{Sample}} = \text{LOD}(or\ \text{LOQ}) \times \left(\frac{V_{\text{Sample}}}{W_{\text{Sample}}} \right) \times CF \quad (19)$$

V_{MC} = volume di solvente utilizzato per la mineralizzazione del campione (L)

W_{MC} = peso del campione (g)

CF= fattori di correzione (CF) ottenuto dalla percentuale di recupero

Tabella 28. Percentuale di recupero, fattore di correzione media dei LOD_{sample} e LOQ_{sample} calcolati per ogni campione e relativi ad ogni elemento

Analyte	Recovery percentage	Correction factor	Mean LOQ _{sample} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Mean LOD _{sample} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Cr	95.44	1.05	0.25	0.115
Ni	99.15	1.01	0.30	0.123
Cu	76.75	1.30	0.59	0.222
As	76.47	1.31	0.01	0.004
Se	84.97	1.18	0.04	0.014
Cd	80.10	1.25	0.01	0.002
Hg	103.94	0.96	0.02	0.008
Pb	80.89	1.24	0.24	0.083
Co	88.66	1.13	0.00	0.002
Mn	83.92	1.19	0.12	0.059
Ag	82.45	1.21	0.01	0.003
V	80.19	1.25	0.01	0.006
Zn	80.19	1.25	61.28	24.583
Fe	78.90	1.27	4.70	1.905
Sb	94.49	1.06	0.01	0.002
Ba	79.41	1.26	1.57	0.758
B	80.09	1.25	3.20	1.179
Sn	78.16	1.28	1.05	0.340

7.4 Conclusioni

In questo studio si è determinata la presenza di metalli pesanti suddivisi per elementi essenziali e non essenziali in tessuti e uova di *C. caretta*. Al fine di comprendere se i livelli riscontrati si discostavano da quelli solitamente registrati è stato fatto un confronto degli stessi con altri lavori simili presenti in letteratura. I risultati mostrano elevate concentrazioni di elementi tossici quali cadmio e arsenico in tutti i tessuti degli individui analizzati con livelli preoccupanti registrati in fegato reni e gonadi.

Gli effetti potenzialmente negativi dei metalli pesanti dispersi negli ecosistemi marini richiedono un biomonitoraggio continuo e attività di valutazione della loro distribuzione geografica e biologica.

In questo contesto, le indagini su *C. caretta* scaturiscono grande interesse sia per la conservazione di questa specie sia in quanto eccellenti bioindicatori dell'inquinamento da metalli pesanti permettendo di valutare lo stato di inquinamento attuale e sostenere adeguate misure di intervento.

8. Conclusioni

Durante il triennio di dottorato di ricerca ho affrontato e approfondito differenti argomenti connessi (i) alle indagini di chimica analitica ed ambientale di sostanze organiche persistenti quali i composti organofluorurati e gli ftalati, e (ii) a quelle relative agli effetti della diffusione ed esposizione ad alcune di esse su diverse scale di osservazione, dall'ecosistema acquatico ad alcune delle sue componenti. Riguardo il primo argomento, la ricerca si è concentrata sullo sviluppo e l'ottimizzazione dei metodi di estrazione (di analiti selezionati) ed analisi di matrici organiche complesse (acque, sedimenti, tessuti) contaminate e sul trattamento di alcune di queste per il tramite di tecniche green di purificazione fotochimica.

Il secondo argomento parallelo e consequenziale al primo si rivolge all'impatto ambientale di tali sostanze e alle ricadute sui processi fisiologici degli organismi ad esse esposti.

Per entrambi gli argomenti il filo conduttore è costituito dallo *studio della biodistribuzione di sostanze biologicamente attive in organismi acquatici*.

In tale lavoro, gli aspetti relativi sia alla comprensione dei meccanismi interspecifici di base di bioaccumulo e di effetto, che alla più ampia visione dell'incidenza negativa delle sostanze oggetto della trattazione, sono stati ampiamente scandagliati in letteratura, indagati sul campo e mediante esperimenti in laboratorio. È stato quindi esplorato lo stato dell'arte relativo alle sostanze biologicamente attive dalla loro fonte di origine (ad es. plastiche) al loro destino ambientale con particolare attenzione all'impatto sugli organismi acquatici.

In questo contesto ho cercato di rispondere attraverso gli studi effettuati ad alcune domande di seguito affrontate e discusse.

Innanzitutto, va premesso che, sia da ricerche in letteratura che sperimentali, è emerso che la plastica (compresa la porzione invisibile per dimensioni e poiché celata sotto la coperta blu del mare) è il maggiore detrito antropogenico degli oceani e costituisce una delle principali fonti e vettore di inquinanti. Tra questi ultimi destano particolare attenzione le sostanze contaminanti emergenti come gli antibiotici e gli inquinanti organici persistenti (POPs) come i noti distruttori endocrini: composti poli- e perfluorurati (PFCs) e gli esteri ftalici (PAEs). A questo proposito è risultato necessario ricercare organismi modello al fine di effettuare studi relativi al biomonitoraggio e ai potenziali di bioaccumulo (specifici delle diverse sostanze e specie) per la valutazione degli effetti biomolecolari che comporta l'esposizione a tali composti.

Una volta scelti i bioindicatori si è rivelato fondamentale sviluppare e applicare tecniche di estrazione (ad es. solido-liquido o in fase solida), di analisi chimica (HPLC/MS, GC/MS) e biomolecolare (PCR). In questo modo è stato possibile effettuare indagini ed elaborazioni volte ad offrire una più chiara panoramica sull'incidenza e sulle conseguenze tossicologiche relative

alle sostanze oggetto della ricerca.

I risultati ottenuti dalle ricerche effettuate dimostrano che i composti organofluorurati e gli esteri ftalici **si bioaccumulano**. In particolare, abbiamo osservato come uno degli esponenti più rilevanti della classe dei PFCs ossia l'acido perfluoroottanoico (PFOA) sia stato registrato con elevata frequenza e livelli concentrazione nel riccio *Paracentrotus lividus* sia durante rilevazioni effettuate in ambiente naturale che durante esperimenti di esposizione condotti in condizioni controllate (elevata bioaccumulabilità del PFOA mostrata dal fattore di bioconcentrazione: BCF). Similmente, per sei dei più comuni PAEs utilizzati con plasticizzanti sono stati rilevati significativi valori di uptake (mostrati dal fattore di accumulo biota-sedimento: BSAF) nella macroalga *Ulva lactuca* esposta attraverso esperimenti di laboratorio a sedimenti contaminati. Inoltre, per gli stessi ftalati sono stati trovati preoccupanti tassi di contaminazione nei campioni relativi alla tartaruga marina *Caretta caretta*.

Contestualmente è stato possibile osservare che sia il PFOA che i PAEs si **biodistribuiscono** in maniera specifica in base alla natura della molecola e del tessuto/organismo coinvolto. Nei ricci di mare il PFOA è stato riscontrato in misura maggiore nel fluido celomatico e nelle gonadi, invece nelle tartarughe marine e nelle loro uova, è stato osservato che gli ftalati erano presenti in tutti i tessuti degli adulti e delle uova; in particolare i PAEs più lipofili si riscontravano specialmente nei campioni con una maggiore percentuale di grasso.

In questi studi è stato quindi possibile individuare dei sistemi di **biomonitoraggio** ambientale non distruttivi.

Infatti, per quanto concerne gli ftalati in *C. caretta* sarebbe possibile asportare piccoli campioni di grasso dall'adulto o analizzare le uova non schiuse che altrimenti si deteriorerebbero; tuttavia, per una valutazione più ristretta dello status di inquinamento di un'area *U. lactuca* si è rivelata un modello ideale. Allo stesso modo per il PFOA in *P. lividus*, attraverso prelievi del fluido celomatico, è possibile determinare se un sito è potenzialmente inquinato o meno da PFCs.

Questi echinodermi, infatti, accumulano facilmente tale sostanza con conseguenze potenzialmente negative che sono state poste sotto attenzione durante alcuni esperimenti in laboratorio.

Infatti, esponendo individui adulti di *P. lividus* al PFOA è stato osservato che questa sostanza ha **effetti negativi** sia sugli **adulti** (perdita delle spine e morte) sia sulla loro **prole** (embrioni) la cui esposizione indiretta/parentale ha determinato l'insorgere di anomalie di sviluppo e malformazioni di varia natura e grado. Gli **effetti tossicologici** osservati non si sono limitati solo alle osservazioni morfologica durante lo sviluppo degli embrioni o all'effetto e letale dose-dipendente negli adulti ma anche a quelli biomolecolari. Infatti, dall'analisi del profilo di

espressione di alcuni geni marker sia nelle gonadi che negli embrioni è stato registrato che il PFOA altera la funzione di alcuni pathways fisiologici (coinvolti nello sviluppo, nell'omeostasi o nei processi di detossificazione). Relativamente agli ftalati, potenziali ricadute sulla prole sono state osservate dal punto di vista chimico anche sulle uova della specie protetta *C. caretta* che hanno mostrato un potenziale trasferimento di origine materna degli ftalati attraverso vitellogenesi. Questo è stato ipotizzato sia grazie a ricerche di letteratura sia attraverso prove in laboratorio dove è stato simulato un possibile processo di trasferimento degli ftalati utilizzando un sistema composto da acqua e guscio d'uovo.

Le scoperte scientifiche relative agli effetti biomolecolari di queste sostanze pericolose non sono al loro epilogo; ciò che precauzionalmente è doveroso affrontare è la ricerca di una possibile soluzione al loro impatto. Purtroppo, anche l'utilizzo di alternative alle sopramenzionate sostanze è ben lungi dall'essere esaustivamente innocuo.

Diversamente, tra i possibili rimedi sostenibili vi è il biorisanamento attraverso l'utilizzo non invasivo di organismi bioaccumulatori (animali o vegetali) che rimuovono gli inquinanti dall'ambiente concentrandoli nelle loro matrici organiche. Queste ultime, come la biomassa algale, possono essere ripulite a loro volta dai composti accumulati attraverso metodi green, come osservato durante il trattamento con radiazioni UV (degradazione fotoindotta dei PAEs) in *U. lactuca*.

Allo stesso modo, le indagini sui contaminanti emergenti come gli antibiotici e i geni di resistenza così come quelle relative ai ben noti metalli pesanti hanno mostrato quanto sia ormai comune la loro presenza nell'ambiente. Questa pone ulteriori interrogativi sulle nuove soluzioni da adottare che prevenano le ricadute ambientali per le quali sicuramente occorre operare attraverso il controllo delle fonti di contaminazione. In questo modo la ricerca e le sue scoperte scientifiche favorirebbero politiche e regolamentazioni di sostenibilità ambientale al fine ultimo di migliorare la qualità della vita degli ecosistemi e delle sue componenti.

9. Appendice

Tabella 1. Dataset dei livelli di PFOA in *Paracentrotus lividus*

<i>P. lividus</i> Specimen #	Sex	Size (cm)	[PFOA] _{CF} (ng·g ⁻¹)	[PFOA] _{CC} (ng·g ⁻¹)	[PFOA] _{Mix} (ng·g ⁻¹)	[PFOA] _G (ng·g ⁻¹)	[PFOA] _{GoM} (ng·g ⁻¹)	[PFOA] _{Water} (ng·L ⁻¹)	Sampling Site	[PFOA] _{TOT} (ng·g ⁻¹)
1	Male	3.5	4	6		3	3	2	A	4
2	Male	3.5	4	3		5	5	2	A	4
3	Male	3	4	3		1	1	2	A	3
4	Undetermined	3	7	6		602	602	2	A	49
5	Male	3.5	0	1		11	11	2	A	2
6	Male	3.5	4	3		4	4	2	A	4
7	Male	3.8	4	37		4	4	2	A	10
8	Male	3	4	3		15	15	2	A	5
9	Male	3.3	0	3	5		5	2	A	3
10	Male	3	0	7		3	3	2	A	1
11	Female	3.2	4	1		4	4	2	A	3
12	Undetermined	3	4	1		1	1	2	A	3
13	Undetermined	3	0	1		4	4	2	A	1
14	Undetermined	3.4	4	3		1	1	2	A	3
15	Undetermined	3	4	3	5		5	2	A	4
16	Undetermined	3	0	0		0	0	2	A	0
17	Undetermined	3.1	0	0		0	0	2	A	0
18	Undetermined	3.2	0	0		0	0	2	A	0
19	Undetermined	3.4	0	0		0	0	2	A	0
20	Undetermined	3.6	0	0		0	0	2	A	0
21	Undetermined	3.1	0	0		0	0	2	A	0
22	Undetermined	3.2	0	0		0	0	2	A	0
23	Undetermined	3.2	0	0		0	0	2	A	0
24	Male	3.3	0	0		0	0	2	A	0
25	Female	4.5	0	235		0	0	2	A	15
26	Female	4.3	0	21		0	0	2	A	1
27	Male	3.3	0	0	0		0	2	A	0
28	Female	3.3	0	0		0	0	2	A	0
29	Male	3.7	0	0		0	0	2	A	0
30	Male	3.5	0	250		0	0	2	A	25
31	Male	3.6	2500	0	0		0	2	A	1034
32	Male	3.4	10	0		0	0	2	A	6
33	Female	3.8	0	40	0		0	2	A	4
34	Male	3.9	0	0	0		0	2	A	0
35	Male	3.1	0	147	0		0	2	A	23
36	Undetermined	3.3	0	0		0	0	2	A	0
37	Undetermined	3.3	0	0	0		0	2	A	0

38	Undetermined	3.7	0	0	0		0	2	A	0
39	Male	3.2	0	0	0		0	2	A	0
40	Undetermined	3.1	0	0	0		0	2	A	0
41	Undetermined	3	0	0	0		0	2	A	0
42	Undetermined	3	0	0	0		0	2	A	0
43	Undetermined	3.1	0	0		0	0	2	A	0
44	Male	3.4	0	0		0	0	2	A	0
45	Female	3	0	0		0	0	2	A	0
46	Undetermined	3.4	0	165		40	40	6	B	69
47	Undetermined	3.5	296	346		92	92	6	B	277
48	Undetermined	3.3	7	188	0		0	6	B	15
49	Undetermined	3.3	0	196	0		0	6	B	8
50	Undetermined	3.4	46	272		0	0	6	B	58
51	Undetermined	3.4	0	629	0		0	6	B	132
52	Undetermined	3.3	104	182	0		0	6	B	75
53	Undetermined	3.3	25	418	0		0	6	B	102
54	Undetermined	3.4	39	480		153	153	6	B	75
55	Male	4	18	31		0	0	6	B	14
56	Undetermined	3.4	0	0		0	0	6	B	0
57	Undetermined	5.1	3029	97		31	31	6	B	2672
58	Male	5	21	0		19	19	6	B	18
59	Female	4	18	57		0	0	6	B	21
60	Undetermined	3.2	0	6		23	23	6	B	4
61	Undetermined	3.5	161	0		121	121	6	B	143
62	Male	4.2	0	10		147	147	6	B	29
63	Female	4	11	1		42	42	6	B	26
64	Female	3.4	0	0		334	334	6	B	60
65	Undetermined	3.2	0	38		292	292	6	B	74
66	Undetermined	3.4	107	196	375		375	6	B	206
67	Undetermined	3	82	387		123	123	6	B	132
68	Undetermined	3	82	181	15		15	6	B	74
69	Undetermined	3.2	36	82	750		750	6	B	258
70	Female	3.1	11	74		266	266	6	B	138
71	Undetermined	3	7	4		73	73	6	B	31
72	Undetermined	3.4	136	476	480		480	6	B	338
73	Undetermined	3.5	0	1	545		545	6	B	208
74	Undetermined	3	0	0		25	25	6	B	4
75	Female	3	293	179		11	11	6	B	72
76	Male	3.7	0	0	0		0	6	B	0
77	Undetermined	4.1	0	26	185		185	6	B	58
78	Undetermined	3.9	0	0	300		300	6	B	125
79	Male	3.7	32	204		74	74	6	B	68

80	Male	4.1	61	422		67	67	6	B	87
81	Female	3.9	29	266		93	93	6	B	70
82	Undetermined	3.7	82	153	73		73	6	B	88
83	Female	3.8	54	422		97	97	6	B	105
84	Female	3	186	550		0	0	6	B	137
85	Undetermined	3.5	21	279		342	342	6	B	120
86	Undetermined	3.4	64	503		1129	1129	6	B	267
87	Female	3.3	121	400		763	763	6	B	269
88	Female	3.3	14	90		1160	1160	6	B	183
89	Male	3.5	0	147		22	22	6	B	16
90	Male	3.4	36	94		507	507	6	B	145

Tabella 2a. Summary

Factors (F)	Eigenvalue	% Variance
1	2.89326	57.865
2	0.942043	18.841
3	0.625781	12.516
4	0.44039	8.8078
5	0.0985259	1.9705

Tabella 2b. Factor loadings

	F1	F2	F3	F4	F5
Size	0.18696	0.97175	0.10799	0.056867	0.076485
CF	0.48325	-0.036288	-0.38963	-0.70029	0.35061
CC	0.47114	-0.10531	-0.43496	0.70933	0.27312
GoM	0.43382	-0.20271	0.80341	0.038971	0.35175
TOT	0.56687	-0.046892	0.043214	-0.041126	-0.82031

Tabella 2c. Scores

Observations	F1	F2	F3	F4	F5
1	-0.47576	0.30952	-0.13722	-0.11856	0.1953
2	-0.51129	0.29973	0.097432	-0.27503	0.19151
3	-1.0155	-0.89155	-0.41524	-0.36382	0.01614
4	0.89839	-1.4581	1.3437	-0.31726	0.017777
5	-1.0343	0.31117	0.7455	0.09109	0.13721

6	-0.54399	0.31501	0.036861	-0.27796	0.16499
7	0.23693	0.90622	-0.27082	0.40388	0.16978
8	-0.53473	-1.0748	0.28381	-0.33813	0.16265
9	-1.0437	-0.16428	0.34199	0.24717	-0.035656
10	-1.3188	-0.93605	-0.018472	0.4096	0.18745
11	-0.88259	-0.40473	0.072279	-0.51972	0.11368
12	-1.1496	-0.86158	-0.29144	-0.56571	-0.061598
13	-1.547	-0.8948	0.30327	0.0094097	0.064427
14	-0.81497	0.15092	-0.29939	-0.30281	0.098192
15	-0.75914	-0.98855	-0.045737	-0.35042	0.09011
16	-2.154	-0.71467	-0.12167	-0.20505	0.019193
17	-2.102	-0.44459	-0.091654	-0.18925	0.04045
18	-2.0513	-0.18102	-0.062363	-0.17382	0.061196
19	-1.9534	0.3278	-0.005816	-0.14405	0.10124
20	-1.8599	0.814	0.048217	-0.1156	0.13951
21	-2.102	-0.44459	-0.091654	-0.18925	0.04045
22	-2.0513	-0.18102	-0.062363	-0.17382	0.061196
23	-2.0513	-0.18102	-0.062363	-0.17382	0.061196
24	-2.0018	0.076349	-0.03376	-0.15876	0.081453
25	0.31012	2.4712	-0.65429	1.5368	-0.16028
26	-0.77958	2.2144	-0.31765	0.86204	0.34153
27	-2.0018	0.076349	-0.03376	-0.15876	0.081453
28	-2.0018	0.076349	-0.03376	-0.15876	0.081453
29	-1.8146	1.0492	0.074358	-0.10183	0.15803
30	0.028806	0.26302	-0.89938	1.4169	-0.51286
31	1.8203	0.52357	-1.2907	-2.9087	-1.1992
32	-0.87385	0.24279	-0.41982	-0.99653	-0.23919
33	-0.62412	1.0835	-0.53072	0.96227	-0.026391
34	-1.7269	1.505	0.12501	-0.075156	0.1939
35	-0.29056	-0.73057	-0.91981	1.205	-0.62146
36	-2.0018	0.076349	-0.03376	-0.15876	0.081453
37	-2.0018	0.076349	-0.03376	-0.15876	0.081453
38	-1.8146	1.0492	0.074358	-0.10183	0.15803

39	-2.0513	-0.18102	-0.062363	-0.17382	0.061196
40	-2.102	-0.44459	-0.091654	-0.18925	0.04045
41	-2.154	-0.71467	-0.12167	-0.20505	0.019193
42	-2.154	-0.71467	-0.12167	-0.20505	0.019193
43	-2.102	-0.44459	-0.091654	-0.18925	0.04045
44	-1.9534	0.3278	-0.005816	-0.14405	0.10124
45	-2.154	-0.71467	-0.12167	-0.20505	0.019193
46	0.83095	-0.29797	0.40095	1.3228	-0.41936
47	2.8697	-0.28331	-0.48004	-0.39649	0.24018
48	0.2369	-0.24791	-1.307	0.60782	-0.043251
49	-0.3957	-0.20043	-0.93287	1.3377	-0.17113
50	1.1185	-0.072237	-1.6531	0.10268	-0.18284
51	0.5934	-0.058466	-1.058	1.6391	-1.0568
52	1.2486	-0.32612	-1.7565	-0.30661	-0.2081
53	1.1623	-0.34404	-1.6344	0.40322	-0.46964
54	2.1612	-0.52169	-0.045291	0.39875	0.4885
55	0.3964	1.4647	-0.97135	-0.10568	0.059414
56	-1.9534	0.3278	-0.005816	-0.14405	0.10124
57	4.2202	3.0975	-0.6322	-1.4202	-0.27024
58	0.7442	3.3499	0.8416	-1.0046	0.19745
59	0.61325	1.4306	-1.0698	0.060154	-0.021196
60	-0.67698	-0.56696	0.67851	0.41314	0.12266
61	1.4698	-0.027968	0.75616	-1.8772	-0.22648
62	0.66248	1.5576	1.4981	0.67626	-0.067333
63	0.58319	1.2645	0.87222	-0.7078	-0.0087289
64	0.18221	-0.24996	2.0091	-0.12962	-0.63421
65	0.82397	-0.91053	1.2579	0.90155	-0.36234
66	2.6479	-0.59743	0.24318	-0.20376	0.30184
67	2.2001	-1.5619	-0.32144	0.012792	0.2598
68	1.5341	-1.3449	-0.87814	-0.22965	0.097392
69	2.3152	-1.1129	0.77796	-0.11441	-0.0029933
70	1.6299	-1.2519	0.62351	0.21867	-0.13775
71	0.33834	-1.2579	0.69779	-0.44047	-0.15345

72	3.05	-0.67135	0.13207	-0.032567	0.28758
73	0.77854	-0.10216	2.0998	0.070781	-0.93973
74	-1.1418	-1.0232	0.99336	-0.18358	-0.12594
75	1.7698	-1.342	-1.2114	-0.66682	0.27991
76	-1.8146	1.0492	0.074358	-0.10183	0.15803
77	1.0161	1.2724	1.4037	0.91602	-0.21024
78	0.58231	0.9203	2.119	-0.076443	-0.83613
79	1.9351	0.30245	-0.017393	0.24821	0.34941
80	2.4421	1.1563	-0.19436	0.29088	0.50047
81	2.0997	0.72895	0.079686	0.38733	0.42056
82	2.1613	0.2941	-0.14001	-0.15371	0.37442
83	2.4015	0.46054	-0.12021	0.29509	0.40947
84	1.6036	-1.1881	-2.1383	-0.2395	-0.27798
85	2.2309	-0.31931	0.46717	0.46265	0.28304
86	2.9766	-0.72703	0.54222	0.25517	0.38152
87	2.9634	-0.94704	0.30616	-0.046579	0.38343
88	2.1581	-0.87264	1.0987	0.24792	0.068821
89	0.28049	-0.46488	0.17278	1.2927	0.0082473
90	2.2167	-0.56457	0.6689	-0.040547	0.21581

10. Ringraziamenti

Se < il migliore riconoscimento per la fatica fatta non è ciò che se ne ricava, ma ciò che si diventa grazie ad essa >, desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno esposto in maniera sia cronica che acuta a persistenti consigli, determinando un bioaccumulo nel tempo di esperienze grazie alle quali ho acquisito caratteri emergenti la cui espressione non sarà soggetta a significativi cambiamenti o meglio rimozioni. In primis ringrazio il mio tutor Prof. *Andrea Pace*, che mi ha seguito, passo dopo passo, in questo percorso, grazie al quale ho acquisito un metodo di lavoro che mi ha permesso di affrontare qualsiasi problema. Allo stesso modo ringrazio la mia co-tutor dr.ssa *Raffaella Melfi* per gli insegnamenti, per il sostegno, per la disponibilità, per la sua gentilezza e potrei continuare per log0. Desidero ringraziare il Prof. *Marco Arculeo* sempre presente per offrirmi preziosi suggerimenti, complimenti, critiche ed osservazioni costruttive e per il suo impegno nelle nostre collaborazioni. Ringrazio la Prof.ssa *Ivana Pibiri* per avermi accolto nel suo laboratorio ed avermi sempre rassicurato davanti qualsiasi ostacolo. Restando sempre in lab ringrazio *Ignazio, Pietro, Riccardo e Casimiro* per il meraviglioso rapporto di amicizia instaurato. Voglio ringraziare la Prof.ssa *Valeria Alduina* per avermi coinvolto nelle sue ricerche, e per il nostro rapporto sincero. Altrettanta gratitudine e stima per il Prof. *Antonio Palumbo Piccionello* sempre presente e fondamentale. Un grande grazie alla Prof.ssa *Maggio*, alla Prof.ssa *Riela*, e al Prof. *Giacalone* così come a tutti i colleghi più o meno diretti *Mercadante A.* (il 7 e l'8), *Campisciano V.*, *Massaro M.*, *Badalamenti N.*, *Barreca S.*, *Nicosia A.* con i quali ho condiviso tanti piacevoli momenti e confronti. Ringrazio la dr.ssa *Antonella Maccotta* che mi ha guidato nelle ricerche a chiusura di questo percorso, così come desidero ringraziare la dr.ssa *Vittoria Giudice*, il dr. *Gaetano D'Oca*, e il dr. *Salvatore Messina* della UOS Divisione Analitica 2, ARPA Sicilia per il cordiale rapporto sinergico di collaborazione.

Vorrei infine ringraziare le persone a me più care che mi hanno sempre sostenuto, ossia la mia fidanzata *Simonetta* per essermi stata vicina, tutti i miei parenti ed amici, sia quelli presenti (*Carlo, Andrea, Massimo, Antonio, Federico*) sia quelli che non lo sono più, in ogni caso sempre con me, compagni di mille battaglie che mi hanno sempre dato grinta, forza ed energia. Un grande ringraziamento a mio fratello per avere sempre creduto in me e a mia madre e mio padre che, con il loro dolce e instancabile sostegno, mi hanno permesso di arrivare fin qui contribuendo alla mia formazione personale.

11. Bibliografia

- Abercrombie, S. A., de Perre, C., Choi, Y. J., Tornabene, B. J., Sepúlveda, M. S., Lee, L. S., & Hoverman, J. T. (2019). Larval amphibians rapidly bioaccumulate poly- and perfluoroalkyl substances. *Ecotoxicology and environmental safety*, *178*, 137–145.
- Abercrombie, S. A., de Perre, C., Iacchetta, M., Flynn, R. W., Sepúlveda, M. S., Lee, L. S., & Hoverman, J. T. (2021). Sublethal Effects of Dermal Exposure to Poly- and Perfluoroalkyl Substances on Postmetamorphic Amphibians. *Environmental toxicology and chemistry*, *40*(3), 717–726.
- Abita, A., Aiello, P. & Buscaglia, V. M. (2010). Monitoraggio e valutazione dello stato ecologico e chimico delle acque di transizione del Distretto Idrografico della Sicilia ai sensi del D.M. 260. <https://www.snpambiente.it/wp-content/uploads/2019/06/Relazione-POA-2011-2018-Acque-di-transizione.pdf>.
- Ackerman R. A. (1977). The respiratory gas exchange of sea turtle nests (Chelonia, Caretta). *Respiration physiology*, *31*(1), 19–38.
- Adams, W. J., Biddinger, G. R., Robillard, K. A., & Gorsuch, J. W. (1995). A summary of the acute toxicity of 14 phthalate esters to representative aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *14*, 1569–1574.
- Aguirre, A. A., Gardner, S. C., Marsh, J. C., Delgado, S. G., Limpus, C. J., & Nichols, W. J. (2006). Hazards associated with the consumption of sea turtle meat and eggs: a review for health care workers and the general public. *EcoHealth*, *3*(3), 141-153.
- Ahasan, M. S., Picard, J., Elliott, L., Kinobe, R., Owens, L., & Ariel, E. (2017). Evidence of antibiotic resistance in Enterobacteriales isolated from green sea turtles, Chelonia mydas on the Great Barrier Reef. *Marine pollution bulletin*, *120*(1-2), 18–27.
- Ahrens, L., & Bundschuh, M. (2014). Fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment: a review. *Environmental toxicology and chemistry*, *33*(9), 1921–1929.
- Ahrens, L., Gashaw, H., Sjöholm, M., Gebrehiwot, S. G., Getahun, A., Derbe, E., Bishop, K., & Åkerblom, S. (2016). Poly- and perfluoroalkylated substances (PFASs) in water, sediment and fish muscle tissue from Lake Tana, Ethiopia and implications for human exposure. *Chemosphere*, *165*, 352–357.
- Akoglu H. (2018). User's guide to correlation coefficients. *Turkish journal of emergency medicine*, *18*(3), 91–93.

- Alam, S. K., & Brim, M. S. (2000). Organochlorine, PCB, PAH, and metal concentrations in eggs of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from northwest Florida, USA. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 35(6), 705–724.
- Alava, J. J., Keller, J. M., Kucklick, J. R., Wyneken, J., Crowder, L., & Scott, G. I. (2006). Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) egg yolk concentrations of persistent organic pollutants and lipid increase during the last stage of embryonic development. *The Science of the total environment*, 367(1), 170–181.
- Al-Bahry, S. N., Al-Zadjali, M. A., Mahmoud, I. Y., & Elshafie, A. E. (2012). Biomonitoring marine habitats in reference to antibiotic resistant bacteria and ampicillin resistance determinants from oviductal fluid of the nesting green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Chemosphere*, 87(11), 1308–1315.
- Al-Bahry, S. N., Mahmoud, I. Y., Al-Belushi, K. I., Elshafie, A. E., Al-Harthy, A., & Bakheit, C. K. (2009b). Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. *Chemosphere*, 77(11), 1534–1539.
- Al-Bahry, S. N., Mahmoud, I. Y., Al-Khaifi, A., Elshafie, A. E., & Al-Harthy, A. (2009c). Viability of multiple antibiotic resistant bacteria in distribution lines of treated sewage effluent used for irrigation. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 60(11), 2939–2948.
- Al-Bahry, S. N., Mahmoud, I. Y., Al-Zadjali, M., Elshafie, A., Al-Harthy, A., & Al-Alawi, W. (2011b). Antibiotic resistant bacteria as bio-indicator of polluted effluent in the green turtles, *Chelonia mydas* in Oman. *Marine environmental research*, 71(2), 139–144.
- Al-Bahry, S. N., Mahmoud, I. Y., Melghit, K., & Al-Amri, I. (2011a). Analysis of elemental composition of the eggshell before and after incubation in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) in Oman. *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 17(3), 452–460.
- Al-Bahry, S., Mahmoud, I., Elshafie, A., Al-Harthy, A., Al-Ghafri, S., Al-Amri, I., & Alkindi, A. (2009a). Bacterial flora and antibiotic resistance from eggs of green turtles *Chelonia mydas*: an indication of polluted effluents. *Marine pollution bulletin*, 58(5), 720–725.
- Albero B., Sánchez-Brunete C., García-Valcárcel A. I., Pérez R. A. (2015). Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples. *Trends in Analytical*

Chemistry, 71, 110-118.

- Alduina R. (2020). Antibiotics and Environment. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(4), 202.
- Alduina, R., Gambino, D., Presentato, A., Gentile, A., Sucato, A., Savoca, D., Filippello, S., Visconti, G., Caracappa, G., Vicari, D., & Arculeo, M. (2020). Is *Caretta caretta* a Carrier of Antibiotic Resistance in the Mediterranean Sea?. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(3), 116.
- Ali, H., & Khan, E. (2018a). What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’—proposal of a comprehensive definition. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(1), 6-19.
- Ali, H., & Khan, E. (2018b). Bioaccumulation of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in freshwater fish. Risk to human health. *Environmental chemistry letters*, 16(3), 903-917.
- Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of chemistry*, 2019.
- Ali, S. S., Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E. A., Zhu, D., & Sun, J. (2021). Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. *The Science of the total environment*, 771, 144719.
- Alloway, B. J. (2013). Heavy metals and metalloids as micronutrients for plants and animals. In *Heavy metals in soils* (pp. 195-209). Springer, Dordrecht.
- Al-Rawahy, S. H., AlKindi, A. Y., Elshafie, A., Ibrahim, M., Al Bahry, S. N., Al Siyabi, S. S., Mansour, M.H., & Al Kiyumi, A. A. (2007). Accumulation of metals in the egg yolk and liver of hatchling of green turtles *Chelonia mydas* at Ras Al Hadd, Sultante of Oman. *Journal of Biological Sciences*, 7(6), 925-930.
- Alves, L. M., Nunes, M., Marchand, P., Le Bizec, B., Mendes, S., Correia, J. P., Lemos, M. F., & Novais, S. C. (2016). Blue sharks (*Prionace glauca*) as bioindicators of pollution and health in the Atlantic Ocean: Contamination levels and biochemical stress responses. *The Science of the total environment*, 563-564, 282–292.
- Alves, M. S., Pereira, A., Araújo, S. M., Castro, B. B., Correia, A. C., & Henriques, I. (2014). Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Frontiers in microbiology*, 5, 426.

- Amarasiri, M., Sano, D., & Suzuki, S. (2020). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(19), 2016-2059.
- Amoatey, P., & Baawain, M. S. (2019). Effects of pollution on freshwater aquatic organisms. *Water environment research: a research publication of the Water Environment Federation*, 91(10), 1272–1287.
- Anan, Y., Kunito, T., Watanabe, I., Sakai, H., & Tanabe, S. (2001). Trace element accumulation in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) and green turtles (*Chelonia mydas*) from Yaeyama Islands, Japan. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(12), 2802–2814.
- Anderson, M. J. & Walsh, D. C. I. (2013). PERMANOVA, ANOSIM, and the mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? *Ecological monographs*, 83, 557–574.
- Anderson, M. J., Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2008). PERMANOVA+ for Primer. Guide to Software and Statistical Methods.,(University of Auckland and PRIMER-E Ltd: Plymouth, UK.).
- Andrady, A. L., & Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 1977–1984.
- Andreani, G., Santoro, M., Cottignoli, S., Fabbri, M., Carpenè, E., & Isani, G. (2008). Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *The Science of the total environment*, 390(1), 287–294.
- Andreozzi, R., Caprio, V., Ciniglia, C., de Champdoré, M., Lo Giudice, R., Marotta, R., & Zuccato, E. (2004). Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental science & technology*, 38(24), 6832–6838.
- Antoniou, Z., Dassenakis, M., Panagopoulos, D., & Sofouli, E. (2004). Copper and manganese in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) tissues in the Mediterranean. *Mediterranean Marine Science*, 5(1), 109–116.
- Api A. M. (2001). Toxicological profile of diethyl phthalate: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 39(2), 97–108.

- Arizza, V., Vazzana, M., Schillaci, D., Russo, D., Giaramita, F. T., & Parrinello, N. (2013). Gender differences in the immune system activities of sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, *164*(3), 447–455.
- Arizza, V., Vecchioni, L., Caracappa, S., Sciorba, G., Berlinghieri, F., Gentile, A., Persichetti, M. F., Arculeo, M., & Alduina, R. (2019). New insights into the gut microbiome in loggerhead sea turtles *Caretta caretta* stranded on the Mediterranean coast. *PloS one*, *14*(8), e0220329.
- Arnot, J. A., Gobas, F. A. (2006). A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, *14*, 257–297.
- Ateia, M., Maroli, A., Tharayil, N., & Karanfil, T. (2019). The overlooked short- and ultrashort-chain poly- and perfluorinated substances: A review. *Chemosphere*, *220*, 866–882.
- Augustsson, A., Lennqvist, T., Osbeck, C., Tibblin, P., Glynn, A., Nguyen, M. A., Westberg, E., & Vestergren, R. (2021). Consumption of freshwater fish: A variable but significant risk factor for PFOS exposure. *Environmental research*, *192*, 110284.
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2017). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine environmental research*, *128*, 2–11.
- Ayanda, I. O., Yang, M., Yu, Z., & Zha, J. (2018). Cytotoxic and genotoxic effects of perfluorododecanoic acid (PFDoA) in Japanese medaka. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, (419), 9.
- Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World journal of microbiology & biotechnology*, *32*(11), 180.
- Babu, B., & Wu, J. T. (2010). Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria. *The Science of the total environment*, *408*(21), 4969–4975.
- Baker, A., Mayo, M., Owens, L., Burgess, G., Norton, R., McBride, W. J., Currie, B. J., & Warner, J. (2013). Biogeography of *Burkholderia pseudomallei* in the Torres Strait Islands of Northern Australia. *Journal of clinical microbiology*, *51*(8), 2520–2525.
- Banzhaf, S., Filipovic, M., Lewis, J., Sparrenbom, C. J., & Barthel, R. (2017). A review of contamination of surface-, ground-, and drinking water in Sweden by perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs). *Ambio*, *46*(3), 335–346.

- Baothman, O. A., Alshamrani, Y. A., & Al-Talhi, H. A. (2020). Prevalence of Extended-Spectrum-lactamases in Isolated from Polluted Wild Fish. *The Open Biochemistry Journal*, 14(1).
- Barbarossa, A., Gazzotti, T., Farabegoli, F., Mancini, F. R., Zironi, E., Busani, L., & Pagliuca, G. (2016). Assessment of Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid Exposure Through Fish Consumption in Italy. *Italian journal of food safety*, 5(4), 6055.
- Barmantlo, S. H., Stel, J. M., van Doorn, M., Eschauzier, C., de Voogt, P., & Kraak, M. H. (2015). Acute and chronic toxicity of short chained perfluoroalkyl substances to *Daphnia magna*. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 198, 47–53.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 1985–1998.
- Barraza, A. D., Komoroske, L. M., Allen, C., Eguchi, T., Gossett, R., Holland, E., Lawson, D. D., LeRoux, R. A., Long, A., Seminoff, J. A., & Lowe, C. G. (2019). Trace metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two southern California coastal estuaries. *Chemosphere*, 223, 342–350.
- Barreca, S., Indelicato, R., Orecchio, S., & Pace, A. (2014). Photodegradation of selected phthalates on mural painting surfaces under UV light irradiation. *Microchemical Journal*, 114, 192-196.
- Barreca, S., Orecchio, S., & Pace, A. (2013). Photochemical sample treatment for extracts clean up in PCB analysis from sediments. *Talanta*, 103, 349–354.
- Belding, C., & Boopathy, R. (2018). Presence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in coastal recreational waters of southeast Louisiana, USA. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*.
- Bellasi, A., Binda, G., Pozzi, A., Galafassi, S., Volta, P., & Bettinetti, R. (2020). Microplastic contamination in freshwater environments: A review, focusing on interactions with sediments and benthic organisms. *Environments*, 7(4), 30.
- Beltrán-Sanahuja, A., Casado-Coy, N., Simó-Cabrera, L., & Sanz-Lázaro, C. (2020). Monitoring polymer degradation under different conditions in the marine environment. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 259, 113836.
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A re-

view. *Environmental research*, 169, 483–493.

- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M. N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), 310–317.
- Berger, U., Glynn, A., Holmström, K. E., Berglund, M., Ankarberg, E. H., & Törnkvist, A. (2009). Fish consumption as a source of human exposure to perfluorinated alkyl substances in Sweden - analysis of edible fish from Lake Vättern and the Baltic Sea. *Chemosphere*, 76(6), 799–804.
- Bertin, D., Ferrari, B. J., Labadie, P., Sapin, A., Garric, J., Budzinski, H., Houde, M., & Babut, M. (2014). Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge (*Chironomus riparius*) larvae exposed to sediment. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 189, 27–34.
- Bibbal, D., Dupouy, V., Ferré, J. P., Toutain, P. L., Fayet, O., Prère, M. F., & Bousquet-Mélou, A. (2007). Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in Enterobacteriaceae and excretion of blaTEM genes in swine feces. *Applied and environmental microbiology*, 73(15), 4785–4790.
- Bil, W., Zeilmaker, M., Fragki, S., Lijzen, J., Verbruggen, E., & Bokkers, B. (2021). Risk Assessment of Per- and Polyfluoroalkyl Substance Mixtures: A Relative Potency Factor Approach. *Environmental toxicology and chemistry*, 40(3), 859–870.
- Blasi, M. F., Migliore, L., Mattei, D., Rotini, A., Thaller, M. C., & Alduina, R. (2020). Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacteria from Wild Captured Loggerhead Sea Turtles. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(4), 162.
- Bondarczuk, K., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Microbial diversity and antibiotic resistance in a final effluent-receiving lake. *The Science of the total environment*, 650(Pt 2), 2951–2961.
- Boone, J. S., Vigo, C., Boone, T., Byrne, C., Ferrario, J., Benson, R., Donohue, J., Simmons, J. E., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., & Glassmeyer, S. T. (2019). Per- and polyfluoroalkyl substances in source and treated drinking waters of the United States. *The Science of the total environment*, 653, 359–369.
- Bornehag, C. G., Lundgren, B., Weschler, C. J., Sigsgaard, T., Hagerhed-Engman, L., & Sundell, J. (2005). Phthalates in indoor dust and their association with building characteristics. *Environmental health perspectives*, 113(10), 1399–1404.
- Boudreau, T. M., Sibley, P. K., Mabury, S. A., Muir, D. G., & Solomon, K. R. (2003).

Laboratory evaluation of the toxicity of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Lemna gibba*, *Daphnia magna*, and *Daphnia pulicaria*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 44(3), 307–313.

- Bougouffa, S., Yang, J. K., Lee, O. O., Wang, Y., Batang, Z., Al-Suwailem, A., & Qian, P. Y. (2013). Distinctive microbial community structure in highly stratified deep-sea brine water columns. *Applied and environmental microbiology*, 79(11), 3425–3437.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852–857.
- Brambilla, G., D'Hollander, W., Oliaei, F., Stahl, T., & Weber, R. (2015). Pathways and factors for food safety and food security at PFOS contaminated sites within a problem based learning approach. *Chemosphere*, 129, 192–202.
- Brase, R. A., Mullin, E. J., & Spink, D. C. (2021). Legacy and Emerging Per- and Polyfluoroalkyl Substances: Analytical Techniques, Environmental Fate, and Health Effects. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 995.
- Braun J. M. (2017). Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nature reviews. Endocrinology*, 13(3), 161–173.
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691.
- Bucchia, M., Camacho, M., Santos, M. R., Boada, L. D., Roncada, P., Mateo, R., Ortiz-Santaliestra, M. E., Rodríguez-Estival, J., Zumbado, M., Orós, J., Henríquez-Hernández, L. A., García-Álvarez, N., & Luzardo, O. P. (2015). Plasma levels of pollutants are much higher in loggerhead turtle populations from the Adriatic Sea than in those from open waters (Eastern Atlantic Ocean). *The Science of the total environment*, 523, 161–169.
- Buck, R. C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J. M., Cousins, I. T., de Voogt, P., Jensen, A. A., Kannan, K., Mabury, S. A., & van Leeuwen, S. P. (2011). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integrated environmental assessment and management*, 7(4), 513–541.
- Burkhard L. P. (2021). Evaluation of Published Bioconcentration Factor (BCF) and Bioaccumulation Factor (BAF) Data for Per- and Polyfluoroalkyl Substances Across Aquatic

Species. *Environmental toxicology and chemistry*, 40(6), 1530–1543.

- Butt, C. M., Muir, D. C., & Mabury, S. A. (2014). Biotransformation pathways of fluorotelomer-based polyfluoroalkyl substances: a review. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(2), 243–267.
- Camacho, M., Luzardo, O. P., Boada, L. D., López Jurado, L. F., Medina, M., Zumbado, M., & Orós, J. (2013). Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles: evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles. *The Science of the total environment*, 458-460, 283–289.
- Caracappa, S., Persichetti, M. F., Piazza, A., Caracappa, G., Gentile, A., Marineo, S., Crucitti, D., & Arculeo, M. (2018). Incidental catch of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) along the Sicilian coasts by longline fishery. *PeerJ*, 6, e5392.
- Caracappa, S., Persichetti, M.F., Gentile, A., Caracappa, G., Curro', V., Freggi, D., Arculeo, M. (2017). New records of leatherback sea turtle, *Dermochelys coriacea* (Vandelli,1761) (Testudines: Dermochelyidae) in the strait of Sicily. *Cahiers De Biologie Marine*, 58, 353–357.
- Caracappa, S., Pisciotta, A., Persichetti, M. F., Caracappa, G., Alduina, R., & Arculeo, M. (2016). Nonmodal scutes patterns in the Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*): a possible epigenetic effect?. *Canadian Journal of Zoology*, 94(5), 379-383.
- Carballeira, C., Ramos-Gómez, J., Martín-Díaz, L., & DelValls, T. A. (2012). Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: application to marine pisciculture effluents. *Marine environmental research*, 77, 12–22.
- Cardellicchio, N., Giandomenico, S., Ragone, P., & Di Leo, A. (2000). Tissue distribution of metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Apulian coasts, southern Italy. *Marine environmental research*, 49(1), 55–66.
- Cardoso-Brito, V., Raposo, A., Pires, T. T., Pinna, M. H., & Oriá, A. P. (2019). Conjunctival bacterial flora and antimicrobial susceptibility of captive and free-living sea turtles in Brazil. *Veterinary ophthalmology*, 22(3), 246–255.
- Carroll, D., Wang, J., Fanning, S., & McMahon, B. J. (2015). Antimicrobial Resistance in Wildlife: Implications for Public Health. *Zoonoses and public health*, 62(7), 534–542.
- Casal, P., González-Gaya, B., Zhang, Y., Reardon, A. J., Martin, J. W., Jiménez, B., & Dachs, J. (2017). Accumulation of Perfluoroalkylated Substances in Oceanic Plankton. *Environmental science & technology*, 51(5), 2766–2775.
- Catherine, M., Nadège, B., Charles, P., & Yann, A. (2019). Perfluoroalkyl substances (PFASs)

in the marine environment: Spatial distribution and temporal profile shifts in shellfish from French coasts. *Chemosphere*, 228, 640–648.

- Çelik, A., Kaska, Y., Bağ, H., Aureggi, M., Semiz, G., Kartal A. A. & Elçi, L., (2006). Heavy Metal Monitoring Around the Nesting Environment of Green Sea Turtles in Turkey. *Water Air Soil Pollut* 169, 67–79.
- Cerón, J.A.J., Barragán, A., Ruiz, H.G., (2000). Contamination by phthalate ester plasticizers in two marine turtle species. The National Marine Fisheries Service (NMFS). Proceedings Of The Eighteenth International Sea Turtle Symposium 118- 119.
- Chan, H. W., Lau, T. C., Ang, P. O., Wu, M., & Wong, P. K. (2004). Biosorption of di (2-ethylhexyl) phthalate by seaweed biomass. *Journal of applied phycology*, 16(4), 263-274.
- Chang, E. T., Adami, H. O., Boffetta, P., Cole, P., Starr, T. B., & Mandel, J. S. (2014). A critical review of perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate exposure and cancer risk in humans. *Critical reviews in toxicology*, 44 Suppl 1, 1–81.
- Chaturvedi, P., Shukla, P., Giri, B. S., Chowdhary, P., Chandra, R., Gupta, P., & Pandey, A. (2021). Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. *Environmental research*, 194, 110664.
- Chen, G., Zhao, L., & Dong, Y. H. (2011). Oxidative degradation kinetics and products of chlortetracycline by manganese dioxide. *Journal of hazardous materials*, 193, 128–138.
- Chen, Z., Ren, G., Ma, X., Ding, Y., Hui, Y., Qin, P., Xu, Z., Gu, X., Yuan, F., & Liu, Y. (2020). Perfluoroalkyl substances in the Lingang hybrid constructed wetland, Tianjin, China: occurrence, distribution characteristics, and ecological risks. *Environmental science and pollution research international*, 27(31), 38580–38590.
- Cheney, D., Rajic, L., Sly, E., Meric, D., & Sheahan, T. (2014). Uptake of PCBs contained in marine sediments by the green macroalga *Ulva rigida*. *Marine pollution bulletin*, 88(1-2), 207–214.
- Cheng, W., Doering, J. A., LaLone, C., & Ng, C. (2021b). Integrative Computational Approaches to Inform Relative Bioaccumulation Potential of Per- and Polyfluoroalkyl Substances Across Species. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 180(2), 212–223.
- Cheng, Z., Chen, J. R., Zheng, C., Yang, Z. B., Xu, X. X., & Wong, M. H. (2021a). Bioaccumulation and health risk assessment of phthalate esters in cultured low trophic level

fish fed with food waste-based diets. *Chemosphere*, 276, 130189.

- Cheng, Z., Nie, X. P., Wang, H. S., & Wong, M. H. (2013). Risk assessments of human exposure to bioaccessible phthalate esters through market fish consumption. *Environment international*, 57-58, 75–80.
- Chuen-Im, T., Suriyant, D., Sawetsuwannakun, K., & Kitkumthorn, N. (2019). The Occurrence of Vibrionaceae, Staphylococcaceae, and Enterobacteriaceae in Green Turtle *Chelonia mydas* Rearing Seawater. *Journal of aquatic animal health*, 31(4), 303–310.
- Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current biology: CB*, 19(11), R437–R441.
- Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2006). PRIMER v6: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth, 192 pp. *the text*.
- CLSI *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals CLSI Supplement VET08*; 4th edition.; Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2018; ISBN 978-1-68440-010-2
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin*, 62(12), 2588–2597.
- Collingro, A., Köstlbacher, S., & Horn, M. (2020). Chlamydiae in the Environment. *Trends in microbiology*, 28(11), 877–888.
- Conder, J. M., Hoke, R. A., De Wolf, W., Russell, M. H., & Buck, R. C. (2008). Are PFCAs bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds. *Environmental science & technology*, 42(4), 995–1003.
- Cortés-Gómez, A. A., Morcillo, P., Guardiola, F. A., Espinosa, C., Esteban, M. A., Cuesta, A., Girondot, M., & Romero, D. (2018). Molecular oxidative stress markers in olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) and their relation to metal concentrations in wild populations. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 233, 156–167.
- Costello, M.C.S., Lee, L.S. (2019). Sources, Fate, and Plant Uptake in Agricultural Systems of Per- and Polyfluoroalkyl Substances. *Current Pollution Reports*, 2020
- Cousins, R. J., Liuzzi, J. P., & Lichten, L. A. (2006). Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *The Journal of biological chemistry*, 281(34), 24085–24089.
- Cui, W. J., Peng, J. X., Tan, Z. J., Zhai, Y. X., Guo, M. M., Li, Z. X., & Mou, H. J. (2019). Pollution Characteristics of Perfluorinated Alkyl Substances (PFASs) in Seawater, Sediments, and Biological Samples from Jiaozhou Bay, China. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue*, 40(9),

3990–3999.

- Cui, Y., Liu, W., Xie, W., Yu, W., Wang, C., & Chen, H. (2015). Investigation of the Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on Apoptosis and Cell Cycle in a Zebrafish (*Danio rerio*) Liver Cell Line. *International journal of environmental research and public health*, *12*(12), 15673–15682.
- da Silva, C. C., Klein, R. D., Barcarolli, I. F., & Bianchini, A. (2016). Metal contamination as a possible etiology of fibropapillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the southern Atlantic Ocean. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *170*, 42–51.
- Dai, Z., Zeng, F. (2019). Distribution and Bioaccumulation of Perfluoroalkyl Acids in Xiamen Coastal Waters. *Journal of Chemistry*, 2019, 2612853.
- Danso, D., Chow, J., & Streit, W. R. (2019). Plastics: Environmental and Biotechnological Perspectives on Microbial Degradation. *Applied and environmental microbiology*, *85*(19), e01095-19.
- Darbre P. D. (2020). Chemical components of plastics as endocrine disruptors: Overview and commentary. *Birth defects research*, *112*(17), 1300–1307.
- Dassuncao, C., Hu, X. C., Zhang, X., Bossi, R., Dam, M., Mikkelsen, B., & Sunderland, E. M. (2017). Temporal Shifts in Poly- and Perfluoroalkyl Substances (PFASs) in North Atlantic Pilot Whales Indicate Large Contribution of Atmospheric Precursors. *Environmental science & technology*, *51*(8), 4512–4521.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, *477*(7365), 457–461.
- De Silva, A. O., Tseng, P. J., & Mabury, S. A. (2009). Toxicokinetics of perfluorocarboxylate isomers in rainbow trout. *Environmental toxicology and chemistry*, *28*(2), 330–337.
- Death, C., Bell, C., Champness, D., Milne, C., Reichman, S., & Hagen, T. (2021). Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in livestock and game species: A review. *The Science of the total environment*, *774*, 144795.
- Delli Paoli Carini, A., Ariel, E., Picard, J., & Elliott, L. (2017). Antibiotic Resistant Bacterial Isolates from Captive Green Turtles and *In Vitro* Sensitivity to Bacteriophages. *International journal of microbiology*, 2017, 5798161.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of clinical microbiology and*

antimicrobials, 14, 45.

- Dennis, M. M., Poppenga, R., Conan, A., Hill, K., Hargrave, S., Maroun, V., & Stewart, K. M. (2020). Leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) hatch success and essential and nonessential metals in eggs and embryos from nests in St. Kitts (2015). *Marine pollution bulletin*, 161(Pt A), 111726.
- D'Hollander, W., de Voogt, P., De Coen, W., & Bervoets, L. (2010). Perfluorinated substances in human food and other sources of human exposure. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 208, 179–215.
- Di Cesare, A., Eckert, E. M., D'Urso, S., Bertoni, R., Gillan, D. C., Wattiez, R., & Corno, G. (2016b). Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water research*, 94, 208–214.
- Di Cesare, A., Fontaneto, D., Doppelbauer, J., & Corno, G. (2016a). Fitness and Recovery of Bacterial Communities and Antibiotic Resistance Genes in Urban Wastewaters Exposed to Classical Disinfection Treatments. *Environmental science & technology*, 50(18), 10153–10161.
- Di Cesare, A., Luna, G. M., Vignaroli, C., Pasquaroli, S., Tota, S., Paroncini, P., & Biavasco, F. (2013). Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic-resistant Enterococci in marine sediments. *PloS one*, 8(4), e62838.
- Di Cesare, A., Vignaroli, C., Luna, G. M., Pasquaroli, S., & Biavasco, F. (2012). Antibiotic-resistant enterococci in seawater and sediments from a coastal fish farm. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 18(5), 502–509.
- Di Ianni, F., Dodi, P. L., Cabassi, C. S., Pelizzone, I., Sala, A., Cvirani, S., Parmigiani, E., Quintavalla, F., & Taddei, S. (2015). Conjunctival flora of clinically normal and diseased turtles and tortoises. *BMC veterinary research*, 11, 91.
- Di Natale, M., Bennici, C., Biondo, G., Masullo, T., Monastero, C., Tagliavia, M., Torri, M., Costa, S., Ragusa, M. A., Cuttitta, A., & Nicosia, A. (2019). Aberrant gene expression profiles in Mediterranean sea urchin reproductive tissues after metal exposures. *Chemosphere*, 216, 48–58.
- Digka, N., Bray, L., Tsangaris, C., Andreanidou, K., Kasimati, E., Kofidou, E., Komnenou, A., & Kaberi, H. (2020). Evidence of ingested plastics in stranded loggerhead sea turtles along the Greek coastline, East Mediterranean Sea. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 263(Pt A), 114596.
- Ding, G., Wang, L., Zhang, J., Wei, Y., Wei, L., Li, Y., Shao, M., & Xiong, D. (2015). Toxicity

and DNA methylation changes induced by perfluorooctane sulfonate (PFOS) in sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. *Chemosphere*, 128, 225–230.

- Ding, G., Wouterse, M., Baerselman, R., & Peijnenburg, W. J. (2012). Toxicity of polyfluorinated and perfluorinated compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 62(1), 49–55.
- Drudge, C. N., Elliott, A. V., Plach, J. M., Ejim, L. J., Wright, G. D., Droppo, I. G., & Warren, L. A. (2012). Diversity of integron- and culture-associated antibiotic resistance genes in freshwater floc. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), 4367–4372.
- du Preez, M., Nel, R., & Bouwman, H. (2018). First report of metallic elements in loggerhead and leatherback turtle eggs from the Indian Ocean. *Chemosphere*, 197, 716–728.
- Duarte, D. J., Oldenkamp, R., & Ragas, A. (2019). Modelling environmental antibiotic-resistance gene abundance: A meta-analysis. *The Science of the total environment*, 659, 335–341.
- Duloquin, L., Lhomond, G., & Gache, C. (2007). Localized VEGF signaling from ectoderm to mesenchyme cells controls morphogenesis of the sea urchin embryo skeleton. *Development (Cambridge, England)*, 134(12), 2293–2302.
- Dumontet, S., Krovacek, K., Svenson, S. B., Pasquale, V., Baloda, S. B., & Figliuolo, G. (2000). Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of Southern Italy. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 23(1), 53–72.
- Duncan, E. M., Broderick, A. C., Fuller, W. J., Galloway, T. S., Godfrey, M. H., Hamann, M., Limpus, C. J., Lindeque, P. K., Mayes, A. G., Omeyer, L., Santillo, D., Snape, R., & Godley, B. J. (2019). Microplastic ingestion ubiquitous in marine turtles. *Global change biology*, 25(2), 744–752.
- Dutta, S., Haggerty, D. K., Rappolee, D. A., & Ruden, D. M. (2020). Phthalate Exposure and Long-Term Epigenomic Consequences: A Review. *Frontiers in genetics*, 11, 405.
- Eastman, C. B., Farrell, J. A., Whitmore, L., Rollinson Ramia, D. R., Thomas, R. S., Prine, J., Eastman, S. F., Osborne, T. Z., Martindale, M. Q., Duffy, D. J. (2020). Plastic ingestion in post-hatchling sea turtles: assessing a major threat in Florida near shore waters. *Frontiers in Marine Science*, 7, 693.
- ECHA (2017). Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.11: PBT/vPvB Assessment. Available online:

https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r11_en.pdf accessed on 1 April 2021.

- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Alexander, J., Auðunsson, G. A., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi, J., Dogliotti, E., Di Domenico, A., Fernández-Cruz, M. L., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., ... (2008). Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 6, 653.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. R., Nebbia, C. S., Oswald, I. P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A. C., Vleminckx, C., Vollmer, G., ... Schwerdtle, T. (2018). Risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 16(12), e05194.
- Eggleton, J., & Thomas, K. V. (2004). A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment international*, 30(7), 973–980.
- Ekwanzala, M. D., Lehutso, R. F., Kasonga, T. K., Dewar, J. B., & Momba, M. (2020). Environmental Dissemination of Selected Antibiotics from Hospital Wastewater to the Aquatic Environment. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(7), 431.
- Elifantz, H., Horn, G., Ayon, M., Cohen, Y., & Minz, D. (2013). Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS microbiology ecology*, 85(2), 348–357.
- Ellington, J. J. (1999). Octanol/Water Partition Coefficients and Water Solubilities of Phthalate Esters. *Journal of Chemical & Engineering* 44 (6), 1414-1418.
- Ericson, I., Martí-Cid, R., Nadal, M., Van Bavel, B., Lindström, G., & Domingo, J. L. (2008). Human exposure to perfluorinated chemicals through the diet: intake of perfluorinated compounds in foods from the Catalan (Spain) market. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(5), 1787–1794.
- Escobedo Mondragón, M., Luzardo, O.P., Zumbado, M., Rodríguez-Hernández, Á., Rial Berriel, C., Ramírez-Gómez, H.V., González-Rebeles Islas, C., Aguilar Fisher, R.F., & Rosiles Martínez, J.R. (2021). Incidence of 49 elements in the blood and scute tissues of nesting hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Holbox Island. *Regional Studies in Marine Science*, 41, 101566.

- Esposito, M., De Roma, A., Sansone, D., Capozzo, D., Iaccarino, D., di Nocera, F., & Gallo, P. (2020). Non-essential toxic element (Cd, As, Hg and Pb) levels in muscle, liver and kidney of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) stranded along the southwestern coasts of Tyrrhenian Sea. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 231, 108725.
- Evangelidou, N., Grythe, H., Klimont, Z., Heyes, C., Eckhardt, S., Lopez-Aparicio, S., & Stohl, A. (2020). Atmospheric transport is a major pathway of microplastics to remote regions. *Nature communications*, 11(1), 3381.
- Evangelista-Barreto, N. S., de Carvalho, F. C., Vieira, R. H., Dos Reis, C. M., Macrae, A., & Rodrigues, D. (2010). Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 41(2), 452–460.
- Fair, P. A., Wolf, B., White, N. D., Arnott, S. A., Kannan, K., Karthikraj, R., & Vena, J. E. (2019). Perfluoroalkyl substances (PFASs) in edible fish species from Charleston Harbor and tributaries, South Carolina, United States: Exposure and risk assessment. *Environmental research*, 171, 266–277.
- Fang, S., Zhao, S., Zhang, Y., Zhong, W., & Zhu, L. (2014). Distribution of perfluoroalkyl substances (PFASs) with isomer analysis among the tissues of aquatic organisms in Taihu Lake, China. *Environmental pollution*, 193, 224–232.
- Fattore, E., Bagnati, R., Colombo, A., Fanelli, R., Miniero, R., Brambilla, G., Di Domenico, A., Roncarati, A., & Davoli, E. (2018). Perfluorooctane Sulfonate (PFOS), Perfluorooctanoic Acid (PFOA), Brominated Dioxins (PBDDs) and Furans (PBDFs) in Wild and Farmed Organisms at Different Trophic Levels in the Mediterranean Sea. *Toxics*, 6(3), 50.
- Faust, D. R., Hooper, M. J., Cobb, G. P., Barnes, M., Shaver, D., Ertolacci, S., & Smith, P. N. (2014). Inorganic elements in green sea turtles (*Chelonia mydas*): relationships among external and internal tissues. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(9), 2020–2027.
- Fernández-Sanjuan, M., Meyer, J., Damásio, J., Faria, M., Barata, C., & Lacorte, S. (2010). Screening of perfluorinated chemicals (PFCs) in various aquatic organisms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(3), 1447–1456.
- Fichi, G., Cardeti, G., Cersini, A., Mancusi, C., Guarducci, M., Di Guardo, G., & Terracciano, G. (2016). Bacterial and viral pathogens detected in sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy. *Veterinary microbiology*, 185, 56–61.

- Fiedler, H., & Sadia, M. (2021). Regional occurrence of perfluoroalkane substances in human milk for the global monitoring plan under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants during 2016-2019. *Chemosphere*, 277, 130287.
- Fitzpatrick, D., & Walsh, F. (2016). Antibiotic resistance genes across a wide variety of metagenomes. *FEMS microbiology ecology*, 92(2), fiv168.
- Flynn, R. W., Iacchetta, M., de Perre, C., Lee, L., Sepúlveda, M. S., & Hoverman, J. T. (2021). Chronic Per-/Polyfluoroalkyl Substance Exposure Under Environmentally Relevant Conditions Delays Development in Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) Larvae. *Environmental toxicology and chemistry*, 40(3), 711–716.
- Foguth, R. M., Flynn, R. W., de Perre, C., Iacchetta, M., Lee, L. S., Sepúlveda, M. S., & Cannon, J. R. (2019). Developmental exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) selectively decreases brain dopamine levels in Northern leopard frogs. *Toxicology and applied pharmacology*, 377, 114623.
- Fossi, M. C., 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*). *Marine environmental research*, 100, 17–24.
- Foti, M., Giacobello, C., Bottari, T., Fisichella, V., Rinaldo, D., & Mammina, C. (2009). Antibiotic Resistance of Gram Negatives isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 58(9), 1363–1366.
- Franzellitti, S., Locatelli, C., Gerosa, G., Vallini, C., & Fabbri, E. (2004). Heavy metals in tissues of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the northwestern Adriatic Sea. Comparative biochemistry and physiology. *Toxicology & pharmacology: CBP*, 138(2), 187–194.
- Fromme, H., Tittlemier, S. A., Völkel, W., Wilhelm, M., & Twardella, D. (2009). Perfluorinated compounds--exposure assessment for the general population in Western countries. *International journal of hygiene and environmental health*, 212(3), 239–270.
- Fu, L., Li, J., Wang, G., Luan, Y., & Dai, W. (2021). Adsorption behavior of organic pollutants on microplastics. *Ecotoxicology and environmental safety*, 217, 112207.
- Gaballah, S., Swank, A., Sobus, J. R., Howey, X. M., Schmid, J., Catron, T., McCord, J., Hines, E., Strynar, M., & Tal, T. (2020). Evaluation of Developmental Toxicity, Developmental Neurotoxicity, and Tissue Dose in Zebrafish Exposed to GenX and Other PFAS. *Environmental health perspectives*, 128(4), 47005.

- Gale, R. W., Bergeron, J. M., Willingham, E. J., & Crews, D. (2002). Turtle sex determination assay: mass balance and responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Environmental toxicology and chemistry*, 21(11), 2477–2482.
- Gall, S. C., & Thompson, R. C. (2015). The impact of debris on marine life. *Marine pollution bulletin*, 92(1-2), 170–179.
- Gallo, F., Fossi, C., Weber, R., Santillo, D., Sousa, J., Ingram, I., Nadal, A., & Romano, D. (2018). Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components: the need for urgent preventive measures. *Environmental sciences Europe*, 30(1), 13.
- Gambino, D., Persichetti, M. F., Gentile, A., Arculeo, M., Visconti, G., Currò, V., Caracappa, G., Crucitti, D., Piazza, A., Mancianti, F., Nardoni, S., Vicari, D., & Caracappa, S. (2020). First data on microflora of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) nests from the coastlines of Sicily. *Biology open*, 9(1), bio045252.
- Gao, C. J., & Kannan, K. (2020). Phthalates, bisphenols, parabens, and triclocarban in feminine hygiene products from the United States and their implications for human exposure. *Environment international*, 136, 105465.
- Gao, K., Miao, X., Fu, J., Chen, Y., Li, H., Pan, W., Fu, J., Zhang, Q., Zhang, A., & Jiang, G. (2020). Occurrence and trophic transfer of per- and polyfluoroalkyl substances in an Antarctic ecosystem. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 257, 113383.
- Gao, P., Ding, Y., Li, H., & Xagorarakis, I. (2012). Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: mass balance and removal processes. *Chemosphere*, 88(1), 17–24.
- García-Fernández, A. J., Gómez-Ramírez, P., Martínez-López, E., Hernández-García, A., María-Mojica, P., Romero, D., Jiménez, P., Castillo, J. J., & Bellido, J. J. (2009). Heavy metals in tissues from loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the southwestern Mediterranean (Spain). *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(2), 557–563.
- García-Gómez, J.C., Garrigós, M., & Garrigós, J. (2021). Plastic as a Vector of Dispersion for Marine Species With Invasive Potential. A Review. *Frontiers in Ecology and Evolution*.
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New biotechnology*, 32(1), 147–156.
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., UmLauf, G., Nadal, M., Van Der Ploeg, M., Van Der Zee, S., Ritsema, C. (2015): Emerging Pollutants in the Environment: A Challenge for Water Resource Management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3 (1), 57–65.

- GESAMP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection, (2016). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part 2 of a global assessment. (IMO, FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/ WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP). In: Kershaw, P.J. (Ed.), Rep. Stud. GESAMP No. 90 (96 pp). Reports Stud. GESAMP, No. 93, 96 p. 93.
- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., & Zhu, Y. G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME journal*, 9(6), 1269–1279.
- Gökirmak, T., Campanale, J. P., Shipp, L. E., Moy, G. W., Tao, H., & Hamdoun, A. (2012). Localization and substrate selectivity of sea urchin multidrug (MDR) efflux transporters. *The Journal of biological chemistry*, 287(52), 43876–43883.
- Gómez, C., Vicente, J., Echavarri-Erasun, B., Porte, C., & Lacorte, S. (2011). Occurrence of perfluorinated compounds in water, sediment and mussels from the Cantabrian Sea (North Spain). *Marine pollution bulletin*, 62(5), 948–955.
- Graham, D. W., Olivares-Rieumont, S., Knapp, C. W., Lima, L., Werner, D., & Bowen, E. (2011). Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares River near Havana, Cuba. *Environmental science & technology*, 45(2), 418–424.
- Graham, E. D., & Tully, B. J. (2021). Marine Dada bacteria exhibit genome streamlining and phototrophy-driven niche partitioning. *The ISME journal*, 15(4), 1248–1256.
- Grenni, P., Ancona, V., & Caracciolo, A. B. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25-39.
- Grindler, N. M., Vanderlinden, L., Karthikraj, R., Kannan, K., Teal, S., Polotsky, A. J., Powell, T. L., Yang, I. V., & Jansson, T. (2018). Exposure to Phthalate, an Endocrine Disrupting Chemical, Alters the First Trimester Placental Methylome and Transcriptome in Women. *Scientific reports*, 8(1), 6086.
- Groffen, T., Rijnders, J., van Doorn, L., Jorissen, C., De Borger, S. M., Luttikhuis, D. O., de Deyn, L., Covaci, A., & Bervoets, L. (2021). Preliminary study on the distribution of metals and persistent organic pollutants (POPs), including perfluoroalkylated acids (PFAS), in the aquatic environment near Morogoro, Tanzania, and the potential health risks for humans. *Environmental research*, 192, 110299.
- Gu, S., Zheng, H., Xu, Q., Sun, C., Shi, M., Wang, Z., & Li, F. (2017). Comparative toxicity of the plasticizer dibutyl phthalate to two freshwater algae. *Aquatic toxicology (Amsterdam,*

Netherlands), 191, 122–130.

- Guerranti, C., Ancora, S., Bianchi, N., Perra, G., Fanello, E. L., Corsolini, S., Fossi, M. C., & Focardi, S. E. (2013). Perfluorinated compounds in blood of *Caretta caretta* from the Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 73(1), 98–101.
- Guerranti, C., Bainsi, M., Casini, S., Focardi, S. E., Giannetti, M., Mancusi, C., Marsili, L., Perra, G., & Fossi, M. C. (2014). Pilot study on levels of chemical contaminants and porphyrins in *Caretta caretta* from the Mediterranean Sea. *Marine environmental research*, 100, 33–37.
- Gunduz, G., Parlak, H., Arslan, O., Boyac'oglu, M., Karaaslan, M. (2013). Embryotoxic effects of perfluorooctane sulfonate compounds in Sea Urchin *Paracentrotus lividus*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22, 171–177.
- Guo, M., Zheng, G., Peng, J., Meng, D., Wu, H., Tan, Z., Li, F., & Zhai, Y. (2019b). Distribution of perfluorinated alkyl substances in marine shellfish along the Chinese Bohai Sea coast. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 54(4), 271–280.
- Guo, W., Pan, B., Sakkiah, S., Yavas, G., Ge, W., Zou, W., Tong, W., & Hong, H. (2019a). Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods. *International journal of environmental research and public health*, 16(22), 4361.
- Gwenzi, W., Musiyiwa, K., & Mangori, L. (2020). Sources, behaviour and health risks of antimicrobial resistance genes in wastewaters: a hotspot reservoir. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 102220.
- Habibullah-Al-Mamun, M., Ahmed, M. K., Raknuzzaman, M., Islam, M. S., Ali, M. M., Tokumura, M., & Masunaga, S. (2017). Occurrence and assessment of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in commonly consumed seafood from the coastal area of Bangladesh. *Marine pollution bulletin*, 124(2), 775–785.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 1-9. Available online at https://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Han, Y., Wang, J., Zhao, Z., Chen, J., Lu, H., & Liu, G. (2017). Fishmeal Application Induces Antibiotic Resistance Gene Propagation in Mariculture Sediment. *Environmental science & technology*, 51(18), 10850–10860.
- Harada, K. H., & Koizumi, A. (2009). Environmental and biological monitoring of persistent fluorinated compounds in Japan and their toxicities. *Environmental health and preventive*

medicine, 14(1), 7–19.

- Hassell, K. L., Coggan, T. L., Cresswell, T., Kolobaric, A., Berry, K., Crosbie, N. D., Blackbeard, J., Pettigrove, V. J., & Clarke, B. O. (2020). Dietary Uptake and Depuration Kinetics of Perfluorooctane Sulfonate, Perfluorooctanoic Acid, and Hexafluoropropylene Oxide Dimer Acid (GenX) in a Benthic Fish. *Environmental toxicology and chemistry*, 39(3), 595–603.
- Hatosy, S. M., & Martiny, A. C. (2015). The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes. *Applied and environmental microbiology*, 81(21), 7593–7599.
- Haug, L. S., Thomsen, C., Brantsaeter, A. L., Kvale, H. E., Haugen, M., Becher, G., Alexander, J., Meltzer, H. M., & Knutsen, H. K. (2010). Diet and particularly seafood are major sources of perfluorinated compounds in humans. *Environment international*, 36(7), 772–778.
- Hayman, N. T., Rosen, G., Colvin, M. A., Conder, J., & Arblaster, J. A. (2021). Aquatic toxicity evaluations of PFOS and PFOA for five standard marine endpoints. *Chemosphere*, 273, 129699.
- He, X., Dai, K., Li, A., & Chen, H. (2015). Occurrence and assessment of perfluorinated compounds in fish from the Danjiangkou reservoir and Hanjiang river in China. *Food chemistry*, 174, 180–187.
- He, Y., Jin, L., Sun, F., Hu, Q., & Chen, L. (2016). Antibiotic and heavy-metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh shrimps in Shanghai fish markets, China. *Environmental science and pollution research international*, 23(15), 15033–15040.
- Hemmer, M. J., Barron, M. G., & Greene, R. M. (2011). Comparative toxicity of eight oil dispersants, Louisiana sweet crude oil (LSC), and chemically dispersed LSC to two aquatic test species. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(10), 2244–2252.
- Hereu, B. (2005). Movement patterns of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a marine reserve and an unprotected area in the NW Mediterranean. *Marine Ecology*, 26(1), 54–62.
- 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.
- Herrmann, M., Wegner, C. E., Taubert, M., Geesink, P., Lehmann, K., Yan, L., Lehmann, R., Totsche, K. U., & Küsel, K. (2019). Predominance of *Cand. Patescibacteria* in Groundwater Is Caused by Their Preferential Mobilization From Soils and Flourishing Under Oligotrophic Conditions. *Frontiers in microbiology*, 10, 1407.
- Hilber, I., & Gabbert, S. (2020). Choosing the best for preventing the worst: A structured

analysis of the selection of risk management options in REACH restriction dossiers. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 118, 104809.

- Hliseníková, H., Petrovičová, I., Kolena, B., Šidlovská, M., & Sirotkin, A. (2020). Effects and Mechanisms of Phthalates' Action on Reproductive Processes and Reproductive Health: A Literature Review. *International journal of environmental research and public health*, 17(18), 6811.
- Hogan, C. M. (2010). Heavy metal. *Encyclopedia of Earth*. National Council for Science and the Environment. Eds E. Monosson & C. Cleveland, Washington DC.
- Hong, B., Ba, Y., Niu, L., Lou, F., Zhang, Z., Liu, H., Pan, Y., & Zhao, Y. (2018). A Comprehensive Research on Antibiotic Resistance Genes in Microbiota of Aquatic Animals. *Frontiers in microbiology*, 9, 1617.
- Hong, S., Khim, J. S., Wang, T., Naile, J. E., Park, J., Kwon, B. O., Song, S. J., Ryu, J., Codling, G., Jones, P. D., Lu, Y., & Giesy, J. P. (2015). Bioaccumulation characteristics of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in coastal organisms from the west coast of South Korea. *Chemosphere*, 129, 157–163.
- Hoover, G. M., Chislock, M. F., Tornabene, B. J., Guffey, S. C., Choi, Y. J., De Perre, C., Hoverman, J. T., Lee, L. S., Sepúlveda, M. S. (2017) Uptake and Depuration of Four Per/Polyfluoroalkyl Substances (PFASS) in Northern Leopard Frog *Rana pipiens* Tadpoles. *Environmental Science & Technology Letters*, 4, 399–403.
- Houde, M., Balmer, B. C., Brandsma, S., Wells, R. S., Rowles, T. K., Solomon, K. R., & Muir, D. C. (2006). Perfluoroalkyl compounds in relation to life-history and reproductive parameters in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, Florida, U.S.A. *Environmental toxicology and chemistry*, 25(9), 2405–2412.
- Houde, M., De Silva, A. O., Muir, D. C., & Letcher, R. J. (2011). Monitoring of perfluorinated compounds in aquatic biota: an updated review. *Environmental science & technology*, 45(19), 7962–7973. <https://doi.org/10.1021/es104326w>
- Houde, M., Martin, J. W., Letcher, R. J., Solomon, K. R., & Muir, D. C. (2006). Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environmental science & technology*, 40(11), 3463–3473. <https://doi.org/10.1021/es052580b>
- Hu, X. C., Dassuncao, C., Zhang, X., Grandjean, P., Weihe, P., Webster, G. M., Nielsen, F., & Sunderland, E. M. (2018). Can profiles of poly- and Perfluoroalkyl substances (PFASs) in human serum provide information on major exposure sources?. *Environmental health: a global*

access science source, 17(1), 11.

- Hubinger J. C. (2010). A survey of phthalate esters in consumer cosmetic products. *Journal of cosmetic science*, 61(6), 457–465.
- Ikonopoulou, M. P., Olszowy, H., Limpus, C., Francis, R., & Whittier, J. (2011). Trace element concentrations in nesting flatback turtles (*Natator depressus*) from Curtis Island, Queensland, Australia. *Marine environmental research*, 71(1), 10–16.
- Imran, M., Das, K. R., & Naik, M. M. (2019). Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. *Chemosphere*, 215, 846–857.
- Jantzen, C. E., Annunziato, K. M., & Cooper, K. R. (2016). Behavioral, morphometric, and gene expression effects in adult zebrafish (*Danio rerio*) embryonically exposed to PFOA, PFOS, and PFNA. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 180, 123–130.
- Jeon, J., Kannan, K., Lim, H. K., Moon, H. B., & Kim, S. D. (2010). Bioconcentration of perfluorinated compounds in blackrock fish, *Sebastes schlegeli*, at different salinity levels. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(11), 2529–2535.
- Jerez, S., Motas, M., Cánovas, R. A., Talavera, J., Almela, R. M., & Del Río, A. B. (2010). Accumulation and tissue distribution of heavy metals and essential elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Spanish Mediterranean coastline of Murcia. *Chemosphere*, 78(3), 256–264.
- Jergensen, T., Cusmano, D., & Roy, N. M. (2019). Di-butyl phthalate (DBP) induces craniofacial defects during embryonic development in zebrafish. *Ecotoxicology (London, England)*, 28(8), 995–1002.
- Jiang, H., Zhou, R., Yang, Y., Chen, B., Cheng, Z., Zhang, M., Li, J., Zhang, G., & Zou, S. (2018). Characterizing the antibiotic resistance genes in a river catchment: Influence of anthropogenic activities. *Journal of environmental sciences (China)*, 69, 125–132.
- Jjemba P. K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(1), 113–130.
- Jonsson, S., & Baun, A. (2003). Toxicity of mono-and diesters of o-phthalic esters to a crustacean, a green alga, and a bacterium. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(12), 3037–3043.
- Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Oehme, G., Focardi, S., & Giesy, J. P. (2002). Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and

birds from coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas. *Environmental science & technology*, 36(15), 3210–3216. <https://doi.org/10.1021/es020519q>

- Kannan, K., Tao, L., Sinclair, E., Pastva, S. D., Jude, D. J., and Giesy, J. P. (2005). Perfluorinated compounds in aquatic organisms at various trophic levels in a Great Lakes food chain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48, 559–566.
- Kar, S., Sepúlveda, M. S., Roy, K., & Leszczynski, J. (2017). Endocrine-disrupting activity of per- and polyfluoroalkyl substances: Exploring combined approaches of ligand and structure based modeling. *Chemosphere*, 184, 514–523.
- Kaska, Y., Celik, A., Bag, H., Aureggi, M., Ozel, K., Elci, A., Kaska, A., Elca, L., (2004). Heavy metal monitoring in stranded sea turtles along the Mediterranean coast of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 13 (8), 769-776.
- Kato, K., Calafat, A. M., Wong, L. Y., Wanigatunga, A. A., Caudill, S. P., & Needham, L. L. (2009). Polyfluoroalkyl compounds in pooled sera from children participating in the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2002. *Environmental science & technology*, 43(7), 2641–2647.
- Kato, K., Wong, L. Y., Jia, L. T., Kuklenyik, Z., & Calafat, A. M. (2011). Trends in exposure to polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. Population: 1999-2008. *Environmental science & technology*, 45(19), 8037–8045.
- Keller J. M. (2013). Forty-seven days of decay does not change persistent organic pollutant levels in loggerhead sea turtle eggs. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(4), 747–756.
- Keller, J. M., Alava, J. J., Aleksa, K., Young, B., & Kucklick, J. R. (2005). Spatial trends of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in loggerhead sea turtle eggs and plasma. *Organohalogen Compounds*, 67, 610-611.
- Kensa, V. M. (2011). Bioremediation-an overview. *Journal of Industrial Pollution Control*, 27(2), 161-168.
- Khatibi, S. A., Hamidi, S., & Siah-Shadbad, M. R. (2021). Current trends in sample preparation by solid-phase extraction techniques for the determination of antibiotic residues in foodstuffs: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(20), 3361–3382.
- Kim, M., Park, M. S., Son, J., Park, I., Lee, H. K., Kim, C., Min, B. H., Ryoo, J., Choi, K. S., Lee, D. S., & Lee, H. S. (2015). Perfluoroheptanoic acid affects amphibian embryogenesis by inducing the phosphorylation of ERK and JNK. *International journal of molecular medicine*, 36(6), 1693–1700.

- Kirchman, D. L., Yu, L., & Cottrell, M. T. (2003). Diversity and abundance of uncultured cytophaga-like bacteria in the Delaware estuary. *Applied and environmental microbiology*, 69(11), 6587–6596.
- Koelmans, A. A., Bakir, A., Burton, G. A., & Janssen, C. R. (2016). Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. *Environmental science & technology*, 50(7), 3315–3326.
- Koponen, J., Airaksinen, R., Hallikainen, A., Vuorinen, P. J., Mannio, J., & Kiviranta, H. (2015). Perfluoroalkyl acids in various edible Baltic, freshwater, and farmed fish in Finland. *Chemosphere*, 129, 186–191.
- Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms*, 7(6), 180.
- Kucharzyk, K. H., Darlington, R., Benotti, M., Deeb, R., & Hawley, E. (2017). Novel treatment technologies for PFAS compounds: A critical review. *Journal of environmental management*, 204(Pt 2), 757–764.
- Kühn, S., & van Franeker, J. A. (2020). Quantitative overview of marine debris ingested by marine megafauna. *Marine pollution bulletin*, 151, 110858.
- Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere*, 75(4), 417–434.
- Kwiatkowski, C. F., Andrews, D. Q., Birnbaum, L. S., Bruton, T. A., DeWitt, J. C., Knappe, D., Maffini, M. V., Miller, M. F., Pelch, K. E., Reade, A., Soehl, A., Trier, X., Venier, M., Wagner, C. C., Wang, Z., & Blum, A. (2020). Scientific Basis for Managing PFAS as a Chemical Class. *Environmental science & technology letters*, 7(8), 532–543.
- Labadie, P., & Chevreuil, M. (2011). Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 159(2), 391–397.
- Laganà, P., Caruso, G., Corsi, I., Bergami, E., Venuti, V., Majolino, D., La Ferla, R., Azzaro, M., & Cappello, S. (2019). Do plastics serve as a possible vector for the spread of antibiotic resistance? First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica). *International journal of hygiene and environmental health*, 222(1), 89–100.
- Lam, J. C., Tanabe, S., Chan, S. K., Lam, M. H., Martin, M., & Lam, P. K. (2006). Levels of trace elements in green turtle eggs collected from Hong Kong: Evidence of risks due to selenium and nickel. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 144(3), 790–801.

- Lam, N. H., Cho, C. R., Kannan, K., & Cho, H. S. (2017). A nationwide survey of perfluorinated alkyl substances in waters, sediment and biota collected from aquatic environment in Vietnam: Distributions and bioconcentration profiles. *Journal of hazardous materials*, 323(Pt A), 116–127.
- Latała, A., Nędzi, M., & Stepnowski, P. (2009). Acute toxicity assessment of perfluorinated carboxylic acids towards the Baltic microalgae. *Environmental toxicology and pharmacology*, 28(2), 167–171.
- Latini G. (2005). Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 361(1-2), 20–29.
- Lau, T. K., Chu, W., & Graham, N. (2005). The degradation of endocrine disruptor di-n-butyl phthalate by UV irradiation: a photolysis and product study. *Chemosphere*, 60(8), 1045–1053.
- Lee, H., De Silva, A. O., & Mabury, S. A. (2012). Dietary bioaccumulation of perfluorophosphonates and perfluorophosphinates in juvenile rainbow trout: evidence of metabolism of perfluorophosphinates. *Environmental science & technology*, 46(6), 3489–3497.
- Lee, Y. M., Lee, J. Y., Kim, M. K., Yang, H., Lee, J. E., Son, Y., Kho, Y., Choi, K., & Zoh, K. D. (2020). Concentration and distribution of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the Asan Lake area of South Korea. *Journal of hazardous materials*, 381, 120909.
- Leonard, A., Zhang, L., Balfour, A. J., Garside, R., Hawkey, P. M., Murray, A. K., Ukoumunne, O. C., & Gaze, W. H. (2018). Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant E. coli in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environment international*, 114, 326–333.
- Lesch, V., Bouwman, H., Kinoshita, A., & Shibata, Y. (2017). First report of perfluoroalkyl substances in South African Odonata. *Chemosphere*, 175, 153–160.
- Li M. H. (2009). Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to plants and aquatic invertebrates. *Environmental toxicology*, 24(1), 95–101.
- Li, F., Yu, Y., Guo, M., Lin, Y., Jiang, Y., Qu, M., Sun, X., Li, Z., Zhai, Y., & Tan, Z. (2021). Integrated analysis of physiological, transcriptomics and metabolomics provides insights into detoxication disruption of PFOA exposure in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 214, 112081.
- Liew, Z., Goudarzi, H., & Oulhote, Y. (2018). Developmental Exposures to Perfluoroalkyl Substances (PFASs): An Update of Associated Health Outcomes. *Current environmental health reports*, 5(1), 1–19.

- Lilienthal, H., Dieter, H. H., Hölzer, J., & Wilhelm, M. (2017). Recent experimental results of effects of perfluoroalkyl substances in laboratory animals - Relation to current regulations and guidance values. *International journal of hygiene and environmental health*, 220(4), 766–775.
- Liu, C., Chang, V. W., Gin, K. Y., & Nguyen, V. T. (2014). Genotoxicity of perfluorinated chemicals (PFCs) to the green mussel (*Perna viridis*). *The Science of the total environment*, 487, 117–122.
- Liu, S., Zhao, H., LehmLer, H. J., Cai, X., & Chen, J. (2017). Antibiotic Pollution in Marine Food Webs in Laizhou Bay, North China: Trophodynamics and Human Exposure Implication. *Environmental science & technology*, 51(4), 2392–2400.
- Liu, Y., Dyall-Smith, M., Marendra, M., Hu, H. W., Browning, G., & Billman-Jacobe, H. (2020). Antibiotic Resistance Genes in Antibiotic-Free Chicken Farms. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(3), 120.
- Liu, Y., Guan, Y., Yang, Z., Cai, Z., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhu, W., & Zhang, X. (2009). Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology (London, England)*, 18(3), 293–303.
- Liu, Y., Liu, W., Yang, X., Wang, J., Lin, H., & Yang, Y. (2021). Microplastics are a hotspot for antibiotic resistance genes: Progress and perspective. *The Science of the total environment*, 773, 145643.
- Logeshwaran, P., Sivaram, A. K., Surapaneni, A., Kannan, K., Naidu, R., & Megharaj, M. (2021). Exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) but not perfluorooctanoic acid (PFOA) at ppb concentration induces chronic toxicity in *Daphnia carinata*. *The Science of the total environment*, 769, 144577.
- Loi, E. I., Yeung, L. W., Taniyasu, S., Lam, P. K., Kannan, K., & Yamashita, N. (2011). Trophic magnification of poly- and perfluorinated compounds in a subtropical food web. *Environmental science & technology*, 45(13), 5506–5513.
- Lottrup, G., Andersson, A. M., Leffers, H., Mortensen, G. K., Toppari, J., Skakkebaek, N. E., & Main, K. M. (2006). Possible impact of phthalates on infant reproductive health. *International journal of andrology*, 29(1), 172–185.
- Lou, Q. Q., Zhang, Y. F., Zhou, Z., Shi, Y. L., Ge, Y. N., Ren, D. K., Xu, H. M., Zhao, Y. X., Wei, W. J., & Qin, Z. F. (2013). Effects of perfluorooctanesulfonate and perfluorobutanesulfonate on the growth and sexual development of *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology (London, England)*, 22(7), 1133–1144.

- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., & J J Alvarez, P. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental science & technology*, 44(19), 7220–7225.
- Machado, I., Moura, P., Pereira, F., Vasconcelos, P., & Gaspar, M. B. (2019). Reproductive cycle of the commercially harvested sea urchin (*Paracentrotus lividus*) along the western coast of Portugal. *Invertebrate Biology*, 138(1), 40-54.
- Maffucci, F., Caurant, F., Bustamante, P., & Bentivegna, F. (2005). Trace element (Cd, Cu, Hg, Se, Zn) accumulation and tissue distribution in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the Western Mediterranean Sea (southern Italy). *Chemosphere*, 58(5), 535–542.
- Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*, 40(2), 294–309.
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2013). Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one*, 8(1), e55387.
- Marrone, V., Piscopo, M., Romano, G., Ianora, A., Palumbo, A., & Costantini, M. (2012). Defense against toxic diatom aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *PloS one*, 7(2), e31750.
- Marti, E., & Balcázar, J. L. (2013). Real-Time PCR assays for quantification of qnr genes in environmental water samples and chicken feces. *Applied and environmental microbiology*, 79(5), 1743–1745.
- Marti, E., Jofre, J., & Balcazar, J. L. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PloS one*, 8(10), e78906.
- Martin, J. W., Ellis, D. A., Mabury, S. A., Hurley, M. D., & Wallington, T. J. (2006). Atmospheric chemistry of perfluoroalkanesulfonamides: kinetic and product studies of the OH radical and Cl atom initiated oxidation of N-ethyl perfluorobutanesulfonamide. *Environmental science & technology*, 40(3), 864–872.
- Martin, J. W., Mabury, S. A., Solomon, K. R., & Muir, D. C. (2003). Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental toxicology and chemistry*, 22(1), 196–204.
- Martín, J., Hidalgo, F., García-Corcoles, M. T., Ibáñez-Yuste, A. J., Alonso, E., Vilchez, J. L., & Zafra-Gómez, A. (2019). Bioaccumulation of perfluoroalkyl substances in marine echinoderms:

Results of laboratory-scale experiments with *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791. *Chemosphere*, 215, 261–271.

- Martínez-López, E., Herrero, D., López-Berenguer, G., & Peñalver, J. (2021). Total Arsenic Concentrations in Sea Turtle Tissues from the Mediterranean Coast of Spain. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 107(5), 820–826.
- Mascarenhas, R., Santos, R., & Zeppelini, D. (2004). Plastic debris ingestion by sea turtle in Paraíba, Brazil. *Marine pollution bulletin*, 49(4), 354–355.
- Masullo, T., Biondo, G., Natale, M. D., Tagliavia, M., Bennici, C. D., Musco, M., Ragusa, M. A., Costa, S., Cuttitta, A., & Nicosia, A. (2021). Gene Expression Changes after Parental Exposure to Metals in the Sea Urchin Affect Timing of Genetic Programme of Embryo Development. *Biology*, 10(2), 103.
- Matiddi, M., Hochscheid, S., Camedda, A., Baini, M., Cocumelli, C., Serena, F., Tomassetti, P., Travaglini, A., Marra, S., Campani, T., Scholl, F., Mancusi, C., Amato, E., Briguglio, P., Maffucci, F., Fossi, M. C., Bentivegna, F., & de Lucia, G. A. (2017). Loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): A target species for monitoring litter ingested by marine organisms in the Mediterranean Sea. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 230, 199–209.
- Matranga, V., Pinsino, A., Celi, M., Natoli, A., Bonaventura, R., Schröder, H. C., & Müller, W. E. (2005). Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. *Progress in molecular and subcellular biology*, 39, 85–110.
- Mattei, D., Veschetti, E., D'Ilio, S., & Blasi, M. F. (2015). Mapping elements distribution in carapace of *Caretta caretta*: A strategy for biomonitoring contamination in sea turtles?. *Marine pollution bulletin*, 98(1-2), 341–348.
- Matyar F. (2012). Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(3), 551–556.
- Maugeri, T. L., Carbone, M., Fera, M. T., Irrera, G. P., & Gugliandolo, C. (2004). Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. *Journal of applied microbiology*, 97(2), 354–361.
- Maveekumbure Manthreethilaka Jayasiri Gamaralalage Chathuri, N. J., Yadav, S., Propper, C. R., Kumar, V., Dayawansa, N., & Singleton, G. R. (2021). Assessing Potential Environmental Impacts of Pesticide Usage in Paddy Ecosystems: A Case Study in the Deduru Oya River Basin, Sri Lanka. *Environmental toxicology and chemistry*, 10.1002/etc.5261. Advance online

publication.

- McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L., 2004. Overview of phytoremediation and control of wastes. In: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.), *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants*. John Wiley and Sons Inc, Hoboken, New Jersey, pp. 1–58.
- Meeker, J. D., Sathyanarayana, S., & Swan, S. H. (2009). Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 2097–2113.
- Menéndez-Pedriza, A., & Jaumot, J. (2020). Interaction of Environmental Pollutants with Microplastics: A Critical Review of Sorption Factors, Bioaccumulation and Ecotoxicological Effects. *Toxics*, 8(2), 40.
- Mhadhbi, L., Rial, D., Pérez, S., & Beiras, R. (2012). Ecological risk assessment of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in marine environment using *Isochrysis galbana*, *Paracentrotus lividus*, *Siriella armata* and *Psetta maxima*. *Journal of environmental monitoring: JEM*, 14(5), 1375–1382.
- Migliaccio, O., Castellano, I., Romano, G., & Palumbo, A. (2014). Stress response to cadmium and manganese in *Paracentrotus lividus* developing embryos is mediated by nitric oxide. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 156, 125–134.
- Miner, K. R., Clifford, H., Taruscio, T., Potocki, M., Solomon, G., Ritari, M., Napper, I. E., Gajurel, A. P., & Mayewski, P. A. (2021). Deposition of PFAS 'forever chemicals' on Mt. Everest. *The Science of the total environment*, 759, 144421.
- Mittal, V. K., & Ng, C. A. (2018). Formation of PFAAs in fish through biotransformation: A PBPK approach. *Chemosphere*, 202, 218–227.
- Momper, L., Aronson, H. S., & Amend, J. P. (2018). Genomic Description of 'Candidatus Abyssobacteria,' a Novel Subsurface Lineage Within the Candidate Phylum Hydrogenedentes. *Frontiers in microbiology*, 9, 1993.
- Montazeri, P., Fossati, S., Warembourg, C., Casas, M., Clemente, D., Garcia-Esteban, R., Nawrot, T. S., & Vrijheid, M. (2021). Prenatal exposure to phthalates and phenols and preclinical vascular health during early adolescence. *International journal of hygiene and environmental health*, 240, 113909.
- Montes-Santiago, J. (2013). The lead-poisoned genius: saturnism in famous artists across five centuries. *Progress in brain research*, 203, 223-240.

- Morão, I., Lemos, M., Félix, R., Vieira, S., Barata, C., & Novais, S. C. (2022). Stress response markers in the blood of São Tomé green sea turtles (*Chelonia mydas*) and their relation with accumulated metal levels. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 293, 118490.
- Mrosovsky, N., Ryan, G.D., James, M.C., 2009. Leatherback turtles: the menace of plastic. *Marine pollution bulletin*, 58, 287–289.
- Muller, J. K., Gross, T. S., & Borgert, C. J. (2007). Topical dose delivery in the reptilian egg treatment model. *Environmental toxicology and chemistry*, 26(5), 914–919.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Muñoz, C. C., & Vermeiren, P. (2020). Maternal Transfer of Persistent Organic Pollutants to Sea Turtle Eggs: A Meta-Analysis Addressing Knowledge and Data Gaps Toward an Improved Synthesis of Research Outputs. *Environmental toxicology and chemistry*, 39(1), 9–29.
- Munoz, G., Budzinski, H., Babut, M., Lobry, J., Selleslagh, J., Tapie, N., & Labadie, P. (2019). Temporal variations of perfluoroalkyl substances partitioning between surface water, suspended sediment, and biota in a macrotidal estuary. *Chemosphere*, 233, 319–326.
- Mwakalapa, E. B., Mmochi, A. J., Müller, M., Mdegela, R. H., Lyche, J. L., & Polder, A. (2018). Occurrence and levels of persistent organic pollutants (POPs) in farmed and wild marine fish from Tanzania. A pilot study. *Chemosphere*, 191, 438–449.
- Naile, J. E., Khim, J. S., Hong, S., Park, J., Kwon, B. O., Ryu, J. S., Hwang, J. H., Jones, P. D., & Giesy, J. P. (2013). Distributions and bioconcentration characteristics of perfluorinated compounds in environmental samples collected from the west coast of Korea. *Chemosphere*, 90(2), 387–394.
- Nakata, H., Kannan, K., Nasu, T., Cho, H. S., Sinclair, E., & Takemurai, A. (2006). Perfluorinated contaminants in sediments and aquatic organisms collected from shallow water and tidal flat areas of the Ariake Sea, Japan: environmental fate of perfluorooctane sulfonate in aquatic ecosystems. *Environmental science & technology*, 40(16), 4916–4921.
- Nakayama, S.F., Yoshikane, M., Onoda, Y., Nishihama, Y., Iwai-Shimada, M., Takagi, M., Kobayashi, Y., Isobe, T. (2019). Worldwide trends in tracing poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 121, 115410.
- Napper, I. E., & Thompson, R. C. (2016). Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Marine pollution bulletin*, 112(1-2), 39–45.

- Napper, I. E., & Thompson, R. C. (2020). Plastic Debris in the Marine Environment: History and Future Challenges. *Global challenges (Hoboken, NJ)*, 4(6), 1900081.
- Nedergaard, R. I., Risgaard-Petersen, N., & Finster, K. (2002). The importance of sulfate reduction associated with *Ulva lactuca* thalli during decomposition: a mesocosm experiment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 275(1), 15-29.
- Nelms, S. E., Duncan, E. M., Broderick, A. C., Galloway, T. S., Godfrey, M. H., Hamann, M., Lindeque, P. K., Godley, B. J. (2016). Plastic and marine turtles: a review and call for research. *ICES Journal of Marine Science*, 73(2), 165-181.
- Nelms, S. E., Galloway, T. S., Godley, B. J., Jarvis, D. S., & Lindeque, P. K. (2018). Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 238, 999–1007.
- Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A., & Ouddane, B. (2015). Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environmental science & technology*, 49(7), 4019–4035.
- Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes*, 15(4), 209–215.
- Nøst, T. H., Halse, A. K., Schlabach, M., Bäcklund, A., Eckhardt, S., & Breivik, K. (2018). Low concentrations of persistent organic pollutants (POPs) in air at Cape Verde. *The Science of the total environment*, 612, 129–137.
- Novillo, O., Pertusa, J. F., & Tomás, J. (2017). Exploring the presence of pollutants at sea: Monitoring heavy metals and pesticides in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the western Mediterranean. *The Science of the total environment*, 598, 1130–1139.
- O'Carroll, R. E., Masterton, G., Dougall, N., Ebmeier, K. P., & Goodwin, G. M. (1995). The neuropsychiatric sequelae of mercury poisoning: the Mad Hatter's disease revisited. *The British Journal of Psychiatry*, 167(1), 95-98.
- Oberbeckmann, S., & Labrenz, M. (2020). Marine Microbial Assemblages on Microplastics: Diversity, Adaptation, and Role in Degradation. *Annual review of marine science*, 12, 209–232.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., Wollenberger, L., Santos, E. M., Paull, G. C., Van Look, K. J., & Tyler, C. R. (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 2047–2062.
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych,

- T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., & Surani, M. A. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, *436*(7048), 207–213.
- Orecchio, S., Indelicato, R., & Barreca, S. (2013). The distribution of phthalate esters in indoor dust of Palermo (Italy). *Environmental geochemistry and health*, *35*(5), 613–624.
 - Pace, A., Dipineto, L., Fioretti, A., & Hochscheid, S. (2019b). Loggerhead sea turtles as sentinels in the western Mediterranean: antibiotic resistance and environment-related modifications of Gram-negative bacteria. *Marine pollution bulletin*, *149*, 110575.
 - Pace, A., Rinaldi, L., Ianniello, D., Borrelli, L., Cringoli, G., Fioretti, A., Hochscheid, S., & Dipineto, L. (2019a). Gastrointestinal investigation of parasites and Enterobacteriaceae in loggerhead sea turtles from Italian coasts. *BMC veterinary research*, *15*(1), 370.
 - Paiano, V., Fattore, E., Carrà, A., Generoso, C., Fanelli, R., & Bagnati, R. (2012). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic Acid in fish fillet samples. *Journal of analytical methods in chemistry*, *2012*, 719010.
 - Palmer, K., Bangma, J. T., Reiner, J. L., Bonde, R. K., Korte, J. E., Boggs, A. S., & Bowden, J. A. (2019). Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in plasma of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*). *Marine pollution bulletin*, *140*, 610–615.
 - Paluselli, A., Fauvelle, V., Galgani, F., & Sempéré, R. (2019). Phthalate Release from Plastic Fragments and Degradation in Seawater. *Environmental science & technology*, *53*(1), 166–175.
 - Pan, X., Qiang, Z., Ben, W., & Chen, M. (2011). Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Chemosphere*, *84*(5), 695–700.
 - Park, K., Kim, W. S., Choi, B., & Kwak, I. S. (2020). Expression Levels of the Immune-Related p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Transcript in Response to Environmental Pollutants on *Macrophthalmus japonicus* Crab. *Genes*, *11*(9), 958.
 - Parmar, T. K.; Rawtani, D.; Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: The natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, *9*, 110–118.
 - Pascariello, S.; Mazzoni, M.; Bettinetti, R.; Manca, M.; Patelli, M.; Piscia, R.; Valsecchi, S.; Polesello, S. (2019). Organic Contaminants in Zooplankton of Italian Subalpine Lakes: Patterns of Distribution and Seasonal Variations. *Water*, *11*, 1901.
 - Pei, R., Kim, S. C., Carlson, K. H., & Pruden, A. (2006). Effect of river landscape on the

sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water research*, 40(12), 2427–2435.

- Peijnenburg, W. J. G. M. (2008). Phthalates. *Encyclopedia of Ecology*, 2008, 2733-2738.
- Penry, D. L. (1998), Applications of efficiency measurements in bioaccumulation studies: Definitions, clarifications, and a critique of methods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 1633-1639.
- Pepi, M., & Focardi, S. (2021). Antibiotic-Resistant Bacteria in Aquaculture and Climate Change: A Challenge for Health in the Mediterranean Area. *International journal of environmental research and public health*, 18(11), 5723.
- Pereira, A., Santos, A., Tacão, M., Alves, A., Henriques, I., & Correia, A. (2013). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *The Science of the total environment*, 461-462, 65–71.
- Perelo L. W. (2010). Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), 81–89.
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 9, 2928.
- Pilon-Smits E. (2005). Phytoremediation. *Annual review of plant biology*, 56, 15–39.
- Pinsino, A., Della Torre, C., Sammarini, V., Bonaventura, R., Amato, E., & Matranga, V. (2008). Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy. *Cell biology and toxicology*, 24(6), 541–552.
- Pitt J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30(1), 19–34.
- Pontes, D. S., Pinheiro, F. A., Lima-Bittencourt, C. I., Guedes, R. L., Cursino, L., Barbosa, F., Santos, F. R., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. (2009). Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. *Microbial ecology*, 58(4), 762–772.
- Prabhu R.N., Lakshmipraba J. (2022) Persistent Organic Pollutants (Part I): The “Dirty Dozen” – Sources and Adverse Effects. In: Vasanthi M., Sivasankar V., Sunitha T.G. (eds) Organic Pollutants. Emerging Contaminants and Associated Treatment Technologies. Springer, Cham.

- Prabhu R.N., Lakshmi Praba J. (2022) Persistent Organic Pollutants (Part II): The New POPs – Sources and Adverse Effects. In: Vasanthi M., Sivasankar V., Sunitha T.G. (eds) Organic Pollutants. Emerging Contaminants and Associated Treatment Technologies. Springer, Cham.
- Prevedouros, K., Cousins, I. T., Buck, R. C., & Korzeniowski, S. H. (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental science & technology*, 40(1), 32–44.
- Prichula, J., Pereira, R. I., Wachholz, G. R., Cardoso, L. A., Tolfo, N., Santestevan, N. A., Medeiros, A. W., Tavares, M., Frazzon, J., d'Azevedo, P. A., & Frazzon, A. (2019). Corrigendum "Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil" [Mar. Pollut. Bull. 105 (2016) 51-57]. *Marine pollution bulletin*, 141, 655–656.
- Pruesse, E., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(14), 1823–1829.
- Prüst, M., Meijer, J., & Westerink, R. (2020). The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Particle and fibre toxicology*, 17(1), 24.
- Puckowski, A., Mioduszevska, K., Łukaszewicz, P., Borecka, M., Caban, M., Maszkowska, J., & Stepnowski, P. (2016). Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 127, 232–255.
- Pulcinella, J., Bonanomi, S., Colombelli, A., Fortuna, C. M., Moro, F., Lucchetti, A., & Sala, A. (2019). Bycatch of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) in the Italian Adriatic midwater pair trawl fishery. *Frontiers in Marine Science*, 6, 365.
- Qian, X., Li, J., Xu, S., Wan, Y., Li, Y., Jiang, Y., Zhao, H., Zhou, Y., Liao, J., Liu, H., Sun, X., Liu, W., Peng, Y., Hu, C., Zhang, B., Lu, S., Cai, Z., & Xia, W. (2019). Prenatal exposure to phthalates and neurocognitive development in children at two years of age. *Environment international*, 131, 105023.
- Radke, E. G., Yost, E. E., Roth, N., Sathyanarayana, S., & Whaley, P. (2020). Application of US EPA IRIS systematic review methods to the health effects of phthalates: Lessons learned and path forward. *Environment international*, 145, 105820.
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment international*, 146, 106274.

- Ragusa, M. A., Costa, S., Cuttitta, A., Gianguzza, F., & Nicosia, A. (2017a). Coexposure to sulfamethoxazole and cadmium impairs development and attenuates transcriptional response in sea urchin embryo. *Chemosphere*, *180*, 275–284.
- Ragusa, M. A., Costa, S., Gianguzza, M., Roccheri, M. C., & Gianguzza, F. (2013). Effects of cadmium exposure on sea urchin development assessed by SSH and RT-qPCR: metallothionein genes and their differential induction. *Molecular biology reports*, *40*(3), 2157–2167.
- Ragusa, M. A., Nicosia, A., Costa, S., Cuttitta, A., & Gianguzza, F. (2017b). Metallothionein Gene Family in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus*: Gene Structure, Differential Expression and Phylogenetic Analysis. *International journal of molecular sciences*, *18*(4), 812.
- Rand, G. M. (Ed.). (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. CRC press.
- Rasmussen, R. R., Søndergaard, A. B., Bøknæs, N., Cederberg, T. L., Sloth, J. J., & Granby, K. (2017). Effects of industrial processing on essential elements and regulated and emerging contaminant levels in seafood. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *104*, 85–94.
- Rech, S., Borrell, Y., & García-Vazquez, E. (2016). Marine litter as a vector for non-native species: What we need to know. *Marine pollution bulletin*, *113*(1-2), 40–43.
- Rewerts, J. N., Christie, E. C., Robel, A. E., Anderson, T. A., McCarthy, C., Salice, C. J., & Field, J. A. (2021). Key Considerations for Accurate Exposures in Ecotoxicological Assessments of Perfluorinated Carboxylates and Sulfonates. *Environmental toxicology and chemistry*, *40*(3), 677–688.
- Rie, M. T., Lendas, K. A., & Callard, I. P. (2001). Cadmium: tissue distribution and binding protein induction in the painted turtle, *Chrysemys picta*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, *130*(1), 41–51.
- Rigét, F., Bignert, A., Braune, B., Dam, M., Dietz, R., Evans, M., Green, N., Gunnlaugsdóttir, H., Hoydal, K. S., Kucklick, J., Letcher, R., Muir, D., Schuur, S., Sonne, C., Stern, G., Tomy, G., Vorkamp, K., & Wilson, S. (2019). Temporal trends of persistent organic pollutants in Arctic marine and freshwater biota. *The Science of the total environment*, *649*, 99–110.
- Rizzo, L., Gernjak, W., Krzeminski, P., Malato, S., McArdell, C. S., Perez, J., Schaar, H., & Fatta-Kassinos, D. (2020). Best available technologies and treatment trains to address current challenges in urban wastewater reuse for irrigation of crops in EU countries. *The Science of the total environment*, *710*, 136312.

- Rocha, A. C., Camacho, C., Eljarrat, E., Peris, A., Aminot, Y., Readman, J. W., Boti, V., Nannou, C., Marques, A., Nunes, M. L., & Almeida, C. M. (2018). Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental research*, *161*, 354–363.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T., & Teh, S. J. (2013). Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific reports*, *3*, 3263.
- Rodriguez, K. L., Hwang, J. H., Esfahani, A. R., Sadmani, A., & Lee, W. H. (2020). Recent Developments of PFAS-Detecting Sensors and Future Direction: A Review. *Micromachines*, *11*(7), 667.
- Roosa, S., Wattiez, R., Prygiel, E., Lesven, L., Billon, G., & Gillan, D. C. (2014). Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, *189*, 143–151.
- Rosewarne, C. P., Pettigrove, V., Stokes, H. W., & Parsons, Y. M. (2010). Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS microbiology ecology*, *72*(1), 35–46.
- Ross, D. A., Guzman, H. M., Potvin, C., & van Hinsberg, V. J. (2017). A review of toxic metal contamination in marine turtle tissues and its implications for human health. *Regional Studies in Marine Science*, *15*, 1-9.
- Rowdhwal, S., & Chen, J. (2018). Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed research international*, *2018*, 1750368.
- Ruocco, N., Costantini, M., & Santella, L. (2016). New insights into negative effects of lithium on sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. *Scientific reports*, *6*, 32157.
- Sakurai, T., Kobayashi, J., Kinoshita, K., Ito, N., Serizawa, S., Shiraishi, H., Lee, J. H., Horiguchi, T., Maki, H., Mizukawa, K., Imaizumi, Y., Kawai, T., & Suzuki, N. (2013). Transfer kinetics of perfluorooctane sulfonate from water and sediment to a marine benthic fish, the marbled flounder (*Pseudopleuronectes yokohamae*). *Environmental toxicology and chemistry*, *32*(9), 2009–2017.
- Sanfilippo, S. (2017). Ordinanza n. 08 del 17 marzo 2017 - Divieto di Balneazione. <http://www.albopretorionline.info/santaflavia/pdf/Ordinanza%20Sindacale%20n%2008%20del%2017-03-17.pdf>
- San-Segundo, L., Guimarães, L., Fernández Torija, C., Beltrán, E. M., Guilhermino, L., &

Pablos, M. V. (2016). Alterations in gene expression levels provide early indicators of chemical stress during *Xenopus laevis* embryo development: A case study with perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Ecotoxicology and environmental safety*, 127, 51–60.

- Santestevan, N. A., de Angelis Zvoboda, D., Prichula, J., Pereira, R. I., Wachholz, G. R., Cardoso, L. A., de Moura, T. M., Medeiros, A. W., de Amorin, D. B., Tavares, M., d'Azevedo, P. A., Franco, A. C., Frazzon, J., & Frazzon, A. P. (2015). Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). *World journal of microbiology & biotechnology*, 31(12), 1935–1946.
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Hemavathy, R. V., Jeevanantham, S., Harikumar, P., Priyanka, G., & Devakirubai, D. (2021). A comprehensive review on sources, analysis and toxicity of environmental pollutants and its removal methods from water environment. *The Science of the total environment*, 812, 152456. Advance online publication.
- Sargent, P. J., Farnaud, S., & Evans, R. W. (2005). Structure/function overview of proteins involved in iron storage and transport. *Current medicinal chemistry*, 12(23), 2683–2693.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725–759.
- Sauvé, S., & Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central journal*, 8(1), 15.
- Savoca, D., & Pace, A. (2021). Bioaccumulation, Biodistribution, Toxicology and Biomonitoring of Organofluorine Compounds in Aquatic Organisms. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6276.
- Savoca, D., Arculeo, M., Arizza, V., Pace, A., Melfi, R., Caracappa, S., Caracappa, G., Vullo, C., Cambera, I., Visconti, G., Giudice, V., D'Oca, G., Messina, S., Maccotta, A. (2022). Impact of Heavy Metals in Eggs and Tissues of *C. caretta* along the Sicilian Coast (Mediterranean Sea). *Environments*, 9, 88.
- Savoca, D., Arculeo, M., Barreca, S., Buscemi, S., Caracappa, S., Gentile, A., Persichetti, M. F., & Pace, A. (2018). Chasing phthalates in tissues of marine turtles from the Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 127, 165–169.
- Savoca, D., Arculeo, M., Vecchioni, L., Cambera, I., Visconti, G., Melfi, R., Arizza, V., Palumbo Piccionello, A., Buscemi, S., & Pace, A. (2021a). Can phthalates move into the eggs

of the loggerhead sea turtle *Caretta caretta*? The case of the nests on the Linosa Island in the Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 168, 112395.

- Savoca, D., Melfi, R., Palumbo Piccionello, A., Barreca, S., Buscemi, S., Arizza, V., Arculeo, M., & Pace, A. (2021b). Presence and biodistribution of perfluorooctanoic acid (PFOA) in *Paracentrotus lividus* highlight its potential application for environmental biomonitoring. *Scientific reports*, 11(1), 18763.
- Schmale, M. C., Nairn, R. S., & Winn, R. N. (2007). Aquatic animal models of human disease. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 145(1), 1–4.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., & Larsen, J. L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four danish rainbow trout farms. *Applied and environmental microbiology*, 66(11), 4908–4915.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 3(6), 1101–1108.
- Schuetze, A., Heberer, T., Effkemann, S., & Juergensen, S. (2010). Occurrence and assessment of perfluorinated chemicals in wild fish from Northern Germany. *Chemosphere*, 78(6), 647–652.
- Schultes, L., Sandblom, O., Broeg, K., Bignert, A., & Benskin, J. P. (2020). Temporal Trends (1981–2013) of Per- and Polyfluoroalkyl Substances and Total Fluorine in Baltic cod (*Gadus morhua*). *Environmental toxicology and chemistry*, 39(2), 300–309.
- Schulz, K., Silva, M. R., & Klaper, R. (2020). Distribution and effects of branched versus linear isomers of PFOA, PFOS, and PFHxS: A review of recent literature. *The Science of the total environment*, 733, 139186.
- Schulz, N., Wagner, C. I., Ebeling, J., Raddatz, G., Diddens-de Buhr, M. F., Lyko, F., & Kurtz, J. (2018). Dnmt1 has an essential function despite the absence of CpG DNA methylation in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Scientific reports*, 8(1), 16462.
- Schuyler, Q. A., Wilcox, C., Townsend, K. A., Wedemeyer-Strombel, K. R., Balazs, G., van Sebille, E., & Hardesty, B. D. (2016). Risk analysis reveals global hotspots for marine debris ingestion by sea turtles. *Global change biology*, 22(2), 567–576.
- Sebaugh J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics*, 10(2), 128–134.
- Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., Shinbori, K.,

- Motoyama, H., Kohshima, S., & Ushida, K. (2013). Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 127–134.
- Seiler, C., & Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in microbiology*, 3, 399.
 - Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology*, 4, 47.
 - Senta, I., Terzic, S., & Ahel, M. (2013). Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment. *Water research*, 47(2), 705–714.
 - Serratore, P., Ostanello, F., Passalacqua, P. L., Zavatta, E., Bignami, G., Serraino, A., & Giacometti, F. (2016). First Multi-Year Retrospective Study on *Vibrio Parhaemolyticus* and *Vibrio Vulnificus* Prevalence in *Ruditapes Philippinarum* Harvested in Sacca Di Goro, Italy. *Italian journal of food safety*, 5(4), 6161.
 - Shaikh, I. V., & Shaikh, V. (2021). A comprehensive review on assessment of plastic debris in aquatic environment and its prevalence in fishes and other aquatic animals in India. *The Science of the total environment*, 779, 146421.
 - Shi, Y., Pan, Y., Wang, J., & Cai, Y. (2012). Distribution of perfluorinated compounds in water, sediment, biota and floating plants in Baiyangdian Lake, China. *Journal of environmental monitoring: JEM*, 14(2), 636–642.
 - Shi, Y., Song, X., Jin, Q., Li, W., He, S., & Cai, Y. (2020). Tissue distribution and bioaccumulation of a novel polyfluoroalkyl benzenesulfonate in crucian carp. *Environment international*, 135, 105418.
 - Silva, C. M., Evangelista-Barreto, N. S., Vieira, R., Mendonça, K. V., & Sousa, O. V. (2014). Population dynamics and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. along a salinity gradient in an urban estuary in Northeastern Brazil. *Marine pollution bulletin*, 89(1-2), 96–101.
 - Sinaei, M., & Bolouki, M. (2017). Metals in Blood and Eggs of Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*) from Nesting Colonies of the Northern Coast of the Sea of Oman. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 73(4), 552–561.
 - Singh, K. P., Miaskowski, C., Dhruva, A. A., Flowers, E., & Kober, K. M. (2018). Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression. *Biological research for nursing*, 20(4), 369–382.

- Smaldone, G., Marrone, R., Cappiello, S., Martin, G. A., Oliva, G., Cortesi, M. L., & Anastasio, A. (2014). Occurrence of antibiotic resistance in bacteria isolated from seawater organisms caught in Campania Region: preliminary study. *BMC veterinary research*, *10*, 161.
- Smith, L. C., Ghosh, J., Buckley, K. M., Clow, L. A., Dheilly, N. M., Haug, T., Henson, J. H., Li, C., Lun, C. M., Majeske, A.J, Matranga, V., Nair, S. V., Rast, J. P., Raftos, D. A., Roth, M., Sacchi, S., Schrankel, C. S, & Stensvåg, K. (2010). Echinoderm immunity. *Invertebrate immunity*, 260-301.
- Soualili, D., Dubois, P., Gosselin, P., Pernet, P., & Guillou, M. (2008). Assessment of seawater pollution by heavy metals in the neighbourhood of Algiers: use of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*, as a bioindicator. *ICES Journal of Marine Science*, *65*(2), 132-139.
- Souza, N., Carneiro, M., Pimentel, E. F., Frossard, A., Freire, J. B., Endringer, D. C., & Ferreira Júnior, P. D. (2018). Trace elements influence the hatching success and emergence of *Caretta caretta* and *Chelonia mydas*. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, *50*, 117–122.
- Spaan, K. M., van Noordenburg, C., Plassmann, M. M., Schultes, L., Shaw, S., Berger, M., Heide-Jørgensen, M. P., Rosing-Asvid, A., Granquist, S. M., Dietz, R., Sonne, C., Rigét, F., Roos, A., & Benskin, J. P. (2020). Fluorine Mass Balance and Suspect Screening in Marine Mammals from the Northern Hemisphere. *Environmental science & technology*, *54*(7), 4046–4058.
- Spaan, K. M., van Noordenburg, C., Plassmann, M. M., Schultes, L., Shaw, S., Berger, M., Heide-Jørgensen, M. P., Rosing-Asvid, A., Granquist, S. M., Dietz, R., Sonne, C., Rigét, F., Roos, A., & Benskin, J. P. (2021). Correction to Fluorine Mass Balance and Suspect Screening in Marine Mammals from the Northern Hemisphere. *Environmental science & technology*, *55*(9), 6518–6520.
- Sparling, D. W. (2016). *Ecotoxicology essentials: environmental contaminants and their biological effects on animals and plants*. Academic Press.
- Squadrone, S., Ciccotelli, V., Favaro, L., Scanzio, T., Prearo, M., & Abete, M. C. (2014). Fish consumption as a source of human exposure to perfluorinated alkyl substances in Italy: analysis of two edible fish from Lake Maggiore. *Chemosphere*, *114*, 181–186.
- Stabili, L., & Pagliara, P. (2015). The sea urchin *Paracentrotus lividus* immunological response to chemical pollution exposure: The case of lindane. *Chemosphere*, *134*, 60–66.
- Stahl, L. L., Snyder, B. D., Olsen, A. R., Kincaid, T. M., Wathen, J. B., & McCarty, H. B.

(2014). Perfluorinated compounds in fish from US urban rivers and the Great Lakes. *Science of the total environment*, 499, 185-195.

- Stamper, M.A., Whitaker, B.R., Schofield, T.D., 2006. Case study: morbidity in a pygmy sperm whale *Kogia Breviceps* due to ocean-bourne plastic. *Marine mammal science*, 22, 719–722.
- Staples, C. A., Adams, W. J., Parkerton, T. F., Gorsuch, J. W., Biggingers, G. R., Reiner, K. H. (1997). Aquatic Toxicity of Eighteen Phthalate Esters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(5), 875–891.
- Stefani, F., Rusconi, M., Valsecchi, S., & Marziali, L. (2014). Evolutionary ecotoxicology of perfluoralkyl substances (PFASs) inferred from multigenerational exposure: a case study with *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 156, 41–51.
- Stewart, J. R., Townsend, F. I., Lane, S. M., Dyar, E., Hohn, A. A., Rowles, T. K., Staggs, L. A., Wells, R. S., Balmer, B. C., & Schwacke, L. H. (2014). Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA. *Diseases of aquatic organisms*, 108(2), 91–102.
- Stewart, K. R., Keller, J. M., Templeton, R., Kucklick, J. R., & Johnson, C. (2011). Monitoring persistent organic pollutants in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) confirms maternal transfer. *Marine pollution bulletin*, 62(7), 1396–1409.
- Stoll, C., Sidhu, J. P., Tiehm, A., & Toze, S. (2012). Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environmental science & technology*, 46(17), 9716–9726.
- Stoneburner, D. L., Nicora, M. N., & Blood, E. R. (1980). Heavy Metals in Loggerhead Sea Turtle Eggs (*Caretta caretta*): Evidence to Support the Hypothesis That Demes Exist in the Western Atlantic Population. *Journal of Herpetology*, 14(2), 171–175.
- Storelli, M. M., & Marcotrigiano, G. O. (2003). Heavy metal residues in tissues of marine turtles. *Marine pollution bulletin*, 46(4), 397–400.
- Storelli, M. M., Ceci, E., & Marcotrigiano, G. O. (1998). Distribution of heavy metal residues in some tissues of *Caretta caretta* (Linnaeus) specimen beached along the Adriatic Sea (Italy). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 60(4), 546–552.
- Storelli, M. M., Storelli, A., D'Addabbo, R., Marano, C., Bruno, R., & Marcotrigiano, G. O. (2005). Trace elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the eastern Mediterranean Sea: overview and evaluation. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 135(1),

- Streit B. (1998). Bioaccumulation of contaminants in fish. *EXS*, 86, 353–387.
- Su, S., Li, C., Yang, J., Xu, Q., Qiu, Z., Xue, B., Wang, S., Zhao, C., Xiao, Z., Wang, J., & Shen, Z. (2020). Distribution of Antibiotic Resistance Genes in Three Different Natural Water Bodies- A Lake, River and Sea. *International journal of environmental research and public health*, 17(2), 552.
- Sucato, A., Vecchioni, L., Savoca, D., Presentato, A., Arculeo, M., & Alduina, R. (2021). A Comparative Analysis of Aquatic and Polyethylene-Associated Antibiotic-Resistant Microbiota in the Mediterranean Sea. *Biology*, 10(3), 200.
- Sugawara, N. (1974). Toxic effect of a normal series of phthalate esters on the hatching of shrimp eggs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 30, 87–89.
- Suja, F., Pramanik, B. K., & Zain, S. M. (2009). Contamination, bioaccumulation and toxic effects of perfluorinated chemicals (PFCs) in the water environment: a review paper. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 60(6), 1533–1544.
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. (2018). Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Frontiers in microbiology*, 9, 2066.
- Sun, B., Li, Q., Zheng, M., Su, G., Lin, S., Wu, M., Li, C., Wang, Q., Tao, Y., Dai, L., Qin, Y., & Meng, B. (2020). Recent advances in the removal of persistent organic pollutants (POPs) using multifunctional materials: a review. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 265(Pt A), 114908.
- Sunderland, E. M., Hu, X. C., Dassuncao, C., Tokranov, A. K., Wagner, C. C., & Allen, J. G. (2019). A review of the pathways of human exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) and present understanding of health effects. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 29(2), 131–147.
- Suzuki, K. T., Someya, A., Komada, Y., & Ogra, Y. (2002). Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *Journal of inorganic biochemistry*, 88(2), 173–182.
- Sznajder-Katarzynska, K., Surma, M., Cieslik, I. (2019). A Review of Perfluoroalkyl Acids (PFAAs) in terms of Sources, Applications, Human Exposure, Dietary Intake, Toxicity, Legal Regulation, and Methods of Determination. *Journal of Chemistry*, 2019, 2717528.
- Tahseen, Q. (2009). Coelomocytes: Biology and possible immune functions in invertebrates

with special remarks on nematodes. *International Journal of Zoology*, 2009.

- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PloS one*, 9(8), e105592.
- Talavera-Saenz, A., Gardner, S. C., Riosmena Rodriguez, R., & Acosta Vargas, B. (2007). Metal profiles used as environmental markers of green turtle (*Chelonia mydas*) foraging resources. *The Science of the total environment*, 373(1), 94–102.
- Talsness, C. E., Andrade, A. J., Kuriyama, S. N., Taylor, J. A., & vom Saal, F. S. (2009). Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 2079–2096.
- Taniyasu, S., Kannan, K., Horii, Y., Hanari, N., & Yamashita, N. (2003). A survey of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds in water, fish, birds, and humans from Japan. *Environmental science & technology*, 37(12), 2634–2639.
- Tapiero, H., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 57(9), 399–411.
- Tapilatu, R.F, Wona, H., Siburian, R.H.S., Saleda, S.T., 2020. Heavy metals contaminants in the eggs and temperatures of nesting beaches of sea turtles in Kaimana, West Papua, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 21. 4582-4590.
- Taylor, J. R (1982). *An introduction to error analysis: The study of uncertainties in physical measurements*. Mill Valley, Calif: University Science Books.
- Taylor, M. L., Gwinnett, C., Robinson, L. F., & Woodall, L. C. (2016). Plastic microfibre ingestion by deep-sea organisms. *Scientific reports*, 6, 33997.
- Teaf, C. M., Garber, M. M., Covert, D. J., & Tuovila, B. J. (2019). Perfluorooctanoic acid (PFOA): environmental sources, chemistry, toxicology, and potential risks. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 28(3), 258-273., C. M., Garber, M. M., Covert, D. J., & Tuovila, B. J. (2019). Perfluorooctanoic acid (PFOA): environmental sources, chemistry, toxicology, and potential risks. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 28(3), 258-273.
- Teunen, L., Bervoets, L., Belpaire, C., De Jonge, M., & Groffen, T. (2021). PFAS accumulation in indigenous and translocated aquatic organisms from Belgium, with translation to human and

ecological health risk. *Environmental Sciences Europe*, 33(1), 1-19.

- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Galloway, T. S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P. H., Tana, T. S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M. P., Akkhavong, K., Ogata, Y., ... Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 2027–2045.
- Thomas, S. G., Glover, M. A., Parthasarathy, A., Wong, N. H., Shipman, P. A., & Hudson, A. O. (2020). Expression of a Shiga-Like Toxin during Plastic Colonization by Two Multidrug-Resistant Bacteria, *Aeromonas hydrophila* RIT668 and *Citrobacter freundii* RIT669, Isolated from Endangered Turtles (*Clemmys guttata*). *Microorganisms*, 8(8), 1172.
- Thompson, L. A., & Darwish, W. S. (2019). Environmental Chemical Contaminants in Food: Review of a Global Problem. *Journal of toxicology*, 2019, 2345283.
- Tittlemier, S. A., Pepper, K., Seymour, C., Moisey, J., Bronson, R., Cao, X. L., & Dabeka, R. W. (2007). Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(8), 3203–3210.
- Tomás, J., Guitart, R., Mateo, R., & Raga, J. A. (2002). Marine debris ingestion in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from the Western Mediterranean. *Marine pollution bulletin*, 44(3), 211–216.
- Tomšić, S., Conides, A., Radić, I. D., & Glamuzina, B. (2010). Growth, size class frequency and reproduction of purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in Bistrina Bay (Adriatic Sea, Croatia). *Acta adriatica*, 51(1), 67.
- Torrent, A., González-Díaz, O. M., Monagas, P., & Orós, J. (2004). Tissue distribution of metals in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Marine pollution bulletin*, 49(9-10), 854–860.
- Tu, C., Chen, T., Zhou, Q., Liu, Y., Wei, J., Waniek, J. J., & Luo, Y. (2020). Biofilm formation and its influences on the properties of microplastics as affected by exposure time and depth in the seawater. *The Science of the total environment*, 734, 139237.
- Tu, W., Martínez, R., Navarro-Martin, L., Kostyniuk, D. J., Hum, C., Huang, J., Deng, M., Jin, Y., Chan, H. M., & Mennigen, J. A. (2019). Bioconcentration and Metabolic Effects of Emerging PFOS Alternatives in Developing Zebrafish. *Environmental science &*

technology, 53(22), 13427–13439.

- Ulhaq, M., Sundström, M., Larsson, P., Gabriëlsson, J., Bergman, Å., Norrgren, L., & Örn, S. (2015). Tissue uptake, distribution and elimination of (14)C-PFOA in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 163, 148–157.
- UN WWAP (2003). United Nations World Water Assessment Programme. The World Water Development Report 1: Water for People, Water for Life. UNESCO: Paris, France.
- Urry, L. A., Hamilton, P. C., Killian, C. E., & Wilt, F. H. (2000). Expression of spicule matrix proteins in the sea urchin embryo during normal and experimentally altered spiculogenesis. *Developmental biology*, 225(1), 201–213.
- Valdivia, P. A., Zenteno-Savín, T., Gardner, S. C., & Alonso Aguirre, A. (2007). Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 146(1-2), 111–117.
- Valsecchi, S., Babut, M., Mazzoni, M., Pascariello, S., Ferrario, C., De Felice, B., Bettinetti, R., Veyrand, B., Marchand, P., & Polesello, S. (2021). Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Fish from European Lakes: Current Contamination Status, Sources, and Perspectives for Monitoring. *Environmental toxicology and chemistry*, 40(3), 658–676.
- Valsecchi, S., Conti, D., Crebelli, R., Polesello, S., Rusconi, M., Mazzoni, M., Preziosi, E., Carere, M., Lucentini, L., Ferretti, E., Balzamo, S., Simeone, M. G., & Aste, F. (2017). Deriving environmental quality standards for perfluorooctanoic acid (PFOA) and related short chain perfluorinated alkyl acids. *Journal of hazardous materials*, 323(Pt A), 84–98.
- Valsecchi, S., Rusconi, M., & Polesello, S. (2013). Determination of perfluorinated compounds in aquatic organisms: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(1), 143–157.
- Van de Merwe, J. P., Hodge, M., Olszowy, H. A., Whittier, J. M., Ibrahim, K., & Lee, S. Y. (2009). Chemical contamination of green turtle (*Chelonia mydas*) eggs in peninsular Malaysia: implications for conservation and public health. *Environmental health perspectives*, 117(9), 1397–1401.
- Van de Merwe, J. P., Hodge, M., Olszowy, H. A., Whittier, J. M., & Lee, S. Y. (2010a). Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Marine pollution bulletin*, 60(4), 579–588.
- Van de Merwe, J. P., Hodge, M., Whittier, J. M., Ibrahim, K., & Lee, S. Y. (2010b). Persistent organic pollutants in the green sea turtle *Chelonia mydas*: Nesting population variation, maternal transfer, and effects on development. *Marine Ecology Progress Series*, 403, 269–278.

- Vandermeersch, G., Lourenço, H. M., Alvarez-Muñoz, D., Cunha, S., Diogène, J., Cano-Sancho, G., Sloth, J. J., Kwadijk, C., Barcelo, D., Allegaert, W., Bekaert, K., Fernandes, J. O., Marques, A., & Robbens, J. (2015). Environmental contaminants of emerging concern in seafood--European database on contaminant levels. *Environmental research*, 143(Pt B), 29–45.
- Varrella, S., Romano, G., Ianora, A., Bentley, M. G., Ruocco, N., & Costantini, M. (2014). Molecular response to toxic diatom-derived aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine drugs*, 12(4), 2089–2113.
- Vega-Moreno, D., Abaroa-Pérez, B., Rein-Loring, P. D., Presas-Navarro, C., Fraile-Nuez, E., & Machín, F. (2021). Distribution and transport of microplastics in the upper 1150 m of the water column at the Eastern North Atlantic Subtropical Gyre, Canary Islands, Spain. *The Science of the total environment*, 788, 147802.
- Velasco, J., Hedman, C., Portern, W., Dollinger, R., Lenz, A., (2017). Measurement of monoester phthalate metabolites as markers of phthalate contamination in eggs of *Dermochelys coriacea* and *Caretta caretta*. In: Proceedings of the 37th International Sea Turtle Symposium. Memorandum, NOAA Technical.
- Vierke, L.; Staude, C.; Biegel-Engler, A.; Drost, W.; Schulte, C. (2012). Perfluorooctanoic acid (PFOA) – Main concerns and regulatory developments in Europe from an environmental point of view. *Environmental Sciences Europe*, 24, 16.
- Villanger, G. D., Kovacs, K. M., Lydersen, C., Haug, L. S., Sabaredzovic, A., Jenssen, B. M., & Routti, H. (2020). Perfluoroalkyl substances (PFASs) in white whales (*Delphinapterus leucas*) from Svalbard - A comparison of concentrations in plasma sampled 15 years apart. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 263(Pt A), 114497.
- Villaverde-de-Sáa, E., Quintana, J. B., Rodil, R., Ferrero-Refojos, R., Rubí, E., & Cela, R. (2012). Determination of perfluorinated compounds in mollusks by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(1), 509–518.
- Vitale, M., Gaglio, S., Galluzzo, P., Cascone, G., Piraino, C., Di Marco Lo Presti, V., & Alduina, R. (2018). Antibiotic Resistance Profiling, Analysis of Virulence Aspects and Molecular Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolated in Sicily, Italy. *Foodborne pathogens and disease*, 15(3), 177–185.
- Vitale, M., Galluzzo, P., Buffa, P. G., Carlino, E., Spezia, O., & Alduina, R. (2019). Comparison of Antibiotic Resistance Profile and Biofilm Production of *Staphylococcus aureus* Isolates

Derived from Human Specimens and Animal-Derived Samples. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 8(3), 97.

- Waldron, H. A. (1983). Did the Mad Hatter have mercury poisoning?. *British medical journal* (Clinical research ed.), 287(6409), 1961.
- Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., & Peakall, D. B. (2006). *Principles of Ecotoxicology*. by CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL.
- Wallace, C. C., Yund, P. O., Ford, T. E., Matassa, K. A., & Bass, A. L. (2013). Increase in antimicrobial resistance in bacteria isolated from stranded marine mammals of the Northwest Atlantic. *EcoHealth*, 10(2), 201–210.
- Wallington, T. J., Andersen, M., & Nielsen, O. J. (2021). The case for a more precise definition of regulated PFAS. *Environmental science. Processes & impacts*, 23(12), 1834–1838.
- Wang, C., Zeng, T., Gu, C., Zhu, S., Zhang, Q., & Luo, X. (2019). Photodegradation Pathways of Typical Phthalic Acid Esters Under UV, UV/TiO₂, and UV-Vis/Bi₂WO₆ Systems. *Frontiers in chemistry*, 7, 852.
- Wang, F., Shih, K. M., & Li, X. Y. (2015a). The partition behavior of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanesulfonamide (FOSA) on microplastics. *Chemosphere*, 119, 841–847.
- Wang, J., Chen, G., Christie, P., Zhang, M., Luo, Y., & Teng, Y. (2015b). Occurrence and risk assessment of phthalate esters (PAEs) in vegetables and soils of suburban plastic film greenhouses. *The Science of the total environment*, 523, 129–137.
- Wang, L., Wu, W. M., Bolan, N. S., Tsang, D., Li, Y., Qin, M., & Hou, D. (2021a). Environmental fate, toxicity and risk management strategies of nanoplastics in the environment: Current status and future perspectives. *Journal of hazardous materials*, 401, 123415.
- Wang, Y., Zhu, H., & Kannan, K. (2019). A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics*, 7(2), 21.
- Wang, Z., Buser, A. M., Cousins, I. T., Demattio, S., Drost, W., Johansson, O., Ohno, K., Patlewicz, G., Richard, A. M., Walker, G. W., White, G. S., & Leinala, E. (2021b). A New OECD Definition for Per- and Polyfluoroalkyl Substances. *Environmental science & technology*, 55(23), 15575–15578.
- Wardrop, P., Shimeta, J., Nugegoda, D., Morrison, P. D., Miranda, A., Tang, M., & Clarke, B. O. (2016). Chemical Pollutants Sorbed to Ingested Microbeads from Personal Care Products Accumulate in Fish. *Environmental science & technology*, 50(7), 4037–4044.

- Waseem, H., Williams, M. R., Jameel, S., & Hashsham, S. A. (2018). Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation*, 90(10), 865–884.
- Wasel, O., Thompson, K. M., Gao, Y., Godfrey, A. E., Gao, J., Mahapatra, C. T., Lee, L. S., Sepúlveda, M. S., & Freeman, J. L. (2021). Comparison of zebrafish in vitro and in vivo developmental toxicity assessments of perfluoroalkyl acids (PFAAs). *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 84(3), 125–136.
- Wayman, C., & Niemann, H. (2021). The fate of plastic in the ocean environment - a minireview. *Environmental science. Processes & impacts*, 23(2), 198–212.
- Weisbrod, A. V., Woodburn, K. B., Koelmans, A. A., Parkerton, T. F., McElroy, A. E., & Borgå, K. (2009). Evaluation of bioaccumulation using in vivo laboratory and field studies. *Integrated environmental assessment and management*, 5(4), 598–623.
- Wilson-Sanders S. E. (2011). Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. *ILAR journal*, 52(2), 126–152.
- Wöhler, L., Hoekstra, A.Y., Hogeboom, R.J., Brugnach, M., & Krol, M.S. (2020). Alternative societal solutions to pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Cleaner Production*, 277, 124350.
- Wong, F., Hung, H., Dryfhout-Clark, H., Aas, W., Bohlin-Nizzetto, P., Breivik, K., Mastromonaco, M. N., Lundén, E. B., Ólafsdóttir, K., Sigurðsson, Á., Vorkamp, K., Bossi, R., Skov, H., Hakola, H., Barresi, E., Sverko, E., Fellin, P., Li, H., Vlasenko, A., Zapevalov, M., ... Wilson, S. (2021). Time trends of persistent organic pollutants (POPs) and Chemicals of Emerging Arctic Concern (CEAC) in Arctic air from 25 years of monitoring. *The Science of the total environment*, 775, 145109.
- Wright G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews. Microbiology*, 5(3), 175–186.
- Wu, C., Zhang, K., Huang, X., & Liu, J. (2016). Sorption of pharmaceuticals and personal care products to polyethylene debris. *Environmental science and pollution research international*, 23(9), 8819–8826.
- Wu, Y., Wang, Y., Li, J., Zhao, Y., Guo, F., Liu, J., & Cai, Z. (2012). Perfluorinated compounds in seafood from coastal areas in China. *Environment international*, 42, 67–71.
- Xiao, F. (2017). Emerging poly- and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment: A review of current literature. *Water research* 124, 482–495.

- Xu, S., Zhang, H., Pao, P. C., Lee, A., Wang, J., Suen Chan, Y., Manno Iii, F., Wan Chan, S., Han Cheng, S., & Chen, X. (2020). Exposure to phthalates impaired neurodevelopment through estrogenic effects and induced DNA damage in neurons. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 222, 105469.
- Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Petrick, G., & Gamo, T. (2005). A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Marine pollution bulletin*, 51(8-12), 658–668.
- Yang, Y., Liu, G., Song, W., Ye, C., Lin, H., Li, Z., & Liu, W. (2019). Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environment international*, 123, 79–86.
- Yang, Y., Liu, W., Zhang, Z., Grossart, H. P., & Gadd, G. M. (2020). Microplastics provide new microbial niches in aquatic environments. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(15), 6501–6511.
- Yang, Y., Xu, C., Cao, X., Lin, H., & Wang, J. (2017). Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. *Ecotoxicology (London, England)*, 26(6), 831–840.
- Ye, L., Wu, L. L., Jiang, Y. X., Zhang, C. J., & Chen, L. (2009). Toxicological study of PFOS/PFOA to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue*, 30(6), 1727–1732.
- Yeh, A., Marcinek, D. J., Meador, J. P., & Gallagher, E. P. (2017). Effect of contaminants of emerging concern on liver mitochondrial function in Chinook salmon. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 190, 21–31.
- Yeung, L. W., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, P. K., Sinha, R. K., Borole, D. V., & Kannan, K. (2009). A survey of perfluorinated compounds in surface water and biota including dolphins from the Ganges River and in other waterbodies in India. *Chemosphere*, 76(1), 55–62.
- Yipel, M., Tekeli, İ. O., İşler, C. T., & Altuğ, M. E. (2017). Heavy metal distribution in blood, liver and kidneys of Loggerhead (*Caretta caretta*) and Green (*Chelonia mydas*) sea turtles from the Northeast Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 125(1-2), 487–491.
- Yoshizawa, N., Usui, M., Fukuda, A., Asai, T., Higuchi, H., Okamoto, E., Seki, K., Takada, H., & Tamura, Y. (2020). Manure Compost Is a Potential Source of Tetracycline-Resistant *Escherichia coli* and Tetracycline Resistance Genes in Japanese Farms. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(2), 76.
- Zafeiraki, E., Gebbink, W. A., Hoogenboom, R., Kotterman, M., Kwadijk, C., Dassenakis, E., &

- van Leeuwen, S. (2019a). Occurrence of perfluoroalkyl substances (PFASs) in a large number of wild and farmed aquatic animals collected in the Netherlands. *Chemosphere*, 232, 415–423.
- Zafeiraki, E., Gebbink, W. A., van Leeuwen, S., Dassenakis, E., & Megalofonou, P. (2019b). Occurrence and tissue distribution of perfluoroalkyl substances (PFASs) in sharks and rays from the eastern Mediterranean Sea. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 252(Pt A), 379–387.
 - Zavala-Norzagaray, A. A., Aguirre, A. A., Velazquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N., Ley-Quíñonez, C. P., Hernández-Díaz, L., & Canizalez-Roman, A. (2015). Isolation, characterization, and antibiotic resistance of *Vibrio* spp. in sea turtles from Northwestern Mexico. *Frontiers in microbiology*, 6, 635.
 - Zeng, F., Cui, K., Xie, Z., Wu, L., Liu, M., Sun, G., Lin, Y., Luo, D., & Zeng, Z. (2008). Phthalate esters (PAEs): emerging organic contaminants in agricultural soils in peri-urban areas around Guangzhou, China. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 156(2), 425–434.
 - Zhang, D. Q., Zhang, W. L., & Liang, Y. N. (2019). Adsorption of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) from aqueous solution - A review. *The Science of the total environment*, 694, 133606.
 - Zhang, L., Liu, J., Liu, H., Wan, G., & Zhang, S. (2015). The occurrence and ecological risk assessment of phthalate esters (PAEs) in urban aquatic environments of China. *Ecotoxicology (London, England)*, 24(5), 967–984.
 - Zhang, Q., Sun, Y., Zhang, Q., Hou, J., Wang, P., Kong, X., & Sundell, J. (2020a). Phthalate exposure in Chinese homes and its association with household consumer products. *The Science of the total environment*, 719, 136965.
 - Zhang, X. X., Zhang, T., & Fang, H. H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(3), 397–414.
 - Zhang, Y., Li, Y., Su, F., Peng, L., & Liu, D. (2022a). The life cycle of micro-nano plastics in domestic sewage. *The Science of the total environment*, 802, 149658.
 - Zhang, Y., Wang, J., Lu, J., & Wu, J. (2020b). Antibiotic resistance genes might serve as new indicators for wastewater contamination of coastal waters: Spatial distribution and source apportionment of antibiotic resistance genes in a coastal bay. *Ecological Indicators*, 114, 106299.
 - Zhang, Z., Sarkar, D., Biswas, J. K., & Datta, R. (2022b). Biodegradation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A review. *Bioresource technology*, 344(Pt B), 126223.

- Zhao, Y., Gao, J., Wang, Z., Dai, H., & Wang, Y. (2021). Responses of bacterial communities and resistance genes on microplastics to antibiotics and heavy metals in sewage environment. *Journal of hazardous materials*, 402, 123550.
- Zheng, G., Miller, P., von Hippel, F. A., Buck, C. L., Carpenter, D. O., & Salamova, A. (2020). Legacy and emerging semi-volatile organic compounds in sentinel fish from an arctic formerly used defense site in Alaska. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 259, 113872.
- Zhou, L. J., Ying, G. G., Liu, S., Zhang, R. Q., Lai, H. J., Chen, Z. F., & Pan, C. G. (2013). Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. *The Science of the total environment*, 444, 183–195.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., & Jiang, G. (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica chimica acta*, 606(2), 135–150.
- Zothanpuia, Passari, A. K., Leo, V. V., Singh, B. P. (2018). Freshwater Actinobacteria. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 67–77.
- Zuo, R., Hou, S., Wu, F., Song, J., Zhang, W., Zhao, C., & Chang, Y. (2017). Higher dietary protein increases growth performance, anti-oxidative enzymes activity and transcription of heat shock protein 70 in the juvenile sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) under a heat stress. *Aquaculture and fisheries*, 2(1), 18-23.

