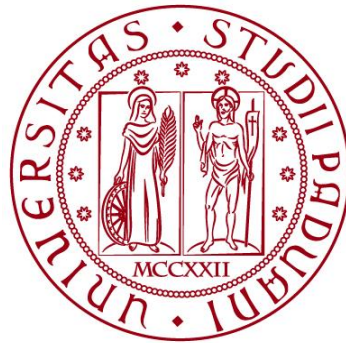


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Effetti combinati di cambiamenti climatici e  
microplastiche negli echinodermi**

**Tutor: Prof.ssa Maria Gabriella Marin  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Valeria Francesca Corvini**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



## INDICE

|   |               |
|---|---------------|
| <b>1. Introduzione.....</b>   | <b>Pag. 1</b> |
| <b>2. Ricci di mare come organismi modello .....</b>  | <b>Pag.1</b>  |
| <b>3. Acidificazione delle acque.....</b>   | <b>Pag.3</b>  |
| 3.1 Effetti dell'acidificazione negli echinodermi.....  | Pag.4         |
| <b>4. Microplastiche.....</b>   | <b>Pag.7</b>  |
| 4.1 Effetti delle microplastiche negli echinodermi.....   | Pag.8         |
| <b>5. Effetti combinati di microplastiche e acidificazione.....</b>   | <b>Pag.11</b> |
| 5.1 La lisciviazione abiotica della plastica contribuisce<br>all'acidificazione degli oceani.....   | Pag.11        |
| 5.2 Effetto combinato di microplastiche e fattori di cambiamento<br>climatico sullo sviluppo e la crescita larvale del riccio di<br>mare..... | Pag.13        |
| <b>6. Conclusioni.....</b>  | <b>Pag.17</b> |
| <b>7. Letteratura citata.....</b>   | <b>Pag.18</b> |



## 1. INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni gli effetti di industrializzazione, agricoltura intensiva e sviluppo delle grandi città hanno avuto come conseguenza un cambiamento degli ecosistemi marini e impattato la qualità di questi ambienti. L'inquinamento viene trasportato dai fiumi agli oceani o direttamente rilasciato in essi, considerando che il 70-80% della popolazione vive in aree costiere (Parra-Luna et al., 2020; Ventura et al., 2023). I sedimenti assorbono molti inquinanti ma ne sono anche la fonte in quanto nel momento in cui le particelle che li compongono vengono risospese nella colonna d'acqua, a causa di eventi naturali o attività antropiche, le sostanze chimiche tossiche vengono mobilizzate e rese quindi nuovamente biodisponibili. Gli echinodermi svolgono un importante ruolo negli ecosistemi marini e sono utilizzati come indicatori biologici per la loro ampia distribuzione e la facilità con cui possono essere utilizzati per esperimenti di laboratorio. Tra gli echinodermi i ricci di mare sono una componente fondamentale negli habitat costituiti da fondali duri e svolgono l'importante ruolo di controllare le dinamiche della comunità vegetale (Grosso et al., 2021, 2022). Una diminuzione della loro popolazione può portare ad un'eccessiva proliferazione algale, mentre la sovrappopolazione può portare a fondali marini con poca o nessuna vegetazione (noti con il termine *barren*), con conseguente scomparsa della biodiversità. Uno sviluppo anormale delle comunità di ricci di mare potrebbe portare a variare la struttura delle popolazioni e delle comunità marine (Guarnieri et al., 2020; Manzo et al., 2022). Questi organismi sono inoltre utilizzati in molti studi di ecotossicologia in quanto le loro larve si sono dimostrate estremamente sensibili ad un'ampia gamma di contaminanti ed altri stressori ambientali, possono quindi essere considerati come riferimento rilevante nella valutazione dello stato dell'ambiente marino (Morrone et al., 2023).

## 2. RICCI DI MARE COME ORGANISMI MODELLO

I ricci di mare sono degli Echinoidei Regolari. Gli Echinodermi, in quanto deuterostomi, condividono origini comuni con i Cordati da cui si sono separati prima del periodo Cambriano. Proprio queste caratteristiche li hanno resi di particolare interesse per studi incentrati su sviluppo ed evoluzione (Figura 1).

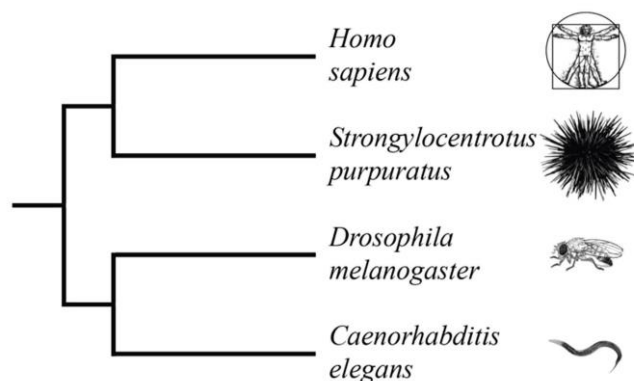


Figura 1: albero filogenetico troncato di organismi modello utilizzati più comunemente negli studi biologici (da McClay, 2011).

Da tempo, alcune specie di echinoidei in particolare (ad es. *Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Strongylocentrotus intermedius*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Lytechinus variegatus*, *Paracentrotus lividus*, e *Mesocentrotus franciscanus*) sono ampiamente utilizzate come modelli sperimentali nello studio della biologia dello sviluppo (McClay, 2011). La fase iniziale dell'embriogenesi del riccio di mare è stata utilizzata per studiare la comunicazione intercellulare e l'adesione cellulare, meccanismi di controllo del ciclo cellulare, segnalazione del calcio, fecondazione, differenziazione cellulare, sopravvivenza e morte cellulare.

Le specie considerate "organismo modello" devono avere alcune caratteristiche che permettano il loro facile utilizzo. Il riccio di mare le possiede, infatti si riproduce facilmente in laboratorio, si possono ottenere colture embrionali sincrone e l'embriogenesi procede rapidamente, la larva è trasparente quindi si può facilmente controllare il suo sviluppo e ha una struttura semplice, ma caratterizzata da fasi successive morfologicamente ben differenziate e quindi identificabili. Il sequenziamento del genoma e la descrizione di complesse reti di regolazione genica durante l'embriogenesi del riccio di mare lo hanno reso un modello ideale per lo studio della regolazione dell'espressione genica.

Molti degli studi riguardanti i ricci di mare sono stati svolti esponendo le larve a inquinanti. Le caratteristiche dello sviluppo di questi organismi permettono in tempi brevi una precisa definizione degli effetti tossici in funzione della concentrazione di contaminanti. I fattori di stress esercitano vari tipi di interferenza sui meccanismi che regolano lo sviluppo dell'embrione e la crescita della larva e hanno come risultato anomalie che molto spesso precludono il raggiungimento dello stadio adulto. Se la larva riuscisse a crescere fino a metamorfosare in adulto potrebbero emergere ulteriori anomalie come, ad esempio, la presenza di uno scheletro debole o tessuti danneggiati dai contaminanti, morfologia alterata e infertilità. Inoltre, sottoponendo stadi vitali diversi (gameti, zigoti, embrioni precoci, gastrule, larve) agli stessi inquinanti, gli effetti cambiano evidenziando condizioni diverse di

sensibilità in base allo stadio di sviluppo, al meccanismo d'azione e alla concentrazione dell'inquinante (Gambardella et al., 2021).

Gli echinodermi essendo organismi calcificanti sono sensibili alle variazioni di pH, infatti, l'alterazione del valore di quest'ultimo porta all'indebolimento delle strutture scheletriche presenti sia nelle larve che negli adulti composte da carbonato di calcio e magnesio e proprio per questo motivo sono presi come esempio nello studio degli effetti dell'acidificazione dei mari. Questo fenomeno si verifica perché la CO<sub>2</sub> disciolta in acqua di mare produce acido carbonico, ma un aumentato assorbimento di CO<sub>2</sub> riduce la concentrazione di carbonati nell'acqua. Di conseguenza, gli organismi calcificanti, che utilizzano ioni calcio e carbonati disciolti in acqua di mare per costruire gusci e scheletri, si trovano a dover far fronte a questa mancanza.

In questo lavoro ci concentreremo sullo studio dei ricci di mare per analizzare l'impatto che i cambiamenti ambientali possono avere su questa importante componente delle comunità bentoniche marine. Cambiamenti ambientali e presenza di inquinanti influenzano i processi di interazione tra uovo e spermatozoo e tra embrione e ambiente; quindi, possono condizionare la fecondazione e il normale sviluppo dei ricci di mare. Di conseguenza, anomalie a carico degli stadi embrionali e larvali sono state spesso utilizzate come biomarcatori di alterazioni ambientali. (Moulin et al., 2011; Carballeira et al., 2012; Morroni et al., 2018; Chiarelli et al., 2019).

Tra le specie di riccio di mare prese in considerazione per gli studi di ecotossicità, *Paracentrotus lividus* è una delle più utilizzate, recentemente anche, per la valutazione del rischio tossicologico rappresentato da diversi contaminanti emergenti.

In seguito saranno analizzate le principali anomalie morfologiche causate in *P. lividus* dall'esposizione a valori di pH inferiori al range ottimale e saranno esaminati i rischi che possono derivare dalla presenza nell'ambiente di nuovi contaminanti come micro- e nanoplastiche.

### 3. ACIDIFICAZIONE DELLE ACQUE

Le attività antropiche, come l'uso di combustibili fossili hanno causato l'aumento della concentrazione atmosferica di anidride carbonica da 280 ad oltre 400 mg/l (IPCC, 2013). Questo innalzamento dei livelli di CO<sub>2</sub> atmosferica sta portando all'aumento della temperatura dell'acqua di mare, inoltre ne sta modificando la chimica poiché, disciogliendosi nelle acque superficiali, la CO<sub>2</sub> produce una diminuzione del pH e della concentrazione di ioni carbonato (Caldeira and Wickett, 2003; Orr, 2011). Lo stato di saturazione dell'acqua ( $\Omega$ ) per i minerali di carbonato di calcio è fortemente influenzato dalla riduzione degli ioni carbonato. Questi minerali sono costituenti di diversi organismi marini, tra i quali gli echinodermi che producono calcite ad alto contenuto in magnesio, una delle forme più solubili di calcio carbonato (Morse et al., 2006).

L'acidificazione degli oceani incorpora tre fattori di stress che agiscono con modalità diverse sulla fisiologia larvale. Il pH più basso può erodere lo scheletro e può compromettere le funzioni cellulari (ad esempio l'attività enzimatica è dipendente dal pH); il basso livello di saturazione dei carbonati nell'acqua di mare compromette le capacità delle larve di costruire il proprio scheletro e l'ipercapnia (aumento di pCO<sub>2</sub> negli organismi) altera il metabolismo. Per i ricci di mare consideriamo l'aumento di pCO<sub>2</sub> come un fattore di stress chiave perché influisce principalmente sui meccanismi di calcificazione (Byrne, 2011).

Anche negli adulti di riccio di mare lo scheletro è una struttura di grande importanza e il suo deterioramento avrebbe conseguenze notevoli sulle performance dell'animale riducendo non solo la protezione dai predatori e da forte idrodinamismo ma anche le possibilità di localizzazione e raccolta del cibo. Lo scheletro è composto principalmente dal corpo, dagli aculei e dall'apparato masticatorio chiamato "lanterna di Aristotele". Una rete tridimensionale di trabecole di carbonato di calcio, chiamata stereoma, costituisce gli ossicini di queste strutture. L'effetto dell'acidificazione sullo scheletro potrebbe essere dovuto in larga misura al costo del mantenimento dell'equilibrio acido-base (Collard et al., 2016).

Tuttavia, ci sono sempre più evidenze che l'effetto di un singolo fattore di stress, come l'acidificazione, potrebbe risultare fortemente modificato se si ha compresenza di altri stressogeni. Per questo motivo si sta riservando una crescente attenzione proprio alla valutazione di effetti combinati di più variabili ambientali in uno scenario di cambiamento climatico, come il pH, la temperatura e l'ossigeno disciolto, insieme alla presenza di contaminanti, un fenomeno che affligge acque costiere ma anche di aperto oceano.

Se si prendesse l'acidificazione come singolo fattore di stress che agisce sui ricci di mare adulti questa potrebbe non evidenziare grandi anomalie negli individui presi in considerazione, per questo è importante considerare gli effetti combinati di più stressogeni su questi organismi.

### **3.1 Effetti dell'acidificazione negli echinodermi**

Collard e colleghi (2016) riportano un esperimento condotto su un campione di adulti di *P. lividus* analizzando gli effetti dell'acidificazione sullo scheletro degli animali (Fig. 2). La struttura dello scheletro del riccio di mare è organizzata in singole piastre tenute insieme da tessuto e, su quelle, le spine si articolano in corrispondenza dei tubercoli. Le piastre sono disposte in cinque doppie file interambulacrali e cinque ambulacrali. Due tipi di placche interambulacrali sono stati utilizzati: le placche ambitali, che sono le più grandi e si trovano lungo l'ambitus (il diametro maggiore del riccio di mare), e le placche apicali, che sono le più prossime al polo apicale e le più piccole.



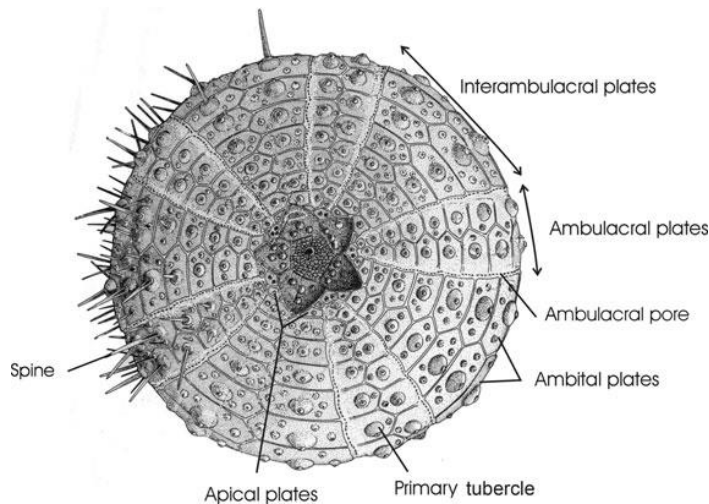


Figura 2: Rappresentazione della struttura dello scheletro del riccio di mare (da Collard et al., 2016).

Questo studio si basa su due test: uno che è stato svolto in laboratorio e uno che fa riferimento a individui raccolti in ambienti naturali caratterizzati da un basso pH. Questi due test sono stati accoppiati per studiare in modo completo l'impatto delle condizioni future di pH sulle proprietà meccaniche del riccio di mare.

Nel primo test l'esperimento ha avuto una durata di 49 settimane presso il "Plymouth Marine Laboratory" da Marzo 2011 a Febbraio 2012. Le condizioni, che dovevano replicare la situazione attuale, erano mantenute facendo gorgogliare aria non trattata mentre le condizioni a pH più basso sono state create facendo gorgogliare aria arricchita con CO<sub>2</sub>. Per rendere l'ambiente quanto più fedele a quello marino è stato anche adeguato il fotoperiodo in base alla stagione dell'anno. Ogni trattamento è stato replicato quattro volte. I ricci di mare sono stati nutriti con macroalghe raccolte da Plymouth Sound una volta alla settimana e l'acqua di mare utilizzata nel sistema sperimentale è stata raccolta da un sito di monitoraggio nel Canale della Manica Occidentale. Dopo dodici mesi di trattamento i ricci di mare utilizzati per i test meccanici sono stati prelevati dagli acquari, sezionati, puliti dagli organi interni ed essiccati per 48 ore.

Nel secondo test l'effetto delle variazioni di pH è stato studiato prelevando i ricci di mare nei pressi di sorgenti di CO<sub>2</sub> in cui naturalmente si ha un pH minore, ovvero in una zona vulcanica presso la Baia di Levante a largo dell'isola di Vulcano in Italia, nel Giugno 2013 (Calosi et al., 2013). Sono state scelte due località. Il sito utilizzato come "condizione di controllo" si trovava a 380 metri di distanza dalla sorgente principale di CO<sub>2</sub> e aveva un pH medio di 8,1. Il secondo sito identificato come "condizione di pH basso" si trovava a 300 metri dalle sorgenti e aveva un pH medio di 7,8, che era vicino ai valori previsti per la fine del secolo (Boatta et al., 2013). Gli individui sono stati prelevati facendo snorkeling a una profondità di 1-2 m e successivamente, come nel test precedente, sono stati sezionati, puliti ed essiccati per 48 ore. Successivamente sono state prelevate le piastre. In entrambi i

casi sono state utilizzate tre piastre interambulacrali ambitali e tre piastre interambulacrali apicali di ciascun riccio.

In laboratorio sono state effettuate delle prove meccaniche. Per misurare la forza di frattura delle placche ambitali è stato eseguito un test di flessione a tre punti. Sono state scelte le piastre più grandi, ovvero le più vecchie, e prima di svolgere i test veri e propri sono state fotografate per misurarne la lunghezza e lo spessore effettivi. Successivamente queste piastre sono state posizionate su un supporto metallico e sono state eseguite le prove meccaniche attraverso una lama non tagliente come si può notare nello schema rappresentato nella Figura 3 (Collard et al.,2016).

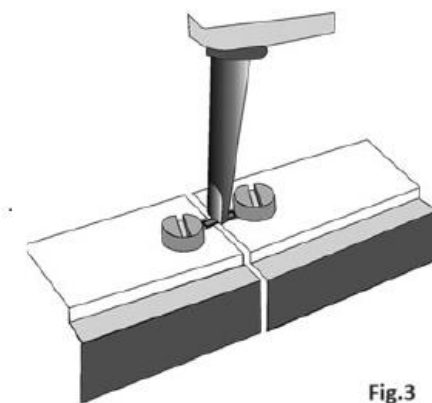


Figura 3: prove meccaniche sulle placche ambitali (da Collard et al.,2016).

Le prove meccaniche sono state effettuate anche sulle placche apicali ma in questo caso utilizzando un semplice metodo di compressione. Sono state scelte le placche più giovani ovvero quelle più piccole e anche in questo caso sono state fotografate per valutarne la lunghezza e lo spessore. Successivamente le placche sono state posizionate su un blocco di metallo e la prova è stata fatta utilizzando un secondo blocco che poi è stato pressato su di esse (Fig. 4).

I risultati di questi due test mostrano che l'esposizione a lungo termine ad acque a pH ridotto non influenza le proprietà meccaniche delle placche scheletriche di *P. lividus*, condizione che vale sia per le placche ambitali che per quelle apicali. Tuttavia questi risultati non precludono altre problematiche per questi organismi come i costi energetici legati alla necessità di eliminare i protoni dal sito di calcificazione o problemi che riguardano la disponibilità di cibo (Collard et al., 2016).

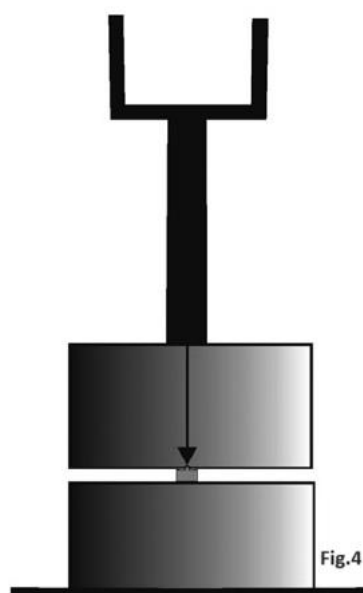


Figura 4: prove meccaniche sulle placche apicali (da Collard et al.,2016).

Grazie a questo esperimento possiamo notare come l'acidificazione se considerata come evento stressogeno isolato potrebbe non apportare gravi danni agli organismi calcificanti come gli Echinodermi. Tuttavia il risultato potrebbe essere diverso considerando altre risposte degli animali e in presenza di ulteriori fattori di stress.

#### 4. MICROPLASTICHE

La produzione crescente di plastica ha portato alla sua immissione in ambiente in quantità crescenti. Si tratta principalmente di plastica sfusa e di plastica secondaria che deriva dalla degradazione di rifiuti primari sotto l'azione meccanica delle onde e della luce ultravioletta. Le particelle di plastica sono ormai presenti in tutti i settori ambientali, tuttavia, l'uso di micro e nanoplastiche in una varietà di prodotti di consumo ha portato ad una fonte aggiuntiva di particelle polimeriche nelle acque reflue delle città. Queste possono raggiungere fiumi, estuari e infine gli ecosistemi marini, in particolare quelli vicini a grandi città site nelle aree costiere (Ryan et al., 2009). La dispersione di plastica in articoli di grandi dimensioni, come i resti delle reti da pesca abbandonate, mette in pericolo le specie più grandi, ma le particelle più piccole (microplastiche) minacciano gli organismi di dimensioni minori a livelli inferiori della rete trofica marina. La maggior parte della ricerca sulle microplastiche si è concentrata su particelle di dimensioni comprese tra 300  $\mu\text{m}$  e 5 mm. Tuttavia, le possibilità di interazione tra organismi marini e microparticelle aumentano notevolmente con dimensioni ancora più piccole, in particolare da 300  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  (Auta et al., 2017). Le microplastiche includono non solo i polimeri primari, ma possono anche contenere una varietà di additivi chimici che sono stati utilizzati nel processo di fabbricazione per dare alla plastica proprietà specifiche.

Pertanto, le microplastiche possono avere effetti negativi ad ampio raggio su un'ampia varietà di organismi a causa delle loro miscele complesse (Rochman et al., 2019). Studi diversi hanno esaminato gli effetti delle microparticelle sui ricci di mare e gli effetti rilevati sono stati da nessuno, a molto lievi, a moderati (Thomas et al., 2020). Gli organismi bentonici sono in particolare esposti a micro (e nano) plastiche che affondano e si accumulano sui fondali marini. A causa del loro ruolo essenziale come organismi brucatori, i ricci di mare possono essere soggetti alla plastica per tutta la loro vita, con conseguenze che possono poi estendersi a specie a loro collegate da legami trofici, questo perché possono accumulare microplastiche nei tessuti (Manzo et al., 2022).

### **5.1 Effetti delle microplastiche negli echinodermi**

Per valutare gli effetti delle microplastiche nei ricci di mare prendiamo in considerazione una review di Sonia Manzo e Simona Schiavo pubblicata nel 2021 che analizza la letteratura recente sui rischi chimici e fisici causati da questi polimeri. La maggior parte delle pubblicazioni prese in esame sono relative al periodo 2018-2020, sottolineando l'attuale e crescente preoccupazione per le conseguenze dell'inquinamento da plastica sugli organismi bentonici. Da questo studio risulta che la specie utilizzata maggiormente per gli studi sulla tossicità delle microplastiche è *P. lividus*, particolarmente diffusa nel Mediterraneo e sulle coste del Nord Atlantico. Possiamo notare che la letteratura fa riferimento principalmente a gameti, embrioni e fasi iniziali dello sviluppo, prendendo in considerazione il tasso di fecondazione oppure la simmetria, la forma e le dimensioni delle larve. Al contrario risultano di numero inferiore gli esperimenti svolti sugli organismi adulti. In questo caso si studia l'accumulo di microplastiche nel tratto gastrointestinale, nel fluido celomatico, nel sistema vascolare e nelle gonadi oltre che effetti a livello biochimico. È stato scoperto anche che i ricci di mare rendono maggiormente biodisponibili le microplastiche, infatti, la frammentazione e la biotrasformazione causate dall'ingestione e dal transito nel tratto digestivo aumentano la diffusione e la biodisponibilità della plastica nei sedimenti marini (Porter et al., 2019; Parolini et al., 2020).

Gli esperimenti descritti nei vari studi presi in considerazione si basano su protocolli di esposizione che prevedono di aggiungere le particelle di plastica (con dosaggi differenti) ad acqua marina artificiale o naturale. Successivamente per garantire una distribuzione omogenea nel mezzo viene prevista una fase di miscelazione attraverso l'uso di un vortex o di un sonicatore (Bergami et al., 2019; Della Torre et al., 2014; Murano et al., 2020). In alcuni casi, per ottenere una migliore dispersione delle particelle, è stato utilizzato un tensioattivo in concentrazioni che non andassero ad influenzare i risultati dell'esperimento (anche se non si può escludere un effetto indiretto in quanto viene aumentata la facilità di dispersione che potrebbe comportare una tossicità più elevata di quella reale). La

tossicità delle microplastiche è stata valutata non solo in sospensione ma anche utilizzando la sola fase liquida (*leachate*) ottenuta dopo un processo di lisciviazione che porta in soluzione componenti additive della plastica.

Le modalità di preparazione del *leachate* e i passaggi svolti nei diversi esperimenti variano molto in base agli studi. La soluzione da saggiare è stata generalmente ottenuta seguendo un rapporto liquido/solido di 10:1 con 24 ore di miscelazione rotatoria a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  al buio. La stessa procedura con una diversa concentrazione (da 10:1 fino a  $10^4$ :1) di plastica è stata utilizzata da altri autori evidenziando come la diluizione del *leachate* possa ridurre la tossicità. Rapporti liquido/solido pari a  $10^6$ :1 e  $10^4$ :1 ma con un tempo di lisciviazione più lungo (48 ore), oppure pari a  $10^2$ :1 in condizioni standard sono stati successivamente adottati. In tutti i casi le soluzioni finali sono state ottenute filtrando la miscela acqua di mare/microplastiche con filtri di diverse dimensioni al fine di rimuovere le particelle. Nonostante le diverse modalità con le quali si sono ottenuti i *leachate*, si è potuto avere un quadro generale sugli effetti che polimeri differenti possono causare nei ricci di mare:

- Polietilene (PE): è il polimero dominante nei sedimenti marini. In tutti gli esperimenti la tossicità, dove veniva registrata, era da attribuire agli additivi funzionali utilizzati per la preparazione della plastica, in quanto il PE come resina grezza è risultato privo di tossicità sugli embrioni o le larve di *P. lividus*. Le informazioni riguardanti questo polimero, tuttavia, sono scarse considerando la sua abbondante presenza nei sedimenti marini.
- Polietilene tereftalato (PET): è un polimero particolarmente denso, quindi tende ad accumularsi più facilmente sul fondo marino, ciò lo rende anche più disponibile agli organismi bentonici come i ricci di mare. È stato evidenziato come l'interazione di questa microplastica con le microalghe possa influire attivamente in termini di biodisponibilità aumentandone il tasso di ingestione. Negli animali adulti esposti a PET tramite la dieta non si sono riscontrati particolari effetti negativi, le condizioni generali di salute erano buone, sebbene il tasso di infiammazione lungo il tratto digestivo fosse abbastanza elevato. Tuttavia, le particelle di plastica sono state trovate nelle feci, nel muco e nei materiali organici non digeriti, ciò dimostra che la loro persistenza potrebbe anche creare un danno fisico a livello del tratto digestivo (Parolini et al., 2020).
- Cloruro di polivinile (PVC): è un materiale molto usato poiché presenta numerose proprietà tecniche utili; tuttavia, per ottenere le funzionalità desiderate vengono utilizzati diversi additivi in alte concentrazioni. Sono proprio queste sostanze che aggiunte alle particelle vergini di PVC lo rendono una sostanza tossica (si osserva il blocco dello sviluppo dopo la fecondazione). La sostituzione degli additivi convenzionali con sostanze chimiche alternative di origine naturale ha ridotto con successo la tossicità dei materiali in PVC. Se analizziamo l'esposizione dei ricci di mare adulti

a questo polimero non notiamo alcun impatto significativo però possiamo osservare che hanno mostrato capacità di rimozione del PVC dalla superficie corporea utilizzando pedicellarie e ciglia. L'ingestione di questo polimero da parte di *P. lividus* non ha influenzato in modo significativo lo sviluppo delle gonadi o la crescita ma ha compromesso lo stato nutrizionale riducendo significativamente l'indice di alimentazione.

- Polistirene (PS): è il componente principale dei rifiuti plastici marini. Le alghe e altri organismi colonizzano le particelle galleggianti di PS e ne provocano l'affondamento facendolo diventare più disponibile per l'ingestione. L'esposizione degli spermatozoi di riccio di mare al PS ha diminuito la loro capacità di fecondazione e la qualità della prole.
- Plastica ambientale. Oltre alle microplastiche che affondano naturalmente se ne possono trovare altre che, seppure in origine più leggere dell'acqua di mare, si sono depositate al fondo una volta appesantite per la formazione di biofilm, o a causa dell'aggregazione con organismi marini o ancora perché ingerite e poi eliminate nei pellet fecali. Gli organismi bentonici come i ricci di mare, in seguito, possono accumulare le microplastiche nei diversi tessuti ingerendo questi materiali. La maggior abbondanza di queste sostanze è stata riscontrata nell'intestino, nel liquido celomatico e nelle gonadi del riccio di mare.

Nel complesso, le plastiche ambientali (cioè esposte a processi più o meno lunghi di invecchiamento) sono meno tossiche dei nuovi prodotti commerciali, il che sottolinea l'impatto impressionante degli additivi utilizzati nella loro produzione. Effetti significativi come la compromissione dell'embrione, con fenomeni come l'esogastrulazione e il blocco nelle prime fasi di sviluppo, possono verificarsi durante gli stadi più sensibili della crescita dei ricci di mare a seguito dell'esposizione a microplastiche. Durante la fase di gastrulazione, MP e NP (nanoplastiche) possono anche aderire alla superficie esterna delle blastule, essere internalizzate durante l'invaginazione delle cellule mesenchimali primarie e quindi accumularsi nel tratto digestivo. L'internalizzazione e la tossicità delle diverse microplastiche possono essere influenzate da una varietà di caratteristiche chimico-fisiche delle MP, che ne determinano il comportamento in ambiente e il rischio per il biota. Le conclusioni nella valutazione del rischio ambientale di questi polimeri possono essere significativamente influenzate anche dalla metodologia di esposizione utilizzata.

La natura dinamica delle micro (e nano) plastiche, è inoltre una questione importante per comprenderne il destino e i potenziali effetti, infatti, le loro dimensioni, forme e carica elettrica possono cambiare notevolmente nel tempo (Manzo et al., 2022).

## **5. EFFETTI COMBINATI DI MICROPLASTICHE E ACIDIFICAZIONE**

I fenomeni derivati da cambiamenti climatici hanno impatti sostanziali sul funzionamento degli ecosistemi e sulle dinamiche della rete alimentare e se associati alla presenza di contaminanti ambientali come le microplastiche causano ulteriore stress agli organismi marini (Perry et al., 2019). Inoltre, le proprietà fisico chimiche dei contaminanti possono essere alterate dalle variazioni di pH e/o di temperatura, aumentandone potenzialmente la tossicità, viceversa la presenza di microplastiche in soluzione potrebbe portare ad una diminuzione del pH (Romera-Castillo et al., 2023). La creazione di metodi sperimentali che consentano l'analisi di una varietà di fattori di stress che influiscono sugli organismi marini e, allo stesso tempo, emulino scenari realistici è necessaria per comprendere l'impatto delle attività umane sugli ecosistemi marini. La quantità di variabili da analizzare rende spesso difficile realizzare queste configurazioni, poiché è necessario condurre esperimenti con molti trattamenti e ripetizioni, il che richiede più tempo e spazio per l'esecuzione (Boyd et al., 2018). Pertanto, una delle sfide attuali nel campo dell'ecotossicologia è lo sviluppo di metodi adeguati per prevedere gli effetti combinati di molteplici fattori di stress sull'ambiente (Bertucci et al., 2023).

### **5.1 La lisciviazione abiotica della plastica contribuisce all'acidificazione degli oceani**

Come già esposto nei paragrafi precedenti gli effetti delle microplastiche nell'ecosistema marino sono un problema da non sottovalutare in quanto possono causare l'insorgenza di anomalie nello sviluppo degli organismi o arrecare danni alle loro strutture. Inoltre, la presenza di queste particelle potrebbe alterare il pH dell'acqua di mare intensificando gli effetti dell'acidificazione.

Uno studio svolto da Romera-Castillo et al. (2023) dimostra come la fotodegradazione della plastica induca una diminuzione del pH e come il carbonio organico disciolto (DOC) lisciviato da queste particelle sia uno dei responsabili della riduzione. La plastica raccolta presentava segni visibili di invecchiamento sia ad occhio nudo che al microscopico elettrico a scansione. Le miscele di plastiche utilizzate per svolgere le prove di laboratorio erano composte da 65% di polietilene, 30% di polipropilene e 5% di Cloruro di Polivinile. Le particelle raccolte sono state successivamente pulite utilizzando il seguente procedimento: la soluzione è stata sonicata con acqua per 10 minuti, per rimuovere eventuali detriti organici il materiale è stato poi immerso in perossido di ossigeno all'1% per un'ora e infine la plastica è stata sonicata tre volte in acqua per 5 minuti. Successivamente i frammenti sono stati collocati in tubi di quarzo da 500 ml riempiti con 400 ml di acqua di mare. Gli esperimenti sono stati svolti in parte sotto la radiazione solare artificiale (campioni irradiati per sei giorni) e in parte al buio, utilizzando per alcuni trattamenti acqua di mare artificiale mentre per altri acqua di mare naturale. In tutte

le prove sono stati incubati anche campioni di controllo senza plastica. A ciascun trattamento è stata aggiunta un'aliquota di miscela di plastiche tale da replicare la condizione delle aree molto inquinate.

I risultati di tali prove hanno portato a concludere che i trattamenti con plastica invecchiata hanno fatto registrare la diminuzione più elevata di pH. La variazione era compresa tra  $0,54 \pm 0,08$  e  $0,33 \pm 0,04$  unità dopo sei giorni di irradiazione solare, mentre il pH variava solo di  $0,13 \pm 0,02$  unità dopo sei giorni di incubazione al buio.

Per la plastica invecchiata, la diminuzione più elevata del pH si è verificata nei trattamenti con acqua di mare artificiale, con una diminuzione di  $0,54 \pm 0,08$  unità, mentre nei trattamenti eseguiti con acqua di mare naturale si è registrata una diminuzione del pH tra 0,40 e 0,31 unità.

Si è potuto dimostrare grazie a questo studio che la degradazione abiotica dei detriti di plastica tende a diminuire il pH dell'acqua di mare. Questa acidificazione potrebbe derivare:

- dalla produzione diretta di CO<sub>2</sub> dalla degradazione della plastica come prodotto di fotoossidazione (Ward et al., 2019).
- dalla fotoossidazione della materia organica disciolta (DOM) rilasciata dalla plastica (Moran and Zepp, 1997).
- dal rilascio di acidi organici costituenti dei polimeri plastici e/o additivi.

In questi esperimenti la diminuzione del pH dell'acqua di mare dipende dal DOC lisciviato dalla plastica. Per valori di DOC superiori a  $\sim 250 \mu\text{mol kg}^{-1}$ , il pH finale è rimasto costante intorno a 7,58 (Fig. 5); la lisciviazione della plastica ha causato una diminuzione media del pH di circa 0,49 unità.

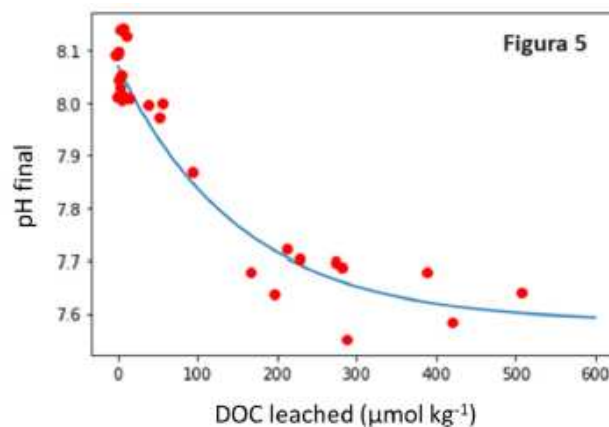


Figura 5: Grafico rappresentante la relazione esponenziale tra il pH e il DOC lisciviato dalla plastica al termine delle incubazioni (da Romera-Castillo et al., 2023).



Non è stata trovata alcuna correlazione significativa tra pH e DOC quando sono stati esaminati i campioni di controllo; ciò suggerisce che la diminuzione del pH sia stata causata dal rilascio di DOC da parte della plastica piuttosto che dalla fotoossidazione del DOM che è già presente nell'acqua di mare.

Da questi studi si è potuto concludere che la lisciviazione delle particelle di plastica presenti negli oceani potrà portare all'aggravamento degli effetti dannosi dati dall'acidificazione per gli organismi marini. Questo è dovuto al rilascio di acidi organici, ovvero di CO<sub>2</sub>, dalla plastica (Romera-Castillo et al., 2023).

## **5.2 Effetto combinato di microplastiche e fattori di cambiamento climatico sullo sviluppo e la crescita larvale del riccio di mare**

Alcuni studi recenti hanno analizzato la combinazione di più fattori stressogeni sullo sviluppo del riccio di mare *P. lividus* svolgendo degli esperimenti che prendessero in considerazione effetti di microplastiche, acidificazione e riscaldamento delle acque (Bertucci & Bellas, 2021; Bertucci et al. 2022; Bertucci et al. 2023).

Nello studio di Bertucci e Bellas (2021) sono stati raccolti esemplari di *P. lividus* nella Ría de Vigo (Spagna) e sono stati mantenuti in vasche con acqua di mare e fotoperiodo naturale, nutrendoli giornalmente con alghe verdi e brune. Le sospensioni di MP (polistirene ad alta intensità) sono state preparate aggiungendo 1 mg di MP in 1L di acqua di mare filtrata, sterilizzata con luce UV e ozono. I trattamenti sono stati acidificati aggiungendo goccia a goccia HCl 10% continuando ad agitare la soluzione fino alla stabilizzazione del pH.

Una singola coppia di individui maturi di *P. lividus* è stata selezionata per ottenere i gameti. Una sospensione di ovociti densa è stata fecondata con 10 µL di sperma non diluito. Entro trenta minuti dalla fecondazione, le uova sono state distribuite in fiale da 50 mL contenenti i trattamenti sperimentali e ad una densità di trenta embrioni per millilitro (4 repliche per trattamento). Per studiare l'effetto combinato di microplastiche e acidificazione nei diversi trattamenti sono state testate due concentrazioni di MP (1000 e 3000 particelle/mL) e due valori di pH (8,1 e 7,6) e le loro combinazioni. Per rappresentare lo stress termico è stata scelta una temperatura di 24°C, 4°C superiore a quella di controllo. Dopo 48 ore di incubazione al buio e senza aerazione, le fiale sono state fissate con dieci gocce di formalina tamponata al 40% e le larve sono state osservate direttamente al microscopio invertito.

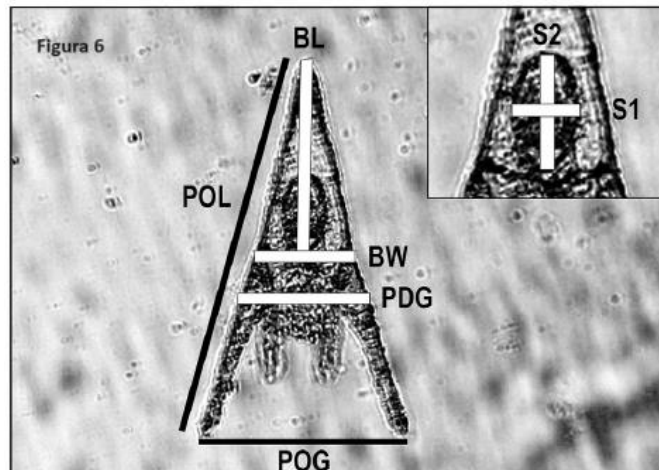


Figura 6: Schema delle misurazioni effettuate sulle larve di *P. lividus* (da Bertucci & Bellas, 2021).

Nella Figura 6 (Bertucci & Bellas, 2021) si può vedere come sono state prese le misurazioni della larva. Il braccio postorale più lungo (POL) è stato utilizzato per valutare la crescita della larva. Per determinare le alterazioni nella forma del corpo sono state prese in considerazione la larghezza del corpo (BW), la sua lunghezza totale (BL; misurata dall'apice della larva fino alla base dello stomaco), la larghezza nella zona delle braccia postorali (PDG) e la distanza degli apici delle due braccia (POG). Queste misurazioni e quella del volume dello stomaco sono state effettuate su 10 larve per replica.

Un esperimento preliminare, svolto per testare unicamente gli effetti dell'acidificazione, era stato allestito a diverse condizioni di pH. Come possiamo vedere dalla Figura 7, le larve risultanti da embrioni allevati a pH inferiore a 7,6 hanno mostrato una crescita ritardata e a pH 7,3 nelle larve si è notata una riduzione del 50% della lunghezza rispetto al trattamento di controllo. Sulla base di questi risultati è stato scelto un pH soglia di 7,6 per studiare gli effetti combinati di MP e acidificazione (Bertucci & Bellas, 2021).

Oltre alla diminuzione dei tassi di crescita, l'esposizione a un pH di 7,6 ha portato allo sviluppo di solo due braccia invece che quattro.

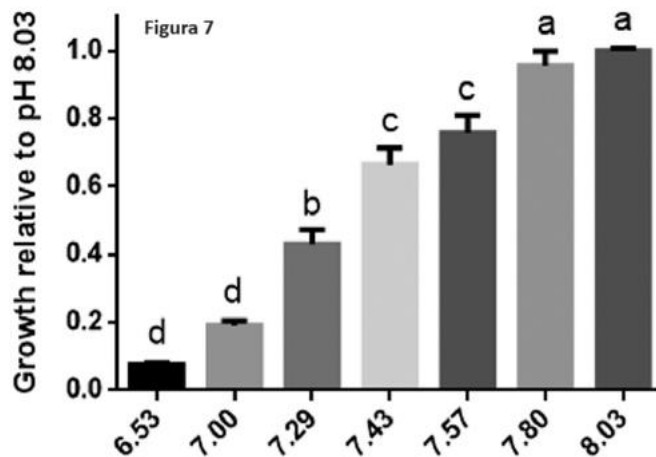


Figura 7: Il grafico illustra il tasso di crescita delle larve di *P. lividus* in relazione al valore di pH al quale è stato sottoposto l’embrione (da Bertucci & Bellas, 2021).

Per quanto riguarda invece le microplastiche, l’esposizione a 1000 particelle/mL non ha influenzato la crescita delle larve; invece, quella a 3000 particelle/mL ha mostrato una diminuzione della crescita del 20% rispetto ai controlli e ha anche indotto altre alterazioni come l’aumento della separazione delle braccia postorali o dei vertici (Fig. 8 B,C).

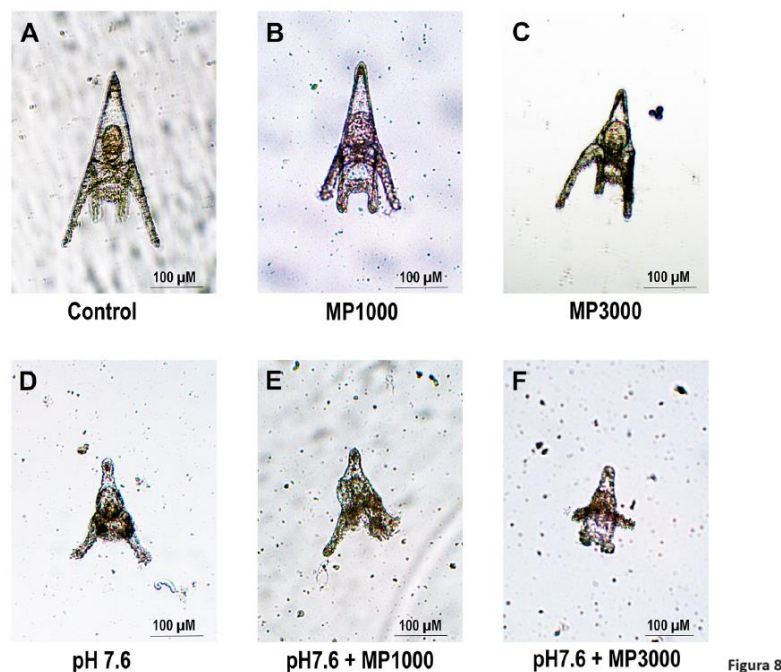


Figura 8. Immagini di *P. lividus* che illustrano le morfologie delle larve sottoposte ai diversi trattamenti (da Bertucci & Bellas, 2021)

L’esposizione combinata degli embrioni a pH 7,6 e MP (1000 o 3000 particelle/mL) ha causato una diminuzione significativa del tasso di crescita e marcate alterazioni

morfologiche delle braccia (Fig. 8 E,F). Per quanto riguarda il volume dello stomaco non si sono osservate differenze significative ad eccezione del trattamento MP3000 in cui il suo volume era aumentato.

L'aumento della temperatura da 20°C a 24°C ha comportato un aumento del 15% della crescita osservato anche nei trattamenti a pH 7,6 e pH 7,6 + MP3000 ma non nel trattamento a pH 7,6 + MP1000. Il volume dello stomaco era diminuito del 15% con valori di temperatura più elevati. Ciò potrebbe generare complicazioni per le larve nell'alimentazione. In questo lavoro il pH è stato diminuito senza alterare la pCO<sub>2</sub>; quindi, si può sostenere che un pH basso possa provocare alterazioni nella crescita e nello sviluppo che potrebbero non essere totalmente correlate alla calcificazione delle strutture scheletriche. Le larve del riccio di mare sono in grado di mantenere il proprio pH interno costante nonostante le variazioni esterne ma ciò richiede un dispendio energetico che potrebbe incidere sulla loro crescita e aumentarne la mortalità. Il pH più basso è collegato anche all'aumento della frequenza respiratoria, all'espressione genica anormale e alla risposta ossidativa che indica che l'acidificazione è un problema multifattoriale.

Grazie a questi esperimenti si è potuto dimostrare come le microplastiche aggravino l'effetto di una diminuzione del pH e dell'aumento di temperatura nelle larve di *P. lividus* causando un rallentamento nel processo di crescita e l'alterazione dei parametri morfometrici. Gli effetti di pH e microplastiche combinati non sono additivi, probabilmente perché il pH ridotto, essendo il fattore di stress dominante, ha già un forte impatto sulla crescita che non potrebbe essere molto aggravato dalle microplastiche.

Darling et al., (2010) hanno descritto questo tipo di interazione come “antagonismo non additivo”, presente quando uno dei due fattori di stress ha un impatto dominante rispetto agli altri. Gli effetti dei contaminanti e dei cambiamenti ambientali si manifestano nello stadio planctonico della larva, quando questa inizia a nutrirsi autonomamente (Gosselin and Jangoux, 1998). Durante lo stadio planctonico, le dimensioni e la forma delle larve di *P. lividus* sono essenziali per garantire la loro galleggiabilità e quindi la loro sopravvivenza, anche se dopo 30 giorni queste strutture larvali verranno riassorbite, permettendo al riccio di mare di metamorfosare in adulto (Bertucci & Bellas, 2021).

Secondo i risultati qui presentati, se non vengono intraprese azioni urgenti per modificare l'attuale tendenza al riscaldamento degli oceani, all'acidificazione e all'inquinamento da microplastiche, le popolazioni di ricci di mare potrebbero essere minacciate con un impatto sugli ecosistemi (Oliva et al., 2016).

Le conseguenze dell'aumento della temperatura associato all'acidificazione negli invertebrati marini sono state analizzate anche da Byrne et al. (2018). L'esposizione simultanea a questi fattori può portare a degli effetti che potrebbero risultare: additivi (l'effetto totale corrisponde alla somma degli effetti individuali), sinergici (l'effetto totale è maggiore degli effetti individuali) o antagonisti (l'effetto totale è minore degli effetti individuali) (Przeslawski et al., 2015). Una recente analisi delle interazioni di OW (ocean warming) e OA (ocean acidification) nelle prime fasi di

vita degli invertebrati marini ha rivelato che le interazioni sinergiche sono più comuni di quelle additive o antagoniste, rafforzando l'importanza degli studi multistress (Przeslawski et al., 2015).

Le risposte delle larve a fattori di stress come l'aumento della temperatura e l'acidificazione suggeriscono previsioni sui loro effetti combinati.

- Previsione n.1; Ritmo di sviluppo e crescita più rapidi in risposta alla stimolazione del metabolismo nel caso in cui ci sia un riscaldamento moderato. Si prevede un'interazione antagonista tra questi fattori di stress, un lieve aumento della temperatura potrebbe portare a migliorare alcuni effetti negativi dell'acidificazione;
- Previsione n.2; Interazioni sinergiche negative o effetti negativi additivi se si superano le soglie di tolleranza di temperatura e pH, portando al fallimento dello sviluppo. La tolleranza termica dovrebbe ridursi in condizioni di ipercapnia.

Il pH ha maggiori probabilità di causare effetti subletali, mentre lo stress termico sembra causare mortalità durante le prime fasi di vita degli invertebrati marini generando una sorta di effetto "collo di bottiglia" (Byrne et al., 2018).

## 6. CONCLUSIONI

L'esposizione agli stressogeni negli stadi iniziali dello sviluppo può avere un impatto negativo sulle fasi successive a causa dell'"effetto domino", poiché le prestazioni dell'ontogenesi dipendono dal successo delle fasi iniziali (Pechenik, 1987; Byrne, 2011).

Indipendentemente dallo stadio, il fallimento dello sviluppo avrà un impatto negativo sulla persistenza delle popolazioni marine e degli ecosistemi in cui vivono (Harley et al., 2006; Brierley and Kingsford, 2009; Hofmann et al., 2010).

Per valutare i potenziali risultati per le specie, sono necessari studi completi che valutino gli organismi dalla fecondazione all'insediamento e allo sviluppo postlarvale con esperimenti multistress.

Gli studi presi in considerazione evidenziano come variazioni di pH e temperatura e la presenza di contaminanti possano indurre cambiamenti morfologici nelle larve e successivamente negli adulti di riccio di mare. Tuttavia, è necessario considerare un aspetto importante. L'oceano cambierà in modo più graduale rispetto agli esperimenti svolti sui cambiamenti climatici qui esaminati, l'acclimatazione nella gametogenesi (in particolare durante lo sviluppo delle uova) in un oceano più caldo e con un pH più basso può facilitare la creazione di prole più resistente e guadagnare tempo per facilitare l'adattamento genetico.

Quindi questo tipo di plasticità fenotipica è potenzialmente associata agli effetti materni e/o paterni e può aiutare a mitigare le conseguenze dei cambiamenti climatici sulla forma fisica nel corso delle generazioni, inoltre, può fornire una finestra temporale affinché si verifichi l'adattamento evolutivo (genetico). Diversi studi rilevano la presenza di un sottoinsieme di prole più resistente (soprattutto

per quanto riguarda l'acidificazione e il riscaldamento) indicando l'esistenza di plasticità fenotipica o la possibile variazione genetica che potrebbe consentire alle specie di sopravvivere in un oceano in cambiamento. Tuttavia, se questi genotipi resistenti allo stress venissero scelti significherebbe avere una minore variabilità genetica nelle popolazioni.

Per prevedere la composizione e le dinamiche future delle comunità oceaniche in uno scenario di "vincitori e vinti", è fondamentale conoscere la capacità di adattamento e il grado di risposta ai cambiamenti delle condizioni marine (Byrne et al., 2018).

Sicuramente il modo migliore per affrontare la situazione è quello di agire alla base del problema limitando le emissioni di CO<sub>2</sub> e l'uso di plastica e di altri contaminanti. Proprio per questo motivo negli ultimi anni si è cercato di porre un'attenzione maggiore nei confronti di questo tema che coinvolge tutti. Tuttavia, cambiare le cose potrebbe risultare particolarmente difficile in quanto queste problematiche sono frutto di abitudini ormai consolidate nella nostra società.

## 7. LETTERATURA CITATA

- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, *102*, 165–176.
- Bergami, E., Krupinski Emerenciano, A., González-Aravena, M., Cárdenas, C. A., Hernández, P., Silva, J. R. M. C., & Corsi, I. (2019). Polystyrene nanoparticles affect the innate immune system of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Polar Biology*, *42*(4), 743–757.
- Bertucci, J. I., & Bellas, J. (2021). Combined effect of microplastics and global warming factors on early growth and development of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Science of The Total Environment*, *782*, 146888.
- Bertucci, J. I., Juez, A., & Bellas, J. (2022). Impact of microplastics and ocean acidification on critical stages of sea urchin (*Paracentrotus lividus*) early development. *Chemosphere*, *301*, 134783.
- Bertucci, J. I., Veloso-Cerredelo, C., & Bellas, J. (2023). Global climate change increases the impact of pollutant mixtures in the model species *Paracentrotus lividus*. *Science of The Total Environment*, *893*, 164837.
- Boatta, F., D'Alessandro, W., Gagliano, A. L., Liotta, M., Milazzo, M., Rodolfo-Metalpa, R., Hall-Spencer, J. M., & Parello, F. (2013). Geochemical survey of Levante Bay, Vulcano Island (Italy), a natural laboratory for the study of ocean acidification. *Marine Pollution Bulletin*, *73*(2), 485–494.
- Boyd, P. W., Collins, S., Dupont, S., Fabricius, K., Gattuso, J., Havenhand, J.,

- Hutchins, D. A., Riebesell, U., Rintoul, M. S., Vichi, M., Biswas, H., Ciotti, A., Gao, K., Gehlen, M., Hurd, C. L., Kurihara, H., McGraw, C. M., Navarro, J. M., Nilsson, G. E., Pörtner, H. (2018). Experimental strategies to assess the biological ramifications of multiple drivers of global ocean change—A review. *Global Change Biology*, *24*(6), 2239–2261.
- Brierley, A. S., & Kingsford, M. J. (2009). Impacts of Climate Change on Marine Organisms and Ecosystems. *Current Biology*, *19*(14), R602–R614.
- Byrne, M. (2011). Impact of warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanography and Marine Biology. An annual review*, *49*, 1-42.
- Byrne, M., Ross, P. M., Dworjanyn, S. A., & Parker, L., (2018). Larval Ecology in the Face of Changing Climate—Impacts of Ocean Warming and Ocean Acidification. In: *Evolutionary Ecology of Marine Invertebrate Larvae*, Carrier, T.J., Reitzel, A.M., Heyland, A. Eds, pp. 251-272, Oxford University Press,
- Caldeira, K., & Wickett, M. E. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, *425*(6956), 365–365.
- Calosi, P., Rastrick, S. P. S., Graziano, M., Thomas, S. C., Baggini, C., Carter, H. A., Hall-Spencer, J. M., Milazzo, M., & Spicer, J. I. (2013). Distribution of sea urchins living near shallow water CO<sub>2</sub> vents is dependent upon species acid–base and ion-regulatory abilities. *Marine Pollution Bulletin*, *73*(2), 470–484.
- 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.
- Chiarelli, R., Martino, C., & Roccheri, M. C. (2019). Cadmium stress effects indicating marine pollution in different species of sea urchin employed as environmental bioindicators. *Cell Stress and Chaperones*, *24*(4), 675–687.
- Collard, M., Rastrick, S. P. S., Calosi, P., Demolder, Y., Dille, J., Findlay, H. S., Hall-Spencer, J. M., Milazzo, M., Moulin, L., Widdicombe, S., Dehairs, F., & Dubois, P. (2016). The impact of ocean acidification and warming on the skeletal mechanical properties of the sea urchin *Paracentrotus lividus* from laboratory and field observations. *ICES Journal of Marine Science*, *73*(3), 727–738.
- Darling, E. S., McClanahan, T. R., & Côté, I. M. (2010). Combined effects of two stressors on Kenyan coral reefs are additive or antagonistic, not synergistic. *Conservation Letters*, *3*(2), 122–130.
- Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K. A., & Corsi, I. (2014). Accumulation and Embryotoxicity of Polystyrene Nanoparticles at Early Stage of Development of Sea Urchin Embryos *Paracentrotus lividus*. *Environmental Science & Technology*, *48*(20),

12302–12311.

- Gambardella, C., Marcellini, F., Falugi, C., Varrella, S., & Corinaldesi, C. (2021). Early-stage anomalies in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: Overview and future perspectives. *Environmental Pollution*, 287, 117608.
- Gosselin, P., & Jangoux, M. (1998). From competent larva to exotrophic juvenile: A morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphology*, 118(1), 31–43.
- Grosso, L., Rakaj, A., Fianchini, A., Morroni, L., Cataudella, S., & Scardi, M. (2021). Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system combining the sea urchin *Paracentrotus lividus*, as primary species, and the sea cucumber *Holothuria tubulosa* as extractive species. *Aquaculture*, 534, 736268.
- Grosso, L., Rakaj, A., Fianchini, A., Tancioni, L., Vizzini, S., Boudouresque, C.-F., & Scardi, M. (2022). Trophic Requirements of the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* Varies at Different Life Stages: Comprehension of Species Ecology and Implications for Effective Feeding Formulations. *Frontiers in Marine Science*, 9, 865450.
- Guarnieri, G., Bevilacqua, S., Figueras, N., Tamburello, L., & Fraschetti, S. (2020). Large-Scale Sea Urchin Culling Drives the Reduction of Subtidal Barren Grounds in the Mediterranean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 7, 519.
- Harley, C. D. G., Randall Hughes, A., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thornber, C. S., Rodriguez, L. F., Tomanek, L., & Williams, S. L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9(2), 228–241.
- Hofmann, G. E., Barry, J. P., Edmunds, P. J., Gates, R. D., Hutchins, D. A., Klinger, T., & Sewell, M. A. (2010). The Effect of Ocean Acidification on Calcifying Organisms in Marine Ecosystems: An Organism-to-Ecosystem Perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41(1), 127–147.
- IPCC, 2013: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- Manzo, S., & Schiavo, S. (2022). Physical and chemical threats posed by micro(nano)plastic to sea urchins. *Science of The Total Environment*, 808, 152105.
- McClay, D. R. (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: Sea urchins. *Development*, 138(13), 2639–2648.
- Moran, M. A., & Zepp, R. G. (1997). Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 42(6), 1307–1316.



- Morrone, L., Pinsino, A., Pellegrini, D., & Regoli, F. (2018). Reversibility of trace metals effects on sea urchin embryonic development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *148*, 923–929.
- Morrone, L., Rakaj, A., Grosso, L., Flori, G., Fianchini, A., Pellegrini, D., & Regoli, F. (2023). Echinoderm larvae as bioindicators for the assessment of marine pollution: Sea urchin and sea cucumber responsiveness and future perspectives. *Environmental Pollution*, *335*, 122285.
- Morse, J. W., Andersson, A. J., & Mackenzie, F. T. (2006). Initial responses of carbonate-rich shelf sediments to rising atmospheric pCO<sub>2</sub> and “ocean acidification”: Role of high Mg-calcites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *70*(23), 5814–5830.
- Moulin, L., Catarino, A. I., Claessens, T., & Dubois, P. (2011). Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). *Marine Pollution Bulletin*, *62*(1), 48–54.
- Murano, C., Agnisola, C., Caramiello, D., Castellano, I., Casotti, R., Corsi, I., & Palumbo, A. (2020). How sea urchins face microplastics: Uptake, tissue distribution and immune system response. *Environmental Pollution*, *264*, 114685.
- Oliva, S., Farina, S., Pinna, S., Guala, I., Agnetta, D., Ariotti, P. A., Mura, F., & Ceccherelli, G. (2016). Determinants of *Paracentrotus lividus* sea urchin recruitment under oligotrophic conditions: Implications for conservation management. *Marine Environmental Research*, *117*, 13–20.
- Orr, J. C. (2011). Recent and Future Changes in Ocean Carbonate Chemistry. In: *Ocean Acidification*, J.-P. Gattuso & L. Hansson Eds, pp. 41-66, Oxford University Press.
- Parolini, M., Ferrario, C., De Felice, B., Gazzotti, S., Bonasoro, F., Candia Carnevali, M. D., Ortenzi, M. A., & Sugni, M. (2020). Interactive effects between sinking polyethylene terephthalate (PET) microplastics deriving from water bottles and a benthic grazer. *Journal of Hazardous Materials*, *398*, 122848.
- Parra-Luna, M., Martín-Pozo, L., Hidalgo, F., & Zafra-Gómez, A. (2020). Common sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and sea cucumber of the genus *Holothuria* as bioindicators of pollution in the study of chemical contaminants in aquatic media. A revision. *Ecological Indicators*, *113*, 106185.
- Pechenik, J. A. (1987). Environmental influences on larval survival and development. *Reproduction of marine invertebrates*, *9*, 551-608.
- Perry, D., Staveley, T., Deyanova, D., Baden, S., Dupont, S., Hernroth, B., Wood, H., Björk, M., & Gullström, M. (2019). Global environmental changes negatively impact temperate seagrass ecosystems. *Ecosphere*, *10*(12), e02986.
- Porter, A., Smith, K. E., & Lewis, C. (2019). The sea urchin *Paracentrotus lividus* as a bioeroder of plastic. *Science of The Total Environment*, *693*, 133621.

- Przeslawski, R., Byrne, M., & Mellin, C. (2015). A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global change biology*, 21(6), 2122–2140.
- Rochman, C. M., Brookson, C., Bikker, J., Djuric, N., Earn, A., Bucci, K., Athey, S., Huntington, A., McIlwraith, H., Munno, K., De Frond, H., Kolomijeca, A., Erdle, L., Grbic, J., Bayoumi, M., Borrelle, S. B., Wu, T., Santoro, S., Werbowski, L. M., Hung, C. (2019). Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(4), 703–711.
- Romera-Castillo, C., Lucas, A., Mallenco-Fornies, R., Briones-Rizo, M., Calvo, E., & Pelejero, C. (2023). Abiotic plastic leaching contributes to ocean acidification. *Science of The Total Environment*, 854, 158683.
- Ryan, P. G., Moore, C. J., Van Franeker, J. A., & Moloney, C. L. (2009). Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1999–2012.
- Thomas, P. J., Oral, R., Pagano, G., Tez, S., Toscanesi, M., Ranieri, P., Trifuoggi, M., & Lyons, D. M. (2020). Mild toxicity of polystyrene and polymethylmethacrylate microplastics in *Paracentrotus lividus* early life stages. *Marine Environmental Research*, 161, 105132.
- Ventura, D., Grosso, L., Pensa, D., Casoli, E., Mancini, G., Valente, T., Scardi, M., & Rakaj, A. (2023). Coastal benthic habitat mapping and monitoring by integrating aerial and water surface low-cost drones. *Frontiers in Marine Science*, 9, 1096594.
- Ward, C. P., Armstrong, C. J., Walsh, A. N., Jackson, J. H., & Reddy, C. M. (2019). Sunlight Converts Polystyrene to Carbon Dioxide and Dissolved Organic Carbon. *Environmental Science & Technology Letters*, 6(11), 669–674.