

**MESSA A PUNTO DELLA METODICA PER L'ANALISI DELLE
MICROPLASTICHE IN TESSUTI DI SPECIE ITTICHE DI INTERESSE
COMMERCIALE**



Marilena Di Natale, Marianna Musco, Carmelo Bennici e Tiziana Masullo

Istituto di Studi sul Mediterraneo, S.S. di Palermo, Via F. Parlatore, 65 90145 Palermo

marilena.dinatale@ismed.cnr.it

Indice

Abstract	3
1. Introduzione	4
2. Materiali e metodi	6
2.1 Campionamento	6
2.2 Raccolta dati morfometrici	6
2.3 Sub-campionamento	6
2.4 Fase di predigestione	7
2.5 Fase di digestione	7
2.6 Fase di filtrazione e osservazione al microscopio	8
3. Conclusioni	9
4. Bibliografia	10

Abstract

La crescente minaccia dell'inquinamento da microplastiche sugli organismi marini evidenzia la pressante necessità di una rilevazione adeguata delle microplastiche nei diversi tessuti indagati e di metodi idonei a fornire una valutazione qualitativa efficace delle diverse tipologie di polimeri riscontrabili. Lo scopo di questo report tecnico è di fornire una metodica affidabile per la digestione del tratto gastrointestinale di diverse specie ittiche di interesse commerciale al fine di migliorare l'analisi qualitativa delle microplastiche e di procedere all'identificazione dei diversi polimeri tramite metodica FT-IR riducendo al minimo la potenziale interferenza data dai materiali non plastici. La metodica descritta prevede una fase di predigestione con aggiunta a step progressivi di SDS (5%), proteinasi K e H₂O₂. La successiva fase di doppia filtrazione e recupero dell'eluato, fornisce un campione privo di interferenti e idoneo all'osservazione al microscopio e all'identificazione mediante metodica spettroscopica FT-IR.

1. Introduzione

Il carico di plastica sull'ambiente è una minaccia crescente che colpisce gli ecosistemi acquatici di tutto il mondo (Lambert et al., 2014) e il suo impatto sui sistemi marini è stato ampiamente studiato negli ultimi anni (Ivar do Sul, 2014). Sebbene i detriti macroplastici rappresentino da tempo una delle principali preoccupazioni ambientali, è solo dall'inizio del secolo che minuscoli frammenti di plastica, fibre e granuli, chiamati collettivamente microplastiche (<5 mm), sono state considerate come inquinanti a pieno titolo (Ryan et al., 2009; Thompson et al., 2004).

L'inquinamento da microplastiche, identificato come un'importante minaccia emergente (Sutherland et al., 2010), è stato particolarmente preoccupante negli ultimi anni. La presenza e la distribuzione delle microplastiche nell'ambiente marino globale comprende sia le fonti primarie (derivate da detersivi per mani e viso, preparati cosmetici, e scarti di produzione da impianti di lavorazione della plastica) sia le fonti secondarie (derivate dalla frammentazione di plastica come risultato di effetti fisici e chimici) (Zitko e Hanlon, 1991; Gregory, 1996; Barnes et al., 2009).

A causa della loro onnipresenza nell'ambiente marino e di un'ampia varietà di forme, colori e dimensioni, le microplastiche possono essere ingerite da un'ampia gamma di organismi marini (Kühn et al., 2015, Laist, 1997, Derraik, 2002). È noto che l'ingestione di microplastiche produce effetti fisici e chimici nelle diverse specie marine studiate, poiché è noto che i monomeri e gli additivi plastici causano carcinogenesi e interruzione del sistema endocrino (Wright et al., 2013). Inoltre, poiché le microplastiche fungono da vettori di dispersione per specie invasive (Gregory, 2009) e sostanze tossiche bioaccumulabili e persistenti (PBT) (Koelmans et al., 2013), possono emergere implicazioni ecologiche delle microplastiche nella catena alimentare (Cole et al., 2013; Mattsson et al., 2015; Della Torre et al., 2014).

Il Mar Mediterraneo è uno dei mari più colpiti al mondo in termini di rifiuti di plastica e, le elevate concentrazioni di plastica, sono probabilmente legate alla sua natura e ai suoi regimi oceanografici (Deudero e Alomar, 2014). L'ingestione di microplastiche è già stata ampiamente rilevata in specie ittiche di interesse commerciale nel Mar Mediterraneo (Romeo et al., 2015). Le diverse specie ittiche pelagiche, bentoniche e demersali durante il normale comportamento alimentare sono infatti in grado di accumulare passivamente le microplastiche distribuite lungo la colonna d'acqua o depositate nel sedimento. A causa della loro ampia distribuzione spaziale, importanza commerciale, habitat e strategie di alimentazione, nonché per la documentata ingestione di microplastiche, alcune specie ittiche di particolare interesse commerciale, quali sardine e triglie, sono tra gli indicatori proposti su piccola scala delle microplastiche presenti nel Mar Mediterraneo in acque aperte e sul fondo marino, rispettivamente (Fossi et al., 2018).

Una sfida importante nella quantificazione delle microplastiche negli organismi acquatici riguarda le metodologie per l'identificazione delle microplastiche (Avio et al., 2015; Bianchi et al., 2020). L'ispezione visiva dei tessuti con l'ausilio di un microscopio, comporta un elevato rischio di sottostimare particelle e fibre piccole e poco appariscenti (Roch, and Brinker, 2017). Per aumentare la possibilità di identificare e quantificare tutti i tipi di polimeri plastici, è necessario effettuare una digestione della materia organica. Le tecniche ed i protocolli di digestione precedentemente sviluppati non sempre risultano efficaci e/o richiedono molto tempo e diversi passaggi prima di ottenere un campione idoneo all'osservazione mediante metodi spettroscopici. Potenziali inconvenienti quali perdita di alcuni tipi di polimeri e la possibilità di contaminazione sono anche associati ai diversi passaggi di purificazione dei campioni. Anche la presenza di altri detriti inorganici possano ostacolare l'identificazione delle microplastiche dando luogo alla caratterizzazione di falsi positivi, nonostante si utilizzino metodi consolidati come la spettroscopia.

Lo scopo di questo report tecnico è di fornire una metodica affidabile per la digestione del tratto gastrointestinale di diverse specie ittiche di interesse commerciale al fine di migliorare l'analisi qualitativa delle microplastiche e di procedere all'identificazione dei diversi polimeri tramite metodica spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) riducendo al minimo la potenziale interferenza data dai materiali non plastici. Le specie ittiche acciuga (*Engraulis encrasicolus*), sardina (*Sardina pilchardus*), triglia di fango (*Mullus barbatus*) e merluzzo (*Merluccius merluccius*) sono state selezionate poiché rappresentative del comparto ambientale specifico, per il loro valore commerciale perché descritte in studi scientifici come regolari consumatori del litter.

2. Materiali e metodi

2.1 Campionamento

Le specie oggetto di interesse, sono state acquistate da sbarchi commerciali in porti delle provincie di Palermo, Messina, Siracusa, Agrigento e Trapani.

Al fine di ridurre la variabilità associata all'ingestione del microlitter, come risultato del comportamento alimentare delle specie, i campioni sono stati prelevati con cadenza stagionale. Dalle cassette commerciali sono stati scartati tutti gli individui nei quali si riscontrava l'espansione della vescica natatoria (fenomeno causato da alcune attrezzature da pesca) e il conseguente totale o parziale svuotamento dello stomaco.

2.2 Raccolta dati morfometrici

Vista la stagionalità dei campionamenti, al fine di rendere omogeneo il campione da analizzare, sono state rilevate per ciascun individuo le principali misure morfometriche nonché il peso (Fig. 1 A, B).

Pervenuti in laboratorio, i campioni sono stati sciacquati con acqua e rilevate le seguenti misure:

- Lunghezza Totale (LT), lunghezza misurata dall'estremo della bocca alla fine della pinna caudale;
- Lunghezza Standard (LS), lunghezza misurata dall'estremo della bocca alla biforcazione della furca;
- Peso totale in grammi (W).

Per rendere statisticamente validi i risultati, si è proceduto a selezionare secondo i criteri di cui sopra, 30 individui di ciascuna specie da ciascuna area di studio, per un totale di 120 individui per area e stagione (4 specie*30 individui/area/stagione).



Figura 1: A) Campione; B) Misure morfometriche.

2.3 Sub-campionamento

I 30 individui di partenza sono stati quindi divisi in 3 pool da 10 individui ciascuno, in modo da ottenere 3 repliche di ciascuna specie per sito di provenienza. Da qui, si è proceduto ad eviscerare tutti gli individui appartenenti allo stesso pool e prelevare l'intero tratto gastrointestinale (GI) annotandone il peso (pool 1=10 GI; pool 2=10 GI; pool 3=10 GI).

2.4 Fase di predigestione

Tutti i reagenti utilizzati sono stati filtrati con filtri in microfibra di vetro (diametro pori 1.2 μm) e utilizzata esclusivamente vetreria di laboratorio.

Ogni tratto gastrointestinale appartenente a ciascun pool è stato svuotato dei contenuti stomacali, i quali sono stati omogenati al vortex (Fig. 2 A, B).

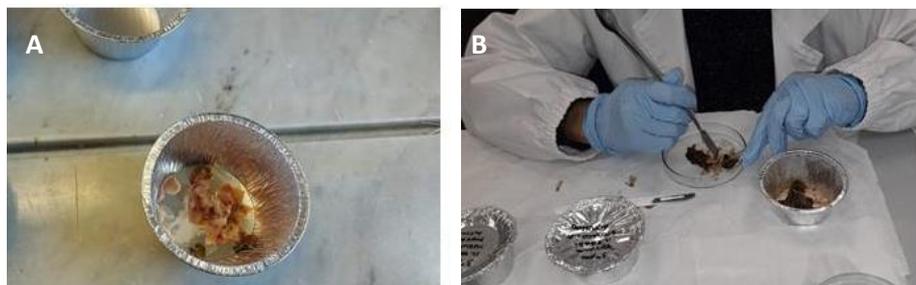


Figura 2: A) Preparazione del pool; B) Svuotamento del tratto gastrointestinale.

La fase di predigestione è stata effettuata in accordo alle procedure indicate dalla letteratura con alcune modifiche (Cole et al., 2013; Corami et al., 2020; Digka et al., 2018; Karlsson et al., 2017; Löder et al., 2017; Thiele et al., 2019).

Ad una quantità pari a 0,2 g di contenuti stomacali sono stati aggiunti SDS 5% (24h incubazione a 50 °C) e 150 mAnson-U Proteinasi K (2h incubazione a 50 °C) (Fig. 3).



Figura 3: Fase di Predigestione dei campioni a 50 °C

2.5 Fase di digestione

Successivamente ciascun campione è stato digerito in una soluzione di 30% H_2O_2 , etanolo ed acqua ultrapura (rapporto in volume 1:2:4.5) per 96h ad RT in blanda agitazione (Fig. 4).

Utilizzando lo stesso protocollo, al fine di valutare l'eventuale contaminazione ambientale, è stato preparato un bianco privato della componente organica.



Figura 4: Campioni dopo 96h di digestione

2.6 Fase di filtrazione e osservazione al microscopio

Per la standardizzazione dei dati, si è proceduto quindi ad effettuare una pre-filtrazione del campione digerito, su un filtro la cui dimensione dei pori era di $100\ \mu\text{m}$; questo ha consentito di separare la porzione particolata inferiore a $100\ \mu\text{m}$ che troveremo nell'eluato, da quella superiore a $100\ \mu\text{m}$, che troveremo al disopra del filtro (Fig. 5 A). Quest'ultima è stata recuperata risciacquando il filtro con acqua ultra pura (Fig. 5 B, C).



Figura 5: Fasi della filtrazione su membrana $100\ \mu\text{m}$

A questo punto, la frazione recuperata che contiene gli eventuali polimeri di dimensione superiore a $100\ \mu\text{m}$ è stata rifiltrata mediante pompa da vuoto su filtro in membrana di cellulosa dal diametro di $0.45\ \mu\text{m}$ (Fig. 6 A). Quindi si è passati all'osservazione del filtro allo stereo microscopio dove ogni frammento, fibra o filamento ascrivibile a polimeri o materiale artificiale è stato prelevato manualmente e conservato in acqua ultra pura (Fig. 6 B).



Figura 6: A) Filtrazione e B) osservazione al microscopio

In ultima analisi tutto il materiale recuperato dai filtri è stato conservato per le successive analisi qualitative mediante microscopia FT-IR.

3. Conclusioni

Le conclusioni di questo studio evidenziano che le procedure di estrazione e purificazione sviluppate possono eliminare completamente la componente organica costituente il campione biologico da analizzare, ridurre al minimo i detriti inorganici non-plastici che spesso precipitano in forma di film o cristalli, minimizzare la degradazione di alcune tipologie di polimeri plastici organici, permettendo così una perfetta identificazione delle microplastiche usando il metodo dell'FT-IR.

4. Bibliografia

- Avio C.G., Gorbi S., Regoli F. "Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea" *Marine Environmental Research* Volume 111, October 2015, Pages 18-26
- Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 1985–1998.
- Bianchi J., Valente T., Scacco U., Cimmaruta R., Sbrana A., Silvestri C., Matiddi M. "Food preference determines the best suitable digestion protocol for analysing microplastic ingestion by fish". *Marine Pollution Bulletin* Volume 154, May 2020.
- Cole M., Webb H., Lindeque P.K., Fileman E.S., Halsband C., Galloway T.S. "Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organism". *Scientific Reports* 2013.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J.; Galloway, T. S. Microplastic ingestion by zooplankton *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47, 6646– 6655 DOI: 10.1021/es400663f
- Corami F., Rosso B., Roman M., Picone M., Gambaro A., Barbante C. "Evidence of small microplastics (<100µm) ingestion by Pacific oysters(*Crassostrea gigas*): Anovel method of extraction,purification and analysis using Micro-FTIR". *Marine Pollution Bulletin* Volume 160, November 2020, 111606
- Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K. A., Corsi, I. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus* *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 12302– 12311 DOI: 10.1021/es502569w
- Derraik, J. G. B. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 842-852.
- Deudero, S., Alomar, C., 2014. Revising interactions of plastics with marine biota: evidence from the Mediterranean in CIESM 2014. In: Briand, F. (Ed.), *Marine litter in the Mediterranean and Black Seas*, CIESM Workshop Monograph N 46. CIESM Publisher, Monaco, p. 180.
- Digka et al., 2018. Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine Pollution Bulletin* 135 (2018) 30–40
- Fossi, M.C., Pedà, C., Compa, M., Tsangaris, C., Alomar, C., Claro, F., Ioakeimidis, C., Galgani, F., Hema, H., Deudero, S., Romeo, T., Battaglia, P., Andaloro, F., Caliani, I., Casini, S., Panti, P., Bainsi, M., 2018. Bioindicators for monitoring marine litter ingestion and its impacts on Mediterranean biodiversity. *Environ. Pollut.* 237, 1023–1040.
- Gregory, M. R. 2009. Environmental implications of plastic debris in marine settings— entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 2013-2025.
- Gregory, M.R., 1996. Plastic 'scrubbers' in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified. *Marine Pollution Bulletin* 32, 867–871.
- Ivar do Sul, J. A., Costa, M. F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environ. Pollut.* 2014, 185, 352–364.

- Karlsson et al. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation. *Marine Pollution Bulletin* 122 (2017) 403–408
- Koelmans, A. A., Besseling, E., Wegner, A. & Foekema, E. M. 2013. Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: A model analysis. *Environmental Science & Technology*, 47, 7812–7820.
- Kühn, s., Bravo Rebolledo, E. I. & Van Franeker, J. A. 2015. Deleterious Effects of Litter on Marine Life. In: BERGMANN, M., GUTOW, L. & KLAGES, M. (eds.) *Marine Anthropogenic Litter*. Berlin: Springer.
- Laist, D. 1997. Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records. In: COE, J. & ROGERS, D. (eds.) *Marine Debris*. Springer New York.
- Lambert, S., Sinclair, C., Boxall, A. Occurrence, Degradation, and Effect of Polymer-Based Materials in the Environment. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 227; Whitacre, D. M., Ed.; 2014; Vol. 227, pp 1–53.
- Löder M.G.J. et al. Enzymatic Purification of Microplastics in Environmental Samples. *Environmental Science & Technology* 2017 51 (24), 14283-14292 DOI: 10.1021/acs.est.7b03055
- Mattsson, K., Ekvall, M. T., Hansson, L.-A., Linse, S., Malmendal, A., Cedervall, T. Altered behavior, physiology and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49 (1) 553– 561 DOI: 10.1021/es5053655
- Roch, S., and Brinker, A. A rapid and efficient method for the detection of microplastic in the gastrointestinal tract of fishes. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51, 8, 4522–4530
- Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., Fossi, M.C., 2015. First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 95 (1), 358e361.
- 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, 1999–2012.
- Sutherland, W.J., Clout, M., Côté, I.M., Daszak, P., Depledge, M.H., Fellman, L., Fleishman, E., Garthwaite, R., Gibbons, D.W., De Lurio, J., Impey, A.J., Lickorish, F., Lindenmayer, D., Madgwick, J., Margerison, C., Maynard, T., Peck, L.S., Pretty, J., Prior, S., Redford, K.H., Scharlemann, J.P.W., Spalding, M., Watkinson, A.R., 2010. A horizon scan of global conservation issues for 2010. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 1–7.
- Thiele, C., Hudson, M., Russel, A. 2019 Evaluation of existing methods to extract microplastics from bivalve tissue: adapted KOH digestion protocol improves filtration at single-digit pore size. *Marine pollution bulletin*, 142, pp. 384-393.
- Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., McGonigle, D., Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, 838.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., Galloway, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environ. Pollut.* 2013, 178, 483–492.
- Zitko, V., Hanlon, M., 1991. Another source of pollution by plastics: skin cleansers with plastic scrubbers. *Marine Pollution Bulletin* 22, 41–42.