

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Progetto Ricerca Corrente 19/01

Rilevazione di frammenti di microplastica nell'ambiente acquatico e nei tessuti commestibili dei pesci di allevamento e selvatici

Carla Giansante – Federica Di Giacinto
Centro per la Biologia delle Acque

Microplastiche (MPs)

- Con il termine microplastiche (**MPs**) sono definite tutte le particelle le cui dimensioni sono comprese tra 0,1 μm e 5 mm.
- Nelle acque l'ingestione di MPs è già stata dimostrata sia nei vertebrati sia negli invertebrati.
- **EFSA** promuove studi per verificare la presenza di MPs negli alimenti derivanti dagli organismi acquatici per valutarne il **rischio per i consumatori.**

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Obiettivo principale del progetto

Sviluppare **metodologie innovative** per l'identificazione e la caratterizzazione di MPs **nell'ambiente acquatico e nei tessuti di pesci di allevamento e selvatici** destinati all'umano consumo.

Obiettivi specifici

- **Sviluppare e applicare protocolli di estrazione** delle MPs da sedimenti acquatici e acqua fluviale, da muscolo (parte edibile) e dal tratto gastrointestinale dei pesci;
- Valutare il **livello di contaminazione** da MPs nei pesci e nelle aree fluviali selezionate durante il campionamento;
- Valutare l'impatto delle microplastiche sul **comportamento della *Daphnia magna*** e il ruolo delle MPs come **carrier** di batteri eventualmente patogeni

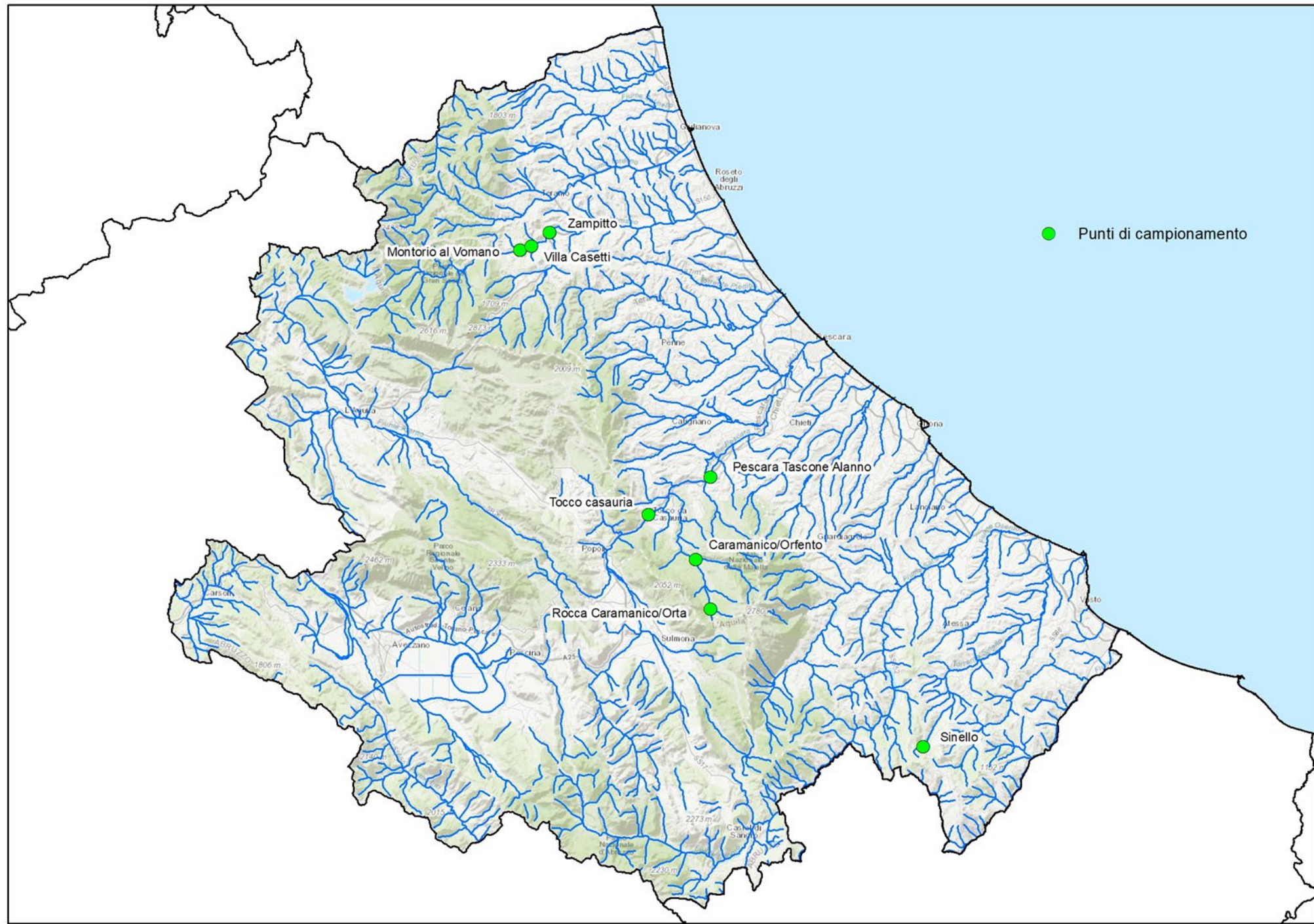
Campionamento

- Pesci selvatici, sedimento fluviale e acqua campionati nei fiumi più importanti della regione Abruzzo (**Pescara e Vomano**) e nei fiumi minori come **Orta, Orfento e Sinello**, seguendo anche la disponibilità dei pescatori sportivi locali.
- Pesci allevati acquistati in pescheria.



T E R A

ISTITUTO
ZOOPROFILI
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"



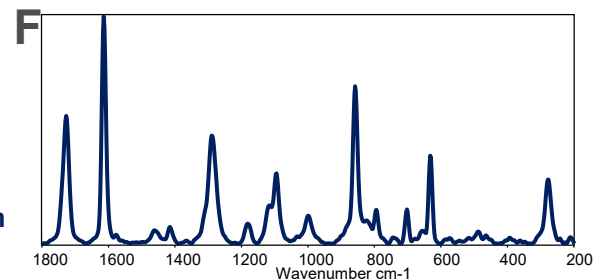
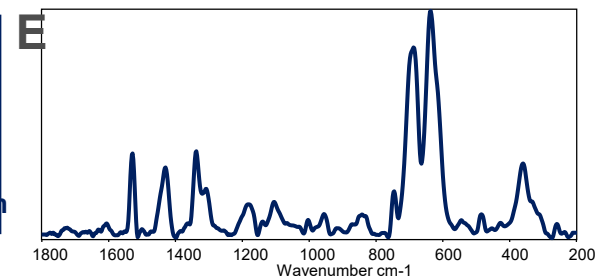
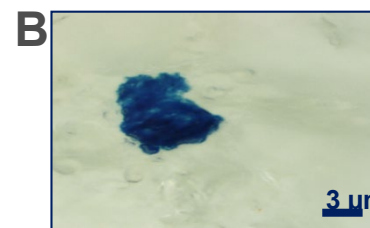
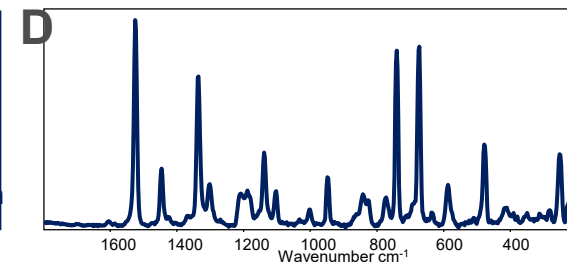
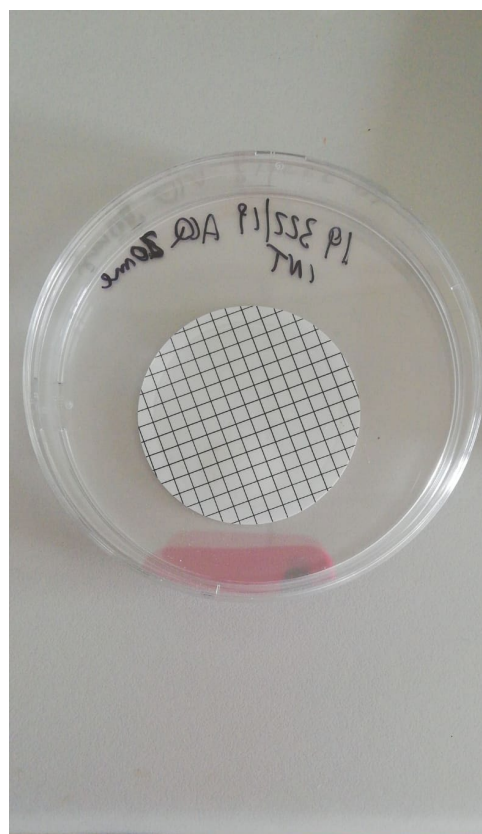


IZS

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Letture allo stereomicroscopio e RAMAN



Metodologia: protocolli di estrazione dal sedimento

Per il sedimento è stato utilizzato un apposito campionatore e redatta la bozza della procedura per la numerazione e l'identificazione morfologica delle microplastiche $\geq 1 \mu\text{m}$:

- disidratazione in stufa 60°C per 1 h
- separazione per densità ZnCl (1,6 kg/l)
- sonicazione
- filtrazione con rampa
- lettura allo stereomicroscopio
- caratterizzazione chimica delle MPs con Raman

Metodologia: protocollo di estrazione per l'acqua fluviale

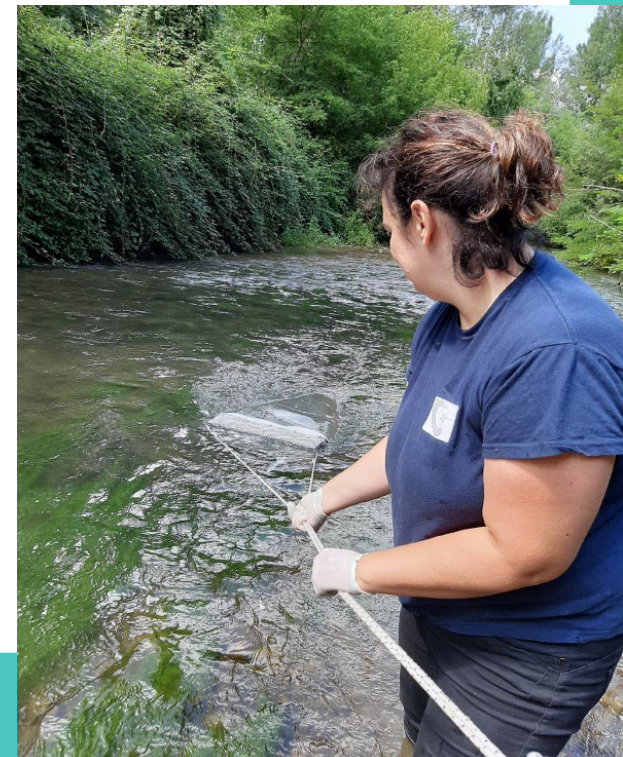
- procedura relativa al campionamento di MPs con un retino, appositamente ideato e fabbricato, chiamato «manta», in grado di filtrare un volume definito di acqua calcolato con un flussimetro.
- procedura di estrazione delle MPs dal retino mediante pinza in metallo e trattamento chimico (KOH 10%) del campione di acqua raccolto nel bicchiere finale del retino procedendo come per gli altri campioni.

IZS

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

IZS.IT



Espressione dei risultati

Lettura allo stereomicroscopio e caratterizzazione chimica RAMAN esprimendo i risultati come:

- numero totale delle microparticelle per grammo (tessuto e sedimento);
- numero totale di microparticelle per m³ di acqua fluviale;
- % morfologia (frammento, film, filamento, sfera)
- % colore
- Polimero e pigmento



Metodologia: impatto delle MPs sul comportamento di *D. magna*

Dafnie esposte a microplastica fluorescente in polistirene (2 μm):

- test di tossicità acuta (24 h) – valutazione della mortalità
- analisi dei parametri comportamentali delle dafnie mediante tecnica di video analisi (DanioVision, Noldus, Wageningen, The Netherlands) in collaborazione con gli etologi dell'Università di Ferrara.

IZS

T E R A M O

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Metodologia: ruolo carrier delle MPs

In collaborazione con Unità Operativa Semplice (UOS) Biologia molecolare e tecnologie omiche di IZSAM è stata redatta una procedura di estrazione dei batteri dalle microplastiche contenute nei campioni di acqua fiume e sedimento, comparandoli ai batteri estratti direttamente dall'acqua di fiume.

IZS

T E R A M O

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Metodologia

Per lo studio metagenomico è stato utilizzato il metodo che prevede l'amplificazione parziale del gene che codifica per l'RNA ribosomiale 16S. In particolare il target genomico è rappresentato dalle due regioni iper-variabili V3 e V4 più comunemente utilizzate per lo studio tassonomico dei microrganismi.



38.77 μm

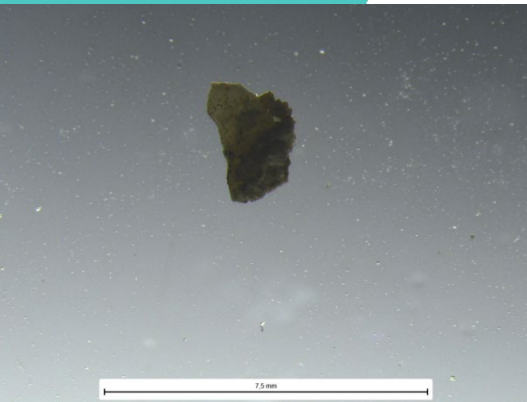
500.00 μm

Risultati: MPs nei sedimenti

Negli 8 punti di campionamento sono state rilevate 7 microplastiche , caratterizzate chimicamente e poi analizzate come carrier:

- dei 7 campioni 2 non erano plastica;
- 2 erano polistirene;
- 3 erano polipropilene;

I filtri ottenuti dal protocollo di estrazione sono ad oggi sottoposti a caratterizzazione chimica.



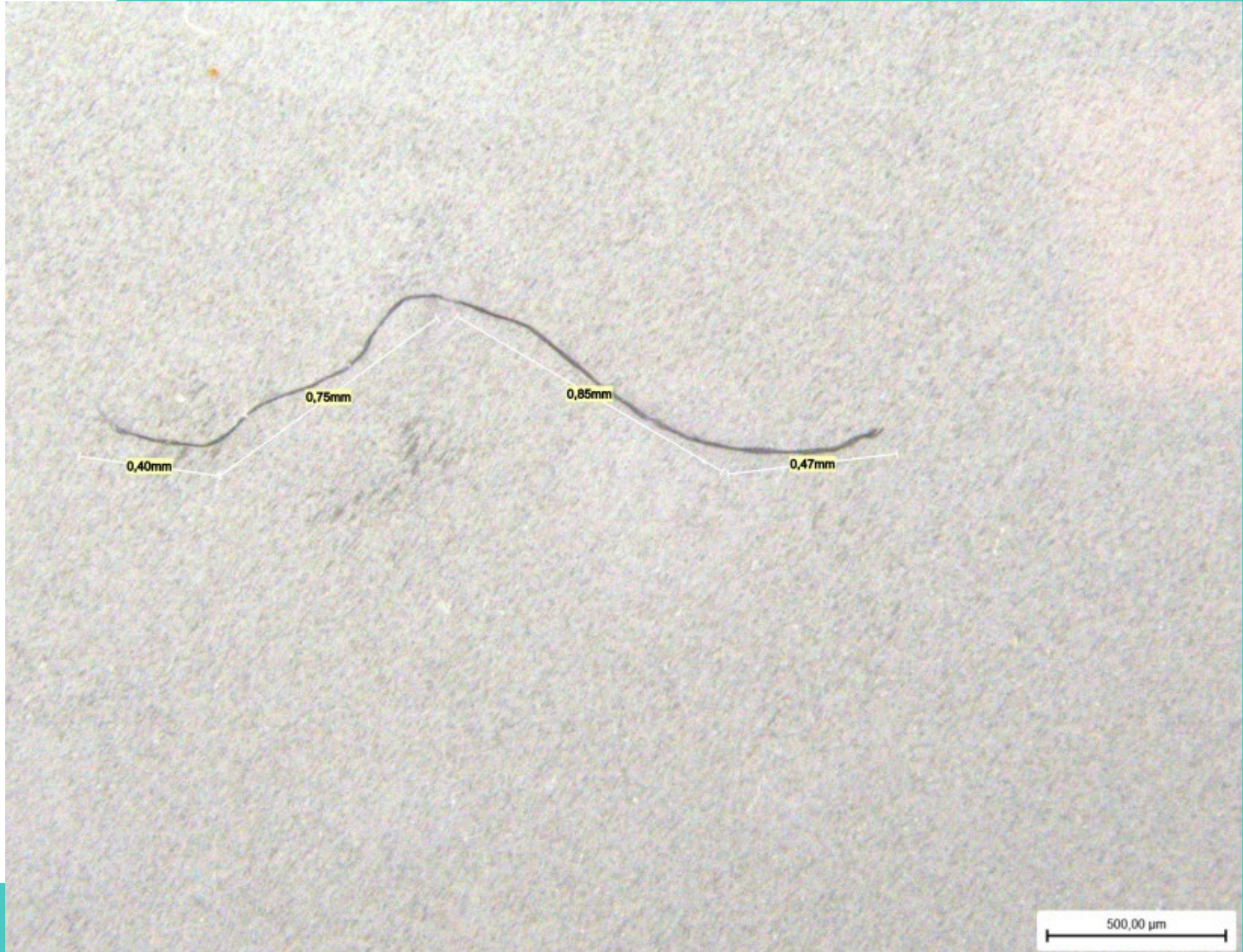
IZS

TERAMO

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

IZS.IT



IZS

T E R A M O

/

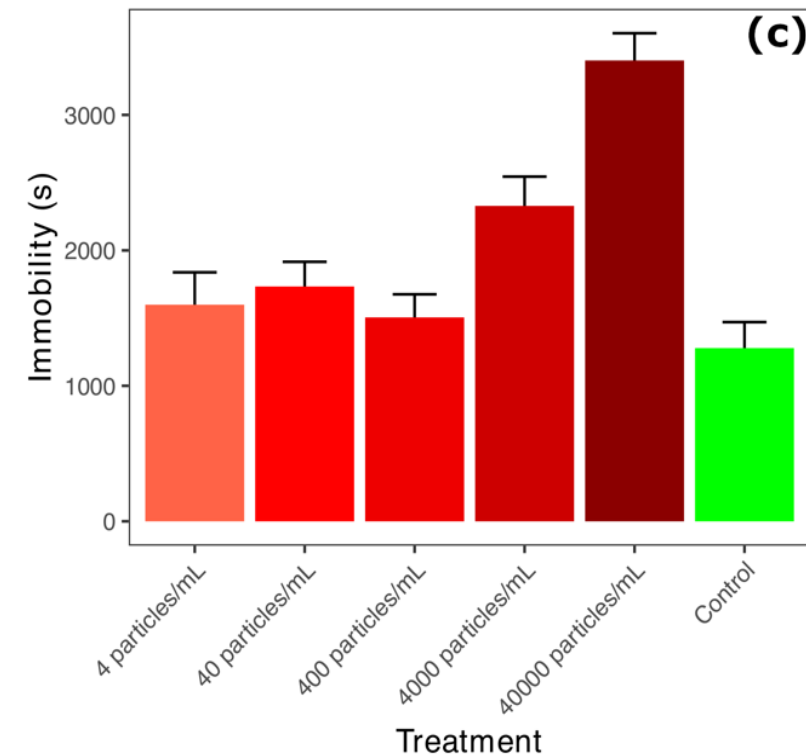
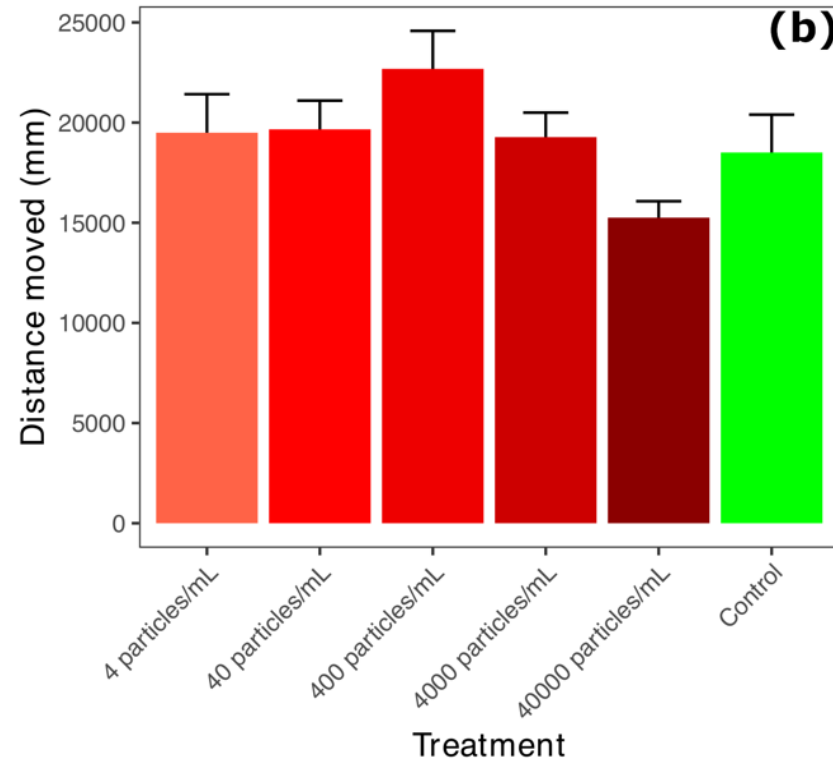
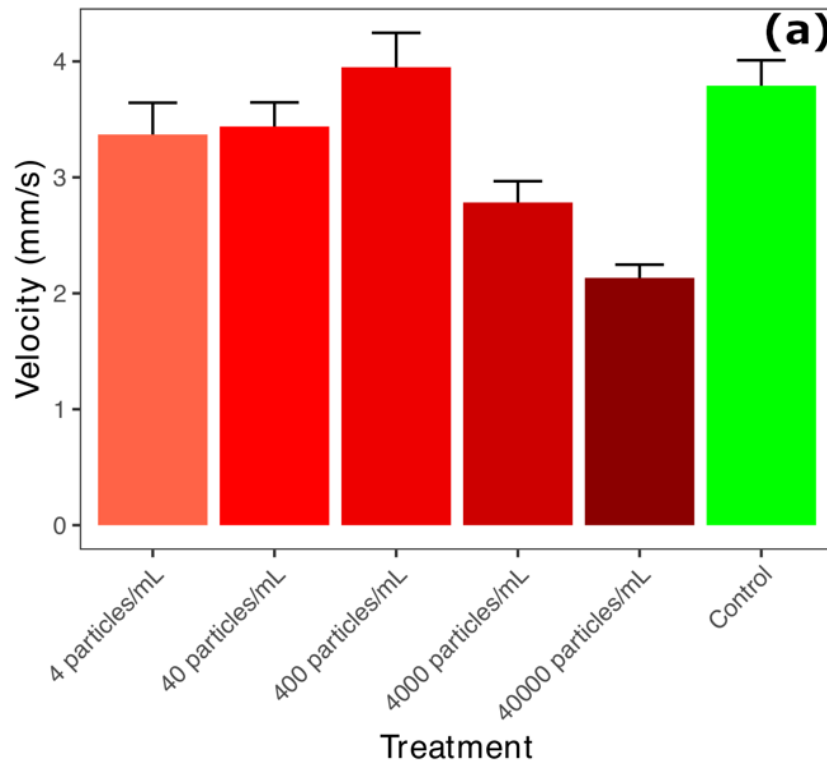
ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Risultati: test di tossicità acuta con *Daphnia magna* 24h

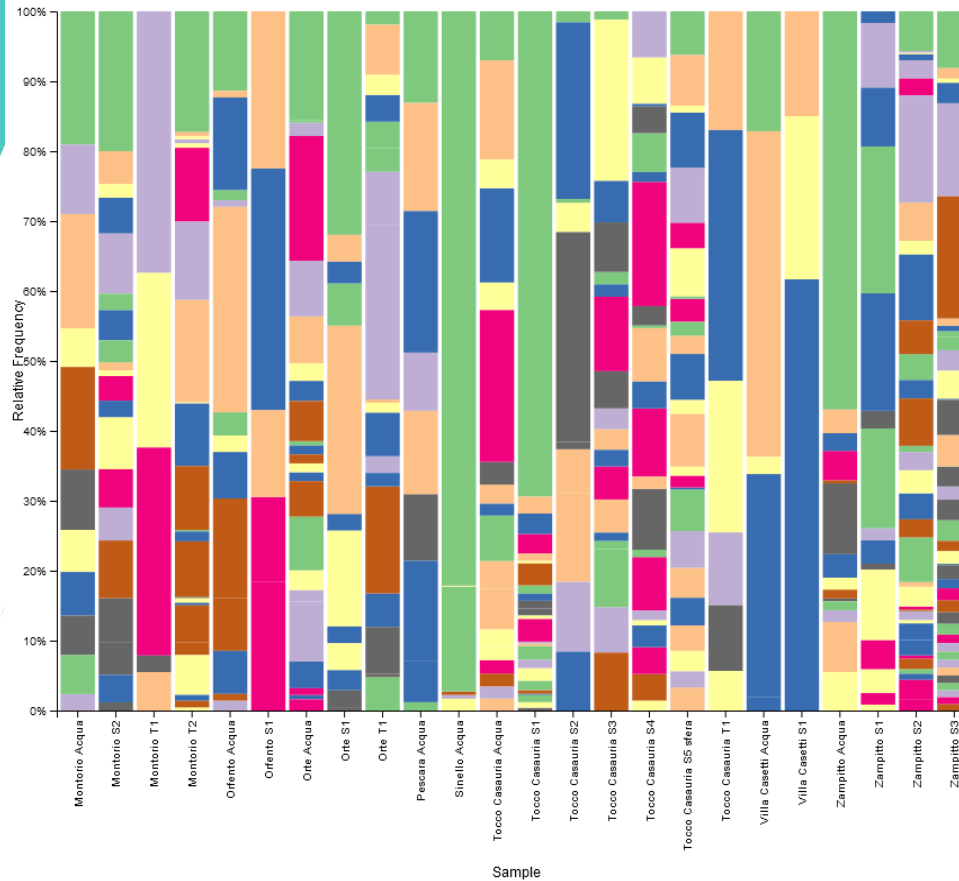
Tutte le dafnie esposte a concentrazioni di microplastica da 4 a 4×10^8 particelle/ml non hanno mostrato alcuna mortalità.

Risultati: Video analisi del comportamento della dafnia

I risultati dimostrano che c'è una differenza significativa di **comportamento natatorio** tra gli animali esposti alle più elevate concentrazioni di microplastiche e i controlli ($P < 0,05$)



Generi batterici riscontrati nell'acqua e nelle microplastiche provenienti dall'acqua e dai sedimenti



- D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Veillonellaceae;D_5__Veillonella
- D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococaceae;D_5__Streptococcus
- D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Lactobacillaceae;D_5__Lactobacillus
- D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family XII;D_5__Exiguobacterium
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfobacterales;D_4__Desulfobulbaceae;D_5__[Desulfobacterium] catecholicum group
- D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Weeksellaceae;D_5__Chryseobacterium
- D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Staphylococcaceae;D_5__Staphylococcus
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Neisseriaceae;D_5__Neisseria
- D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae;D_5__Flavobacterium
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Myxococcales;D_4__MidBa8;D_5__uncultured delta proteobacterium
- D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Porphyromonadaceae;D_5__Porphyromonas
- D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Enterococaceae;D_5__Enterococcus
- D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_2__Verrucomicrobiae;D_3__Methylacidiphilales;D_4__Methylacidiphilaceae;D_5__uncultured
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Legionellales;D_4__Legionellaceae;D_5__Legionella
- D_0__Bacteria;D_1__Planctomycetes;D_2__Planctomycetacia;D_3__Pirellulales;D_4__Pirellulaceae;D_5__Pirellula
- D_0__Bacteria;D_1__Planctomycetes;D_2__Planctomycetacia;D_3__Pirellulales;D_4__Pirellulaceae;D_5__uncultured
- D_0__Bacteria;D_1__Planctomycetes;D_2__vadinHA49;D_3__metagenome;D_4__metagenome;D_5__metagenome
- D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Cytophagales;D_4__Spirosomaceae;D_5__Pseudardiella
- D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Chitinophagales;D_4__Saprospiraceae;D_5__uncultured
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Rhodocyclaceae;D_5__uncultured
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Pseudomonadaceae;D_5__Pseudomonas
- D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Prevotellaceae;D_5__Prevotella 6
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Burkholderiaceae;D_5__Massilia
- D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae;D_5__Actibacter
- D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Chitinophagales;D_4__Chitinophagaceae;D_5__Terribonas
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Methylophilaceae;D_5__Candidatus Methylophilum
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Xanthomonadales;D_4__Xanthomonadaceae;D_5__Arenimonas
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfuromonadales;D_4__Geobacteraceae;D_5__Geobacter
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfobacterales;D_4__Desulfobulbaceae;D_5__Desulfobulbus
- D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Chitinophagales;D_4__Chitinophagaceae;D_5__uncultured
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfobacterales;D_4__Desulfobulbaceae;D_5__Desulfoprunum
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfobacterales;D_4__Desulfobulbaceae;D_5__uncultured
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae;D_5__Psychrobacter
- D_0__Bacteria;D_1__Planctomycetes;D_2__Planctomycetacia;D_3__Isosphaerales;D_4__Isosphaeraceae;D_5__uncultured
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfobacterales;D_4__Desulfobacteriaceae;D_5__Sva0081 sediment group
- D_0__Bacteria;D_1__Chlamydiae;D_2__Chlamydiae;D_3__Chlamydiales;D_4__uncultured
- D_0__Bacteria;D_1__Fibrobacteres;D_2__Fibrobacteria;D_3__Fibrobacteriales;D_4__uncultured
- D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Deltaproteobacteria Incertae Sedis;D_4__Syntrophobacterales;D_5__Syntrophobacter

Risultati

Valutazione del ruolo delle MPs come *carrier*

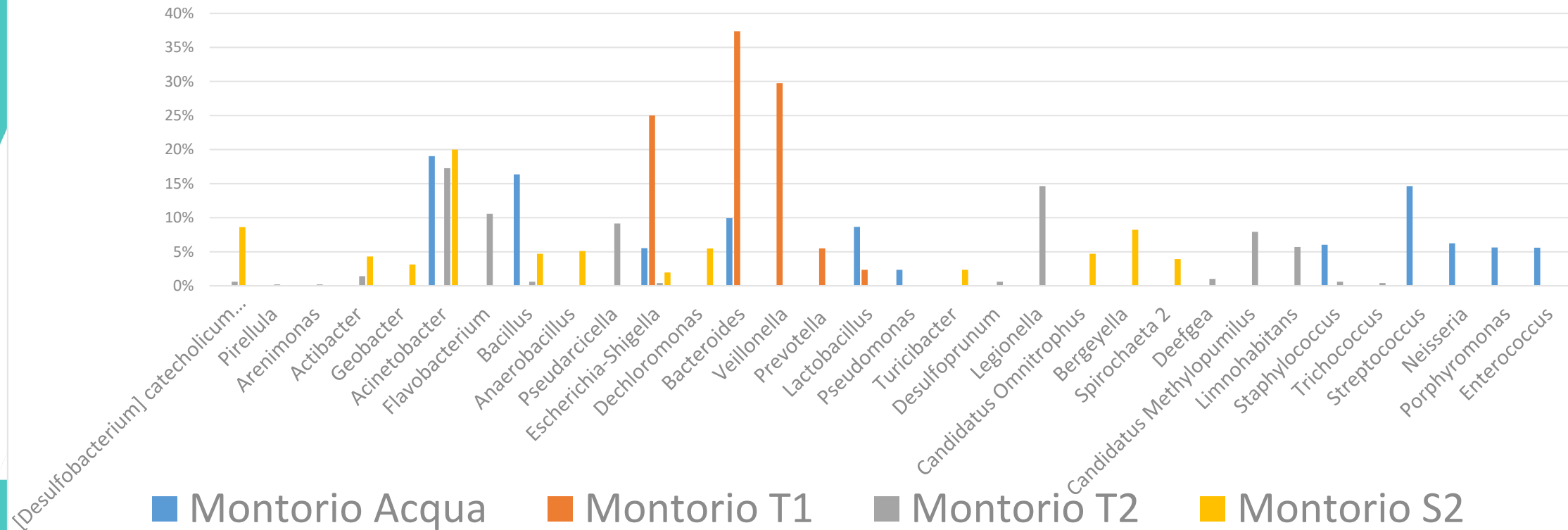
Dai campioni di MPs estratti dall'acqua e dal sedimento sono stati identificati 80 generi alcuni dei quali patogeni per gli animali e per l'uomo.

Sono in corso valutazioni per verificare l'habitat di elezione dei singoli generi, eventuali affinità con la forma (filamento, sfera, frammento), con il tipo di polimero e con la matrice (acqua, sedimento, microplastica).

Montorio

Generi batterici riscontrati nell'acqua e nelle microplastiche provenienti dall'acqua e dai sedimenti

Montorio



Conclusioni

- Le MPs sono state rilevate in tutte le tipologie di matrici, compresi i tessuti edibili dei pesci.
- Le MPs possono essere vettori (*carrier*) di batteri anche patogeni.
- Le MPs producono effetti sul comportamento di *Daphnia magna*.

I risultati definitivi sono in corso di elaborazione.

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Grazie per l'attenzione!

