REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

AGENTZIA REGIONALE PRO S'AMPARU DE S'AMBIENTE DE SARDIGNA
AGENZIA REGIONALE PER LA PROTEZIONE DELL'AMBIENTE DELLA SARDEGNA

ARPAS

Servizio Rete laboratori e misure in campo – Centro Regionale Amianto
Dipartimento Geologico - Laboratorio Geologico-petrografico

RICERCA DI MICROPLASTICHE NEI PESCI ALLEVATI IN SARDEGNA E CONTRIBUTO ALLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO SANITARIO PER IL CONSUMATORE

Relazione Finale

Dicembre 2023

Sommario

1. Generalità 3
1.1 Attrezzature utilizzate 3
1.2 Premessa 3
2. Attività preliminari 3
2.1 Studio in FTIR dei campioni di plastica tal quali 3
2.2 Studio in FTIR dei campioni di plastica dopo attacco con differenti protocolli 4
2.3 Protocollo digestivo 4
3. Studio in FTIR dei campioni di pesci 5
1.1 Allevamento Tortoli (A) 4° trimestre 2022 - Autunno 7
1.2 Allevamento Golfo Aranci (B) 4° trimestre 2022 - Autunno 8
1.3 Allevamento Stintino (C) 4° trimestre 2022 - Autunno 8
1.4 Allevamento Oristano (D) 4° trimestre 2022 – Autunno 10
1.5 Allevamento Tortolì (A) 1° trimestre 2023 – Inverno 10
1.6 Allevamento Golfo Aranci (B) 1° trimestre 2023 – Inverno 10
1.7 Allevamento Stintino (C) 1° trimestre 2023 – Inverno 11
1.8 Allevamento Oristano (D) 1° trimestre 2023 – Inverno 13
1.9 Allevamento Tortolì (A) 2° trimestre 2023 – Primavera 14
1.10 Allevamento Golfo Aranci (B) 2° trimestre 2023 – Primavera 14
1.11 Allevamento Stintino (C) 2° trimestre 2023 – Primavera 14
1.12 Allevamento Oristano (D) 2° trimestre 2023 – Primavera 15
1.13 Allevamento Tortolì (A) 3° trimestre 2023 – Estate 16
1.14 Allevamento Golfo Aranci (B) 3° trimestre 2023 – Estate 18
1.15 Allevamento Stintino (C) 3° trimestre 2023 – Estate 18
1.16 Allevamento Oristano (D) 3° trimestre 2023 – Estate 19
4. **Conclusioni** 20

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

1. Generalità

Il Centro Regionale Amianto (CRA) del Servizio Rete laboratori e misure in campo ed il Laboratorio Geologico-petrografico del Dipartimento Geologico dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (ARPAS), hanno aderito al progetto di ricerca corrente 2020 dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (IZS) dal titolo "Ricerca di microplastiche in pesci allevati in Sardegna e contributo alla valutazione del rischio sanitario per il consumatore". Tale progetto ha avuto come scopo l'identificazione, la quantificazione e la caratterizzazione delle microplastiche presenti in pesci provenienti da allevamenti intensivi di maricoltura al fine di acquisire dati epidemiologici sulla presenza e il livello di contaminazione da microplastiche.

1.1 Attrezzature utilizzate

L'attività dell'Arpas è stata svolta utilizzando uno stereomicroscopio ottico Zeiss Stemi 200-C, uno stereomicroscopio digitale Leica DMS1000, un micro-FTIR Nicolet IN10 della Thermo Fisher e un microscopio elettronico a scansione (SEM) Leo EVO 50 VP, strumenti appartenenti al CRA ed al laboratorio Geologico petrografico del Dipartimento Geologico.

1.2 Premessa

Il contributo fornito al progetto dalla Unità Operativa n° 2 ARPAS, ha visto l'esecuzione delle attività rientranti nella FASE 2 del progetto:

1. collaborazione con IZS sui protocolli adottati per le procedure di digestione dei tessuti dei pesci;
2. filtrazione delle soluzioni prodotte dall'Unita Operativa IZS su opportune membrane filtranti;
3. analisi di immagine con conteggio e verifica dimensionale delle microplastiche presenti;
4. analisi in spettroscopia infrarosso in trasformata di Fourier accoppiata a microscopio (micro-FTIR) finalizzata all'identificazione delle diverse tipologie di microplastiche presenti.

Il presente documento relaziona sulle attività di sperimentazione svolte dall'Arpas all'interno del progetto e costituisce la relazione finale relativa alla Fase 2 del progetto di competenza dall'ARPAS.

2. Attività preliminari

2.1 Studio in FTIR dei campioni di plastica tal quali

Propedeuticamente alle attività inerenti la caratterizzazione delle microplastiche eventualmente presenti nei pesci si è proceduto a selezionare e caratterizzare alcuni tra i polimeri più comuni mediante l'utilizzo del Micro-FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) analizzando particelle tal quali nella dimensione > 500 micron, utilizzando la tecnica a riflessione totale attenuata (ATR) o in trasmissione.

Lo studio di dettaglio è riportato nelle relazioni intermedie.

Detta attività ha premesso di costruire una banca dati degli spettri FTIR da utilizzare nelle fasi successive della ricerca.

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

Nella tabella che segue è riportata la classificazione dei polimeri analizzati e relativi ai più diffusi materiali plastici:

n. campione	classificazione FTIR	nome originale
1	polietilene	tappo di bottiglia di plastica
5	polietilene	materiale plastico spiaggia Platamona
7	polietilene	busta plastica per campioni
3	nylon	lenza nylon
4	amido (STARCH)	chips da imballaggi
6	polietilene tereftalato (PET)	bottiglia acqua
8	polistirene	tappo a vite marrone
11	polistirene	imballaggi per carichi fragili
9	polipropilene	contenitori prodotti commerciali
10	poliuretano	gommaspugna per imbottiture

2.2 Studio in FTIR dei campioni di plastica dopo attacco con differenti protocolli

La ricerca è proseguita con lo studio dei materiali plastici dopo i differenti attacchi, finalizzato alla definizione del protocollo digestivo maggiormente idoneo alla dissoluzione della materia organica senza che i polimeri eventualmente presenti potessero subire degradazioni tali da compromettere la loro identificazione/classificazione in Micro-FTIR.

Sono quindi state studiate, in stereomicroscopio e al microscopio elettronico a scansione, le plastiche di dimensione intorno ai 500 micron dopo essere state attaccate con l'utilizzando delle seguenti soluzioni:

- soluzioni di KOH al 10% a 60° per 72 h
- soluzioni di KOH al 10% a 60° per 48 h
- soluzioni di KOH al 10% a 40° per 48 h

Le evidenze dello studio delle plastiche cosi attaccate, ha evidenziato che le prime due soluzioni di attacco comportano un parziale degrado dei polimeri con formazioni di micro-bolle sulle superfici che comportano un parziale modifica degli spettri FTIR con aumento dell'incertezza classificativa.

Per contro l'attacco a più bassa temperatura, risultando meno aggressivo, non modifica le superfici delle microplastiche.

Pertanto si è stabilito di applicare al protocollo digestivo l'attacco con soluzione di KOH al 10% a 40° per 48 h

2.3 Protocollo digestivo

L'attività eseguita nella prima fase del progetto è stata finalizzata all'individuazione e verifica dell'idoneità del protocollo digestivo individuato per la liberazione delle microplastiche dal biota, che necessariamente deve essere risolutivo nei confronti del dissolvimento dei tessuti biologici ma al tempo stesso non deve essere troppo aggressivo per evitare la degradazione delle microplastiche eventualmente presenti.

Sulla base delle attività eseguite, riportata puntualmente nelle relazioni intermedie cui si rimanda, si è deciso ed adottato il seguente protocollo digestivo:

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

1) attacco dei tessuti di interesse dei pesci con una soluzione di KOH al 10% a temperatura di 40°C per 48 ore;
2) setacciatura della sospensione su setaccio metallico con luce da 0.5 mm con verifica sul trattenuto della presenza di plastiche;
3) neutralizzazione della sospensione con acido citrico 1M;
4) filtrazione della sospensione setacciata e neutralizzata su membrana in Policarbonato con porosità 10 micron, osservazione allo stereo-microscopio per l'eliminazione di eventuale materiale organico residuo;
5) lavaggio della membrana con acqua distillata e successiva filtrazione su membrana in Silicio per l'analisi diretta in micro-FTIR presso i laboratori dell'Arpas.

Sulle sospensioni setacciate e neutralizzate di alcuni esemplari, per ogni ciclo di campionatura, sono state inoltre eseguite ulteriori filtrazioni su membrane in Policarbonato con porosità 10 micron allo scopo di studiare in stereomicroscopio ed analizzare in micro-FTIR le particelle selezionate.

Le attività di digestione e filtrazione sono state eseguite presso i Laboratori dell'IZS di Sassari che ha fornito periodicamente ai laboratorio dell'ARPAS, i filtri in silicio e in policarbonato ottenuti.

3. Studio in FTIR dei campioni di pesci

Sulla base del protocollo di attacco e filtrazione definito, è iniziato lo studio del contenuto di microplastiche nei pesci sia nell'intestino che in porzioni di muscolo.

Questa attività ha previsto, con cadenza trimestrale, il prelievo di 4 pesci per ogni allevamento individuato: Tortolì (codice A), Golfo Aranci (codice B), Stintino (codice C) e Oristano (codice D), con monitoraggio nelle quattro stagioni campionando 64 pesci totali.

I codici attribuiti ai differenti campioni di organi dei pesci, prelevati nei diversi allevamenti nei quattro trimestri, sono costituiti da un codice alfanumerico che indica:

- la prima lettera l'allevamento,
- il primo numero il trimestre
- il secondo numero il progressivo del pesce
- la seconda lettera l'organo campionato

D4_1I = allevamento Oristano 4°trimestre (2022) primo pesce organo intestino

A1_3M = allevamento Tortolì 1 trimestre (2023) terzo pesce organo muscolo.

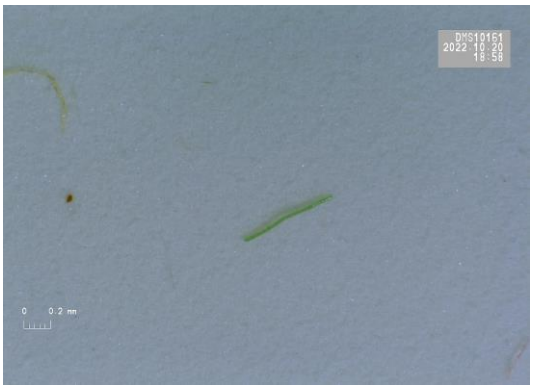
Dal quarto semestre del 2022, l'IZS di Sassari ha iniziato i campionamenti previsti nei 4 allevamenti e la successiva attività di attacco e filtrazione del biota per la liberazione delle microplastiche eventualmente presenti.

L'Arpas ha quindi proceduto alle analisi delle sospensioni prodotte dall'IZS secondo il protocollo più sopra descritto.

Le analisi in micro-FTIR sono state eseguite su tutti campioni prelevati dagli allevamenti di Tortoli, Golfo Aranci, Stintino ed Oristano nei quattro trimestri di monitoraggio: Autunno 2022, Inverno 2023, Primavera 2023 ed Estate 2023.

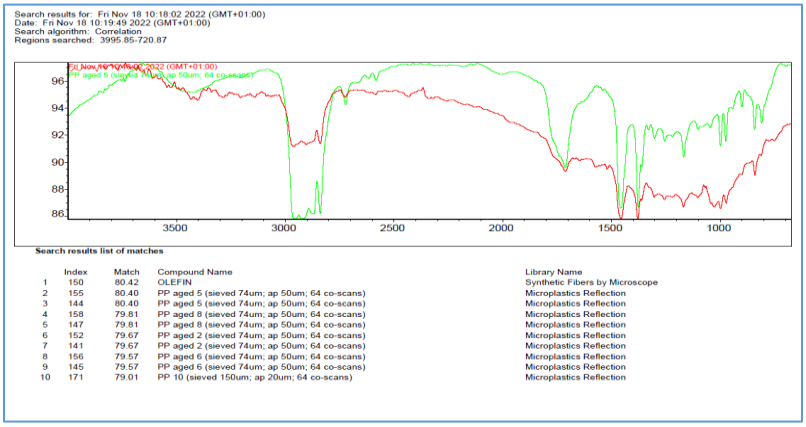
ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

Durante le attività analitiche si è evidenziata la costante presenza di elementi di colore verde la cui analisi in spettrofotometria infrarossa è riconducibile al polipropilene con elevato livello di sovrapposizione con lo spettro tipico riportato nelle librerie. Tali elementi sono stati evidenziati anche durante l'analisi in micro-FTIR dei bianchi di filtrazione del KOH, utilizzato per eseguire la fase di digestione, indicando che questi elementi non sono realmente presenti negli esemplari ma sono legati al reagente utilizzato per eseguire la digestione. Nelle figure che seguono vengono riportate immagini di membrane di filtrazione con l'elemento verde presente nel KOH e rinvenuto in una sospensione e il relativo spettro infrarosso incognito e della libreria.



Elemento verde su membrana di filtrazione del bianco del KOH

Elemento verde su membrana di filtrazione gastrointestino del pesce A4_2I



Spettro FTIR di polipropilene relativo all'elemento verde rinvenuto nella sospensione di un pesce dell'allevamento di Tortolì (4° trimestre 2022

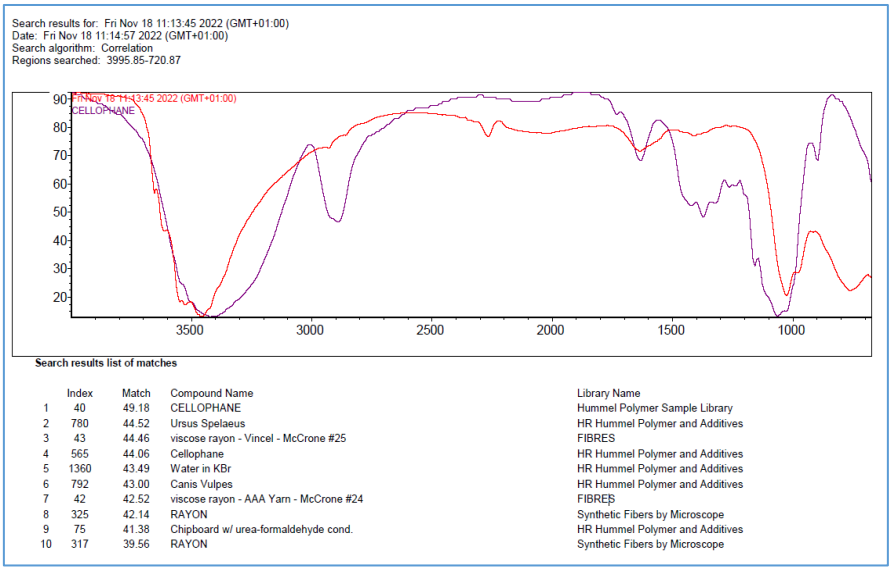
ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

1.1 Allevamento Tortoli (A) 4° trimestre 2022 - Autunno

Nell'allevamento di Tortoli sono stati prelevati i previsti 4 esemplari di pesci di tipo Orata.

La procedura di attacco è stata eseguita sia sull'intestino che su una porzione di muscolo. I risultati ottenuti evidenziano la sostanziale assenza di microplastiche negli organi. E' confermata la presenza degli elementi verdi in polipropilene che non sono attribuibili ai pesci e quindi non conteggiati. Si evidenzia la dubitativa presenza di un frammento di cellophane, di cui alla successiva figura; lo spettro è infatti sovrapponibile a quello presente nelle librerie per il solo 49%.

Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
A4_1I	Nessuno	Nessuna
A4_1M	1	Nessuna
A4_2I	1	Nessuna
A4_2M	Nessuno	Nessuna
A4_3I	Nessuno	Nessuna
A4_3M	Nessuno	Nessuna
A4_4I	Nessuno	1 dubitativo
A4_4M	Nessuno	Nessuna



	Index	Match	Compound Name	Library Name
1	40	49.18	CELLOPHANE	Hummel Polymer Sample Library
2	780	44.52	Ursus Spelaeus	HR Hummel Polymer and Additives
3	43	44.46	viscose rayon - Vincel - McCrone #25	FIBRES
4	565	44.06	Cellophane	HR Hummel Polymer and Additives
5	1360	43.49	Water in KBr	HR Hummel Polymer and Additives
6	792	43.00	Canis Vulpes	HR Hummel Polymer and Additives
7	42	42.52	viscose rayon - AAA Yarn - McCrone #24	FIBRES
8	325	42.14	RAYON	Synthetic Fibers by Microscope
9	75	41.38	Chipboard w/ urea-formaldehyde cond.	HR Hummel Polymer and Additives
10	317	39.56	RAYON	Synthetic Fibers by Microscope

Frammento di cellophane in campione A4_I4

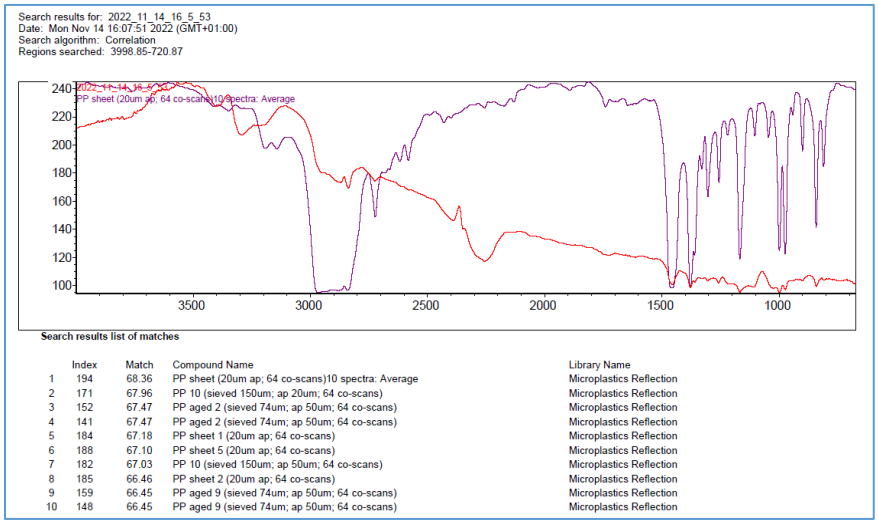
ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

1.2 Allevamento Golfo Aranci (B) 4° trimestre 2022 - Autunno

Nell'allevamento di Golfo Aranci sono stati prelevati i previsti 4 esemplari di pesci di tipo Orata.

Nell'intestino del secondo esemplare si è registrata la presenza di un elemento blu il cui spettro FTIR è riconducibile a polipropilene con una sovrapposizione dello spettro presente nelle librerie per il 68%.

Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
B4_1I	2	Nessuna
B4_1M	Nessuno	Nessuna
B4_2I	1	1
B4_2M	Nessuno	Nessuna
B4_3I	Nessuno	Nessuna
B4_3M	1	Nessuna
B4_4I	1	Nessuna
B4_4M	Nessuno	Nessuna



Frammento Polipropilene

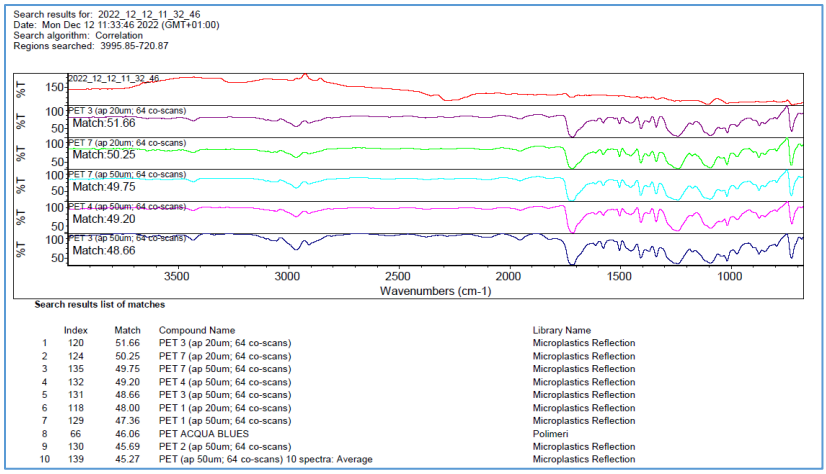
Anche in alcuni esemplari analizzati in questo allevamento sono stati riscontrati gli elementi verdi di polipropilene che non sono stati contati come microplastiche presenti negli esemplari.

1.3 Allevamento Stintino (C) 4° trimestre 2022 - Autunno

Nell'allevamento di Stintino sono stati prelevati i previsti 4 esemplari di pesci di tipo Orata.

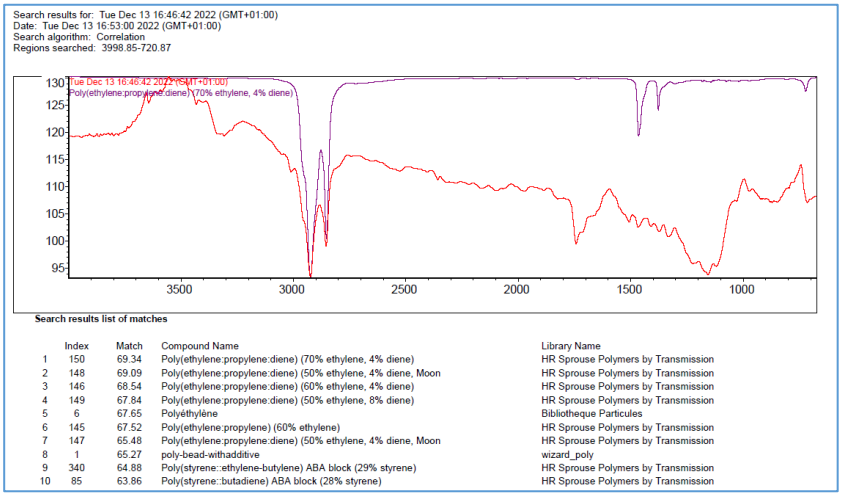
Nell'intestino del primo esemplare si è registrata la presenza di un filamento viola il cui spettro FTIR è riconducibile a polietilene – tereftalato (PET) con una sovrapposizione dello spettro presente nelle librerie per il 51.66%.

Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
C4_1I	1	1
C4_1M	1	Nessuna
C4_2I	1	Nessuna
C4_2M	Nessuno	Nessuna
C4_3I	1	1
C4_3M	1	Nessuna
C4_4I	1	Nessuna
C4_4M	Nessuno	Nessuna



Elemento di PET

Nell'intestino del terzo esemplare è stato individuato un elemento di colore blu il cui spettro FTIR è riconducibile a polietilene con una sovrapposizione dello spettro presente nelle librerie per il 69.34%.



Elemento di polietilene

Nei campioni di bianco di questo trimestre sono stati rinvenuti diversi elementi verdi di polipropilene

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

1.4 Allevamento Oristano (D) 4° trimestre 2022 – Autunno

Nell'allevamento di Oristano sono stati prelevati i previsti 4 esemplari di pesci di tipo Orata. Per ciascuno dei 4 esemplari l'IZS ha inviato n.1 campione di intestino e n.1 campione di muscolo

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella 2, nella quale a ciascun campione sono associate due colonne. Nella prima compare il numero degli elementi verdi, sopra citati, presenti anche in questo set di camioni, il cui spettro è riconducibile al polipropilene, nella seconda colonna viene invece evidenziata la presenza di eventuali miroplastiche.

Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
D4_1I	1	Nessuno
D4_1M	Nessuno	Nessuno
D4_2I	1	Nessuno
D4_2M	1-2	Nessuno
D4_3I	Nessuno	Nessuno
D4_3M	1	Nessuno
D4_4I	Nessuno	Nessuno
D4_4M	Nessuno	Nessuno

Come più volte riportato, gli elementi verdi classificabili come polipropilene sono presenti anche nei filtri bianchi trattati con il solo KOH mentre non sono presenti sui filtri in silicio trattato con la sola acqua distillata. Questo conferma ulterirmente che gli elemnti verdi non sono riconducibili agli organi dei pesci.

1.5 Allevamento Tortolì (A) 1° trimestre 2023 – Inverno

Per problematiche legate alle attività dell'IZS nell'allevamento di Tortoli nel 1° trimestre 2023 (inverno) non è stato possibile eseguire il campionamento.

1.6 Allevamento Golfo Aranci (B) 1° trimestre 2023 – Inverno

Per ciascuno dei 4 esemplari di pesci di specie Orata, IZS ha inviato n.1 campione di intestino (tranne che per il campione 4I, per il quale ne sono stati inviati due) e n.1 campione di muscolo.

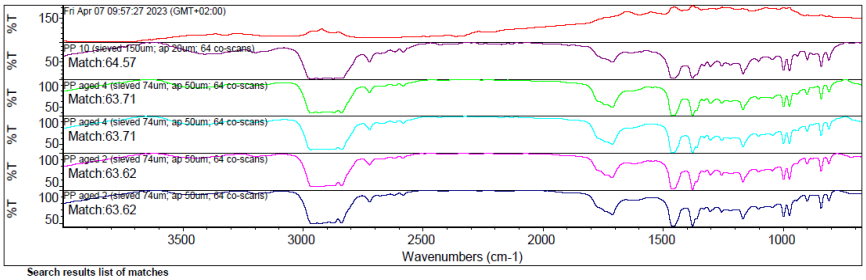
I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	Elementi verdi	Altri elementi
B1_1I	Nessuno	Nessuno
B1_1M	Nessuno	Nessuno
B1_2I	Nessuno	Nessuno
B1_2M	Nessuno	Nessuno
B1_3I	Nessuno	Nessuno
B1_3M	1	Nessuno
B1_4I	Nessuno	1 dubitativo
B1_4M	Nessuno	Nessuno

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

Nel campione B1_4I è stato riscontrato un elemento di morfologia simile agli elementi verdi normalmente rilevati, avente però un colore differente, granata, anziché verde intenso. Si riportano di seguito immagine e spettro relativo. Questo elemento viene considerato dubitativamente una microplastica

Elemento granata in Campione B1_4I (immagine FTIR)



Search results list of matches

	Index	Match	Compound Name	Library Name
1	171	64.57	PP 10 (sieved 150um; ap 20um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
2	154	63.71	PP aged 4 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
3	143	63.71	PP aged 4 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
4	152	63.62	PP aged 2 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
5	141	63.62	PP aged 2 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
6	156	63.52	PP aged 6 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
7	145	63.52	PP aged 6 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
8	182	63.33	PP 10 (sieved 150um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
9	161	63.30	PP aged (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)10 spectra: Avera	Microplastics Reflection
10	150	63.30	PP aged (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)10 spectra: Avera	Microplastics Reflection

Spettro Elemento granata in Campione B1_4I

1.7 Allevamento Stintino (C) 1° trimestre 2023 – Inverno

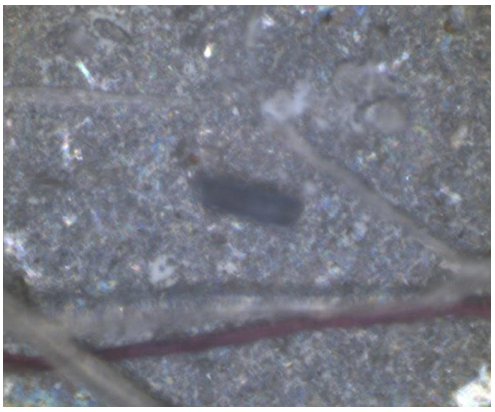
Per ciascuno dei 4 esemplari di pesci di specie Orata, IZS ha inviato n.1 campione di intestino e n.1 campione di muscolo, fatta eccezione per il campione C1_3I, per il quale sono stati esaminati n.2 filtri in silicio e n.1 filtro in PC (in tabella sono stati accorpati in un unico campione vista l'assenza di elementi di interesse).

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente. Oltre alla presenza in tre campioni , dei soliti elementi verdi, sono stati riscontrati altri elementi di interesse, le cui immagini e spettri relativi sono riportati nelle figure.

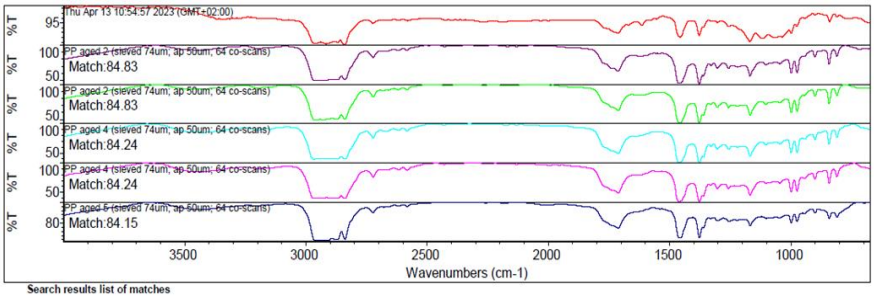
Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
C1_1I	1	1
C1_1M	1	1
C1_2I	Nessuno	Nessuna
C1_2M	Nessuno	Nessuna
C1_3I	Nessuno	Nessuna
C1_3M	Nessuno	Nessuna
C1_4I	1	Nessuna

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

C1_4M	Nessuno	Nessuna



Elemento bluastro in Campione C1_1I (immagine FTIR)

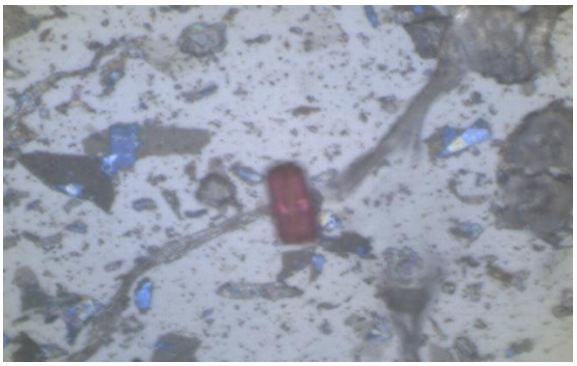


Search results list of matches

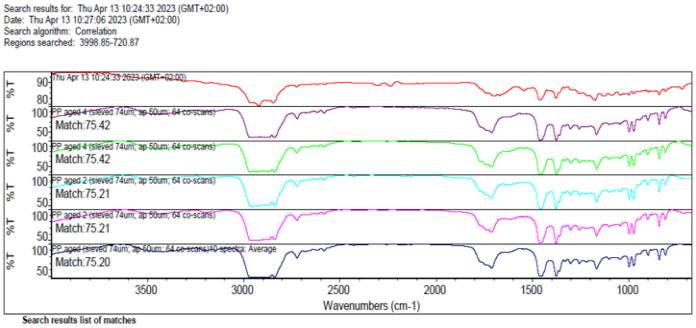
	Index	Match	Compound Name	Library Name
1	152	84.83	PP aged 2 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
2	141	84.83	PP aged 2 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
3	154	84.24	PP aged 4 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
4	143	84.24	PP aged 4 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
5	155	84.15	PP aged 5 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
6	144	84.15	PP aged 5 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
7	156	83.89	PP aged 6 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
8	145	83.89	PP aged 6 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
9	161	83.79	PP aged (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)10 spectra: Avera	Microplastics Reflection
10	150	83.79	PP aged (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)10 spectra: Avera	Microplastics Reflection

Spettro Elemento rosso in Campione C1_1M

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it



Elemento rosso in Campione C1_1M (immagine FTIR)



Search results list of matches

	Index	Match	Compound Name	Library Name
1	154	75.42	PP aged 4 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
2	143	75.42	PP aged 4 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
3	152	75.21	PP aged 2 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
4	141	75.21	PP aged 2 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
5	161	75.20	PP aged (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)10 spectra: Avera	Microplastics Reflection
6	150	75.20	PP aged (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)10 spectra: Avera	Microplastics Reflection
7	171	74.95	PP 10 (sieved 150um; ap 20um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
8	156	74.18	PP aged 6 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
9	145	74.18	PP aged 6 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
10	157	73.62	PP aged 7 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection

Spettro Elemento bluastro in Campione C1_1I

Questi due elementi il cui spettro IR indica la natura di Polipropilene sono stati considerati microplastiche

1.8 Allevamento Oristano (D) 1° trimestre 2023 – Inverno

Nell'allevamento di Oristano sono stati prelevati quattro campioni. Per ciascun esemplare sono stati prodotti 2 filtri uno relativo all'intestino ed una al muscolo.

I risultati ottenuti, riassunti in tabella evidenziano l'assenza di microplstiche e la preseza, a volte importante, degli elementi verdi non attribuibili a microplastiche s.s., ma ad impurezza del regentario.

Campioni	Elementi verdi	Microplatiche
D1_1I	2	Nessuna
D1_1M	1	Nessuna
D1_2I	Nessuno	Nessuna
D1_2M	4	Nessuna
D1_3I	Nessuno	Nessuna
D1_3M	Nessuno	Nessuna
D1_4I_a	1	Nessuna
D1_4I_b	Nessuno	Nessuna
D1_4M	Nessuno	Nessuna

1.9 Allevamento Tortolì (A) 2° trimestre 2023 – Primavera

Per ciascuno dei 4 esemplari di pesci di specie Orata, IZS ha inviato n.1 campione di intestino, n.1 campione di muscolo e, complessivamente, n.2 bianchi.

I risultati ottenuti, come riportato nella tabella seguente evidenziano l'assenza in tutti i campioni di elementi verdi e microplastiche.

Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
A2_1I	Nessuno	Nessuna
A2_1M	Nessuno	Nessuna
A2_2I	Nessuno	Nessuna
A2_2M	Nessuno	Nessuna
A2_3I	Nessuno	Nessuna
A2_3M	Nessuno	Nessuna
A2_4I	Nessuno	Nessuna
A2_4M	Nessuno	Nessuna

1.10 Allevamento Golfo Aranci (B) 2° trimestre 2023 – Primavera

Per ciascuno dei 4 esemplari di pesci di specie Orata, IZS ha inviato n.1 campione di intestino, n.1 campione di muscolo e, complessivamente, n.2 bianchi.

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente:

Campioni	Elementi Verdi	Microplastiche
B2_1I	1	Nessuna-
B2_1M	Nessuno	Nessuna-
B2_2I	1	Nessuna-
B2_2M	Nessuno	Nessuna-
B2_3I	Nessuno	Nessuna-
B2_3M	Nessuno	Nessuna-
B2_4I	2	Nessuna-
B2_4M	Nessuno	Nessuna-

-

In questi campioni sono state rinvenuti diversi elementi verdi che, come già evidenziato, sono riconducibili ad impurità del reagentario utilizzato negli attacchi; gli spettri IR (non riportai) confermano la natura di polipropilene (PP).

Nei campioni non sono state riscontrate microplastiche.

1.11 Allevamento Stintino (C) 2° trimestre 2023 – Primavera

Per ciascuno dei 4 esemplari d pesci di specie Orata sono stati prodotti dall'IZS 1 campione di intestino, i campione di muscolo e complessivamente 3 bianchi

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente che evidenzia il fatto che non siano state riscontrate sia microplastiche che gli elementi verdi

Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
C2_1I	Nessuno	Nessuna
C2_1M	Nessuno	Nessuna
C2_2I	Nessuno	Nessuna
C2_2M	Nessuno	Nessuna
C2_3I	Nessuno	Nessuna
C2_3M	Nessuno	Nessuna
C2_4I	Nessuno	Nessuna
C2_4M	Nessuno	Nessuna

1.12 Allevamento Oristano (D) 2° trimestre 2023 – Primavera

Per ciascuno dei 4 esemplari di pesci di specie Orata, IZS ha inviato n.1 campione di intestino, n.1 campione di muscolo e, complessivamente, n.3 bianchi.

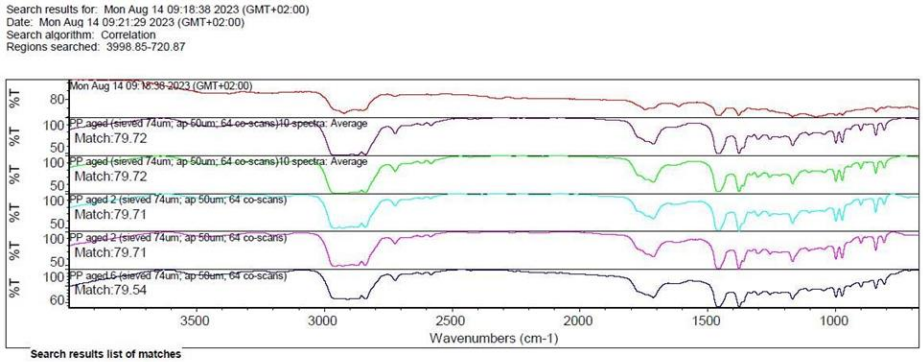
I risultati delle letture dei filtri sono riassunti nella tabella seguente

Campioni	Elemento verde	Microplastiche
D2_1I	Nessuno	Nessuna
D2_1M	Nessuno	Nessuna
D2_2I	1	Nessuna
D2_2M	Nessuno	1 elemento rosso
D2_3I	1	Nessuna
D2_3M	Nessuno	Nessuna
D2_4I	Nessuno	Nessuna
D2_4M	Nessuno	Nessuna

Come nei precedenti campioni gli elementi verdi sono attribuibili ad impurità del reagentario utilizzato per l'attacco, mentre in un campione di muscolo è stato rinvenuto un elemento rosso, nelle figure che seguono si riportano le immagini e lo spettro IR relativo che può essere classificato come polipropilene (PP)

Elemento rosso al Micro-FTIR del campione D2_2M

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it



Search results list of matches

	Index	Match	Compound Name	Library Name
1	161	79.72	PP aged (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)10 spectra: Avera	Microplastics Reflection
2	150	79.72	PP aged (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)10 spectra: Avera	Microplastics Reflection
3	152	79.71	PP aged 2 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
4	141	79.71	PP aged 2 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
5	156	79.54	PP aged 6 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
6	145	79.54	PP aged 6 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
7	154	79.39	PP aged 4 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
8	143	79.39	PP aged 4 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
9	155	79.18	PP aged 5 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
10	144	79.18	PP aged 5 (sieved 74um; ap 50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection

Spettro IR di polippropilene (PP) dell'elemento rosso in Campione D2_2M

1.13 Allevamento Tortolì (A) 3° trimestre 2023 – Estate

Per ciascuno dei 4 esemplari di pesci di specie Orata, IZS ha inviato n.1 campione di intestino e n.1 campione di muscolo.

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
A3_1I	Nessuno	Nessuna
A3_1M	Nessuno	1 elemento azzurro
A3_2I	Nessuno	Nessuna
A3_2M	Nessuno	Nessuna
A3_3I	Nessuno	Nessuna
A3_3M	Nessuno	Nessuna
A3_4I	Nessuno	Nessuna
A3_4M	Nessuno	Nessuna

Nelle figure che seguono sono riportate le immagini ed il report IR dell'elemento indicato

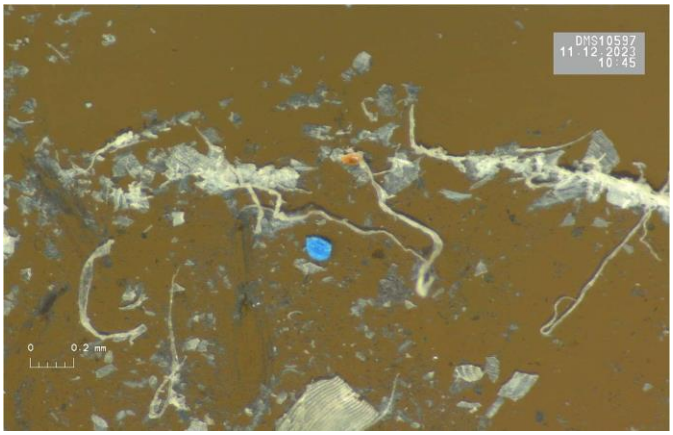


Immagine allo stereomicroscopio dell'elemento azzuro

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

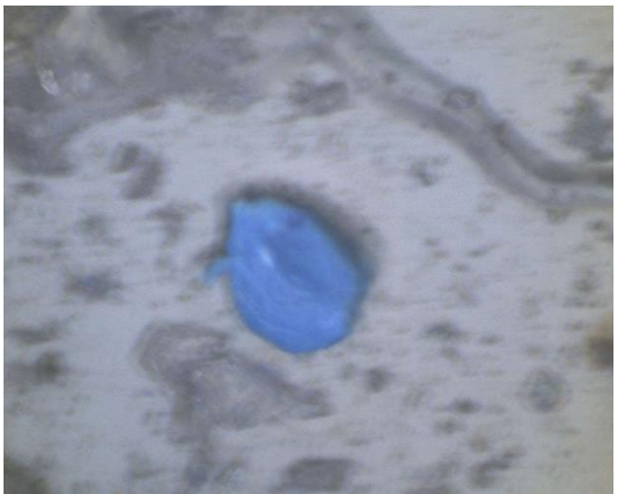
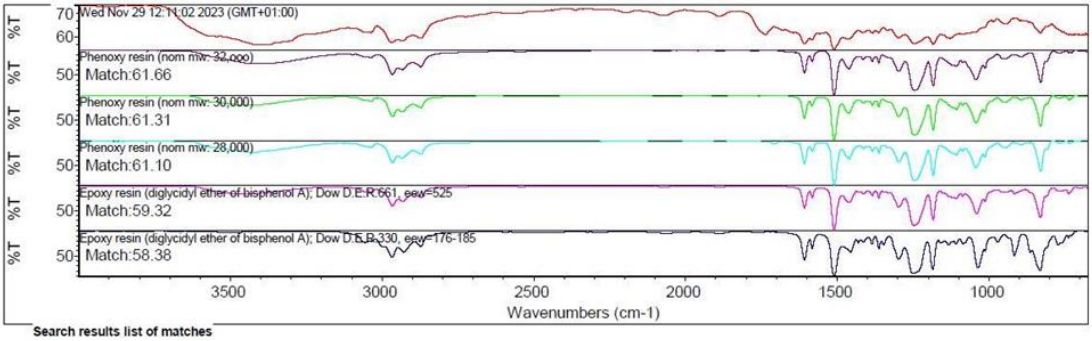


Immagine al Micro-FTIR dell'elemento azzurro

Search results for: Wed Nov 29 12:11:02 2023 (GMT+01:00)
Date: Wed Nov 29 12:13:58 2023 (GMT+01:00)
Search algorithm: Correlation
Regions searched: 3998.85-720.87



Search results list of matches

	Index	Match	Compound Name	Library Name
1	159	61.66	Phenoxy resin (nom mw: 32,000)	HR Sprouse Polymers by Transmission
2	158	61.31	Phenoxy resin (nom mw: 30,000)	HR Sprouse Polymers by Transmission
3	32	61.10	Phenoxy resin (nom mw: 28,000)	HR Sprouse Polymers by Transmission
4	155	59.32	Epoxy resin (diglycidyl ether of bisphenol A); Dow D.E.R.661	HR Sprouse Polymers by Transmission
5	354	58.38	Epoxy resin (diglycidyl ether of bisphenol A); Dow D.E.R.330	HR Sprouse Polymers by Transmission
6	394	57.28	Epoxy resin (diglycidyl ether of bisphenol A); Dow D.E.R.337	HR Sprouse Polymers by Transmission
7	363	55.30	Epoxy resin (diglycidyl ether of bisphenol A); Dow D.E.R.317	HR Sprouse Polymers by Transmission
8	361	54.09	Epoxy resin (diglycidyl ether of bisphenol A); Dow D.E.R.331	HR Sprouse Polymers by Transmission
9	47	47.18	Poly(4,4-dipropoxy-2,2-diphenyl propane fumarate)	HR Sprouse Polymers by Transmission
10	588	44.86	Ethoxylated bisphenol A diacrylate (inhib. with 100ppm Methy	HR Sprouse Polymers by Transmission

Figura Spettro IR dell'elemento azzurro è dubitativamente attribuibile a resine fenoliche.

1.14 Allevamento Golfo Aranci (B) 3° trimestre 2023 – Estate

Per ciascuno dei 4 esemplari di pesci di specie Orata, IZS ha inviato n.1 campione di intestino (fatta eccezione per il campione B3_2I, per il quale sono stati esaminati n.2 filtri in silicio), n.1 campione di muscolo e, complessivamente, n.2 bianchi.

I risultati ottenuti sono riassunti in tabella dove si evidenzia l'assenza di microplastiche.

Campioni	Elementi Verdi	Microplastiche
B3_1I	2	Nessuna
B3_1M	Nessuno	Nessuna
B3_2I	Nessuno	Nessuna
B3_2M	Nessuno	Nessuna
B3_3I	Nessuno	Nessuna
B3_3M	Nessuno	Nessuna
B3_4I	Nessuno	Nessuna
B3_4M	Nessuno	Nessuna

Gli elementi verdi individuati sono riconducibili ad impurità dei reagenti utilizzati negli attacchi come già evidenziato in precedenza

1.15 Allevamento Stintino (C) 3° trimestre 2023 – Estate

Per ciascuno dei 4 esemplari di pesci di specie Orata, IZS ha inviato n.1 campione di intestino, n.1 campione di muscolo e, complessivamente, n.3 bianchi,

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella nella quale si riporta la presenza fortemente dubitativa di una microplastica nel muscolo del 2 pesce e la presenza di un elemento verde.

Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
C3_1I	Nessuno	Nessuna
C3_1M	Nessuno	Nessuna
C3_2I	Nessuno	Nessuna
C3_2M	Nessuno	1 bubitativa–
C3_3I	Nessuno	Nessuna
C3_3M	1	Nessuna
C3_4I	Nessuno	Nessuna
C3_4M	Nessuno	Nessuna

Nel campione C3-2M e presente un corpuscolo, inserito in tabella come microplastica dubitativa, di dimensioni ridottissime che ne impediscono l'analisi.

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

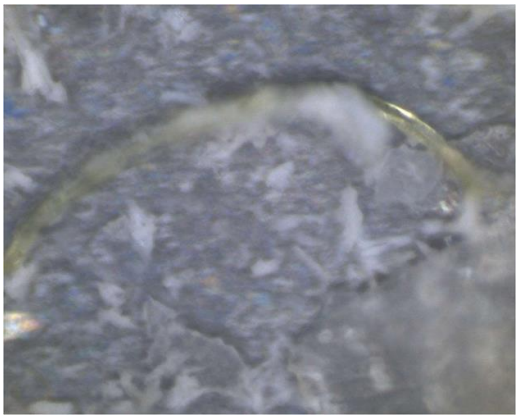
1.16 Allevamento Oristano (D) 3° trimestre 2023 – Estate

Per ciascuno dei 4 esemplari di pesci di specie Orata, IZS ha inviato n.1 campione di intestino, n.1 campione di muscolo e, complessivamente, n.2 bianchi.

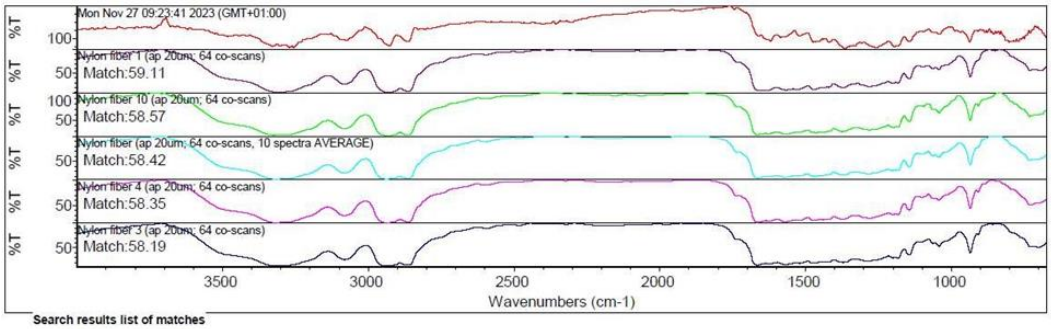
I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	Elementi verdi	Microplastiche
D3_1I	Nessuno	1 elemento arcuato
D3_1M	Nessuno	Nessuna
D3_2I	Nessuno	Nessuna
D3_2M	Nessuno	Nessuna
D3_3I	Nessuno	Nessuna
D3_3M	Nessuno	Nessuna
D3_4I	Nessuno	Nessuna
D3_4M	Nessuno	Nessuna

Nelle figure seguenti sono riportate le immagini ed il report strumentale dell'elemento rinvenuto nel campione D3_1I la cui analisi è compatibile con il nylon.



Search results for: Mon Nov 27 09:23:41 2023 (GMT+01:00)
Date: Mon Nov 27 09:44:26 2023 (GMT+01:00)
Search algorithm: Correlation
Regions searched: 3998.85-720.87



Search results list of matches

	Index	Match	Compound Name	Library Name
1	106	59.11	Nylon fiber 1 (ap 20um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
2	97	58.57	Nylon fiber 10 (ap 20um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
3	96	58.42	Nylon fiber (ap 20um; 64 co-scans, 10 spectra AVERAGE)	Microplastics Reflection
4	103	58.35	Nylon fiber 4 (ap 20um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
5	104	58.19	Nylon fiber 3 (ap 20um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
6	105	58.01	ylon fiber 2 (ap 20um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
7	100	58.00	Nylon fiber 7 (ap 20um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
8	112	57.82	Nylon fiber 6 (ap 30x50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
9	114	57.82	Nylon fiber 4 (ap 30x50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection
10	111	57.38	Nylon fiber 7 (ap 30x50um; 64 co-scans)	Microplastics Reflection

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it

4. Conclusioni

Le attività eseguite durante lo svolgimento del progetto da parte dell'UO Arpas hanno consentito di determinare, in collaborazione con l'UO IZS, un protocollo di "digestione" che ha permesso di degradare i tessuti dei pesci e contemporaneamente ottenere dei "filtrati" sulle membrane in silicio utilizzabili per le analisi dirette in Micro-FTIR.

Questo risultato riveste un ruolo importante nella ricerca delle microplastiche nel biota in quanto permette l'analisi diretta delle microplastiche, con limitate manipolazione delle dispersioni ottenute con gli attacchi e conseguentemente una limitata perdita di eventuali microplastiche.

Le analisi eseguite sui pesci campionati nei differenti allevamenti in 4 periodi dell'anno non hanno fatto evidenziare differenze legate alla stagionalità del campionamento anche perché come si evince dalla tabella seguente l'incidenza di microplastiche, anche considerando quelle dubitative, risulta estremamente ridotta.

Nella tabella sono riportati, per ogni allevamento, i risultati riassuntivi di tutti i pesci campionati suddivisi per organi nei 4 trimestri di campionamento:

Organo trimestre di riferimento	Allevamento (A) Tortoli	Allevamento (B) Golfo Aranci	Allevamento (C) Stintino	Allevamento (D) Oristano
Intestino - autunno	1	1	2	0
Intestino - inverno	NC	1	1	0
Intestino - primavera	0	0	0	0
Intestino - estate	0	0	0	1
Muscolo - autunno	0	0	0	0
Muscolo - inverno	NC	0	1	0
Muscolo - primavera	0	0	0	1
Muscolo - estate	1	0	1	0

NC= non campionato

E' da evidenziare in conclusione che la costante presenza di elementi verdi, di natura polipropilene, anche nei bianchi di filtrazione ha comportato una parziale difficoltà nel riconoscimento della eventuale presenza di microplastiche. Questi elementi come già più volte evidenziato sono stati interpretati come impurità nei reagenti utilizzati per la "digestione" del biota.

ARPAS Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna viale Ciusa, 6 - 09131 Cagliari - tel.+39 070/4042-601 dipartimento.geo@arpa.sardegna.it