

V. FERRARI^{1,2}, R. SIMONINI², S. RIGHI², D. PREVEDELLI², E. BERGAMI^{2,3}

¹Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche, Università di Modena e Reggio Emilia, Italia.

²Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Italia.

³National Biodiversity Future Center, Palermo, Italia.

valentina.ferrari@unimore.it

MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DI UN PROTOCOLLO PER L'ESTRAZIONE DI MICROPLASTICHE DAL VERME DI FUOCO *HERMODICE CARUNCULATA* (ANNELIDA)

SET UP AND VALIDATION OF A PROTOCOL TO EXTRACT MICROPLASTICS FROM THE FIREWORM *HERMODICE CARUNCULATA* (ANNELIDA)

Abstract - Microplastic pollution in the marine environment has raised high concern over the last years. An increasing number of studies have dealt with microplastic ingestion as it constitutes a hazard to marine organisms. However, information about some mediterranean benthic species, such as polychaetes, is still limited. Here, a tissue digestion method to extract microplastics from the fireworm *Hermodice carunculata* has been developed and the details are presented. Filterability, digestion effectiveness, recovery of microplastics and the reagent-dependent damage on common polymer types were assessed. The proposed protocol showed high efficiency on organic matter removal while preserving the structural integrity of the plastic polymers. Our results can be useful for standardizing the identification and quantification procedures of microplastics ingested by other polychaete species.

Key-words: Polychaetes, microplastic extraction, tissue digestion, Mediterranean Sea.

Introduzione - La contaminazione da microplastiche (MP; <5 mm) in mare è una delle più gravi emergenze ambientali del nostro tempo. Il Mar Mediterraneo è tra le aree maggiormente colpite dall'accumulo di rifiuti di plastica e MP a livello mondiale, come risultato delle condizioni idrodinamiche, dell'elevata densità di popolazione nelle aree costiere e dell'importante traffico marittimo (Sharma *et al.*, 2021). Data l'ubiquità, l'elevata persistenza in ambiente e le dimensioni ridotte, le MP sono biodisponibili per un'ampia gamma di organismi marini, che possono ingerirle direttamente o mediante il consumo di prede contaminate. L'ingestione di MP e i relativi impatti sono stati ampiamente documentati ad ogni livello delle catene trofiche marine, dai bivalvi ai pesci e alle tartarughe marine (e.g., Fossi *et al.*, 2018). Tuttavia, ad oggi i dati disponibili su alcuni gruppi bentonici, come ad esempio i policheti, sono ancora molto limitati.

Il verme di fuoco *Hermodice carunculata* (Pallas, 1766) è un polichete di grandi dimensioni comunemente presente lungo le coste del Mar Mediterraneo centro-orientale che, probabilmente a causa del progressivo riscaldamento dei mari, si sta espandendo in località sempre più occidentali e settentrionali (Righi *et al.*, 2020). Questo organismo è un saprofago e vorace predatore generalista in grado di consumare un'ampia gamma di invertebrati marini, tra cui ricci di mare, gorgonie e stelle marine (Righi *et al.*, 2020). L'estrema adattabilità e flessibilità della dieta, l'ampio areale di distribuzione e l'elevata densità delle sue popolazioni suggeriscono che *H. carunculata* possa rappresentare una specie utile per il biomonitoraggio delle MP a livello dei predatori bentonici (Vecchi *et al.*, 2021).

Considerando la mancanza in letteratura di protocolli condivisi e standardizzati per l'estrazione delle MP dai policheti, l'obiettivo del presente studio è stato quello di ottimizzare e validare un metodo estrattivo efficiente per determinare il contenuto di

MP nel verme di fuoco *H. carunculata*.

Materiali e metodi - Esemplari del polichete *H. carunculata* sono stati campionati da operatori subacquei lungo le coste ioniche della Puglia (Santa Maria al Bagno, LE) nell'ambito del progetto di Citizen Science "Monitoraggio vermocane" dell'Università di Modena e Reggio Emilia. Gli organismi prelevati sono stati sciacquati con acqua di mare filtrata a 0,2 µm per rimuovere possibili MP adese agli animali e conservati in etanolo al 70%.

Per identificare il trattamento di estrazione delle MP ottimale è stato seguito un approccio in tre fasi: (i) prove di digestione della materia organica usando diversi reagenti in base alle metodiche presenti in letteratura, (ii) ottimizzazione del protocollo scelto per aumentarne l'efficienza di estrazione, (iii) test di validazione del metodo.

Per la rimozione della materia organica, sono state innanzitutto comparate due metodiche basate sul trattamento alcalino-acido (Vecchi *et al.*, 2021) e ossidativo (Bergami *et al.*, 2023) del campione. Ciascuna soluzione testata (perossido di idrogeno (H₂O₂) al 25% e idrossido di potassio (KOH) al 10%) è stata aggiunta in bottiglie di vetro contenenti singoli esemplari di *H. carunculata*, precedentemente pesati e tagliati in pezzi per facilitare la digestione dei tessuti. Dopo incubazione a temperatura controllata (H₂O₂: 50°C; KOH: 40°C) per 48 ore in lenta agitazione, i campioni sono stati depositati su filtri in fibra di vetro (porosità: 1,2 µm) e osservati allo stereomicroscopio per confrontare la capacità di rimozione della sostanza organica dei due reagenti.

Successivamente, il metodo scelto è stato ottimizzato aggiungendo un pre-trattamento enzimatico con tripsina al 0,3% con incubazione a 37°C per 1 ora per limitare la formazione di schiuma nei campioni. Inoltre, siccome *H. carunculata* possiede setole urticanti di natura chitinosa-calcareo, dopo la digestione della materia organica è stato necessario un ulteriore passaggio di attacco acido. A questo scopo, sono state testate soluzioni di acido cloridrico (HCl) al 5% e di acido acetico (AcOH) al 10% (Reineccius *et al.*, 2021).

In seguito all'ottimizzazione del protocollo, sono state svolte ulteriori indagini mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) per verificare che i reagenti selezionati lasciassero inalterate la superficie e la morfologia dei polimeri sintetici. In particolare, è stato determinato il potenziale impatto del protocollo estrattivo su polivinilcloruro (PVC), poliammide (PA), polietilene tereftalato (PET) e polistirene (PS).

Infine, l'efficacia del protocollo sviluppato è stata valutata determinando l'efficienza di digestione dei tessuti del polichete (*Digestion Efficiency*, DE, %) e il tasso di recupero di polimeri di riferimento (*Recovery Rate*, RR, %).

La DE è stata calcolata come perdita percentuale di peso secco (von Friesen *et al.*, 2019) dei campioni a seguito del trattamento. A tal fine è stato determinato il peso secco iniziale di 3 esemplari di *H. carunculata* (essiccazione in stufa a 105°C per 6 ore) e di filtri in fibra di vetro (in stufa a 50°C per 24 ore). Al termine della procedura di estrazione, i campioni depositati sui filtri sono stati nuovamente essiccati in stufa per ottenere il peso secco dei residui di materia organica.

Per quantificare il RR, invece, sono state aggiunte delle MP di riferimento (PVC e PA, n = 30) a 3 campioni prima dell'inizio del protocollo. I due polimeri di riferimento sono stati scelti sulla base delle MP potenzialmente più abbondanti nei campioni, ovvero polimeri ad alta densità (PVC, densità = 1,38 g/cm³) che si depositano sul fondale marino e polimeri costituenti le reti da pesca (PA) con cui spesso i vermocani entrano

in contatto. Il RR è stato calcolato come numero delle MP ritrovate sui filtri al termine del processo di estrazione e filtrazione, rispetto al numero iniziale aggiunto ai campioni.

Risultati - Dalle prime prove effettuate è emerso che il KOH non è un reagente ottimale per la digestione di esemplari *in toto* del verme di fuoco. I digestati con KOH, infatti, presentavano numerosi residui di sostanza organica non digeriti e setole rispetto ai digestati con H₂O₂ (Fig. 1a). Il protocollo con H₂O₂ ha infatti permesso la filtrazione del campione su un unico filtro con porosità di 1,2 µm (Fig. 1b), mentre i digestati con KOH hanno richiesto 3 filtri per singolo campione anche con porosità maggiore, di 20 µm (Fig. 1c). Inoltre, a seguito del trattamento con KOH, tutta la superficie del filtro risultava coperta da molti residui organici e chitinosi, riducendo fortemente la possibilità di individuare potenziali MP nel campione. Pertanto, è stato scelto di procedere con il protocollo ossidativo, ottimizzato con pre-trattamento enzimatico e attacco acido, per la digestione dei tessuti di *H. carunculata*.

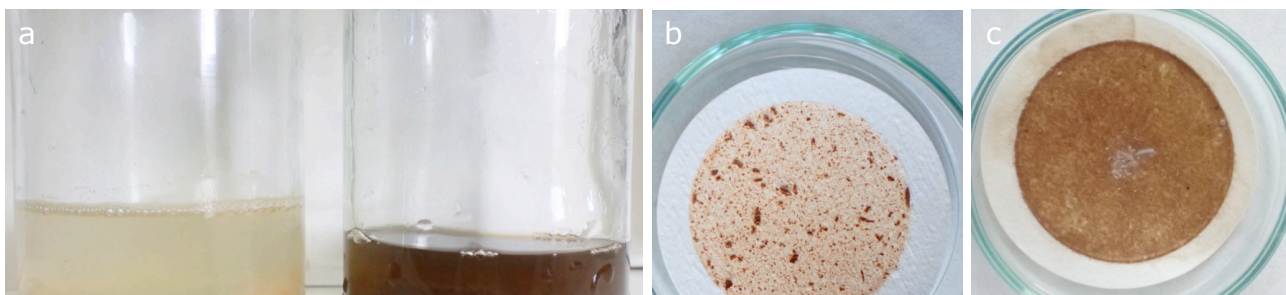


Fig. 1 - Digestione di esemplari di *H. carunculata* (a) dopo trattamento con H₂O₂ (a sinistra) e KOH (a destra); filtro ottenuto dopo la filtrazione dei campioni digeriti con H₂O₂ (b) e KOH (c).
H. carunculata specimen digestion (a) after H₂O₂ (on the left) and KOH (on the right) treatment; filter paper obtained after filtration of samples digested with H₂O₂ (b) and KOH (c).

L'analisi dei polimeri di riferimento al SEM mostra come il trattamento con H₂O₂ al 25% non abbia alterato la struttura superficiale in nessuno dei polimeri testati (PET, PVC, PA, PS). Inoltre, non è stato osservato alcun cambiamento di peso, dimensioni o colore dei frammenti esposti. Allo stesso modo, non sono state osservate evidenti alterazioni dei polimeri prima (Fig. 2a) e dopo il trattamento con gli agenti acidi, come AcOH (Fig. 2b).

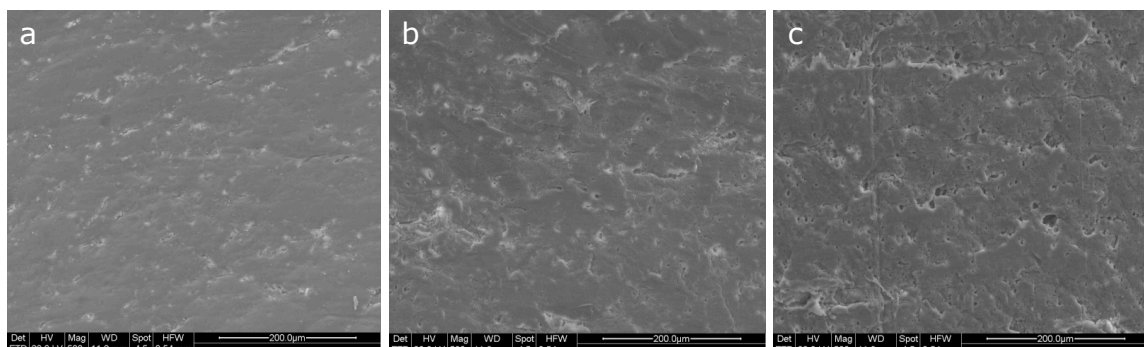


Fig. 2 - Immagini al SEM di frammenti di PVC non trattati (a), trattati con AcOH a temperatura ambiente per 2 ore (b) e con HCl a temperatura ambiente per 5 minuti (c).
SEM images of virgin PVC fragments (a), treated with AcOH at room temperature for 2 hours (b) and with HCl at room temperature for 5 minutes (c).

Di conseguenza, questo acido debole è stato scelto al posto dell'HCl (Fig. 2c), un acido forte più pericoloso, per dissolvere le setole di *H. carunculata*, agevolando la filtrazione dei campioni e migliorando l'identificazione di eventuali MP depositate sui filtri. Il trattamento con tripsina-H₂O₂-AcOH è risultato molto efficiente per la rimozione della materia organica, con DE = 98,4 ± 1,2% considerando il peso secco iniziale del campione. Il valore di DE ottenuto è maggiore rispetto a quelli riportati in letteratura per altri reagenti. Inoltre, il protocollo con tripsina-H₂O₂-AcOH ha richiesto tempi di processamento dei campioni inferiori (Vecchi *et al.*, 2021). Tale metodo ha anche raggiunto valori di RR altrettanto elevati: 94,4 ± 1,5% per i frammenti di PVC intenzionalmente aggiunti ai campioni e 86,7 ± 1,7% per i frammenti di PA.

Conclusioni - Nonostante i policheti rappresentino un'importante componente delle comunità macrobentoniche (Díaz-Castañeda e Reish, 2009), le informazioni riguardo la presenza di MP ingerite da questi animali sono ancora limitate. Trattandosi di campioni biologici ricchi sia di lipidi e proteine sia di strutture calcaree e chitinose, la loro digestione per estrarre e quantificare le MP risulta complessa.

In questo lavoro è stato messo a punto un protocollo, efficiente in termini di rendimento e tempo, per determinare il contenuto di MP in esemplari di *H. carunculata* basato sulla digestione della materia organica tramite trattamento enzimatico e ossidativo, seguito da un attacco acido per rimuovere le setole. Sulla base dei risultati ottenuti, non si raccomanda l'utilizzo del trattamento alcalino (KOH) per lo studio delle MP nel verme di fuoco a fini di monitoraggio ambientale; questo metodo infatti non risulta ottimale a causa della degradazione incompleta dei tessuti dell'animale e della difficoltà di filtrazione ed osservazione del campione. Il protocollo sviluppato, invece, basato su H₂O₂, mostra un'elevata capacità di rimozione della materia organica, senza provocare alcun effetto distruttivo sull'integrità di comuni polimeri sintetici e permettendo di recuperare efficacemente una buona quantità di MP. L'applicazione del protocollo risulta promettente per futuri studi di monitoraggio volti ad indagare l'abbondanza di MP nel verme di fuoco, così da comprendere meglio la potenziale minaccia rappresentata da questi contaminanti.

Bibliografia

- BERGAMI E., FERRARI E., LÖDER M.G., BIRARDA G., LAFORSCH C., VACCARI L., CORSI I. (2023) - Textile microfibers in wild Antarctic whelk *Neobuccinum eatoni* (Smith, 1875) from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Environ. Res.*, **216**: 114487.
- DÍAZ-CASTAÑEDA V., REISH D. (2009) - Polychaetes in environmental studies. In: Shain D.H. (ed), *Annelids in Modern Biology*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ: 205-227.
- FOSSI M.C., PEDÀ C., COMPA M., TSANGARIS C., ALOMAR C., CLARO F., IOAKEIMIDIS C., GALGANI F., HEMA T., DEUDERO S., ROMEO T., BATTAGLIA P., ANDALORO F., CALIANI I., CASINI S., PANTI C., BAINI M. (2018) - Bioindicators for monitoring marine litter ingestion and its impacts on Mediterranean biodiversity. *Environ. Pollut.*, **237**: 1023-1040.
- REINECCIUS J., BRESIEN J., WANIEK J.J. (2021) - Separation of microplastics from mass-limited samples by an effective adsorption technique. *Sci. Total Environ.*, **788**: 147881.
- RIGHI S., PREVEDELLI D., SIMONINI R. (2020) - Ecology, distribution and expansion of a Mediterranean native invader, the fireworm *Hermodice carunculata* (Annelida). *Mediterr. Mar. Sci.*, **21** (3): 558-574.
- SHARMA S., SHARMA V., CHATTERJEE S. (2021) - Microplastics in the Mediterranean Sea: sources, pollution intensity, sea health, and regulatory policies. *Front. Mar. Sci.*, **8**: 634934.
- VECCHI S., BIANCHI J., SCALICI M., FABRONI F., TOMASSETTI P. (2021) - Field evidence for microplastic interactions in marine benthic invertebrates. *Sci. Rep.*, **11** (1): 20900.
- VON FRIESEN L.W., GRANBERG M.E., HASSELLÖV M., GABRIELSEN G.W., MAGNUSSON K. (2019) - An efficient and gentle enzymatic digestion protocol for the extraction of microplastics from bivalve tissue. *Mar. Pollut. Bull.*, **142**: 129-134.