

“MAYDAY SOS PLASTICA”
Campagna 2019 promossa da Greenpeace Italia

“MICROPLASTICHE IN PESCI E INVERTEBRATI
CAMPIONATI NEL TIRRENO”

“MICROPLASTICS IN FISH AND INVERTEBRATES ALONG
THE TYRRHENIAN COAST”
Report Finale_luglio 2020

Prof.ssa Gorbi Stefania

Dr. Lucia Pittura

Dr. Alessandro Nardi

Dr. Fazio Simone

Dr. Lucia Ventura

Prof. Francesco Regoli

Dipartimento Scienze della Vita e dell’Ambiente
Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

Premessa

Nell'estate 2019 l'Università Politecnica delle Marche (UNIVPM) insieme al Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per lo studio degli Impatti Antropici e Sostenibilità in Ambiente Marino di Genova (CNR-IAS) ha partecipato alla campagna "Mayday SOS Plastica" promossa da Greenpeace, una campagna di sensibilizzazione e ricerca per lo studio e il monitoraggio della plastica e delle microplastiche in acqua sedimenti e organismi marini. L'attività si è svolta dal 18 maggio all'8 giugno 2019 nel Tirreno Centrale e precisamente lungo le coste della Toscana, Lazio, Campania e Sardegna, includendo anche isole dell'Arcipelago Toscano (Elba, Giglio, Pianosa, Capraia) e Ponziano (Ventotene), aree prominenti le foci dei fiumi (Foce dell'Ombrone, del Tevere e del Sarno) e aree marine protette come quella di Tavolara-Punta Coda Cavallo (isola di Tavolara, Molaro e Molarotto) (Figura 1).

Nel presente report vengono presentati i risultati relativi alla determinazione delle microplastiche (MPs) e delle microfibre (MFs) in pesci e organismi invertebrati campionati durante il tour. I risultati ottenuti saranno utili per fornire nuove informazioni sui livelli, frequenze di ingestione e sulla caratterizzazione chimica delle microparticelle di plastica e microfibre, in specie differenti campionate da aree sottoposte a diverso impatto antropico. I risultati saranno messi a confronto con quelli già ottenuti in campagne precedenti (Tour Greenpeace 2017_Less Plastic More Mediterranean; Avio et al., 2017) e consentiranno di evidenziare eventuali variazioni sui livelli di ingestione delle MPs e MFs, su scala temporale e spaziale.

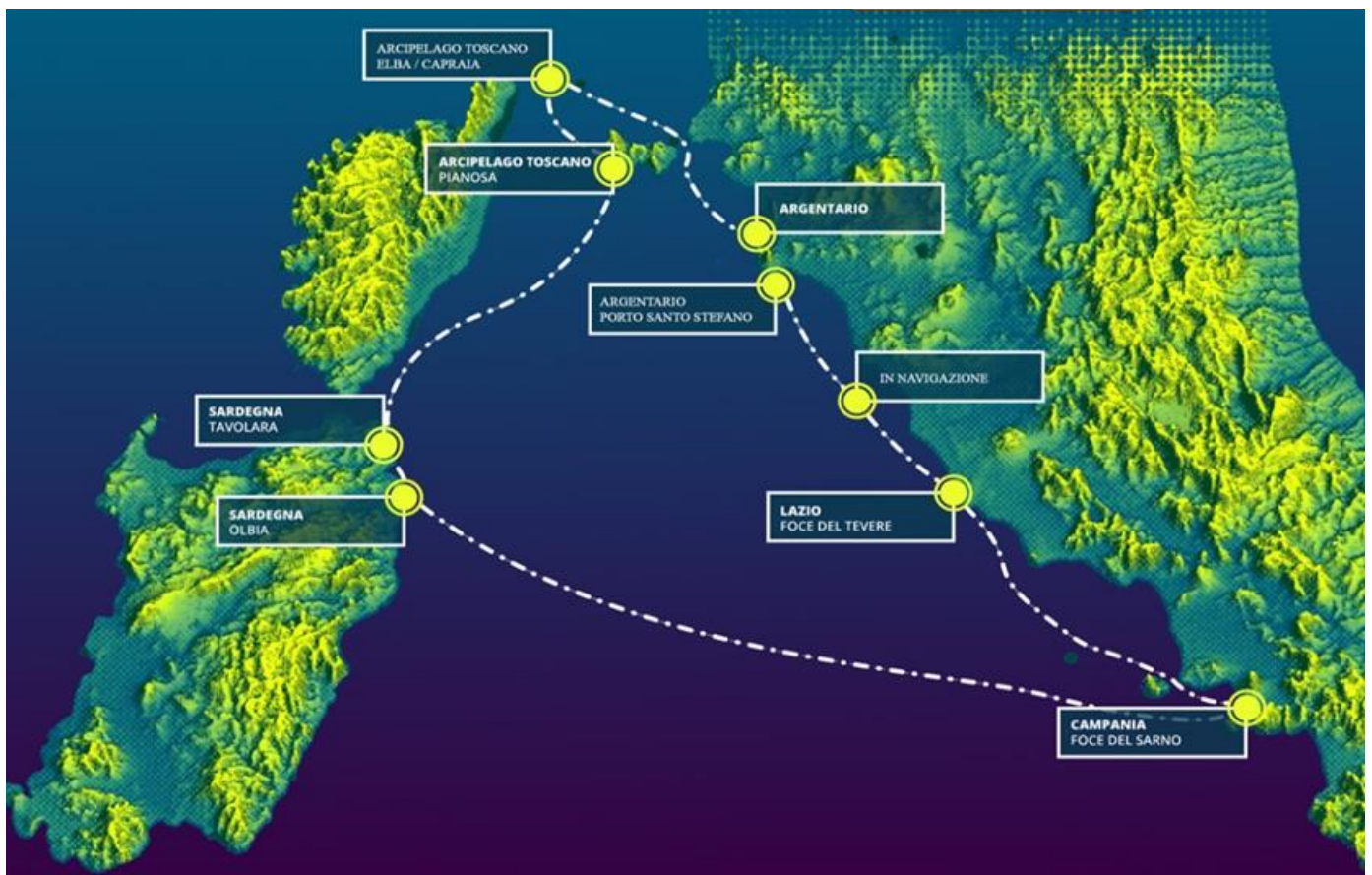


Figura 1. Rotta di navigazione del tour 2019 "Mayday SOS Plastica" con indicazione delle aree di campionamento di acqua, sedimenti e organismi per l'analisi delle microplastiche.

Campionamento di pesci e invertebrati marini

Grazie al supporto di pescatori locali gli organismi, sia pesci che invertebrati, sono stati prelevati dalle aree di Fiumicino (Fiumicino), Isola di Ventotene (Ventotene), Golfo di Napoli (Napoli), Isola d'Elba (Elba), Isola di Capraia (Capraia), foce del Fiume Ombrone (Ombrone) e da due siti all'Isola del Giglio: Giglio Porto e Campese. Questi ultimi rappresentano rispettivamente il sito di naufragio della nave Costa Concordia (Giglio Relitto: 42°22'04.80" N, 10°55'16.80" E) ed una zona di controllo (Giglio Ctrl: 42°37'06.36" N, 10°86'81.37" E), aree già monitorate nell'anno 2014 immediatamente dopo la rimozione del relitto, e nel 2017 quando è stato possibile verificare le variazioni temporali nei livelli di ingestione delle MPs e MFs (Avio et al., 2017). Il tour ha previsto anche attività di campionamento in Sardegna, dove pesci e scampi sono stati ottenuti da pescatori della zona del Golfo Aranci (Golfo Aranci) mentre mitili, *Mytilus galloprovincialis*, sono stati prelevati in 6 siti dai colleghi del CNR-IAS, con il supporto degli operatori dell'Area Marina Protetta di Tavolara-Punta Coda Cavallo. Nello specifico i mitili sono stati raccolti da filari di allevamento di cozze nel Golfo di Olbia (Olbia 1 e Olbia 2), da una boa che segnala l'entrata al porto di Olbia (Olbia 3), da boe di segnalamento nel Golfo Aranci (Golfo Aranci 1) e da boe per l'ormeggio all'Isola di Molarotto (Molarotto) e all'isola di Tavolara (Tavolara). La Figura 2 mostra le aree di campionamento e i siti specifici per l'area del Giglio e della Sardegna.



Figura 2. Aree di campionamento degli organismi con dettaglio dei siti in Sardegna e all'Isola del Giglio

In totale sono stati analizzati 308 organismi di cui 208 pesci appartenenti a 23 specie diverse e 100 invertebrati appartenenti a 3 specie. Le specie sono state scelte per il loro valore commerciale ed ecologico e il numero di individui per ognuna è stato definito secondo le disponibilità. In Tabella 1 sono riportate, per ogni area di campionamento, le specie target e il relativo numero di organismi analizzati, il dominio di appartenenza e i parametri morfometrici registrati *in situ* e prima della dissezione dei tratti gastrointestinali dei vertebrati e dell'intero tessuto molle degli invertebrati.

Non avendo la possibilità di processare immediatamente i tessuti freschi né di conservarli a -20°C, subito dopo la dissezione i campioni sono stati posti in barattoli di vetro contenenti una soluzione di idrossido di potassio (KOH) al 5% (peso: volume, 1:5) a temperatura ambiente. I campioni, così conservati, sono stati quindi trasportati presso i laboratori del DiSVA (Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente) dell'Università Politecnica delle Marche, per le successive analisi.

Tabella 1. Specie di pesci e invertebrati raccolte per ogni sito di campionamento, indicazione dei domini di appartenenza (www.fishbase.org), parametri morfometrici espressi come media \pm deviazione standard e numero di organismi analizzati per ogni specie.

Sito di campionamento	Specie (nome scientifico)	Specie (nome comune)	Dominio	Lunghezza organismo (cm)	Peso organismo (g)	N° organismi analizzati
Fiumicino	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardina	Pelagico	12,93 \pm 0,30	11,17 \pm 1,52	10
	<i>Mullus barbatus</i>	Triglia	Demersale	15,17 \pm 0,85	48,48 \pm 10,13	10
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merluzzo	Bento-Pelagico	19,28 \pm 1,26	58,28 \pm 14,23	10
	<i>Scomber scombrus</i>	Sgombro	Pelagico	26,4 \pm 2,78	157,74 \pm 41,96	10
	<i>Chelidonichthys lucerna</i>	Gallinella/Cappone	Demersale	22 \pm 1,29	102,25 \pm 13,07	4
Ventotene	<i>Scorpaena sp.</i>	Scorfano	Demersale	20	140	1
	<i>Boops boops</i>	Boga	Demersale	24,1 \pm 0,99	158 \pm 33,94	2
	<i>Coris julis</i>	Donzella	Bento-pelagico	19,6	80	1
	<i>Serranus scriba</i>	Sciarrano/Serrano	Demersale	17,25 \pm 1,06	79,9 \pm 30,97	1
	<i>Pagellus erythrinus</i>	Pagello	Bento-pelagico	19,21 \pm 0,74	103,07 \pm 14,10	2
	<i>Mullus barbatus</i>	Triglia	Demersale	19,61 \pm 0,58	88,4 \pm 5,94	2
	<i>Uranoscopus scaber</i>	Pesce prete	Demersale	30	500	1
	<i>Spicara maena</i>	Menola	Bento-pelagico	17,48 \pm 2,24	78,01 \pm 35,51	9
	<i>Raja clavata</i>	Razza	Demersale	52	-	1
Napoli	<i>Uranoscopus scaber</i>	Pesce prete	Demersale	25,87 \pm 1,84	443,75 \pm 220,16	4
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merluzzo	Bento-pelagico	20,4 \pm 0,81	60,54 \pm 12,59	10
	<i>Mullus barbatus</i>	Triglia	Demersale	16,65 \pm 1,87	69,03 \pm 0,74	10
	<i>Scomber scombrus</i>	Sgombro	Pelagico	27,05 \pm 2,17	311,58 \pm 148,55	10
	<i>Chelidonichthys lucerna</i>	Gallinella/Cappone	Demersale	26,67 \pm 0,93	268,71 \pm 130,61	6
	<i>Penaeus kerathurus</i>	Mazzancolla	Bentonico	18,21 \pm 1,72	36,76 \pm 13,9	10
	<i>Nephrops norvegicus</i>	Scampo	Bentonico	17,44 \pm 4,22	27,62 \pm 10,18	10
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mitilo	Bentonico	5,88 \pm 0,43	2,88 \pm 0,53	10
Elba	<i>Pagellus erythrinus</i>	Pagello	Bento-pelagico	22,62 \pm 1,03	143,65 \pm 13,20	4
	<i>Oblada melanura</i>	Occhiata	Bento-pelagico	25 \pm 1	190,67 \pm 36,83	3
	<i>Diplodus spp.</i>	Sarago	Demersale	17,6 \pm 1,14	79,24 \pm 6,95	5
	<i>Scorpaena spp.</i>	Scorfano	Demersale	20,38 \pm 4,17	166,1 \pm 101,13	5
	<i>Trachurus trachurus</i>	Sugarello	Pelagico	17,57 \pm 3,24	54 \pm 5	10
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Acciuga/Alice	Pelagico	15 \pm 0,93	22,52 \pm 4,45	10

Tabella 1 (continua...)

Sito di campionamento		Specie (nome scientifico)	Specie (nome comune)	Dominio	Lunghezza organismo (cm)	Peso organismo (g)	N° organismi analizzati
Capraia		<i>Spondyllosoma cantharus</i>	Tanuta	Bento-pelagico	31,25 ± 0,35	-	2
		<i>Umbrina cirrosa</i>	Ombrina	Demersale	25	293	1
		<i>Diplodus spp.</i>	Sarago	Demersale	20,50	148	1
		<i>Scorpaena spp.</i>	Scorfano	Demersale	23,80 ± 1,72	247 ± 53,74	5
Ombrone		<i>Scorpaena spp.</i>	Scorfano	Demersale	17,9 ± 1,48	130 ± 66,3	5
		<i>Sarpa salpa</i>	Salpa	Bento-pelagico	23,6 ± 0,74	198 ± 17,89	5
		<i>Mullus barbatus</i>	Triglia	Demersale	14,35 ± 7,69	49,14 ± 20,26	4
Giglio	Relitto	<i>Chelidonichthys lucerna</i>	Gallinella/Cappone	Demersale	29,30 ± 3,73	-	4
		<i>Scorpaena spp.</i>	Scorfano	Demersale	26,60 ± 3,59	-	5
		<i>Uranoscopus scaber</i>	Pesce prete	Demersale	25 ± 2,12	-	2
		<i>Sphyraena sphyraena</i>	Barracuda	Pelagico	71	-	1
	Ctrl	<i>Merluccius merluccius</i>	Merluzzo	Bento-pelagico	36	-	1
		<i>Sparus aurata</i>	Orata	Demersale	24,75 ± 1,06	-	2
		<i>Diplodus sargus</i>	Sarago	Demersale	14	-	1
		<i>Scorpaena spp.</i>	Scorfano	Demersale	25,07 ± 7,34	-	7
		<i>Uranoscopus scaber</i>	Pesce prete	Demersale	22,17 ± 0,29	-	3
		<i>Phycis phycis</i>	Musdea	Bento-pelagico	32 ± 2,83	-	2
	<i>Sphyraena sphyraena</i>	Barracuda	Pelagico	60	-	1	
Sardegna	Golfo Aranci	<i>Nephrops norvegicus</i>	Scampo	Bentonico	10,34 ± 0,72	12,44 ± 2,24	10
		<i>Merluccius merluccius</i>	Merluzzo	Bento-pelagico	22,50 ± 1,46	68,14 ± 36,11	5
		<i>Mullus barbatus</i>	Triglia	Demersale	14,30 ± 0,76	36,12 ± 6,7	5
		<i>Chelidonichthys lucerna</i>	Gallinella/Cappone	Demersale	23,90 ± 1,52	114,42 ± 19,62	5
	Olbia1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mitilo	Bentonico	5,76 ± 0,24	2,73 ± 0,48	10
	Olbia 2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mitilo	Bentonico	3,89 ± 0,25	1,00 ± 0,30	10
	Olbia 3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mitilo	Bentonico	3,61 ± 0,25	0,89 ± 0,23	10
	Golfo Aranci 1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mitilo	Bentonico	5,73 ± 0,43	2,00 ± 0,36	10
	Golfo Aranci 3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mitilo	Bentonico	5,22 ± 0,27	3,21 ± 0,69	10
	Molarotto	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mitilo	Bentonico	6,44 ± 0,76	4,11 ± 1,32	10
Tavolara	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mitilo	Bentonico	6,09 ± 0,49	4,31 ± 0,99	10	

Estrazione e caratterizzazione delle microplastiche

I campioni, dopo la fase di predigestione nella soluzione di KOH 5%, sono stati filtrati sottovuoto e i filtrati sono stati sottoposti ad una ulteriore digestione in una soluzione di perossido di idrogeno H₂O₂ 15%. Questa procedura si basa sul protocollo pubblicato da Avio et al. (2015), validato su vari tipi di campioni biologici e condiviso durante un workshop e un training-course internazionale tenuto nell'ambito della collaborazione tra due progetti europei JPI Oceans, EPHEMARE e BASEMAN

(https://www.researchgate.net/publication/332157735_Harmonized_protocol_for_monitoring_microplastics_in_biota).

I campioni digeriti nella soluzione di KOH sono stati trasferiti in un cilindro di vetro graduato a cui sono stati aggiunti circa 100/200 mL di soluzione satura di NaCl (1,2 g/cm³). La soluzione è stata mantenuta in agitazione su una piastra magnetica per 10 minuti e lasciata decantare per altri 10 minuti, al termine dei quali è stato recuperato il sovrantante. L'operazione è stata eseguita due volte per separare efficacemente le microplastiche contenute nel campione dal resto del materiale (es. sabbia, chitina, scheletri), sfruttando le diverse caratteristiche di densità. Il sovrantante ottenuto è stato poi filtrato attraverso un sistema di pompe sottovuoto utilizzando un filtro in nitrato di cellulosa con porosità 8 µm (Sartorius Stedim Biotech, Ø 47 mm); successivamente la membrana filtrante è stata recuperata, posta in una piastra Petri a cui è stata aggiunta una soluzione di H₂O₂ al 15% e lasciata in stufa a 50°C per una notte per la digestione della materia organica residua. Le membrane sono state quindi osservate allo stereomicroscopio (Optika SZM-D) dotato di una videocamera OptiKamB5 collegata al Software Optika Vision Lite 2.1; le MFs e le MPs sono state recuperate con pinzetta e ago montato, trasferite su un supporto dotato di un nuovo filtro e fotografate.

Le MFs vengono definite tali quando presentano un diametro inferiore ai 50 µm, una lunghezza da 1 µm a 5 mm e un rapporto lunghezza-diametro maggiore di 100, hanno una struttura filiforme, priva di un diametro regolare e con estremità sfilacciate che possono assumere forme trilobate a nastro e a L (Magni et al., 2019; Liu et al., 2019) (Figura 2). Le MPs vengono invece definite in funzione di 4 differenti tipologie di forma: le *linee* hanno spessore e lunghezza variabili ma un diametro regolare per tutta la loro lunghezza, con estremità nette e non sfilacciate, a differenza delle fibre; i *frammenti* sono rigidi, spessi, con bordi netti e forma irregolare (Lusher et al., 2017); i *film* sono più sottili e flessibili, di forma irregolare; i *pellet* sono particelle in cui ogni punto della superficie ha la stessa distanza dal centro (Hartmann et al., 2019) (Figura 2). Le particelle estratte sono state inoltre misurate nella diagonale più lunga e incluse in 4 classi dimensionali (5-1 mm; 1-0,5 mm; 0,5-0,1 mm; 0,1-0,01 mm).

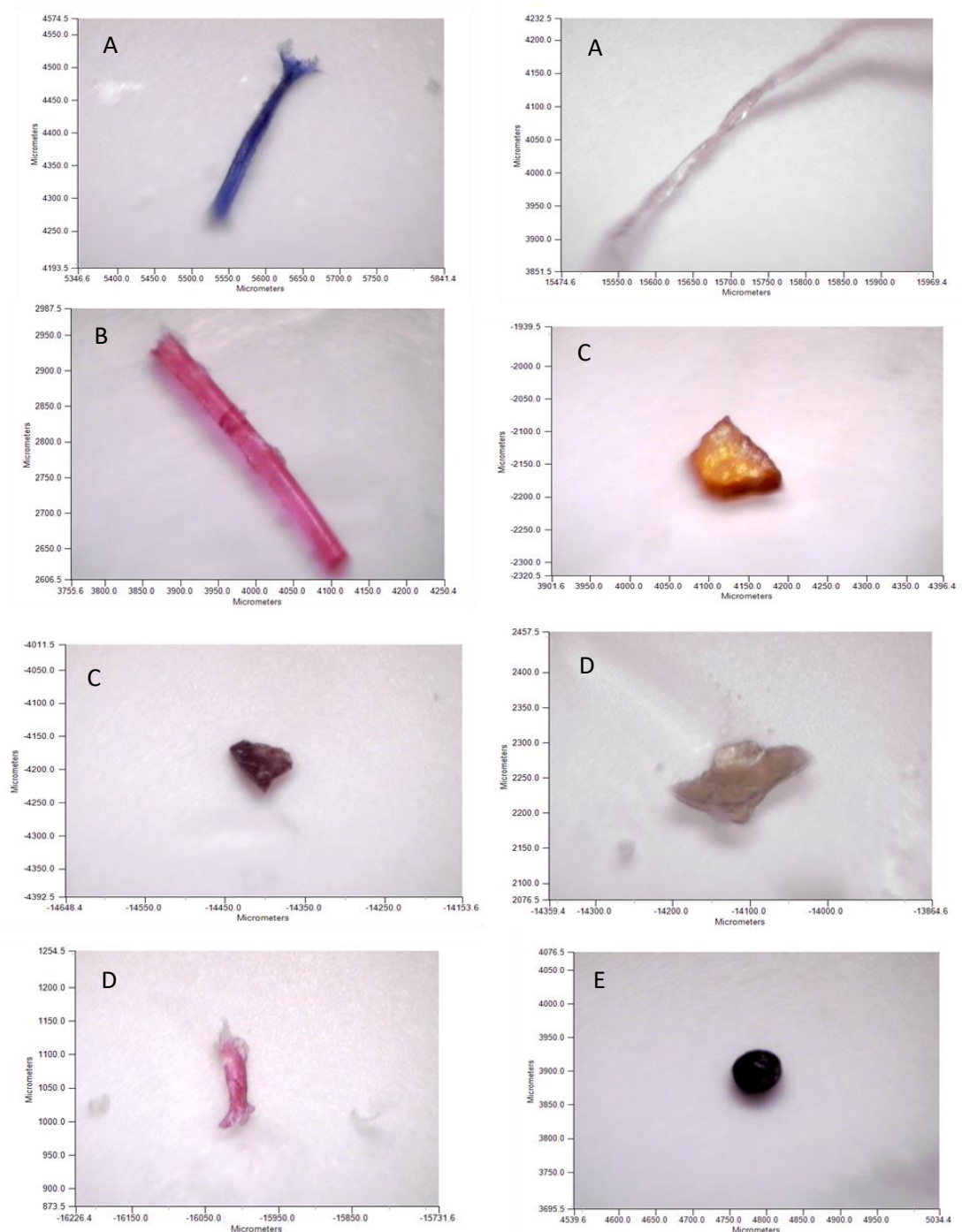


Figura 2. Esempi di microfibre (A) e microparticelle nella forma di linee (B), frammenti (C), film (D) e pellet (E)

Per accertarne l'origine sintetica e identificare il tipo di polimero, le MFs e le MPs sono state caratterizzate chimicamente utilizzando un sistema di microscopia FT-IR (Perkin Elmer Spotlight 200i) accoppiato al banco ottico Spectrum Two, in grado di caratterizzare in modalità micro-ATR particelle di dimensioni fino ai 10 x 10 μm . Per ogni microparticella, a seguito della scansione del background, sono state effettuate 16 scansioni registrate con risoluzione di 4 cm^{-1} . Per identificare il

polimero, gli spettri infrarossi ottenuti sono stati confrontati, grazie al software Spectrum TM 10, con librerie di spettri standard della Perkin Elmer, con i database ottenuti all'interno del progetto BASEMAN di JPI-Oceans (Primpke et al., 2018) e con altri database di laboratorio. Per l'elaborazione finale sono stati considerati solo gli spettri con corrispondenza superiore al 70% con lo spettro di riferimento (Avio et al., 2015). Inoltre, basandosi sulle raccomandazioni di Hartmann et al. (2019), sono stati tutti inclusi nella categoria delle plastiche sia i polimeri sintetici (quelli a base di petrolio, a base biologica e i polimeri ibridi), che i copolimeri e i compositi, mentre i polimeri naturali modificati (ad esempio il rayon) sono stati esclusi come suggerito da Suaria et al., 2020.

Controllo della contaminazione esterna

Durante il campionamento, la dissezione dei tessuti biologici e le successive fasi di estrazione in laboratorio sono state adottate specifiche precauzioni per controllare la contaminazione esterna, in particolare quella delle fibre sintetiche direttamente rilasciate dagli indumenti degli operatori o attraverso gli apporti atmosferici naturali.

Campioni di bianco, sono stati preparati al momento della dissezione in campo in barattoli di vetro, contenenti 100 ml circa di KOH al 5%, lasciati aperti durante tutta l'operazione di raccolta dei tessuti e processati in laboratorio con le stesse modalità a cui sono stati sottoposti i campioni biologici.

Le procedure di estrazione e caratterizzazione per l'analisi delle MFs e MPs sono state eseguite in un laboratorio dedicato, dove la presenza del personale è stata limitata a un massimo di due persone contemporaneamente. Gli operatori hanno indossato guanti in nitrile, abiti e camici da laboratorio di cotone. I banchi da lavoro sono stati puliti con etanolo puro prima di iniziare le attività e tra ogni fase di lavorazione. Sono state utilizzate attrezzature in vetro e metallo e prima dell'uso sono state sciacquate con acqua ultrapura, pulite ulteriormente con aria compressa e coperte con fogli di alluminio; anche gli accessori dell'apparato di filtrazione sono stati sottoposti allo stesso trattamento (Avio et al., 2020). Le soluzioni di H₂O₂ e KOH sono state diluite in acqua ultrapura, mentre la soluzione di NaCl è stata preparata in acqua distillata. Le soluzioni sono state ulteriormente filtrate su membrane sterili di acetato di cellulosa con dimensioni dei pori di 0,45 µm, ad eccezione del KOH al 5%, perchè corrosivo nei confronti della membrana di acetato di cellulosa.

In laboratorio, i campioni di bianco, preparati durante la fase di dissezione degli organismi in campo, sono stati processati secondo le stesse procedure previste per i campioni biologici; i risultati dei campioni di bianco hanno rilevato esclusivamente la presenza di MFs, mentre nessuna tipologia di MPs nella forma di frammenti, film, linee o pellet è stata ritrovata. Nello specifico, il numero di microfibre misurate nei campioni di bianco risulta estremamente variabile in funzione dei siti considerati e presumibilmente collegato alle condizioni logistiche e atmosferiche presenti al momento

della dissezione (es. presenza di vento, dissezione in barca e/o in luoghi aperti o in ambienti confinati, etc.): in totale sono state ritrovate 8 MFs nei campioni di bianco per i siti di Napoli e Ombrone, 12 per Ventotene, 17 per la Sardegna, 19 per Giglio Ctrl, 27 per l'isola d' Elba, 35 per Giglio Relitto fino a 51 MFs ottenute nei bianchi dell'isola di Capraia. Per questo motivo, è stato calcolato, per ogni sito investigato, un numero medio di fibre del bianco che è stato quindi sottratto al calcolo finale delle fibre rilevate negli organismi, così da escludere l'effetto della contaminazione esterna.

Analisi statistica

Il test non parametrico di Kruskal-Wallis è stato applicato per evidenziare eventuali differenze nel numero medio di microplastiche ingerite dagli organismi in relazione ai siti di campionamento. I dati sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism® e le differenze sono state considerate significative per $p < 0,05$.

Risultati

Un totale di 308 organismi rappresentativi di diverse specie di pesci e invertebrati, sono stati campionati da 8 diverse aree del Mar Tirreno durante la campagna Mayday SOS plastica nell'estate 2019.

La frequenza di ingestione delle microfibre da parte delle specie analizzate risulta molto alta, a prescindere dal sito di indagine, e dimostra ancora una volta l'ampia diffusione di MFs lungo le coste del Tirreno. In totale sono state estratte circa 2000 microfibre (MFs) dagli organismi, misurando una frequenza di ingestione del 89% e una media di $7,1 \pm 5,2$ MFs per singolo individuo (Fig. 3). Una frequenza di ingestione del 100% è stata evidenziata negli organismi dei siti Elba e Giglio Ctrl, 98% per quelli di Fiumicino, 95% per Ventotene, 94% per Giglio Relitto, 93% per Ombrone, 84% per Napoli, 81% per la Sardegna e 67% per Capraia (Fig. 3A). Il numero medio di microfibre ingerite dagli organismi campionati nei vari siti è risultato essere pari a $8,7 \pm 6,8$ a Fiumicino, 11 ± 6 a Ventotene, $6,3 \pm 5$ a Napoli, 9 ± 4 all'Elba, $5,2 \pm 4,8$ a Capraia, $5 \pm 3,8$ a Ombrone, $8,7 \pm 5$ nel sito di Giglio Relitto, $7,7 \pm 5$ nell'area Giglio Ctrl e $4 \pm 3,6$ in Sardegna (Fig. 3B).

La caratterizzazione polimerica ha tuttavia confermato la predominanza di una origine naturale di queste particelle, che non possono quindi essere considerate microplastiche, che per definizione sono costituite da solo materiale di origine sintetica. Le analisi in μ FT-IR sono state effettuate su un sub-campione di 287 MF rivelando che l'82,6% di queste erano di origine naturale, a base di cellulosa; il rimanente 17,4% di microfibre sintetiche era costituito per il 90% da poliestere, mentre il 10% era di natura semi-sintetica (viscosa) (Fig. 4).

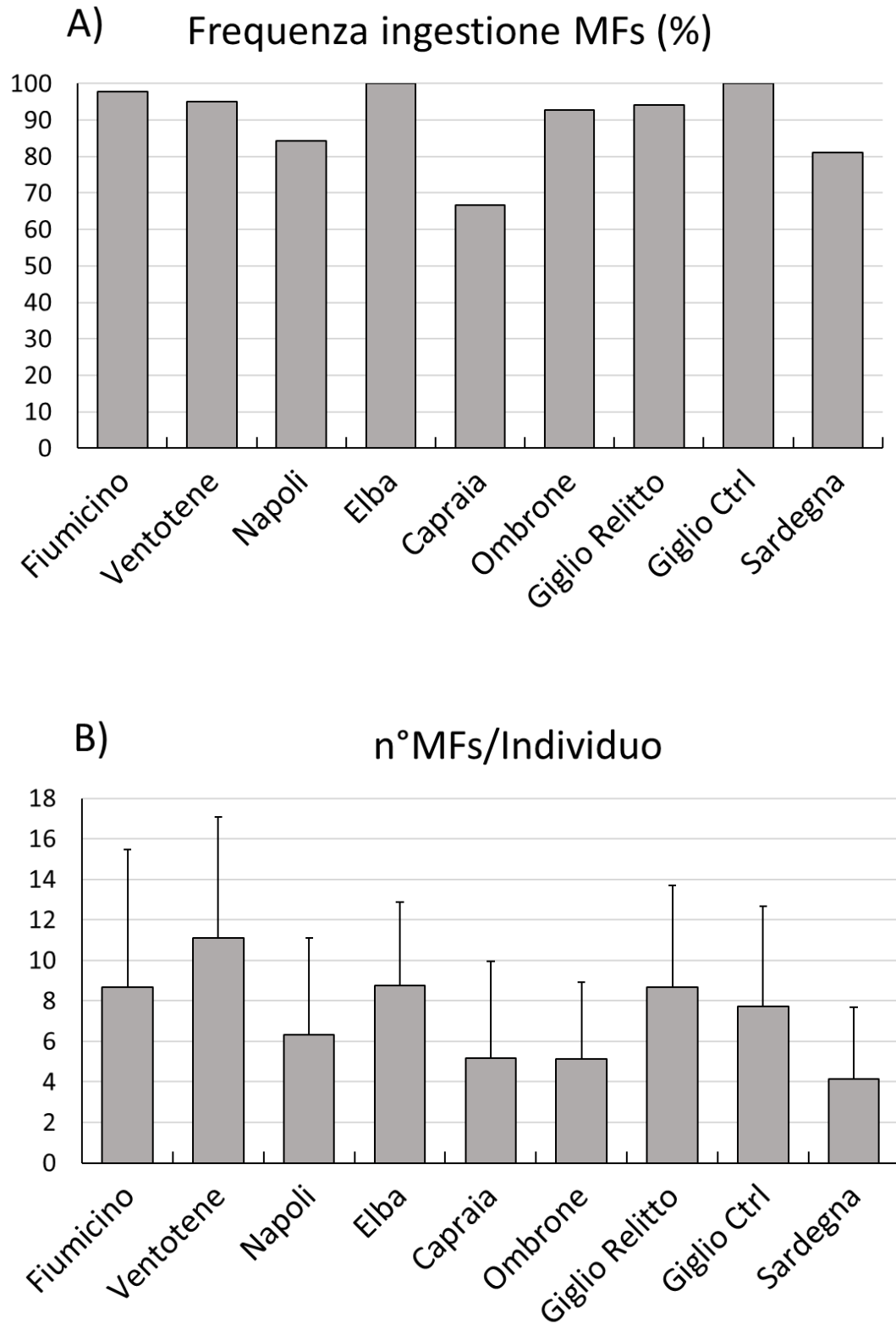


Figura 3. A) Percentuale di organismi positivi all'ingestione di almeno una MFs (frequenza di ingestione) e B) numero medio (\pm deviazione standard) delle MFs estratte per individuo, in funzione dei diversi siti di campionamento.

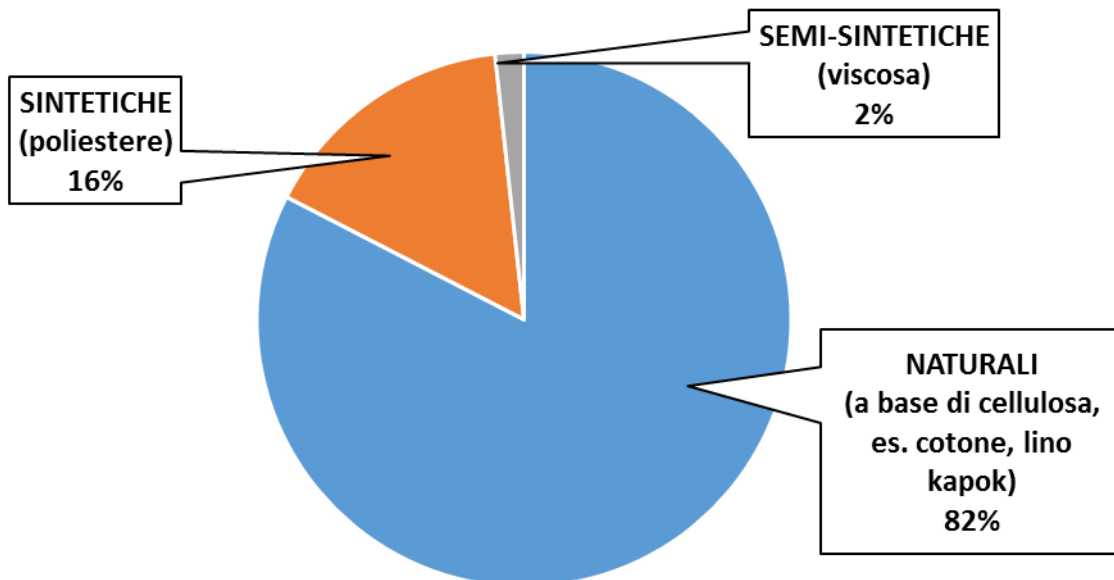


Figura 4. Composizione polimerica delle MFs estratte dagli organismi.

Per quanto riguarda le microplastiche (MPs), dei 308 organismi analizzati, 108 sono risultati positivi all'ingestione di almeno una MPs, con una frequenza quindi del 35%. Il numero totale di MPs estratte è stato di 158; il 72,2% degli organismi ha ingerito una sola particella, il 20,4% ne ha ingerite 2 e il 5,5% ne ha ingerite 3. Solo in pochissimi casi il numero di particelle ingerite è risultato superiore: ad esempio 7 particelle sono state estratte da un individuo di *Scomber scombrus* campionato a Fiumicino e 9 da un individuo del genere *Scorpaena* sp. campionato nel sito di Giglio Controllo.

I siti del Giglio, Elba e Capraia hanno mostrato le maggiori frequenze di ingestione (Fig. 5A, Tab. 2), pari al 76,5% nei pesci campionati nel sito di Giglio Ctrl, 50 % in quelli di Giglio Relitto, e 49 e 44% per quelli dell'isola d'Elba e di Capraia rispettivamente. Il numero medio di MPs ingerite per ogni organismo (considerando solo gli organismi positivi all'ingestione) è stato pari a $1,46 \pm 1,12$ (media \pm dev. st.). Considerando i diversi siti di indagine, il numero medio di particelle ingerite per individuo risulta simile tra le varie aree (Fig. 5B, Tab. 2), risultato confermato dall'assenza di differenze statisticamente significative tra i diversi siti indagati (Kruskall-Wallis test, $p=0,111$).

In Tabella 2 vengono riportate le frequenze di ingestione e il numero complessivo di MPs estratte dalle singole specie analizzate, per ogni sito di campionamento. Il maggior numero di organismi è stato campionato nei siti di Napoli ($n=70$) e Sardegna ($n=85$), aree dove è stato possibile campionare anche invertebrati e dove sono state rilevate frequenze di ingestione rispettivamente del 30% e del 22%.

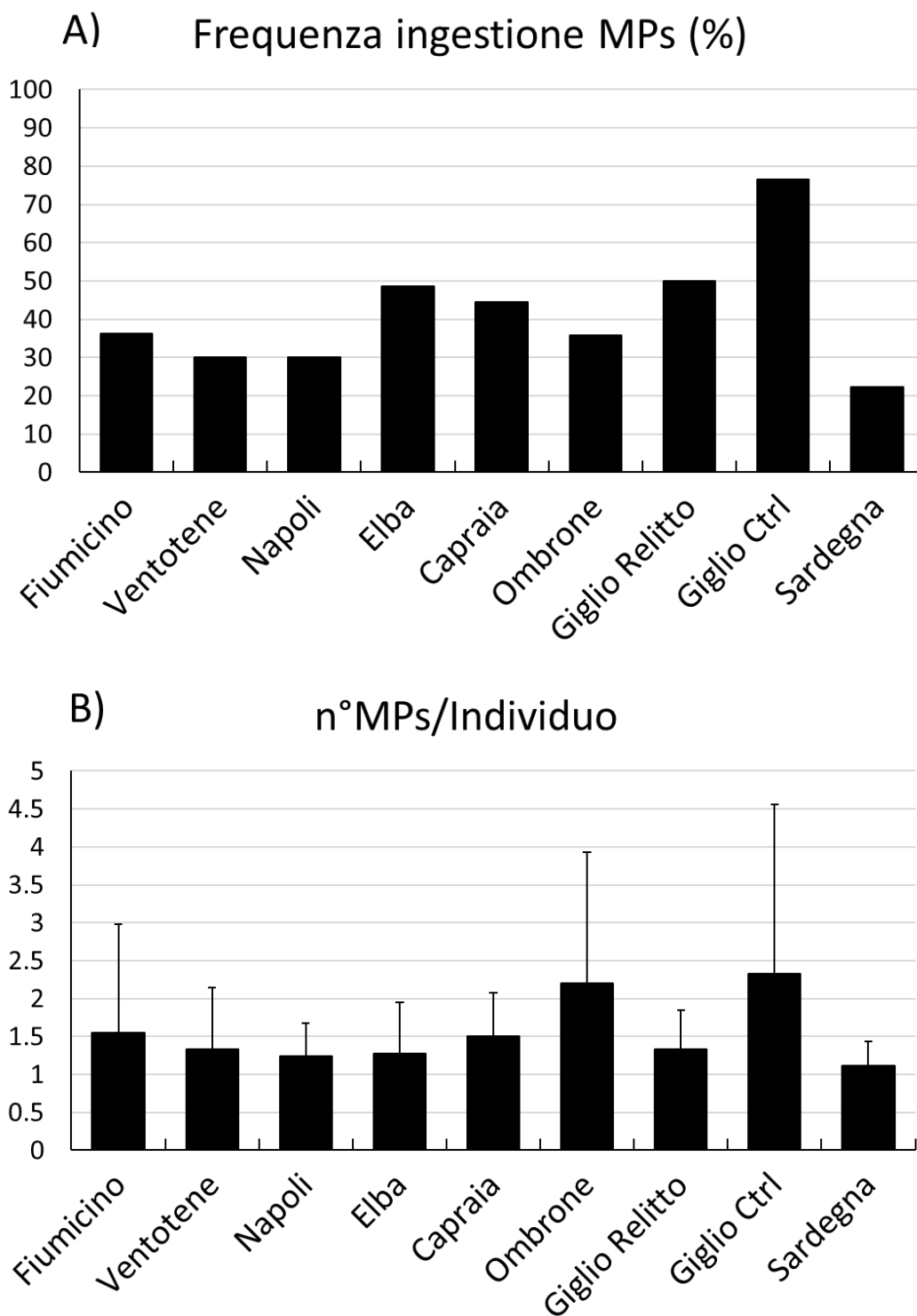


Figura 5. A) Percentuale di organismi positivi all'ingestione di almeno una particella di MPs (frequenza di ingestione) e B) numero medio (\pm deviazione standard) delle MPs estratte per ciascun individuo positivo all'ingestione, in relazione ai singoli siti di campionamento.

Tabella 2. MPs estratte negli organismi campionati nei diversi siti di indagine e specie: percentuale di organismi positivi all'ingestione di almeno una particella (frequenza); numero totale di particelle estratte e numero medio (\pm deviazione standard) calcolato sugli organismi positivi all'ingestione.

Sito di campionamento	Specie	N° organismi analizzati	Frequenza di ingestione	Tot. MPs estratte/tot.individui	N°MPs/individuo
Fiumicino	<i>Sardina pilchardus</i>	10	40 %	5	1,25 \pm 0,5
	<i>Mullus barbatus</i>	10	20 %	3	1,5 \pm 0,71
	<i>Merluccius merluccius</i>	10	40 %	5	1,2 \pm 0,45
	<i>Scomber scombrus</i>	10	30 %	10	3,33 \pm 3,21
	<i>Chelidonichthys lucerna</i>	4	75 %	3	1 \pm 0
	totale	44	36 %	26	1,56 \pm 1,42
Ventotene	<i>Scorpaena sp.</i>	1	0	0	0
	<i>Boops boops</i>	2	50 %	1	1 \pm 0
	<i>Coris julis</i>	1	0	0	0
	<i>Serranus scriba</i>	1	0	0	0
	<i>Pagellus erythrinus</i>	2	0	0	0
	<i>Mullus barbatus</i>	2	0	0	0
	<i>Uranoscopus scaber</i>	1	0	0	0
	<i>Spicara maena</i>	9	44 %	4	1 \pm 0
	<i>Raja clavata</i>	1	100 %	3	3 \pm 0
	totale	20	30 %	8	1 \pm 0,82
Napoli	<i>Uranoscopus scaber</i>	4	25 %	1	1 \pm 0
	<i>Merluccius merluccius</i>	10	50 %	6	1,2 \pm 0,45
	<i>Mullus barbatus</i>	10	30 %	4	1,3 \pm 0,58
	<i>Scomber scombrus</i>	10	40 %	7	1,8 \pm 0,5
	<i>Chelidonichthys lucerna</i>	6	33 %	2	1 \pm 0
	<i>Penaeus kerathurus</i>	10	20 %	2	1 \pm 0
	<i>Nephrops norvegicus</i>	10	30 %	3	1 \pm 0,58
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10	10 %	1	1 \pm 0
	totale	70	30 %	26	1,24 \pm 0,44
Elba	<i>Pagellus erythrinus</i>	4	75 %	3	1 \pm 0
	<i>Oblada melanura</i>	3	0	0	0
	<i>Diplodus spp.</i>	5	60 %	3	1 \pm 0
	<i>Scorpaena spp.</i>	5	20 %	1	1 \pm 0
	<i>Trachurus trachurus</i>	10	40 %	6	1,5 \pm 1
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	10	70 %	10	1,43 \pm 0,79
	totale	37	49 %	23	1,28 \pm 0,67

Tabella 2 (continua...)

Sito di campionamento		Specie	N° organismi analizzati	Frequenza di ingestione	Tot MPs estratte/tot. organismi	N°MPs/individuo
Capraia		<i>Spondyllosoma cantharus</i>	2	50%	2	2 ± 0
		<i>Umbrina cirrosa</i>	1	100%	1	1 ± 0
		<i>Diplodus spp.</i>	1	0	0	0
		<i>Scorpaena spp.</i>	5	10%	3	2 ± 0,71
		totale	9	44%	6	2 ± 0,58
Ombrone		<i>Scorpaena spp.</i>	5	20%	1	1 ± 0
		<i>Sarpa salpa</i>	5	60%	9	3 ± 1,73
		<i>Mullus barbatus</i>	4	25%	1	1 ± 0
		totale	14	36%	11	2,2 ± 1,73
Giglio	Relitto	<i>Chelidonichthys lucerna</i>	4	75%	5	1,65 ± 0,96
		<i>Scorpaena spp.</i>	5	40%	2	1 ± 0
		<i>Uranoscopus scaber</i>	2	50%	1	1 ± 0
		<i>Sphyaena sphyraena</i>	1	0	0	0
		totale	12	50%	8	1,33 ± 0,52
	Ctrl	<i>Merluccius merluccius</i>	1	100%	3	3 ± 0
		<i>Sparus aurata</i>	2	100%	3	1,5 ± 0,71
		<i>Diplodus sargus</i>	1	0	0	0
		<i>Scorpaena spp.</i>	7	86%	17	3,2 ± 3,35
		<i>Uranoscopus scaber</i>	3	33%	1	1 ± 0
		<i>Phycis phycis</i>	2	100%	3	1,5 ± 0,71
		<i>Sphyaena sphyraena</i>	1	100%	2	2 ± 0
	totale	17	76,5%	29	2,33 ± 2,23	
	Sardegna	Golfo Aranci	<i>Nephrops norvegicus</i>	10	30%	3
<i>Merluccius merluccius</i>			5	0	0	0
<i>Mullus barbatus</i>			5	20%	1	1 ± 0
<i>Chelidonichthys lucerna</i>			5	0	0	0
Olbia1		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10	10%	1	1 ± 0
Olbia 2		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10	20%	2	1 ± 0
Olbia 3		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10	10%	1	1 ± 0
Golfo Aranci 1		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10	30%	3	1 ± 0
Molarotto		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10	10%	1	1 ± 0
Tavolara		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10	70%	9	1,3 ± 0,49
	totale	85	22%	21	1,1 ± 0,32	

Nel Golfo di Napoli è stata evidenziata una percentuale del 37,5% di pesci positivi all'ingestione di almeno una particella (15 dei 40 organismi analizzati in totale); tra le singole specie, *Merluccius merluccius* presenta la frequenza di ingestione più alta (50%), mentre tra gli invertebrati *Nephrops norvegicus* è risultata la specie con la frequenza di ingestione maggiore (30%). Dei 15 pesci analizzati per il sito della Sardegna un solo organismo, appartenente alla specie *Mullus barbatus*, è risultato positivo all'ingestione di un frammento di plastica. Considerando gli invertebrati, *Nephrops norvegicus* ha mostrato una frequenza di ingestione del 30%, mentre per i mitili *Mytilus galloprovincialis* la frequenza di ingestione varia dal 70% per il sito Tavolara, al 10% nel sito Isola di Molarotto; frequenze di ingestione dal 10 al 20% sono state riscontrate nei mitili raccolti dai filari degli allevamenti situati nel Porto di Olbia (Olbia 1 e Olbia 2) e dalla boa che segnala l'entrata nel porto (Olbia 3), mentre una frequenza di ingestione del 30% è stata ritrovata nei mitili raccolti da una boa di segnalamento nel Golfo Aranci (Golfo Aranci 1).

L'area con la frequenza di ingestione maggiore è risultata quella di Giglio Ctrl, (76,5%, 13 individui su 17 analizzati). In questo sito la specie *Scorpaena* spp., con il numero più alto di individui analizzati, ha presentato una frequenza di ingestione dell'86%. Nell'area di Giglio Relitto, la percentuale di organismi positivi all'ingestione, su un totale di 12 organismi campionati, è risultata inferiore (50%) e la frequenza di ingestione più alta (75%) è stata osservata nella specie *Chelidonichthys lucerna*.

Nel sito di Fiumicino tutte le 5 specie analizzate sono risultate positive all'ingestione, con 16 organismi positivi su un totale di 44 campionati, una frequenza di ingestione del 36% e un totale di 26 particelle estratte: la frequenza più alta (75%) è stata ancora una volta registrata nella specie *Chelidonichthys lucerna*, seguita da *Sardina pilchardus* e *Merluccius merluccius* con una frequenza del 40%, *Scomber scombrus* con il 30% e *Mullus barbatus* con il 20%.

Considerando il sito dell'Isola di Ventotene, sono stati analizzati organismi appartenenti a 9 specie diverse ma solo 3 sono risultate positive all'ingestione: *Boops boops*, *Spicara maena* e *Raja clavata*. Tra queste, *S. maena* ha presentato una frequenza del 44%, inferiore a quella riscontrata in *B. boops* (50%) di cui sono stati però analizzati soltanto 2 individui e a *R. calvata*, di cui è stato campionato un solo organismo, contenente 3 MPs.

Nell'area dell'Isola d'Elba è stata registrata una frequenza complessiva di ingestione del 49% (18 su 37 organismi analizzati), con un totale di 23 particelle estratte; delle 6 specie analizzate solo *Ombrina melanura* non ha mostrato MPs nel tratto gastrointestinale. La specie con il maggior numero di MPs ingerite (10 particelle) è risultata *Engraulis encrasicolus* con una frequenza del 70%, di poco inferiore a quella di *Pagellus erythrinus* (75%) da cui sono state estratte 3 particelle da 3 individui su un totale di 4 campionati. La frequenza minore è stata registrata in *Scorpaena* spp., con un solo organismo positivo su un totale di 5 campionati (20%) e da cui è stata estratta un'unica particella. In questo sito, *Diplodus sargus* ha mostrato un'elevata frequenza di ingestione (60%), con 3 dei 5 organismi analizzati positivi all'ingestione di una particella ciascuno.

La specie *Diplodus sargus* è stata campionata anche nel sito di Capraia, ma nell'unico organismo analizzato non sono state ritrovate microplastiche. Le altre 3 specie analizzate hanno presentato complessivamente una frequenza pari al 44% (4 dei 9 organismi analizzati sono risultati positivi

all'ingestione). La maggior parte degli organismi campionati apparteneva al genere *Scorpaena* spp. che ha mostrato una frequenza di ingestione del 40%.

Infine, nell'area di Foce Ombrone 5 organismi su 14 sono risultati positivi all'ingestione, con una frequenza del 36% e un numero di particelle totali estratte pari a 11. Tutte le 3 specie analizzate sono risultate positive all'ingestione e la specie con la frequenza più alta, pari al 60%, è risultata *Sarpa salpa* che è anche la specie da cui sono state estratte la maggior parte delle MPs (9 su 11). Le altre 2 specie hanno mostrato valori di frequenza di ingestione simili: in *Scorpaena* spp. è stata estratta una sola particella da uno dei 5 organismi analizzati (20%) mentre in *Mullus barbatus* è stata estratta una sola MPs dall'unico organismo positivo su 4 (25%).

In Figura 6 sono riportati i risultati della caratterizzazione delle MPs estratte nel totale degli organismi analizzati e, nello specifico, vengono presentati i contributi relativi (%) di ogni forma, classe dimensionale e tipologia polimerica. La forma riscontrata più frequentemente è stata quella dei film (45,6%), seguita dai frammenti (36,1%), dalle linee (17,7%) e dai pellet (0,6%) (Figura 6 A). Per quanto riguarda le classi dimensionali la maggior parte delle particelle ingerite dagli organismi sono risultate inferiori a 0.5 mm (70%), con un contributo del 39% e del 31%, rispettivamente, per la classe di taglia 0.5-0.1 mm e 0.1- 0.01 mm. Considerando le classi di taglia maggiore, sono state riscontrate frequenze del 16,4% per il range 5-1 mm e del 13,3% per la classe 1-0.5 mm (Figura 6 B). L'analisi FTIR ha dimostrato la presenza di 24 tipologie diverse di polimeri ingeriti con il contributo maggiore dato dal polietilene (20%), polipropilene (13%) e dal poliestere (12%). Altre tipologie polimeriche sono state ritrovate con frequenze minori del 10% come la poliammide, il poliacrilato, il copolimero Etilene Vinil Acetato (EVA) (8%) e il copolimero etilene propilene diene (6%). Infine, con percentuali ancora più basse, variabili tra l'1 e il 4%, sono stati identificati altri copolimeri (stirene acrilato, stirene isoprene, etilene acrilato, etilene-propilene con EVA, polietilene-vinil-alcol, stirene-etilene-butilene) e polimeri (polivinil cloruro, elastomero termoplastico, vernice alchidica, silicone, gomma poliacrilica, plastificante adipico e termopolimero PVC PA PE, poliuretano, resina epossifenolica, polistirene e polioossimetilene) che insieme sono stati inclusi nella categoria "Altri" e che hanno contribuito con una frequenza totale del 27% (Figura 6 C). La caratterizzazione chimica ha quindi evidenziato una certa eterogeneità polimerica ma con un contributo dei singoli polimeri piuttosto omogeneo.

In Figura 7 vengono presentate le caratteristiche delle MPs estratte dagli organismi, in funzione dei diversi siti di campionamento. Nella maggior parte dei siti domina la forma dei film (con percentuali dal 37 al 64%), ad esclusione dell'Isola di Ventotene e dell'Isola d'Elba in cui la classe morfologica più frequente negli organismi è stata quella dei frammenti con percentuali rispettivamente del 50 e del 48%, e nell'area della Sardegna in cui la forma più frequente è stata quella delle linee (38%). Solo nel sito di Giglio Relitto sono state trovate tutte le tipologie di forma, con una preponderanza di film (37,5%), seguiti da frammenti (25%), linee (25%) e pellet (12,5%), mentre nel sito di Giglio Controllo sono stati identificati solo film (52%) e frammenti (48%) (Figura 7 A).

Nel sito di Ventotene è stata registrata la percentuale più alta (75%) di particelle ingerite nella classe dimensionale più piccola (0,1-0,01 mm), mentre non è stata trovata negli organismi nessuna particella

appartenente alla classe maggiore (5-1 mm). Anche nel sito di Giglio Relitto tutte le particelle ingerite sono ricadute nelle classi dimensionali più piccole, con il 75% compreso tra 0,5 e 0,1 mm e il 25% tra 0,1 e 0,01 mm. La percentuale più alta di particelle appartenenti alla classe dimensionale da 5 a 1 mm è stata invece registrata negli organismi campionati in Sardegna con il 23,8% su un totale di 21 particelle estratte; frequenze leggermente inferiori sono state riscontrate nel sito di Giglio Controllo (21%), Napoli (19%), Elba e Capraia (17%), mentre dagli organismi campionati nel sito Ombrone le particelle comprese tra 5 e 1 mm erano il 9% del totale (Figura 7 B).

I siti che riflettono maggiormente l'eterogeneità di polimeri sono quelli di Fiumicino e di Giglio Controllo con 13 tipologie differenti rilevate (Fig. 7 C): negli organismi campionati a Fiumicino il polimero più frequente è risultato essere il polioossimetilene (15,4%) mentre nel sito di Giglio Controllo la frequenza maggiore è stata registrata per il polietilene (27,6%). Il polietilene rappresenta anche il polimero più ritrovato negli organismi prelevati all'Isola d'Elba (30%) e a Napoli (27%) insieme al poliacrilato (23%). Il minor numero di polimeri diversi tra loro è stato registrato a Ventotene, Capraia e Giglio Relitto, con 5 o 6 tipologie polimeriche, tuttavia, mentre per Ventotene e Capraia si osserva una certa omogeneità nel contributo relativo di ogni polimero, le MPs estratte dai pesci del sito di Giglio Relitto erano per il 37,5% di polipropilene. Anche per i pesci campionati a Foce Ombrone il polimero più riscontrato è stato il polipropilene (27,3%), mentre le restanti 9 tipologie hanno contribuito con una frequenza del 9% ciascuna. Alcuni polimeri sono stati riscontrati esclusivamente in alcuni siti, come il silicone, registrato unicamente presso l'Isola d'Elba con una percentuale del 4,3% o come il plastificante adipico e il termopolimero PVC-PA-PE estratti dagli organismi prelevati presso il sito Ombrone con percentuali del 9% sul totale delle tipologie di polimeri (Figura 7 C).

I risultati ottenuti in alcuni siti già campionati nelle campagne precedenti del 2014 e 2017 sono stati messi a confronto in Figura 8. Le frequenze di ingestione delle MPs risultano in generale comparabili tra i diversi anni di campionamento, dimostrando che questo tipo di contaminazione ha caratteristiche piuttosto ubiquitarie e costanti nel tempo. Livelli sempre maggiori di ingestione sono stati osservati nei siti di campionamento l'isola del Giglio, anche se a partire dal 2017, dopo tre anni dalla rimozione del relitto della Costa Concordia, era già evidente un certo miglioramento nei pesci campionati a Giglio Relitto, con frequenze di ingestione inferiori rispetto al 2014. In generale l'alta frequenza di MPs nei pesci del Giglio riflette la maggiore vicinanza delle aree di cattura alle coste dell'isola che, soprattutto durante la stagione estiva, sono maggiormente influenzate dalla pressione antropica legata al turismo.

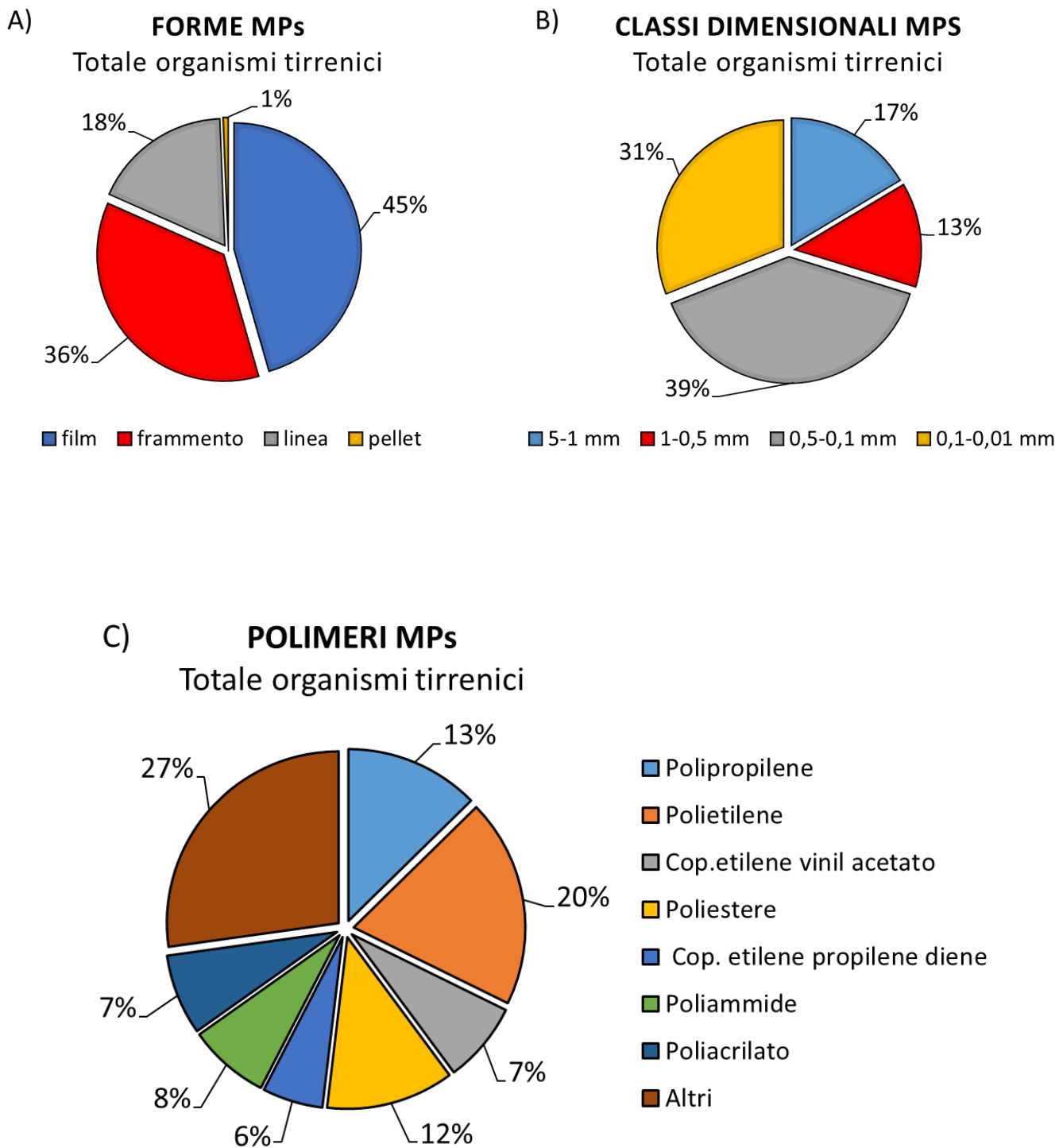


Figura 6. Caratterizzazione delle forme (A), classi dimensionali (B) e tipologia polimerica (C) delle MPs totali estratte dagli organismi analizzati. La categoria “Altri” include quelle MPs (n=17) con caratteristiche polimeriche che si presentano con una frequenza inferiore al 4%.

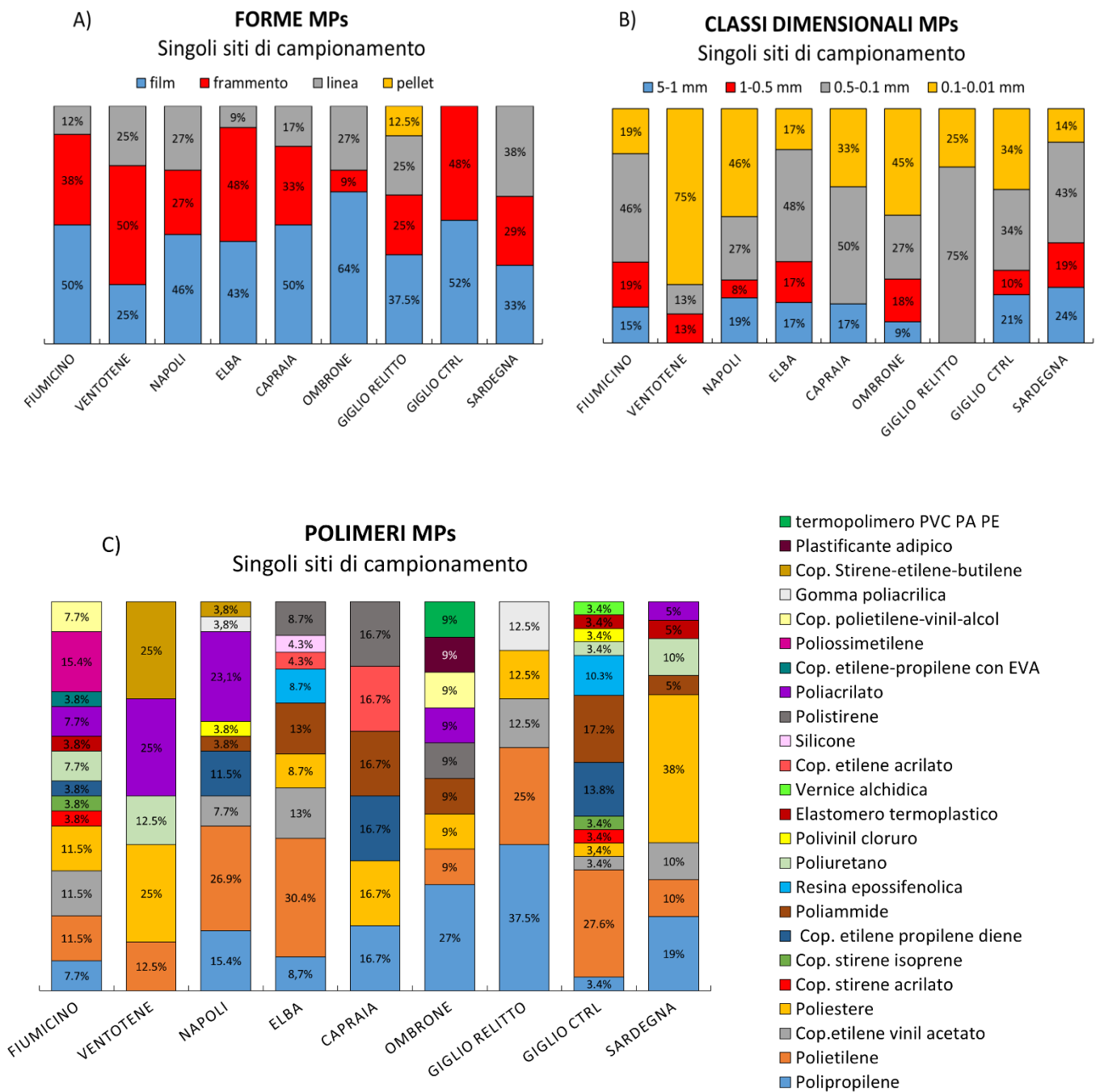


Figura 7. Contributo relativo (frequenza) delle singole forme (A), classi dimensionali (B) e polimeri (C) sulle microparticelle di plastica (MPs) totali estratte dagli organismi per ogni sito di indagine.

I risultati ottenuti in alcuni siti già campionati nelle campagne precedenti del 2014 e 2017 sono stati messi a confronto in Figura 8. Le frequenze di ingestione delle MPs risultano in generale comparabili tra i diversi anni di campionamento, dimostrando che questo tipo di contaminazione ha caratteristiche piuttosto ubiquitarie e costanti nel tempo. Livelli sempre maggiori di ingestione sono stati osservati nei siti di campionamento l'isola del Giglio, anche se a partire dal 2017, dopo tre anni dalla rimozione del relitto della Costa Concordia, era già evidente un certo miglioramento nei pesci campionati a Giglio Relitto, con frequenze di ingestione inferiori rispetto al 2014. In generale l'alta frequenza di MPs nei pesci del Giglio riflette la maggiore vicinanza delle aree di cattura alle coste dell'isola che, soprattutto durante la stagione estiva, sono maggiormente influenzate dalla pressione antropica legata al turismo.

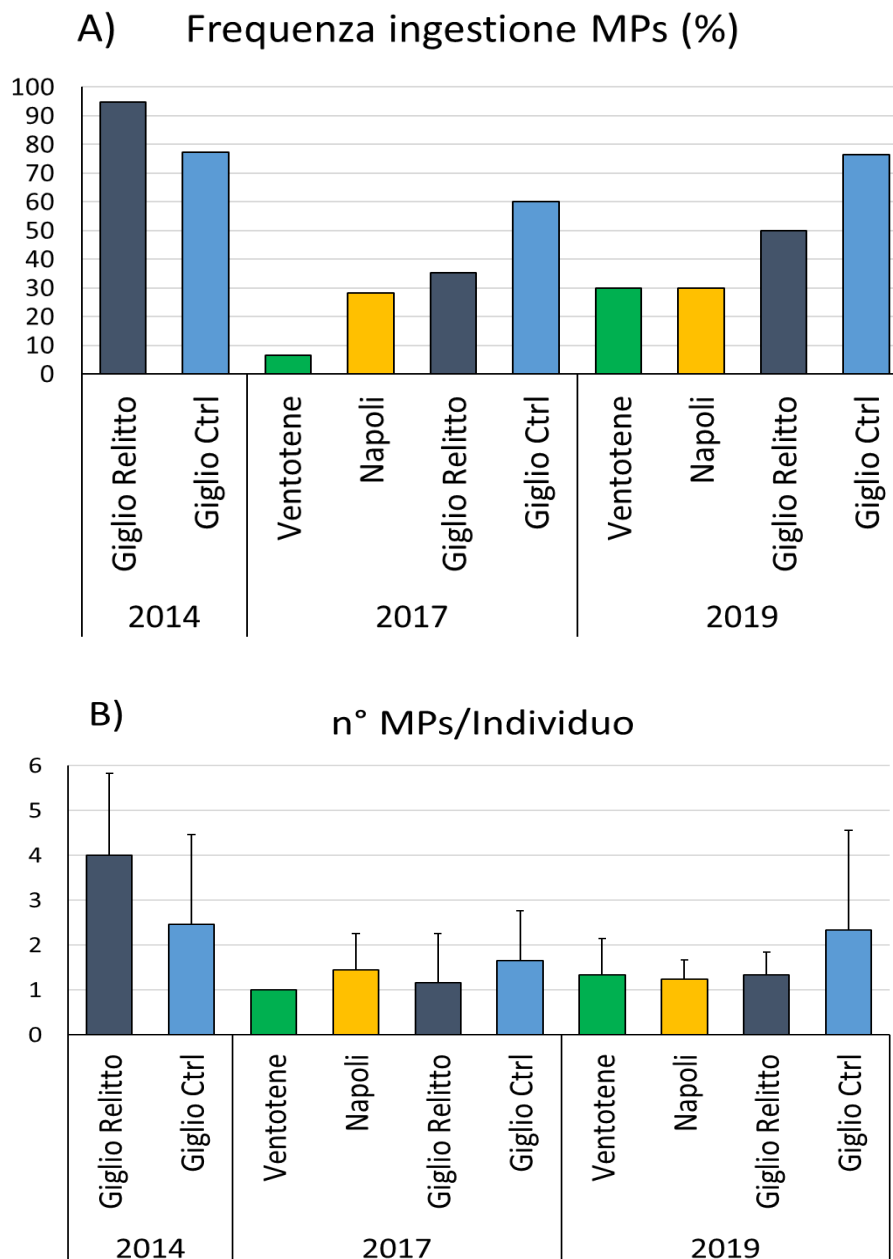


Figura 8. Confronto tra i risultati ottenuti dall'analisi degli organismi campionati nel Mar Tirreno nei siti in comune tra gli anni 2014, 2017 e 2019; A) percentuale di organismi positivi all'ingestione di almeno una microparticella di plastica (MPs) (frequenza di ingestione) sul totale analizzati e B) numero medio (\pm deviazione standard) delle MPs estratte per individuo.

Conclusioni generali

La frequenza generale di ingestione delle microplastiche negli organismi campionati durante la campagna Mayday SOS Plastica nel 2019 risulta del 35%, leggermente superiore a quella già osservata durante la precedente campagna effettuata nel 2017 (30%) e a quella riferita agli organismi del Mar Adriatico (27%) (Avio et al., 2020).

I risultati ottenuti sul numero di microplastiche ritrovate per individuo avvalorano quanto riscontrato in altre aree del Mediterraneo e a livello globale, cioè che il numero delle particelle riscontrate nei tratti gastrointestinali degli organismi è generalmente di 1 o 2 particelle, indipendentemente che siano pesci o invertebrati. Numeri maggiori di particelle ingerite per individuo vengono ritrovati sporadicamente e senza correlazioni con le specie analizzate o i siti di indagine. Più alti sono risultati i valori ottenuti per le microfibre, con una frequenza di ingestione media del 90% ed un numero di MFs mediamente pari a $7,6 \pm 5,4$ per individuo, confermando i dati già osservati nelle specie campionate in Adriatico (Avio et al., 2020).

Al fine di monitorare la presenza delle microplastiche e delle microfibre in mare, la misura della frequenza di ingestione risulta assumere una valenza maggiore rispetto al numero di particelle ingerite. Infatti, tale parametro meglio di altri è in grado di riflettere la probabilità per gli organismi di entrare in contatto con le microparticelle nel proprio habitat, e fornisce la possibilità di poter discriminare tra aree geografiche diverse o specie diverse.

L'analisi di pesci, rappresentativi di diversi habitat, ha permesso di evidenziare che le specie demersali (es. gallinella, scorfano, pagello fragolino, razza), che hanno una stretta relazione con l'ambiente di fondo dove si alimentano, presentano frequenze di ingestione delle microplastiche maggiori (75-100%) rispetto alle specie pelagiche, in quasi tutti i siti indagati. Questo risultato conferma come i sedimenti e in generale tutta la colonna d'acqua (non solo lo strato superficiale) possano rappresentare un comparto importante di accumulo della plastica e microplastica immessa in mare.

L'analisi μ FTIR delle microplastiche ha dimostrato una certa eterogeneità con un totale di 24 tipologie diverse di polimeri ingeriti rappresentati in percentuale maggiore dal polietilene (20%), polipropilene (13%) e dal poliestere (12%). Per quanto riguarda le microfibre, la predominanza dei polimeri rinvenuti è risultata di origine naturale come cotone, cellulosa e lino (oltre l'80% delle fibre analizzate). Recentemente è stato dimostrato che anche le microfibre presenti nei campioni di acqua di mare sono in gran parte di origine naturale (Suaria et al., 2020) suggerendo che le fibre naturali costituiscano la componente predominante in ambiente marino e anche quella più biodisponibile; tuttavia, non è ancora chiaro quali effetti le microfibre naturali possano indurre negli organismi marini.

Bibliografia

Avio C.G., Gorbi S., Milan M., Benedetti M., Fattorini D., D'Errico G., Pauletto M., Bargelloni L., Regoli F., 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution* 198, 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>.

Avio C.G., Gorbi S., Regoli F., 2017. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research* 128, 2-11.

Avio, C. G., Pittura, L., d'Errico, G., Abel, S., Amorello, S., Marino, G., ... & Regoli, F. (2020). Distribution and characterization of microplastic particles and textile microfibers in Adriatic food webs: General insights for biomonitoring strategies. *Environmental Pollution*, 258, 113766.

Hartmann N.B., Hüffer T., Thompson R.C., Hassellöv M., Verschoor A., Daugaard A.E., Rist S., Karlsson T., Brennholt N., Cole M., Herrling M.P., Hess M.C., Ivlevam N.P., Lusher A.L., Wagner M. Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. *Environ. Sci. Technol.*, 5 (2019), pp. 1039-1047

Liu J., Yang Y., Ding J., Zhu B., Gao W., 2019. Microfibers: a preliminary discussion on their definition and sources. *Environmental Sciences and Pollution Research*, 26(28), 29497-29501.

Lusher A.L., Welden N.A., Sobral P., Cole M., 2017. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods* 9, 1346-1360. <https://doi.org/10.1039/C6AY02415G>.

Magni S., Binelli A., Pittura L., Avio C.G., Della Torre C., Parenti C.C., Gorbi S., Regoli F. The fate of microplastics in an Italian wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.*, 652 (2019), pp. 602-610

Primpke S., Wirth M., Lorenz C., Gerdt G. Reference database design for the automated analysis of microplastic samples based on Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 410 (2018), p. 5131.

Suaria, G., Achtypi, A., Perold, V., Lee, J. R., Pierucci, A., Bornman, T. G., et al. (2020). Microfibers in oceanic surface waters: A global characterization. *Sci. Adv.* 6(23), eaay8493. [10.1126/sciadv.aay8493](https://doi.org/10.1126/sciadv.aay8493)