

Progetto - Projet  
**SPLASH! - Stop alle Plastiche in H2O!**



**PRODOTTO T1.2.1: REPORT SVILUPPO DI SISTEMI DI  
 CAMPIONAMENTO INNOVATIVI**

**LIVRABLE T1.2.1: RAPPORT DE DÉVELOPPEMENT DES SYSTÈMES  
 D'ÉCHANTILLONAGE INNOVANTS**

Partner responsabile - Partner responsable : Université de Toulon  
 Partner contributori - Partenaires contributeurs : Università di Genova,  
 European Research Institute

Nome del prodotto	Redatto da:	Verificato da:	Validato da:
T1.2.1 - Report sviluppo di sistemi di campionamento innovativi	Mario Petrillo Laura Canesi	Laura Cutroneo Stéphane Mounier	Marco Capello Alessandro Stocchino
<b>Data :</b>	03/09/2018	05/09/2018	20/09/2018

**Descrizione del Prodotto:** Lo studio delle tecniche e dei materiali disponibili sul mercato e già applicati nel campionamento delle microplastiche permetterà la progettazione di sistemi innovativi di campionamento delle acque adatti alle caratteristiche degli ambienti portuali.

**Description du livrable:** Etude des techniques et des matériaux disponibles dans le commerce et déjà appliqués pour l'échantillonnage des microplastiques permettant la conception de système innovants d'échantillonnage appropriés aux caractéristiques des eaux en milieux portuaires

### **Sintesi**

Le microplastiche sono inquinanti emergenti ampiamente diffusi in tutti gli ambienti, pertanto rappresentano un parametro da monitorare. Per quanto riguarda la matrice acqua di mare, oggetto di questa ricerca, esistono diverse tecniche di campionamento che sfruttano strumenti comunemente utilizzati per lo studio di altri parametri, ma anche nuovi strumenti che continuano a essere sviluppati appositamente per lo studio di questi inquinanti. Le metodologie di analisi in laboratorio dipendono dalla strategia di campionamento utilizzata. Per quanto riguarda le tecniche di identificazione si tratta di analisi visive o strumentali. La presente indagine si basa su una ricerca bibliografica e sulle informazioni ricavate dall'analisi di più di 80 studi scientifici che sono stati realizzati negli ultimi anni. A seguito di un capitolo introduttivo, nel capitolo 2 sono riportate le principali strategie di campionamento, nel capitolo 3 le metodologie di analisi in laboratorio, mentre il capitolo 4 riporta le tecniche di identificazione delle microplastiche. Infine, nei capitoli 5 e 6 vengono riportate brevemente le modalità di restituzione dei risultati degli studi condotti sulle microplastiche, e le conclusioni riassumono quanto ricavato della presente indagine.

### **Synthèse**

Les microplastiques sont des polluants émergents et ils sont largement distribués dans tous les environnements. Concernant l'eau de mer, objet de ce projet, il y a différentes techniques d'échantillonnage qui exploitent des instruments communément utilisés pour l'étude d'autres paramètres, mais aussi de nouveaux instruments qui seront développés spécifiquement pour cette étude. Les méthodologies d'analyse en laboratoire dépendent de la stratégie d'échantillonnage utilisée. Les techniques d'identification reposent sur les analyses visuelles et/ou instrumentales. Cette étude repose sur une recherche bibliographique et sur les informations figurant dans l'analyse de plus de 80 études scientifiques qui ont été faites au cours de ces dernières années. Après un chapitre introductif,

### **Prodotto n. T1.2.1**

dans le chapitre 2 sont présentés les principales stratégies d'échantillonnage, dans le chapitre 3 les méthodologies d'analyses en laboratoire, tandis que le chapitre 4 contient les techniques d'identification des microplastiques. Enfin, dans les chapitres 5 et 6 sont présentés brièvement les modes de restitution des résultats des études menés sur les microplastiques, et les conclusions résument le produit de la présente recherche.

## Indice

1 Introduzione .....	1
2. Strategie di campionamento .....	3
2.1 Strumenti di campionamento delle microplastiche in acqua di mare .....	4
2.1.1 Strumenti di campionamento non discreti .....	4
2.1.2 Strumenti di campionamento discreti .....	16
2.1.3 Strumenti di campionamento del microstrato superficiale.....	18
2.1.4 Nuovi strumenti per lo studio delle microplastiche.....	19
2.1.5 Conservazione dei campioni .....	21
3 Metodologie di analisi in laboratorio .....	22
3.1 Separazione per densità .....	22
3.2 Filtrazione .....	23
3.3 Setacciatura .....	23
3.4 Visual sorting.....	24
3.5 Digestione .....	25
4 Tecniche di identificazione.....	27
4.1 Tecniche di identificazione visiva .....	27
4.2 Tecniche analitiche .....	28
5 Restituzione dei risultati.....	32
5.1 Classificazione delle microplastiche .....	32
5.2 Abbondanza e concentrazione delle microplastiche .....	32
6 Conclusioni .....	33
Bibliografia .....	35

## **1 Introduzione**

La plastica è un composto organico sintetico derivato da processi di polimerizzazione che rappresenta uno dei principali rifiuti presenti nei mari e negli oceani (de Lucia et al. 2014). La plastica rilasciata nell'ambiente marino può derivare da terra, e in questo caso si tratta di prodotti quali quelli per uso domestico e per la cura personale che raggiungono il mare principalmente per mezzo degli scarichi urbani, oppure può essere rilasciata direttamente in mare, come nel caso delle reti da pesca in nylon (de Lucia et al. 2014; Duis e Coors, 2016). Per questo, i rifiuti plastici sono maggiormente concentrati nei tratti di mare più vicini alle aree urbanizzate (de Lucia et al. 2014). Tuttavia, a causa di diversi meccanismi fisici di trasporto quali, in particolare, le correnti e le maree, le plastiche sono ormai diffuse in tutti gli ambienti marini, da quello polare all'equatore (Ivar do Sul e Costa, 2014).

Le plastiche sono comunemente classificate sulla base della loro dimensione, pertanto si può parlare di nanoplastiche, microplastiche, mesoplastiche, macroplastiche e megaplastiche (GESAMP, 2015). Le microplastiche sono definite come plastiche con dimensioni non superiori ai 5 mm; il loro limite inferiore raccomandato è di 20µm (Arthur et al. 2009; Galgani et al. 2013). Le microplastiche possono poi essere divise in due classi sulla base della loro origine: microplastiche primarie e secondarie (Hildago-Ruz et al. 2012). Le microplastiche primarie sono prodotte per un determinato uso nel range di dimensioni sopra citato, e sono rilasciate come tali in ambiente: un esempio sono le piccole sfere (pellets) che compongono molti prodotti per uso personale e che vengono chiamate '*microbeads*' (Cole et al. 2011). Le microplastiche secondarie, invece, derivano dalla frammentazione di plastiche di dimensioni maggiori (Hildago-Ruz et al. 2012).

Nell'ambiente marino, le microplastiche tendono ad accumularsi sulla superficie della colonna d'acqua, ma sono soggette anche al trasporto verticale verso il fondo a causa di diversi meccanismi (Wang et al. 2016). Infatti, durante la loro permanenza in ambiente marino, la densità dei rifiuti plastici può aumentare per diversi motivi, tra questi vi è la crescita di organismi noti come *fouling* sulla loro superficie che ne determina un aumento del peso, causandone lo sprofondamento verso strati più profondi della colonna d'acqua fino a raggiungere il sedimento di fondo (Cózar et al. 2014; Wang et al. 2016). Inoltre, fenomeni quali la turbolenza generata dal vento forte può determinare il mixing dello strato superficiale della colonna d'acqua e, di conseguenza, una ridistribuzione delle microplastiche in questo strato (Collignon et al. 2012).

Le microplastiche sono in grado di concentrare su di esse diversi tipi di inquinanti, come gli inquinanti organici persistenti (POPs), e sono soggette a diversi tipi di degradazione: meccanica (ad esempio per l'azione del moto ondoso), chimica (per esempio processi di fotodegradazione e termodegradazione) o biologica (data dall'azione dei diversi microrganismi che possono insediarsi sulla loro superficie) (Wang

et al. 2016).

Le microplastiche tendono ad essere facilmente ingerite dagli organismi acquatici, entrando così nella rete trofica e pertanto, rappresentano un pericolo sia per gli organismi marini sia per la salute umana (Miller et al. 2017). L'inquinamento da microplastiche rappresenta un problema serio da affrontare vista l'ampia diffusione di questi inquinanti in ambiente, e per questo motivo sono entrate a far parte delle leggi internazionali e nazionali. A livello europeo, la Marine Strategy Framework Directive (MSFD/2008/56/EC) rilasciata dalla Commissione Europea (EC) istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino e pone come obiettivo il raggiungimento del Buono Stato Ambientale (Good Environmental Status, GES), da valutare sulla base di 11 descrittori. Le microplastiche rientrano nel descrittore numero 10 sulla "Marine litter", divenendo così un parametro da monitorare. Tuttavia, ancora non è presente una metodologia standard per lo studio delle microplastiche, dal loro campionamento alla separazione dalle matrici ambientali, alla loro identificazione, e quindi diversi metodi sono applicati per determinarne abbondanza, distribuzione e effetti sugli organismi. Pertanto, risulta ancora molto difficile poter effettuare dei confronti tra aree e studi diversi. A questo proposito, nei capitoli successivi sono presentate alcune tra le più diffuse metodologie di campionamento, analisi e identificazione, utilizzate in più di 80 studi condotti in tutto il mondo sulla matrice acqua di mare negli ultimi 10 anni.

La ricerca oggetto di questo prodotto sarà la base per la progettazione di sistemi innovativi di campionamento delle acque, adatti alle caratteristiche degli ambienti portuali (prodotto T1.2.2), e alla progettazione delle campagne di misura, per l'applicazione delle migliori metodologie di trattamento e analisi per la determinazione delle microplastiche, da condividere tra i Partner.

## 2 Strategie di campionamento

Le principali strategie di campionamento delle microplastiche si possono suddividere in tre tipologie principali (Hildago-Ruz et al. 2012):

- Campionamento selettivo (*selective sampling*): prevede la raccolta dei campioni di microplastiche riconoscibili ad occhio nudo direttamente dall'ambiente. Si tratta di una strategia che potrebbe favorire una stima errata della reale abbondanza delle microplastiche dovuta alla sottostima di quelle di dimensioni minori perché difficilmente individuabili ad occhio nudo.
- Campionamento in serie (*bulk sampling*): prevede il campionamento di un certo volume di acqua e l'estrazione in laboratorio delle microplastiche a partire dall'intero volume del campione prelevato in ambiente. Si tratta di una strategia utilizzata quando le microplastiche non possono essere identificate facilmente, per esempio ad occhio nudo.
- Campionamento a volume ridotto (*volume-reduced sampling*): prevede l'estrazione delle microplastiche dai campioni di acqua filtrata prelevati in ambiente. Si tratta di campioni il cui volume è ridotto direttamente durante la fase di campionamento, preservando solamente quella porzione del campione che è di interesse. I campioni, di volume ridotto, sono ottenuti filtrando grandi volumi di acqua con le reti. Questa strategia richiede che il campione sia ulteriormente trattato in laboratorio.

Per quanto riguarda specificatamente i sistemi di campionamento delle microplastiche in acqua di mare, gli strumenti esistenti che attualmente vengono utilizzati per lo studio di questi inquinanti sono molteplici. In base allo strumento, è possibile campionare i diversi strati della colonna d'acqua a partire dal microstrato superficiale dello spessore di pochi micron fino allo strato più prossimo al fondo. La maggior parte degli strumenti è adibita al campionamento dei primi metri della colonna d'acqua, poiché si ritiene che in questo strato vi sia la maggior concentrazione di microplastiche. Alcuni degli strumenti utilizzati sono già conosciuti e ampiamente utilizzati durante le campagne oceanografiche per il campionamento di altri parametri oceanografici, mentre altri sono stati costruiti appositamente per lo studio delle microplastiche.

Nel paragrafo seguente sono elencati i principali sistemi di campionamento delle microplastiche in acqua di mare utilizzati in diversi studi effettuati in ambiente marino (colonna d'acqua) in tutto il mondo negli ultimi 10 anni.

## 2.1 Strumenti di campionamento delle microplastiche in acqua di mare

Gli strumenti di campionamento delle microplastiche in acqua di mare possono essere suddivisi in tre categorie principali:

- Strumenti di campionamento non discreti: reti e sistemi di pompaggio;
- Strumenti di campionamento discreti: bottiglia Niskin, Rosette e Integrated Water Sampler (IWS);
- Strumenti di campionamento del microstrato superficiale: setacci e rotating drum sampler.

### 2.1.1 Strumenti di campionamento non discreti

Si tratta principalmente di due grandi categorie di strumenti largamente utilizzati per il campionamento delle microplastiche: reti e sistemi di pompaggio.

#### Reti

Le reti sono gli strumenti maggiormente utilizzati per il campionamento delle microplastiche in acqua di mare. Si tratta di strumenti già ampiamente utilizzati per il campionamento del plankton (phytoplankton e zooplankton) che sono adibiti anche al campionamento delle microplastiche; in questo modo è possibile caratterizzare un'area da entrambi i punti di vista. Le reti permettono di campionare grandi volumi di acqua, sia superficiale sia intermedia o di fondo (campionamento a volume ridotto).

Le reti sono trainate e dispiegate generalmente lateralmente alla nave per mezzo di spinnaker o altre strutture grazie alle quali la rete può essere mantenuta distante dalla nave stessa in modo tale da evitare l'onda di prua o, se dispiegata verso poppa, la turbolenza generata dalla scia della nave. Le reti utilizzate possono avere apertura della bocca di raccolta rettangolare [con area che varia da 0.08 m<sup>2</sup> (Maes et al. 2017; Eriksen et al. 2018) a 0.60 m<sup>2</sup> (Gajšt et al. 2016)] oppure circolare [da 0.15 m (Hall et al. 2015) a 0.60 m (Lima et al. 2014; Frias et al. 2014; Gorokhova 2015; Aytan et al. 2016; Güven et al. 2017; Bains et al. 2018) di diametro]. La struttura della bocca è composta da un telaio rigido che mantiene la bocca stessa dello strumento aperta. In alcuni casi, le reti presentano delle ali saldate lateralmente alla bocca di raccolta e composte da un misto di resine che favoriscono il galleggiamento dello strumento mantenendolo in superficie o ad una certa profondità. Le reti sono costruite in materiale plastico e sono saldate al telaio rigido della bocca di raccolta, presentano lunghezze e maglie variabili [da 1.5 m (Gajšt et al. 2016) a 4.5 m (Maes et al. 2017) di lunghezza e maglie da 50 µm (Hall et al. 2015) a 500 µm (Sun et al. 2018)]. Le reti hanno generalmente forma conica e terminano con un collettore in cui il campione viene concentrato.



## Prodotto n. T1.2.1

Nel caso del campionamento di acqua superficiale, le reti sono trainate in superficie lungo transetti orizzontali per periodi di tempo determinati (da 3 a 90 minuti) e a velocità specifiche (da 1 a 5 nodi). La velocità della nave deve essere tale da evitare gorgoglii che influenzano la quantità di acqua che attraversa la bocca di raccolta dello strumento e che potrebbero minare la qualità del campione prelevato. Alcuni tipi di rete possono, invece, essere trainati verticalmente dal fondo alla superficie per campionare l'intera colonna d'acqua. Per mezzo di meccanismi di chiusura della rete è possibile anche ottenere dei campioni a determinati range di profondità. Una volta terminato il campionamento, la rete è sciacquata dall'esterno con acqua Milli-Q o acqua di mare, in questo modo si evita la contaminazione del campione. Il materiale adeso alla rete è quindi convogliato nel collettore che viene successivamente svuotato sciacquandolo ripetutamente in un contenitore. Il contenitore molto spesso è di vetro, in alcuni casi è utilizzato in plastica previa valutazione della possibile contaminazione attraverso l'analisi di un campione di controllo. In questa fase, al campione può essere aggiunto un conservante (generalmente formalina 4%) per evitare la degradazione degli organismi del plankton, e poter poi studiare le abbondanze di entrambi i parametri (microplastiche e plankton), rapportarli ed eventualmente valutare la quantità di microplastiche all'interno degli organismi. Il campione è conservato nel contenitore fino all'analisi in laboratorio. La rete, pulita, può essere utilizzata per il campionamento successivo.

Poiché l'abbondanza delle microplastiche è principalmente riferita ad un'unità di volume, le reti sono spesso equipaggiate con un flussimetro che permette di conoscere la quantità di acqua che è stata filtrata durante il traino. Se il flussimetro non è presente, il calcolo della quantità di acqua filtrata è effettuato a partire da dati conosciuti, come la dimensioni della bocca di raccolta dello strumento e la lunghezza del transetto calcolata annotando le coordinate di partenza e di arrivo. Queste informazioni sono utili anche nei casi in cui sia campionato lo strato più superficiale della colonna d'acqua, per cui è necessario riportare il valore di abbondanza delle microplastiche per unità di area e non di volume.

Le maglie delle reti più comunemente utilizzate sono superiori al limite inferiore consigliato di 20  $\mu\text{m}$ ; ciò causa una sottostima del reale numero di microplastiche presenti nell'area indagata. Tuttavia, l'utilizzo di reti con maglia adeguata (20  $\mu\text{m}$ ) di difficile applicazione poiché la rete è soggetta ad intasamento che compromette le operazioni di campionamento. Infatti, anche con le maglie più utilizzate (le più comuni sono maglie da 333  $\mu\text{m}$ ), è opportuno fare attenzione che la rete non si intasi e si consiglia di evitare di effettuare i campionamenti durante i periodi di bloom algale. Per ovviare alla sottostima dell'abbondanza delle microplastiche, è possibile associare alla rete uno strumento di campionamento differente (ad esempio uno strumento di campionamento discreto) che permetta di valutare specificatamente la frazione di microplastiche non trattenuta dalla rete. Se anche questa

## Prodotto n. T1.2.1

strategia non è, o non può essere, utilizzata, è necessario comunque tenere conto della sottostima.

Per quanto riguarda la contaminazione del campione, il problema delle reti è che sono costruite con materiale plastico quale PVC, così come anche il collettore. Il rischio di contaminazione del campione è dato dal fatto che le reti o il collettore potrebbero rilasciare parte del materiale di cui sono composte per usura o abrasione durante le operazioni di campionamento. Per questo motivo, è necessario conoscere la natura del materiale di cui la rete e il collettore sono composti e prevedere un campione di controllo per valutare la contaminazione. Il rischio di contaminazione è dato anche da tutti i materiali con cui la rete viene a contatto durante le procedure di campionamento, siano esse le vernici o il materiale plastico presente sullo scafo della nave o sulla nave stessa o gli strumenti utilizzati per trasferire il campione dal collettore al contenitore in cui è conservato. Inoltre, per evitare la contaminazione dei campioni, gli operatori devono essere adeguatamente vestiti evitando indumenti sintetici e utilizzando guanti adeguati e devono porsi sottovento durante le operazioni di campionamento.

Di seguito sono descritti i tipi di rete maggiormente utilizzati nel campionamento delle microplastiche in acqua di mare.

### *Reti Neuston*

Le reti neuston (Figura 1) sono adibite al campionamento del plankton, ma sono utilizzate anche per il campionamento delle microplastiche nello strato superficiale della colonna d'acqua, e sono state le prime ad essere utilizzate per il campionamento di questi inquinanti.

La rete neuston semplice presenta un'apertura della bocca di raccolta di forma rettangolare, ha una rete conica che termina con un collettore (Figura 1a). Un telaio metallico mantiene aperta la bocca di raccolta dello strumento.

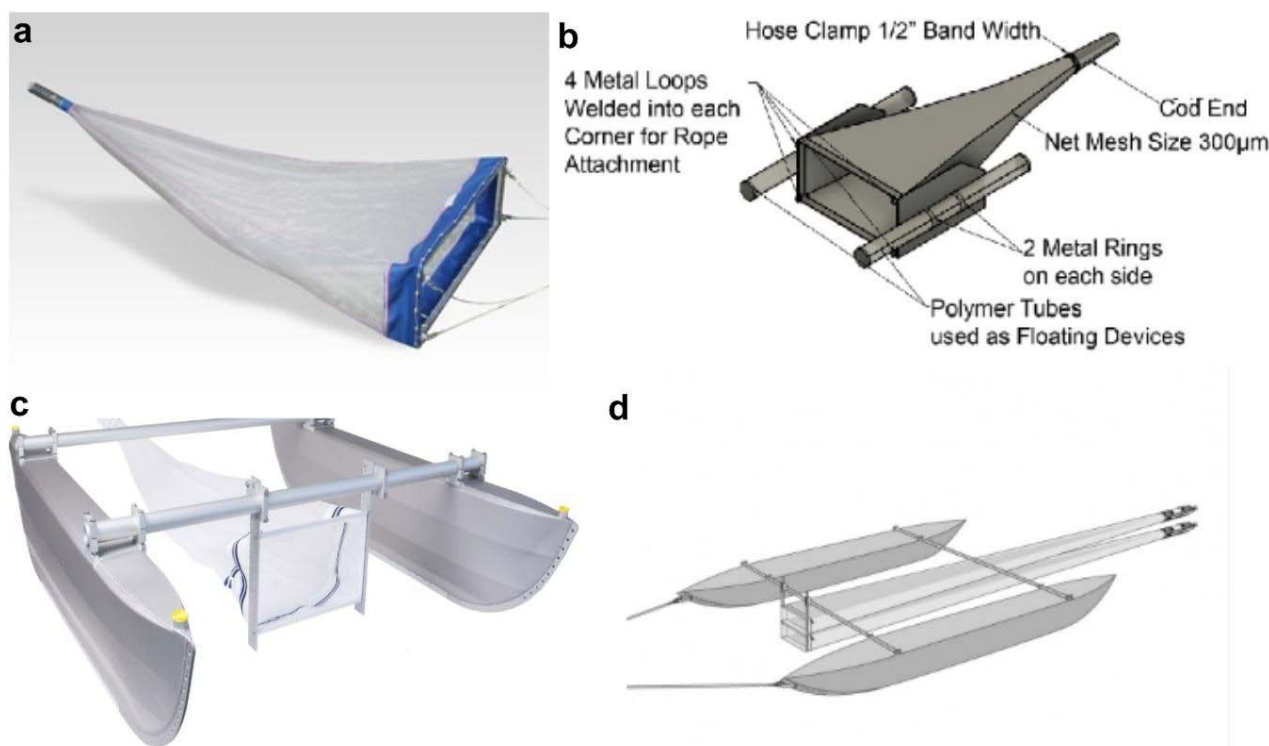
Per quanto riguarda le altre tipologie di reti neuston esistenti, si tratta di reti che sono state concepite a partire dal modello sopra citato. In particolare si tratta delle reti: Neuston DiSalvo, Neuston catamaran e Neuston acc. to David/Hempel Model 300.

La rete neuston DiSalvo (Figura 1b) è una rete neuston con bocca di raccolta rettangolare di 0.4 m di altezza e 0.8 m di larghezza, e maglia da 300  $\mu\text{m}$ . Questa rete neuston è equipaggiata con due tubi saldati lateralmente alla bocca della rete che ne permettono il galleggiamento e ne indicano il livello di immersione. In condizioni di mare calmo, l'apertura dello strumento è immersa per metà, e permette di campionare un'area di 0.2 x 0.8 m. Questa rete è stata usata in Cile negli anni '80 ed è stata introdotta per la prima volta da Louis DiSalvo nel 1988 (Eriksen et al. 2018). La rete neuston catamaran (Figura 1c)

### Prodotto n. T1.2.1

è una rete neuston con apertura rettangolare che è stata accoppiata alla struttura di un catamarano in alluminio. La rete rimane quasi completamente sommersa e la struttura ne permette l'utilizzo anche in condizioni di mare mosso (Löder and Gerdts 2015). E' stata sviluppata specificatamente per il campionamento delle microplastiche. La rete neuston acc. to David/Hempel Model 300 (Figura 1d) , invece, è una rete neuston costruita per campionare l'epineuston e l'iponeuston. E' composta da due reti che presentano una bocca di raccolta rettangolare e maglia da 300 µm. Le bocche di raccolta sono collegate alla struttura di un catamarano in alluminio che fornisce stabilità allo strumento e sono posizionate in modo tale che quella superiore campioni lo strato superficiale (epineuston), mentre quella sottostante lo strato sub-superficiale (iponeuston).

In Tabella 1 sono elencate le caratteristiche e le modalità di utilizzo delle reti Neuston semplice e Neuston DiSalvo sulla base delle informazioni contenute nei diversi studi analizzati. Le reti Neuston catamaran e Neuston acc. to David/Hempel Model 300 non sono state utilizzate in nessuno degli studi indagati.



**Figura 1.** Reti Neuston; 1a) Rete Neuston semplice, fonte: <http://www.sea-gear.net/neuston-nets.html>; 1b) Rete neuston DiSalvo, fonte: Eriksen et al. 2018; 1c) Rete Neuston catamaran, fonte: <https://www.hydrobios.de/product/neuston-katamaran-for-microplastic/>; 1d) Rete Neuston acc. to David/Hempel Model 300, fonte: <https://www.hydrobios.de/product/neuston-net-acc-to-davidhempel-model-300/>.

**Tabella 1.** Caratteristiche e modalità di utilizzo delle reti Neuston sulla base delle informazioni contenute nei diversi studi analizzati.

Maglia della rete ( $\mu\text{m}$ )	Area/diametro della bocca di raccolta ( $\text{m}^2$ )	Lunghezza della rete (m)	Durata del traino (minuti)	Velocità di traino (nodi)	Bibliografia
<b>Rete Neuston</b>					
300	0.5		5	1.5	Abayomi 2017
280	0.2		3	1.5	Frias et al. 2014
350	0.6	3	20	2-3	Isobe et al. 2015; Isobe 2016
335	1.2		15	2-4	Reisser et al. 2013
200	0.5		5	1.5-2	Suaria et al. 2016
333	0.1		25-30	2	Zhao et al. 2014
300	0.3	2.2	15-30	2	Eriksen et al. 2018
335	0.4	4			Barrows et al. 2017
300	0.9	1.5	20	3	Gajšt et al. 2016
<b>Rete neuston DiSalvo</b>					
300	0.3				Eriksen et al. 2018

#### *Reti da plankton*

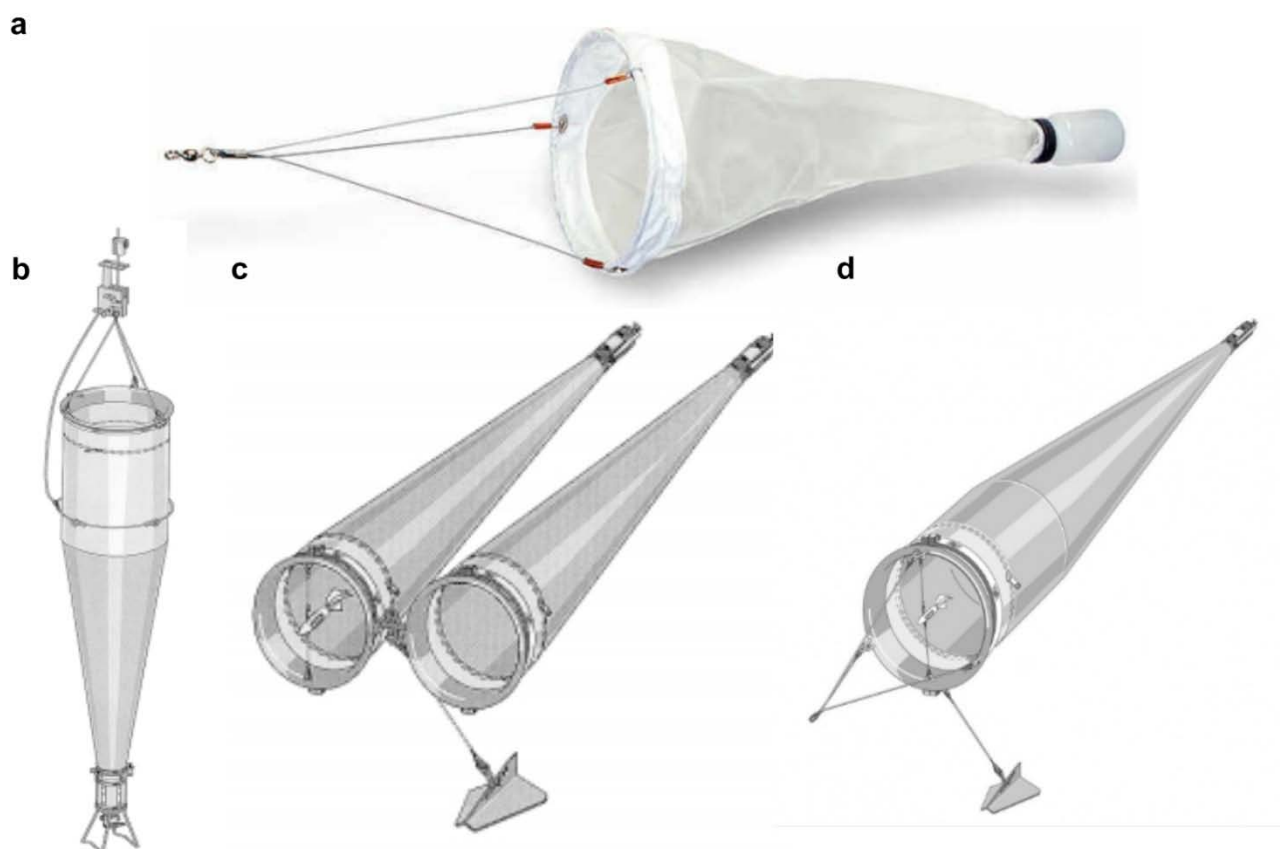
Le reti da plankton sono strumenti generalmente utilizzati per il campionamento del plankton (phytoplankton e zooplankton; Figura 2).

La rete da plankton semplice presenta una bocca di raccolta circolare e forma conica (Figura 2a). La bocca di raccolta è mantenuta aperta da una struttura in acciaio e la rete termina con un collettore. Le reti da plankton sono generalmente trainate orizzontalmente per ottenere campioni superficiali. Altri tipi di reti da plankton sono utilizzate per il campionamento delle microplastiche e si tratta di: rete da plankton WP2, rete bongo e rete ad anello [ring net; disegnata dal *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations* (CalCOFI)]. La rete da plankton WP2 (Figura 2b) è uno strumento utilizzato normalmente per la raccolta verticale dello zooplankton; può essere equipaggiato da uno speciale sistema di chiusura, attivabile da un peso messaggero, che permette di campionare la colonna d'acqua in un range di profondità prestabilito. Questa rete presenta una bocca di raccolta circolare, lunghezza e maglia variabili. Nello studio delle microplastiche è trainata sia orizzontalmente in superficie sia verticalmente dal fondo alla superficie. La rete bongo (Figura 1c) è utilizzata per campionamenti

## Prodotto n. T1.2.1

orizzontali ad una profondità stabilita. Si tratta di una rete caratterizzata da due aperture circolari rigide saldate insieme, a ciascuna delle quali è collegata una rete; queste reti sono trainate simultaneamente. La rete ad anello disegnata dal *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations* (CalCOFI) (Figura 1d; Löder and Gerdts 2015) è una rete da plankton che può essere trainata orizzontalmente o obliquamente. L'anello all'apertura della bocca di raccolta dello strumento è in acciaio inossidabile con diametro di 1 m; lo strumento è dotato di una rete di lunghezza pari a 4 m ed ha maglia variabile. Questa rete deve essere utilizzata in combinazione con un depressore.

In Tabella 2 sono elencate le caratteristiche e le modalità di utilizzo delle reti da plankton, fatta eccezione per la rete ad anello CalCOFI, sulla base delle informazioni contenute negli studi analizzati. La rete ad anello CalCOFI non è stata utilizzata in nessuno degli studi analizzati.



**Figura 2.** Reti da Plankton; 2a) Rete da plankton semplice, fonte: <https://scubla.it/it/prodotti/gestione-ambientale/campionamento-plancton-e-macroinvertebrati/retini-plancton-wd-student-detail.html>; 1b) Rete da plankton WP2, fonte: <http://www.idromarambiente.it/PDF-IT/CAMPIONATORI-PLANKTON-IT.pdf>; 1c) Rete Bongo, fonte: <http://www.idromarambiente.it/PDF-IT/CAMPIONATORI-PLANKTON-IT.pdf>; 1d) Rete ad anello CalCOFI, fonte: <https://www.hydrobios.de/product/ring-trawl-calcofi-net/>.

**Tabella 2.** Caratteristiche e modalità di utilizzo delle reti da plankton sulla base delle informazioni contenute nei diversi studi analizzati.

<b>Maglia della rete (µm)</b>	<b>Area/diametro della bocca di raccolta (m)</b>	<b>Lunghezza della rete (m)</b>	<b>Durata del traino (minuti)</b>	<b>Velocità di traino (nodi)</b>	<b>Bibliografia</b>
<b>Rete da plankton semplice</b>					
150	0.4	1.5	3	1.5	Castro et al. 2016
300			10	3	Gallagher et al. 2016
50	0.2		5		Hall et al. 2015
300	0.6	2	15	2.7	Lima et al. 2014
153			30	3-5	Tsang et al. 2017
200					Cole et al. 2014
500					Cole et al. 2014
120	0.5	2	5-7	1-2	Castillo et al. 2016
<b>Rete da plankton WP2</b>					
200	0.57	2.6	5	2	Aytan et al. 2016
200	0.57		20	1.5-4	Baini et al. 2018
180	0.58		3	1.5	Frias et al. 2014
90	0.57		3	1.5	Gorokhova 2015
200	0.6				Güven et al. 2017
<b>Rete bongo</b>					
500	0.6	15	2-3		Sun et al. 2018

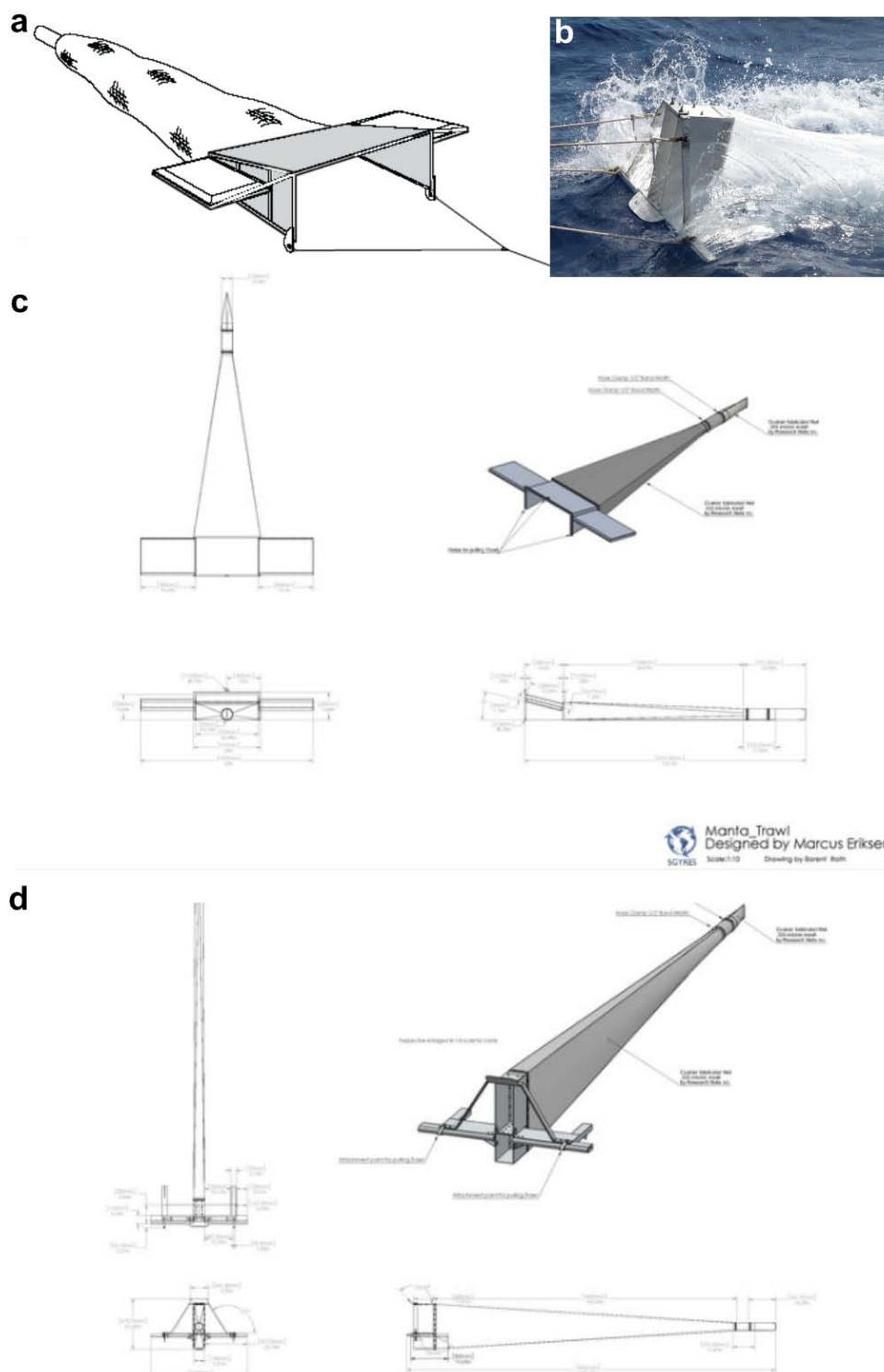
### *Reti Manta*

Le reti Manta (Figura 3) sono utilizzate per ottenere campioni superficiali e sono tra le reti più utilizzate nel campionamento delle microplastiche. La rete Manta semplice (Figura 3a) è costituita da una bocca di raccolta rettangolare dotata di due ali che ne garantiscono la galleggiabilità, entrambe realizzate in acciaio. La rete è collegata alla struttura della bocca di raccolta e termina con un collettore. Esistono diversi tipi di rete Manta che sono stati elaborati a partire dalla rete Manta semplice, e si tratta delle reti: Manta ad alta velocità, suitcase Manta, e AVANI. La rete manta ad alta velocità (Figura 3b) è dotata di una bocca di raccolta rettangolare con altezza di dimensioni superiori rispetto alla larghezza: 0.5 m (lunghezza) e 0.2 (larghezza). Questa caratteristica permette il traino a velocità più elevate di quelle normalmente utilizzate per altre reti Manta semplici. La rete è saldata alla bocca di raccolta dello

### Prodotto n. T1.2.1

strumento, è lunga 4.5 m, ha maglia da 333  $\mu\text{m}$  e termina con un collettore cilindrico. Questa rete permette il campionamento dello strato superficiale della colonna d'acqua. La rete suitcase Manta (disegnata e prodotta da Marcus Eriksen, 5 Gyres Institute; Figura 3c) è dotata di apertura della bocca rettangolare di altezza pari a 0.2 m e larghezza di 0.6 m; alla bocca di raccolta dello strumento sono collegate due ali rimovibili. La rete presenta maglia da 333  $\mu\text{m}$  e permette di effettuare campionamenti all'interfaccia aria-acqua. Questa rete è adatta ad ogni tipo di imbarcazione, non solo quelle oceanografiche. La rete AVANI è una rete Manta con apertura rettangolare di altezza pari a 0.6 m e larghezza di 0.14 m divisa in due compartimenti da un piatto di alluminio (Figura 3d). Il piatto di alluminio è posizionato sullo stesso piano di due sci, collegati lateralmente alla bocca di raccolta dello strumento, che hanno funzione di mantenere la rete in superficie quando viene trainata in modo tale che il comparto in basso (di altezza 0.2 m e larghezza 0.14 m) stia al di sotto della superficie. Lo strumento presenta anche due grandi ali rivolte verso l'alto, cave all'interno che favoriscono il galleggiamento e spingono la parte frontale verso l'alto durante il traino. La rete, di lunghezza pari a 4 m, è collegata alla bocca di raccolta, presenta maglia da 335  $\mu\text{m}$  e termina con un collettore. La rete è trainata utilizzando strumenti quali un tangone, che permettono di dispiegarla lateralmente alla nave lontano dalle influenze dell'onda di prua o della scia di poppa che potrebbero minare la buona riuscita del campionamento. L'apertura della bocca di raccolta con altezza molto superiore rispetto alla lunghezza, favorisce la stabilità dell'apertura della rete e rende quindi possibile il campionamento ad alta velocità. La struttura di questa rete ne permette l'utilizzo anche con mare mosso. Le velocità di traino sono comprese tra i 4 e i 6 nodi, fino ad arrivare anche a 7 o 8 con condizioni di vento adeguate. Può essere utilizzata per periodi di tempo lunghi (per esempio 60 minuti), ma anche in continuo. In Tabella 3 sono elencate le caratteristiche e le modalità di utilizzo delle reti Manta sulla base delle informazioni contenute nei diversi studi analizzati.





**Figura 3.** Reti Manta; 3a) Rete Manta semplice, fonte: <https://swfsc.noaa.gov/textblock.aspx?Division=FRD&ParentMenuId=213&id=1360>; 3b) Rete Manta ad alta velocità, fonte: <https://lindseyhoshaw.wordpress.com/page/4/>; 3c) Rete suitcase Manta disegnata da Marcus Eriksen, 5 Gyres Institute, fonte: <http://www.testingourwaters.net/pdfs/>; 3d) Rete AVANI, fonte: <http://www.testingourwaters.net/pdfs/>.



**Tabella 3.** Caratteristiche e modalità di utilizzo delle reti da plankton sulla base delle informazioni contenute nei diversi studi analizzati.

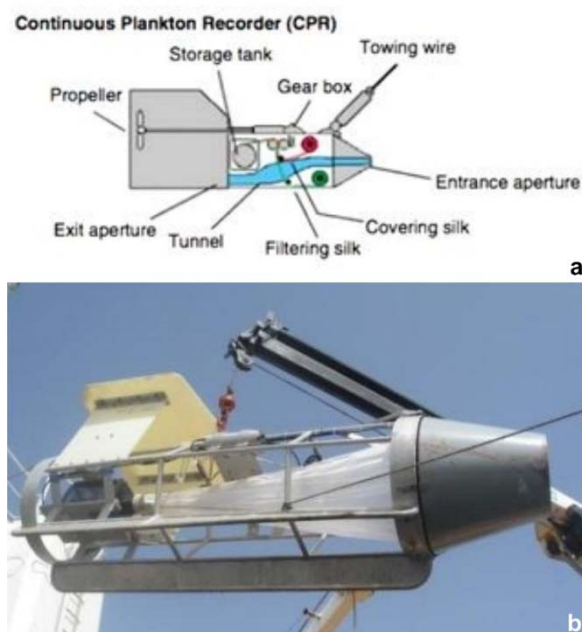
<b>Maglia della rete (µm)</b>	<b>Area/diametro della bocca di raccolta (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Lunghezza della rete (m)</b>	<b>Durata del traino (minuti)</b>	<b>Velocità di traino (nodi)</b>	<b>Bibliografia</b>
<b>Rete Manta</b>					
330	0.1		20	2-3	Baini et al. 2018
333	0.2		15	1-2	Brandon et al. 2016
333	0.1		20	2.5	Collignon et al. 2012
500			20	2	de Lucia et al. 2014
330	0.1		45-90	2.5	Faur et al. 2015
330	0.1	3	10	1.5-2.5	Kang et al. 2015
333	0.2		15	2-4	Reisser et al. 2013
330	0.1		10	2	Song et al. 2014
333	0.1	3	30	2-4	Sutton et al. 2016
333	0.1		15	2	van der Hal et al. 2017
335			60	2	Eriksen et al. 2018
333	0.1				Güven et al. 2017
300	0.1			4	Erni-Cassola et al. 2017
335	0.1	2			Frère et al. 2016
355	0.1	3	30	<3	Sedlak et al. 2017
<b>Rete Manta ad alta velocità</b>					
333	0.1	4.5	60		Maes et al. 2017
<b>Rete suitcase Manta</b>					
333	0.1			1-3	Setälä et al. 2016
<b>Rete AVANI</b>					
335	0.1	4	60	5	Eriksen et al. 2018

#### *Reti in continuo*

Il Continuous Plankton Recorder (CPR) e il Longhurst Hardy Plankton Recorder (LHPR) sono strumenti originariamente adibiti al campionamento del plankton, che prevedono l'utilizzo di reti e possono

### **Prodotto n. T1.2.1**

essere usati in continuo (Figura 4). Il Continuous Plankton Recorder (CPR, Figura 4a) è uno strumento che è utilizzato per monitorare il plankton, viene collegato allo scafo delle navi (oceanografiche, mercantili, da crociera, ecc.) e permette di effettuare campionamenti in continuo lungo le rotte di queste navi senza che si debbano modificare le loro velocità di crociera o le rotte per evitare l'eventuale danneggiamento dello strumento, per esempio a causa dello stato del mare. Lo strumento è generalmente posto a dieci metri di profondità (Thompson et al. 2004) ed è dotato di una rete che periodicamente ed automaticamente viene sostituita con una nuova. Infatti, prima di iniziare il campionamento, lo strumento è caricato con una cassetta in cui è presente la rete filtrante che tramite un sistema di rulli è sostituita periodicamente. La rete sostituita è automaticamente arrotolata su di un altro rullo e, una volta terminato il campionamento, la cassetta è prelevata e portata in laboratorio dove la rete viene dispiegata e le microplastiche e/o il plankton trattenuti possono venire analizzati. La maglia della rete del CPR è di 280 $\mu$ m (Thompson et al. 2004). La struttura robusta dello strumento ne permette l'uso anche con mare mosso, ed è stato utilizzato con velocità fino a 25 nodi. Per quanto riguarda il Longhurst Hardy Plankton Recorder (LHPR; Figura 4b), si tratta di uno strumento che può essere usato in continuo. In questo caso, la rete è protetta da un telaio cilindrico; questa struttura presenta una parte conica frontale a cui è collegata la rete che presenta bocca di raccolta circolare. La rete ha forma conica, termina con un collettore collegato al telaio e presenta maglia variabile. Questo strumento permette di effettuare campionamenti sia orizzontali sia verticali.



**Figura 4.** Continuous Plankton Recorder (CPR), fonte: <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2015/08/heard-at-the-2015-asm-general-meeting-in-new-orleans-marine-vibrios-and-climate-change.html>; Longhurst Hardy Plankton Recorder (LHPR), fonte: <http://soki.aq/display/StandMeth/LHPR+-+Longhurst+Hardy+Plankton+Sampler>.

#### *Reti manuali*

Alcune reti sono usate manualmente per prelevare i campioni di microplastiche. Queste reti presentano bocche di raccolta circolari con diametro pari a 0.2 m e maglie da 50  $\mu\text{m}$  (Kang et al. 2015; Song et al. 2014) o 80  $\mu\text{m}$  (Norén 2007). Il campionamento avviene in superficie e l'acqua è raccolta manualmente con un contenitore (becher, bottiglia, ecc.) e rovesciata all'interno della rete in modo tale da filtrarla. Il materiale trattenuto dalla rete è successivamente raccolto in un contenitore.

#### Sistemi di pompaggio

I sistemi di pompaggio rappresentano strategie di campionamento ampiamente utilizzati, anche se meno frequentemente rispetto alle reti. Si tratta di diversi tipi di pompe o sistemi di pompe, e in alcuni casi vengono anche utilizzati i sistemi di seawater intake delle navi. Alcune pompe sono calate con l'utilizzo di un verricello sia lateralmente sia posteriormente alla nave. I sistemi di pompaggio possono essere utilizzati in continuo per diverse ore oppure per pochi minuti in ciascuna stazione (non esiste una standardizzazione al riguardo), e permettono di campionare lo strato sub superficiale della colonna d'acqua [da 0.3 m (Zhao et al. 2015; Sedlak et al. 2017) a 6 m (Lusher et al. 2015) di profondità]. Nel caso in cui i campioni siano prelevati in continuo la velocità di traino della nave varia da 1 a 12 nodi (Lusher

## Prodotto n. T1.2.1

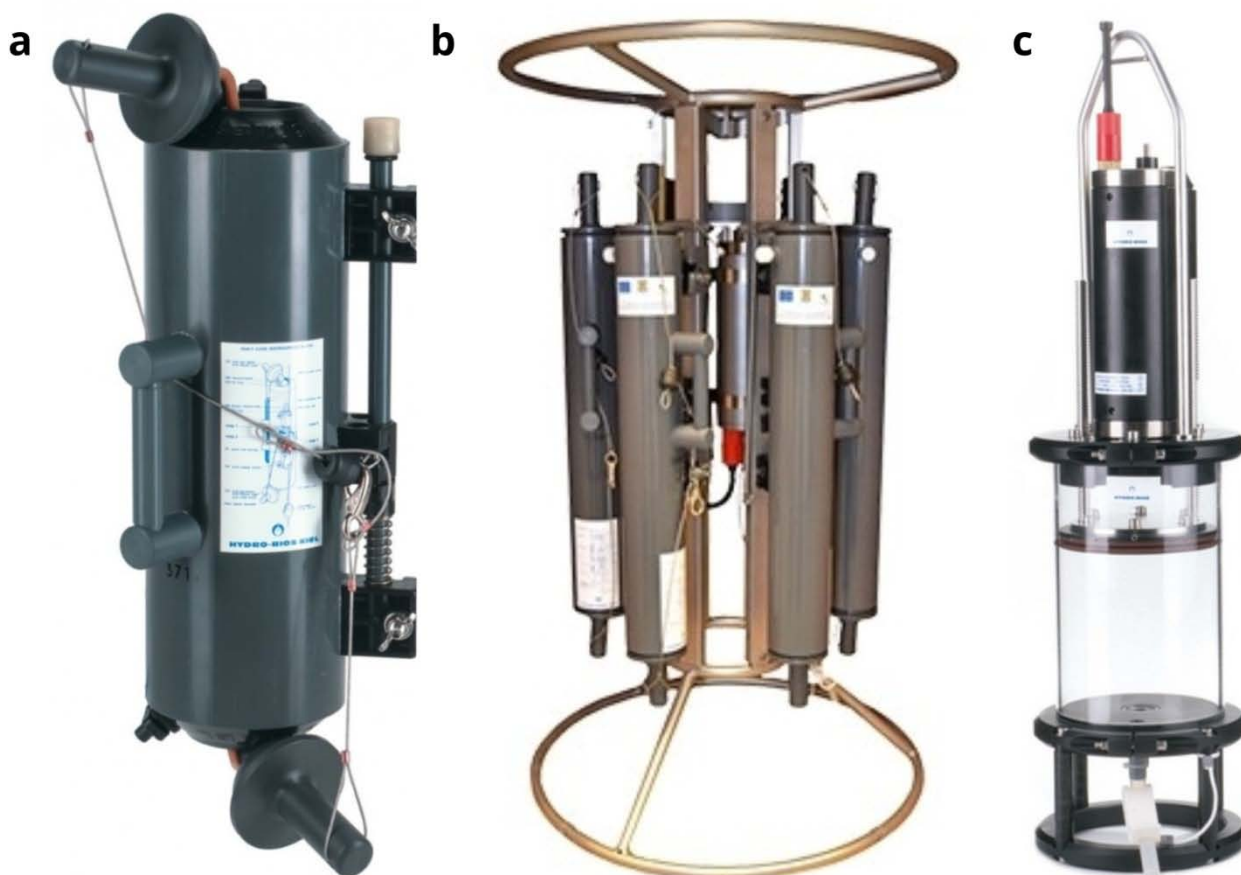
et al. 2014; Enders et al. 2015). I sistemi di pompaggio sono generalmente collegati ad un sistema di filtri che permette di selezionare le plastiche della taglia di interesse: il primo filtro presenta maglia da 5 mm per rimuovere tutte le plastiche di dimensioni superiori, mentre il secondo è un filtro con maglia di dimensioni pari a 20  $\mu\text{m}$ . In questo modo è campionato l'intero range delle microplastiche (Sedlak et al. 2017). In alcuni casi le maglie di questi filtri possono variare: il primo filtro può avere maglia da 300  $\mu\text{m}$  ed essere seguito da uno da 10  $\mu\text{m}$  (Lenz et al. 2015); quest'ultimo può essere sostituito da un filtro con maglia da 50  $\mu\text{m}$  in caso di bloom algale, in modo tale da evitare l'intasamento dello stesso (Enders et al. 2015). Inoltre, è possibile utilizzare una batteria di setacci, che permette la suddivisione delle microplastiche in classi di taglia (per esempio, setacci con maglia da 5 mm, 250  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$  e 62.5  $\mu\text{m}$ ; Desforges et al. 2014). Una volta terminato il campionamento, le microplastiche si trovano riposte su uno o più filtri che sono sigillati per evitare la contaminazione del campione, che può essere così conservato fino al momento dell'analisi in laboratorio. I sistemi di pompaggio possono essere equipaggiati con un flussimetro per conoscere la quantità di acqua filtrata, utile a riportare l'abbondanza o la massa delle microplastiche all'unità di volume.

### 2.1.2 Strumenti di campionamento discreti

Gli strumenti di campionamento discreti sono strumenti meno utilizzati rispetto a quelli non discreti e permettono di campionare l'acqua a profondità stabilite. Si tratta per lo più di strumenti già utilizzati nel campionamento dell'acqua per lo studio del materiale particellato sospeso o altri parametri e, pertanto, già conosciuti. Nello specifico si tratta di bottiglie Niskin, Rosette e Integrated Water Sampler (IWS). Questi strumenti sono calati manualmente o per mezzo dell'utilizzo di un verricello fino alla profondità di campionamento. Nello specifico, la bottiglia Niskin e la Rosette sono calate aperte, e la chiusura avviene una volta raggiunta la profondità di campionamento stabilita per mezzo dell'utilizzo di un messaggero o di un sistema di chiusura elettronico azionato a distanza. L'IWS, invece, è calato chiuso ed è fornito di un sistema di aspirazione che permette di effettuare campioni ad una determinata profondità o campioni integrati lungo la colonna d'acqua, prelevando piccole aliquote di acqua alle profondità stabilite. Una volta terminato il campionamento, questi strumenti sono riportati in superficie, il campione è trasferito in un contenitore, e l'interno degli strumenti viene sciacquato adeguatamente con acqua decontaminata (acqua distillata filtrata o microfiltrata, acqua Milli-Q o ultrapura) per raccogliere l'eventuale parte del campione rimasto adeso alle pareti degli strumenti. Il campione è poi trasportato in laboratorio dove può essere analizzato mentre gli strumenti, puliti, sono pronti per il successivo campionamento. Il campione può essere setacciato a bordo prima di essere trasportato in laboratorio per le analisi.

### **Prodotto n. T1.2.1**

Ognuno di questi strumenti ha caratteristiche differenti. Nello specifico, la bottiglia Niskin è costituita da un cilindro in plastica (generalmente PVC), con un volume variabile generalmente tra 5 o 30 L (Bagaev et al. 2018); presenta un meccanismo che la mantiene aperta e ne governa la chiusura ed è collegata ad una cima o un cavo che possono essere graduati. La cima graduata, o un manometro meccanico accoppiato al verricello, permette di definire la profondità dello strumento. Una volta giunta alla profondità stabilita, la bottiglia è chiusa per mezzo di un messaggero e l'acqua viene campionata. Grazie a questo meccanismo, la bottiglia Niskin permette di campionare a qualsiasi profondità lungo la colonna d'acqua. La Rosette è uno strumento che presenta un telaio metallico a cui sono collegate una serie di bottiglie Niskin, che vengono calate aperte e simultaneamente per mezzo di un verricello. Una sonda con sensore di pressione accoppiata alla struttura metallica permette di definire la profondità dello strumento e ogni bottiglia Niskin è chiusa da remoto alla profondità voluta. Questo strumento permette di campionare con una sola calata a diverse profondità. L'Integrated Water Sampler (IWS; Figura 5c) è uno strumento con struttura cilindrica che permette di campionare a differenti profondità. Infatti, permette di prelevare campioni ad una singola profondità o campioni integrati lungo la colonna d'acqua grazie alla possibilità di programmare gli intervalli di profondità a cui effettuare il campionamento. Lo strumento è dotato di un motore elettrico che aziona un pistone all'interno di un tubo trasparente, mentre un microprocessore controlla la procedura di campionamento in base alla profondità prestabilita. Un sensore di pressione integrato ad alta precisione fornisce misure di profondità accurate. L'alimentazione del campionatore è composta da batterie ricaricabili agli ioni di litio.



**Figura 5.** Strumenti di campionamento discreti; 5a) bottiglia Niskin; 5b) Rosette, fonte: <https://marine-research.com/equipment/sampling-devices/>; 5c) Integrated Water Sampler (IWS), fonte: <https://www.hydrobios.de/product/integrating-water-sampler-iws-iii/>.

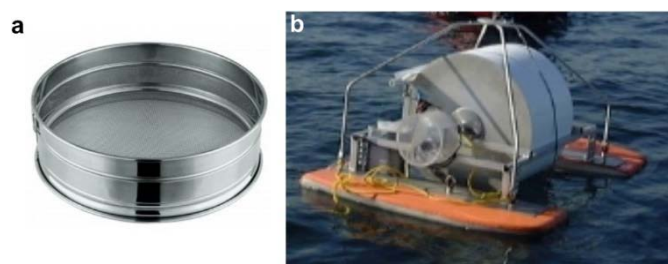
In alcuni studi sono stati effettuati campionamenti discreti manuali dello strato superficiale della colonna d'acqua. I campioni sono stati prelevati immergendo subito sotto la superficie diversi tipi di contenitori o bottiglie.

### 2.1.3 Strumenti di campionamento del microstrato superficiale

Gli strumenti di campionamento del microstrato superficiale della colonna d'acqua permettono di campionare i primi micron della colonna d'acqua, ossia il cosiddetto microstrato superficiale. Si tratta di setacci e del rotating drum sampler (Figura 6). Questi strumenti sono adagiati sulla superficie dell'acqua e necessitano di condizioni di mare calmo per poter essere utilizzati; in caso contrario il campione non risulterebbe rappresentativo del microstrato superficiale. I setacci sono strumenti che sono comunemente utilizzati per le analisi granulometriche dei sedimenti, così come possono essere utilizzati anche per le microplastiche. Il setaccio usato per il campionamento delle microplastiche è in

### Prodotto n. T1.2.1

metallo, generalmente caratterizzato da un diametro di 20 cm, maglia 2 mm; la profondità di campionamento stimata varia da 150  $\mu\text{m}$  a 400  $\mu\text{m}$  (Song et al. 2014, 2015; Figura 6a). Il setaccio è posto a contatto con la superficie del mare, l'acqua che rimane intrappolata entro lo spazio delle maglie del setaccio per tensione superficiale è poi raccolta in un vassoio di acciaio. Il procedimento è ripetuto per un numero di volte stabilito (per esempio, 100 volte; Song et a. 2014, 2015). L'acqua raccolta nel vassoio è poi trasferita in un contenitore per essere trasportata in laboratorio dove le microplastiche possono essere analizzate. Il Rotating drum sampler (Figura 6b) è uno strumento che viene appoggiato sulla superficie del mare, dove inizia a campionare. E' costituito da un cilindro di vetro parzialmente immerso e rotante, che ha una superficie idrofila pulita e che, usando una forza capillare, campiona l'acqua del microstrato superficiale (da 1 a 1000  $\mu\text{m}$  di spessore; Harvey e Burzell, 1972; Carlson, et al. 1988; Hildago-Ruz et al. 2012). Questi strumenti di campionamento possono essere utilizzati soltanto in condizioni di mare calmo, altrimenti il campione non risulta rappresentativo del microstrato superficiale della colonna d'acqua.



**Figura 6.** Strumenti di campionamento del microstrato superficiale; 6a) Setaccio; 6b) Rotating drum sampler, fonte: <https://www.whoi.edu/cruiseplanning/synopsis.do?id=2484>.

#### 2.1.4 Nuovi strumenti per lo studio delle microplastiche

Nell'ambito di alcuni progetti e studi, sono stati sviluppati strumenti di campionamento *ad hoc* per le microplastiche (Figura 7).

Il progetto COMMON SENSE (Cost-effective sensors, interoperable with international existing ocean observing systems, to meet EU policies requirements; programma FP7 Environment, Ocean 2013.2) è un progetto europeo della durata di 40 mesi, iniziato nel novembre 2013, con capofila "Acondicionamiento Tarrasense Asociacion Leitat" (Barcellona, Spagna) e 14 partner di differenti paesi. Il progetto ha previsto lo sviluppo di un sensore da utilizzare in situ per il monitoraggio delle microplastiche (Figura 7a). Con questo sensore è possibile quantificare le microplastiche ottenendo dati in real-time. Il sensore si basa sull'utilizzo di tecniche a fluorescenza accoppiate all'acquisizione di immagini per mezzo delle quali si ottengono informazioni sulle microplastiche. Lo strumento in cui è



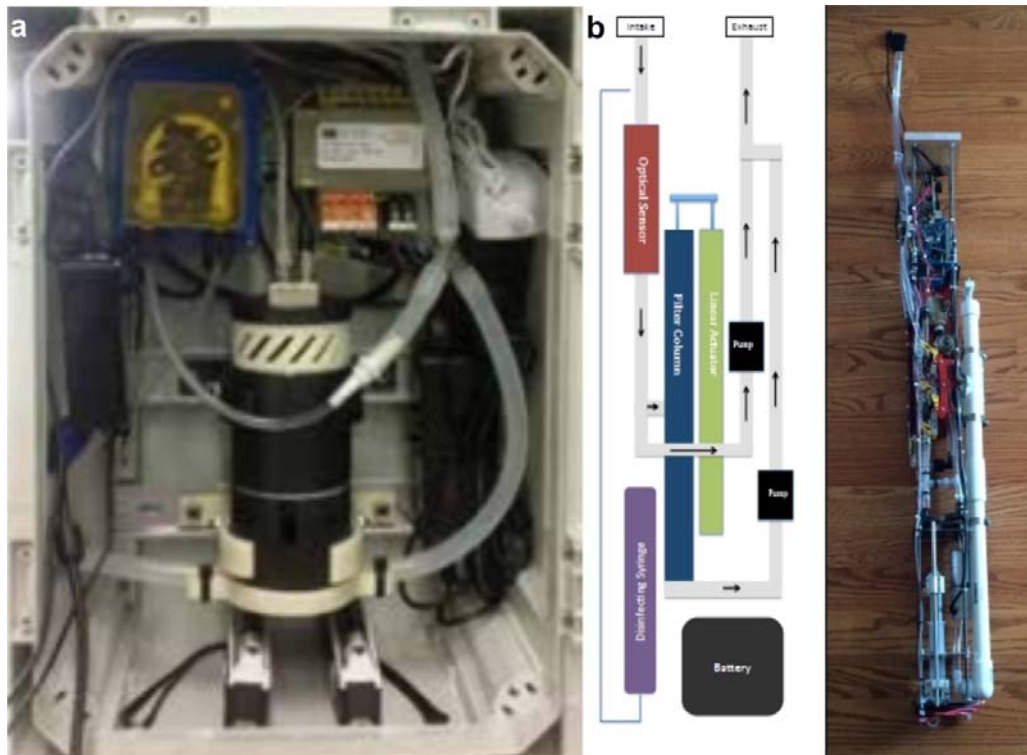
### Prodotto n. T1.2.1

inserirlo il sensore permette di filtrare dei campioni di acqua; i filtri sono poi analizzati in laboratorio e permettono di validare i risultati ottenuti con il sensore.

Recentemente, è stato presentato un nuovo strumento per il campionamento delle microplastiche all'evento RISE:2015 (Research, Innovation and Scholarship Expo) dalla Northeastern University (Boston, Massachusetts). Questo strumento è stato ideato da uno studente (Ethan Edson) con l'aiuto di un professore (Mark Patterson). Lo strumento si chiama "MantaRay" e permette di campionare le microplastiche su larga scala e di determinarne l'abbondanza. Il MantaRay (Figura 7b) si basa su di un sistema di pompe e fornisce campioni discreti di microplastiche su filtro. Il funzionamento dello strumento è descritto brevemente di seguito. Inizialmente avviene la disinfezione del sistema in modo tale da assicurare un campione privo di contaminazione, la disinfezione avviene anche al termine di ciascun campionamento. Successivamente, l'acqua di mare viene fatta fluire all'interno dello strumento tramite una pompa, il flusso di acqua passa attraverso un sensore ottico: se nessuna particella viene rivelata dal sensore (nello specifico dall'interruzione del cammino del laser sul fotodetector), l'acqua continua ad essere pompata attraverso lo strumento; se il sensore ottico rivela la presenza di particelle, si accende una seconda pompa, mentre la prima si spegne interrompendo il flusso di acqua in entrata nello strumento. La seconda pompa convoglia il flusso di acqua contenente le particelle rilevate attraverso una colonna di filtraggio e un filtro da 500  $\mu\text{m}$ , dove le microplastiche sono conservate. Una volta che l'acqua ha attraversato la colonna di filtraggio, la seconda pompa si spegne e avviene nuovamente la disinfezione del sistema.

Lo strumento è dotato di GPS, di misuratore di portata e ha la possibilità di prelevare fino a 28 campioni discreti di microplastiche filtrando un volume di acqua personalizzabile. Pertanto, è possibile conoscere, in ciascun punto, l'abbondanza delle microplastiche. I filtri possono essere poi analizzati in laboratorio. Lo strumento rileva anche i valori di temperatura dell'acqua e salinità e ha il vantaggio di essere low-cost. Il MantaRay può essere attaccato ad altri strumenti quali mooring, drifter o Autonomous Underwater Vehicle (AUV).





**Figura 7.** Nuovi strumenti di campionamento delle microplastiche; 7a) Prototipo del sensore delle microplastiche sviluppato nell'ambito del progetto europeo COMMON SENSE (fonte: <https://www.commonsenseproject.eu/>); 7b) MantaRay (fonte: Edson e Paterson, 2015).

### 2.1.5 Conservazione dei campioni

Al termine del campionamento può essere previsto un metodo di conservazione del campione. I metodi di conservazione prevedono per lo più l'uso di formalina 4% che è addizionata al campione prima di essere sigillato per il trasporto in laboratorio, e hanno il solo scopo di preservare la componente biologica per le successive analisi in laboratorio. Infatti, inizialmente, le sostanze come la formalina erano aggiunte ai campioni perché l'analisi della componente biologica (phytoplankton e zooplankton) rappresentava lo scopo principale degli studi, mentre le microplastiche venivano analizzate ma considerate di secondaria importanza. Tuttavia, negli ultimi anni, le microplastiche sono diventate oggetto principale di molte analisi e i conservanti hanno cominciato ad essere addizionati solo nei casi in cui si volesse studiare anche la componente biologica, oppure le microplastiche contenute all'interno degli organismi, o il rapporto microplastiche:zooplankton. Se le microplastiche sono l'unico parametro di interesse, non sono richiesti particolari metodi di conservazione dei campioni, in alcuni casi i campioni vengono posti in frigo o freezer e/o al buio.

Nel capitolo successivo sono descritte le metodologie di analisi delle microplastiche in laboratorio.

### 3 Metodologie di analisi in laboratorio

In laboratorio i campioni di microplastiche possono essere analizzati direttamente o necessitare di una o più procedure che prevedono la separazione delle microplastiche stesse dal campione di acqua originale. I campioni di microplastiche restituiti su filtro dagli strumenti di campionamento possono essere direttamente sottoposti a classificazione ed identificazione. Per quanto riguarda i campioni in cui le microplastiche sono ancora all'interno della matrice acqua è necessario uno step di separazione. Le metodologie di separazione possono essere classificate come segue (Hildago-Ruz et al. 2012).

- Separazione per densità: per separare le microplastiche dal resto del campione sfruttando le proprietà di galleggiamento delle microplastiche.
- Filtrazione: sotto vuoto o per gravità.
- Setacciatura: per mezzo dell'uso di un setaccio o di una batteria di setacci.
- Visual sorting: per separare le microplastiche dai campioni di acqua a occhio nudo o tramite l'aiuto di un microscopio.

Inoltre, possono essere attuati diversi tipi di digestione (acida, enzimatica, alcalina e ossidativa) del campione che permettono di separare le microplastiche dal materiale biologico presente nel campione. Così come a bordo della nave, anche in laboratorio è necessario prestare attenzione alla possibile contaminazione dei campioni di microplastiche. A questo proposito, tutta la strumentazione deve essere costituita di materiale non plastico, l'abbigliamento dell'operatore che svolge le analisi deve essere in cotone, è necessario evitare i materiali sintetici e devono essere indossati guanti adeguati. Inoltre, è necessario prestare attenzione all'inquinamento derivante dall'aria durante le procedure di analisi: un filtro bianco può essere lasciato all'aria per tutta la durata dell'analisi al fine di valutare l'eventuale deposizione di microplastiche che potrebbero aver contaminato anche il campione. Infine, è possibile sottoporre un campione di acqua decontaminata (campione di controllo) alla stessa procedura alla quale sono sottoposti i campioni di microplastiche per valutare la possibile contaminazione durante le procedure di laboratorio.

Di seguito sono elencate nello specifico le metodologie di separazione delle microplastiche dal campione di acqua iniziale.

#### 3.1 Separazione per densità

La separazione per densità delle microplastiche dall'acqua di mare prevede l'utilizzo di diverse soluzioni che permettono il galleggiamento delle microplastiche che possono così essere rimosse. Prima di tutto, il campione è sospeso o risospeso (se precedentemente setacciato) in una soluzione salina sovrasatura (NaCl); successivamente, viene agitato per diversi minuti manualmente e lasciato riposare per un breve

## Prodotto n. T1.2.1

periodo di tempo (30 minuti, 1 h) o per periodi di tempo maggiori (per esempio, per una notte). In seguito, il surnatante, contenente le microplastiche, è prelevato e risposto in una piastra Petri di vetro o direttamente filtrato. Le microplastiche possono quindi essere classificate ed identificate al microscopio.

Le soluzioni di NaCl sono le più utilizzate, anche per la loro economicità. Altri metodi di separazione per densità prevedono l'utilizzo di cloruro di zinco ( $ZnCl_2$ ), o l'utilizzo di tensioattivi quali soluzioni di laurilsolfato di sodio (SDS).

### 3.2 Filtrazione

La filtrazione è un metodo di separazione utilizzato per separare le microplastiche dall'acqua in cui si trovano immerse. I filtri usati sono di varia natura: policarbonato, poliammide, nylon, fibra di vetro, acetato di cellulosa e nitrato di cellulosa. Le dimensioni variano da 45 mm a 47 mm di diametro, in alcuni casi si utilizza carta filtrante, mentre la porosità varia da 0.7  $\mu m$  (Tsang et al. 2017) a 300  $\mu m$  (Setälä et al. 2016). I filtri maggiormente utilizzati sono quadrettati per facilitare la successiva identificazione delle microplastiche.

La filtrazione può essere diretta oppure essere preceduta da altri trattamenti. La filtrazione diretta prevede che il campione di acqua sia filtrato direttamente senza nessun trattamento precedente. La filtrazione può essere preceduta da setacciatura, ed in questo caso, i campioni di microplastiche trattenute dai setacci vengono filtrati insieme all'acqua utilizzata per rimuoverle dai setacci stessi (acqua distillata filtrata, acqua microfiltrata, acqua Milli-Q, acqua ultrapura per eliminare il rischio di contaminazione). Inoltre, la filtrazione del campione può essere preceduta da una fase in cui il campione è lasciato riposare e sedimentare, dopo di che, il surnatante è filtrato mentre il materiale depositato è setacciato e solo in seguito può essere filtrato. La filtrazione dei campioni è effettuata per gravità o può avvenire per mezzo dell'utilizzo di una pompa da vuoto. Nella fase finale della filtrazione, i filtri possono essere sciacquati con acqua decontaminata (acqua distillata filtrata, microfiltrata, Milli-Q o ultrapura) per eliminare il rischio che si formino cristalli di sale una volta asciutti. I filtri sono poi conservati in piastre Petri di vetro precedentemente pulite, e in alcuni casi vengono asciugati in forno, in essiccatore (40-70 °C) o a temperatura ambiente. I filtri asciutti possono essere pesati per determinare la massa delle microplastiche, conoscendo la tara del filtro precedentemente determinata. Le microplastiche sui filtri possono essere successivamente classificate ed identificate.

### 3.3 Setacciatura

La setacciatura permette di separare le microplastiche dall'acqua di mare per mezzo di uno o più

### Prodotto n. T1.2.1

setacci di metallo. La setacciatura può avvenire tramite setaccio singolo o tramite una batteria di setacci; in quest'ultimo caso, le microplastiche vengono anche suddivise in classi di taglia. Le maglie dei setacci utilizzati sono di diverso tipo e dipendono dallo scopo della setacciatura: selezione del range di dimensioni delle microplastiche (20  $\mu\text{m}$ -5 mm), eliminazione di una determinata frazione di plastiche o suddivisione in classi di taglia. Nello specifico, possono essere utilizzati due setacci con maglie tali da selezionare le plastiche della taglia di interesse; nel caso di campionamento con le reti, il setaccio con maglia inferiore presenta la stessa maglia della rete utilizzata durante il campionamento. Un singolo setaccio con maglia da 5 mm permette di eliminare la frazione di plastiche (o altro materiale) di dimensioni maggiori. Un setaccio con maglia da 1 o 2 mm può essere usato per suddividere il campione di microplastiche in due classi di taglia: le microplastiche trattenute dal setaccio sono sottoposte a visual sorting (paragrafo successivo) mentre quelle non trattenute sono sottoposte a filtrazione (paragrafo precedente). Infine, le batterie di setacci permettono la suddivisione delle microplastiche in classi di taglia. La setacciatura può avvenire anche su campioni di microplastiche precedentemente separate dalla matrice acqua, sempre per suddividerle in classi di taglia. La setacciatura del campione di acqua può essere effettuata direttamente a bordo o in laboratorio. In entrambi i casi, i campioni di acqua sono rovesciati sul setaccio o sulla batteria di setacci e i campioni sono lavati con acqua decontaminata (acqua distillata filtrata, microfiltrata, Milli-Q o ultrapura). Una volta terminata la setacciatura, i setacci sono sciacquati accuratamente per assicurarsi che le microplastiche adese alle pareti non vengano perse; le microplastiche presenti su ogni setaccio vengono quindi riposte all'interno di piastre Petri o filtrate con l'acqua di risciacquo. Le microplastiche sui filtri o nelle piastre Petri possono essere asciugate in forno o in essiccatore (40-70 °C) per poi essere classificate ed identificate.

### 3.4 Visual sorting

Il visual sorting è una tecnica utilizzata per separare le microplastiche dal resto del campione di acqua (detriti e materiale organico) a occhio nudo o con l'aiuto di un microscopio. Il visual sorting è comunemente realizzato in laboratorio ma in alcuni casi anche a bordo della nave. In laboratorio il campione di acqua è inserito progressivamente all'interno di piastre Petri che vengono analizzate visivamente da uno o più operatori, i quali, per mezzo di pinzette in metallo prelevano le microplastiche e le inseriscono in contenitori di vetro (per esempio vials) o su carta da filtro per la successiva identificazione. Le microplastiche prelevate possono essere asciugate in forno o in essiccatore (40-70 °C) e possono essere pesate. Durante il sorting, le microplastiche possono anche essere suddivise in diversi contenitori a seconda di una delle loro caratteristiche quali: tipo (pellet, frammento, ecc), forma

### Prodotto n. T1.2.1

(sfere, frammenti, ecc) o colore. Il visual sorting può essere effettuato precedentemente alla filtrazione o alla setacciatura dei campioni per eliminare le microplastiche di dimensioni superiori a 5 mm che si rendono visibili oppure in seguito alla setacciatura dei campioni, in questo caso le microplastiche trattenute dal setaccio (o dai setacci, se più di uno) possono essere inserite in contenitori di vetro o riposte su carta da filtro.

Dal momento che le microplastiche di dimensioni inferiori (<1-2 mm) sono difficilmente osservabili a occhio nudo e che le microplastiche di dimensioni nell'ordine dei micrometri sono difficilmente osservabili anche con un buon ingrandimento al microscopio, con questa tecnica di separazione vi è il rischio di non campionare l'intero insieme di microplastiche che compongono un campione. Per ridurre l'errore, il visual sorting di un singolo campione è spesso effettuato da più operatori, preferibilmente esperti.

### 3.5 Digestione

La digestione enzimatica è una tecnica che è utilizzata per separare le microplastiche dal materiale organico presente nel campione. Esistono diversi tipi di digestione: acida, enzimatica, alcalina e ossidativa che possono essere anche utilizzate in combinazione. Il campione è sottoposto a digestione in seguito a separazione delle microplastiche dalla matrice acqua. La digestione è spesso accoppiata a separazione per densità: il materiale organico galleggiante, che è prelevato insieme alle microplastiche, è successivamente digerito per essere eliminato. Le sostanze usate più comunemente per la digestione del materiale organico sono acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ) a differenti volumi (30% volume più utilizzato), acqua ossigenata abbinata a un catalizzatore quale il solfato ferroso ( $FeSO_4$ ), acido cloridrico (HCl) o fluoridrico (HF), idrossido di sodio (NaOH) o di potassio (KOH; Cole et al. 2014), e diversi tipi di enzimi di cui il più comune è la Proteinasi-K. Le sostanze usate nella digestione del materiale organico possono essere usate anche in combinazione, come ad esempio  $H_2O_2$  30% seguita da un trattamento del campione con HF 40% (Dubaiish and Liebezeit, 2013), oppure trattamento con HCl 37% seguito dal trattamento con  $H_2O_2$  50% (della durata di sette giorni a temperatura ambiente), seguito a sua volta da trattamento con ipoclorito di sodio 9-14% (NaClO; per 24 ore a temperatura ambiente; Tamminga et al. 2018). Per eliminare il materiale organico può essere utilizzato anche il processo di Wet Peroxide Oxidation (WPO). Una volta terminata la digestione del campione, le microplastiche possono essere classificate ed identificate.

La digestione acida che prevede l'uso di acidi forti quali HCl e HF ha uno svantaggio, infatti, questi acidi, possono minare l'integrità strutturale delle microplastiche presenti nel campione.

La digestione del materiale organico permette di studiare anche le microplastiche presenti all'interno



MARITTIMO-IT FR-MARITIME

Fondo Europeo di Sviluppo Regionale

degli organismi del plankton.

Prodotto n. T1.2.1

## **4 Tecniche di identificazione**

Le tecniche di identificazione delle microplastiche si distinguono in:

- Tecniche di identificazione visive che prevedono la classificazione e l'identificazione delle microplastiche a occhio nudo o con l'aiuto di un microscopio. Diversi tipi di test che prevedono la bruciatura del campione (test di fusione, melting test, hot needle test) possono essere sfruttati durante il visual sorting per assicurarsi che la particella osservata sia realmente costituita di materiale plastico;
- Tecniche analitiche (spettroscopia, gas-cromatografia, ecc) che prevedono l'utilizzo di diversi strumenti, generalmente utilizzati in chimica analitica, per l'identificazione delle microplastiche e del polimero di cui sono composte.

### **4.1 Tecniche di identificazione visiva**

La tecnica di identificazione visiva è stata la prima tecnica ad essere stata utilizzata per la classificazione e l'identificazione delle microplastiche, viene realizzata sui campioni conservati su filtro, nelle piastre Petri o all'interno di contenitori, e viene effettuata a occhio nudo o con l'aiuto di un microscopio. I microscopi utilizzati sono di diversi tipi: a fluorescenza, a dissezione, ottici, elettronici, stereo, binoculari, invertiti e verticali. Gli ingrandimenti utilizzati per l'identificazione delle microplastiche variano da 4.5X (MERI 2017) a 400X (Norén 2007). Per la classificazione e l'identificazione delle microplastiche può essere usato anche lo Scanning Electron Microscope (SEM), più preciso nella discriminazione di questi inquinanti per la grande risoluzione anche se non permette di distinguerne il colore. I microscopi possono essere dotati di macchina fotografica, in questo modo le microplastiche possono essere fotografate e analizzate anche successivamente.

Dal momento che le microplastiche di dimensioni inferiori (<1-2 mm) sono difficilmente osservabili a occhio nudo e che le microplastiche di dimensioni nell'ordine dei micrometri sono difficilmente osservabili anche con un buon ingrandimento al microscopio, con la tecnica del visual sorting vi è il rischio di non osservare tutte le microplastiche che compongono un campione e/o di classificare come plastica anche particelle che in realtà sono composte di altro materiale. A questo proposito, l'analisi di un campione da parte di più di un operatore e la loro esperienza giocano un ruolo importante nel minimizzare l'errore; inoltre, sono stati anche stabiliti tre criteri che permettono di distinguere le microplastiche in particolare dal materiale biologico (Hildago-Ruz et al. 2012; MERI 2017; Norén 2007):

1. Non devono essere presenti strutture cellulari evidenti sulla particella osservata.
2. Le fibre osservate devono essere ugualmente spesse lungo la loro intera lunghezza.
3. Le particelle osservate devono esibire colori netti e omogenei.



### Prodotto n. T1.2.1

Diversi test possono essere eseguiti per assicurarsi che la particella osservata sia effettivamente costituita di materiale plastico: test di fusione, melting test e hot needle test. Si tratta di test che prevedono la bruciatura della particella osservata, pertanto questi test determinano la compromissione o la perdita della particella osservata. Per questo motivo, questi test sono effettuati esclusivamente sulle particelle di dubbia natura. Nello specifico, il test di fusione prevede, appunto, la fusione della particella che è posta sotto fiamma: se la particella fonde si conferma la sua natura plastica. Il melting test prevede la bruciatura del campione; l'hot needle test (test dell'ago caldo) prevede anch'esso la bruciatura della particella che viene effettuata con un ago precedentemente portato ad alte temperature. Se di materiale plastico, le particelle bruciate si sciolgono o si arricciano, mentre quelle biologiche non subiscono deformazioni simili; in questo modo è possibile operare una distinzione.

Nel caso di campioni sottoposti a filtrazione, i filtri utilizzati per i campioni di microplastiche sono generalmente quadrettati, in modo tale da facilitare l'analisi visiva, soprattutto al microscopio. L'area da analizzare è la così detta area di filtrazione, ossia l'area in cui il filtro è stato attraversato dall'acqua, ed è distinguibile dalle diverse colorazioni (marrone, beige, ecc.; MERI 2017) che può assumere rispetto al bianco del filtro. Se il filtro si incurva a seguito dell'asciugatura è possibile incollarlo alla piastra Petri per facilitare la visualizzazione delle microplastiche al microscopio. Infine, è consigliabile analizzare ogni quadretto all'interno dell'area di filtrazione, seguendo un percorso a S (dal quadretto in alto a destra della prima riga in alto) che tocchi tutti i quadretti di ogni riga (MERI 2017). In questo modo, si evita di considerare una stessa microplastica più di una volta.

I microscopi possono essere accoppiati agli strumenti analitici come mostrato nel paragrafo successivo.

## 4.2 Tecniche analitiche

Le tecniche analitiche sono tecniche comparse successivamente alle tecniche di visual sorting e prevedono l'utilizzo di diversi tipi di strumenti, comunemente utilizzati in chimica analitica, per stabilire con certezza se una particella è costituita da materiale plastico. Inoltre, permettono di identificare il polimero di cui ciascuna microplastica è composta. Per l'identificazione delle microplastiche vengono utilizzate diverse tecniche analitiche e diversi strumenti (Tabella 4): le tecniche più comuni sono la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) e la spettroscopia Raman. Le microplastiche possono essere analizzate singolarmente o su filtro (facendo attenzione al materiale costituente il filtro).

Per quanto riguarda le tecniche analitiche spettroscopiche, gli strumenti possono essere accoppiati a microscopi: micro-FTIR, micro-Raman e Focal Plane Array (FPA). In questi casi, i campioni analizzati si trovano tipicamente su filtro. Questi strumenti sono sempre più ampiamente utilizzati, in quanto



### Prodotto n. T1.2.1

permettono l'identificazione anche delle microplastiche di piccole dimensioni difficilmente individuabili a occhio nudo. Infatti, gli strumenti non dotati di microscopio sono limitati dal fatto che le microplastiche che non sono visibili ad occhio nudo, e che quindi non sono prelevabili con pinzette, non possono essere analizzate. Questo perché ciascuna microplastica, per essere identificata senza l'ausilio di un microscopio, deve essere prelevata con pinzette di metallo e riposta nell'apposita sezione dello strumento per essere analizzata.

Alcune tecniche causano la distruzione del campione, e si tratta di tecniche che sfruttano le proprietà di stabilità termica dei polimeri delle microplastiche e che per identificarle analizzano i prodotti di degradazione termica, come ad esempio la pirolisi analitica accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa (Py-GC-MS), la tecnica di estrazione e desorbimento termico accoppiati con gas cromatografia-spettrometria di massa (TED-GC-MS), e l'analisi termogravimetrica accoppiata a calorimetria differenziale a scansione (TGA\_DSC). A differenza delle altre tecniche, la TED-GC-MS permette di identificare i polimeri direttamente nei campioni ambientali senza attività di pre-sorting o preparazione del campione. Questo metodo è una combinazione dell'analisi termogravimetrica, accoppiata all'estrazione in fase solida (TGA-SPE), e della cromatografia a gas a desorbimento termico (TDS-GC/MS). Il campione ambientale, comprensivo di componente inorganica, microplastiche e altro materiale, viene posto in un crogiolo e scaldato in condizioni inerti: i prodotti vengono assorbiti su un substrato di estrazione e poi desorbiti termicamente in un gascromatografo accoppiato ad uno spettrometro di massa (GC/MS).

Tutte le tecniche analitiche forniscono uno spettro per ogni particella analizzata, che viene poi confrontato con spettri di riferimento contenuti all'interno di librerie, ossia di database in cui gli spettri dei diversi polimeri sono registrati. In questo modo, è possibile stabilire se una particella sia costituita di materiale plastico in maniera univoca (il risultato non è frutto della decisione di un operatore) ed è possibile conoscere la natura del polimero che la costituisce.

Per facilitare l'identificazione delle microplastiche è possibile utilizzare un colorante artificiale: il Rosso Nilo (Nile Red) è il colorante fluorescente più comunemente utilizzato.

Le tecniche analitiche richiedono tempi lunghi di analisi, in quanto le microplastiche vengono analizzate una alla volta, e sono costose. Per questi motivi, si stanno sviluppando nuovi metodi di identificazione automatici, come quello proposto da Frère et al. (2016): scanning semi-automatico delle particelle e spettroscopia micro-Raman che permette l'analisi automatica delle particelle di plastica.

Dal momento che, come detto, non si tratta di analisi economiche, nella maggior parte degli studi non vengono identificate con tecniche analitiche tutte le microplastiche prelevate, ma più comunemente viene analizzato un subset rappresentativo dell'intero campione i cui risultati vengono poi estesi

statisticamente a tutto il campione.

Le tecniche analitiche sono le uniche tecniche che permettono di conoscere con certezza se le particelle osservate siano, o non siano, composte da materiale plastico. Attualmente, risulta necessario prevedere l'identificazione di almeno un subset di microplastiche con tecniche analitiche per poter considerare uno studio realmente rappresentativo. Infatti, l'errore commesso nell'identificazione delle microplastiche solo con tecniche di visual sorting è elevato, come dimostrato dall'avvento delle tecniche analitiche che hanno rivelato come la maggior parte delle particelle definite come microplastiche in realtà fossero costituite di altro materiale.

**Tabella 4.** Tecniche analitiche di identificazione delle MP in acqua di mare.

Tecnica analitica	Abbreviazione	Bibliografia
Spettrometria infrarossa a trasformata di Fourier	FT-IR	Abayomi et al. 2017; Bains et al. 2018; Cincinelli et al. 2017; Cole et al. 2014; Gallagher et al. 2016; Güven et al. 2017; Isobe 2016; Isobe et al. 2015; Leslie et al. 2011; Lusher et al. 2015; Reisser et al. 2013; Stöhr 2016; Song et al. 2015.
Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier in combinazione con microscopia ottica	micro-FT-IR	Frias et al. 2014; Kang et al. 2015; Song et al. 2014; Sun et al. 2018; Syakti 2017.
Spettrofotometria infrarossa a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata	ATR FTIR	Brandon et al. 2016; Castillo et al. 2016 ; Castro et al. 2016; Hall et al. 2015; Mintenig et al. 2017; Palatinus et al. 2015; Suaria et al. 2016; Syakti 2017; Syakti et al. 2017; Tsang et al. 2017; Viršek et al. 2016.
Spettrofotometria infrarossa a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata in combinazione con microscopia ottica	micro-ATR FTIR	Palatinus et al. 2015; Viršek et al. 2016.
Focal Plane Array micro-FTIR	FPA micro-FTIR	Mintenig et al. 2017; Primpke et al. 2017.

Spettroscopia nel vicino infrarosso	FT-NIR	Abayomi et al. 2017; Gajšt et al. 2016.
Spettroscopia Raman		Leslie et al. 2011; Sedlak et al. 2017.
Spettroscopia Raman in combinazione con microscopia ottica	Spettroscopia micro-Raman	Enders et al. 2015; Erni-Cassola et al. 2017; Lenz et al. 2015; Zhao et al. 2015.
Scanner semi automatico di particelle in combinazione con spettroscopia micro-Raman		Frère et al. 2016.
Estrazione e desorbimento termico accoppiati con gas cromatografia-spettrometria di massa	TED-GC-MS	Dümichen et al. 2015.
Analisi termogravimetrica accoppiata a calorimetria differenziale a scansione	TGA-DSC	Majewsky et al. 2016.
Pirolisi analitica accoppiata con gascromatografia e spettrometria di massa	Py-GC-MS	Syakti 2017.

## 5 Restituzione dei risultati

### 5.1 Classificazione delle microplastiche

La classificazione delle microplastiche avviene sulla base di diverse caratteristiche morfologiche: tipologia (frammenti, pellets, fibre, film di plastica, plastica espansa, granuli, polistirolo), forma (cilindrica, a disco, piatta, ovoidale, a sfera, arrotondata, subarrotondata, subangolare, angolare, irregolare, allungata, degradata, ruvida, e coi bordi rotti), colore (trasparente, cristallino, bianco, crema, rosso, arancione, blu, opaco, nero, grigio, marrone, verde, rosa, color rame, giallo), taglia e tipo di polimero (Galgani et al. 2013). Le microplastiche possono essere suddivise in classi di taglia o essere misurate manualmente o con l'aiuto di software accoppiati ai microscopi. I diversi studi utilizzano classificazioni leggermente differenti le une dalle altre, e per questo motivo, spesso non sono comparabili.

### 5.2 Abbondanza e concentrazione delle microplastiche

I risultati ottenuti possono essere riportati come abbondanza o concentrazione delle microplastiche in acqua di mare. L'abbondanza delle microplastiche può essere riportata all'unità di superficie (n° di microplastiche/m<sup>2</sup> o n° di microplastiche/Km<sup>2</sup>) o all'unità di volume (n° di microplastiche/m<sup>3</sup> o n° di microplastiche/Km<sup>3</sup>). Il primo caso si applica a strumenti che campionano lo strato superficiale del mare: è necessario conoscere le dimensioni della bocca di raccolta dello strumento e lo spazio percorso (coordinate di partenza e di arrivo). Nel secondo caso è necessario conoscere la quantità di acqua filtrata o campionata. La concentrazione delle microplastiche può essere stimata anche a partire dal peso delle microplastiche campionate e viene riportata anch'essa all'unità di area o di volume. In questo caso, il peso delle microplastiche è inteso come peso secco del campione di microplastiche.

## 6 Conclusioni

Le strategie di campionamento, analisi in laboratorio ed identificazione delle microplastiche sono molteplici e si evince come manchi una standardizzazione delle procedure. Inoltre, l'utilizzo di tecniche differenti rende difficile la comparazione tra studi diversi. Diventa quindi evidente come la condivisione di strumenti e metodi sia necessaria per ottenere risultati paragonabili.

Il campionamento e l'analisi delle microplastiche sono effettuati con strumenti sia di campo sia di laboratorio che sono già disponibili e che sono utilizzati principalmente per lo studio di altri parametri oceanografici. Questi strumenti sono quindi riadattati per lo studio delle microplastiche per le quali non è ancora previsto un sistema di campionamento ed analisi *ad hoc*. La progettazione, la realizzazione e l'applicazione quindi di strumenti di nuova generazione potrebbe portare alla risoluzione di problemi legati agli strumenti utilizzati ed ai metodi finora utilizzati (contaminazione, campionamento parziale dell'intera gamma di microplastiche, perdita di parte di campione, ecc.).

Inoltre, sebbene il limite dimensionale delle microplastiche sia definito come 20  $\mu\text{m}$ , a livello globale in realtà non esiste un limite dimensionale inferiore standard. Infatti, nei vari studi sono considerati limiti inferiori differenti a seconda degli strumenti di campionamento e di laboratorio impiegati. Per esempio, infatti, le reti sono gli strumenti di campionamento più ampiamente utilizzati, ma trattandosi di strumenti ideati e comunemente impiegati per altri scopi, non presentano maglie adeguate a campionare le dimensioni minime delle microplastiche (20  $\mu\text{m}$ ). Tuttavia, l'utilizzo di una maglia delle reti da 20  $\mu\text{m}$  non sarebbe facilmente realizzabile a causa della facilità con cui la rete si intasa, a causa, ad esempio, degli organismi del plankton.

L'utilizzo di strumenti originariamente creati per altri fini, inoltre, introduce il problema della contaminazione del campione. Per esempio, le reti sono generalmente costituite da materiale plastico, che quindi può inquinare il campione indagato. Il rischio di contaminazione dei campioni deve essere quindi limitato attraverso la messa in atto di diverse precauzioni. In questo caso devono essere predisposti campioni di controllo che devono essere sottoposti alle stesse procedure dei campioni di microplastiche al fine di valutare la contaminazione dei campioni durante le procedure di campionamento ed analisi.

Negli ultimi anni si è sviluppata la tendenza allo studio e alla creazione di nuovi strumenti e sensori specifici per il campionamento delle microplastiche, ma rimangono ancora a livello di prototipo e non sono riconosciuti a livello globale e quindi commercializzati. Per questo, la tendenza è di sfruttare gli strumenti esistenti che già si possiedono ed adattarli allo studio delle microplastiche.

Per quanto riguarda le procedure di analisi in laboratorio, la filtrazione risulta quella più utilizzata. I sistemi di identificazione sono diversi, ma le tecniche analitiche sono quelle che permettono una

### **Prodotto n. T1.2.1**

migliore qualità del dato, in quanto permettono di identificare con certezza l'effettiva natura plastica di una particella ed anche il polimero di cui è composta. Al contrario, le analisi visive dipendono dall'interpretazione degli operatori che effettuano le analisi, e molti studi recenti, analizzando le particelle con tecniche analitiche, hanno evidenziato come molte particelle identificate dall'operatore come plastiche in realtà fossero composte di altro materiale. Le tecniche analitiche sono molto costose, pertanto nella maggior parte dei casi queste analisi non sono svolte su tutte le microplastiche campionate, ma solo su una aliquota di esse. Visto l'errore dovuto all'analisi visiva, è consigliabile prevedere l'impiego di tecniche analitiche su un subset di campioni il più possibile rappresentativo del campione totale, al fine di validare i risultati ottenuti dall'analisi visiva.

## **Bibliografia**

- Abayomi OA, Range P, Al-Ghouti MA, Obbard JP, Almeer SH, Ben-Hamadou R (2017). Microplastics in coastal environments of the Arabian Gulf. *Marine Pollution bulletin* 124: 181-188.
- Aytan U, Valente A, Senturk Y, Usta R, Sahin FBE, Mazlum RE, Agirbas E (2016). First evaluation of neustonic microplastics in Black Sea waters. *Marine Environmental Research* 119: 22-30.
- Arthur C, Baker J, Bamford H (Eds.) (2009). *Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris*. NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30.
- Bagaev A, Khatmullina L, Chubarenko I (2018). Anthropogenic microlitter in the Baltic Sea water column. *Marine Pollution Bulletin* 129: 918-923. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.049>.
- Baini M, Fossi MC, Galli M, Caliani I, Campani T, Finoia G, Panti C (2018). Abundance and characterization of microplastics in the coastal waters of Tuscany (Italy): the application of the MSFD monitoring protocol in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 133: 543-552.
- Barrows APW, Neumann CA, Berger ML, Shaw SD (2017). Grab vs. neuston tow net: a microplastic sampling performance comparison and possible advances in the field. *Analytical Methods* 9: 1446.
- Brandon J, Goldstein M, Ohman MD (2016). Long-term aging and degradation of microplastic particles: comparing in situ oceanic and experimental weathering patterns. *Marine Pollution Bulletin* 110: 299-308.
- Carlson DJ, Cullen JL, Cantey JJ (1988). Description of and results from a new surface microlayer sampling device. *Deep-Sea Research, Part A*, 35: 1205-1213.
- Castillo AB, Al-Maslamani I, Obbard JP (2016). Prevalence of microplastics in the marine waters of Qatar. *Marine Pollution Bulletin* 111: 260-267.
- Castro RO, Silva ML, Marques MRC, de Araújo FV (2016). Evaluation of microplastics in Jurujuba Cove, Niterói, RJ, Brazil, an area of mussels farming. *Marine Pollution Bulletin* 110: 555-558.
- Cincinelli A, Scopetani C, Chelazzi D, Lombardini E, Martellini T, Katsoyiannis A, Fossi MC, Corsolini S (2017). Microplastic in the surface waters of Ross Sea (Antarctica): occurrence, distribution and characterization by FTIR. *Chemosphere* 175: 391-400.
- Cole M, Lindeque P, Halsband C, Galloway TS, (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin* 62: 2588-2597.
- Collignon A, Hecq JH, Galgani F, Voisin P, Collard F, Goffart A (2012). Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 64 (4): 861e864.
- Cózar A, Echevarría F, Gonzalez-Gordillo JI, Irigoien X, Úbeda B, Hernandez-Leon S, Palma AT, Navarro S, García-de-Lomas J, Ruiz A, Fernandez-de-Puelles M, Duarte CM (2014). Plastic debris in the open ocean.

Proceedings of the National Academy of Sciences 111 (28): 10239-10244.

de Lucia GA, Caliani I, Marra S, Camedda A, Coppa S, Alcaro L et al. (2014). Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea). *Marine Environmental Research* 100: 10-16.

Desforges JPW, Galbraith M, Dangerfield N, Ross PS (2014). Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 79: 94-99.

Dubaish F, Liebezeit G (2013). Suspended microplastics and black carbon particles in the Jade system, Southern North Sea. *Water, Air & Soil Pollution* 224 (2): 1-8.

Duis K, Coors (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Science Europe* 28:2.

Dümichem E, Barthel AK, Braun U, Bannick CG, Brand K, Jekel M, Senz R (2015). Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method. *Water Research* 85: 451-457.

Edson E, Patterson M (2015). MantaRay: a novel autonomous microplastic sensor for determining particle concentrations in marine ecosystems. Research, Innovation and Scholarship Expo. Category: Engineering and Technology. Abstract ID# 580. Boston (MA; USA), 9.04.2018.

Enders K, Lenz R, Stedmon CA, Nielsen TG (2015). Abundance, size and polymer composition of marine microplastics  $\geq 10 \mu\text{m}$  in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Marine Pollution Bulletin* 100: 70-81.

Eriksen M, Liboiron M, Kiessling T, Charron L, Alling A, Lebreton L et al. (2018). Microplastic sampling with the AVANI trawl compared to two neuston trawls in the Bay of Bengal and South Pacific. *Marine Pollution Bulletin* 232: 430-439.

Erni-cassola G, Gibson MI, Thompson RC, Christie-Oleza JA (2017). Lost, but found with Nile Red: a novel method for detecting and quantifying small microplastics (1 mm to  $20 \mu\text{m}$ ) in environmental samples. *Environmental Science & Technology* 51: 13641-13648.

Faur F, Saini C, Potter G, Galgani F, De Alencastro LF, Hagmann P (2015). An evaluation of surface micro- and mesoplastic pollution in pelagic ecosystems of the Western Mediterranean Sea. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (16): 12190-12197.

Frère L, Paul-Pont I, Moreau J, Soudant P, Lambert C, Huvet A, Rinnert E (2016). A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. *Marine Pollution Bulletin* 113: 461-468.

Frias JPGL, Otero V, Sobral P (2014). Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. *Marine Environmental Research* 95: 89-95.



- Gajšt T, Bizjak T, Palatinus A, Liubartseva S, Kržan A (2016). Sea surface microplastics in Slovenian part of the northern Adriatic. *Marine Pollution Bulletin* 113: 392-399.
- Galgani F, Hanke G, Werner S, Oosterbaan L, Nilsson P, Fleet D et al. (2013). Guidance on monitoring of marine litter in European Seas. Report EUR 26113 EN – Joint Research Centre – Institute for Environment and Sustainability, pp. 128.
- Gallagher A, Rees A, Rowe R, Stevens J, Wright P (2016). Microplastics in the Solent estuarine complex, UK: an initial assessment. *Marine Pollution Bulletin* 102: 243-249.
- GESAMP (2015). "Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment" (Kershaw, P. J., ed.). (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 90, 96 p.
- Gorokhova E (2015). Screening for microplastic particles in plankton samples: how to integrate marine litter assessment into existing monitoring programs? *Marine Pollution bulletin* 99: 271-275.
- Güven O, Gökdağ K, Jovanović B, Kleyş AE (2017). Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish. *Environmental Pollution* 223: 286-294.
- Hall NM, Berry KLE, Rintoul L, Hoogenboom MO (2015). Microplastic ingestion by scleractinian corals. *Marine Biology* 162: 725.
- Harvey GW, Burzell LA (1972). A simple microlayer method for small samples. *Limnology and Oceanography* 17: 156-157.
- Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M (2012). Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science & Technology* 46: 3060-3075.
- Isobe A, Uchida K, Tokai T, Iwasaki S (2015). East Asian seas: a hot spot of pelagic microplastics. *Marine Pollution Bulletin* 101: 618-623.
- Isobe A (2016). Percentage of microbeads in pelagic microplastics within Japanese coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 110: 432-437.
- Ivar do Sul JA, Costa MF (2014). The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution* 185: 352-364.
- Kang JH, Kwon OY, Lee KW, Song YK, Shim WJ (2015). Marine neustonic microplastics around the southeastern coast of Korea. *Marine Pollution Bulletin* 96: 304-312.
- Lenz R, Enders K, Stedmon CA, Mackenzie DMA, Nielsen TG (2015). A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. *Marine*

Pollution Bulletin 100: 82–91.

Leslie HA, van der Meulen MD, Kleissen FM, Vethaak AD (2011). Microplastic litter in the Dutch marine environment. Providing facts and analysis for Dutch policymakers concerned with marine microplastic litter. *Deltares*, pp. 105.

Lima ARA, Costa MF, Barletta M (2014). Distribution patterns of microplastics within the plankton of a tropical estuary. *Environmental Research* 132: 146–155.

Löder MG, Gerdt G (2015). Methodology used for the detection and identification of microplastics—a critical appraisal. *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, pp. 201–227.

Lusher AL, Burke A, O'Connor I, Officer R (2014). Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. *Marine Pollution Bulletin* 88 (1): 325-333.

Lusher AL, Tirelli V, O'Connor I, Officer R (2015). Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Scientific Reports* 5: 14947.

Maes T, Van der Meulen MD, Devriese LI, Leslie HA, Huvet A, Frère L, Robbens J, Vethaak AD (2017). Microplastic baseline surveys at the water surface and sediments of the North-East Atlantic. *Frontiers in Marine Science* 4:135.

Majewsky M, Bitter H, Eiche E, Horn H (2016). Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC). *Science of the Total Environment* 568: 507-511.

MERI (Marine & Environmental Research Institute), 2017. Guide to microplastic identification. pp. 14

Miller ME, Kroon FJ, Motti CA (2017). Recovering microplastics from marine samples: a review of current practices. *Marine Pollution Bulletin* 123: 6-18.

Mintenig SM, Int-Veen I, Löder MGJ, Primpke S, Gerdt G (2017). Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water Research* 108: 365-372.

Norén F (2007). *Small Plastic Particles in Coastal Swedish Waters*. Kimo Sweden, Lysekil

Palatinus A, Viršek MK, Kaberi E (2015). DeFishGear protocols for sea surface and beach sediment sampling and sample analysis. Cross Border Cooperation 2007-2013, Adriatic IPA, DeFishGear project, pp. 27.

Primpke S, Lorenz C, Rascher-Friesenhausen R, Gerdt G (2017). An automated approach for microplastics analysis using focal plane array (FPA) FTIR microscopy and image analysis. *Analytical Methods* 9: 1499.

Reisser J, Shaw J, Wilcox C, Hardesty BD, Proietti M, Thums M, Pattiaratchi C (2013). Marine plastic pollution in waters around Australia: characteristics, concentrations, and pathways. *PloS one* 8 (11):

e80466.

Sedlak M, Sutton R, Box C, Sun J, Lin D (2017). FINAL Sampling and analysis plan for microplastic monitoring in San Francisco Bay and adjacent Nation Marine Sanctuaries. SFEI Contribution 819. Richmond CA.

Setälä O, Magnusson K, Lehtiniemi M, Norén F (2016). Distribution and abundance of surface water microlitter in the Baltic Sea: a comparison of two sampling methods. *Marine Pollution Bulletin* 110 (1): 177-183.

Syakti, A.D (2017). Microplastics monitoring in marine environment. *Omni-Akuatika*, 11 (2): 1-6.

Syakti AD, Bouhroum R, Hidayati NV, Koenawan CJ, Boulkamh A, Sulistyio I, Lebarillier S, Akhlus S, Doumenq P, Wong-Wah-Chung P (2017). Beach macro-litter monitoring and floating microplastic in a coastal area of Indonesia. *Marine Pollution Bulletin* 122: 217-225.

Song YK, Hong SH, Jang M, Kang JH, Kwon OY, Han GM, Shim WJ (2014). Large accumulation of micro-sized synthetic polymer particles in the sea surface microlayer. *Environmental Science & Technology* 48: 9014-9021.

Song YK, Hong SH, Jang M, Han GM, Rani M, Lee J, Shim WJ (2015). A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin* 93 : 202-209.

Stöhr R (2016). Microplastic in the Sea. A research approach by One Earth – One Ocean. One Earth – One Ocean project. <https://oneearth-oneocean.com/wp-content/uploads/Microplastic-in-the-sea-report-l.pdf>

Suaria G, Avio CG, Mineo A, Lattin GL, Magaldi MG, Belmonte G (2016). The Mediterranean plastic soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters. *Scientific Reports* 6:37551.

Sun X, Liang J, Zhu M, Zhao Y, Zhang B (2018). Microplastics in seawater and zooplankton from the Yellow Sea. *Environmental Pollution* 242: 585-595.

Sutton R, Mason SA, Stanek SK, Willis-Norton E, Wren IF, Box C (2016). Microplastic contamination in the San Francisco Bay, California, USA. *Marine Pollution Bulletin* 109: 230-235.

Tamminga M, Hengstmann E, Fischer EK (2018). Microplastic analysis in the South Funen Archipelago, Baltic Sea, implementing manta trawling and bulk sampling. *Marine Pollution Bulletin* 128: 601-608.

Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AWG et al. (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304: 838.

Tsang YY, Mak CW, Liebich C, Lam SW, Sze ETP, Chan KM (2017). Microplastic pollution in the marine waters and sediments of Hong Kong. *Marine Pollution bulletin* 115: 20-28.

van der Hal N, Ariel A, Angel DL (2017). Exceptionally high abundances of microplastics in the

oligotrophic Israeli Mediterranean coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 116: 151–155.

Viršek MK, Palatinus A, Koren S, Peterlin M, Horvat P, Kržan A (2016). Protocol for microplastics sampling on the sea surface and sample analysis. *Journal of Visualized Experiments* 118: 55161.

Wang J, Tan Z, Peng J, Qiu Q, Li M, (2016). The behaviors of microplastic in the marine environment. *Marine Environmental Research* 113: 7-17.

Zhao S, Zhu L, Wang T, Li D (2014). Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution. *Marine Pollution Bulletin* 86, 562–568.

Progetto - Projet  
**SPLASH! - Stop alle Plastiche in H2O!**



**PRODOTTO T1.2.1: REPORT SVILUPPO DI SISTEMI DI  
CAMPIONAMENTO INNOVATIVI**

**LIVRABLE T1.2.1: RAPPORT DE DÉVELOPPEMENT DES SYSTÈMES  
D'ÉCHANTILLONAGE INNOVANTS**

**Partner responsabile - Partner responsable :** Université de Toulon  
**Partner contributori - Partenaires contributeurs :** Università di Genova,  
European Research Institute

<b>Nome del prodotto</b>	<b>Redatto da:</b>	<b>Verificato da:</b>	<b>Validato da:</b>
T1.2.1 - Report sviluppo di sistemi di campionamento innovativi	Mario Petrillo Laura Canesi	Laura Cutroneo Stéphane Mounier	Marco Capello Alessandro Stocchino
<b>Data :</b>	03/09/2018	05/09/2018	20/09/2018

## **Prodotto n. T1.2.1**

**Descrizione del Prodotto:** Lo studio delle tecniche e dei materiali disponibili sul mercato e già applicati nel campionamento delle microplastiche permetterà la progettazione di sistemi innovativi di campionamento delle acque adatti alle caratteristiche degli ambienti portuali.

**Description du livrable:** Etude des techniques et des matériaux disponibles dans le commerce et déjà appliqués pour l'échantillonnage des microplastiques permettra la conception des systèmes innovants d'échantillonnage des eaux appropriés aux caractéristiques des milieux portuaires.

### **Sintesi**

Le microplastiche sono inquinanti emergenti ampiamente diffusi in tutti gli ambienti, pertanto rappresentano un parametro da monitorare. Per quanto riguarda la matrice acqua di mare, oggetto di questa ricerca, esistono diverse tecniche di campionamento che sfruttano strumenti comunemente utilizzati per lo studio di altri parametri, ma anche nuovi strumenti che continuano a essere sviluppati appositamente per lo studio di questi inquinanti. Le metodologie di analisi in laboratorio dipendono dalla strategia di campionamento utilizzata. Per quanto riguarda le tecniche di identificazione si tratta di analisi visive o strumentali. La presente indagine si basa su una ricerca bibliografica e sulle informazioni ricavate dall'analisi di più di 80 studi scientifici che sono stati realizzati negli ultimi anni. A seguito di un capitolo introduttivo, nel capitolo 2 sono riportate le principali strategie di campionamento, nel capitolo 3 le metodologie di analisi in laboratorio, mentre il capitolo 4 riporta le tecniche di identificazione delle microplastiche. Infine, nei capitoli 5 e 6 vengono riportate brevemente le modalità di restituzione dei risultati degli studi condotti sulle microplastiche, e le conclusioni riassumono quanto ricavato dalla presente indagine.

### **Synthèse**

Les microplastiques sont des polluants émergents et ils sont largement distribués dans tous les environnements. Concernant l'eau de mer, objet de cette recherche, il y a différents techniques d'échantillonnage qui exploitent les instruments communément utilisés pour l'étude des autres paramètres, mais aussi nouveaux instruments que continuent d'être développés spécifiquement pour l'étude de ces polluants. Les méthodologies d'analyse en laboratoire dépendent de la stratégie d'échantillonnage utilisée. Les techniques d'identification reposent sur les analyses visuelles ou instrumentales. Cette étude repose sur une recherche bibliographique et sur les informations figurant dans l'analyse de plus de 80 études scientifiques qui ont été faites au cours des dernières années. Après un chapitre introductif, dans le chapitre 2 sont présentés les principales stratégies d'échantillonnage, dans le chapitre 3 les méthodologies d'analyses en laboratoire, tandis que le

## **Prodotto n. T1.2.1**

capitolo 4 contiene le tecniche d'identificazione dei microplastici. Infine, nei capitoli 5 e 6 sono presentati brevemente i modi di restituzione dei risultati delle ricerche condotte sui microplastici, e le conclusioni riassumono il prodotto della presente ricerca.



**Indice**

1	Introduction .....	1
2	Stratégies d'échantillonnage .....	3
2.1	Instruments d'échantillonnage pour microplastiques dans l'eau de mer .....	3
2.1.1	Outils d'échantillonnage non discrets .....	4
2.1.2	Outils d'échantillonnage discret .....	15
2.1.3	Instruments d'échantillonnage des micro-couches superficielles .....	17
2.1.4	Nouveaux outils pour l'étude des microplastiques .....	18
2.1.5	Conservation des échantillons .....	20
3	Méthodes d'analyse en laboratoire .....	21
3.1	Séparation par densité .....	21
3.2	Filtrations .....	22
3.3	Tamassage .....	23
3.4	Tri visuel .....	23
3.5	La digestion .....	24
4	Techniques d'identification .....	25
4.1	Techniques d'identification visuelle .....	25
4.2	Techniques d'analyse .....	26
5	Restitution des résultats .....	30
5.1	Classification des microplastiques .....	30
5.2	Abondance et concentration de microplastiques .....	30
6	Conclusions .....	31
	Bibliographie .....	33

## **1 Introduction**

Le plastique est un composé organique de synthèse issu des processus de polymérisation qui représente l'un des principaux déchets présents dans les mers et les océans (de Lucia et al., 2014). Le plastique libéré dans le milieu marin peut provenir du sol et, dans ce cas, ce sont des produits tels que ceux à usage domestique et pour les soins personnels qui parviennent à la mer principalement par le biais de rejets urbains, ou, il peut être rejeté directement dans la mer, comme dans le cas des filets de pêche en nylon (de Lucia et al. 2014, Duis et Coors, 2016). Pour cette raison, les déchets plastiques sont davantage concentrés dans les étendues marines plus proches des zones urbaines (de Lucia et al., 2014). Cependant, en raison de divers mécanismes de transport physique tels que les courants et les marées, les plastiques sont désormais répandus dans tous les environnements marins, du pôle à l'équateur (Ivar do Sul et Costa, 2014).

Les plastiques sont généralement classés en fonction de leur taille. On peut alors parler de nanoplastiques, de microplastiques, de mésoplastiques, de macroplastiques et de mégaplastiques (GESAMP, 2015). Les microplastiques sont définis comme des plastiques dont les dimensions ne dépassent pas 5 mm ; leur limite inférieure proposée est de 20  $\mu\text{m}$  (Arthur et al 2009, Galgani et al. 2013). Les microplastiques peuvent ensuite être divisés en deux classes en fonction de leur origine: les microplastiques primaires et secondaires (Hildago-Ruz et al., 2012). Les microplastiques primaires sont produits fabriqués à dessein dans la gamme de tailles mentionnée ci-dessus pour une certaine utilisation et sont ainsi libérés tel quel dans l'environnement : on citera par exemple les petites sphères (pastilles) qui composent de nombreux produits à usage personnel et sont appelées «microbilles» (Cole et al. 2011). Les microplastiques secondaires, par contre, proviennent de la fragmentation de plastiques plus gros (Hildago-Ruz et al., 2012).

Dans le milieu marin, les microplastiques ont tendance à s'accumuler à la surface de la colonne d'eau, mais sont également sujets à un transport vertical vers le fond en raison de différents mécanismes (Wang et al., 2016). En fait, pendant leur séjour dans le milieu marin, la densité des déchets plastiques peut augmenter pour plusieurs raisons, parmi lesquelles, la croissance d'organismes connus sous le nom d'encrassement à leur surface (biofouling), ce qui provoque une augmentation de poids, le faisant couler vers des couches plus profondes de la colonne d'eau jusqu'à ce qu'il atteigne le sédiment de fond (Cózar et al., 2014; Wang et al., 2016). De plus, des phénomènes tels que la turbulence générée par le vent fort peuvent provoquer un mélange de la couche superficielle de la colonne d'eau et, par conséquent, une redistribution des microplastiques dans cette couche (Collignon et al., 2012).

Les microplastiques sont capables de concentrer différents types de polluants, tels que les polluants organiques persistants (POP), et sont sujets à différents types de dégradation: mécanique (par exemple

## **Prodotto n. T1.2.1**

par l'action du mouvement des vagues), chimique (par exemple processus de photodégradation et de thermodégradation) ou biologiques (donnés par l'action des différents microorganismes pouvant se déposer à leur surface) (Wang et al., 2016).

Les micro-plastiques ont tendance à être facilement ingérée par les organismes aquatiques, entrant ainsi la chaîne alimentaire et représentent donc un danger pour les organismes marins ou pour la santé humaine (Miller et al. 2017). La pollution microplastique est un problème grave auquel il faut faire face étant donné la large diffusion de ces polluants dans l'environnement. C'est pour cette raison qu'ils font désormais partie intégrante des lois nationales et internationales. Au niveau européen, la directive-cadre sur la stratégie marine (MSFD / 2008/56 / CE) publié par la Commission européenne (CE) établissant un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin a pour objectif d'atteindre un bon Etat environnemental (bon état environnemental, GES), qui est évalué sur la base de 11 descripteurs. Les microplastiques sont inclus dans le numéro de descripteur 10 sur la "litière marine", devenant ainsi un paramètre à surveiller. Cependant, il n'existe pas encore une méthodologie standard pour l'étude des microplastique, pour l'échantillonnage et leur séparation de matrices environnementales, pour leur identification, et donc des méthodes différentes à travers le monde sont appliquées pour déterminer l'abondance, la distribution et les effets sur les organismes. Par conséquent, il est encore très difficile de faire des comparaisons entre différents domaines et études. À cet égard, les chapitres suivants présentent certaines des méthodes d'échantillonnage, d'analyse et d'identification les plus courantes, utilisées dans plus de 80 études menées dans le monde entier sur la matrice de l'eau de mer au cours des 10 dernières années.

L'objet de recherche de ce produit servira de base à la conception de systèmes de prélèvement d'eau innovants, adaptés aux caractéristiques des environnements portuaires (produit T1.2.2), et à la conception de campagnes de mesure, en vue de l'application des meilleures méthodes de traitement et d'analyse pour la détermination des microplastiques. Ces connaissances seront partagées entre les partenaires.

## **2 Stratégies d'échantillonnage**

Les principales stratégies d'échantillonnage des microplastiques peuvent être divisées en trois types principaux (Hildago-Ruz et al. 2012):

- Échantillonnage sélectif: ensemble des échantillons de microplastique reconnaissables à l'œil nu directement dans l'environnement. C'est une stratégie qui pourrait favoriser une mauvaise estimation de l'abondance réelle des microplastiques en raison de la sous-estimation de ceux de plus petites dimensions car ils sont difficiles à identifier à l'œil nu.
- Échantillonnage en série (échantillonnage en vrac): consiste à prélever un certain volume d'eau et à extraire des microplastiques au laboratoire à partir du volume total de l'échantillon prélevé dans l'environnement. C'est une stratégie utilisée lorsque les microplastiques ne peuvent pas être facilement identifiés, par exemple à l'œil nu.
- Échantillonnage à volume réduit (échantillonnage à volume réduit): consiste à extraire les microplastiques des échantillons d'eau filtrée prélevés dans l'environnement. Ce sont des échantillons dont le volume est réduit directement pendant la phase d'échantillonnage, en ne conservant que la partie de l'échantillon qui présente un intérêt. Les échantillons, de volume réduit, sont obtenus en filtrant de grands volumes d'eau avec les filets. Cette stratégie nécessite que l'échantillon soit traité ultérieurement dans le laboratoire.

En ce qui concerne plus particulièrement les systèmes d'échantillonnage de microplastique dans l'eau de mer, les instruments existants actuellement utilisés pour l'étude de ces polluants sont nombreux. Selon l'instrument, il est possible d'échantillonner les différentes couches de la colonne d'eau à partir des micro-strates superficielles d'une épaisseur de quelques microns jusqu'à la couche la plus proche du fond. La plupart des instruments sont utilisés pour échantillonner les premiers mètres de la colonne d'eau, car on pense que c'est dans cette couche que se trouve la plus grande concentration de microplastiques. Certains des outils utilisés sont déjà connus et largement utilisés lors des campagnes océanographiques pour l'échantillonnage d'autres paramètres océanographiques, tandis que d'autres ont été spécialement conçus pour l'étude des microplastiques.

La section suivante répertorie les principaux systèmes d'échantillonnage de microplastiques pour eau de mer utilisés dans plusieurs études menées dans le milieu marin (colonne d'eau) dans le monde entier au cours des 10 dernières années.

### **2.1 Instruments d'échantillonnage pour microplastiques dans l'eau de mer**

Les outils de prélèvement de microplastique dans l'eau de mer peuvent être divisés en trois catégories

principales:

- Outils d'échantillonnage non discrets: filets et systèmes de pompage;
- Outils d'échantillonnage discrets: bouteille Niskin, Rosette et échantillonneur d'eau intégré (IWS);
- Échantillons de micro-strates de surface: tamis et échantillonneur à tambour rotatif.

### **2.1.1 Outils d'échantillonnage non discrets**

Ce sont principalement deux grandes catégories d'instruments largement utilisés pour l'échantillonnage de microplastique: les filets et les systèmes de pompage.

#### Les filets

Les filets sont les instruments les plus utilisés pour l'échantillonnage de microplastiques dans l'eau de mer. Ce sont des outils déjà largement utilisés pour l'échantillonnage du plancton (phytoplancton et zooplancton), également utilisés pour l'échantillonnage des microplastiques; De cette manière, il est possible de caractériser une zone des deux points de vue. Les filets permettent d'échantillonner de grands volumes d'eau, superficiels, intermédiaires ou de fond (échantillonnage à volume réduit).

Les filets sont remorqués et généralement déployés latéralement sur le navire au moyen d'un "spinnaker" ou d'autres structures, le filet pouvant ainsi être maintenu à l'écart du navire de manière à éviter la vague en avant ou, en cas de déploiement vers l'arrière, la turbulence du sillage générée par navire. Les filets utilisés peuvent avoir une ouverture rectangulaire de la bouche [d'une superficie allant de 0,08 m<sup>2</sup> (Maes et al., 2017; Eriksen et al 2018) à 0,60 m<sup>2</sup> (Gajšt et al., 2016)] ou circulaire [de 0,15 m (Hall et al., 2015) à 0,60 m (Lima et al., 2014; Frias et al., 2014; Gorokhova 2015; Aytan et al., 2016; Güven et al., 2017; Bainsi et al., 2018) de diamètre]. La structure de la bouche est composée d'un cadre rigide qui maintient la bouche de l'instrument ouverte. Dans certains cas, les filets ont des ailes soudées latéralement à l'embouchure de la collecte et sont composées d'un mélange de résines qui favorise la flottation de l'instrument en le maintenant à la surface ou à une certaine profondeur. Les filets sont en plastique et sont soudés au cadre rigide de la bouche de collecte, avec différentes longueurs et tailles de mailles [de 1,5 m (Gajšt et al., 2016) à 4,5 m (Maes et al., 2017) de longueur et mailles de 50 µm (Hall et al., 2015) à 500 µm (Sun et al 2018)]. Les filets ont généralement une forme conique et se terminent par un collecteur dans lequel l'échantillon est concentré.

Dans le cas de l'échantillonnage des eaux de surface, les filets sont remorqués en surface le long de transects horizontaux pendant des durées déterminées (de 3 à 90 minutes) et à des vitesses

### **Prodotto n. T1.2.1**

spécifiques (de 1 à 5 nœuds). La vitesse du navire doit être telle qu'elle évite les gargouillis qui affectent la quantité d'eau qui passe par la bouche de l'instrument et qui pourraient nuire à la qualité de l'échantillon prélevé. D'autre part, certains types de filets peuvent être remorqués verticalement du fond à la surface pour échantillonner toute la colonne d'eau. Au moyen de mécanismes de fermeture de filet, il est également possible d'obtenir des échantillons à certaines profondeurs. Une fois l'échantillonnage terminé, le filet est rincé de l'extérieur avec de l'eau Milli-Q ou de l'eau de mer, évitant ainsi la contamination de l'échantillon. Le matériau attaché au filet est ensuite acheminé dans le collecteur qui est ensuite vidé en le rinçant à plusieurs reprises dans un récipient. Le conteneur est très souvent en verre. Dans certains cas, il est utilisé en plastique après évaluation de la contamination éventuelle par analyse d'un échantillon de contrôle. Dans cette phase, un conservateur (généralement 4% de formol) peut être ajouté à l'échantillon pour éviter la dégradation des organismes du plancton, puis être en mesure d'étudier les abondances des deux paramètres (microplastique et plancton), de reporter leur présence et d'évaluer la quantité de microplastiques dans les organismes quand cela est possible. L'échantillon est stocké dans le conteneur jusqu'à son analyse en laboratoire. Le filet propre peut être utilisé pour un échantillonnage ultérieur.

Etant donné que l'abondance des microplastiques correspond principalement à une unité de volume, les filets sont souvent équipés d'un débitmètre permettant de connaître la quantité d'eau filtrée lors du remorquage. Si le débitmètre n'est pas présent, le calcul de la quantité d'eau filtrée est effectué à partir de données connues, telles que la taille de la bouche collectrice de l'instrument et la longueur du transect, calculées en notant les coordonnées de départ et d'arrivée. Ces informations sont également utiles dans les cas où la couche la plus superficielle de la colonne d'eau est échantillonnée. Il est donc nécessaire de signaler la valeur de l'abondance des microplastiques par unité de surface et non en volume.

Les mailles des filets les plus couramment utilisés sont supérieures à la limite inférieure recommandée de 20  $\mu\text{m}$  ; cela entraîne une sous-estimation du nombre réel de microplastiques présents dans la zone étudiée. Cependant, l'utilisation de mailles avec un maillage approprié (20  $\mu\text{m}$ ) est difficile à appliquer car le filet est sujet à un encrassement qui compromet les opérations d'échantillonnage. En fait, même avec les mailles les plus utilisées (les plus courantes sont des mailles de 333  $\mu\text{m}$ ), il est important de s'assurer que le maillage ne soit pas obstrué et il est recommandé d'éviter les prélèvements pendant les périodes de prolifération des algues. Pour surmonter la sous-estimation de l'abondance des microplastiques, il est possible d'associer au filet un instrument d'échantillonnage différent (par exemple, un instrument d'échantillonnage discret) permettant d'évaluer spécifiquement la fraction de microplastique non retenue par le filet. Si cette stratégie n'est pas ou ne peut pas être utilisée, la sous-estimation doit être prise en compte.

## Prodotto n. T1.2.1

En ce qui concerne la contamination de l'échantillon, le problème des filets est qu'ils sont fabriqués en matière plastique telle que le PVC, ainsi que le collecteur, quand il n'est pas en verre. Le risque de contamination de l'échantillon est donné par le fait que les filets ou le collecteur pourraient libérer une partie du matériau qui les compose par usure ou abrasion lors des opérations de prélèvement. Pour cette raison, il est nécessaire de connaître la nature du matériau composant le filet et le collecteur et de fournir un échantillon de contrôle pour évaluer la contamination. Le risque de contamination est également donné par tous les matériaux avec lesquels le filet entre en contact pendant les procédures de prélèvement, qu'il s'agisse des peintures ou du matériau plastique présent sur la coque du navire ou sur le bateau lui-même ou des instruments utilisés pour transférer l'échantillon du collecteur au conteneur dans lequel il est stocké. En outre, pour éviter la contamination des échantillons, les opérateurs doivent être correctement vêtus, éviter les vêtements synthétiques et porter des gants appropriés, ainsi être sous le vent lors de l'échantillonnage.

Les types de filet les plus couramment utilisés pour l'échantillonnage de microplastiques dans l'eau de mer sont décrits ci-dessous.

### *Filet Neuston*

Les filets de Neuston (Figure 1) sont utilisés pour l'échantillonnage le plancton, mais également pour échantillonner les microplastiques dans la couche de surface de la colonne d'eau. Ils ont été les premiers à être utilisés pour l'échantillonnage de ces derniers.

Le filet simple de Neuston a une ouverture de collecte de forme rectangulaire, un filet conique qui se termine par un collecteur (figure 1a). Un cadre en métal garde la bouche de l'instrument ouverte.

Les autres types de filet Neuston existants, sont des filets conçus à partir du modèle susmentionné. Il s'agit en particulier des filets : Neuston DiSalvo, Neuston catamaran et Neuston acc. David / Hempel modèle 300.

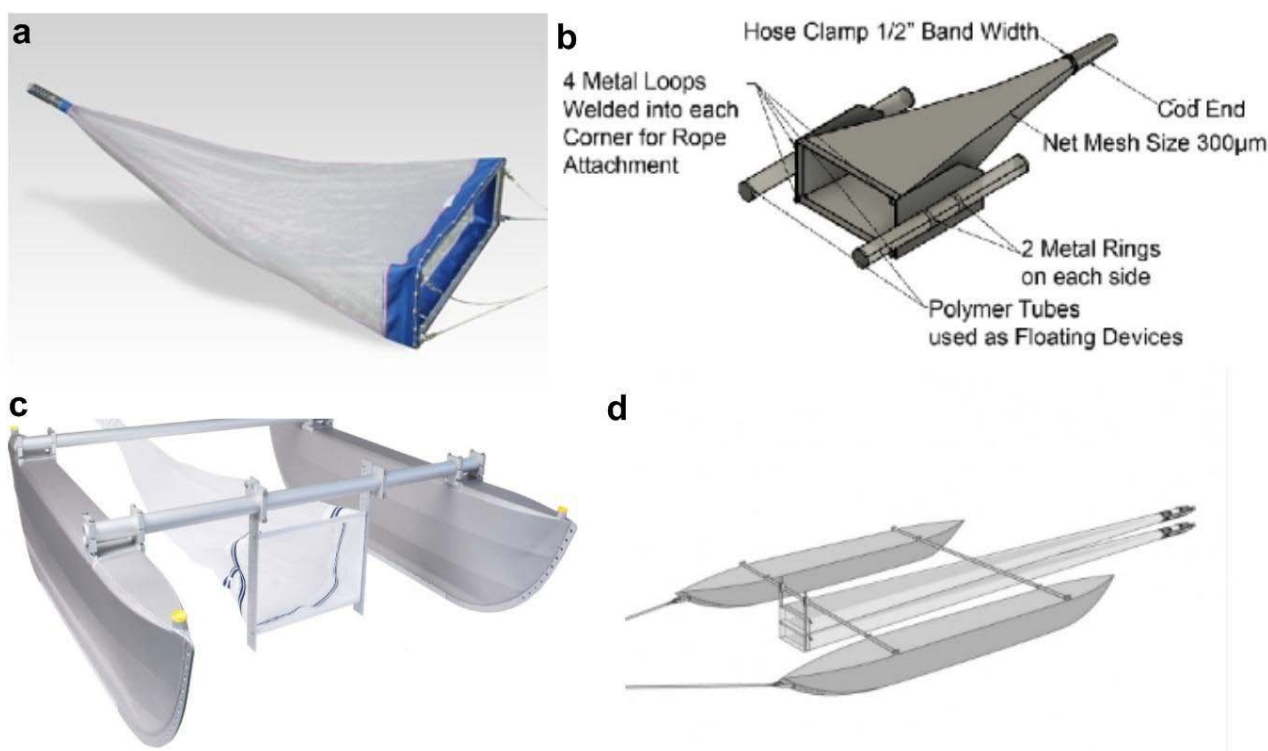
Le filet Neuston DiSalvo (figure 1b) est un filet Neuston avec la bouche rectangulaire de recouvrement de 0,4 m de hauteur et 0,8 m de large et une mailles de 300 microns. Ce filet est équipé de deux tubes soudés latéralement par rapport à l'embouchure du filet qui permettent de maintenir la ligne de flottaison et d'indiquer le niveau d'immersion. Dans des conditions calmes, l'ouverture de l'instrument est réglé pour la mi-hauteur, et permet d'échantillonner une superficie de 0,2 x 0,8 m. Ce filet a été utilisé au Chili dans les années 80 et a été introduit pour la première fois en 1988 par Louis DiSalvo (Eriksen et al. 2018). Le filet catamaran Neuston (Figure 1c) est une ouverture rectangulaire type filet Neuston qui a été couplé à la structure d'un catamaran en aluminium. Le filet reste presque complètement submergé et la structure permet son utilisation même dans des conditions de mer



**Prodotto n. T1.2.1**

agitée (Loder et Gerdts 2015). Il a été spécialement développé pour les échantillonnages de microplastiques. Le filet acc Neuston. David / Hempel Modèle 300 (Figure 1d), par contre, est un filet construit par Neuston spécifiquement pour échantillonner l'épineuston et l'iponeuston. Il se compose de deux filets qui ont une embouchure de ramassage rectangulaire et une maille de 300 microns. Les bouches de collecte sont reliés à la structure d'un catamaran en aluminium qui assure la stabilité de l'appareil et sont positionnées de telle sorte que la couche de surface supérieure échantillonne la surface (épineuston), tandis qu'au-dessous un autre filet échantillonne la couche de sous-surface (iponeuston).

Le tableau 1 répertorie les caractéristiques et les méthodes d'utilisation des filets Neuston Simple et Neuston DiSalvo sur la base des informations contenues dans les différentes études analysées. Les filets Neuston catamaran et Neuston acc. David / Hempel Model 300 n'ont été utilisés dans aucune des études examinées.



**Figura 1.** Filets Neuston; 1a) Filet Neuston simple, source: <http://www.sea-gear.net/neuston-nets.html>; 1b) Rete neuston DiSalvo, source: Eriksen et al. 2018; 1c) Filet Neuston catamaran, source: <https://www.hydrobios.de/product/neuston-katamaran-for-microplastic/>; 1d) Filet Neuston acc. to David/Hempel Model 300, source: <https://www.hydrobios.de/product/neuston-net-acc-to-davidhempel-model-300/>.

**Tableau 1.** Caractéristiques et méthodes d'utilisation des filets Neuston sur la base des informations contenues dans les différentes études analysées.

Mailles du filet ( $\mu\text{m}$ )	Surface/Diam. de la bouche de collecte ( $\text{m}^2$ )	Longueur du filet (m)	Durée du trait (min)	Vitesse du navire (noeud)	Bibliographie
<b>Filet Neuston</b>					
300	0.5		5	1.5	Abayomi 2017
280	0.2		3	1.5	Frias et al. 2014
350	0.6	3	20	2-3	Isobe et al. 2015; Isobe 2016
335	1.2		15	2-4	Reisser et al. 2013
200	0.5		5	1.5-2	Suaria et al. 2016
333	0.1		25-30	2	Zhao et al. 2014
300	0.3	2.2	15-30	2	Eriksen et al. 2018
335	0.4	4			Barrows et al. 2017
300	0.9	1.5	20	3	Gajšt et al. 2016
<b>Filet Neuston DiSalvo</b>					
300	0.3				Eriksen et al. 2018

#### *Filet à plancton*

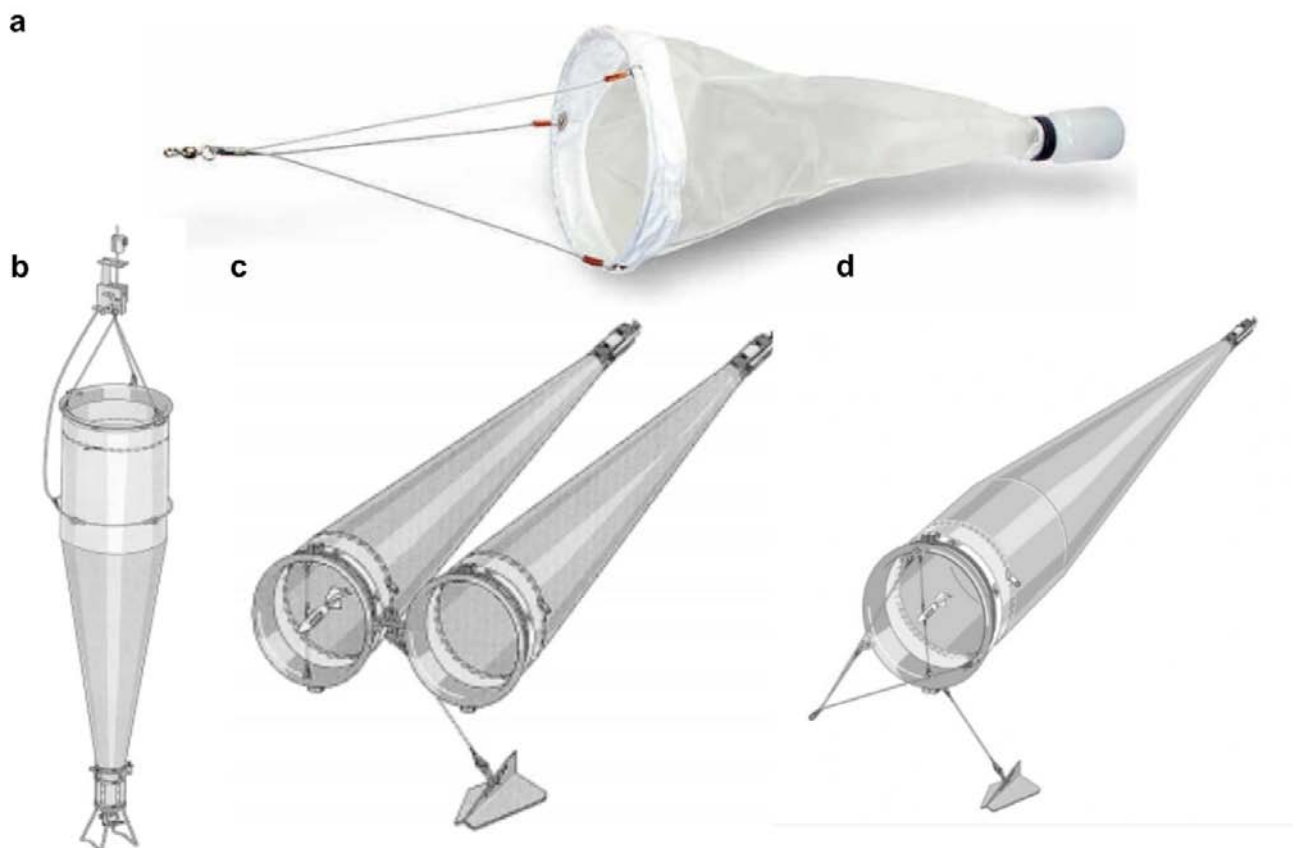
Les filets à plancton sont généralement utilisés pour l'échantillonnage du plancton (phytoplancton et zooplancton; figure 2).

Le filet à plancton simple a une bouche collectrice circulaire et une forme conique (figure 2a). La bouche de collecte est maintenue ouverte par une structure en acier et le filet se termine par un collecteur. Les filets à plancton sont généralement entraînés horizontalement pour obtenir des échantillons de surface. D'autres types de filets à plancton sont utilisés pour l'échantillonnage de microplastiques et sont les suivants: filet à plancton WP2, filet bongo et filet en anneau [filet à anneau; conçu par la California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations (CalCOFI)]. Le filet à plancton WP2 (Figure 2b) est un outil normalement utilisé pour la collecte verticale du zooplancton ; il peut être équipé d'un système de fermeture spécial, activé par un messageur, qui permet l'échantillonnage de la colonne d'eau dans une plage de profondeur prédéterminée. Ce filet a une bouche de collecte circulaire, de longueur et de maillage variable. Dans l'étude des microplastiques, il est remorqué à la fois horizontalement en surface et verticalement du fond à la surface. Le filet bongo (figure 1c) est utilisé pour l'échantillonnage horizontal à une profondeur définie. Il s'agit d'un filet caractérisé par deux

**Prodotto n. T1.2.1**

ouvertures circulaires rigides soudées ensemble, à chacune desquelles un filet est connecté ; ces filets sont remorqués simultanément. Le filet à anneau conçu par CalCOFI (California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations) (figure 1d; Löder et Gerdts 2015) est un filet à plancton pouvant être exploité horizontalement ou obliquement. La bague située à l'ouverture de la bouche de collection de l'instrument est en acier inoxydable d'un diamètre de 1 m ; l'instrument est équipé d'un filet de 4 m de long et a une maille variable. Ce filet doit être utilisé en combinaison avec un dépresseur.

Le tableau 2 répertorie les caractéristiques et les méthodes d'utilisation des filets à plancton, à l'exception du filet à anneau CalCOFI, sur la base des informations contenues dans les études analysées. Le filet à anneau CalCOFI n'a été utilisé dans aucune des études analysées.



**Figura 2.** Filet à Plankton; 2a) Filet à plancton simple, source: <https://scubla.it/it/prodotti/gestione-ambientale/campionamento-plancton-e-macroinvertebrati/retini-plancton-wd-student-detail.html>; 1b) Filet à plancton WP2, source: <http://www.idromarambiente.it/PDF-IT/CAMPIONATORI-PLANKTON-IT.pdf>; 1c) Filet Bongo, source: <http://www.idromarambiente.it/PDF-IT/CAMPIONATORI-PLANKTON-IT.pdf>; 1d) Filet à anneaux CalCOFI, source: <https://www.hydrobios.de/product/ring-trawl-calcofi-net/>.

**Tabella 2.** Caratteristiche e modalità di utilizzo delle reti da plankton sulla base delle informazioni contenute nei diversi studi analizzati.

Mailles du filet ( $\mu\text{m}$ )	Surface/Diam. de la bouche de collecte ( $\text{m}^2$ )	Longueur du filet (m)	Durée du trait (min)	Vitesse du navire (noeud)	Bibliographie
<b>Filet à plancton simple</b>					
150	0.4	1.5	3	1.5	Castro et al. 2016
300			10	3	Gallagher et al. 2016
50	0.2		5		Hall et al. 2015
300	0.6	2	15	2.7	Lima et al. 2014
153			30	3-5	Tsang et al. 2017
200					Cole et al. 2014
500					Cole et al. 2014
120	0.5	2	5-7	1-2	Castillo et al. 2016
<b>Filet à plancton WP2</b>					
200	0.57	2.6	5	2	Aytan et al. 2016
200	0.57		20	1.5-4	Baini et al. 2018
180	0.58		3	1.5	Frias et al. 2014
90	0.57		3	1.5	Gorokhova 2015
200	0.6				Güven et al. 2017
<b>Filet bongo</b>					
500	0.6	15	2-3		Sun et al. 2018

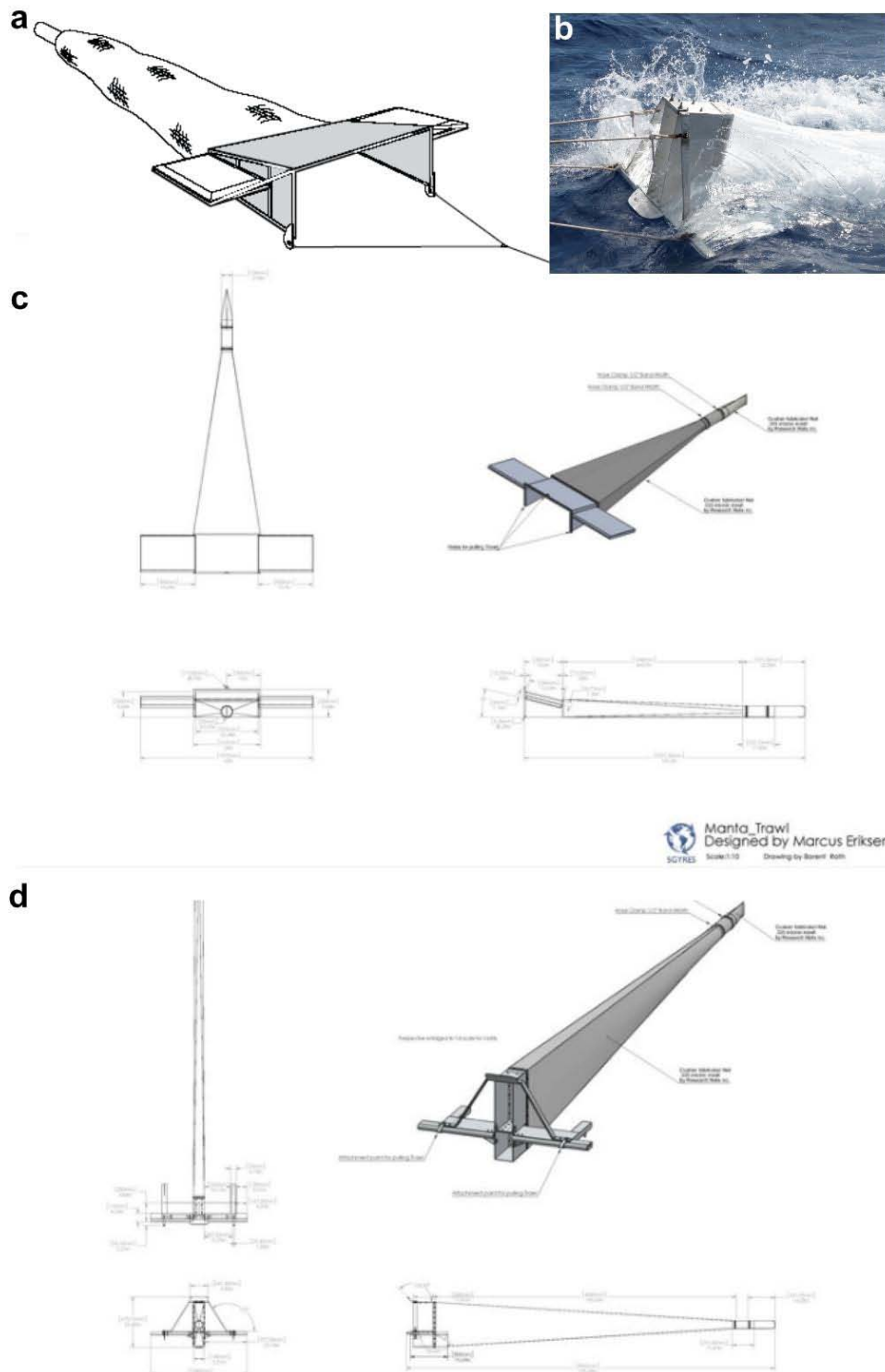
### *Filet Manta*

Les filets Manta (Figure 3) sont utilisés pour obtenir des échantillons superficiels et font partie des filets les plus utilisés dans l'échantillonnage de microplastiques. Le filet simple Manta (Figure 3a) consiste en une bouche de collecte rectangulaire avec deux ailes garantissant la flottabilité, toutes deux en acier. Le filet est connecté à la structure de la bouche de collecte et se termine par un collecteur. Plusieurs types de filets Manta ont été conçus à partir du filet simple Manta. Il s'agit de filets: haut débit, manta, valises et AVANI. Le filet Manta à haute vitesse (figure 3b) est équipé d'une bouche de collecte rectangulaire d'une hauteur supérieure à la largeur: 0,5 m (longueur) et 0,2 (largeur). Cette fonctionnalité permet de remorquer à des vitesses plus élevées que celles normalement utilisées pour d'autres filets Manta

### Prodotto n. T1.2.1

simples. Le filet soudé à la bouche de collecte de l'instrument a une longueur de 4,5 m, une maille de 333  $\mu\text{m}$  et se termine par un collecteur cylindrique. Ce filet permet l'échantillonnage de la couche de surface de la colonne d'eau. Le filet à valises Manta (conçu et réalisé par Marcus Eriksen, 5 Gyres Institute; Figure 3c) présente une ouverture rectangulaire de 0,2 m de haut et de 0,6 m de large; deux ailes amovibles sont reliées à la bouche de collecte de l'instrument. Le filet a une maille de 333  $\mu\text{m}$  et permet l'échantillonnage à l'interface air-eau. Ce filet convient à tous les types de bateaux, pas seulement à ceux océanographiques. Le filet AVANI est un filet Manta avec une hauteur d'ouverture rectangulaire de 0,6 m et une largeur de 0,14 m, divisé en deux compartiments par une plaque d'aluminium (Figure 3d). La plaque d'aluminium est placée dans le même plan que deux skis, reliés latéralement à l'embouchure de l'instrument, qui ont pour fonction de maintenir le filet à la surface lorsqu'il est remorqué, de manière à ce que le compartiment inférieur (hauteur 0,2 m et largeur 0,14 m) reste sous la surface. L'instrument possède également deux grandes ailes orientées vers le haut, des avec des creux à l'intérieur qui facilitent la flottaison et poussent la partie avant vers le haut pendant le remorquage. Le filet, d'une longueur de 4 m, est relié à l'embouchure du collecteur et présente un maillage de 335  $\mu\text{m}$ , il se termine par un collecteur. Le filet est remorqué à l'aide d'outils tels que des "spinnakers", ce qui lui permet d'être déployé sur le côté du navire, à l'abri des influences de la vague d'étrave ou du sillage de poupe susceptibles de compromettre le succès de l'échantillonnage. L'ouverture de la gueule de collecte, d'une hauteur bien supérieure à la longueur, favorise la stabilité de l'ouverture du filet et permet donc d'effectuer des prélèvements à grande vitesse. La structure de ce filet lui permet d'être utilisé même dans les mers agitées. Les vitesses de remorquage sont comprises entre 4 et 6 nœuds, jusqu'à 7 ou 8 avec des conditions de vent adéquates. Il peut être utilisé pendant de longues périodes (par exemple 60 minutes), mais également de manière continue.

Le tableau 3 énumère les caractéristiques et les méthodes d'utilisation des filets Manta sur la base des informations contenues dans les différentes études analysées.



**Figura 3.** Filet Manta; 3a) Filet Manta simple, source: <https://swfsc.noaa.gov/textblock.aspx?Division=FRD&ParentMenuId=213&id=1360>; 3b) Filet Manta haut débit, source: <https://lindseyhoshaw.wordpress.com/page/4/>; 3c) Filet Manta à valises dessiné par Marcus Eriksen, 5 Gyres Institute, source: <http://www.testingourwaters.net/pdfs/>; 3d) Filet AVANI, source: <http://www.testingourwaters.net/pdfs/>.

**Tableau 3.** Caractéristiques et méthodes d'utilisation des filets de plancton sur la base des informations contenues dans les différentes études analysées.

Mailles du filet ( $\mu\text{m}$ )	Surface/Diam. de la bouche de collecte ( $\text{m}^2$ )	Longueur du filet (m)	Durée du trait (min)	Vitesse du navire (noeud)	Bibliographie
<b>Rete Manta</b>					
330	0.1		20	2-3	Baini et al. 2018
333	0.2		15	1-2	Brandon et al. 2016
333	0.1		20	2.5	Collignon et al. 2012
500			20	2	de Lucia et al. 2014
330	0.1		45-90	2.5	Faur et al. 2015
330	0.1	3	10	1.5-2.5	Kang et al. 2015
333	0.2		15	2-4	Reisser et al. 2013
330	0.1		10	2	Song et al. 2014
333	0.1	3	30	2-4	Sutton et al. 2016
333	0.1		15	2	van der Hal et al. 2017
335			60	2	Eriksen et al. 2018
333	0.1				Güven et al. 2017
300	0.1			4	Erni-Cassola et al. 2017
335	0.1	2			Frère et al. 2016
355	0.1	3	30	<3	Sedlak et al. 2017
<b>Rete Manta ad alta velocità</b>					
333	0.1	4.5	60		Maes et al. 2017
<b>Rete suitcase Manta</b>					
333	0.1			1-3	Setälä et al. 2016
<b>Rete AVANI</b>					
335	0.1	4	60	5	Eriksen et al. 2018

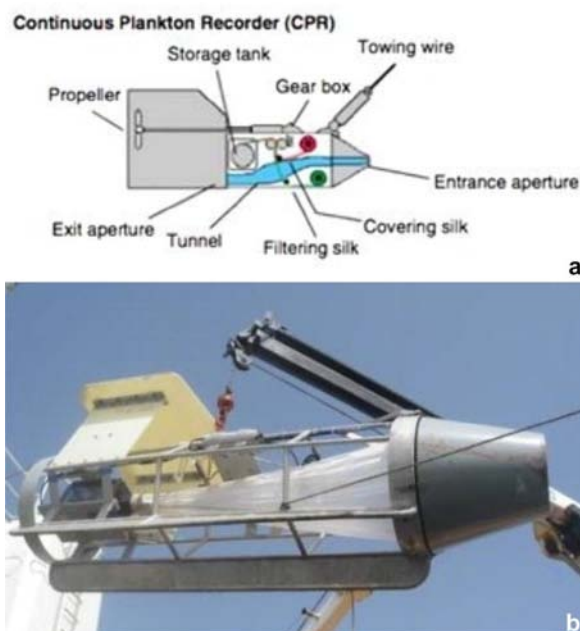
#### *Filet en continu*

Le collecteur de plancton continu (CPR) et le collecteur de plancton Hardy de Longhurst Hardy (LHPR) sont des instruments utilisés à l'origine pour l'échantillonnage du plancton. Ils utilisent des filets et peuvent être utilisés en continu (Figure 4). Le collecteur de plancton continu (CPR, Figure 4a) est un



### Prodotto n. T1.2.1

outil utilisé pour surveiller le plancton, qui est connecté à la coque des navires (océanographique, marchand, croisière, etc.) et permet un échantillonnage continu le long des routes maritimes des navires équipés sans avoir à modifier leur vitesse de croisière ou leur route pour éviter tout dommage à l'instrument, par exemple en raison de l'état de la mer. L'instrument est généralement placé à une profondeur de dix mètres (Thompson et al., 2004) et est équipé d'un filet qui est périodiquement et automatiquement remplacé par un nouveau. En fait, avant de commencer l'échantillonnage, l'instrument est chargé avec une cassette contenant le filet de filtrage, qui est périodiquement remplacée par un système à rouleaux. Le filet substitué est automatiquement enroulé sur un autre rouleau et, une fois l'échantillonnage terminé, la cassette est amenée au laboratoire où le filet est déplié et où les microplastiques et / ou le plancton retenus peuvent être analysés. Le maillage du filet CPR est de 280  $\mu\text{m}$  (Thompson et al., 2004). La structure robuste de l'instrument lui permet d'être utilisé même par mer agitée. Il a été utilisé à des vitesses allant jusqu'à 25 nœuds. Quant au Longhurst Hardy Plankton Recorder (LHPR, figure 4b), il s'agit d'un instrument qui peut être utilisé en permanence. Dans ce cas, le filet est protégé par un châssis cylindrique; cette structure a une partie avant conique connectée au filet qui a une ouverture circulaire. Le filet a une forme conique, se termine par un collecteur relié au cadre et a un maillage variable. Cet outil vous permet d'effectuer un échantillonnage horizontal et vertical.



**Figura 4.** Collecteur Plankton Recorder (CPR), source: <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2015/08/heard-at-the-2015-asm-general-meeting-in-new-orleans-marine-vibrios-and-climate-change.html>; Longhurst Hardy Plankton Recorder (LHPR), source: <http://soki.aq/display/StandMeth/LHPR+-+Longhurst+Hardy+Plankton+Sampler>.

### *Filets Manuels*

Certains filets sont utilisés manuellement pour prélever des échantillons de microplastique. Ces filets ont des ouvertures de collecte circulaires d'un diamètre de 0,2 m et des mailles de 50  $\mu\text{m}$  (Kang et al 2015, Song et al., 2014) ou de 80  $\mu\text{m}$  (Norén 2007). L'échantillonnage a lieu à la surface et l'eau est collectée manuellement avec un récipient (bécher, bouteille, etc.) et versée à l'intérieur du filet afin de la filtrer. La matière retenue par le filet est ensuite collectée dans un conteneur.

### Système de pompage

Les systèmes de pompage représentent des stratégies d'échantillonnage largement utilisées, bien que moins fréquemment que les filets. Ce sont différents types de pompes ou de systèmes de pompage, et dans certains cas, les systèmes de prise d'eau de mer des navires sont également utilisés. Certaines pompes sont abaissées avec un treuil à la fois sur le côté ou derrière le navire. Les systèmes de pompage peuvent être utilisés en continu pendant plusieurs heures ou quelques minutes à chaque station (il n'y a pas de normalisation à cet égard), et permettent d'échantillonner la couche superficielle de la colonne d'eau [à partir de 0,3 m (Zhao et al. 2015; Sedlak et al., 2017) à 6 m (Lusher et al. 2015) en profondeur]. Si les échantillons sont prélevés en continu, la vitesse de remorquage du navire varie de 1 à 12 nœuds (Lusher et al., 2014; Enders et al., 2015). Les systèmes de pompage sont généralement connectés à un système de filtrage qui permet de sélectionner les plastiques de la taille souhaitée : le premier filtre est doté d'une maille de 5 mm pour éliminer tous les plastiques de plus grande taille, tandis que le second est un filtre avec une maille égale à 20  $\mu\text{m}$ . De cette manière, toute la gamme de microplastiques est échantillonnée (Sedlak et al. 2017). Dans certains cas, les mailles de ces filtres peuvent varier: le premier filtre peut avoir une maille de 300  $\mu\text{m}$  et être suivi d'une maille de 10  $\mu\text{m}$  (Lenz et al., 2015); ce dernier peut être remplacé par un filtre à mailles de 50  $\mu\text{m}$  en cas de prolifération d'algues, afin d'éviter tout encrassement (Enders et al., 2015). De plus, il est possible d'utiliser une batterie à tamis qui permet de subdiviser les microplastiques en classes de taille (par exemple, tamis à mailles de 5 mm, 250  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$  et 62,5  $\mu\text{m}$ ; Desforges et al., 2014). Une fois l'échantillonnage terminé, les microplastiques sont placés sur un ou plusieurs filtres scellés afin d'éviter la contamination de l'échantillon. Ils peuvent ainsi être conservés jusqu'au moment de l'analyse en laboratoire. Les systèmes de pompage peuvent être équipés d'un débitmètre permettant de connaître la quantité d'eau filtrée, ce qui est utile pour amener l'abondance ou la masse des microplastiques à l'unité de volume.

### **2.1.2 Outils d'échantillonnage discret**

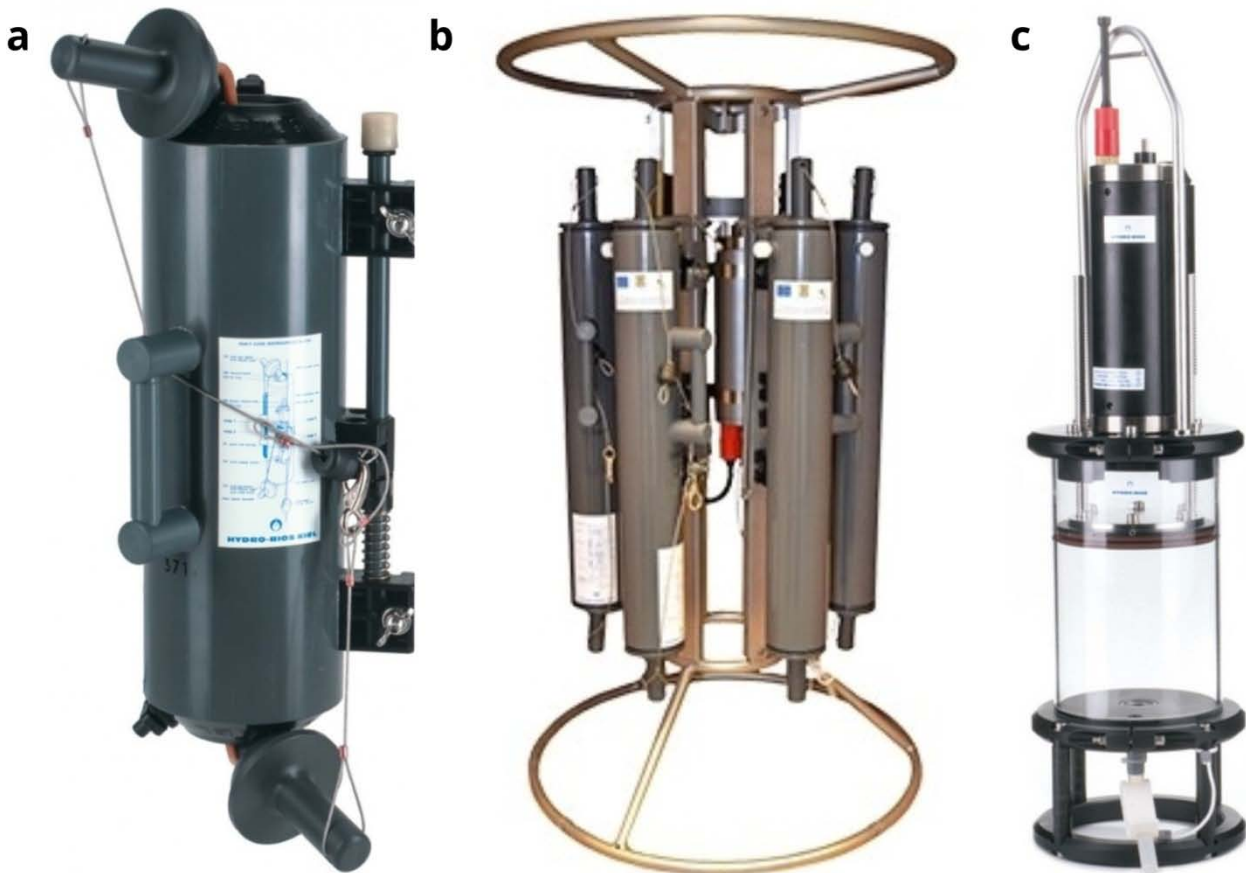
Les outils d'échantillonnage discret sont moins utilisés que les outils non discrets et permettent

### **Prodotto n. T1.2.1**

l'échantillonnage de l'eau à des profondeurs définies. Ce sont principalement des outils déjà utilisés dans l'échantillonnage de l'eau pour l'étude des particules en suspension ou d'autres paramètres et donc déjà connus. Il s'agit en particulier des bouteilles Niskin, Rosette et "Integrated Water Sampler" (IWS). Ces instruments sont abaissés manuellement ou à l'aide d'un treuil jusqu'à la profondeur d'échantillonnage. Plus précisément, la bouteille Niskin et la rosette sont laissées ouvertes et la fermeture se produit une fois que la profondeur d'échantillonnage est atteinte au moyen d'un messenger ou d'un système de verrouillage électronique télécommandé. L'IWS, par contre, est abaissé et est équipé d'un système d'aspiration qui permet de prélever des échantillons à une certaine profondeur ou de les intégrer le long de la colonne d'eau, en prenant de petites quantités d'eau aux profondeurs établies. Une fois l'échantillonnage terminé, ces instruments sont remis à la surface, l'échantillon est transféré dans un conteneur et les instruments à l'intérieur sont correctement rincés à l'eau non contaminée (eau distillée filtrée ou microfiltrée, Milli-Q ou eau ultrapure) pour recueillir l'échantillon toute partie de l'échantillon qui resterait attachée aux parois de l'instrument. L'échantillon est ensuite transporté vers le laboratoire où il peut être analysé pendant que les instruments propres sont prêts pour un nouvel échantillonnage. L'échantillon peut être tamisé à bord avant d'être transporté au laboratoire pour analyse.

Chacun de ces outils a des caractéristiques différentes. Plus précisément, la bouteille Niskin consiste en un cylindre en plastique (généralement en PVC), d'un volume compris généralement entre 5 et 30 litres (Bagaev et al 2018) ; elle a un mécanisme qui la maintient ouverte et contrôle sa fermeture et est connecté à un sommet ou à un câble qui peut être gradué. Le sommet gradué, ou un manomètre mécanique couplé au treuil, permet de définir la profondeur de l'instrument. Une fois la profondeur définie atteinte, la bouteille est fermée à l'aide d'un messenger et l'eau échantillonnée. Grâce à ce mécanisme, la bouteille Niskin permet l'échantillonnage à n'importe quelle profondeur le long de la colonne d'eau. La Rosette est un instrument présentant un cadre en métal auquel sont reliées une série de bouteilles Niskin qui s'abaissent et s'ouvrent simultanément à l'aide d'un treuil. Une sonde avec capteur de pression couplée à la structure métallique permet de définir la profondeur de l'instrument et chaque bouteille Niskin est fermée à distance jusqu'à la profondeur souhaitée. Cet outil permet l'échantillonnage en un seul aller retour fond surface différentes profondeurs. L'échantillonneur d'eau intégré (IWS ; Figure 5c) est un instrument à structure cylindrique permettant l'échantillonnage à différentes profondeurs. En fait, il permet de prélever des échantillons à une profondeur unique ou d'intégrer des échantillons le long de la colonne d'eau grâce à la possibilité de programmer les plages de profondeur à échantillonner. L'instrument est équipé d'un moteur électrique qui entraîne un piston dans un tube transparent, tandis qu'un microprocesseur contrôle la procédure d'échantillonnage en fonction de la profondeur prédéfinie. Un capteur de pression intégré

de haute précision fournit des mesures de profondeur précises. L'alimentation de l'échantillonneur est constituée de batteries rechargeables au lithium.



**Figura 5.** Instruments de prélèvement discret; 5a) Bouteille Niskin; 5b) Rosette, source: <https://marine-research.com/equipment/sampling-devices/>; 5c) Integrated Water Sampler (IWS), source: <https://www.hydrobios.de/product/integrating-water-sampler-iws-iii/>.

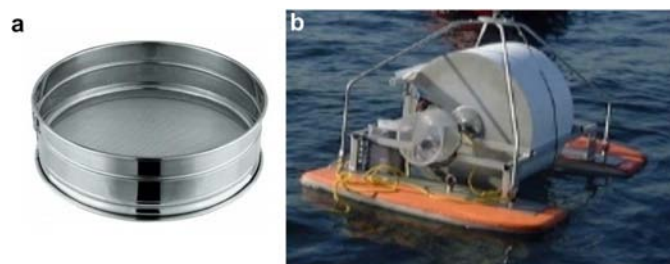
Dans certaines études, un échantillonnage discret manuel de la couche de surface de la colonne d'eau a été réalisé. Les échantillons ont été prélevés en immergeant immédiatement sous la surface différents types de récipients ou de bouteilles.

### 2.1.3 Instruments d'échantillonnage des micro-couches superficielles

Les instruments de prélèvement des micro-couches superficielles de la colonne d'eau permettent d'échantillonner les premiers microns de la colonne d'eau, c'est-à-dire la micro-couche de surface. Ce sont des tamis et es échantillonneur à tambour rotatif (Figure 6). Ces outils sont placés à la surface de l'eau et ont besoin pour leur utilisation de conditions de mer calme sinon l'échantillon ne serait pas représentatif de la micro-couche superficielle. Les tamis sont des outils couramment utilisés pour

### Prodotto n. T1.2.1

l'analyse granulométrique des sédiments, et ils peuvent également être utilisés pour les microplastiques. Le tamis utilisé pour l'échantillonnage des microplastiques est en métal, généralement caractérisé par un diamètre de 20 cm et une maille de 2 mm ; la profondeur d'échantillonnage estimée est comprise entre 150 et 400  $\mu\text{m}$  (Song et al., 2014, 2015; figure 6a). Le tamis est mis en contact avec la surface de la mer, l'eau qui reste emprisonnée dans l'espace des tamis par la tension superficielle est ensuite collectée dans un bac en acier. La procédure est répétée un nombre de fois défini (par exemple, 100 fois, Song et al 2014, 2015). L'eau recueillie dans le plateau est ensuite transférée dans un conteneur pour être transportée au laboratoire où les microplastiques peuvent être analysés. L'échantillonneur à tambour rotatif (figure 6b) est un instrument placé à la surface de la mer, où il commence à échantillonner. Il consiste en un cylindre de verre partiellement immergé et en rotation, présentant une surface hydrophile propre et qui prélève, par force capillaire, l'eau de la micro-couche de surface (de 1 à 1000  $\mu\text{m}$  d'épaisseur; Harvey et Burzell, 1972; Carlson et al., 1988; Hildago-Ruz et al., 2012). Ces instruments d'échantillonnage ne peuvent être utilisés que par mer calme, sinon l'échantillon n'est pas représentatif de la micro-couche de surface de la colonne d'eau.



**Figura 6.** Instrument de prélèvement de la micro-couche de surface; 6a) Tamis; 6b) Rotating drum sampler, source: <https://www.whoi.edu/cruiseplanning/synopsis.do?id=2484>.

#### 2.1.4 Nouveaux outils pour l'étude des microplastiques

Dans le cadre de certains projets et études, des outils d'échantillonnage ad hoc ont été développés pour les microplastiques (Figure 7).

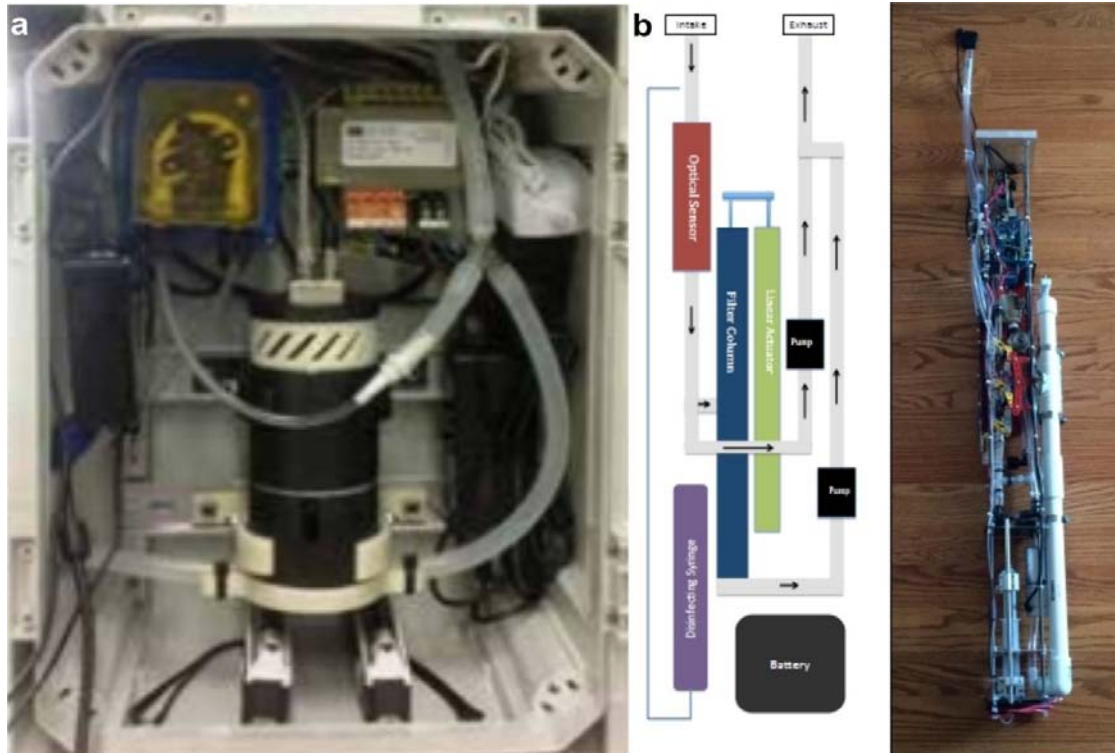
Le projet COMMON SENSE est un projet européen de 40 mois, démarré en novembre 2013 et dirigé par "Acondicionamiento Tarrasense Asociacion Leitat "(Barcelone, Espagne) et 14 partenaires de différents pays. Le projet comprenait la mise au point d'un capteur *in situ* pour la surveillance des microplastiques (Figure 7a). Avec ce capteur, il est possible de quantifier les microplastiques en obtenant des données en temps réel. Le capteur repose sur l'utilisation de techniques de fluorescence couplées à l'acquisition d'images permettant d'obtenir des informations sur les microplastiques. L'instrument dans lequel le capteur est inséré permet de filtrer les échantillons d'eau ; les filtres sont ensuite analysés en laboratoire et permettent de valider les résultats obtenus avec le capteur.

### Prodotto n. T1.2.1

Récemment, un nouvel outil d'échantillonnage de microplastique a été présenté à l'événement RISE: 2015 (recherche, innovation et bourses d'études) de la Northeastern University (Boston, Massachusetts). Cet outil a été conçu par un étudiant (Ethan Edson) avec l'aide du professeur Mark Patterson. L'instrument s'appelle «MantaRay» et permet d'échantillonner les microplastiques à grande échelle et de déterminer leur abondance. Le MantaRay (Figure 7b) est basé sur un système de pompe et fournit des échantillons discrets de microplastiques sur un filtre. Le fonctionnement de l'instrument est décrit brièvement ci-dessous. Initialement, la désinfection du système est effectuée de manière à garantir un échantillon sans contamination, une désinfection est également effectuée à la fin de chaque échantillonnage. Ensuite, l'eau de mer est amenée à s'écouler à l'intérieur de l'instrument à travers une pompe, l'écoulement de l'eau passe à travers un capteur optique: si aucune particule n'est détectée par le capteur (notamment suite à l'interruption du trajet du laser sur le photodétecteur), l'eau continue à être pompée à travers l'instrument ; si le capteur optique détecte la présence de particules, une seconde pompe est activée, tandis que la première s'éteint, interrompant ainsi au flux d'eau d'entrer dans l'instrument. La seconde pompe achemine le flux d'eau contenant les particules détectées à travers une colonne de filtration et un filtre de 500 µm, où les microplastiques sont stockés. Une fois que l'eau a traversé la colonne de filtration, la seconde pompe s'éteint et le système pompe à nouveau.

L'instrument est équipé d'un GPS, d'un débitmètre et peut prélever jusqu'à 28 échantillons microplastiques discrets en filtrant un volume d'eau pouvant être personnalisé. Par conséquent, il est possible de connaître, à chaque point, l'abondance des microplastiques. Les filtres peuvent ensuite être analysés en laboratoire. L'instrument détecte également les valeurs de température de l'eau et de la salinité et présente l'avantage d'être peu coûteux. MantaRay peut être attaché à d'autres instruments tels que les mouillages, les dériveurs ou les véhicules sous-marins autonomes (AUV).





**Figure 7.** Nouveaux outils d'échantillonnage en microplastique; 7a) Prototype du capteur en microplastique développé dans le cadre du projet européen COMMON SENSE (source: <https://www.commonsenseproject.eu/>); 7b) MantaRay (source: Edson e Paterson, 2015).

### 2.1.5 Conservation des échantillons

À la fin de l'échantillonnage, une méthode de conservation des échantillons peut être fournie. Les méthodes de conservation consistent principalement à utiliser du formol à 4%, qui est ajouté à l'échantillon avant d'être scellé pour le transport en laboratoire, et ont pour seul objectif de préserver le composant biologique en vue d'analyses ultérieures en laboratoire. En fait, initialement, des substances telles que le formol ont été ajoutées aux échantillons car l'analyse du composant biologique (phytoplancton et zooplancton) représentait l'objectif principal des études, tandis que les microplastiques ont été analysés mais considérés comme d'importance secondaire. Cependant, ces dernières années, les microplastiques sont devenus le principal objet de nombreuses analyses et les agents de conservation ont commencé à être ajoutés uniquement dans les cas où l'on étudierait également le composant biologique, ou les microplastiques contenus dans les organismes, ou la relation microplastique/zooplanctons. Si les microplastiques constituent le seul paramètre d'intérêt, aucune méthode spéciale de conservation des échantillons n'est requise; dans certains cas, les échantillons sont placés au réfrigérateur ou au congélateur et/ou à l'obscurité.

Le chapitre suivant décrit les méthodologies d'analyse des microplastiques en laboratoire.



### **3 Méthodes d'analyse en laboratoire**

En laboratoire, les échantillons de microplastique peuvent être analysés directement ou nécessitent une ou plusieurs procédures prévoyant la séparation des microplastiques eux-mêmes de l'échantillon d'eau initial. Les échantillons de microplastique observables sur le filtre par des instruments d'échantillonnage peuvent être directement soumis à une classification et à une identification. En ce qui concerne les échantillons dans lesquels les microplastiques sont encore dans la matrice d'eau, une étape de séparation est nécessaire. Les méthodes de séparation peuvent être classées comme suit (Hildago-Ruz et al., 2012).

- Séparation par densité: séparer les microplastiques du reste de l'échantillon en exploitant les propriétés de flottement des microplastiques.
- Filtration: sous vide ou par gravité.
- Tamisage: en utilisant un tamis ou une batterie de tamis.
- Tri visuel: pour séparer les microplastiques des échantillons d'eau à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope.

De plus, différents types de digestion (acide, enzymatique, alcaline et oxydante) de l'échantillon peuvent être mis en oeuvre, ce qui permet de séparer les microplastiques du matériel biologique présent dans l'échantillon.

Outre à bord du navire, il convient également de prêter attention à la contamination éventuelle des échantillons de microplastique au laboratoire. À cet égard, tous les équipements doivent être en matériau non plastique, les vêtements de l'opérateur effectuant les analyses doivent être en coton, les matériaux synthétiques doivent être évités et les gants appropriés doivent être portés. De plus, il faut faire attention à la pollution de l'air pendant les procédures d'analyse : un filtre blanc peut être laissé dans l'air pendant toute la durée de l'analyse afin d'évaluer le dépôt possible de microplastiques susceptibles d'avoir également contaminé l'échantillon. Enfin, il est possible de soumettre un échantillon d'eau non contaminé (échantillon de contrôle) à la même procédure que les échantillons de microplastique afin d'évaluer la contamination possible pendant les procédures de laboratoire.

Les méthodes de séparation des microplastiques de l'échantillon d'eau initial sont répertoriées ci-dessous.

#### **3.1 Séparation par densité**

La séparation par densité des microplastiques de l'eau de mer implique l'utilisation de différentes solutions permettant de flotter les microplastiques pouvant être éliminés. Tout d'abord, l'échantillon

### Prodotto n. T1.2.1

est suspendu ou remis en suspension (s'il a été préalablement tamisé) dans une solution de sel sursaturée (NaCl); ensuite, il est agité manuellement pendant plusieurs minutes et laissé au repos pendant une courte période (30 minutes, 1 heure) ou pour des périodes plus longues (par exemple, une nuit). Ensuite, le surnageant, contenant les microplastiques, est recueilli et transféré dans une boîte de Pétri en verre ou directement filtré. Les microplastiques peuvent alors être classés et identifiés au microscope.

Les solutions de NaCl sont les plus utilisées, également pour leur rapport coût-efficacité. D'autres méthodes de séparation par densité impliquent l'utilisation de chlorure de zinc (ZnCl<sub>2</sub>) ou l'utilisation d'agents tensioactifs tels que des solutions de sodium lauryl sulfate (SDS).

## 3.2 Filtrations

La filtration est une méthode de séparation utilisée pour séparer les microplastiques de l'eau dans laquelle ils sont immergés. Les filtres utilisés sont de différents types : polycarbonate, polyamide, nylon, fibre de verre, acétate de cellulose et nitrate de cellulose. Les dimensions varient de 45 mm à 47 mm de diamètre; dans certains cas, du papier filtre est utilisé, tandis que la porosité varie de 0,7 µm (Tsang et al., 2017) à 300 µm (Setälä et al., 2016). Les filtres les plus utilisés sont quadrillés pour faciliter l'identification ultérieure des microplastiques.

La filtration peut être directe ou précédée d'autres traitements. La filtration directe nécessite que l'échantillon d'eau soit filtré directement sans traitement préalable. La filtration peut être précédée d'un tamisage. Dans ce cas, les échantillons de microplastique retenus par les tamis sont filtrés avec l'eau utilisée pour les extraire des tamis eux-mêmes (eau distillée filtrée, eau microfiltrée, eau Milli-Q, eau ultrapure pour éliminer le tamis) pour éviter le risque de contamination. De plus, la filtration de l'échantillon peut être précédée d'une phase au cours de laquelle l'échantillon est laissé se reposer et se déposer, après quoi le surnageant est filtré tandis que le matériau déposé est tamisé et filtré ultérieurement. La filtration des échantillons est effectuée par gravité ou à l'aide d'une pompe à vide. Lors de la dernière phase de filtration, les filtres peuvent être rincés avec de l'eau non contaminé (eau distillée filtrée, microfiltrée, Milli-Q ou ultrapure) afin d'éliminer le risque de formation de cristaux de sel après séchage. Les filtres sont ensuite stockés dans des boîtes de Pétri en verre préalablement nettoyées et, dans certains cas, ils sont séchés à l'étuve ou dans un dessiccateur (40-70 ° C) ou à la température ambiante. Les filtres secs peuvent être pesés pour déterminer la masse des microplastiques, en connaissant la tare de filtre déterminée précédemment.

Les microplastiques sur les filtres peuvent ensuite être classés et identifiés.

### **3.3 Tamisage**

Le tamisage permet de séparer les microplastiques de l'eau de mer au moyen d'un ou plusieurs tamis métalliques. Le tamisage peut être effectué via un tamis unique ou à travers une batterie de tamis ; dans ce dernier cas, les microplastiques sont également divisés en classes de taille. Les mailles des tamis utilisés sont de types différents et dépendent de l'objet du tamisage: sélection de la plage de taille des microplastiques (20 µm-5 mm), élimination d'une certaine fraction de matières plastiques ou subdivision en classes de taille. Plus précisément, deux tamis peuvent être utilisés avec des mailles de manière à sélectionner les plastiques de la taille souhaitée; dans le cas de l'échantillonnage avec les filets, le tamis a le même maillage que le filet utilisé lors de l'échantillonnage. Un seul tamis à mailles de 5 mm élimine la fraction de plastique plus gros (ou autre matériau). Un tamis avec un maillage de 1 ou 2 mm peut être utilisé pour subdiviser l'échantillon de microplastique en deux classes de taille : les microplastiques retenus par le tamis sont soumis à un tri visuel (paragraphe suivant), tandis que les non retenus sont filtrés (paragraphe précédent). Enfin, les batteries à tamis permettent de subdiviser les microplastiques en classes de taille. Le tamisage peut également avoir lieu sur des échantillons de microplastiques préalablement séparés de la matrice d'eau, pour les subdiviser à nouveau en classes de taille. Le tamisage de l'échantillon d'eau peut être effectué directement à bord ou en laboratoire. Dans les deux cas, les échantillons d'eau sont inversés sur le tamis ou la batterie de tamis et les échantillons sont lavés avec de l'eau non contaminé (eau distillée filtrée, microfiltrée, Milli-Q ou ultrapure). Une fois le tamisage terminé, les tamis sont soigneusement rincés afin de ne pas perdre les microplastiques fixés aux murs, les microplastiques présents sur chaque tamis sont ensuite placés à l'intérieur de boîtes de Pétri ou filtrés avec de l'eau de rinçage. Les microplastiques sur les filtres ou dans les boîtes de Pétri peuvent être séchés au four ou dans un séchoir (40-70 ° C), puis classés et identifiés.

### **3.4 Tri visuel**

Le tri visuel est une technique utilisée pour séparer les microplastiques du reste de l'échantillon d'eau (débris et matière organique) à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope. Le tri visuel est généralement effectué en laboratoire mais, dans certains cas, même à bord du navire. Au laboratoire, l'échantillon d'eau est progressivement introduit dans des boîtes de Pétri, lesquelles sont analysées visuellement par un ou plusieurs opérateurs. Ceux-ci recueillent les microplastiques à l'aide de pinces métalliques et les placent dans des récipients en verre (par exemple, des flacons) ou sur du papier filtre pour une identification ultérieure. Les microplastiques prélevés peuvent être séchés dans un four ou dans un séchoir (40-70 °C) et peuvent être pesés. Lors du tri, les microplastiques peuvent également être divisés en différents contenants en fonction de l'une de leurs caractéristiques telles que: type (pastille,

## Prodotto n. T1.2.1

fragment, etc.), forme (sphères, fragments, etc.) ou couleur. Un tri visuel peut être effectué avant de filtrer ou de tamiser les échantillons pour éliminer les microplastiques de plus de 5 mm qui deviennent visibles ou après le tamisage des échantillons, dans ce cas les microplastiques retenus par le tamis (ou par les tamis, si nécessaire), ils peuvent être placés dans des récipients en verre ou sur du papier filtre. Comme les microplastiques de plus petite taille (<1 à 2 mm) sont difficilement observables à l'œil nu et que les microplastiques de taille micrométrique sont difficiles à observer même avec un bon grossissement microscopique, cette technique de séparation présente le risque de ne pas échantillonner l'ensemble des microplastiques constituant un échantillon. Pour réduire les erreurs, le tri visuel d'un échantillon est souvent effectué par plusieurs opérateurs, de préférence des experts.

### 3.5 La digestion

La digestion est une technique utilisée pour séparer les microplastiques de la matière organique présente sur l'échantillon. Il existe plusieurs types de digestion: acide, enzymatique, alcaline et oxydante qui peuvent également être utilisés en combinaison. L'échantillon est soumis à une digestion après séparation des microplastiques de la matrice aqueuse. La digestion est souvent associée à la séparation par densité : la matière organique flottante, qui est assimilée aux microplastiques, est ensuite digérée pour être nettoyés. Les substances les plus utilisées pour la digestion de la matière organique sont le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à différents volumes (30% plus de volume utilisé), le peroxyde d'hydrogène en combinaison avec un catalyseur tel que le sulfate ferreux ( $FeSO_4$ ), l'acide chlorhydrique (HCl) ou de fluorure d'hydrogène (HF), l'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'hydroxyde de potassium (KOH; Cole et al 2014), et plusieurs types d'enzymes telle que la plus commune la protéinase-K. Les substances utilisées dans la digestion des matières organiques peuvent également être utilisés en combinaison, tels que  $H_2O_2$  30% suivi d'un traitement de l'échantillon avec du HF à 40% (Dubai et Liebezeit, 2013), ou par traitement avec HCl à 37% suivi d'un traitement avec  $H_2O_2$  50% (une période de sept jours à la température ambiante), suivi à son tour par un traitement à l'hypochlorite de sodium 9-14% (NaClO, pendant 24 heures à température ambiante; Tamminga et al 2018). Le procédé d'oxydation humide au peroxyde (WPO) peut également être utilisé pour éliminer les matières organiques. Une fois la digestion terminée, les microplastiques peuvent être classés et identifiés.

La digestion acide, qui prévoit l'utilisation d'acides forts tels que HCl et HF présente un inconvénient, en effet, ces acides peuvent porter atteinte à l'intégrité structurelle du présent microplastique dans l'échantillon.

La digestion de la matière organique permet également d'étudier le microplastique présent dans les organismes du plancton.

## **4 Techniques d'identification**

Les techniques d'identification microplastique peuvent être classées en deux catégories:

- Techniques d'identification visuelle impliquant la classification et l'identification de microplastiques à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope. Différents types de tests impliquant la combustion des échantillons (test de fusion, test de fusion, test à l'aiguille chaude) peuvent être exploités pendant le tri visuel afin de s'assurer que la particule observée est réellement en matière plastique;
- Techniques d'analyse (spectroscopie, chromatographie en phase gazeuse, etc.) faisant appel à divers outils, généralement utilisés en chimie analytique, pour l'identification des microplastiques et du polymère qui les compose.

### **4.1 Techniques d'identification visuelle**

La technique d'identification visuelle a été la première technique utilisée pour la classification et l'identification des microplastiques. Elle est réalisée sur des échantillons stockés sur filtre, dans des boîtes de Pétri ou à l'intérieur de récipients, et elle est réalisée à l'œil nu ou avec l'aide d'un microscope. Les microscopes utilisés sont de types différents: fluorescence, dissection, optique, électronique, stéréo, binoculaire, inversé et vertical. Les grossissements utilisés pour identifier les microplastiques vont de 4,5X (MERI 2017) à 400X (Norén 2007). Pour la classification et l'identification des microplastiques, le microscope électronique à balayage (MEB) peut également être utilisé, ce qui est plus précis dans la discrimination de ces polluants en raison de la haute résolution, même s'il ne permet pas de distinguer la couleur. Les microscopes peuvent être équipés d'une caméra. Ainsi, les microplastiques peuvent être photographiés et analysés même plus tard.

Comme les microplastiques de plus petite taille (<1 à 2 mm) sont difficilement observables à l'œil nu et que les microplastiques de taille micrométrique sont difficilement observables même avec un bon grossissement microscopique, avec la technique de tri visuel il y a le risque de ne pas observer tous les microplastiques constituant un échantillon et/ou de classer comme particules des particules également composées d'autres matériaux. À cet égard, l'analyse d'un échantillon par plusieurs opérateurs et leur expérience jouent un rôle important dans la réduction de l'erreur. De plus, trois critères ont été établis pour distinguer les microplastiques en particulier du matériel biologique (Hildago-Ruz et al., 2012; MERI 2017; Norén 2007):

1. Aucune structure cellulaire évidente ne doit être présente sur la particule observée.
2. Les fibres observées doivent être également épaisses sur toute leur longueur.
3. Les particules observées doivent présenter des couleurs claires et homogènes.

Plusieurs tests peuvent être effectués pour s'assurer que la particule observée est bien en plastique: test de fusion (melting test) et test à l'aiguille chaude. Ces tests impliquent la combustion de la particule observée. Ils entraînent donc la dégradation ou la perte de la particule observée. Pour cette raison, ces tests sont effectués exclusivement sur des particules de nature douteuse. Plus précisément, le test de fusion assure en fait la fusion de la particule qui est placée sous la flamme : si la particule fond, cela confirme sa nature plastique. Le test de fusion implique la combustion de l'échantillon ; le test à l'aiguille chaude (hot needle test) permet également de brûler la particule avec une aiguille préalablement portée à des températures élevées. S'il s'agit de matière plastique, les particules brûlées fondent ou se recourbent, tandis que les particules biologiques ne subissent pas de déformations similaires ; de cette façon, il est possible de faire une distinction.

Dans le cas d'échantillons soumis à une filtration, les filtres utilisés pour les échantillons de microplastique sont généralement quadrillés, afin de faciliter l'analyse visuelle, en particulier sous un microscope. La zone à analyser est la zone dite de filtration, c'est-à-dire la zone dans laquelle le filtre a été traversé par l'eau, et se distingue des différentes couleurs (marron, beige, etc., MERI 2017) par rapport au blanc du filtre. Si le filtre se courbe après le séchage, il est possible de le coller sur la boîte de Pétri pour faciliter la visualisation des microplastiques au microscope. Enfin, il est conseillé d'analyser chaque carré de la zone de filtration en suivant un tracé en forme de S (à partir du carré supérieur droit de la première ligne du haut) qui touche tous les carrés de chaque ligne (MERI 2017). De cette manière, on évite de considérer plusieurs fois un même microplastique.

Les microscopes peuvent être couplés aux outils d'analyse comme indiqué dans le paragraphe suivant.

## **4.2 Techniques d'analyse**

Les techniques analytiques sont des techniques qui sont apparues après les techniques de tri visuel et impliquent l'utilisation de différents types d'instruments, couramment utilisés en chimie analytique, pour établir avec certitude si une particule est en plastique. En outre, ils permettent d'identifier le polymère composant chaque microplastique. Pour l'identification des microplastiques, différentes techniques d'analyse et différents instruments sont utilisés (tableau 4): les techniques les plus courantes sont la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la spectroscopie Raman. Les microplastiques peuvent être analysés individuellement ou sur filtre (en prêtant attention au matériau constituant le filtre).

En ce qui concerne les techniques d'analyse spectroscopique, les instruments peuvent être couplés à des microscopes: micro-FTIR, micro-Raman et Focal Plane Array (FPA). Dans ces cas, les échantillons analysés se trouvent généralement sur un filtre. Ces outils sont de plus en plus utilisés car ils

## Prodotto n. T1.2.1

permettent d'identifier de petits microplastiques difficiles à identifier à l'œil nu. En fait, les instruments sans microscopes sont limités par le fait que les microplastiques qui ne sont pas visibles à l'œil nu, et qui ne peuvent donc pas être pris avec une pince à épiler, ne peuvent pas être analysés. En effet, chaque microplastique, à identifier sans l'aide d'un microscope, doit être pris avec une pince à épiler en métal et placé dans la section appropriée de l'instrument à analyser.

Certaines techniques entraînent la destruction de l'échantillon. Il s'agit de techniques qui exploitent les propriétés de stabilité thermique des polymères microplastiques et qui, pour les identifier, analysent les produits de dégradation thermique, telles que la pyrolyse analytique couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (Py-GC-MS), technique d'extraction thermique et de désorption couplée à la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (TED-GC-MS), et analyse thermogravimétrique couplée à la calorimétrie à balayage différentiel (TGA\_DSC). Contrairement à d'autres techniques, TED-GC-MS permet d'identifier les polymères directement dans des échantillons environnementaux, sans tri préalable ni préparation des échantillons. Cette méthode associe une analyse thermogravimétrique couplée à une extraction en phase solide (TGA-SPE) et à une chromatographie en phase gazeuse à désorption thermique (TDS-GC-MS). L'échantillon environnemental, comprenant un composant inorganique, des microplastiques et d'autres matériaux, est placé dans un creuset et chauffé dans des conditions inertes: les produits sont absorbés sur un substrat d'extraction, puis désorbés thermiquement dans un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse.

Toutes ces techniques analytiques fournissent un spectre ou un chromatogramme pour chaque particule analysée, qui est ensuite comparé aux spectres de référence contenus dans des banques de données, c'est-à-dire des bases de données dans lesquelles les spectres de différents polymères sont enregistrés. De cette manière, il est possible d'établir si une particule est en matière plastique de manière univoque (le résultat n'est pas le résultat de la décision d'un opérateur) et il est possible de connaître la nature du polymère qui la constitue.

Pour faciliter l'identification des microplastiques, il est possible d'utiliser un colorant artificiel: le Red Nile (Nile Red) qui est le colorant fluorescent le plus couramment utilisé.

Les techniques analytiques nécessitent toutefois des temps d'analyse longs, car les microplastiques sont analysés un par un et cela est coûteux. Pour ces raisons, de nouvelles méthodes d'identification automatique sont en cours de développement, comme celle proposée par Frère et al. (2016) : balayage semi-automatique des particules et spectroscopie micro-Raman permettant l'analyse automatique des particules de plastique.

Comme il a été mentionné, il ne s'agit pas d'analyses économiques, dans la plupart des études, tous les



## Prodotto n. T1.2.1

microplastiques pris ne sont pas identifiées par des techniques analytiques, mais le plus souvent, un sous-ensemble représentatif de l'ensemble de l'échantillon est analysé. Les résultats sont ensuite étendus statistiquement à tout l'échantillon.

Les techniques analytiques sont les seules techniques qui nous permettent de savoir avec certitude si les particules observées sont ou non composées de matière plastique. Actuellement, il est nécessaire de prévoir l'identification d'au moins un sous-ensemble de microplastiques à l'aide de techniques analytiques afin de pouvoir envisager une étude réellement représentative. En fait, l'erreur commise en identifiant les microplastiques uniquement avec des techniques de tri visuel est grande, comme le prouve l'avènement des techniques analytiques qui ont révélé que la plupart des particules définies comme des microplastiques étaient en réalité constituées d'un autre matériau.

**Tableau 4. Techniques d'analyse permettant d'identifier les microplastiques dans l'eau de mer.**

Technique analytique	abréviation	Bibliographie
Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier	FT-IR	Abayomi et al. 2017; Bains et al. 2018; Cincinelli et al. 2017; Cole et al. 2014; Gallagher et al. 2016; Güven et al. 2017; Isobe 2016; Isobe et al. 2015; Leslie et al. 2011; Lusher et al. 2015; Reisser et al. 2013; Stöhr 2016; Song et al. 2015.
Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en combinaison avec la microscopie optique	micro-FT-IR	Frias et al. 2014; Kang et al. 2015; Song et al. 2014; Sun et al. 2018; Syakti 2017.
Spectrophotométrie infrarouge transformée par Fourier en réflectance atténuée totale	ATR FTIR	Brandon et al. 2016; Castillo et al. 2016 ; Castro et al. 2016; Hall et al. 2015; Mintenig et al. 2017; Palatinus et al. 2015; Suaria et al. 2016; Syakti 2017; Syakti et al. 2017; Tsang et al. 2017; Viršek et al. 2016.
Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier à réflectance totale atténuée en combinaison avec la microscopie optique	micro-ATR FTIR	Palatinus et al. 2015; Viršek et al. 2016.

Réseau de plans focaux micro-FTIR	FPA micro-FTIR	Mintenig et al. 2017; Primpke et al. 2017.
Spectroscopie proche infrarouge	FT-NIR	Abayomi et al. 2017; Gajšt et al. 2016.
Spectroscopie Raman		Leslie et al. 2011; Sedlak et al. 2017.
Spectroscopie Raman en combinaison avec la microscopie optique	Spettroscopia micro-Raman	Enders et al. 2015; Erni-Cassola et al. 2017; Lenz et al. 2015; Zhao et al. 2015.
Scanner de particules semi-automatique associé à la spectroscopie micro-Raman		Frère et al. 2016.
Extraction et désorption thermique couplées à la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse	TED-GC-MS	Dümichen et al. 2015.
Analyse thermogravimétrique couplée à la calorimétrie à balayage différentiel	TGA-DSC	Majewsky et al. 2016.
Pyrolyse analytique couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse	Py-GC-MS	Syakti 2017.

## 5 Restitution des résultats

### 5.1 Classification des microplastiques

La classification des microplastiques a lieu sur la base de différentes caractéristiques morphologiques: type (fragments, pellets, fibres, film plastique, plastique expansé, granulés, polystyrène), forme (cylindrique, disque, plat, ovoïde, sphère, arrondi, sous-arrondi, subangulaire, angulaire, irrégulier, allongé, dégradé, rugueux et avec des bords brisés), couleur (transparent, cristallin, blanc, crème, rouge, orange, bleu, opaque, noir, gris, marron, vert, rose, couleur cuivrée, jaune ), taille et type de polymère (Galgani et al., 2013). Les microplastiques peuvent être divisés en classes de taille ou mesurés manuellement ou avec un logiciel couplé à des microscopes. Les différentes études utilisent des classifications légèrement différentes les unes des autres et pour cette raison, elles ne sont souvent pas comparables.

### 5.2 Abondance et concentration de microplastiques

Les résultats obtenus peuvent être rapportés en termes d'abondance ou de concentration de microplastiques dans l'eau de mer. L'abondance des microplastiques peut être ramenée à l'unité de surface (nbr de microplastique / m<sup>2</sup> ou nbr de microplastique / km<sup>2</sup>) ou à l'unité de volume (nbr de microplastique / m<sup>3</sup> ou nbr de microplastique / km<sup>3</sup>). Le premier cas s'applique aux instruments qui échantillonnent la couche de surface de la mer : il est nécessaire de connaître les dimensions de la bouche collectrice de l'instrument et l'espace parcouru (coordonnées de départ et d'arrivée). Dans le second cas, il est nécessaire de connaître la quantité d'eau filtrée ou échantillonnée. La concentration en microplastiques peut également être estimée à partir du poids des microplastiques échantillonnés et est également rapportée à l'unité de surface ou de volume. Dans ce cas, le poids des microplastiques est compris comme le poids sec de l'échantillon de microplastique.

## **6 Conclusions**

Les stratégies d'échantillonnage, les analyses de laboratoire et l'identification des microplastiques sont nombreuses et il est évident qu'il n'y a pas de normalisation des procédures. De plus, l'utilisation de différentes techniques rend difficile la comparaison de différentes études. Il devient donc évident que le partage d'outils et de méthodes est nécessaire pour obtenir des résultats comparables.

L'échantillonnage et l'analyse des microplastiques sont effectués à l'aide d'instruments de terrain et de laboratoire déjà disponibles et principalement utilisés pour l'étude d'autres paramètres océanographiques. Ces instruments sont ensuite ré-adaptés à l'étude des microplastiques pour lesquels un système d'échantillonnage et d'analyse *ad hoc* n'est pas encore prévu. La conception, la mise en œuvre et l'application d'outils de nouvelle génération pourraient permettre de résoudre les problèmes liés aux instruments utilisés et aux méthodes utilisées jusqu'à présent (contamination, échantillonnage partiel de l'ensemble de la plage microplastique, perte d'une partie de l'échantillon, etc.).

En outre, bien que la limite dimensionnelle des microplastiques soit définie à 20  $\mu\text{m}$ , il n'existe pas de limite dimensionnelle inférieure standard au niveau global. En fait, dans les différentes études, différentes limites inférieures sont considérées en fonction de l'échantillonnage et des instruments de laboratoire utilisés. Par exemple, en fait, les filets sont les outils d'échantillonnage les plus largement utilisés, mais comme il s'agit d'outils conçus et couramment utilisés à d'autres fins, ils ne disposent pas de suffisamment de mailles pour échantillonner les dimensions minimales des microplastiques (20  $\mu\text{m}$ ). Cependant, l'utilisation d'un maillage de 20  $\mu\text{m}$  est difficilement réalisable en raison de la facilité avec laquelle le filet s'obstrue, en raison, par exemple, d'organismes planctoniques.

En outre, l'utilisation d'outils créés à l'origine pour d'autres objectifs introduit le problème de la contamination des échantillons. Par exemple, les filets sont généralement en matière plastique, ce qui peut donc polluer l'échantillon étudié. Le risque de contamination des échantillons doit donc être limité par la mise en œuvre de diverses précautions. Dans ce cas, des échantillons de contrôle doivent être préparés et soumis aux mêmes procédures que les échantillons de microplastique afin d'évaluer la contamination des échantillons au cours des procédures de prélèvement et d'analyse.

Ces dernières années, on a eu tendance à étudier et à créer de nouveaux instruments et capteurs spécifiques pour l'échantillonnage de microplastiques, mais ils restent au niveau du prototype et ne sont pas reconnus au niveau mondial et ne sont donc pas commercialisés. Pour cette raison, la tendance est d'exploiter les instruments existants et de les adapter à l'étude des microplastiques.

En ce qui concerne les procédures d'analyse en laboratoire, la filtration est la plus utilisée. Les systèmes d'identification sont différents, mais les techniques analytiques sont celles qui permettent une

### **Prodotto n. T1.2.1**

meilleure qualité des données, car elles permettent d'identifier avec certitude la nature plastique réelle d'une particule ainsi que le polymère qui la compose. Au contraire, l'analyse visuelle dépend de l'interprétation des opérateurs qui effectuent les analyses, et de nombreuses études récentes analysant les particules à l'aide de techniques analytiques ont montré combien de particules identifiées par l'opérateur comme des matières plastiques étaient en réalité composées d'autres matériaux. Les techniques analytiques sont très coûteuses et, dans la plupart des cas, ces analyses ne sont pas effectuées sur tous les microplastiques échantillonnés, mais uniquement sur une partie aliquote de ceux-ci. Compte tenu de l'erreur due à l'analyse visuelle, il est conseillé d'utiliser des techniques analytiques sur un sous-ensemble d'échantillons aussi représentatif que possible de l'échantillon total, afin de valider les résultats obtenus à partir de l'analyse visuelle.

## **Bibliographie**

- Abayomi OA, Range P, Al-Ghouti MA, Obbard JP, Almeer SH, Ben-Hamadou R (2017). Microplastics in coastal environments of the Arabian Gulf. *Marine Pollution bulletin* 124: 181-188.
- Aytan U, Valente A, Senturk Y, Usta R, Sahin FBE, Mazlum RE, Agirbas E (2016). First evaluation of neustonic microplastics in Black Sea waters. *Marine Environmental Research* 119: 22-30.
- Arthur C, Baker J, Bamford H (Eds.) (2009). *Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris*. NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30.
- Bagaev A, Khatmullina L, Chubarenko I (2018). Anthropogenic microlitter in the Baltic Sea water column. *Marine Pollution Bulletin* 129: 918-923. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.049>.
- Baini M, Fossi MC, Galli M, Caliani I, Campani T, Finoia G, Panti C (2018). Abundance and characterization of microplastics in the coastal waters of Tuscany (Italy): the application of the MSFD monitoring protocol in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 133: 543-552.
- Barrows APW, Neumann CA, Berger ML, Shaw SD (2017). Grab vs. neuston tow net: a microplastic sampling performance comparison and possible advances in the field. *Analytical Methods* 9: 1446.
- Brandon J, Goldstein M, Ohman MD (2016). Long-term aging and degradation of microplastic particles: comparing in situ oceanic and experimental weathering patterns. *Marine Pollution Bulletin* 110: 299-308.
- Carlson DJ, Cullen JL, Cantey JJ (1988). Description of and results from a new surface microlayer sampling device. *Deep-Sea Research, Part A*, 35: 1205-1213.
- Castillo AB, Al-Maslamani I, Obbard JP (2016). Prevalence of microplastics in the marine waters of Qatar. *Marine Pollution Bulletin* 111: 260-267.
- Castro RO, Silva ML, Marques MRC, de Araújo FV (2016). Evaluation of microplastics in Jurujuba Cove, Niterói, RJ, Brazil, an area of mussels farming. *Marine Pollution Bulletin* 110: 555-558.
- Cincinelli A, Scopetani C, Chelazzi D, Lombardini E, Martellini T, Katsoyiannis A, Fossi MC, Corsolini S (2017). Microplastic in the surface waters of Ross Sea (Antarctica): occurrence, distribution and characterization by FTIR. *Chemosphere* 175: 391-400.
- Cole M, Lindeque P, Halsband C, Galloway TS, (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin* 62: 2588-2597.
- Collignon A, Hecq JH, Galgani F, Voisin P, Collard F, Goffart A (2012). Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 64 (4): 861e864.
- Cózar A, Echevarría F, Gonzalez-Gordillo JI, Irigoien X, Úbeda B, Hernandez-Leon S, Palma AT, Navarro S, García-de-Lomas J, Ruiz A, Fernandez-de-Puelles M, Duarte CM (2014). Plastic debris in the open

- ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences 111 (28): 10239-10244.
- de Lucia GA, Caliani I, Marra S, Camedda A, Coppa S, Alcaro L et al. (2014). Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea). *Marine Environmental Research* 100: 10-16.
- Desforges JPW, Galbraith M, Dangerfield N, Ross PS (2014). Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 79: 94-99.
- Dubaish F, Liebezeit G (2013). Suspended microplastics and black carbon particles in the Jade system, Southern North Sea. *Water, Air & Soil Pollution* 224 (2): 1-8.
- Duis K, Coors (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Science Europe* 28:2.
- Dümichem E, Barthel AK, Braun U, Bannick CG, Brand K, Jekel M, Senz R (2015). Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method. *Water Research* 85: 451-457.
- Edson E, Patterson M (2015). MantaRay: a novel autonomous microplastic sensor for determining particle concentrations in marine ecosystems. *Research, Innovation and Scholarship Expo. Category: Engineering and Technology. Abstract ID# 580. Boston (MA; USA), 9.04.2018.*
- Enders K, Lenz R, Stedmon CA, Nielsen TG (2015). Abundance, size and polymer composition of marine microplastics  $\geq 10 \mu\text{m}$  in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Marine Pollution Bulletin* 100: 70-81.
- Eriksen M, Liboiron M, Kiessling T, Charron L, Alling A, Lebreton L et al. (2018). Microplastic sampling with the AVANI trawl compared to two neuston trawls in the Bay of Bengal and South Pacific. *Marine Pollution Bulletin* 232: 430-439.
- Erni-cassola G, Gibson MI, Thompson RC, Christie-Oleza JA (2017). Lost, but found with Nile Red: a novel method for detecting and quantifying small microplastics (1 mm to  $20 \mu\text{m}$ ) in environmental samples. *Environmental Science & Technology* 51: 13641-13648.
- Faur F, Saini C, Potter G, Galgani F, De Alencastro LF, Hagmann P (2015). An evaluation of surface micro- and mesoplastic pollution in pelagic ecosystems of the Western Mediterranean Sea. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (16): 12190-12197.
- Frère L, Paul-Pont I, Moreau J, Soudant P, Lambert C, Huvet A, Rinnert E (2016). A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. *Marine Pollution Bulletin* 113: 461-468.
- Frias JPGL, Otero V, Sobral P (2014). Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. *Marine Environmental Research* 95: 89-95.



- Gajšt T, Bizjak T, Palatinus A, Liubartseva S, Kržan A (2016). Sea surface microplastics in Slovenian part of the northern Adriatic. *Marine Pollution Bulletin* 113: 392–399.
- Galgani F, Hanke G, Werner S, Oosterbaan L, Nilsson P, Fleet D et al. (2013). Guidance on monitoring of marine litter in European Seas. Report EUR 26113 EN – Joint Research Centre – Institute for Environment and Sustainability, pp. 128.
- Gallagher A, Rees A, Rowe R, Stevens J, Wright P (2016). Microplastics in the Solent estuarine complex, UK: an initial assessment. *Marine Pollution Bulletin* 102: 243-249.
- GESAMP (2015). "Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment" (Kershaw, P. J., ed.). (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 90, 96 p.
- Gorokhova E (2015). Screening for microplastic particles in plankton samples: how to integrate marine litter assessment into existing monitoring programs? *Marine Pollution bulletin* 99: 271-275.
- Güven O, Gökdağ K, Jovanović B, Kleyş AE (2017). Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish. *Environmental Pollution* 223: 286–294.
- Hall NM, Berry KLE, Rintoul L, Hoogenboom MO (2015). Microplastic ingestion by scleractinian corals. *Marine Biology* 162: 725.
- Harvey GW, Burzell LA (1972). A simple microlayer method for small samples. *Limnology and Oceanography* 17: 156–157.
- Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M (2012). Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science & Technology* 46: 3060-3075.
- Isobe A, Uchida K, Tokai T, Iwasaki S (2015). East Asian seas: a hot spot of pelagic microplastics. *Marine Pollution Bulletin* 101: 618-623.
- Isobe A (2016). Percentage of microbeads in pelagic microplastics within Japanese coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 110: 432–437.
- Ivar do Sul JA, Costa MF (2014). The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution* 185: 352-364.
- Kang JH, Kwon OY, Lee KW, Song YK, Shim WJ (2015). Marine neustonic microplastics around the southeastern coast of Korea. *Marine Pollution Bulletin* 96: 304–312.
- Lenz R, Enders K, Stedmon CA, Mackenzie DMA, Nielsen TG (2015). A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. *Marine*

Pollution Bulletin 100: 82–91.

Leslie HA, van der Meulen MD, Kleissen FM, Vethaak AD (2011). Microplastic litter in the Dutch marine environment. Providing facts and analysis for Dutch policymakers concerned with marine microplastic litter. *Deltares*, pp. 105.

Lima ARA, Costa MF, Barletta M (2014). Distribution patterns of microplastics within the plankton of a tropical estuary. *Environmental Research* 132: 146–155.

Löder MG, Gerdts G (2015). Methodology used for the detection and identification of microplastics—a critical appraisal. *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, pp. 201–227.

Lusher AL, Burke A, O'Connor I, Officer R (2014). Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. *Marine Pollution Bulletin* 88 (1): 325-333.

Lusher AL, Tirelli V, O'Connor I, Officer R (2015). Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Scientific Reports* 5: 14947.

Maes T, Van der Meulen MD, Devriese LI, Leslie HA, Huvet A, Frère L, Robbens J, Vethaak AD (2017). Microplastic baseline surveys at the water surface and sediments of the North-East Atlantic. *Frontiers in Marine Science* 4:135.

Majewsky M, Bitter H, Eiche E, Horn H (2016). Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC). *Science of the Total Environment* 568: 507-511.

MERI (Marine & Environmental Research Institute), 2017. Guide to microplastic identification. pp. 14

Miller ME, Kroon FJ, Motti CA (2017). Recovering microplastics from marine samples: a review of current practices. *Marine Pollution Bulletin* 123: 6-18.

Mintenig SM, Int-Veen I, Löder MGJ, Primpke S, Gerdts G (2017). Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water Research* 108: 365-372.

Norén F (2007). Small Plastic Particles in Coastal Swedish Waters. Kimo Sweden, Lysekil

Palatinus A, Viršek MK, Kaberi E (2015). DeFishGear protocols for sea surface and beach sediment sampling and sample analysis. Cross Border Cooperation 2007-2013, Adriatic IPA, DeFishGear project, pp. 27.

Primpke S, Lorenz C, Rascher-Friesenhausen R, Gerdts G (2017). An automated approach for microplastics analysis using focal plane array (FPA) FTIR microscopy and image analysis. *Analytical Methods* 9: 1499.

Reisser J, Shaw J, Wilcox C, Hardesty BD, Proietti M, Thums M, Pattiaratchi C (2013). Marine plastic pollution in waters around Australia: characteristics, concentrations, and pathways. *PloS one* 8 (11): e80466.

**Prodotto n. T1.2.1**

- Sedlak M, Sutton R, Box C, Sun J, Lin D (2017). FINAL Sampling and analysis plan for microplastic monitoring in San Francisco Bay and adjacent Nation Marine Sanctuaries. SFEI Contribution 819. Richmond CA.
- Setälä O, Magnusson K, Lehtiniemi M, Norén F (2016). Distribution and abundance of surface water microlitter in the Baltic Sea: a comparison of two sampling methods. *Marine Pollution Bulletin* 110 (1): 177-183.
- Syakti, A.D (2017). Microplastics monitoring in marine environment. *Omni-Akuatika*, 11 (2): 1–6.
- Syakti AD, Bouhroum R, Hidayati NV, Koenawan CJ, Boulkamh A, Sulistyio I, Lebarillier S, Akhlus S, Doumenq P, Wong-Wah-Chung P (2017). Beach macro-litter monitoring and floating microplastic in a coastal area of Indonesia. *Marine Pollution Bulletin* 122: 217-225.
- Song YK, Hong SH, Jang M, Kang JH, Kwon OY, Han GM, Shim WJ (2014). Large accumulation of micro-sized synthetic polymer particles in the sea surface microlayer. *Environmental Science & Technology* 48: 9014–9021.
- Song YK, Hong SH, Jang M, Han GM, Rani M, Lee J, Shim WJ (2015). A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin* 93 : 202–209.
- Stöhr R (2016). Microplastic in the Sea. A research approach by One Earth – One Ocean. One Earth – One Ocean project. <https://oneearth-oneocean.com/wp-content/uploads/Microplastic-in-the-sea-report-I.pdf>
- Suaria G, Avio CG, Mineo A, Lattin GL, Magaldi MG, Belmonte G (2016). The Mediterranean plastic soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters. *Scientific Reports* 6:37551.
- Sun X, Liang J, Zhu M, Zhao Y, Zhang B (2018). Microplastics in seawater and zooplankton from the Yellow Sea. *Environmental Pollution* 242: 585-595.
- Sutton R, Mason SA, Stanek SK, Willis-Norton E, Wren IF, Box C (2016). Microplastic contamination in the San Francisco Bay, California, USA. *Marine Pollution Bulletin* 109: 230–235.
- Tamminga M, Hengstmann E, Fischer EK (2018). Microplastic analysis in the South Funen Archipelago, Baltic Sea, implementing manta trawling and bulk sampling. *Marine Pollution Bulletin* 128: 601-608.
- Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AWG et al. (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304: 838.
- Wang J, Tan Z, Peng J, Qiu Q, Li M, (2016). The behaviors of microplastic in the marine environment. *Marine Environmental Research* 113: 7-17.
- Tsang YY, Mak CW, Liebich C, Lam SW, Sze ETP, Chan KM (2017). Microplastic pollution in the marine waters and sediments of Hong Kong. *Marine Pollution bulletin* 115: 20-28.
- van der Hal N, Ariel A, Angel DL (2017). Exceptionally high abundances of microplastics in the

## **Prodotto n. T1.2.1**

oligotrophic Israeli Mediterranean coastal waters. Marine Pollution Bulletin 116: 151–155.

Viršek MK, Palatinus A, Koren S, Peterlin M, Horvat P, Kržan A (2016). Protocol for microplastics sampling on the sea surface and sample analysis. Journal of Visualized Experiments 118: 55161.

Zhao S, Zhu L, Wang T, Li D (2014). Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution. Marine Pollution Bulletin 86, 562–568.