

Progetto - Projet

SPLasH! - Stop alle Plastiche in H2O!



PRODOTTO T1.3.1: REPORT PROGETTAZIONE CAMPAGNE DI MISURA

LIVRABLE T1.3.1: RAPPORT DE CONCEPTION DES CAMPAGNES DE MESURE

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

Descrizione del Prodotto: La formulazione di un piano di monitoraggio delle microplastiche congiunto e condiviso tra i Partner permetterà di ottenere dati e risultati confrontabili nei diversi porti coinvolti. In questo prodotto, sono descritti i materiali e i metodi di campionamenti ed analisi che verranno applicati per lo studio della diffusione delle microplastiche negli ambienti portuali.

Description du livrable: La formulation d'un plan de surveillance des microplastiques commun et partagé entre les Partenaires permettra d'obtenir des données et des résultats comparables dans les différents ports concernés. Les matériaux et méthodes d'échantillonnage et d'analyse qui seront appliqués pour l'étude de la diffusion microplastique dans les environnements portuaires sont décrits dans ce livrable.

Sintesi

Il piano di monitoraggio è suddiviso in macrocapitoli: campionamento matrici, trattamento dei campioni in laboratorio, analisi delle microplastiche, analisi dei metalli pesanti e interazioni con il biota e stazioni di campionamento.

All'interno del primo capitolo vengono definite le metodologie di campionamento per ogni singola matrice (sedimento, acqua, microplastiche superficiali e pesci), nonché la descrizione della strumentazione utilizzata e gli accorgimenti per ridurre/eliminare la contaminazione da microplastiche a bordo.

Per quanto riguarda il trattamento dei campioni vengono descritti tutti i passaggi che verranno effettuati sulle varie matrici all'interno dei laboratori dei vari Partner per poter ottenere il prodotto finale necessario per l'analisi chimica del polimero. Anche in questo caso vengono descritte le strumentazioni e le linee guida utilizzate, nonché gli accorgimenti per quantificare la possibile contaminazione da microplastiche provenienti dall'ambiente esterno.

L'analisi delle microplastiche viene delineata tramite due passaggi: una prima analisi visiva effettuata con microscopio ottico per poter classificare in maniera preliminare le microparticelle riscontrate sul filtro ottenuto durante il trattamento dei campioni in laboratorio e un'analisi chimica volta a confermare o meno la natura polimerica delle microparticelle visionate in precedenza (un esempio di analisi chimica utilizzata è la spettroscopia Raman). Le concentrazioni dei metalli in tracce sono state analizzate da ICP-MS su un Perkin Elmer Nexlon 300X . La curva di calibrazione è stata eseguita con standard di diluizione (CCS4, CCS5 e CCS6; Inorganic Ventures, New Jersey USA) in HNO₃ 2%. La qualità analitica è stata regolarmente verificata mediante l'analisi di soluzioni certificate: Acqua potabile EnviroMAT EP-L-3 - SCP, Acqua sotterranea EnviroMAT ES-H-2, e SRLS 5. Le analisi sono state duplicate ogni volta e l'intervallo di confidenza è stato costantemente < 5%.

Infine, viene impostato il piano di monitoraggio dedicato al numero e alle caratteristiche delle stazioni di campionamento. La diversa morfologia, nonché la presenza di diverse attività antropiche che caratterizzano i singoli bacini portuali esaminati (Genova, Olbia e Tolone) fa sì che la scelta del numero dei campionamenti e del punto dove campionare siano differenti, definendo quindi zone di maggior impatto da parte dell'inquinamento da microplastiche.

Synthèse

Le plan de surveillance est divisé en macrochapitres : échantillonnage de la matrice, manipulation des échantillons en laboratoire, analyse des microplastiques, analyse des métaux lourds et interactions avec le biote et les stations d'échantillonnage.

Le premier chapitre définit les méthodes d'échantillonnage pour chaque matrice individuelle (sédiments, eau, microplastiques de surface et poissons), ainsi que la description de l'instrumentation utilisée et des mesures visant à réduire/éliminer la contamination par les microplastiques à bord.

En ce qui concerne le traitement des échantillons, toutes les étapes qui seront effectuées sur les différentes matrices dans les laboratoires des différents partenaires afin d'obtenir le produit final nécessaire à l'analyse chimique du polymère sont décrites. Dans ce cas

également, les instruments et les lignes directrices utilisés sont décrits, ainsi que les mesures visant à quantifier la contamination possible par des microplastiques provenant de l'environnement extérieur.

L'analyse des microplastiques se déroule en deux étapes : une première analyse visuelle effectuée au microscope optique afin de classer au préalable les microparticules trouvées sur le filtre obtenu lors du traitement des échantillons en laboratoire et une analyse chimique visant à confirmer ou non la nature polymère des microparticules précédemment observées (un exemple d'analyse chimique utilisée est la spectroscopie Raman).

Les concentrations en métaux traces ont été analysées par ICP-MS sur un Perkin Elmer Nexlon 300X . La courbe d'étalonnage a été réalisée avec des étalons de dilution (CCS4, CCS5 et CCS6 ; Inorganic Ventures, New Jersey, États-Unis) dans du HNO₃ à 2%. La qualité analytique a été régulièrement vérifiée par l'analyse de solutions certifiées : Eau potable EnviroMAT EP-L-3 - SCP, Groundwater EnviroMAT ES-H-2, et SRLS 5. Les analyses ont été dupliquées à chaque fois et l'intervalle de confiance était constamment <5%. Enfin, le plan de surveillance consacré au nombre et aux caractéristiques des stations d'échantillonnage est fixé. La morphologie différente, ainsi que la présence de différentes activités anthropiques qui caractérisent les différents bassins portuaires examinés (Gênes, Olbia et Toulon) font que le choix du nombre d'échantillons et le point où prélever sont différents, définissant ainsi les zones où l'impact de la pollution par les microplastiques est le plus important.

INDICE

1. INTRODUZIONE - INTRODUCTION	1
2. CAMPIONAMENTO MATRICI - ÉCHANTILLONNAGE DE MATRICE	1
2.1 SEDIMENTI - SEDIMENTS	1
2.2 ACQUA - EAU	2
2.3 MICROPLASTICHE SUPERFICIALI - MICROPLASTIQUES SUPERFICIELLES	3
2.4 PESCI - POISSONS	4
2.5 ACCORGIMENTI A BORDO DEI MEZZI NAUTICI - MESURES À BORD DES VÉHICULES NAUTIQUES	5
3. TRATTAMENTO DEI CAMPIONI IN LABORATORIO - TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS AU LABORATOIRE	6
3.1 CAMPIONI DI SEDIMENTO - ÉCHANTILLONS DE SÉDIMENTS	6
3.2 CAMPIONI DI ACQUA - ÉCHANTILLONS D'EAU	12
3.4 STOMACI DEI PESCI - ESTOMACHES DES POISSONS	15
3.5 ACCORGIMENTI IN LABORATORIO - MESURES AU LABORATOIRE	18
4. ANALISI DELLE MICROPLASTICHE - ANALYSE DES MICROPLASTIQUES	18
5. ANALISI METALLI PESANTI E INTERAZIONE CON IL BIOTA - ANALYSE DES MÉTAUX LOURDS ET INTERACTION AVEC BIOTA (UTLN)	22
6. STAZIONI DI CAMPIONAMENTO - STATIONS D'ÉCHANTILLONNAGE	24
6.1 CARATTERISTICHE E NUMERO DELLE STAZIONI DI CAMPIONAMENTO - CARACTÉRISTIQUES ET NOMBRE DE STATIONS DE PRÉLÈVEMENT	24
6.2 PORTO DI GENOVA - PORT DE GÈNE	25
6.3 PORTO DI OLBIA - PORT DE OLBIA	26
6.4 PORTO DI TOLONE - PORT DE TOULON	27
Bibliografia - Bibliographie	29

1. INTRODUZIONE - INTRODUCTION

I campionamenti per la determinazione del quantitativo di microplastiche nelle diverse matrici di studio verranno effettuati nei tre porti pilota coinvolti dal progetto (Porto di Genova, Porto di Olbia e Porto di Tolone) secondo le metodologie e le tempistiche di seguito riportate. GESAMP 2019

L'échantillonnage pour la détermination de la quantité de microplastiques dans les différentes matrices d'étude sera réalisé dans les trois ports pilotes impliqués dans le projet (Port de Gênes, Port d'Olbia et Port de Toulon) selon les méthodologies et le calendrier indiqués ci-dessous. GESAMP 2019.

2. CAMPIONAMENTO MATRICI - ÉCHANTILLONNAGE DE MATRICE

2.1 SEDIMENTI - SEDIMENTS

I sedimenti di fondo verranno campionati con una benna Van Veen da 5 L.

Les sédiments de fond seront échantillonnés avec un seau Van Veen de 5 L.



Benna Van Veen - Seau Van Veen.

La benna verrà aperta in una vasca di metallo e il sedimento dello strato più superficiale (2-3 cm) verrà campionato con un cucchiaio di metallo e raccolto in contenitori di vetro da 500 cc con tappo in metallo. Onde evitare eventuali contaminazioni del campione con la



Interreg



UNIONE EUROPEA



MARITTIMO-IT FR-MARITIME

Fondo Europeo di Sviluppo Regionale

Prodotto n. T1.3.1

plastica/gomma presente sul tappo, tra il sedimento ed il tappo verrà posizionato un foglio di carta stagnola.

Le seau sera ouvert dans un réservoir métallique et les sédiments de la couche la plus superficielle (2-3 cm) seront prélevés avec une cuillère en métal et collectés dans des récipients en verre de 500 cc avec bouchon métallique. Afin d'éviter une éventuelle contamination de l'échantillon avec le plastique / caoutchouc présent sur le bouchon, une feuille de papier d'aluminium sera placée entre le sédiment et le bouchon.

2.2 ACQUA - EAU

L'acqua verrà campionata nello strato superficiale in diversi punti all'interno ed esterno dei porti di Genova, Olbia e Tolone tramite l'utilizzo di una bottiglia Niskin (5 L) in PVC. Nonostante il mezzo di campionamento sia di materiale plastico, la conoscenza del polimero specifico e del colore specifico (grigio) permetterà di eliminare eventuali "inquinamenti" del campione introdotti dall'uso di tale strumento.

L'eau sera prélevée dans la couche superficielle en différents points à l'intérieur et à l'extérieur des ports de Gênes, Olbia et Toulon à l'aide d'une bouteille Niskin (5 L) en PVC. Bien que le milieu de prélèvement soit en matière plastique, la connaissance du polymère spécifique et de la couleur spécifique (gris) permettra d'éliminer toute "pollution" de l'échantillon introduite par l'utilisation de cet instrument.



Bottiglia Niskin - Bouteille Niskin.

2.3 MICROPLASTICHE SUPERFICIALI - MICROPLASTIQUES SUPERFICIELLES

Le microplastiche galleggianti saranno campionate tramite una rete “manta” con maglia 300 μm che verrà trainata da un mezzo nautico lungo transetti che copriranno grandi superfici all’interno dei bacini portuali. Le microplastiche sono raccolte utilizzando un dispositivo a rete manta dotato di due ali che ne garantiscono la stabilità superficiale, una rete con una maglia di 300 μm e un collettore dove il campione è intrappolato. La rete manta è trainata da una barca per 20-30 minuti ad una velocità di circa 2 o 3 nodi. Dopo il traino, la rete viene risciacquata a bordo con una pompa per rimuovere eventuali oggetti che hanno aderito alla rete.

Il contenuto del raccogliatore viene poi svuotato in un setaccio da 300 μm dove viene effettuata una prima cernita visiva. Infine, gli oggetti campionati vengono confezionati con acqua di mare in una bottiglia di Pyrex da 1L lavata in precedenza con acido e conservata nel congelatore.

Les microplastiques flottants seront échantillonnés à travers un filet «manta» avec une maille de 300 μm qui sera tiré par un navire le long de transepts qui couvriront de grandes surfaces dans les bassins portuaires. Les microplastiques sont collectés à l'aide d'un dispositif de filet manta équipé de deux ailes qui garantissent la stabilité de la surface, un filet avec une maille

de 300 µm et un collecteur où l'échantillon est piégé. Le filet manta est remorqué par un bateau pendant 20 à 30 minutes à une vitesse d'environ 2 ou 3 nœuds. Après le remorquage, le filet est rincé à bord avec une pompe pour enlever tout objet ayant adhéré au filet.

Le contenu du collecteur est ensuite vidé dans un tamis de 300 µm où un premier tri visuel est effectué. Enfin, les articles prélevés sont conditionnés avec de l'eau de mer dans une bouteille Pyrex de 1L préalablement lavée à l'acide et conservée au congélateur.

2.4 PESCI - POISSONS

La specie di pesce selezionato per il campionamento è il cefalo (*Famiglia Mugilidae*), uno dei pesci più frequenti e più diffusi negli ambienti costieri e soprattutto nei porti. I pesci verranno catturati tramite rete, grazie alla collaborazione di pescatori professionisti della piccola pesca costiera. I pesci catturati verranno mantenuti vivi fino al momento del campionamento, immediatamente prima del quale verranno sacrificati con una concussione. Ogni esemplare sarà numerato, fotografato, pesato e dovrà esserne misurata la lunghezza totale (punta muso-fine coda) e standard (punta muso-parte centrale dove la coda si divide). Lo stomaco verrà estratto delicatamente dalla cavità viscerale dopo attenta incisione della parete ventrale effettuata mantenendo la punta delle forbici o del bisturi più parallela possibile alla superficie del ventre, evitando di incidere la parete dello stomaco e dell'intestino. Nel dettaglio dell'operazione, con la forbice sarà interrotto il collegamento con la faringe (solitamente il tratto appare più scuro/nero del resto dello stomaco) e sarà interrotto il collegamento con l'intestino. Il campione così prelevato sarà sciacquato con alcol al 70%, in modo da eliminare ogni residuo artificiale o naturale trattenuto sulla superficie esterna durante le precedenti fasi di lavorazione, fissato e conservato singolarmente in un opportuno barattolo di vetro contenente alcol al 70%. Il contenitore sarà identificato con il numero univoco attribuito all'esemplare al momento della dissezione.

L'espèce de poisson sélectionnée pour l'échantillonnage est le mulot (famille des Mugilidae), l'un des poissons les plus fréquents et les plus répandus dans les milieux côtiers et en particulier dans les ports. Le poisson sera capturé au filet, grâce à la collaboration de pêcheurs professionnels de la petite pêche côtière. Les poissons capturés seront maintenus en vie jusqu'au moment de l'échantillonnage, immédiatement avant lequel ils seront sacrifiés

par une commotion cérébrale. Chaque spécimen sera numéroté, photographié, pesé et la longueur totale (bout du museau-bout de queue) et standard (bout du museau-partie centrale où la queue se divise) doit être mesurée. L'estomac sera délicatement extrait de la cavité viscérale après une incision soigneuse de la paroi ventrale en gardant la pointe des ciseaux ou du scalpel aussi parallèle que possible à la surface de l'abdomen, en évitant de couper dans la paroi de l'estomac et des intestins. Dans le détail de l'opération, la connexion avec le pharynx sera interrompue avec les ciseaux (généralement le tractus apparaît plus sombre / noir que le reste de l'estomac) et la connexion avec l'intestin sera interrompue. L'échantillon ainsi prélevé sera rincé à 70% d'alcool, afin d'éliminer tout résidu artificiel ou naturel retenu sur la surface externe lors des étapes de traitement précédentes, fixé et conservé individuellement dans un bocal en verre approprié contenant 70% d'alcool. Le contenant sera identifié avec le numéro unique attribué à l'échantillon au moment de la dissection.

2.5 ACCORGIMENTI A BORDO DEI MEZZI NAUTICI - MESURES À BORD DES VÉHICULES NAUTIQUES

Tutti gli strumenti ed i contenitori utilizzati per il campionamento delle diverse matrici dovranno essere di materiale non plastico, quando possibile. I contenitori per i campioni di microplastiche o matrici dovranno essere precedentemente sciacquati con acqua filtrata in modo da eliminare eventuali microplastiche presenti nei contenitori (es. residui della lavorazione o degli imballaggi). I campioni prelevati dovranno immediatamente essere chiusi negli appositi contenitori onde evitare contaminazione esterna. Il personale a bordo che opererà sui campioni dovrà evitare di indossare ove possibile indumenti od oggetti in plastica.

Tous les instruments et récipients utilisés pour l'échantillonnage des différentes matrices doivent être en matériau non plastique, dans la mesure du possible. Les récipients pour les échantillons microplastiques ou matriciels doivent être préalablement rincés avec de l'eau filtrée afin d'éliminer les microplastiques présents dans les récipients (par exemple les résidus de traitement ou d'emballage). Les échantillons prélevés doivent être

immédiatement fermés dans les récipients appropriés pour éviter toute contamination externe. Le personnel à bord qui travaillera sur les échantillons doit éviter de porter des vêtements ou des objets en plastique dans la mesure du possible.

3. TRATTAMENTO DEI CAMPIONI IN LABORATORIO - TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS AU LABORATOIRE

3.1 CAMPIONI DI SEDIMENTO - ÉCHANTILLONS DE SÉDIMENTS

I campioni di sedimento verranno divisi in due aliquote: una per la determinazione della granulometria del sedimento e una per l'analisi delle microplastiche. Il campione verrà rovesciato in un contenitore in stagnola precedentemente sciacquato con acqua filtrata, omogeneizzato con un cucchiaio di metallo e diviso nelle due aliquote.

Les échantillons de sédiments seront divisés en deux aliquotes: un pour la détermination de la granulométrie du sédiment et un pour l'analyse des microplastiques. L'échantillon sera versé dans un récipient en aluminium préalablement rincé avec de l'eau filtrée, homogénéisé avec une cuillère en métal et divisé en deux aliquotes.

GRANULOMETRIE - GRANULOMÉTRIES

L'aliquota di sedimento destinata all'analisi granulometrica sarà posta in vaschette tarate e fatto essiccare in stufa a 60°C, per 12 ore. Dopo una pesatura sarà sottoposto a setacciatura a umido con maglia da 63 µm per la separazione della frazione fine da quella grossolana. La frazione fine (<63 µm) sarà raccolta in un contenitore, dal quale si preleverà un'aliquota di campione, che verrà successivamente analizzata al Counter Coulter Multisizer 3®. La frazione di sedimento grossolana sarà poi nuovamente asciugata in stufa, pesata e setacciata con batteria di setacci a maglia decrescente dall'alto verso il basso, per individuare il modo in cui sono ripartite le sottoclassi dimensionali all'interno dei campioni raccolti.

La classificazione granulometrica utilizzata sarà la seguente: argilla <4 µm; silt fine 4-16 µm; silt medio 16-32 µm; silt grossolano 32-63 µm; sabbia molto fine 63-125 µm; sabbia fine 125-250 µm; sabbia media 250-500 µm; sabbia grossolana 500-1000 µm; sabbia molto grossolana 1000-2000 µm; ghiaia >2000 µm.

L'analisi dimensionale delle particelle costituenti il campione fine ($<63 \mu\text{m}$) sarà condotta tramite l'utilizzo del Coulter Counter, adottando le metodiche tratte da Krank (1980). Questo strumento, nato per il conteggio dei globuli rossi del sangue, ha raggiunto una larga diffusione ed utilizzazione nel campo delle ricerche marine grazie alle sue caratteristiche di base che gli permettono di misurare concentrazioni anche molto basse di particelle in sospensione aventi un ampio spettro dimensionale ($1200\text{-}0,4 \mu\text{m}$). Il funzionamento del Coulter Counter può essere così sintetizzato: il materiale da analizzare è contenuto in un bicchiere ed è mantenuto in sospensione in un elettrolita (Isoton o acqua di mare filtrata) al quale viene applicato un campo elettrico, creato tramite due elettrodi di cui uno è posto all'interno del tubo, dove è contenuto l'elettrolita, e l'altro direttamente nel bicchiere in modo che il circuito elettrico risulti chiuso; una pompa peristaltica preleva una quantità fissa di sospensione compresa tra 50 e $2000 \mu\text{L}$ tramite un tubo cilindrico di vetro, provvisto di un orificio di dimensioni calibrate (che variano dai 15 ai $2000 \mu\text{m}$). Ogni apertura consente di effettuare analisi granulometriche nell'ambito di un range compreso tra il 2% ed il 60% del diametro del foro stesso. Ciascuna particella è costretta a passare attraverso l'orificio e, avendo una resistività diversa da quella dell'elettrolita il suo passaggio implica una variazione di resistenza tra gli elettrodi, proporzionale al suo volume; questa variazione provoca un impulso di tensione e, grazie alla proporzionalità con il volume particella, lo strumento, contando gli impulsi ricevuti, è in grado di determinare il numero delle particelle e di stabilirne le dimensioni; nel beaker viene immerso un dispositivo ad elica che permette di mantenere la soluzione costantemente in agitazione, al fine di evitare deposizioni delle particelle di dimensioni maggiori e flocculazioni che altererebbero la misura. Gli impulsi di tensione vengono amplificati e passano attraverso un circuito-soglia del quale è possibile regolare il livello; se questo viene raggiunto od oltrepassato, l'impulso viene contato; il livello di soglia, cui corrispondono dimensioni crescenti delle particelle, viene scelto automaticamente dalla macchina e gli impulsi contati vengono visualizzati sul display di un oscilloscopio. I dati così ottenuti vengono rappresentati in un grafico che riporta il numero di particelle contate in funzione del loro diametro e immediatamente trasferiti su un personal computer per mezzo di un'interfaccia predisposta. Dopo una prima rappresentazione, il software applicativo corregge automaticamente le contate dai possibili errori dovuti a

passaggi contemporanei, attraverso il foro capillare, di più particelle che vengono contate come un'unica particella di dimensioni maggiori (correzione di coincidenza) e sottrae le particelle contenute nell'elettrolita (blank substract).

La portion de sédiment destinée à l'analyse granulométrique sera placée dans des plateaux calibrés et séchée dans une étuve à 60°C pendant 12 heures. Après pesée, il sera soumis à un tamisage humide avec une maille de 63 μm pour séparer la fraction fine de la fraction grossière. La fraction fine (<63 μm) sera collectée dans un récipient, dans lequel sera prélevée une aliquote d'échantillon, qui sera ensuite analysée sur le Counter Coulter Multisizer 3[®]. La fraction de sédiments grossiers sera ensuite à nouveau séchée dans une étuve, pesée et tamisée avec une série de tamis à mailles décroissant de haut en bas, pour identifier la manière dont les sous-classes dimensionnelles sont réparties dans les échantillons collectés. La classification granulométrique utilisée sera la suivante: argile <4 μm ; limon fin 4-16 μm ; limon moyen 16-32 μm ; limon grossier 32-63 μm ; sable très fin 63-125 μm ; sable fin 125-250 μm ; sable moyen 250-500 μm ; sable grossier 500-1000 μm ; sable très grossier 1000-2000 μm ; gravier >2000 μm .

L'analyse dimensionnelle des particules constituant l'échantillon fin (<63 μm) sera réalisée à l'aide du Coulter Counter, en adoptant les méthodes tirées de Krank (1980). Cet instrument, créé pour le comptage des globules rouges, a atteint une large diffusion et une utilisation dans le domaine de la recherche marine grâce à ses caractéristiques de base qui lui permettent de mesurer même de très faibles concentrations de particules en suspension ayant un large spectre dimensionnel (de 1200 à 0,4 μm). Le fonctionnement du Coulter Counter peut se résumer comme suit: le matériau à analyser est contenu dans un verre et est maintenu en suspension dans un électrolyte (Isoton ou eau de mer filtrée) auquel est appliqué un champ électrique, créé par deux électrodes dont l'une il est placé à l'intérieur du tube, où est contenu l'électrolyte, et l'autre directement dans la coupelle pour que le circuit électrique soit fermé; une pompe péristaltique prélève une quantité fixe de suspension comprise entre 50 et 2000 μL à travers un tube de verre cylindrique, équipé d'un orifice de dimensions calibrées (allant de 15 à 2000 μm). Chaque ouverture permet une analyse granulométrique dans une plage comprise entre 2% et 60% du diamètre du trou lui-même.

Chaque particule est forcée de traverser l'orifice et, ayant une résistivité différente de celle de l'électrolyte, son passage implique un changement de résistance entre les électrodes, proportionnel à son volume; cette variation provoque une impulsion de tension et, grâce à la proportionnalité avec le volume des particules, l'instrument, en comptant les impulsions reçues, est capable de déterminer le nombre de particules et d'établir leurs dimensions; un dispositif à hélice est immergé dans le béccher ce qui permet de maintenir la solution constamment agitée, afin d'éviter le dépôt de particules plus grosses et des floculations qui altéreraient la mesure. Les impulsions de tension sont amplifiées et traversent un circuit à seuil dont le niveau peut être ajusté; s'il est atteint ou dépassé, l'impulsion est comptée; le niveau de seuil, correspondant à des tailles de particules croissantes, est automatiquement choisi par la machine et les impulsions comptées sont affichées sur l'écran d'un oscilloscope. Les données ainsi obtenues sont représentées dans un graphique qui montre le nombre de particules comptées en fonction de leur diamètre et immédiatement transférées vers un ordinateur personnel au moyen d'une interface préparée. Après une première représentation, le logiciel d'application corrige automatiquement les comptages d'erreurs éventuelles dues aux passages simultanés, à travers le trou capillaire, de plusieurs particules qui sont comptées comme une seule particule plus grande (correction de coïncidence) et soustrait les particules contenues dans le 'électrolyte (blank substract).

ANALISI DELLE MICROPLASTICHE - ANALYSE DES MICROPLASTIQUES

Un'aliquota di 50 mL sarà prelevata dal campione omogeneizzato e sarà sottoposta alle indagini di laboratorio per la determinazione del contenuto in microplastiche. I frammenti plastici, generalmente, hanno una densità compresa tra 0,8 e 1,5 g cm⁻³ (considerando le resine vergini prive di additivi), mentre generalmente le sabbie hanno una densità di circa 2,65 g cm⁻³, ragion per cui si provvederà a sfruttare la differenza di densità per estrarre le microplastiche dal sedimento. Si provvederà, quindi, a creare una soluzione sovrassatura acqua e cloruro di sodio (NaCl) di densità pari a 1,2 g cm⁻³, sciogliendo 350 g di sale da cucina in 1000 mL di acqua. Per evitare qualsiasi contaminazione dei campioni da eventuali microplastiche e corpi estranei contenuti nell'acqua del rubinetto e nel sale si provvederà a filtrare con carta filtro con porosità <10 µm l'acqua sovrassatura così ottenuta. Ai 50 mL di

campione posti in un beaker saranno addizionati 200 mL di acqua sovrassatura; la miscela sarà mescolata per 1 minuti con una bacchetta di vetro e poi lasciato a riposo per 24 h. Si è scelto di prolungare il tempo di posa portandolo ad 24 h, perché conoscendo la granulometria dei campioni e sapendo che le argille, di cui il campione di sedimento portuale è ricco, necessitano di un tempo di sedimentazione più lungo, pochi minuti o poche ore non sarebbero stati sufficienti. A sedimentazione ultimata, utilizzando un cucchiaino di metallo o una pipetta in vetro, si catturerà il sopranatante, la porzione di liquido che si stratifica nella parte superiore di una sospensione per effetto della sedimentazione, che verrà poi conservato in boccette di vetro con tappo in alluminio. Il processo che comprende la separazione per densità e la raccolta del sopranatante sarà ripetuto 3 volte per ogni singolo campione. Il sopranatante raccolto sarà, poi, filtrato con una pompa a vuoto su un filtro GF-C di 45 mm di diametro avente 1,2 μm di porosità. Per eliminare la sostanza organica presente nel campione, il filtro verrà ricoperto di H_2O_2 al 40% e mantenuto immerso in essa per 24 ore direttamente sulla rampa di filtrazione. Successivamente, eliminata l'acqua ossigenata, il filtro verrà sciacquato con 1000 mL acqua filtrata per eliminare eventuali residui di sale che potrebbero disturbare le successive analisi. In seguito, il filtro sarà posto e conservato in una piastra Petri precedentemente lavata con acqua filtrata, e fatto asciugare a temperatura ambiente o in forno termostato a 60°C. Una volta asciutto, si procederà con l'osservazione del campione al microscopio ottico Leica® Z16 APO. Seguendo le linee guida dettate dalla "Guide to Microplastic Identification" del Marine & Environmental Research Institute (2015) e tramite il software Leica Application Suite, si procederà al rilievo fotografico ed alla registrazione di dimensioni, forma e colore dei frammenti e delle fibre trovate secondo la seguente classificazione (Galgani et al. 2013):

Une aliquote de 50 mL sera prélevée sur l'échantillon homogénéisé et sera soumise à des analyses de laboratoire pour la détermination de la teneur en microplastique. Les fragments de plastique ont généralement une densité comprise entre 0,8 et 1,5 g cm^{-3} (compte tenu des résines vierges sans additifs), alors que généralement les sables ont une densité d'environ 2,65 g cm^{-3} , c'est pourquoi pour lequel la différence de densité sera exploitée pour extraire les microplastiques du sédiment. Une solution sursaturée d'eau et de chlorure de sodium

(NaCl) d'une densité de $1,2 \text{ g cm}^{-3}$ sera alors créée en dissolvant 350 g de sel de table dans 1000 ml d'eau. Pour éviter toute contamination des échantillons par des microplastiques et des corps étrangers contenus dans l'eau du robinet et le sel, l'eau sursaturée résultante sera filtrée avec du papier filtre de porosité $<10 \text{ }\mu\text{m}$. Aux 50 mL d'échantillon placés dans un bécher, 200 mL d'eau sursaturée seront ajoutés; le mélange sera agité pendant 1 minute avec une tige de verre puis laissé au repos pendant 24 h. Il a été décidé d'allonger le temps de pose en l'amenant à 24 h, car connaissant la granulométrie des échantillons et sachant que l'échantillon de sédiments portuaire est riche en argile, ils nécessitent un temps de sédimentation plus long, quelques minutes ou quelques heures cela n'aurait pas suffi. A la fin de la sédimentation, à l'aide d'une cuillère en métal ou d'une pipette en verre, le surnageant (la partie de liquide qui est stratifiée dans la partie supérieure d'une suspension en raison de la sédimentation) sera capturé et sera ensuite stockée dans des flacons en verre avec un bouchon en aluminium. Le processus comprenant la séparation par densité et la collecte du surnageant sera répété 3 fois pour chaque échantillon individuel. Le surnageant collecté sera ensuite filtré avec une pompe à vide sur un filtre GF-C de 45 mm de diamètre ayant une porosité de $1,2 \text{ }\mu\text{m}$. Pour éliminer la substance organique présente dans l'échantillon, le filtre sera recouvert de H_2O_2 à 40% et maintenu immergé pendant 24 heures directement sur la rampe de filtration. Par la suite, une fois le peroxyde d'hydrogène éliminé, le filtre sera rincé avec 1000 mL d'eau filtrée pour éliminer tout sel résiduel qui pourrait perturber les analyses ultérieures. Par la suite, le filtre sera placé et stocké dans une boîte de Pétri préalablement lavée à l'eau filtrée, et séché à température ambiante ou dans une étuve thermostatée à 60°C . Une fois sec, nous procéderons à l'observation de l'échantillon sous le microscope optique Leica® Z16 APO. En suivant les directives dictées par le «Guide to Microplastic Identification» du Marine & Environmental Research Institute (2015) et à travers le logiciel Leica Application Suite, nous procéderons au relevé photographique et à l'enregistrement de la taille, de la forme et de la couleur des fragments et fibres trouvés selon la classification suivante (Galgani et al.2013):



		CATEGORIES FOR MICROPARTICLES	
		Material	Description
Size	Record size of each item. Minimum resolution is to allocate in to bin sizes of 100 μm	Plastic	Plastic fragments rounded
			Plastic fragments subrounded
			Plastic fragments subangular
			Plastic fragments angular
Type	Plastic fragments, pellets, filaments, plastic films, foamed plastic, granules, and styrofoam		cylindrical pellets
			disks pellets
			flat pellets
			ovoid pellets
			spheruloids pellets
Shape	For pellets: cylindrical, disks, flat, ovoid, spheruloids; For fragments: rounded, subrounded, subangular, angular; For general- irregular, elongated, degraded, rough, and broken edges		filaments
			plastic films
			foamed plastic
			granules
Colour	Transparent, crystalline, white, clear-white-cream, red, orange, blue, opaque, black, grey, brown, green, pink, tan, yellow		styrofoam
		Other	Other (glass, metal, tar)

La lettura del filtro sarà effettuata seguendo una griglia, in modo da evitare di contare e identificare frammenti già precedentemente identificati. I frammenti saranno contati, misurati dimensionalmente e classificati in differenti categorie in funzione della forma, del colore e del loro aspetto. I frammenti trovati saranno suddivisi per dimensioni, seguendo la classificazione dei sedimenti. Verrà quindi creato un database fotografico delle microplastiche ritrovate nei campioni analizzati nell'ambito del progetto.

La lecture du filtre sera effectuée suivant une grille, afin d'éviter de compter et d'identifier des fragments préalablement identifiés. Les fragments seront comptés, mesurés dimensionnellement et classés en différentes catégories selon leur forme, leur couleur et leur aspect. Les fragments trouvés seront divisés par taille, suivant la classification des sédiments. Une base de données photographique des microplastiques trouvés dans les échantillons analysés dans le cadre du projet sera alors créée.

3.2 CAMPIONI DI ACQUA - ÉCHANTILLONS D'EAU

L'acqua sub-superficiale (1 m di profondità) sarà campionata tramite una bottiglia Niskin o una bottiglia Nansen da 5 L di capacità. La bottiglia Niskin è uno strumento in materiale

plastico, infatti è costruito in PVC di colore grigio, ma grazie al fatto che se ne conosce la composizione polimerica e il colore, è possibile utilizzarla nel campionamento delle microplastiche; in laboratorio, infatti, possono essere effettuati dei test di rilascio di frammenti dalla bottiglia, che possono quindi essere sottratti ai campioni di acqua prelevati con essa. Altrettanto è valido per la bottiglia Van Dorn.

I campioni di acqua saranno raccolti in bottiglioni da 5 L di vetro con il tappo ricoperto di stagnola per evitare contaminazioni provenienti dalla gomma componente il tappo. Per ogni stazione verranno campionati 10 L di acqua di mare per avere un quantitativo di materiale sufficiente per le analisi. I campioni verranno portati in laboratorio e filtrati, attraverso l'utilizzo di una pompa a vuoto, su filtri GF-C di 45 mm di diametro e porosità di 1,2 µm. I 10 L di campione verranno divisi su due filtri per non concentrare troppo il materiale sul filtro e permetterne una migliore visualizzazione al microscopio. Per eliminare la sostanza organica presente nel campione, il filtro verrà ricoperto di H₂O₂ al 40% e mantenuto immerso in essa per 24 ore direttamente sulla rampa di filtrazione. In seguito, eliminata l'acqua ossigenata, il filtro verrà sciacquato con acqua filtrata per eliminare eventuali residui di sale dell'acqua di mare e di H₂O₂. In seguito, il filtro verrà posto e conservato in una piastra Petri precedentemente lavata con acqua filtrata, e fatto asciugare a temperatura ambiente o in forno termostato a 60°C. Una volta asciutto, si procederà con l'osservazione del campione al microscopio ottico per identificare e classificare le particelle in esso presenti, come riportato per i filtri derivanti dall'analisi dei campioni di sedimento. I risultati ottenuti verranno riportati poi a litro di acqua di mare.

L'eau sub-superficielle (1 m de profondeur) sera prélevée avec une bouteille Niskin ou une bouteille Nansen d'une capacité de 5 L. La bouteille Niskin est un instrument en plastique, en fait il est en PVC gris, mais grâce au fait que la composition et la couleur du polymère sont connues, il peut être utilisé dans l'échantillonnage des microplastiques; en laboratoire, en effet, des tests peuvent être effectués pour la libération de fragments du flacon, qui peuvent ensuite être soustraits des échantillons d'eau prélevés avec celui-ci. Il en va de même pour la bouteille Van Dorn.

Les échantillons d'eau seront collectés dans des bouteilles en verre de 5 L avec le bouchon

recouvert d'une feuille d'aluminium pour éviter la contamination par le composant en caoutchouc du bouchon. Pour chaque station, 10 L d'eau de mer seront prélevés afin d'avoir une quantité suffisante de matériel pour les analyses. Les échantillons seront amenés au laboratoire et filtrés, à l'aide d'une pompe à vide, sur des filtres GF-C d'un diamètre de 45 mm et d'une porosité de 1,2 μm . Les 10 L d'échantillon seront répartis sur deux filtres afin de ne pas trop concentrer le matériau sur le filtre et permettre une meilleure visualisation au microscope. Pour éliminer la substance organique présente dans l'échantillon, le filtre sera recouvert de H_2O_2 à 40% et maintenu immergé pendant 24 heures directement sur la rampe de filtration. Par la suite, une fois le peroxyde d'hydrogène éliminé, le filtre sera rincé à l'eau filtrée pour éliminer tout sel d'eau de mer résiduel et H_2O_2 . Par la suite, le filtre sera placé et stocké dans une boîte de Pétri préalablement lavée avec l'eau filtrée, et séché à température ambiante ou dans une étuve thermostatée à 60°C. Une fois sec, nous procéderons à l'observation de l'échantillon au microscope optique pour identifier et classer les particules qui y sont présentes, comme indiqué pour les filtres résultant de l'analyse d'échantillons de sédiments. Les résultats obtenus seront ensuite rapportés par litre d'eau de mer.

3.3 MICROPLASTICHE SUPERFICIALI - MICROPLASTIQUES SUPERFICIELLES

Dopo lo sbrinamento a temperatura ambiente viene effettuata una selezione visiva con una lente di ingrandimento binoculare. Piccoli volumi che vanno da 50 a 100 mL vengono versati in un piccolo cristallizzatore e le microplastiche vengono ordinate utilizzando una clip in teflon. Caratteristiche come la forma, il colore o la consistenza permettono di identificare le microplastiche tra gli altri oggetti presenti nel campione. Le microplastiche raccolte vengono confezionate in una fiala di vetro in presenza di acqua di mare filtrata a 0,2 μm e conservate nel congelatore fino all'analisi.

Dopo l'estrazione del biofilm, è possibile caratterizzare la microplastica. Vengono filtrati attraverso un setaccio di nylon 100 μm , risciacquati con acqua MQ e asciugati in un essiccatore. Il campione viene inizialmente pesato e i frammenti vengono poi inseriti nello schermo del dispositivo ZooSCAN (Hydroptic). Questo dispositivo permette di acquisire un'immagine degli elementi posti su uno schermo e, con l'aiuto del software Image J, è possibile determinare per ogni elemento parametri quali la dimensione massima e l'area

superficiale per microplastica.

Après décongélation à température ambiante, une sélection visuelle est faite avec une loupe binoculaire. De petits volumes allant de 50 à 100 mL sont versés dans un petit cristalliseur et les microplastiques sont triés à l'aide d'un clip en Téflon. Des caractéristiques telles que la forme, la couleur ou la texture permettent d'identifier les microplastiques parmi d'autres objets de l'échantillon. Les microplastiques collectés sont emballés dans un flacon en verre en présence d'eau de mer filtrée à 0,2 µm et stockés au congélateur jusqu'à l'analyse.

Après extraction du biofilm, il est possible de caractériser le microplastique. Ils sont filtrés à travers un tamis en nylon 100 µm, rincés avec de l'eau MQ et séchés dans un dessiccateur. L'échantillon est initialement pesé et les fragments sont ensuite saisis dans l'écran de l'appareil ZooSCAN (Hydroptic). Ce dispositif permet d'acquérir une image des éléments placés sur un écran et, à l'aide du logiciel Image J, il est possible de déterminer pour chaque élément des paramètres tels que la taille et la surface maximales des microplastiques.

3.4 STOMACI DEI PESCI - ESTOMACHES DES POISSONS

Per l'analisi del contenuto stomacale, lo stomaco, estratto dal contenitore di conservazione, viene adagiato per 10 minuti ad asciugare su carta assorbente. Trascorso il tempo standard, lo stomaco viene riposto su un supporto di vetro precedentemente tarato e pesato sulla bilancia di precisione (sensibilità 0,00001 g) per la determinazione del peso totale (STOMACO_{TOT}) e poi trasferito su una capsula petri in vetro.

Lo stomaco viene quindi aperto tramite un bisturi, e il contenuto stomacale viene estratto e raccolto in un beaker dalla capacità di 250 mL mediante l'ausilio di una spatolina in acciaio, dalla punta arrotondata. Per consentire la completa rimozione del contenuto stomacale e delle eventuali microplastiche presenti nello stomaco si sottopone la parte interna dello stomaco a lavaggio con Etanolo al 70%. Il sacco, svuotato, viene disposto una seconda volta su carta assorbente ad asciugare per 10 minuti ed infine pesato nuovamente sulla bilancia di precisione (STOMACO_{SACCO}) per la successiva determinazione del peso del contenuto stomacale:

CONTENUTO STOMACALE = (PESO STOMACO_{TOT} - PESO STOMACO_{SACCO})

Il contenuto stomacale viene omogenizzato per 1 minuto mediante bacchetta di vetro all'interno del beaker. Prima di procedere all'estrazione della plastica, si effettua la digestione della sostanza organica presente nel contenuto stomacale, aggiungendo 60 ml di H₂O₂ al 40% per 72 ore. Durante questa fase di digestione, come anche durante tutte le successive fasi in cui il campione deve essere mantenuto fermo per un determinato tempo, il beaker viene tappato in modo da evitare la contaminazione da microplastiche presenti in aria e che potrebbero cadere sul campione.

Successivamente, per consentire la separazione della microplastica per galleggiamento, si aggiungono, alla soluzione disciolta, 200 mL di acqua supersalata con densità di 1,2 g cm⁻³ ottenuta con NaCl. La soluzione è miscelata con una bacchetta di vetro per 60 secondi e successivamente lasciata riposare per 24 ore. Terminato il processo di sedimentazione, il soprannatante viene rimosso con una pipetta Pasteur e trasferito in una boccetta di vetro con tappo in alluminio. La procedura è effettuata per un totale di tre volte. Il contenuto della boccetta, prodotto delle precedenti operazioni di prelievo, è quindi filtrato mediante pompa a vuoto su un filtro GF-C di 45 mm di diametro e porosità 1,2 µm. Al termine della filtrazione, il filtro viene sciacquato con 1000 ml di acqua dolce filtrata per eliminare i residui di sale che potrebbero disturbare alle successive analisi.

In seguito al processo di filtrazione, il filtro con il campione viene posto e conservato in una piastra Petri lavata con acqua filtrata e lasciato asciugare a temperatura ambiente o in forno termostato a 60°C. Una volta asciutto, si procede con l'osservazione del filtro al microscopio ottico per identificare e classificare eventuali oggetti contenuti nel campione, come riportato sopra.

Pour l'analyse du contenu de l'estomac, l'estomac, sorti du récipient de stockage, est placé pendant 10 minutes à sécher sur du papier absorbant. Après le temps standard, l'estomac est placé sur un support en verre préalablement calibré et pesé sur la balance de précision (sensibilité 0,00001 g) pour la détermination du poids total (ESTOMAC_{TOT}) puis transféré dans une boîte de Pétri en verre.

L'estomac est ensuite ouvert avec un scalpel, et le contenu de l'estomac est extrait et collecté dans un bécher de 250 mL à l'aide d'une spatule en acier, à pointe arrondie. Pour permettre

l'élimination complète du contenu de l'estomac et des microplastiques présents dans l'estomac, la partie interne de l'estomac est lavée avec de l'éthanol à 70%. Le sac, vidé, est placé une deuxième fois sur papier absorbant pour sécher pendant 10 minutes et enfin pesé à nouveau sur la balance de précision (ESTOMACO_{SAC}) pour la détermination ultérieure du poids du contenu de l'estomac:

$$\text{CONTENU DE L'ESTOMAC} = (\text{POIDS ESTOMAC}_{\text{TOT}} - \text{POIDS ESTOMACH}_{\text{SAC}})$$

Le contenu de l'estomac est homogénéisé pendant 1 minute à l'aide d'une tige de verre à l'intérieur du bécher. Avant de procéder à l'extraction du plastique, la digestion de la substance organique présente dans le contenu de l'estomac est effectuée en ajoutant 60 mL de H₂O₂ à 40% pendant 72 heures. Lors de cette phase de digestion, ainsi que pendant toutes les phases ultérieures dans lesquelles l'échantillon doit être maintenu immobile pendant un certain temps, le bécher est bouché afin d'éviter une contamination par des microplastiques présents dans l'air et qui pourraient tomber sur l'échantillon.

Ensuite, pour permettre la séparation du microplastique par flottabilité, 200 ml d'eau sursalée de densité 1,2 g cm⁻³ obtenue avec NaCl sont ajoutés à la solution dissoute. La solution est mélangée avec une tige de verre pendant 60 secondes puis laissée au repos pendant 24 heures. A la fin du processus de sédimentation, le surnageant est prélevé avec une pipette Pasteur et transféré dans un flacon en verre avec un bouchon en aluminium. La procédure est effectuée trois fois au total. Le contenu du flacon, produit des opérations de prélèvement précédentes, est ensuite filtré par une pompe à vide sur un filtre GF-C de diamètre 45 mm et de porosité 1,2 µm. A la fin de la filtration, le filtre est rincé avec 1000 ml d'eau douce filtrée pour éliminer les résidus de sel qui pourraient perturber les analyses ultérieures.

Après le processus de filtration, le filtre avec l'échantillon est placé et conservé dans une boîte de Pétri lavée à l'eau filtrée et laissée sécher à température ambiante ou dans une étuve thermostatée à 60°C. Une fois sec, nous procédons à l'observation du filtre au microscope optique pour identifier et classer les objets contenus dans l'échantillon, comme indiqué ci-dessus.

3.5 ACCORGIMENTI IN LABORATORIO - MESURES AU LABORATOIRE

Per prevenire contaminazioni esterne da microplastiche tutti i solventi utili al processo di estrazione delle microplastiche dai campioni devono essere filtrati mediante carta filtro con porosità <10 µm. I contenitori, la vetreria, le pinzette e quanto necessario alle operazioni devono essere accuratamente lavati con acqua dolce filtrata prima dell'uso. Qualsiasi oggetto e contenitore utilizzato deve essere preferibilmente in vetro o metallo, e vanno quindi evitati tutti gli oggetti in plastica, dove possibile. Prima di procedere all'applicazione del protocollo di estrazione e classificazione delle microplastiche è opportuno disinfettare con Etanolo al 70% l'intero piano di lavoro. Tutte le operazioni devono essere effettuate sotto cappa e comunque proteggendo il campione da eventuale inquinamento atmosferico e predisponendo sulla postazione di lavoro una trappola di controllo (filtro vuoto). Gli operatori devono evitare l'utilizzo di indumenti in microfibre sintetiche o altri oggetti in plastica e indossare un camice di cotone.

Pour éviter la contamination externe par les microplastiques, tous les solvants utiles pour le processus d'extraction des microplastiques à partir des échantillons doivent être filtrés sur papier filtre de porosité <10 µm. Les récipients, la verrerie, les pinces et tout le nécessaire pour les opérations doivent être soigneusement lavés à l'eau douce filtrée avant utilisation. Tout objet et récipient utilisé doivent de préférence être en verre ou en métal, et par conséquent, tous les objets en plastique doivent être évités dans la mesure du possible. Avant de procéder à l'application du protocole d'extraction et de classification des microplastiques, il est conseillé de désinfecter toute la surface de travail avec de l'éthanol à 70%. Toutes les opérations doivent être effectuées sous une hotte et en tout cas en protégeant l'échantillon de toute pollution atmosphérique et en mettant en place un piège de contrôle (filtre vide) sur le poste de travail. Les opérateurs doivent éviter d'utiliser des vêtements en microfibres synthétiques ou d'autres objets en plastique et porter un manteau en coton.

4. ANALISI DELLE MICROPLASTICHE - ANALYSE DES MICROPLASTIQUES

I campioni di microplastiche ottenuti dalle diverse matrici verranno prima analizzati al

microscopio per quantificare il numero, la tipologia ed il colore delle microplastiche e poi verranno indagati con metodologia chimica per la determinazione dei polimeri.

Les échantillons microplastiques obtenus à partir des différentes matrices seront d'abord analysés au microscope pour quantifier le nombre, le type et la couleur des microplastiques, puis ils seront étudiés avec une méthodologie chimique pour la détermination des polymères.

4.1 ANALISI AL MICROSCOPIO - ANALYSE DU MICROSCOPE

Per l'analisi ottica dei campioni provenienti dalla matrice acqua, sedimento e pesci, verrà impiegato un microscopio della serie Leica Z16 APO interfacciato a un computer per l'acquisizione di immagini digitali, con le seguenti caratteristiche:

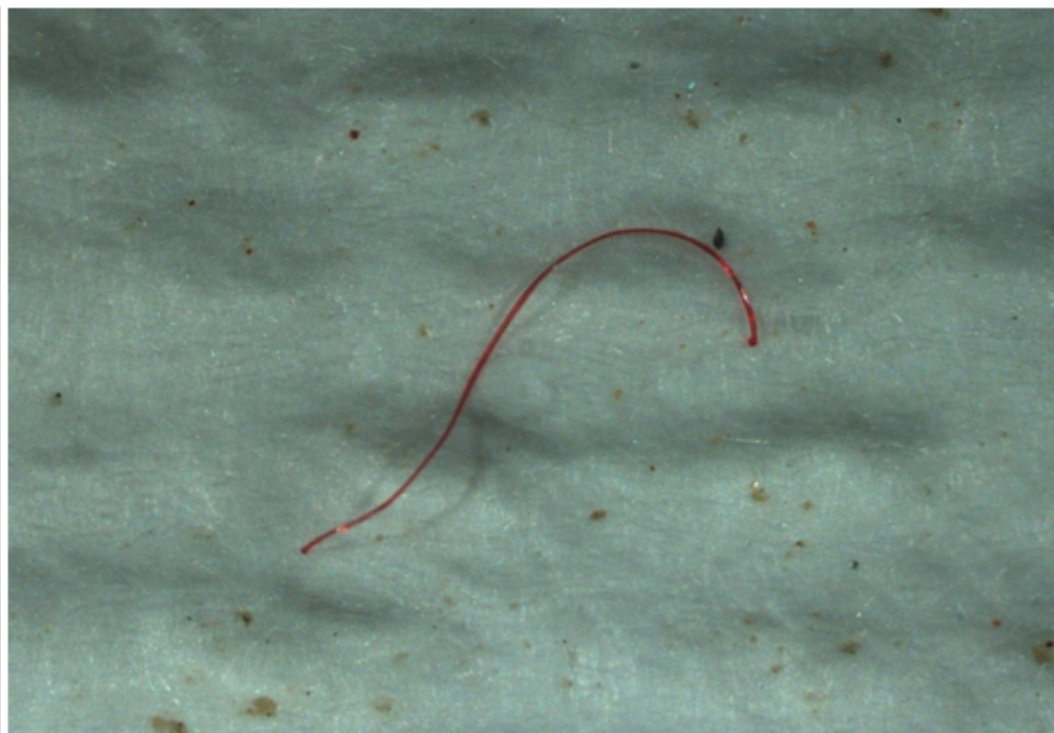
- Zoom 16:1 range 0.57x-97x;
- Ingrandimento totale visuale: 7.1x – 115x (con obiettivo 1.0x e oculari 10x);
- Ingrandimento visuale massimo: 920x;
- Risoluzione variabile: da 336 Lp/mm a 672 Lp/mm;
- Fotocamera digitale.

Ogni campione sarà osservato e tutte le possibili microplastiche saranno fotografate, previo ingrandimento adeguato, misurate e annotate su tabelle appositamente create per lo studio delle microplastiche, prima su carta e poi trasferite su foglio di calcolo elettronico Excel. In queste tabelle verranno annotati: numero del campione; numero della foto; dimensioni per frammento; tipologia (frammento arrotondato, sub- arrotondato, angolare, sub-angolare, pellet cilindrico, pellet a disco, pellet piatto, pellet ovoidale, pellet sferico, filamento, film, plastica espansa/grumosa, granulo, polistirolo o altro); colore (bianco, crema, rosso, arancione, blu, nero, grigio, marrone, verde, rosa, marrone/rossiccio, giallo o altro); lucentezza (lucido, opaco, cristallino o trasparente). Una volta costruita la matrice di dati su Excel contenente tutte le caratteristiche dei frammenti osservati, saranno elaborati dei grafici al fine di valutare la distribuzione della dimensione, della tipologia, del colore e della lucentezza del materiale nelle varie stazioni e nella totalità.

Pour l'analyse optique d'échantillons de la matrice de l'eau, des sédiments et des poissons, un microscope de la série Leica Z16 APO sera utilisé interfacé avec un ordinateur pour l'acquisition d'images numériques, avec les caractéristiques suivantes:

- Zoom 16: 1 plage 0,57x-97x;
- Grossissement visuel total: 7,1x - 115x (avec objectif 1,0x et oculaires 10x);
- Grossissement visuel maximal: 920x;
- Résolution variable: de 336 Lp / mm à 672 Lp / mm;
- Appareil photo numérique.

Chaque échantillon sera observé et tous les microplastiques possibles seront photographiés, soumis à un grossissement adéquat, mesurés et notés sur des tableaux spécialement créés pour l'étude des microplastiques, d'abord sur papier puis transférés sur un tableur Excel. Dans ces tableaux seront notés: le numéro de l'échantillon; numéro de la photo; dimensions par fragment; type (fragment arrondi, sous-arrondi, angulaire, sous-angulaire, pastille cylindrique, pastille de disque, pastille plate, pastille ovoïde, pastille sphérique, filament, film, mousse / plastique grumeleux, granule, polystyrène ou autre); couleur (blanc, crème, rouge, orange, bleu, noir, gris, marron, vert, rose, brun rougeâtre, jaune ou autre); lustre (brillant, opaque, cristallin ou transparent). Une fois la matrice de données construite sur Excel contenant toutes les caractéristiques des fragments observés, des graphiques seront élaborés afin d'évaluer la répartition de la taille, du type, de la couleur et de la luminosité du matériau dans les différentes stations et dans sa totalité.



Esempio di filamento rosso misurato e fotografato al microscopio.
Exemple de filament rouge mesuré et photographié au microscope.



Esempio di pellet a disco trasparente misurato e fotografato al microscopio.
Exemple de pastilles de disque transparent mesurées et photographiées au microscope.

4.2 ANALISI DEI POLIMERI (RAMAN) - ANALYSE DES POLYMÈRES (RAMAN)

Al fine di identificare formalmente i materiali trovati di dimensioni inferiori a 5 mm è considerata essenziale la spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FT-IR) (Lusher *et al.*, 2012). L'analisi con spettrometro FT-IR "Perkin Elmer® Spectrum 65" permette di ottenere uno spettro di assorbimento. Il confronto con lo spettro di assorbimento ottenuto da materiale plastico dei sette diversi tipi noti, identificati dal numero di riciclo ben visibile (es. 01 PET), consente di identificare il tipo di plastica del frammento analizzato.

Tra le tecniche consigliate per la corretta identificazione di materie plastiche vi è anche la spettroscopia Raman o la pirolisi-GC/MS (Löder *et al.*, 2015).

La spectroscopie IR par transformée de Fourier (FT-IR) est considérée comme essentielle pour identifier formellement les matériaux trouvés inférieurs à 5 mm (Lusher *et al.*, 2012). L'analyse avec le spectromètre FT-IR "Perkin Elmer® Spectrum 65" permet d'obtenir un spectre d'absorption. La comparaison avec le spectre d'absorption obtenu à partir de matière plastique des sept types différents connus, identifié par le numéro de recyclage clairement visible (par exemple 01 PET), permet d'identifier le type de plastique du fragment analysé. Parmi les techniques recommandées pour l'identification correcte des plastiques, il y a aussi la spectroscopie Raman ou la pyrolyse-GC/MS (Löder *et al.*, 2015).

5. ANALISI METALLI PESANTI E INTERAZIONE CON IL BIOTA - ANALYSE DES MÉTAUX LOURDS ET INTERACTION AVEC BIOTA (UTLN)

Per estrarre il biofilm, le microplastiche vengono prima filtrate attraverso un setaccio di nylon 100 µm (prelevato con acido) e poi risciacquate con acqua MQ. Il campione viene introdotto in 10 mL di soluzione di NaOH 0,1M s.p.p. e mescolato per inversione per 24 ore ad una velocità compresa tra 3 e 4 RPM. Dopo l'estrazione del biofilm, la soluzione viene filtrata attraverso un filtro di nitrato di cellulosa 0,2 µm prelevato evitando la perdita di microplastica. Per l'analisi del carbonio organico disciolto, vengono introdotti circa 5 mL in una fiala di vetro, vengono aggiunti 20 mL di acqua MQ e la soluzione viene conservata con 24 µL 1M di glutaraldeide. Per l'analisi dei contaminanti metallici, il volume rimanente viene introdotto in un tubo di quarzo con 4,5 mL di acqua MQ e 0,5 mL di H₂O₂ per favorire

l'ossidazione. Il tubo di quarzo viene irradiato con una lampada UV per 12 ore e infine acidificato con 125 µL di HCL s.p. Le analisi del carbonio organico disciolto vengono eseguite utilizzando l'analizzatore TOC-V/TN. L'analisi dei metalli viene eseguita da ICP-MS nei laboratori di Cerege (Aix-en Provence). Le concentrazioni dei metalli in tracce sono state analizzate da ICP-MS su un Perkin Elmer Nexlon 300X . La curva di calibrazione è stata eseguita con standard di diluizione (CCS4, CCS5 e CCS6; Inorganic Ventures, New Jersey USA) in HNO₃ 2%. La qualità analitica è stata regolarmente verificata mediante l'analisi di soluzioni certificate: Acqua potabile EnviroMAT EP-L-3 - SCP, Acqua sotterranea EnviroMAT ES-H-2, e SRLS 5. Le analisi sono state duplicate ogni volta e l'intervallo di confidenza è stato costantemente <5%.

Pour procéder à l'extraction du biofilm, les microplastiques sont tout d'abord filtrés sur un tamis nylon de 100 µm (lavé au préalable à l'acide) puis rincés à l'eau MQ. L'échantillon est introduit dans 10 mL de solution de NaOH 0,1M s.p et agité par retournement pendant 24h à un vitesse comprise entre 3 et 4 RPM. Suite à l'extraction du biofilm, la solution est filtrée à travers un filtre en nitrate de cellulose 0,2 µm lavé au préalable en évitant la perte de microplastiques. Pour l'analyse du carbone organique dissous, environ 5 mL sont introduits dans un vial en verre, 20 mL d'eau MQ sont ajoutés et la solution conservée avec 24 µL de glutaraldehyde 1M. Pour l'analyse des contaminants métalliques, le volume restant est introduit dans un tube en quartz avec 4,5 mL d'eau MQ et 0,5 mL de H₂O₂ pour favoriser l'oxydation. Le tube en quartz est irradié par une lampe UV pendant 12h et finalement acidifié avec 125 µL de HCL s.p. Les analyses de carbone organique dissous sont réalisés à l'aide de l'analyseur TOC-V/TN. L'analyse des métaux est réalisée par ICP-MS dans les laboratoires du Cerege (Aix-en Provence).

Les concentrations en métaux traces ont été analysées par ICP-MS sur un Perkin Elmer Nexlon 300X . La courbe de calibration a été réalisée par dilution de standards (CCS4, CCS5 et CCS6; Inorganic Ventures, New Jersey USA) dans HNO₃ 2%. La qualité analytique a été vérifiée régulièrement par l'analyse de solutions certifiées : EnviroMAT drinking Water EP-L-3 – SCP, EnviroMAT subterranean Water ES-H-2, et SRLS 5. Les analyses ont été dupliquées à chaque fois, et l'intervalle de confiance a été systématiquement <5%.

6. STAZIONI DI CAMPIONAMENTO - STATIONS D'ÉCHANTILLONNAGE

6.1 CARATTERISTICHE E NUMERO DELLE STAZIONI DI CAMPIONAMENTO -

CARACTÉRISTIQUES ET NOMBRE DE STATIONS DE PRÉLÈVEMENT

I campionamenti per la determinazione delle microplastiche verranno effettuati in aree di particolare interesse all'interno dei bacini portuali, ed in particolare in prossimità di fonti di microplastiche, quali foci di torrenti, scarichi fognari, ecc.. I campionamenti verranno ripetuti due volte per ogni singolo porto pilota, in due stagioni diverse per studiare la variabilità nella presenza e quantità di microplastiche durante l'anno e individuare eventuali variazioni per esempio dovute alle piogge autunnali o all'aumento del traffico navale estivo.

Di seguito è riportato il cronoprogramma dei campionamenti previsti:

Les prélèvements pour les microplastiques seront réalisés dans des zones d'intérêt particulier au sein des bassins portuaires, et en particulier à proximité de sources de microplastiques, telles que les bouches de ruisseaux, les rejets d'eaux usées, etc. Les prélèvements seront répétés deux fois pour chacun port pilote unique, en deux saisons différentes pour étudier la variabilité de la présence et de la quantité de microplastiques au cours de l'année et identifier les éventuelles variations, par exemple dues aux pluies d'automne ou à l'augmentation du trafic maritime estival.

Vous trouverez ci-dessous le calendrier des prélèvements prévus:

PORTO - PORT	MESE - MOIS	ANNO - ANNÉE
Genova - Gênes	Dicembre - Décembre	2018
Tolone - Toulon	Marzo - Mars	2019
Genova - Gênes	Giugno - Juin	2019
Tolone - Toulon	Luglio - Juillet	2019
Olbia - Olbia	Ottobre - Octobre	2019

Nei porti coinvolti verranno campionate le seguenti matrici con le rispettive specifiche modalità:

- il sedimento che verrà campionato tramite una benna Van Veen da 5L;
- i pesci verranno catturati tramite l'utilizzo di una rete da pesca e l'ausilio fornito da un pescatore professionista della piccola pesca costiera locale;
- l'acqua verrà campionata tramite una bottiglia Niskin da 5L Van Dorn sempre da 5 L;
- le microplastiche galleggianti verranno campionate tramite l'utilizzo una rete "manta" trainata da mezzo nautico lungo transetti che andranno a coprire tutto lo specchio acqueo portuale.

Dans les ports concernés, les matrices suivantes seront échantillonnées avec leurs méthodes spécifiques respectives:

- les sédiments qui seront prélevés dans un seau Van Veen de 5 L;
- les poissons seront capturés à l'aide d'un filet de pêche et de l'aide fournie par un pêcheur professionnel de la petite pêche côtière locale;
- l'eau sera prélevée dans une bouteille Van Dorn ou Niskin de 5 L;
- les microplastiques flottants seront prélevés à l'aide d'un filet «manta» tiré par un bateau le long de transepts qui couvriront toute la zone portuaire.

6.2 PORTO DI GENOVA - PORT DE GÈNE

All'interno del Porto di Genova, le aree che verranno principalmente monitorate sono tre: il Bacino Porto Vecchio, corrispondente alla parte più interna del porto, dove sono numerose le attività di cantieristica e movimentazione rifiuti, dove sono presenti uno scarico fognario e numerosi sbocchi di rii cittadini, e dove si concentra il traffico passeggeri; l'entrata di levante del porto, in prossimità della foce del torrente Bisagno, dove sono concentrate le marine per il diporto e la cantieristica navale; l'entrata di ponente del Porto, zona antistante la foce del torrente Polcevera in prossimità della quale è presente lo sbocco di una condotta fognaria.

Au sein du port de Gênes, les principaux domaines qui seront surveillés sont trois: le bassin de Porto Vecchio, correspondant à la partie la plus intérieure du port, où se déroulent de nombreuses activités de construction navale et de traitement des déchets, où se trouvent un égout et de nombreux débouchés des cours d'eau de la ville et où le trafic de passagers est

concentré; l'entrée est du port, près de l'embouchure du ruisseau Bisagno, où se concentrent les marinas de plaisance et de construction navale; l'entrée ouest du port, une zone en face de l'embouchure du ruisseau Polcevera près de laquelle se trouve la sortie d'un tuyau d'égout.



6.3 PORTO DI OLBIA - PORT DE OLBIA

All'interno del Porto di Olbia le aree principalmente monitorate saranno antistanti la foce del Fiume Padrongianus, principale immissario di acqua all'interno del Golfo di Olbia, nel settore Sud, l'area industriale nel settore Nord, e l'ingresso dove sono presenti gli impianti di mitilicoltura.

Au sein du port d'Olbia, les zones principalement surveillées se situeront en face de l'embouchure de la rivière Padrongianus, principal affluent des eaux du golfe d'Olbia, dans le secteur sud, la zone industrielle dans le secteur nord et l'entrée où elles sont présentes. les installations mytilicoles.



6.4 PORTO DI TOLONE - PORT DE TOULON

Nel porto di Tolone le aree che verranno indagate sono tre: la piccola rada, la parte più interna alla diga, dove si affaccia la città di Tolone; la grande rada, esterna alla diga, dove sono presenti scarichi fognari; la parte più esterna alla rada e meno impattata dalla presenza della città e dalle attività antropiche.

Dans le port de Toulon, les zones qui seront explorées sont au nombre de trois: la petite baie, la partie la plus intérieure du barrage, qui surplombe la ville de Toulon; la grande baie, à l'extérieur du barrage, où il y a des égouts; la partie la plus extérieure du port et moins impactée par la présence de la ville et des activités anthropiques.



Bibliografia - Bibliographie

Autorità Portuale Nord Sardegna, 2015. Piano di gestione dei rifiuti prodotti dalle navi e dei residui del carico. pp. 79.

Comune di Olbia, 2015. Studio preliminare ambientale. Progetto per la realizzazione di una darsena pescherecci a servizio dell'impianto di stoccaggio e trasformazione del pescato. pp. 55.

Galgani F., Hanke G., Werner S., Oosterbaan L., Nilsson P., Fleet D., Kinsey S., Thompson R., Van Franeker J., Vlachogianni T., 2013. Monitoring guidance for marine litter in European seas. MSFD GES Technical Subgroup on Marine Litter (TSG-ML). DRAFT REPORT, 120p.

Löder, M. G. J. & Gerdts, G., 2015. Methodology used for the detection and identification of microplastics – A critical appraisal in Marine Anthropogenic Litter (eds Bergmann, M. et al.) Ch. 8, 201–227.