



# RAPPORTI ISTISAN 21|2

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

## **Strategie di campionamento di microplastiche negli ambienti acquatici e metodi di pretrattamento**

L. Martellone, L. Lucentini, D. Mattei,  
M. De Vincenzo, G. Favero, S. Bogialli,  
L. Litti, M. Meneghetti, F. Corami, B. Rosso



AMBIENTE  
E SALUTE



# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

## **Strategie di campionamento di microplastiche negli ambienti acquatici e metodi di pretrattamento**

Lorenzo Martellone (a,b), Luca Lucentini (a), Daniela Mattei (a),  
Massimo De Vincenzo (a), Gabriele Favero (b), Sara Bogialli (c),  
Lucio Litti (c), Moreno Meneghetti (c), Fabiana Corami (d,e), Beatrice Rosso (e)

*(a) Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco,  
Università degli Studi "Sapienza" di Roma*

*(c) Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Padova, Padova*

*(d) Istituto di Scienze Polari, CNR, Sede di Venezia*

*(e) Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica,  
Università Ca' Foscari, Venezia*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN**  
**21/2**

Istituto Superiore di Sanità

### **Strategie di campionamento di microplastiche negli ambienti acquatici e metodi di pretrattamento**

Lorenzo Martellone, Luca Lucentini, Daniela Mattei, Massimo De Vincenzo, Gabriele Favero, Sara Bogialli, Lucio Litti, Moreno Meneghetti, Fabiana Corami, Beatrice Rosso  
2021, iii, 39 p. Rapporti ISTISAN 21/2

Le microplastiche rappresentano contaminanti ambientali “emergenti” ampiamente diffusi negli ambienti acquatici e da tempo studiati per i possibili effetti sulla salute umana e animale. Possono appartenere a polimeri molto diversi tra loro e presentano una eterogeneità dimensionale, come sottolineato dalla definizione che l'ECHA ha nel 2019, “dimensioni comprese tra  $1 \text{ nm} \leq x \leq 5 \text{ nm}$  o per fibre di lunghezza compresa tra  $3 \text{ nm} \leq x \leq 15 \text{ nm}$ , con rapporto lunghezza/ diametro  $> 3$ ”. I metodi per il loro campionamento e il pretrattamento necessario per la loro corretta identificazione e quantificazione riflettono questa eterogeneità dimensionale. In relazione alla tipologia e alla destinazione d'uso delle acque, il campionamento può essere effettuato raccogliendo direttamente l'acqua in contenitori adatti o filtrando l'acqua *in situ*. Quest'ultima soluzione, la più impiegata per la possibilità di filtrare volumi d'acqua elevati, soprattutto per acque destinate al consumo umano, prevede l'utilizzo di specifiche reti per il campionamento o sistemi di filtrazione specifici attraverso i quali l'acqua viene convogliata tramite una pompa o mediante un tubo collegato al rubinetto. I metodi di pretrattamento più comuni prevedono ulteriori filtrazioni, un'estrazione per separare le microplastiche dagli interferenti e una digestione per rimuovere il contenuto organico e biologico presente nel campione.

*Parole chiave:* Microplastiche; Acqua; Ambiente; Analisi del rischio

Istituto Superiore di Sanità

### **Sampling strategies and pretreatment methods for microplastics in aquatic environments.**

Lorenzo Martellone, Luca Lucentini, Daniela Mattei, Massimo De Vincenzo, Gabriele Favero, Sara Bogialli, Lucio Litti, Moreno Meneghetti, Fabiana Corami, Beatrice Rosso  
2021, iii, 39 p. Rapporti ISTISAN 21/2 (in Italian)

Microplastics can be considered environmental “emerging” contaminants. Extremely widespread in water bodies, microplastics have been studied for some time due to the possible effects on human and animal health. One of the main problems related to microplastics analysis in environmental matrices is due to the size range. Their definition, according to ECHA (2019), is particles have (i) all dimensions  $1 \text{ nm} \leq x \leq 5 \text{ nm}$ , or (ii), for fibres, a length of  $3 \text{ nm} \leq x \leq 15 \text{ nm}$  and length to diameter ratio of  $>3$ . Sampling and pre-treatment methods for identifying and quantifying microplastics reflect this issue. In relation to their type and destination of use, water sampling can be done simply collecting water or by *in situ* filtration. The latter method is the most used, especially for water intended for human consumption, because high volumes can be filtered. This can be achieved with a specific sampling net or through a filtration system where water is usually conveyed with a pump or with a hose connected to the tap. Pre-treatment methods include additional filtrations, a digestion step necessary for organic matter removal and an extraction procedure to remove interferers.

*Key words:* Microplastics, Water; Environment; Risk analysis

Per informazioni su questo documento scrivere a: [daniela.mattei@iss.it](mailto:daniela.mattei@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

Citare questo documento come segue:

Martellone L, Lucentini L, Mattei D, De Vincenzo M, Favero G, Bogialli S, Litti L, Meneghetti M, Corami F, Rosso B. *Strategie di campionamento di microplastiche negli ambienti acquatici e metodi di pretrattamento*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2021. (Rapporti ISTISAN 21/2).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



# INDICE

<b>Premessa</b> .....	iii
<b>Microplastiche e ambiente: uno sguardo d'insieme</b> .....	1
Rischio e tossicità .....	2
Diffusione di microplastiche nelle acque .....	4
Tecniche analitiche .....	7
<b>Campionamento</b> .....	10
Volume del campione .....	11
Scelta del metodo di campionamento .....	12
Campionamento tramite reti .....	13
Campionamento tramite pompe e allaccio alla rete idrica .....	17
Altri approcci al campionamento .....	18
Strategie per il campionamento .....	19
<b>Conservazione dei campioni</b> .....	22
<b>Procedure di pretrattamento e filtrazione dei campioni</b> .....	23
Digestione .....	23
Flottazione per densità .....	25
Filtrazione .....	27
Altre tecniche di pretrattamento del campione .....	28
Strategie per pretrattamento e filtrazione dei campioni .....	29
<b>Conclusioni</b> .....	31
<b>Bibliografia</b> .....	32



## PREMESSA

La nuova direttiva sulla qualità delle acque destinate al consumo umano, Direttiva (UE) 2020/2184, si pone come obiettivi fondamentali quelli della protezione della salute umana e del miglioramento dell'accesso all'acqua. Essi sono centrati su strategie di prevenzione e controllo basate sull'analisi di rischio integrata sito-specifica ed estesa all'intera filiera idro-potabile, secondo i principi dei *Water Safety Plans* (WSP, Piani di Sicurezza dell'Acqua, PSA). I PSA, proposti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, sono stati adottati in Italia come linee guida proposte dall'Istituto Superiore di Sanità e dal Ministero della Salute.

L'adozione di procedure di analisi di rischio secondo il modello PSA consente di superare i limiti dell'attuale sistema di controllo sulle acque destinate al consumo umano per prevenire efficacemente emergenze idro-potabili anche dovute a parametri attualmente non oggetto di ordinario monitoraggio. Sulla base del modello, viene considerato ogni plausibile evento pericoloso che può manifestarsi alle sorgenti, alla captazione e lungo l'intera filiera idro-potabile, anche proiettato in uno scenario alterato dai cambiamenti climatici e ambientali in atto.

In questo contesto, considerando l'ubiquitarietà delle microplastiche, i rischi potenziali di esposizione ad esse associabili attraverso le acque sono riconducibili sia alla presenza delle stesse particelle fisiche, sia a sostanze chimiche e ad agenti patogeni correlati al biofilm teoricamente presente sulle particelle. Il rischio per la salute che ne può derivare è funzione sia del pericolo (come potenziale causa di danno), sia dell'esposizione (dose). La stessa sostanza può avere effetti diversi a dosi diverse, in funzione della quantità di sostanza a cui si viene esposti e dalla via attraverso la quale si verifica l'esposizione.

C'è quindi una urgente necessità di studi che forniscano evidenze solide – attraverso metodiche efficaci, validate e armonizzate – sulla potenziale esposizione a microplastiche attraverso le acque e alle eventuali conseguenze sulla salute, come pure verso tecniche di rimozione di microplastiche dall'acqua potabile.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità precisa che il monitoraggio di routine delle microplastiche nell'acqua potabile non è raccomandato.

Pur tuttavia, anche alla luce dei nuovi principi normativi, con il presente rapporto si intende fornire un approfondimento sullo stato dell'arte sia delle procedure di campionamento di microplastiche negli ambienti acquatici, sia dei metodi di pretrattamento. Questa disamina può rappresentare un presupposto per un primo studio di esposizione che potrà basarsi su un monitoraggio nazionale su acque di differente origine e su sistemi di trattamento, anche per supportare la Commissione Europea nell'adozione di un'adeguata metodologia di determinazione e rilevamento delle microplastiche sulla base di quanto previsto dall'Art. 13 della nuova direttiva sulla qualità delle acque destinate al consumo umano.

Lucia Bonadonna  
*Direttore f.f.*  
*Dipartimento Ambiente e Salute*



## MICROPLASTICHE E AMBIENTE: UNO SGUARDO D'INSIEME

Le microplastiche rappresentano uno dei problemi ambientali più discussi degli ultimi anni.

L'interesse per questi contaminanti è rapidamente cresciuto nell'ultimo decennio (1, 2), viste le possibili ripercussioni di carattere ambientale e sanitario a cui sono stati associati.

Nonostante vengano attivamente studiate da diverso tempo, una definizione univoca di microplastica ancora non è stata concordata (3), a causa della loro estrema eterogeneità e della mancanza di uniformità nei criteri per la loro classificazione.

Le microplastiche costituiscono un insieme variegato di polimeri di dimensioni, tipologie, forme e colori differenti (3) ai quali vengono spesso aggiunti diversi additivi e plastificanti per motivazioni di natura tecnologica.

I criteri dimensionali e relativi alla composizione chimica delle microplastiche interessano la comunità scientifica per definire gli aspetti di caratterizzazione e quantificazione delle stesse.

Nel gennaio 2019, l'Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche (*European Chemical Agency*, ECHA) ha fornito una definizione precisa (5) di microplastica relativamente all'aspetto dimensionale, stabilendo un limite massimo e minimo. Secondo l'ECHA, sono microplastiche tutte "quelle particelle/fibre contenenti polimeri solidi, alle quali possono essere aggiunti additivi o altre sostanze; le particelle hanno dimensioni comprese tra  $1\text{ nm} \leq x \leq 5\text{ mm}$  e le fibre hanno lunghezza compresa tra  $3\text{ nm} \leq x \leq 15\text{ mm}$ , con rapporto lunghezza/diametro  $> 3$ ".

Si tratta di un range davvero molto esteso in grado di coprire particelle e fibre anche molto diverse tra di loro e che possono per questo rappresentare un problema ambientale, tossicologico e analitico sostanzialmente differente. È per questo necessario distinguere tra le microplastiche più grandi ( $> 100\text{ }\mu\text{m}$ ) e quelle più piccole, le *Small MicroPlastics* (SMP) ( $< 100\text{ }\mu\text{m}$ ).

Poiché nella maggior parte dei protocolli analitici il range di microplastiche ricercato è scandito dall'apertura delle maglie dello strumento utilizzato per il campionamento o per la successiva filtrazione (reti, maglie, filtri), le SMP sono molto spesso trascurate in quanto non sufficientemente ritenute.

L'aspetto relativo alla composizione delle microplastiche risulta allo stesso modo controverso. In letteratura si ritrovano diverse definizioni, a volte anche divergenti tra di loro.

La norma ISO (ISO/TR21960) (6) esclude, ad esempio, dalla definizione di microplastica gli elastomeri. Diversamente, il *German Federal Ministry of Education and Research* (*Bundesministerium für Bildung und Forschung*, BMBF) considera le microplastiche un sottogruppo di polimeri nel quale gli elastomeri vengono inclusi (7). In linea generale, comunque, sono inclusi nel gruppo i polimeri naturali modificati ed esclusi quelli naturali e biodegradabili (5).

In tale scenario, la maggior parte degli studi si è focalizzata sui polimeri esclusivamente sintetici, come il polipropilene (PP) e il polietilene tereftalato (PET). In letteratura si trovano, fra gli altri, dati riferiti anche a polietilene ad alta o bassa densità (HDPE e LDPE), polivinilpirrolidone (PVP, un componente di diversi cosmetici; dovrebbe essere considerato additivo, ma è annoverato tra le microplastiche), polistirene (PS, anche a bassa densità LDPS), poliammidi (PA), acetato di cellulosa (CA), polivinilcloruro plasticizzato (pPVC) e polivinilcloruro non plasticizzato (uPVC).

L'identificazione del polimero consente di predire il loro comportamento nell'ambiente, il possibile danno agli esseri viventi e di attuare specifiche strategie in ambito analitico. Ad esempio, la densità, che dipende dalle caratteristiche chimiche della plastica presa in esame, permette di

comprendere quali polimeri si ritroveranno con maggior facilità negli strati superficiali dell'acqua e quali invece tenderanno a depositarsi più in profondità nella colonna d'acqua o nei sedimenti.

Oltre ad aver fornito una chiara definizione delle microplastiche in termini dimensionali, l'ECHA ha evidenziato (5) la necessità dell'identificazione polimerica come mezzo per stimare la diffusione di questi contaminanti nell'ambiente. Questa è possibile tramite tecniche analitiche appropriate come la spettroscopia infrarossa o la spettroscopia Raman.

Una definizione estensiva di microplastica è tuttavia richiesta per comprenderne appieno i pattern di distribuzione nell'ambiente e per consentire lo sviluppo di protocolli analitici affidabili e robusti. Risulta quindi necessario definire in maniera appropriata anche le caratteristiche secondarie delle microplastiche quali forma e origine.

Le forme della microplastica può essere utile per comprendere origine, percorsi, trasporto e distribuzione nell'ambiente di questi contaminanti, soprattutto per le SMP (< 100 µm.).

In letteratura sono diversi i metodi proposti per la classificazione delle forme delle microplastiche > 300 µm. Tuttavia, come suggerito da Hartmann *et al.* (8), per questo criterio è fondamentale adottare un approccio rigoroso con lo scopo di ridurre il numero di forme effettivamente rilevate al momento dell'ispezione visiva, in modo da semplificare le operazioni analitiche.

I termini *sphere*, *pellet* e *bead* rappresentano tutte plastiche di forma pseudosferica, che differiscono tra loro per l'origine e per l'utilizzo. Per tutti questi polimeri il termine "sfera" o "sferoide" può essere utilizzato per descrivere in maniera esaustiva la loro forma.

Il termine *fragment* viene spesso utilizzato per descrivere particelle di forma irregolare, ma il termine in sé fa presupporre che siano plastiche derivate esclusivamente dalla frammentazione di particelle più grandi. Poiché esistono microplastiche prodotte già con questa forma, come gli abrasivi utilizzati in cosmetica, il termine più corretto da utilizzare per queste dovrebbe essere "particelle irregolari".

La categoria dei *film* si presta meno a incomprensioni, in quanto si tratta di microplastiche di forma planare in cui una delle tre dimensioni è notevolmente più piccola rispetto alle altre due. Le plastiche con un rapporto lunghezza/diametro >3, vengono invece descritte come "fibre" o "filamenti".

Per le microplastiche più piccole (soprattutto per le SMP) può essere invece utilizzato l'*aspect ratio* o elongazione, un parametro morfologico adimensionale che permette di definire queste particelle come sferoidali, allungate o di forma cilindrica.

Come già detto, la forma delle microplastiche spesso dipende dalla loro origine.

Il concetto di origine delle microplastiche è legato alle modalità con le quali questi contaminanti entrano nell'ambiente.

Per microplastiche primarie (3,8) si intendono quelle direttamente immesse nell'ambiente con quel particolare range dimensionale (es. fibre sintetiche negli scarichi dei lavaggi, usura degli pneumatici, *city dust*, vernici derivanti da segnaletiche stradali, *coating* protettivi utilizzati per rivestire le imbarcazioni, *microbead* utilizzate nei cosmetici, ecc.).

Le microplastiche secondarie si formano invece in seguito alla degradazione di oggetti di plastica di più grandi dimensioni (come imballaggi di vario tipo, bottiglie, rifiuti plastici, ecc.) attraverso diversi processi di alterazione fisica, chimica e biologica come la fotodegradazione o degradazione termica.

## Rischio e tossicità

Poco ancora si conosce riguardo la tossicità e l'impatto sulla salute umana delle microplastiche. I motivi dell'incertezza sono attribuibili al fatto che le variabili associate alla

caratterizzazione e classificazione di queste ultime non sono standardizzate, come spesso non lo sono le indagini tossicologiche. Come conseguenza, ad oggi sono disponibili solo pochi dati relativi alla tossicità delle microplastiche.

Le evidenze raccolte fino ad ora hanno permesso di ipotizzare due possibili modalità con le quali questi contaminanti sono in grado di causare danno agli esseri viventi (Figura 1).



**Figura 1. Meccanismi di danno associati alle microplastiche**

Primariamente è stato ipotizzato un danno diretto, attribuibile all'interazione delle particelle di plastica con gli organi e i tessuti degli animali (danno particellare).

In secondo luogo, è stata valutata la possibile tossicità indiretta, attribuibile alle caratteristiche intrinseche delle particelle, alla loro capacità di interagire con l'ambiente circostante e alla possibilità di agire come vettori di altri inquinanti (organici e inorganici), nonché patogeni di varia natura.

Il danno diretto è associato alla capacità degli organismi viventi di inalare o ingerire le microplastiche tramite l'esposizione ad acqua contaminata e unitamente a fenomeni di biomagnificazione. Queste possono poi venir assorbite e trasportate verso regioni specifiche dell'organismo in questione causando danno.

La capacità delle plastiche di determinare danno diretto dipende principalmente dalle dimensioni particellari. Ciò è dovuto a due motivi:

- Gli organismi ingeriscono le microplastiche in relazione alle dimensioni dei loro apparati boccali. Gli invertebrati alla base della rete trofica, quindi, non possono ingerire particelle più grandi di 100  $\mu\text{m}$  (SMP); solamente queste ultime hanno perciò la potenzialità di arrivare, tramite biomagnificazione, ad organismi ai livelli più alti, uomo compreso.
- Gli organismi assorbono le microplastiche ingerite in virtù delle caratteristiche del loro apparato gastrointestinale. Ad esempio, particelle più grandi delle SMP hanno maggiore difficoltà ad essere assorbite nel tratto gastrointestinale umano, motivo per cui effetti sistemici attribuibili a microplastiche di dimensioni maggiori (>100  $\mu\text{m}$ ) sembrano da escludersi (9, 10).

Alcuni studi sulla fauna marina (11) hanno evidenziato la capacità di accumulo di questi contaminanti nei tessuti con effetti associabili a lesioni anche severe al tratto gastrointestinale, ritardo della crescita, riduzione della fertilità e del tasso di sopravvivenza della progenie.

L'ingestione di microplastiche, anche se a concentrazioni elevate, è stata inoltre associata ad una irritazione e infiammazione intestinale nell'uomo. Sempre in relazione alle loro dimensioni, le microplastiche sarebbero dotate anche della capacità di accumularsi all'interno dei fagociti compromettendo la risposta immunitaria locale (12).

La tossicità secondaria è invece legata a molteplici aspetti indipendenti l'uno dall'altro.

Le microplastiche possono rappresentare dei vettori di altri inquinanti adsorbiti sulla loro superficie (composti organici, elementi in tracce) o presenti come additivi e plastificanti (13, 14).

Sebbene il contributo delle microplastiche alla diffusione di questi inquinanti, rispetto a quello di altre fonti ambientali, possa risultare minore, non dovrebbe essere sottovalutato. Fra gli inquinanti associati alle microplastiche sono infatti inclusi polibromodifenileteri (PBDE), ftalati, biossido di titanio e alcuni coloranti contenenti cadmio, universalmente riconosciuti come nocivi per la salute umana e animale.

La natura idrofobica delle microplastiche può inoltre consentire lo sviluppo di biofilm batterici permettendo il trasporto, anche a lunga distanza, di microrganismi.

Lo sviluppo del biofilm può influenzare cambiamenti e strutture della comunità microbica preesistente e potrebbe anche incrementare lo scambio di materiale genetico, contribuendo alla diffusione dell'antibiotico-resistenza (15, 16). Sono comunque necessari ulteriori studi per comprendere appieno il ruolo delle microplastiche nella diffusione di patogeni e nello sviluppo delle antibiotico-resistenze.

In ultima analisi, il rilascio di alcuni monomeri derivati dalla degradazione dei polimeri potrebbero provocare ulteriori effetti tossici, ancora poco studiati e approfonditi. Alcuni limitati studi riguardante lo stirene residuo dagli imballaggi alimentari indicherebbero la possibilità di causare rischi per la salute umana (17).

## Diffusione di microplastiche nelle acque

Le microplastiche sono ampiamente diffuse a livello globale (18, 19) e sono state ritrovate in un'estesa varietà di matrici ambientali, incluse quelle biologiche (20, 21).

Gli ambienti acquatici rappresentano un importante bacino di accumulo per questi contaminanti poiché in essi confluiscono microplastiche da numerose fonti.

A causa della presenza di rifiuti plastici di grosse dimensioni e ad alto impatto sull'ambiente, l'ecosistema marino è stato il primo ad essere indagato (2) ed è quello su cui si sono focalizzate la maggior parte delle ricerche nell'ultimo decennio, anche a causa degli effetti diretti sugli organismi acquatici. Le microplastiche primarie raggiungono il mare tramite deposizione atmosferica e/o tramite le acque interne, mentre le microplastiche secondarie sono la diretta conseguenza dei fenomeni degradativi a carico dei rifiuti plastici sospesi in mare (22-24).

Negli ultimi anni, visti i numerosi interrogativi circa gli effetti sulla salute umana, l'interesse della ricerca si è parzialmente spostato sulle modalità con cui le microplastiche raggiungono le acque interne e sull'impatto che potrebbero avere sulla distribuzione dell'acqua potabile (24).

Questi *pattern* di distribuzione possono essere sommariamente divisi in tre grandi categorie: fonti terrestri, fonti idriche e fonti atmosferiche (Figura 2).

La contaminazione dell'acqua da fonti terrestri avviene principalmente per fenomeni di usura del manto stradale (in particolare dalla degradazione delle vernici utilizzate per la segnaletica orizzontale) e degli pneumatici delle automobili. A questa potrebbe inoltre contribuire la cosiddetta *city dust*, il risultato dell'abrasione di diversi oggetti in plastica comuni nelle zone abitate, come le soles delle scarpe e i tappeti erbosi sintetici (25, 26).



**Figura 2. Principali fonti di contaminazione delle acque interne**

Le fonti idriche maggiormente coinvolte nei fenomeni di accumulo sono invece rappresentate dalle acque di scarico provenienti da lavaggio (la fonte più abbondante di microplastiche primarie) (27), dalle acque di scarico civile o industriale, dalle acque di dilavamento urbano o agricolo e dagli impianti di trattamento delle acque reflue (26, 28).

Le acque reflue raccolgono diverse tipologie di microplastiche utilizzate in ambito domestico e civile (fibre tessili rilasciate durante i lavaggi, prodotti di usura di materiali plastici, guarnizioni, vernici, e microsfele utilizzate in cosmetica) ma anche industriale (fluidi di perforazione, paste cementanti contenenti microsfele in PET, prodotti per la rimozione di ruggine e vernici che utilizzano scrubber in poliestere).

L'efficacia degli impianti di trattamento nel rimuoverle è molto dibattuta (29, 30). Ciò è legato al fatto che le strategie di purificazione adottate da ogni impianto di trattamento possono essere anche molto diverse tra di loro e generalmente non sono specifiche per la rimozione delle microplastiche. Inoltre, al di là dell'efficacia globale del processo, l'ampio volume d'acqua trattato in questi impianti potrebbe comunque contribuire all'introduzione di microplastiche nell'ambiente acquatico.

Un'altra fonte di contaminazione è rappresentata dai sistemi fognari misti (26), la tipologia più diffusa di sistemi per la raccolta delle acque. Questi consentono di raccogliere contemporaneamente i reflui e le precipitazioni meteoriche recepite a livello stradale col fine di convogliarli all'impianto di trattamento (*stormwaters*). Quando i volumi di acqua superano la capacità di carico dell'impianto (es. durante intense perturbazioni meteorologiche), per motivi di sicurezza, l'acqua bypassa l'impianto attraverso scolmatori di piena e viene riversata direttamente nel corpo idrico recettore, contribuendo direttamente alla diffusione ambientale di microplastiche.

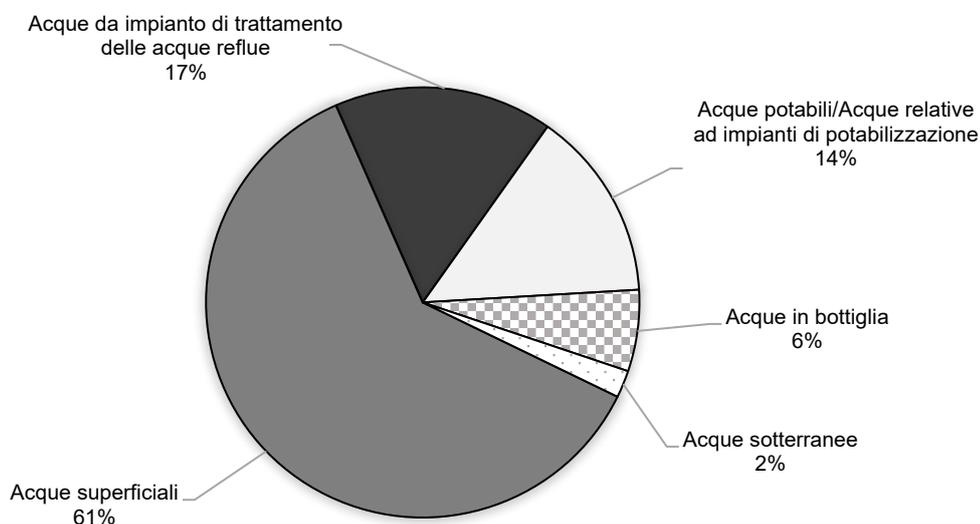
Per quanto concerne le acque potabili, potrebbero contribuire alla contaminazione anche tutti i materiali con cui l'acqua entra in contatto, quali ad esempio la componentistica delle tubazioni e dei filtri utilizzati negli impianti di potabilizzazione (31, 32).

Anche la deposizione atmosferica potrebbe avere un ruolo significativo nella contaminazione delle acque interne. Sebbene siano disponibili pochi dati al riguardo e i meccanismi di trasporto delle microplastiche nell'aria siano ancora poco compresi (3), alcuni studi presenti in letteratura hanno confermato la tendenza di queste particelle a spostarsi per effetto del vento. I prodotti dell'usura stradale e degli pneumatici già descritti tra le fonti terrestri, le fibre sintetiche dei vestiti

(in particolare quelli stesi ad asciugare), le plastiche dei materiali da costruzione e quelle contenute nei fanghi di depurazione degli impianti di trattamento dell'acqua, se lasciati all'aperto, possono raggiungere l'atmosfera e successivamente le acque interne e marine (12, 33). Inoltre, alla stregua di quanto accade nelle acque marine, anche la frammentazione di plastiche di grandi dimensioni può determinare il rilascio di microplastiche secondarie nelle acque in questione (34, 35).

I risultati degli studi sulla contaminazione delle acque interne condotti in questi ultimi anni hanno prodotto risultati disomogenei. Ciò è essenzialmente attribuibile alle dimensioni delle microplastiche oggetto di ricerca (es. SMP o microplastiche > 100 µm), alle diverse tipologie di acque interne sulle quali vengono condotte le analisi (lentiche, lotiche, ad uso potabile, ecc.), alle strategie analitiche impiegate per la classificazione e quantificazione e alle differenti modalità di interpretazione dei risultati.

La Figura 3 riporta i lavori scientifici pubblicati fino a giugno 2020 del database MEDLINE relativi alle analisi di microplastiche in diverse matrici acquose.



**Figura 3. Pubblicazioni nel database MEDLINE relative all'analisi di microplastiche in diverse matrici acquose (aggiornato a giugno 2020)**

In letteratura sono presenti diversi studi sulle acque superficiali, poiché inizialmente scelte per un confronto con quelle marine. La diffusione di questa tipologia di studio è stata inoltre facilitata dalla possibilità di utilizzare, con le dovute accortezze, gli stessi metodi analitici utilizzati per le acque marine (campionamento con rete Manta, digestione organica, flottazione per densità) (36). Contemporaneamente è emerso l'interesse sulle capacità di purificazione degli impianti di trattamento delle acque reflue, con l'introduzione di approcci alternativi adatti per questo tipo di contesto (campionamento tramite sistema di pompaggio, utilizzo di setacci posti in serie). L'analisi dei reflui è ampiamente rappresentata in letteratura, a discapito dello studio di matrici di nuovo interesse come quelle dell'acqua potabile in distribuzione e dell'acqua in bottiglia a cui la comunità scientifica si sta avvicinando solo negli ultimi anni (3). Quantità maggiori di microplastiche nelle acque si riscontrano prevalentemente intorno alle zone urbanizzate e

industriali (37, 38) e alcuni metodi di rimozione dei contaminanti all'interno dell'impianto di trattamento si sono rivelati poco adatti per l'abbattimento o diminuzione in quantità di alcune plastiche dal refluo (es. la coagulazione con poliacrilammide per la rimozione del polietilene) (39). Solamente negli ultimi anni sono emersi i primi dati relativi alla contaminazione di acque sotterranee, dell'acqua in distribuzione e di quella in bottiglia. I dati preliminari sulle acque sotterranee indicano una minore contaminazione rispetto all'acqua superficiale, probabilmente per l'assenza del contributo della deposizione atmosferica (32). Attualmente è opinione comune, vista la tipologia prevalente di microplastiche ritrovate nei campioni, che la contaminazione dell'acqua in bottiglia ad opera di questi polimeri avvenga invece prevalentemente durante il packaging e l'imbottigliamento (40-43).

## Tecniche analitiche

In letteratura sono disponibili diversi protocolli analitici per l'identificazione e la quantificazione delle microplastiche, per lo più riconducibili a quelli utilizzati per le acque marine, sebbene in alcuni casi risultino semplificati rispetto a questi ultimi dato il minor effetto matrice.

Le dimensioni delle microplastiche da analizzare guidano la scelta della tecnica analitica e della relativa strumentazione necessaria.

Le varie tecniche disponibili possono essere distinte sulla base della loro capacità di determinare alcune delle proprietà delle microplastiche.

Si distinguono pertanto tecniche basate unicamente sulla microscopia, tecniche cromatografiche e tecniche spettroscopiche. Più tecniche possono comunque essere utilizzate in sequenza o in associazione per sopperire ai limiti analitici di una o dell'altra di valutare una proprietà caratteristica delle microplastiche.

Quest'ultimo approccio è sempre preferito, perché permette di determinare simultaneamente diverse loro proprietà, rispondendo in maniera adeguata alla necessità di definirle in maniera più estesa (8, 44).

Nel gruppo delle tecniche unicamente basate sulla microscopia rientrano la microscopia ottica e la microscopia elettronica a scansione (*Scanning Electron Microscopy*, SEM). Queste tecniche permettono di valutare forma e dimensioni delle particelle oltre che permetterne la conta, ma non consentono l'identificazione chimica del polimero (come evidenziato anche da ECHA) (5).

Qualora si utilizzi un microscopio a fluorescenza e un colorante, il conteggio è semplificato e risulta possibile distinguere, anche se in maniera grossolana (cioè senza una vera e propria identificazione polimerica), le microplastiche dalle altre particelle presenti nel campione.

Questo approccio può però generare dei falsi positivi a causa della ridotta selettività di alcuni coloranti e all'impossibilità di identificare il polimero senza l'ausilio di altre tecniche.

La SEM rappresenta la tecnica d'elezione per la valutazione delle caratteristiche superficiali delle particelle, specie di quelle più piccole e può essere eseguita contestualmente all'analisi spettroscopica (45, 46).

La tecnica cromatografica più utilizzata per l'analisi delle microplastiche è rappresentata, al contrario, dalla gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa accoppiata a pirolisi (*Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Pyr-GC/MS). Questa tecnica accoppiata consente di identificare microplastiche e additivi ad esse correlati, ma non permette di ricavare alcuna informazione sulla forma, sul numero e sul colore degli analiti. È inoltre una tecnica distruttiva, che non permette analisi multiple o in parallelo (3). Richiede tuttavia una preparazione del campione minima, rispetto ad altre tecniche.

Le tecniche spettroscopiche come la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, FT-IR) e la spettroscopia Raman permettono l'identificazione chimica delle particelle e consentono di valutarne anche forma e numero quando accoppiate a microscopia (microscopia FT-IR o  $\mu$ -FT-IR e microscopia Raman o  $\mu$ -Raman).

Si tratta di tecniche non distruttive che permettono anche analisi multiple sullo stesso campione. L'interpretazione dei dati è inoltre agevolata dall'esistenza di software dedicati che consentono di ridurre notevolmente i tempi d'esecuzione delle analisi.

Pertanto, i metodi spettroscopici (specie quelli accoppiati a microscopia) rappresentano la migliore scelta per l'analisi quali-quantitativa delle microplastiche e sono quelli più utilizzati nei vari protocolli analitici presenti in letteratura.

Ciascuna tecnica prevede una fase di campionamento e di pretrattamento del campione prima dell'analisi (Tabella 1). Queste risultano fondamentali per la rappresentatività dei risultati, vista l'elevata possibilità di contaminazione e le problematiche analitiche dovute all'effetto matrice.

**Tabella 1. Classificazione delle tecniche analitiche per l'analisi delle microplastiche in campioni ambientali**

Tecnica	Caratteristiche
<b>Microscopica</b>	
Ottica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permette la conta e la classificazione per forma delle microplastiche nel campione ma non la loro identificazione chimica</li> <li>• Metodo generalmente complesso e dispendioso nei tempi</li> <li>• Richiede un pretrattamento del campione spesso elaborato</li> <li>• L'analisi può essere facilitata con l'utilizzo di un colorante e di un microscopio a fluorescenza</li> </ul>
Elettronica a scansione	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permette di valutare le caratteristiche superficiali delle microplastiche nel campione</li> <li>• Tecnica efficace per la conta delle particelle più piccole (anche dell'ordine dei nanometri)</li> <li>• Utile se associata ad altre tecniche non distruttive</li> <li>• Spesso accoppiata alla spettroscopia a dispersione di energia</li> </ul>
<b>Cromatografica</b>	
Pyr-GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permette di identificare chimicamente le particelle ma non di quantificarle o classificarle in base alla forma</li> <li>• Permette di identificare anche gli additivi e i contaminanti correlati</li> <li>• L'analisi è distruttiva non permette di riutilizzare il campione</li> <li>• Preparazione del campione minima</li> </ul>
<b>Spettroscopica</b>	
Infrarossa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permette di identificare chimicamente le particelle e gli interferenti della matrice come le sostanze inorganiche</li> <li>• Quando associata alla microscopia permette di valutarne forma e numero</li> <li>• Permette di identificare particelle fino a 7 <math>\mu</math>m con il <math>\mu</math>-FT-IR e 300 <math>\mu</math>m con lo FTIR classico</li> <li>• Richiede spesso un pretrattamento del campione elaborato</li> </ul>
Raman	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permette di identificare chimicamente le particelle e gli interferenti della matrice come le sostanze inorganiche</li> <li>• Quando associata alla microscopia permette di valutarne forma e numero</li> <li>• Permette di lavorare con particelle fino ad 1 <math>\mu</math>m tramite <math>\mu</math>-Raman</li> <li>• Restituisce buoni risultati anche con una preparazione del campione minima</li> </ul>

Le difficoltà causate dall'eterogeneità di questi polimeri possono essere aggirate, prima di procedere con l'analisi, adottando un metodo di campionamento che permetta di lavorare su un

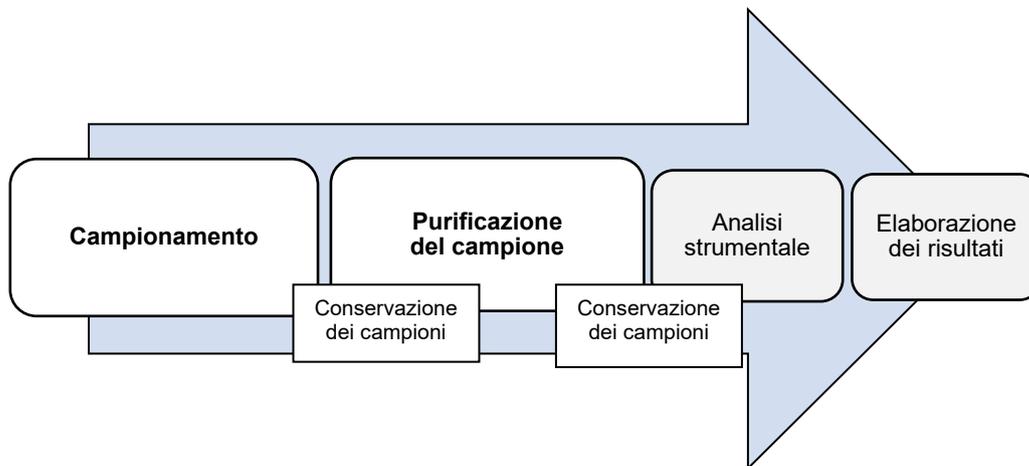
range dimensionale più ristretto. In questo modo viene persa una frazione degli analiti di interesse, ma l'analisi strumentale e l'interpretazione dei risultati risultano semplificate.

La contaminazione da microplastiche nelle operazioni di campionamento e di pretrattamento dei campioni può essere ridotta adottando procedure preventive come l'utilizzo di bianchi di campo, bianchi reagente e procedurali e la manipolazione dei campioni in camera bianca *plastic-free* o sotto cappa a flusso laminare.

L'interferenza della matrice può essere invece ridotta predisponendo metodiche di pretrattamento efficaci, selettive e non in grado di interferire con la successiva analisi strumentale.

Si devono inoltre tenere in conto anche le differenze tra le diverse tipologie di acqua campionata, come ad esempio quelle che intercorrono tra le acque superficiali e sotterranee e tra acque destinate al consumo umano in distribuzione e quelle in bottiglia.

La soluzione al problema può essere rappresentata dalla messa a punto di protocolli di campionamento, estrazione e di purificazione specifici per ogni tipologia di acqua (Figura 4).



**Figura 4. Workflow utilizzato nei protocolli analitici per l'analisi delle microplastiche in matrici ambientali**

Ad esempio, le acque superficiali richiederanno campionamenti volti ad evitare il possibile intasamento dei filtri e tecniche di pretrattamento finalizzate a degradare il maggior contenuto organico presente in questa matrice. Le acque in distribuzione richiederanno invece modalità di pretrattamento specifiche per evitare di compromettere l'integrità delle microplastiche presenti nel campione.

## CAMPIONAMENTO

Il campionamento delle microplastiche nelle acque interne, alla stregua di quelle marine, è una delle fasi più delicate dell'intera procedura analitica in quanto influenza fortemente la rappresentatività dei risultati ottenuti.

Un metodo di campionamento efficace dovrebbe garantire l'analisi di volumi d'acqua adeguati in tempi ristretti ed essere efficace sia per le particelle più grandi che per quelle più piccole. Quest'ultimo obiettivo, per vari motivi, non risulta quasi mai raggiungibile.

I metodi più diffusi, come quelli basati su reti o filtri, non rendono infatti possibile il campionamento delle microplastiche per l'intero range proposto per la loro definizione (1  $\mu\text{m}$  –5 mm). Il processo su cui si basano, un'unica filtrazione meccanica, limita il campionamento a tutto ciò che è al di sopra dell'apertura dello strumento, determinando la perdita di una frazione spesso notevole di particelle (soprattutto SMP).

Questi approcci hanno però permesso di comprendere la natura di alcune frequenti problematiche, quali gli intasamenti dei filtri impiegati e la contaminazione procedurale, migliorando la qualità degli studi successivi.

I metodi relativamente più recenti, come l'utilizzo di setacci posti in serie (47-49) e la centrifugazione a flusso continuo (50-52), hanno permesso di ampliare il range dimensionale di microplastiche campionabili ma necessitano ancora di ulteriori studi per verificare la loro efficacia e non sono comunque esenti da problematiche specifiche.

Anche il campionamento di un volume d'acqua adeguato al sito di prelievo rappresenta un criterio importante da considerare.

La strumentazione deve essere in grado di rispondere a questa richiesta anche se questo dovesse comportare una riduzione del tipo e del numero di microplastiche campionate (che andrà comunque accuratamente valutata).

Comunque, il criterio più importante da considerare quando si programma il campionamento dovrebbe essere la rappresentatività del campione in funzione della valutazione del rischio ambientale (*Environmental Risk Assessment*, ERA) e della valutazione del rischio per la salute umana (*Health Risk Assessment*, HERA). 4

In sostanza, la scelta del range dimensionale di particelle da ricercare (e di conseguenza i volumi richiesti) dovrebbe essere effettuata in virtù della loro capacità di causare danni all'uomo o all'ambiente. In caso contrario, si otterrebbero dei risultati poco significativi e slegati dalla logica della valutazione del rischio.

Sono disponibili diversi protocolli di campionamento dall'analisi della letteratura.

Questi indagano la presenza nelle acque di microplastiche di classi dimensionali anche molto diverse tra di loro, con inevitabili problematiche di confronto.

Tuttavia, anche laddove si campioni la stessa classe dimensionale di microplastiche, il campionamento non è mai standardizzato.

Tutto ciò contribuisce all'estrema eterogeneità dei risultati e all'impossibilità di poterli paragonare direttamente tra di loro.

La Tabella 2 riporta i metodi di campionamento e i volumi consigliati per ciascuna tipologia di acqua.

**Tabella 2. Metodi di campionamento e volumi consigliati per ciascuna tipologia di acqua**

Tipologia di acqua	Volumi consigliati*	Metodo di campionamento utilizzato	Apertura delle maglie utilizzata	Principali problematiche
Acque superficiali	500-1000 L	Reti, Pompe	Reti: 80-500 $\mu\text{m}$ Pompe: < 100 $\mu\text{m}$	Agenti atmosferici, imbarcazione (se utilizzata), stagionalità
Acque sotterranee	> 1000 L	Allaccio diretto, Pompe	Varie (3 o 10 o 450 $\mu\text{m}$ )	Intasamento del filtro
Entrata impianto di depurazione (Reflui)	1 L	Pompe	Pompe: < 100 $\mu\text{m}$	Intasamento del filtro
Uscita impianto di depurazione (Reflui)	500 L	Pompe, Reti	Reti: 80-500 $\mu\text{m}$ Pompe: < 100 $\mu\text{m}$	Intasamento del filtro
Entrata impianto di trattamento (Potabile)	1000 L	Allaccio diretto	2,5-10 $\mu\text{m}$	Intasamento del filtro
Uscita impianto di trattamento (Potabile)	1000 L	Allaccio diretto	2,5-10 $\mu\text{m}$	Intasamento del filtro
Acqua in bottiglia	10 L	Selezione del lotto e filtrazione	Varie (0,40 o 0,45 o 1,5 $\mu\text{m}$ )	Omogeneità dell'acqua nel lotto

\* Koelmans *et al.*, 2019 (44)

## Volume del campione

Uno dei parametri più importanti da valutare per l'analisi di microplastiche nelle acque interne è la dimensione del campione. Il campione risulta infatti rappresentativo quando restituisce una fotografia del luogo di prelievo con risultati in grado di rispecchiare la reale concentrazione delle microplastiche in quell'area specifica.

La scelta del volume adeguato all'analisi, ovvero il volume di acqua che dovrebbe essere campionato, dipende da diversi fattori.

Una volta tenuto conto della strumentazione a disposizione bisogna considerare come primo criterio quello statistico. Un volume campionato troppo ridotto può ridurre la probabilità di trovare determinate particelle, incrementando il margine di errore e riducendo la rappresentatività dello studio (44).

In secondo luogo, bisogna tenere in considerazione le caratteristiche del range dimensionale di microplastiche sul quale viene condotta l'analisi e la tipologia di acqua campionata.

Alcuni studi hanno mostrato come le particelle più piccole siano in realtà quelle più abbondanti (53,54), per cui volumi minori saranno richiesti se si vogliono avere informazioni su particelle di grandezza inferiore ai 100  $\mu\text{m}$  (SMP).

Se invece sono le microplastiche più grandi (>100  $\mu\text{m}$ ) l'oggetto dell'indagine, un volume più ampio sarà richiesto per non ricadere in eventuali sottostime.

Queste ultime osservazioni vanno anche rapportate alla tipologia di acqua sul quale viene condotta l'analisi.

Koelmans *et al.* (44), valutando oltre cinquanta studi differenti, hanno suggerito dei volumi di campionamento ideali per ciascuna tipologia di acqua studiata. Questi volumi ideali rappresentano delle linee guida per il campionamento delle microplastiche più grandi ( $> 100 \mu\text{m}$ ).

Per le acque superficiali, considerate le probabili basse concentrazioni di microplastiche  $> 100 \mu\text{m}$ , la relativa facilità a campionare volumi elevati e la maggiore suscettibilità a variabili temporali atmosferiche (55), il volume di riferimento è stato fissato a 500 L. Volumi ancora maggiori sono richiesti nel caso in cui il campionamento avvenga in località remote e ipoteticamente meno contaminate.

Per quanto riguarda gli impianti di depurazione delle acque reflue occorre differenziare tra flusso in entrata e flusso in uscita. I flussi in entrata, a causa della loro origine, sono notevolmente più contaminati da microplastiche rispetto ad altre matrici e pertanto un volume di 1 L è considerato sufficiente. Viceversa, a valle dell'impianto, analogamente alle acque superficiali, il volume consigliato è di 500 L.

Per l'acqua in distribuzione il volume di campionamento consigliato è di 1000 L, dato che si tratta di acqua che può aver subito trattamenti di potabilizzazione e per cui le concentrazioni di microplastiche attese sono decisamente più basse (32).

Infine, per l'acqua in bottiglia il volume di riferimento consigliato dovrebbe essere superiore 10 L, facendo quindi un campione medio di più bottiglie della marca in esame (44).

Queste linee guida non rappresentano dei limiti invalicabili. Spesso, infatti, si presentano delle problematiche con alcuni metodi di campionamento (la più comune delle quali è l'intasamento dei filtri che avviene solitamente con acque dall'alto contenuto organico) che non consentono di raggiungere questa condizione di volume ideale. In questi casi è consigliato campionare fin dove sia possibile (riportando fra i dati il volume d'acqua raggiunto).

Non esistono al momento linee guida specifiche per il campionamento della frazione di microplastiche al di sotto di  $100 \mu\text{m}$  (SMP). Qualora l'obiettivo della ricerca siano unicamente le SMP, è possibile campionare volumi d'acqua minori (44).

Spesso però lo studio viene esteso anche alle microplastiche più grandi oppure non viene ben chiarita quale sia la vera classe dimensionale di interesse, rendendo la scelta di un volume adeguato (e quindi del metodo di campionamento più adatto) molto difficoltosa.

In letteratura si ritrovano diversi studi che mirano a identificare e quantificare anche le SMP, specialmente in acque potabili e reflue. In entrambi i casi si osserva una notevole variabilità nei volumi d'acqua campionati, solitamente dai 500 ml ai 5 L per il campionamento con bottiglie (45, 56, 57) fino a centinaia di litri per il campionamento tramite sistemi di filtrazione *in situ*. (32, 58)

## Scelta del metodo di campionamento

I metodi di campionamento delle microplastiche per le acque interne sono molteplici, ma non tendono a discostarsi molto da quelli per l'acqua marina.

L'utilizzo di un metodo o di un altro, dipende dalla classe dimensionale di interesse, dalla natura della matrice (acqua superficiale, sotterranea, ecc.) e, in caso di bacini estesi, dalla porzione di colonna d'acqua di interesse analitico.

La scelta della classe dimensionale dovrebbe essere la prima operazione da effettuare nella progettazione del disegno sperimentale, poiché essa influenza la tipologia di strumentazione utilizzabile e, come già detto, i volumi minimi necessari.

La maggior parte dei metodi di campionamento disponibili in letteratura è stata pensata per il campionamento di microplastiche di più grandi dimensioni e poi utilizzati anche per le particelle più piccole di  $100 \mu\text{m}$ . Spesso, infatti, il range dimensionale scelto per i protocolli che si ritrovano

in letteratura include anche le SMP, ma il campionamento viene effettuato con le modalità e i volumi tipici dei protocolli utilizzati per le particelle più grandi.

Qualora siano solamente le SMP l'oggetto dello studio, si dovrebbe quindi optare per un metodo di campionamento mirato ed efficace. Al momento, non esistono protocolli con queste caratteristiche e l'unica soluzione è rappresentata dall'adattare quelli già noti per il campionamento delle microplastiche > 100 µm.

A giocare un ruolo preminente nella scelta del metodo è spesso quindi la tipologia di acqua campionata e le sue caratteristiche intrinseche.

La maggior parte degli studi sulle acque interne è focalizzata sul campionamento dell'acqua di superficie, poiché una buona porzione di microplastiche, data la loro densità, tende a galleggiare. Le plastiche di uso comune hanno però un range di densità che va da 0,85 a 1,41 g/cm<sup>3</sup> (59) (fino a 2,4 g/cm<sup>3</sup> per i polimeri fluorurati) pertanto alcune di esse si ritroveranno con minore probabilità nello strato superficiale della colonna d'acqua.

Per avere una visione globale della distribuzione delle microplastiche negli ambienti acquatici, occorrerebbe quindi studiare la concentrazione delle microplastiche nelle varie porzioni della colonna d'acqua suddividendo successivamente i risultati per classi dimensionali (60).

Questo approccio può però risultare molto laborioso e complesso da mettere in pratica, poiché i volumi da campionare risultano elevati ed è applicabile solamente ai grandi specchi d'acqua (laghi, fiumi navigabili), ovvero dove esista effettivamente una colonna d'acqua da prendere come riferimento; in diversi casi di interesse analitico (acqua potabile in distribuzione, acque reflue, acqua in bottiglia) non è pertanto possibile pensare di agire in questo modo (61).

I grandi specchi d'acqua sono anche quelli in cui, per questioni logistiche, si hanno maggiori possibilità di scelta in termini di tecniche di campionamento utilizzabili.

Al contrario, in caso di acque sotterranee, fiumi di piccole dimensioni e in studi riguardanti sia gli impianti di depurazione che di potabilizzazione, la disponibilità dei mezzi di campionamento è ridotta a causa delle caratteristiche intrinseche del mezzo a disposizione. Ad esempio, in queste zone l'utilizzo di reti è difficoltoso (spesso impossibile) e si preferisce utilizzare metodi di campionamento alternativi quali quelli basati su pompe o con allaccio diretto al rubinetto.

Un altro parametro da considerare, a volte sottovalutato, è la disponibilità strumentale.

Spesso a dettare la scelta del metodo di campionamento è proprio la tipologia di strumenti che si ha a disposizione. Gli strumenti per il campionamento delle microplastiche, quali pompe e reti, sono costosi e ciò può rappresentare un fattore limitante per l'intero studio. La disponibilità all'allaccio ad un rubinetto o l'utilizzo di bottiglie a capienza ridotta consente invece di abbattere notevolmente i costi e di procedere alle analisi con minore difficoltà.

## Campionamento tramite reti

Le microplastiche possono essere raccolte tramite specifiche reti da campionamento, trascinate da imbarcazioni o fissate a dei sostegni (62) nella zona di interesse.

Durante il campionamento, le microplastiche si concentrano nella parte terminale della rete in tipologie e quantità differenti a seconda dell'apertura delle maglie. Solitamente, l'apertura delle maglie delle reti è dell'ordine dei 300 µm (300-333 µm) (62-64), ma non è insolito trovare in letteratura studi che fanno uso di aperture più grandi (meno frequentemente, es. 500 µm) (65,66) o più piccole (più frequentemente, 80-153 µm) (67-69). L'utilizzo di reti con maglie più o meno grandi è spesso funzione del sottotipo di microplastiche che si desidera campionare o dei volumi richiesti.

Reti con apertura di 500 µm permettono di raccogliere facilmente le microplastiche più grandi filtrando volumi elevati senza intasarsi.

Reti con aperture dagli 80 ai 153  $\mu\text{m}$  permettono invece di raccogliere anche fibre più sottili ma tendono frequentemente ad intasarsi (61,67) e necessitano, se il campionamento viene effettuato con reti trainate da un mezzo, di una velocità di rimorchio inferiore (61).

Un'apertura di 300-333  $\mu\text{m}$  è per questo considerata come un giusto compromesso tra classi dimensionali campionate e volumi di acqua adeguati allo scopo (70,71), sebbene comporti comunque forti limitazioni al fine di avere una visione completa sulla distribuzione delle microplastiche nelle acque. Questo compromesso comporta infatti l'esclusione dal conteggio delle SMP (ovvero quelle considerate maggiormente pericolose per uomo e ambiente) e produce comunque risultati molto diversi, anche in studi apparentemente simili, come osservato da Li *et al.* (71).

Così come per gli altri approcci classici, anche per questa tipologia di strumenti è necessario utilizzare un misuratore di portata e conoscere i parametri relativi al flusso d'acqua che si intende studiare, delle condizioni climatiche della zona di campionamento e della traversata in barca.

Il misuratore di portata consente di registrare il volume d'acqua filtrato. Questo parametro è cruciale nello studio delle microplastiche perché è un indice dell'attendibilità del dato analitico e permette a ricerche differenti di essere confrontate (61, 41). Molto spesso, comunque, la tipologia di misuratore di flusso impiegata non viene menzionata. Nel caso in cui il campionamento sfrutti un'entità in movimento come un'imbarcazione, questo risulterà influenzato dalla velocità del mezzo trainante e dal posizionamento della rete rispetto alla barca, nonché dal percorso effettuato durante la traversata.

Kovač Viršek *et al.* (72) hanno messo a punto un protocollo di analisi focalizzato sul campionamento con mezzo trainante in mare ma adottabile per fiumi navigabili (65).

La rete dovrebbe essere dispiegata su un lato della nave a 3-4 m di distanza, cioè fuori dalla zona di scia (*wake zone*), per evitare l'interferenza del flusso turbolento dell'acqua.

Dopo aver segnato in un foglio di calcolo l'ora e le coordinate di partenza del segmento navigabile da percorrere (transetto), l'imbarcazione può iniziare il campionamento. È consigliata una velocità di navigazione di 2-3 nodi per un tempo di 30 minuti, anche se in letteratura si trovano traversate anche di tempi superiori. Fischer *et al.* (73) raccomandano campionamenti di durata inferiore ad un'ora in caso di acque ad alto contenuto organico, per evitare l'intasamento della rete.

Alla fine del campionamento occorrerebbe riportare le coordinate di arrivo con orario e velocità di traino medio e risciacquare la rete con acqua priva di plastiche (44); tuttavia questo, per questioni pratiche non sempre è possibile.

Una volta risciacquata la rete, si dovrebbe procedere rimuovendo con attenzione il contenuto della rete in un setaccio da 300  $\mu\text{m}$  o meno, setacciare accuratamente e porre il contenuto in bottiglie di vetro, risciacquando poi lo strumento per eventuali rimanenze. È anche possibile suddividere già a bordo il materiale campionato in classi dimensionali, come effettuato da Sighicelli *et al.* (64). In quest'ultimo caso bisognerebbe però prestare attenzione ad evitare ulteriori contaminazioni mediate da agenti atmosferici e indumenti, che sono più frequenti all'esterno rispetto all'interno di un laboratorio.

Nel caso la rete non sia legata ad un'imbarcazione, occorrerebbe comunque valutare durante il campionamento le condizioni dell'acqua analogamente alla direzione e intensità del vento. La velocità del vento non dovrebbe essere superiore al livello 2 della scala Beaufort, a meno che non si utilizzino strumenti *ad hoc* come la rete AVANI (*All-purpose Velocity Accelerated Net Instrument*) (74). Nel caso di un campionamento superficiale, solamente metà dell'apertura dovrebbe risultare sommersa durante il campionamento (72). Questi inconvenienti sono ovviamente meno frequenti nei corsi di acqua navigabili rispetto alle acque marine ma possono comunque interferire con l'analisi come prodotto della contaminazione.

Esistono diverse tipologie di reti utilizzate per campionare le microplastiche, ciascuna con i propri vantaggi operativi. Si tratta, nella maggior parte dei casi, di reti per la raccolta del plankton o derivate da queste ultime.

Le reti da Neuston includono reti con forme anche molto differenti tra di loro utilizzate originariamente per la raccolta del plancton, ma adatte anche per campionare le microplastiche (specialmente quelle  $> 100 \mu\text{m}$ ). Sono costituite da un sostegno rigido in plastica o in acciaio a cui è legata la rete vera e propria; questa presenta un'apertura delle maglie variabile, scelta in virtù del soggetto studiato e compresa tra i 100 e i 1000  $\mu\text{m}$ . In alcune versioni più recenti, le reti da Neuston possono essere fissate ad un sostegno galleggiante che ha lo scopo di garantire al sistema di raccolta una maggiore stabilità (Neuston Catamaran). Questo espediente evita che lo strumento venga sollevato dalle onde durante il campionamento. L'utilizzo dei galleggianti comporta però che la profondità di immersione della rete cambi continuamente durante la traversata. Ciò può rendere più difficile l'interpretazione dei risultati (75).

Per il campionamento di microplastiche sono state utilizzate con successo anche un altro sottotipo di reti da Neuston, le reti Bongo. Questi strumenti sono costituiti da una coppia di reti circolari di 60 cm di diametro tenute insieme da un piccolo sostegno di acciaio inossidabile. Il design di questa costruzione permette non solo di campionare le acque con reti di apertura differente allo stesso tempo ma anche di ridurre il disturbo causato dalle briglie di rimorchio.

Il principale limite nell'utilizzo di queste reti è la loro ridotta stabilità che implica una profondità di campionamento non costante. Questo problema può essere parzialmente risolto con l'uso di accessori dedicati che le mantengono più stabili sulla superficie dell'acqua. Il loro design è inoltre adatto sia per il campionamento dello strato superficiale della colonna d'acqua sia per acque più profonde (76).

La rete Manta, descritta per la prima volta nel 1981 (77), è una rete da Neuston modificata che è stata progettata per garantire una profondità di immersione (e quindi di campionamento) costante. Il design con la quale è stata concepita rispecchia questa sua caratteristica. La rete è dotata di ali di compensato o alluminio che donano alla rete la caratteristica forma di una Manta acquatica e che la stabilizzano efficacemente sulla superficie dell'acqua. Queste strutture sono collegate ad un frame di alluminio nella quale è ancorata una rete con apertura delle maglie variabile (100-500  $\mu\text{m}$ ). Al centro dell'apertura rettangolare di 60 cm dove passa l'acqua, vi è un perno dove alloggiare il misuratore di portata. Il suo utilizzo, a meno che non si abbiano a disposizione sistemi automatizzati, richiede la collaborazione di almeno due persone (77), anche se può essere smontata facilmente per il trasporto rimuovendo le ali. La rete Manta è adatta a campionare acque calme di mari, fiumi e laghi, con una velocità di traino massima di 5 nodi e consigliata di 2-3 nodi (77). A velocità di rimorchio superiori o in presenza di alte onde, la rete Manta viene destabilizzata invalidando il campionamento.

La rete AVANI è una rete di nuova generazione progettata da Markus Eriksen per il campionamento superficiale delle acque in condizioni avverse, in particolare quelle marine. La rete presenta un'apertura rettangolare di 15 cm sviluppata in lunghezza piuttosto che in larghezza, permettendo il campionamento di una porzione più estesa della colonna d'acqua e rendendo possibile la raccolta anche dalla frazione di microplastiche che si trova normalmente al di sotto della zona di campionamento della Manta (74). Ciò, coadiuvato dalla presenza di ali laterali come nella Manta, permette una maggiore stabilità in acqua, rendendola adatta anche in condizione di forte vento e ad alte velocità di rimorchio. La rete è reputata adatta per velocità di rimorchio fino ad 8 nodi e con venti fino al punto 5 della scala di Beaufort (74).

Si tratta di uno strumento più ingombrante rispetto alle altre reti, che necessita come altri dell'ausilio di due o più persone per le manovre, a meno che non vengano utilizzati sistemi automatizzati. È sempre presente, anche in questo strumento, il perno per alloggiare il misuratore di portata.

In un recente studio (74), il campionamento con rete AVANI è stato messo a confronto con quello effettuato da una rete Manta e una rete da Neuston nello stesso transetto. I risultati si sono dimostrati sovrapponibili, sebbene la rete AVANI permetta il campionamento di porzioni della colonna d'acqua leggermente differenti.

Un approccio alternativo per il campionamento di microplastiche con rete lungo i fiumi è quello manuale. Questa tecnica prevede che un operatore tenda la rete nel letto del fiume per un determinato periodo di tempo. Per effetto della corrente, le microplastiche tenderanno a depositarsi spontaneamente nella coda della rete. In letteratura si ritrovano studi effettuati con reti di diverse forme e aperture (es. Moore *et al.* (66) utilizzano reti con aperture di 800 e 500  $\mu\text{m}$ ). Il campionamento manuale non è oggi considerato attendibile. In questa tipologia di campionamento bisogna, infatti, considerare un'innumerabile serie di variabili (per primo l'errore umano) e il fatto che i volumi filtrati raramente possono raggiungere quelli desiderati. Si tratta tuttavia di una metodica veloce ed economica, utile se integrata ad altre procedure e che può restituire una stima grossolana circa la presenza di microplastiche nel mezzo.

La Tabella 3 riporta le diverse tipologie di reti per il campionamento superficiale di microplastiche.

**Tabella 3. Tipologie di reti per il campionamento superficiale di microplastiche**

Tipo di rete	Vantaggi	Svantaggi	Aperture disponibili
Rete da Neuston (tipologia Neuston Catamaran)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Velocità di traino fino a 4 nodi</li> <li>• Resistente all'azione delle onde</li> <li>• Particolarmente adatta per il mare aperto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La profondità di immersione della rete cambia continuamente</li> </ul>	100-500 $\mu\text{m}$
Rete da Neuston (tipologia Rete Bongo)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Velocità di traino fino a 4 nodi</li> <li>• Possibilità di campionare simultaneamente con reti di aperture differenti</li> <li>• Risente meno dell'influenza delle briglie di rimorchio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poco stabile sulla superficie dell'acqua se non vengono presi particolari accorgimenti</li> <li>• Pochi studi sulle microplastiche con questa tipologia di rete</li> </ul>	100-1000 $\mu\text{m}$
Rete Manta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Velocità di rimorchio fino a 5 nodi</li> <li>• Profondità di immersione costante</li> <li>• Utilizzata nella maggior parte degli studi sulle acque superficiali</li> <li>• È possibile smontare le ali per facilitarne il trasporto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adatta solo per le acque calme</li> </ul>	80-500 $\mu\text{m}$
Rete AVANI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Velocità di traino fino a 8 nodi e venti fino al punto 5 della scala Beaufort</li> <li>• Riesce a campionare una porzione più estesa della colonna d'acqua</li> <li>• Estremamente stabile</li> <li>• Chiusura "a libro" che ne facilita il trasporto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Al momento è stata utilizzata solo in ambiente marino</li> <li>• Al momento disponibile solamente con apertura a 335 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	335 $\mu\text{m}$
Campionamento manuale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tecnica veloce ed economica</li> <li>• Strumenti in genere poco ingombranti</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dati poco significativi a causa dei ridotti volumi</li> <li>• Pochi studi effettuati con questa tecnica</li> </ul>	Disponibili reti con diverse aperture

Il grande vantaggio dell'utilizzo di reti per il campionamento è che sono in grado, nelle gran parte dei casi, di filtrare grandi volumi d'acqua restituendo una stima maggiormente rappresentativa della distribuzione delle microplastiche nella zona di interesse.

D'altro canto, l'ampiezza delle maglie disponibili per queste reti (solitamente non inferiori a 80  $\mu\text{m}$ ) è un fattore fortemente limitante nell'ambito dello studio perché non permette il campionamento delle particelle più piccole. Sebbene le microplastiche più piccole di 300  $\mu\text{m}$  possano formare aggregati colloidali ed essere comunque ritenuti dalla rete (61), ciò rappresenta una problematica non trascurabile a livello concettuale. Per questo motivo, risulta estremamente difficile studiare le SMP con questa tecnica.

Tuttavia, ciò che maggiormente limita l'utilizzo di questi strumenti è l'aspetto pratico. Non è praticabile effettuare studi di questo tipo in regioni non navigabili. Gli studi presso gli impianti di trattamento dei reflui (flussi in entrata o all'interno dell'impianto), gli impianti di potabilizzazione o su acqua in distribuzione richiedono necessariamente l'utilizzo di sistemi di pompaggio o l'allaccio ad un rubinetto.

## Campionamento tramite pompe e allaccio alla rete idrica

Un altro approccio per il campionamento è rappresentato dall'utilizzo di pompe o strumenti simili.

L'acqua viene pompata dalla zona di campionamento (un lago, un fiume ma anche una sezione di un impianto di trattamento dell'acqua) verso una rete (78), un filtro a cartuccia/a disco (58, 79) o una serie di setacci (47-49) dall'apertura variabile e quindi filtrata. Qualora sia possibile effettuare il campionamento mediante un rubinetto, il sistema di pompaggio non risulta necessario (32, 58), in quanto l'acqua può essere convogliata senza la necessità di ausili verso i sistemi di filtrazione.

In entrambi i casi, l'utilizzo di un misuratore di flusso, analogamente a quanto avviene con le reti, permette la misurazione del volume di acqua filtrata.

Per le operazioni vengono generalmente impiegati filtri con aperture inferiori a quelle che si osservano nel campionamento con rete, solitamente inferiori a 100  $\mu\text{m}$ . Ciò permette di recuperare anche le microplastiche più piccole ma in molti casi (anche se non in tutti, come mostrato da Rodrigues *et al.* (78) questo espediente non consente di filtrare volumi elevati per problematiche specifiche.

La scelta di utilizzare più sistemi di filtrazione in serie al posto che uno solo può risultare vantaggioso perché permette di separare già al momento del campionamento le microplastiche in diverse classi dimensionali (47-49). La principale problematica, anche in quest'ultimo caso, è rappresentata dalla possibilità di intasamento del filtro, che è tanto più probabile quanto è più piccola l'apertura delle maglie utilizzata; anche la tipologia di acqua campionata può contribuire o meno all'intasamento dei filtri.

Ad esempio Ziajahromi *et al.* (47), durante il campionamento dei flussi in uscita da un impianto di trattamento delle acque reflue, sono stati costretti a eliminare uno dei loro setacci posti in serie (quello più piccolo da 25  $\mu\text{m}$ ) per intasamento da materiale organico. Un intasamento si è verificato anche nello studio di Mintenig *et al.* (79) con un filtro a cartuccia da 10  $\mu\text{m}$  e in un altro studio dello stesso autore (32) riguardante un impianto di potabilizzazione, con un filtro a cartuccia da 3  $\mu\text{m}$ .

L'intasamento del filtro non permette di portare a termine il campionamento con i volumi desiderati; questo (soprattutto per le microplastiche > 100  $\mu\text{m}$ ) può non permettere una stima

accurata della contaminazione e i dati ottenuti potrebbero risultare non confrontabili con quelli ottenuti in altri studi.

Una soluzione al problema può essere rappresentata dal cambio dei filtri quando vicini all'intasamento. A volte però questi tendono ad intasarsi piuttosto rapidamente, specie con acque particolarmente torbide (es. con quelle ad alto contenuto di contaminanti organici o soggette a fioriture algali) e pertanto l'operazione non sempre risulta possibile. In aggiunta, il cambio dei filtri durante il campionamento può portare a perdite di materiale e a fenomeni di contaminazione ambientale. In questi casi, l'unica soluzione possibile è installare sin dall'inizio maglie a grandezza maggiore (50) e procedere al campionamento delle microplastiche più piccole (SMP) con un'altra procedura.

I sistemi di campionamento di questo tipo appaiono spesso molto diversi tra di loro, sia in termini di materiali costruttivi che di caratteristiche e dimensioni. Si tratta comunque di artefatti generalmente ingombranti, che richiedono per l'utilizzo più di una singola persona. Nel caso invece sia possibile l'allaccio diretto le operazioni relative al campionamento sono di più semplice svolgimento (58). Molto spesso questi strumenti vengono progettati e assemblati appositamente per lo studio (47-49). Ad esempio, Tamminga *et al.* (49) hanno progettato *in-house* lo strumento per il campionamento, una pompa collegata ad una serie di setacci, seguendo alcuni prerequisiti. Il sistema dovrebbe essere in grado di campionare grandi quantità d'acqua in un tempo ragionevole (diversi m<sup>3</sup> all'ora), avere una componentistica ridotta in plastica ed essere utilizzabile anche su piccole imbarcazioni o dai ponti, se necessario.

La principale problematica dell'utilizzo di questi strumenti personalizzati è che non sono standardizzati e producono risultati difficilmente riproducibili.

Gli approcci al campionamento basati su pompe o simili sono strettamente necessari se quelli basati su reti fisse o mobili non sono applicabili. Per la possibilità di montare filtri sotto ai 100 µm, questi sono molto utili per comprendere la corretta distribuzione nelle acque delle particelle più piccole e delle fibre (49) (anche le SMP, qualora si utilizzino filtri con apertura 10-20 µm e gli intasamenti non siano così d'ostacolo). Le fibre sembrano, infatti, essere meno ritenute da sistemi di raccolta basati su reti per il loro ridotto diametro (49, 80, 81).

## Altri approcci al campionamento

Diversi altri approcci al campionamento sono disponibili in letteratura per quanto riguarda le acque interne.

La centrifugazione a flusso continuo (50-52) rappresenta una tecnica di campionamento innovativa che sembra mostrare diversi vantaggi rispetto a quelli tradizionali. Nel modello proposto da Hildebrandt *et al.* (50), l'acqua viene veicolata attraverso una pompa peristaltica verso una centrifuga a flusso. In ingresso alla centrifuga è stato applicato un filtro da 1 mm per prevenire l'intasamento.

Il rotore dello strumento, al contrario di quanto accade per gli altri metodi basati sulla separazione per forma e classe dimensionale, è in grado di separare i materiali sospesi nelle acque sulla base della loro densità. Le particelle sospese con una densità inferiore a quella del mezzo vengono raccolte nella camera di sedimentazione mentre quelle con densità superiore si accumulano nella sezione superiore del rotore. Solo i materiali sospesi con la stessa densità del mezzo non vengono separati da quest'ultimo e scaricati all'uscita insieme all'acqua. I vantaggi di questo approccio si sono dimostrati essere l'assenza di intasamenti all'interno dello strumento e la minore possibilità di contaminazione. Quest'ultimo vantaggio è basato sul fatto che si tratta di un sistema chiuso nel quale non è nemmeno necessario effettuare dei controlli periodici.

D'altro canto, la tecnica di campionamento non ha un *cut-off* dimensionale definito, ha costi più elevati e risulta meno pratico dato l'elevato peso complessivo del sistema. Per quanto riguarda

i volumi, lo strumento non riesce a filtrare volumi paragonabili a quelli delle reti nello stesso intervallo di tempo. Tuttavia, sono disponibili sul mercato diverse centrifughe capaci di operare a velocità anche molto elevate, sicuramente maggiori di molti tipi di pompe.

Le microplastiche possono essere raccolte anche raccogliendo prima l'acqua in appositi contenitori per poi filtrarla successivamente. Si tratta di espedienti che non permettono di raccogliere volumi d'acqua elevati, ma possono risultare adeguati se l'oggetto della ricerca è rappresentato dalle microplastiche di piccole dimensioni (44,45); si tratta infatti di uno dei metodi di campionamento più utilizzati per lo studio delle SMP in acque reflue o potabili.

L'acqua può essere raccolta in questo modo attraverso contenitori di acciaio inossidabile (81), bottiglie di vetro (51, 82) o specifici campionatori come le bottiglie di Niskin (76, 83) e le bottiglie di Van Dorne (83).

Analogamente, il materiale campionato con i metodi classici può essere ulteriormente filtrato con l'ausilio di setacci o filtri dopo risospensione in laboratorio (78). Ciò permette di ridurre la probabilità di intasamento dei filtri durante il campionamento a discapito del tempo richiesto per l'analisi.

Per quanto riguarda l'acqua in bottiglia, la procedura di campionamento è ristretta alla selezione delle bottiglie da sottoporre all'analisi (44). Poiché esistono ancora pochi studi riguardanti la contaminazione da microplastiche dell'acqua in bottiglia non sono riportati al momento criteri di selezione specifici.

## Strategie per il campionamento

L'efficienza del campionamento, che si riflette sull'esito finale dell'analisi, può essere influenzata da diversi fattori in parte indipendenti dalla tipologia di acqua oggetto dell'analisi.

La contaminazione è uno di quelli più importanti perché può portare ad una sovrastima delle microplastiche presenti nel campione.

La contaminazione durante questa fase dell'analisi può derivare dalla presenza di microplastiche nell'aria, dal rilascio da parte della stessa strumentazione utilizzata per campionare e dal rilascio di fibre sintetiche dagli indumenti degli operatori.

Le reti, le pompe, i contenitori dove le microplastiche vengono conservate ma anche le imbarcazioni utilizzate negli studi in acque aperte (84) hanno diverse componenti strutturali in plastica. Queste, spesso per azione del calore, possono cedere particelle all'ambiente e portare ad una sovrastima della loro presenza in acqua. Ad esempio, il nylon, un polimero di cui sono composte molte reti e che è facile da trovare nell'ambiente potrebbe facilmente contaminare i campioni causando una sovrastima del numero di fibre rilevate.

Gli operatori possono involontariamente contaminare i campioni a causa degli indumenti utilizzati. Indumenti in nylon o acrilico possono infatti rilasciare nell'ambiente particelle o fibre e contaminare i campioni durante le procedure di campionamento, portando ancora una volta ad una sovrastima delle microplastiche presenti.

L'impatto che questo tipo di contaminazione potrebbe avere sul campionamento delle microplastiche è stato studiato da Scopetani *et al.* in un recente lavoro (85). Nello studio è stato messo a punto un modello sperimentale per comprendere l'entità del rilascio di fibre di cotone dai vestiti durante le procedure di campionamento delle microplastiche. Il valore ricavato viene poi normalizzato per i risultati di uno studio di sfregamento (*rubbing experiment*) che aveva lo scopo di paragonare il rilascio per abrasione di fibre tessili da indumenti in cotone rispetto a quelli sintetici. Secondo quanto riportato, il rilascio di fibre da indumenti sintetici potrebbe contribuire ad una sovrastima delle microplastiche dei campioni addirittura del 15%.

La contaminazione, di ogni tipo, dovrebbe essere quindi ridotta il più possibile attuando specifiche strategie e accortezze e quantificata attraverso dei bianchi (controlli negativi) (60, 86, 87).

In primo luogo, è necessario limitare il più possibile l'utilizzo della plastica (88, 89), sia nella strumentazione che nel vestiario utilizzato per campionare.

Ad esempio, l'utilizzo di indumenti in cotone piuttosto che in fibra sintetica e di guanti *plastic-free*, può contribuire a ridurre sensibilmente la contaminazione durante il campionamento (44, 89).

Non sempre però risulta possibile eliminare del tutto la plastica; l'utilizzo di materiale *plastic-free* nella strumentazione per il campionamento comporta spesso l'impossibilità di campionare volumi d'acqua significativi (60). Occorre pertanto giustificare l'utilizzo qualora venga impiegata durante il campionamento e stimarne l'influenza attraverso i bianchi, come già detto.

Ad esempio, Tamminga *et al.* 2019 (49), hanno utilizzato per il campionamento un sistema di pompaggio connesso a serie di setacci tramite un tubo in PVC. L'utilizzo del materiale plastico è stato giustificato con il fatto che il PVC risulta raro da trovare a livello superficiale a causa della sua densità (90). Questa affermazione risulta veritiera per le classi dimensionali più grandi, ma può perdere di significato se l'obiettivo della ricerca sono (anche) le SMP, visto che presentano un profilo di distribuzione diverso da quelle più grandi; l'utilizzo della strumentazione dovrebbe essere pertanto valutato anche in funzione della classe dimensionale di interesse.

Woodall *et al.* (89) hanno stilato una lista di procedure che è consigliato effettuare per ridurre al minimo la contaminazione durante il campionamento (e successivamente in laboratorio).

In primo luogo, viene suggerita la realizzazione di un database riguardante le microplastiche che possono entrare in contatto con i campioni durante l'intera procedura analitica. Sarebbe anche opportuno svolgere un'indagine conoscitiva dei livelli di contaminazione dell'ambiente di campionamento e di lavoro.

Nel caso del campionamento, viene anche consigliato prendere nota dei parametri chimico-fisici dell'acqua campionata (91) (in particolare la durezza; carbonati di calcio e magnesio possono portare alla formazione di aggregati e ostacolare le successive fasi dell'analisi) e dell'intensità del vento durante le operazioni se effettuato in esterno. Potrebbe, inoltre, essere importante sapere se nei giorni precedenti al campionamento si sono verificate precipitazioni atmosferiche perché potrebbe influire sui livelli di microplastiche rilevate.

Oltre ad altre procedure già menzionate, viene suggerito di operare in ambienti puliti e di risciacquare tutta la strumentazione (prima e dopo il campionamento) con acqua ultrapura, demineralizzata ed esente da plastiche, precedentemente testata con un'analisi di bianchi reagente corrispondenti. L'utilizzo della stessa acqua raccolta o filtrata durante campionamento è fortemente sconsigliato a causa di possibili contaminazioni (44).

Nell'ambito di un'indagine all'interno di un impianto di trattamento delle acque reflue o di potabilizzazione è inoltre cruciale essere a conoscenza del suo funzionamento e delle condizioni operative, riportandoli nello studio. Ciò risulta necessario per normalizzare i dati in termini di volumi filtrati ed efficacia di rimozione dei contaminanti (47,92).

Sebbene la contaminazione possa essere ridotta grazie a queste accortezze, deve essere comunque necessariamente stimata attraverso i bianchi.

I bianchi (controlli negativi) dovrebbero essere effettuati in replicato, almeno in tre unità (44, 88). I bianchi di campo sono, però, ancora raramente effettuati nelle diverse analisi di microplastiche.

Un altro fattore che può influenzare l'esito del campionamento in ambienti aperti e alterare i risultati finali è la stagionalità. Nell'organizzare il campionamento è necessario, infatti, considerare l'incidenza dei parametri stagionali e meteorologici prima di mettere a punto un programma di campionamento (84).

Durante l'inverno è maggiore la frequenza degli eventi meteorici, pertanto il campionamento delle microplastiche con reti può divenire per questo più difficoltoso.

Durante la primavera e l'estate invece può intensificarsi il fenomeno della fioritura dei cianobatteri. Ciò rende più frequente l'intasamento delle reti e dei filtri a maglie più strette ostacolando il campionamento di grandi volumi d'acqua (61).

La stagionalità potrebbe anche influire sul contenuto finale di microplastiche nel campione. Alcuni studi (37,66,93), infatti, mostrano, come, nel caso dei fiumi, le concentrazioni di microplastiche siano positivamente correlate all'incremento della portata quando si verificano fenomeni di *run-off* superficiale. Viceversa, in assenza di questi fenomeni (80), queste sarebbero negativamente correlate all'aumento della portata. Sono necessari, tuttavia, ulteriori studi per confermare queste previsioni.

## CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni possono essere conservati con strategie e modalità differenti prima di essere sottoposti all'analisi.

Il materiale campionato tramite reti e setacci viene solitamente raccolto all'interno di contenitori in vetro di vario volume opportunamente coperti. Questa procedura viene eseguita anche quando la filtrazione viene effettuata successivamente al campionamento.

I filtri a disco o a cartuccia, invece, dopo essere stati rimossi dal loro alloggiamento, vengono invece solitamente riposti in becker o capsule di Petri coperti da fogli di alluminio.

Tutti i contenitori devono essere preventivamente risciacquati con acqua ultrapura, demineralizzata ed esente da plastiche, precedentemente testata insieme agli altri bianchi reagente (44,91).

I campioni derivati da acque superficiali o impianti di purificazione vengono a volte trattati con agenti fissativi durante la conservazione (44, 61).

I fissativi sono agenti in grado di ridurre la velocità di evaporazione delle componenti volatili del campione e ne migliorano la stabilità. Il loro utilizzo è volto principalmente a prevenire la decomposizione della sostanza organica che sprigionerebbe cattivi odori nella fase di lettura del campione. La scelta del fissativo da utilizzare dovrebbe essere effettuata non solo in virtù del suo reale bisogno ma soprattutto in rapporto alla sua inerzia nei confronti delle microplastiche del campione (44).

I fissativi più utilizzati sono l'etanolo e l'alcol isopropilico. In letteratura viene riportato anche l'uso di acetaldeide e formalina il cui utilizzo andrebbe però seriamente valutato in quanto agenti cancerogeni.

Infine, i campioni, di ogni tipologia, vanno conservati lontani da fonti di luce e di calore (possibilmente refrigerati) e aperti solamente all'interno del laboratorio sotto cappa, preventivamente decontaminata.

## PROCEDURE DI PRETRATTAMENTO E FILTRAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni prelevati dalle acque interne, analogamente a quelli ottenuti dai sedimenti o dalle acque marine, sono spesso ricchi di materiale di diversa origine in grado di interferire con l'analisi. Questo è rappresentato principalmente da sostanze adsorbite sui polimeri di interesse (di origine naturale e sintetica o biofilm) e da materiale particolato di varia natura.

Tale materiale può modificare la densità apparente dei polimeri (59, 94), indurre la formazione di aggregati rendendo difficoltosa la separazione delle microplastiche dalla matrice e impedirne la corretta identificazione con le tecniche spettroscopiche.

Prima di procedere con l'analisi, è quindi necessario far uso di protocolli di pretrattamento volti a eliminare questi possibili interferenti. (19, 21)

La procedura viene scelta in funzione delle caratteristiche della matrice d'origine, delle modalità di campionamento e della tecnica analitica prescelta.

In linea generale, i campioni ricavati da matrici più complesse richiederanno procedure di pretrattamento più spinte (44); allo stesso tempo, però, pretrattamenti troppo spinti andrebbero evitati poiché potrebbero degradare le microplastiche nel campione impedendo la loro corretta identificazione.

Diversi iter procedurali sono disponibili in letteratura, come ad esempio quello redatto dalla *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOA-A) (95) e dal *Drinking Water Inspectorate* (DWI) (58). Sebbene questi differiscano per diversi aspetti, è possibile osservare una strategia comune. Si ritrovano, infatti, in letteratura delle procedure ricorrenti, quali filtrazione, digestione e flottazione per densità. A queste si aggiungono altre tecniche di pretrattamento meno comuni che hanno comunque esteso il numero dei mezzi a disposizione.

### Digestione

La digestione ha lo scopo di rimuovere il materiale organico adeso alle microplastiche o presente come tale all'interno del campione. Questo ostacola le procedure di filtrazione e il riconoscimento delle microplastiche tramite spettroscopia.

Il metodo utilizzato per la digestione dovrebbe risultare efficace nel degradare il materiale organico e altri eventuali interferenti e allo stesso tempo non così aggressivo da alterare la struttura dei polimeri degradandoli o denaturandoli. In altre parole, la procedura utilizzata non dovrebbe modificare il numero effettivo, la forma, il peso e il colore delle microplastiche presenti.

La scelta dei reagenti da utilizzare viene effettuata in base alle caratteristiche del campione. Una digestione è strettamente necessaria per i campioni derivati da acque superficiali e da impianti di purificazione (44, 58), dato l'alto contenuto organico presupposto. Per quanto riguarda le altre tipologie di acqua, il trattamento digestivo non è richiesto (44), sebbene il DWI lo consigli comunque (58).

I digestivi maggiormente utilizzati sono agenti acidi o alcalini, soluzioni di perossido di idrogeno ed enzimi, utilizzati anche in sequenza e in combinazione tra di loro.

Gli acidi forti (acido nitrico, acido cloridrico) sono efficaci nella digestione del materiale organico presente nel campione ma possono degradare/denaturare alcuni polimeri (come nylon, poliestere e PET) o cambiarne la colorazione (PVC, PVP), specialmente se utilizzati in alte

concentrazioni e ad alta temperatura (96-98). Miscele di acidi hanno mostrato un'efficace attività digestiva, ma con evidenti degradazioni a carico dei polimeri (99).

Gli agenti alcalini (idrossido di sodio, idrossido di potassio) sono altrettanto efficaci (96, 100), ma come gli acidi possono danneggiare le microplastiche o anche decolorarle; possono inoltre lasciare residui non digeriti o oleosi, poiché le parti più grasse presenti nella matrice sembrano non venire digerite completamente (100). I polimeri che subiscono gli effetti negativi dell'utilizzo degli agenti alcalini sono molteplici: PA, PE (anche a bassa densità, LDPE), PET, PVC, policarbonato (PC) e acetato di cellulosa (CA) (97, 100-102). L'utilizzo degli agenti alcalini come digestivi deve essere quindi valutato attentamente.

Il perossido di idrogeno è uno dei reagenti più efficaci per la digestione. Il suo utilizzo comporta infatti una degradazione solo minima dei polimeri ricercati (103) se il trattamento non supera le 48 h (102) e se non si eccede con la temperatura.

Le proprietà ossidanti del perossido di idrogeno vengono inoltre amplificate in presenza di ioni  $Fe^{2+}$ . In presenza di questi catalizzatori, il perossido di idrogeno agisce infatti da precursore di iniziatori radicalici ossidanti secondo la reazione di Fenton.

I radicali idrossili reagiscono con il materiale organico producendo radicali alchilici. Questi, a loro volta, in presenza di ossigeno disciolto, producono radicali alchilperossido che aggrediscono ulteriormente le specie organiche presenti decomponendosi. Si innescano quindi reazioni radicaliche a catena che terminano con l'ossidazione finale degli intermedi ad anidride carbonica e acqua.

La reazione di Fenton procede spontaneamente a temperatura ambiente ma può essere accelerata aumentando la temperatura. Questo processo è noto con il nome di *Wet Peroxide Oxidation* (WPO) e comporta una degradazione più rapida del materiale organico nei campioni con azione sugli analiti minima (95). Tuttavia, la reazione di Fenton è sfavorita da temperature troppo elevate. Ciò è dovuto al fatto che si tratta di una reazione esotermica; oltre i 57°C viene favorita anche la volatilizzazione dello stesso perossido di idrogeno utilizzato come reattivo con riduzione dell'efficacia globale del processo (104).

La reazione di Fenton è anche influenzata dal pH. L'efficienza di reazione è massima a pH 2-4 (104), valori molto lontani dal pH delle acque naturali e anche delle acque reflue (pH 5-9). Per poter sfruttare al massimo la reazione sarebbe quindi necessario acidificare i campioni per raggiungere valori di pH ottimali, ma ciò potrebbe determinare la denaturazione/degradazione dei polimeri presenti nel campione e comportare sia sottostime nella quantificazione, sia problemi nell'identificazione polimerica.

La reazione di Fenton ha forte carattere ossidante ma vi sono specie che mostrano resistenza come i piccoli alcani clorurati (tetracloroetano, tricloroetano), le n-paraffine e gli acidi carbossilici a catena corta (maleico, ossalico, acetico, malonici) (105).

In letteratura si ritrovano diversi studi che fanno uso della WPO per la digestione. La NOA-A (95) e il DWI (58) suggeriscono di adottare questa procedura per i campioni derivati da acque superficiali e da impianti di trattamento delle acque reflue ma non è raro ritrovarla anche fra le procedure di digestione in studi relativi ad acque con minore contenuto organico.

La digestione enzimatica può essere invece considerata una tecnica di digestione alternativa o complementare a quelle già citate. Si tratta di una tecnica meno aggressiva per i polimeri e più sicura per l'operatore, dato che la reazione col materiale organico non presenta elevata reattività, al contrario ad esempio di quella col perossido di idrogeno in presenza di ioni  $Fe^{2+}$ .

Risulta tuttavia più costosa dei metodi tradizionali e l'efficacia globale del processo è spesso limitata ad alcuni composti specifici data la relatività selettività di questi catalizzatori. Gli enzimi inoltre agiscono in un range di temperatura (spesso anche intorno ai 50°C) e pH ben definito, che deve essere soddisfatto per avere rimozioni ottimali del contenuto organico. Un altro aspetto problematico dell'utilizzo di digestioni enzimatiche è il lungo tempo d'incubazione, soprattutto

se effettuate in più passaggi. Ciò rende infatti necessarie manipolazioni aggiuntive del campione con un aumento delle probabilità di contaminazione (79, 106).

La digestione enzimatica viene spesso utilizzata in associazione a quella chimica con perossido di idrogeno per i campioni derivati da acque superficiali, da acque in uscita dagli impianti di trattamento dei reflui e come tecnica di purificazione consigliata dal DWI (58) per i campioni derivati dagli altri tipi di acqua dolce (che potrebbero comunque presentare tracce di biofilm in grado di ostacolare l'ispezione visiva).

Diversi enzimi e combinazioni di enzimi sono stati testati nei protocolli di digestione presenti in letteratura.

La proteinasi K ha mostrato un'efficienza di digestione fino al 97% a 50°C in campioni derivati da acqua marina (101); l'uso sequenziale di proteasi, cellulasi e chitinasi intervallata da WPO ha mostrato un'efficacia addirittura del 98,3% per la stessa tipologia di matrice (102). Un'efficacia digestiva molto alta (72-88%) è stata ottenuta anche utilizzando esclusivamente enzimi (tripsina, collagenasi e papaina) sebbene la matrice presa come riferimento sia di tipo biologico (93).

In associazione agli enzimi o ad altri digestivi viene spesso utilizzato il sodio dodecil solfato (SDS), un tensioattivo ionico in grado di denaturare proteine, disgregare le membrane cellulari e promuovere il distacco di materiale organico dalle microplastiche e degli stessi analiti dai filtri (99).

## Flottazione per densità

La flottazione per densità è una tecnica di separazione gravimetrica che ha come scopo principale quello di separare le microplastiche dalle impurezze pesanti (spesso di origine minerale) presenti nel campione (61). Si tratta di una procedura utilizzata prevalentemente per fanghi di depurazione e sedimenti, dato l'alto contenuto inorganico, ma se ne fa uso anche in diversi studi su campioni derivati da acque meno pulite, come quelle superficiali (47, 73, 79, 95).

Viene solitamente eseguita a posteriori della digestione per le acque e consiste nella miscelazione della soluzione ricavata dal processo digestivo o dalla solubilizzazione delle microplastiche raccolte nella fase di campionamento con una soluzione ipersalina. La soluzione ottenuta viene quindi posta in un imbuto separatore lasciando sedimentare le componenti più pesanti.

Questa tecnica sfrutta la tendenza delle microplastiche con densità prossime a quelle dell'acqua (0,8-1,4 g/cm<sup>3</sup>) ad affiorare in superficie (flottazione) quando messe a contatto con una soluzione ipersalina; sedimenti e altre impurezze tendono invece a precipitare.

La principale problematica di questa tecnica è il fatto che non tutte le microplastiche vengono efficacemente recuperate in questo modo. I polimeri fluorurati, gli elastomeri e anche alcune gomme, in quanto molto più densi rispetto alle altre microplastiche, non affiorano in superficie tramite trattamento con soluzioni ipersaline e vengono perse durante questa procedura.

Inoltre, le microplastiche di piccole dimensioni (SMP) possono non avere una sufficiente spinta idrostatica per essere separate in questo modo e le bolle formatesi durante il processo di flottazione possono ulteriormente interferire con la loro separazione (107).

Un altro aspetto negativo dell'utilizzo di questi sali è osservato dopo la filtrazione della soluzione utilizzata per la separazione. Alcuni residui possono rimanere adesi alla superficie del filtro stesso e addirittura formare cristalli dopo l'essiccazione. Ciò può ostacolare la successiva quantificazione e identificazione dei polimeri.

Le soluzioni ipersaline vengono di solito preparate al momento utilizzando prevalentemente alogenuri di sodio e di zinco o formiato di potassio.

La scelta del sale da utilizzare viene effettuata in virtù della disponibilità e della sua capacità separativa, che da uno studio intercomparativo sui sedimenti sembra risultare tanto maggiore quanto più alta è la densità finale della soluzione (108).

In questo studio sono stati preparati campioni arricchiti di microplastiche comuni da trovare nell'ambiente (PP, PE, LDPE, HDPE, PS, Nylon, uPVC, pPVC, PET) in due range dimensionali (200-400  $\mu\text{m}$  e 800-1000  $\mu\text{m}$ ) e poi trattati con diverse soluzioni ipersaline.

La soluzione ipersalina di cloruro di sodio (NaCl) ha presentato recuperi meno elevati (<90% per entrambi le classi dimensionali) rispetto agli altri sali. Ciò sembra essere dovuto alla bassa densità delle sue soluzioni sature (1,2  $\text{g/cm}^3$ ). Tuttavia, si tratta di un sale poco costoso, facilmente reperibile e non dannoso per l'ambiente nonché il primo mai utilizzato per questa tipologia di pretrattamento (1).

Le soluzioni ipersaline di bromuro di zinco ( $\text{ZnBr}_2$ ) e cloruro di zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) hanno presentato invece recuperi maggiori (>95% per entrambi le classi dimensionali). Ciò sembra dovuto alla più alta densità raggiunta dalle loro soluzioni sature (1,7  $\text{g/cm}^3$ ). Si tratta però di reagenti più costosi e a maggior impatto sull'ambiente rispetto al cloruro di sodio (108).

Le soluzioni ipersaline di ioduro di sodio (NaI) hanno mostrato recuperi paragonabili a quelli degli alogenuri di zinco, probabilmente in relazione alla loro elevata densità (1,7  $\text{g/cm}^3$ ).

Si tratta però di un reagente dai costi comunque elevati; le sue soluzioni possono, inoltre, reagire con i filtri di cellulosa scurendoli e complicando l'identificazione visiva delle microplastiche (60, 107).

In letteratura si ritrovano anche flottazioni effettuate con altri sali quali politungstato di sodio (SPT, 1,5  $\text{g/cm}^3$ ) (71,109,110) e formiato di potassio ( $\text{HCOOK}$ , 1,5  $\text{g/cm}^3$ ) (111).

La Tabella 4 mostra le differenti tipologie di sali utilizzati per la flottazione delle microplastiche.

**Tabella 4. Tipologie di sali utilizzati per la flottazione delle microplastiche**

Tipo di sale	Densità della soluzione satura	Vantaggi applicativi	Svantaggi applicativi
NaCl	1,2 $\text{g/cm}^3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poco costoso</li> <li>• Facilmente reperibile</li> <li>• Non dannoso per l'ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ridotta capacità separativa rispetto agli alogenuri di zinco e a NaI</li> </ul>
$\text{ZnBr}_2$ $\text{ZnCl}_2$	1,7 $\text{g/cm}^3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maggiore capacità separativa rispetto agli altri Sali</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costosi</li> <li>• Dannosi per l'ambiente</li> </ul>
NaI	1,7 $\text{g/cm}^3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacità separativa paragonabile a quella di <math>\text{ZnBr}_2</math></li> <li>• Non dannoso per l'ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reagisce con i filtri di cellulosa scurendoli e complicando l'identificazione visiva delle microplastiche</li> </ul>
SPT	1,5 $\text{g/cm}^3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Densità della soluzione più alta di quella con NaCl</li> <li>• Meno dannoso per l'ambiente rispetto agli alogenuri di zinco</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevato costo</li> <li>• Mai utilizzato per le acque interne</li> <li>• Pochi studi al riguardo</li> </ul>
HCOOK	1,5 $\text{g/cm}^3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Densità della soluzione più alta di quella con NaCl</li> <li>• Non dannoso per l'ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pochi studi al riguardo</li> </ul>

## Filtrazione

La filtrazione, oltre ad essere la principale tecnica per il campionamento delle microplastiche, è anche richiesta fra le varie procedure di purificazione per eliminare i reagenti utilizzati e altri possibili interferenti.

La tipologia di filtro viene scelta in funzione della praticità, della disponibilità, della porosità e dell'adeguatezza alla tecnica analitica prescelta, se del caso (Tabella 5).

**Tabella 5. Tipologie di filtri utilizzati nei protocolli analitici per l'analisi delle microplastiche**

Tipo di filtro	Tecnica analitica	Caratteristiche
Ossido di alluminio	MicroFTIR in trasmissione MicroRaman	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adatti all'analisi in trasmissione con MicroFTIR</li> <li>• Rigidi ma fragili</li> <li>• Più utilizzati per le acque</li> </ul>
Silicio	MicroFTIR in trasmissione MicroRaman	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adatti all'analisi in trasmissione con MicroFTIR</li> <li>• Forma quadrata inadatta alla maggior parte dei sistemi di filtrazione standard</li> </ul>
Policarbonato rivestito d'oro	MicroFTIR in riflessione MicroRaman	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adatti all'analisi in riflessione con MicroFTIR</li> <li>• Superficie altamente riflettente che può rendere difficoltoso il riconoscimento di alcune particelle</li> </ul>
Policarbonato track-etched (PCTE)	Ispezione visiva tramite colorazione con Nile Red e microscopia a fluorescenza	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Migliore scelta per l'ispezione visiva tramite colorazione con Nile Red</li> <li>• Non testato per altre tecniche analitiche</li> <li>• Il filtro potrebbe rilasciare microplastiche nel campione</li> </ul>
Politetrafluoro-etilene (PTFE)	Ispezione visiva tramite SEM-EDS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Migliore scelta per l'ispezione visiva tramite SEM-EDS</li> <li>• Non testato per le altre tecniche analitiche</li> <li>• Il filtro potrebbe rilasciare microplastiche nel campione</li> </ul>
Altre tipologie (acciaio inossidabile, cellulosa e microfibra di vetro)	Adatti solo per campionamento e filtrazione intermedia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quelli in acciaio inossidabile rappresentano la migliore scelta in fase di campionamento</li> </ul>

Il filtro rappresenta infatti solitamente anche il supporto sul quale vengono eseguite le analisi tramite microscopia infrarossa a trasformata di Fourier (MicroFTIR o  $\mu$ -FTIR) e microscopia Raman (MicroRaman o  $\mu$ -Raman). Questo dovrebbe quindi interferire il meno possibile con le tecniche ottiche e/o spettroscopiche in questione. Il filtro scelto per questa fase dovrebbe infatti trasmettere o riflettere la radiazione incidente senza presentare assorbimenti alle lunghezze d'onda di interesse, ovvero quelle della regione dell'infrarosso.

I filtri in acciaio inossidabile, così come quelli in microfibra di vetro e in cellulosa, vengono utilizzati esclusivamente per il campionamento o eventualmente per filtrare le soluzioni da una fase all'altra della procedura di pretrattamento. Non sono adatti per le analisi spettroscopiche perché presentano assorbimenti nella zona dell'infrarosso (filtri in microfibra di vetro) o perché non sono adattabili ai sistemi di filtrazione standard. Si tratta comunque di filtri generalmente meno costosi di quelli utilizzati per la spettroscopia.

I filtri in ossido di alluminio sono di gran lunga quelli più utilizzati come supporto all'analisi spettroscopica (112-114). Si tratta di filtri rigidi e sottili, particolarmente adatti per le analisi tramite spettroscopia IR in trasmissione (nel range 1250-3800  $\text{cm}^{-1}$ ) ma non per quelle in riflessione; possono essere utilizzati con successo anche per la spettroscopia Raman.

Hanno un costo generalmente più contenuto rispetto agli altri filtri utilizzati per le analisi spettroscopiche; sono però anche tra quelli più fragili.

I filtri in silicio sono rigidi, fragili e più costosi degli altri filtri utilizzati per le analisi spettroscopiche. È possibile utilizzarli nelle analisi con spettroscopia IR in trasmissione e in quelle con spettroscopia Raman (115). Uno svantaggio dei filtri in silicio, oltre al costo, è rappresentato dalla forma rettangolare che mal si adatta ai sistemi di filtrazione standard.

Altri filtri utilizzabili per le analisi spettroscopiche sono quelli in policarbonato rivestito d'oro (116). Questi possono essere impiegati per analisi con spettroscopia IR in riflessione o con spettroscopia Raman. Tuttavia, in riflessione, non lavorando al massimo dell'energia IR la qualità degli spettri raccolti viene inevitabilmente ridotta.

Ciascun filtro utilizzato per la spettroscopia deve essere purificato prima di esser sottoposto all'analisi. Questa procedura è necessaria per rimuovere le impurezze ancora presenti sul filtro e operare nelle migliori condizioni possibili. Ciò viene effettuato facendo passare sul filtro, subito dopo la filtrazione del campione, alcuni solventi opportunamente decontaminati (es. etanolo, metanolo o alcol isopropilico).

Il filtro utilizzato per le analisi spettroscopiche deve inoltre essere asciutto. Il filtro andrebbe asciugato a temperatura ambiente, in un contenitore (es. una capsula di Petri) decontaminato e in ambienti atti a minimizzare la contaminazione (sotto cappa a flusso laminare o in *clean room plastic-free*).

I filtri fungono da supporto per l'analisi anche quando sono utilizzate tecniche di colorazione (Nile Red, Rosa Bengala) come metodo per il conteggio delle particelle.

I filtri a membrana in policarbonato del tipo PCTE (*PolyCarbonate Track-Etched*) si sono dimostrati ottimali per l'utilizzo del Nile Red. La loro superficie idrofila è in grado di ridurre la ritenzione del colorante non legato diminuendo la fluorescenza di fondo durante l'analisi. Inoltre, sono traslucidi quando esposti ad etanolo e ciò rende possibile l'utilizzo della microscopia a campo chiaro oltre che quella di fluorescenza (117).

Infine, qualora si utilizzi come tecnica analitica la microscopia elettronica a scansione accoppiata alla spettrometria in dispersione di energia (SEM-EDS), i filtri migliori si sono dimostrati essere quelli in politetrafluoroetilene (PTFE) (45).

## Altre tecniche di pretrattamento del campione

In letteratura è possibile ritrovare diversi altri espedienti per il pretrattamento dei campioni, che a volte sostituiscono ma spesso accompagnano le tecniche più utilizzate.

L'ultrasonificazione può essere d'ausilio alle tecniche di pretrattamento più comuni (digestione, flottazione per densità) per promuovere il distacco delle microplastiche dai filtri e dei contaminanti adesi sulla loro superficie (71, 80). L'utilizzo degli ultrasuoni dovrebbe però essere valutato con attenzione, perché la plastica "invecchiata" e fragile potrebbe frammentarsi durante il processo generando artificialmente microplastiche secondarie in grado di alterare il numero effettivo di contaminanti rilevato (75).

L'essiccamento in stufa può risultare utile, prima di ogni altra tecnica di pretrattamento, per ridurre il volume dei campioni non completamente asciutti come quelli ricavati dalle acque superficiali. È necessario però adottare, come per la digestione, un controllo serrato della temperatura per evitare di degradare/denaturare i polimeri.

La stufa può essere anche utilizzata per asciugare i filtri contenenti i campioni subito prima dell'analisi spettroscopica. È però preferibile, come già detto, condurre questa operazione a temperatura ambiente in ambienti atti a ridurre la contaminazione per minimizzare i fenomeni degradativi.

Come tecnica di digestione alternativa è stato valutato il trattamento con microonde, con risultati piuttosto deludenti (118).

Per quanto riguarda la separazione delle microplastiche dalla matrice, è stata valutata invece anche l'estrazione con olio. Questa tecnica sfrutta la lipofilità dei polimeri ricercati rispetto alle impurezze contenute nel campione e la minore densità dell'olio rispetto all'acqua. L'efficacia della tecnica dipende prevalentemente dalla tipologia di olio utilizzato e dalle impurezze presenti.

Ad esempio, l'estrazione con olio di canola per i sedimenti ha prodotto recuperi elevati (96,1%), tempistiche ridotte rispetto all'utilizzo di una soluzione satura di alogenuri e una ritenzione minima di materiale organico (119). Al contrario, l'olio di pino, in condizioni sperimentali simili, ha prodotto recuperi molto più bassi (55,0%), in particolare per le plastiche ad alta densità (120).

Un'altra tecnica di pretrattamento spesso utilizzata è la marcatura (*tagging*) dei polimeri ricercati con un colorante (117, 121, 122). Questo espediente permette di distinguere le microplastiche dalle altre particelle presenti nel campione facilitando il conteggio in microscopia senza il successivo riconoscimento polimerico.

Affinchè lo scopo venga raggiunto, è necessario che il colorante si leghi efficacemente ad ogni tipologia di microplastica presente nel campione, non interagisca col restante materiale o col filtro e produca una colorazione evidente.

Diversi coloranti sono stati testati per lo scopo, ma solo pochi si sono dimostrati efficaci e selettivi. In letteratura sono infatti riportati risultati insoddisfacenti per coloranti lipofili come Eosina B, Hostasol® Yellow 3G, Oil Red EGN e Rose Bengal (81, 122). Attualmente, il colorante più promettente è il Nile Red.

Il Nile Red è un colorante fluorescente lipofilo che è stato utilizzato in passato per colorare i lipidi in campioni biologici (123) e che si è dimostrato efficace anche con i polimeri sintetici (124). Alcuni autori (49, 117, 121, 122) hanno messo a punto dei protocolli di incubazione dei campioni con risultati promettenti.

La principale criticità nell'utilizzo del Nile Red è dovuta all'interazione del colorante con le impurezze lipidiche presenti nei campioni, restituendo falsi positivi. Inoltre, alcuni polimeri come PC, poliuretano (PU), PET e PVC hanno prodotto segnali di fluorescenza deboli (117) e le fibre si sono dimostrate difficili da colorare (49). Quindi, l'analisi quantitativa con Nile Red potrebbe fornire delle sottostime. In ogni caso, anche presupponendo un'alta efficacia dei metodi digestivi e una colorazione selettiva, è sempre necessario confermare successivamente l'identità dei polimeri con i metodi spettroscopici per avere una conferma, come ribadito dall'ECHA (5).

Per questo motivo, in molti studi sulle microplastiche > 100 µm, dopo la marcatura con il Nile Red, alcune particelle selezionate sono state analizzate con spettroscopia infrarossa per l'identificazione polimerica.

## Strategie per pretrattamento e filtrazione dei campioni

L'efficacia del pretrattamento dei campioni, analogamente a quella del campionamento, è influenzata da diversi fattori. Fra questi, il parametro che richiede maggiore attenzione è la temperatura di lavoro. Alcune tecniche di pretrattamento quali ad esempio WPO, digestione enzimatica ed essiccamento in stufa, fanno generalmente uso di temperature elevate.

In uno studio sull'impatto della temperatura sui polimeri (100), viene suggerito di rimanere sotto i 60°C per evitare possibili degradazioni, specialmente a carico delle microsferi (*microbeads*). Koelmans *et al.* (44) suggeriscono un margine di sicurezza ulteriore, cioè di restare al di sotto dei 50°C. Nel valutare l'impatto della temperatura è fondamentale considerare anche la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) dei polimeri ricercati, soprattutto di quelli ubiquitari nell'ambiente come il nylon. Infatti, anche una temperatura di 50°C, considerata sicura, contribuisce a denaturare/degradare questo polimero (la cui temperatura di transizione varia 37°C e 55°C, a seconda delle tipologie di nylon considerate), impedendone il riconoscimento e determinando sottostime nelle quantità delle particelle e delle fibre microplastiche.

Durante l'intero protocollo di pretrattamento dei campioni, alla stregua del campionamento, occorre minimizzare la contaminazione.

La contaminazione durante questa fase dell'analisi avviene principalmente a causa all'ambiente di lavoro o alle manipolazioni dei campioni da parte degli operatori. Per ridurre, è necessario aprire e manipolare i campioni sotto cappa a flusso laminare (44) oppure in un ambiente controllato come una *clean room (plastic-free)* e condurre un'accurata pulizia preventiva delle superfici di lavoro. Deve inoltre essere utilizzata e vetreria e utensileria (evitando materiali plastici e prediligendo l'acciaio) opportunamente decontaminata; va anche limitato, come durante il campionamento, l'uso di indumenti in fibra sintetica.

Anche in questo caso, è fondamentale quantificare la contaminazione attraverso l'analisi dei bianchi (bianchi reagente e procedurali). Il numero dei bianchi da adottare, anche in questo caso, dovrebbe essere di almeno tre unità (44).

L'analisi dei bianchi consente di correggere i risultati del conteggio delle microplastiche per i valori trovati e di comprendere quali particelle derivino dall'ambiente di lavoro e quali, effettivamente, dal campione.

Per valutare l'efficienza della procedura di pretrattamento, si dovrebbe procedere alla stima del recupero. Il recupero può essere calcolato preparando dei campioni arricchiti di analita a concentrazione nota (controlli positivi) e verificando poi quanto ne viene perso al momento dell'analisi. Questo approccio è di difficile attuazione per l'analisi delle microplastiche (e delle SMP), poiché non esistono in commercio standard di tutti i polimeri che è possibile trovare nei campioni ambientali. Considerato poi che le dimensioni delle microplastiche sono molto varie, si dovrebbero preparare controlli positivi aventi tutte le classi dimensionali considerate (40,44) e bisognerebbe avere anche standard di polimeri già degradati per simulare il comportamento delle microplastiche dei campioni.

Il numero di controlli positivi da adottare, per ciascuno dei metodi impiegati, dovrebbe essere almeno di tre unità (104). Solamente tre dei cinquanta studi revisionati da Koelmans *et al.* (44) hanno fornito dati completi sui controlli positivi, segnale che l'utilizzo di questo espediente non è ancora una pratica comune.

Comunque, in assenza di controlli positivi, l'analisi dei bianchi reagente e procedurali, unita all'analisi in replicato dei campioni, permette di valutare la ripetibilità, la riproducibilità, la robustezza e la precisione del metodo di pretrattamento e di quello analitico nella sua interezza.

## CONCLUSIONI

Le tecniche di campionamento e di purificazione dei campioni di microplastiche disponibili in letteratura sono molteplici, differenti tra di loro e spesso non totalmente riproducibili. Ne segue che i risultati sperimentali, anche presupponendo condizioni strumentali identiche, non potranno essere confrontati.

Ciò che maggiormente influenza la variabilità dei risultati, oltre alla tipologia di reagenti scelti per il pretrattamento del campione, è il valore di *cut-off* scelto al momento del campionamento.

La scelta di questo valore, che il più delle volte coincide con l'apertura delle maglie dello strumento utilizzato per il campionamento (reti, setacci, filtri) o nella successiva filtrazione (SMP), dovrebbe essere pertanto pensata in virtù del *target* dimensionale scelto per l'analisi e della tecnica analitica utilizzata.

Sia nel campionamento sia poi nel pretrattamento è fondamentale minimizzare la contaminazione e quantificarla attraverso i bianchi. La contaminazione può essere ridotta adottando specifiche accortezze quali quella di lavorare in un ambiente dedicato (sotto cappa a flusso laminare con piano in acciaio, oppure in clean room *plastic-free*) e utilizzare solo vetreria e utensileria preventivamente decontaminata. Inoltre, va considerato il vestiario indossato durante le operazioni di campionamento, di pretrattamento e successivamente di analisi strumentale, da cui potrebbe derivare una contaminazione da microplastiche anche consistente.

Analizzare i bianchi di campo, i bianchi reagente e i bianchi procedurali è fondamentale, poiché ciò consente di verificare, per ogni *step* dell'analisi, se la contaminazione è stata effettivamente minimizzata.

Mettere a punto un protocollo di campionamento e di pretrattamento per le microplastiche > 100  $\mu\text{m}$  e per le SMP condiviso dalla comunità scientifica, permetterà di ottenere dati riproducibili, replicabili e robusti. Ciò potrebbe rappresentare una soluzione per ridurre la dispersione dei dati che si osserva in letteratura.

Al presente rapporto sui metodi di campionamento e purificazione dei campioni ne seguirà uno analogo riguardante le tecniche analitiche e l'interpretazione dei risultati ottenuti, che avrà lo scopo di illustrare in maniera completa le principali modalità con le quali le microplastiche (e le SMP) vengono identificate e quantificate.

## BIBLIOGRAFIA

1. Thompson RC, Olsen Y, Mitchell R.P, Davies A, Rowland SJ, John A, McGonigle D, Russel A. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 2004; 304 (5672): 838.
2. Ng KL & Obbard JP. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 2006;52(7):761-7.
3. Marsden P, Koelmans B, Bourdon-Lacombe J, Gouin T, D'Anglada L, Cunliffe D, Jarvis P, Fawell J, De France J. *Microplastic in drinking water*. Geneva: World Health Organization; 2019.
4. Thompson RC, Bergmann M, Gutow L, Klages M. Microplastics in the marine environment: sources, consequences and solutions. *Marine Anthropogenic Litter* 2015:185-200.
5. ECHA. *Proposal for a restriction: intentionally added microplastics (Annex XV restriction report: Version 1.2)*. Helsinki: European Chemical Agency (ECHA); 2019.
6. ISO TR21960: 2020. *Plastic in the environment. Current state of knowledge and methodologies*. Geneva: International Organization for Standardization; 2020.
7. German Federal Ministry of Education and Research. *Microplastic Analytics. Sampling, preparation, and detection methods*. Berlin: German Federal Ministry of Education and Research; 2018.
8. Hartmann N, Huffer T, Thompson R, Hassello M, Verschoor A, Daugaard A, Rist S, Karlsson T, Brennholt N, Cole M, Herrling M, Hess M, Ivleva N, Lusher A, Wagner M. Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. *Environmental Science and Technology* 2019;53 (3):1039-47.
9. Presence of microplastic and nanoplastic in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal* 2016;14(6):4501.
10. Food and Agriculture Organization of the United Nation. *Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation; 2017.
11. Guzzetti E, Sureda A, Tejada S, Faggio C. Microplastic in marine organism: environmental and toxicological effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2018;64:164-71.
12. Wright SL & Kelly JF. Plastic and human health: a micro issue? *Environmental science and technology* 2017;51(12):6634-47.
13. Hahladakis J, Velis Costas A, Weber R, Iacovidou E, Purnell P. An overview of chemical additives present in plastics: migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal, and recycling. *Journal of Hazardous Materials* 2018;344:179-99.
14. Wang F, Wong C, Da Chen, Lu X, Wang F, Zeng E. Interaction of toxic chemicals with microplastics: A critical review. *Water Research* 2018;139:208-219.
15. McCormick AR, Hoellein TJ, London MG, Hittie J, Scott WJ, Kelly J. Microplastic in surface waters of urban rivers: concentration, sources, and associated bacterial assemblages. *Ecosphere*, 2016; 7(11): e01556.
16. Mammo FK, Amoah ID, Gani KM, Pillay L, Ratha SK, Bux F, Kumari S. Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants. *Science of The Total Environment* 2020;743:140518.
17. Liu J, Zhang T, Piché-Choquette S, Wang G, Li J. microplastic pollution in China, an invisible threat exacerbated by food delivery services. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2020; Oct 19.

18. O'Connor JD, Mahon AM, Ramsperger Anya FMR, Trotter B, Redondo-Wassererwarmer PE, Koelmans AA, Lally HT, Murphy S. Microplastics in freshwater biota: a critical review of isolation, characterization, and assessment methods. *Global Challenges* 2019;4(6):1800118.
19. Fu Z, Guanglong C, Wang W, Wang J. Microplastic pollution research methodologies, abundance, characteristics and risk assessments for aquatic biota in China. *Environmental Pollution* 2020;266 (Pt.3).
20. Jamieson AJ, Brooks LSR, Reid WDK., Piertney SB, Narayaaswamy BE, Linley TD. Microplastics and synthetic particles ingested by deep-sea amphipods in six of the deepest marine ecosystems on Earth. *Royal Society open Science* 2019;6 2).
21. Corami F, Rosso B, Roman M, Picone M, Gambaro A, Barbante C. Evidence of small microplastics (<100 µm) ingestion by Pacific oysters (*Crassostrea gigas*): A novel method of extraction, purification, and analysis using Micro-FTIR. *Marine Pollution Bulletin* 2020;160:111606.
22. Boucher J, Friot D. Primary Microplastics in the Oceans: A Global Evaluation of Sources. *The International Union for Conservation of Nature (IUCN)* 2017;43.
23. Munoz-Pineiro MA. *Microplastics. Focus on Food and Health. Factsheet 2017*. Publications Office of the European Union; 2018. Disponibile all'indirizzo: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/brochures-leaflets/microplastics-focus-food-and-health>; ultima consultazione 04/01/2021.
24. Alimi OS, Budarz JF, Hernandez LM, Tufenkij N. Microplastics and Nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. *Environmental Science and Technology* 2018;52(4):1704-24.
25. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). *Emission of microplastic and potential mitigation measures: abrasive cleaning agents, paints and tyre wear*. Bilthoven: RIVM; 2016. (RIVM Report 2016-0026)
26. Foundation for Water Research (FWR). *Microplastic in the Freshwater Environment*. Marlow: FWR; 2017. (FR/R0027)
27. Corami F, Rosso B, Bravo B, Gambaro A, Barbante C. A novel method for purification, quantitative analysis and characterization of microplastic fibers using Micro-FTIR. *Chemosphere* 2020;238:124564.
28. The Water Environment & Reuse Foundation (WE&RF). *White Paper. Microplastic in aquatic systems. An Assessment of Risk. Summer of critical issues and recommended path forward*. Alexandria: WE&RF; 2017.
29. Tang N, Liu X, Xing W. Microplastics in wastewater treatment plants of Wuhan, Central China: Abundance, removal, and potential source in household wastewater. *Science of the Total Environment* 2020;745:141026.
30. Elkhatib D, Oyanedel-Craver VA. Critical review of extraction and identification methods of microplastics in wastewater and drinking water. *Environmental Science & Technology* 2020;54(12):7037-49.
31. Eerkes-Medrano D, Leslie HA, Quinn B. Microplastics in drinking water: A review and assessment. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 2019;7:69-75.
32. Mintenig SM, Löder MHJ, Primpke S, Gerdt G. Low number of microplastic detected in drinking water from ground water sources. *Science of the Total Environment* 2019;648:631-5.
33. Panko JM, Hitchcock KM, Fuller GW, Green D. Evaluation of tire wear contribution to PM 2.5 in Urban Environments. *Atmosphere* 2019;10(2):99.
34. Gasperi J, Dris R, Bonin T, Rocher V, Tassin B. Assessment of floating plastic debris in surface water along the Seine River. *Environmental Pollution* 2014;195:163-6.

35. Morritt D, Stefanoudis PV, Pearce D, Crimmen OA, Clark PF. Plastic in Thames: A river runs through it. *Marine Pollution Bulletin* 2014;78:196-200.
36. Novotna K, Cermakova L, Pivokonska L, Cajthaml T, Pivokonsky M. Microplastics in drinking water treatment – Current knowledge and research needs. *Science of the Total Environment* 2019;667:730-40.
37. Baldwin AK, Corsi SR, Mason SA. Plastic Debris in 29 Great Lakes Tributaries: relations to watershed attributes and hydrology. *Environmental Science and Technology* 2016;50:10377-85.
38. Grbića J, Helm P, Athey S, Rochman CM. Microplastics entering northwestern Lake Ontario are diverse and linked to urban sources. *Water Research* 2020;174:115623.
39. Ma B, Xue W, Ding Y, Hu C, Liu H, Qu J. Removal characteristics of microplastics by Fe-based coagulants during drinking water treatment. *Journal of Environmental sciences (China)* 2019;78:267-75.
40. Mason AS, Welch VG, Neratko J. Synthetic polymer contamination in bottled water. *Frontiers in Chemistry* 2018;6:407.
41. Schymanski D, Goldbeck C, Humpf HU, Fürst P. Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Research* 2018;129:154-62.
42. Winkler A, Winkler N, Santo N, Ortenzi MA, Bacchetta R, Bolzoni E, Tremolada P. Does mechanical stress cause microplastic release from plastic water bottles? *Water Research* 2019;116:115082.
43. Oßmann BE, Sarau G, Holtmannspötter H, Pischetsrieder M, Christiansen SH, Dicke W. Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research* 2018;141:307-16.
44. Koelmans B, Mohamed Nor NH, Hermsen E, Kooi, Mintenig S, De France J. Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Research* 2019;155:410-22.
45. Pivokonsky M, Cermakova L, Novotna K, Peer P, Cajthaml T, Janda V. Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water. *Science of the Total Environment* 2018;643:1644-51.
46. Wang W, Ndungu AW, Li Z, Wang J. Microplastics Pollution in Inland Freshwaters of China: A Case Study in Urban Surface Waters of Wuhan, China. *Science of the Total Environment* 2017;575:1369-74.
47. Ziajahromi S, Neale PA, Rintoul L, Leusch FDL. Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics: development of a new approach to sample wastewater-based microplastics. *Water Research* 2017;112:93-9.
48. D8332 – 20. *Standard practise for collection of water samples with high, medium, or low suspended solids for identification and quantification of microplastic particles and fibers*. West Conshohocken: ASTM International; 2020.
49. Tamminga M, Stoewer SC, Fischer EK. On the representativeness of pump water samples versus Manta sampling in microplastic analysis. *Environmental Pollution* 2019;254:112970.
50. Hildebrandt L, Voigt N, Zimmermann T, Reese A, Proefrock D. Evaluation of continuous flow centrifugation as an alternative technique to sample microplastic from water bodies. *Marine Environmental Research* 2019;151:104768.
51. Leslie HA, Brandsma SH, van Velzen MJ, Vethaak AD. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environment International* 2017;10:133-42.
52. Dümichen E, Eisentraut P, Bannick CG, Barthel AK, Senz R, Braun U. Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. *Chemosphere* 2017;174:572-84.

53. Cabernard L, Roscher L, Lorenz C, Gerdt G, Primpke S. Comparison of Raman and Fourier transform infrared spectroscopy for the quantification of microplastics in the aquatic environment. *Environment Science & Technology* 2018;52:13279-88.
54. Weis JS. Aquatic microplastic research – a critique and suggestions for the future. *Water* 2020;12(5):1475.
55. Ryan PG, Moore CJ, van Franeker A, Moloney CL. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences* 2009;364:1999-2012.
56. Tong H, Jiang Q, Hu X, Zhong X. Occurrence and identification of microplastics in tap water from China. *Chemosphere* 2020;252:126493.
57. Shruti VC, Perez-Guevara F, Kutralam-Muniasamy G. Metro station free drinking water fountain- A potential “microplastics hotspot” for human consumption. *Environmental Pollution* 2020;261:114227.
58. Drinking Water Inspectorate. *Sink to River – River to Tap. A review of potential risks from nanoplastic and microplastic*. London: DWI; 2019. (Report Ref. No. 19/EQ/01/18)
59. Eerkes-Medrano D, Thompson R, Aldridge DC. Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research* 2015;75:63-82.
60. Prata JC, da Costa JP, da Costa A, Duarte C, Rocha-Santos T. Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: A critical review. *Trends in Analytical Chemistry* 2019;110:150-9.
61. Dris R, Imhof HK, Löder M, Gasperi J, Laforsch C, Tassin B. Microplastic contamination in freshwater systems: methodological challenges, occurrence and source. In: Zeng E. (Ed.). *Microplastic contamination in aquatic environment. An emerging matter of environmental urgency*. Guangzhou: Elsevier; 2018. p. 51-93.
62. Mani T, Hauk A, Walter H, Burkhard-Holm P. Microplastics profile along the Rhine River. *Nature Scientific Reports* 2016;5:17988.
63. McCormick AR, Hoellein TJ, London MG, Hittie J, Scott WJ, Kelly J. Microplastic in surface waters of urban rivers: concentration, sources, and associated bacterial assemblages. *Ecosphere* 2016;7(11).
64. Sighicelli M, Pietrelli L, Lecce F, Iannilli V, Falconieri M, Coscia L, Di Vito S, Nuglio S, Zampetti G. Microplastic Pollution in the Surface Waters of Italian Subalpine Lakes. *Environmental Pollution* 2018;236:545-651.
65. Lechner A, Keckeis H, Lumesberger-Loisl F, Zens B, Krusch R, Tritthard M, Glas M, Schludermann E. The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe’s second largest river. *Environmental Pollution* 2014;188:177-81.
66. Moore CJ, Lattin GL, Zellers AF. Quantity and type of plastic debris flowing from two urban rivers to coastal waters and beaches of Southern California. *Journal of Integrated Coastal Zone Management* 2011;11:65-73.
67. Vermaire JC, Pomeroy C, Herczegh SM, Haggart O, Murphy M. Microplastic abundance and distribution in the open water and sediment of the Ottawa River, Canada, and its tributaries. *FACETS* 2017;2:301-14.
68. Dris R, Gasperi J, Rocher V, Saad M, Renault N, Tassin B. Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environmental Chemistry* 2015;12.
69. Estahbanati S, Fahreneld NL. Influence of wastewater treatment plant discharges on microplastic concentrations in surface water. *Chemosphere* 2016;162:277-84.

70. NOAA-A Marine Debris Division. *Proceedings of the international research workshop on the occurrence, effects and fate of microplastic marine debris* (Technical Memorandum NOS-OR&R30). Tacoma: Silver Spring; 2008.
71. Li J, Liu H, Chen JP. Microplastic in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and method for microplastic detection. *Water Research* 2018;137:362-74.
72. Kovač Viršek M, Palatinus A, Koren Š, Peterlin M, Horvat P, Kržan A. Protocol for microplastics sampling on the sea surface and sample analysis. *Journal of visualized experiments* 2016;118:55161.
73. Fischer EK, Paglialonga L, Czech E, Tamminga M. Microplastic pollution in lakes and lake shoreline sediments. A case study on Lake Bolsena and Lake Chiusi (central Italy). *Environmental Pollution* 2016;213:648-57.
74. Eriksen M, Liboiron M, Kiessling T, Charron L, Alling A, Lebreton L, Richards H, Roth B, Ory NC, Hidalgo-Ruz V, Meerhoff E, Box C, Cummins A, Thiel M. Microplastic sampling with the AVANI trawl compared to two Neuston trawls in the Bay of Bengal and South Pacific. *Environmental Pollution* 2017;30:1-10.
75. Löder MGJ, Gerdt G. Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastic – A critical Appraisal. In: Bergmann M, Gutow L, Klages M (Ed.). *Marine Anthropogenic Litter*. Cham: Springer; 2015. p. 201-227.
76. Di Mauro R, Kupchik JM, Benfield MC. Abundant Plankton-Sized Microplastic Particles in Shelf Waters of the Northern Gulf of Mexico. *Environmental Pollution* 2017;230:798-809.
77. Brown DM, Cheng L. New net for sampling the ocean surface. *Marine Ecology – Progress Series* 1881;5:225-7.
78. Rodrigues MO, Abrantes N, Gonçalves FJM, Nogueira H, Marques JC, Gonçalves AMM. Spatial and temporal distribution of microplastics in water and sediments of a freshwater system (Antuã River, Portugal). *Science of the Total Environment* 2018;633:1549-59.
79. Mintenig SM, Int-Veen I, Löder MGJ, Primpke S, Gerdt G. Identification of microplastic in effluents of wastewater treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water Research* 2017;108:365-72.
80. Dris R, Gasperi J, Rocher V, Tassin B. Synthetic and non-synthetic anthropogenic fibers in a river under the impact of Paris Megacity: Sampling methodological aspects and flux estimations. *Science of the Total Environment* 2018;618:157-64.
81. Lares M, Ncibi MC, Sillanpää M, Sillanpää M. Intercomparison study on commonly used methods to determine microplastics in wastewater and sludge samples. *Environmental Science and Pollution Research* 2019;26:12109-22.
82. Browne MA, Crump P, Niven SJ, Teuten EL, Tonkin A, Galloway T, Thompson RC. Accumulations of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental Science and Technology* 2011;45:9175-9.
83. Cerretero O, Frias JP, Pereiro D, Lopes C, Antunes J, Andrade JM, Camedda A, Goruppi A, de Lucia, Pedrotti ML, Sobral P, Caetano M, Tirelli V, Nash Roisin, Gago J. *Cruise Report. WP4: Microplastic sampling comparison. (R/V Ramón Margalef, BASEXPEMIPS 201704). 17th April – 24th April, Vigo (Spain)*. BASEMAN project, Microplastic Analysis in European Waters; 2017.
84. Setälä O, Magnusson K, Lehtiniemi M, Norén F. Distribution and Abundance of Surface Water Microlitter in the Baltic Sea: A Comparison of Two Sampling Methods. *Marine Pollution Bulletin* 2016;110:177-83.
85. Scopetani C, Esterhuizen-Londt M, Chelazzi D, Cincinelli A, Setälä H, Pflugmacher S. Self-contamination from clothing in microplastics research. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2020;189:110036.

86. Brander SM, Renick VC, Foley MM, Steele C, Woo M, Lusher A, Carr S, Helm P, Box C, Cherniak S, Andrews RC, Rochman CM. Sampling and quality assurance and quality control: a guide for scientists investigating the occurrence of microplastics across matrices. *Applied Spectroscopy* 2020;74(9):1099-125.
87. Hung C, Klasios N, Zhu X, Sedlak M, Sutton R, Rochman CM. Methods matter: methods for sampling microplastic and other anthropogenic particles and their implications for monitoring and ecological risk assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management* 2020;17(1):282-91.
88. Torre M, Digka N, Anastasopoulou A, Tsangaris C, Mytilineou C. Anthropogenic microfibrils pollution in marine biota. A new and simple methodology to minimize airborne contamination. *Marine Pollution Bulletin* 2016;113:55-61.
89. Woodall LC, Gwinnet C, Packer M, Thompson RC, Robinson LF, Paterson GLJ. Using a forensic science approach to minimize environmental contamination and to identify microfibrils in marine sediments. *Marine Pollution Bulletin* 2015;95:40-6.
90. Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science and Technology* 2012;46:3060-75.
91. Martin K, Hasenmueller EA, White JR, Chambers LG, Conkl JL. Sampling, sorting, and characterizing microplastics in aquatic environments with high suspended sediment loads and large floating debris. *Journal of Visualized Experiments* 2018;137:e57969.
92. Carr SA, Liu J, Tesoro AG. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Research* 2016;91:174-82.
93. Courtene-Jones W, Quinn B, Murphy F, Garya S, Narayanaswamy BE. Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Analytical Methods* 2017;9:1437.
94. Morét-Ferguson, Law KL, Proskurowski G, Murphy EK, Peacock EE, Reddy CM. The Size, mass, and composition of plastic debris in the Western North Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 2010;60:1873-88.
95. NOAA-A Marine Debris Program. *Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments (Technical Memorandum NOS-OR&R-48)*. Tacoma: Silver Spring; 2015.
96. Catarino AI, Thompson R, Sanderson W, Henry TB. Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2016;34:947-51.
97. Dehaut A, Cassone AL, Frère L, Harmabessiere L, Himber C, Rinnert E, Rivière G, Lambert C, Soudant P, Huvet A, Duflos G, Paul-Pont I. Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution* 2016;215:223-33.
98. Karami A, Golieskardi A, Choo CK, Romano N, Ho YB, Salamatinia B. A high-performance protocol for the extraction of microplastics in fish. *Science of the Total Environment* 2017;578:485-94.
99. Enders K, Lenz R, Stedmon R, Nielson TG. 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* 2015;100: 70-81.
100. Munno K, Helm PA, Jackson DA, Rochman C, Sims A. Impact of temperature and selected chemical digestion methods on microplastic particles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2018;37:91-8.
101. Cole M, Webb H, Lindeque PK, Fileman ES, Halsband C, Galloway TS. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Nature Scientific Reports* 2015;4:4528.

102. Löder MGJ, Imhof HK, Ladehoff M, Löschel LA, Lorenz C, Mintenig S, Piehl, Primpke S, Schrank I, Laforsch C, Gerds G. Enzymatic purification of microplastics in environmental samples. *Environmental Science and Technology* 2017;51:14283-92.
103. Qiu Q, Tan Z, Wang J, Peng J, Li M, Zhan Z. Extraction, enumeration, and identification methods for monitoring microplastics in the environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 2016;176:102-9.
104. Venny V, Gan S, Kiat H. Current status and prospects of Fenton oxidation for the decontamination of persistent organic pollutants (POPs) in soils. *Chemical Engineering Journal* 2012;213:295-317.
105. Mappa G. *Pre-Trattamento di liquami industriali mediante ossidazione chimica FENTON per il miglioramento della biodegradabilità (BOD/COD), la rimozione del COD e dei Tensioattivi Anionici (MBAS)*. Napoli: ANOVA Studi e Ricerche Interdisciplinari; 2014. (WORKBOOK N°7/1). Disponibile all'indirizzo: <https://anovastudi.files.wordpress.com/2014/01/swt-fntdemo.pdf>; ultima consultazione 05/01/2021
106. Lee J, Chae KJ. A systematic protocol of microplastics analysis from their identification to quantification in water environment: A comprehensive review. *Journal of Hazardous Materials* 2021;403:124049.
107. Lusher AL, Munno K, Hermabessiere L, Carr S. Isolation and extraction of microplastics from environmental samples: an evaluation of practical approaches and recommendations for further harmonization. *Applied Spectroscopy* 2020;74(9):1049-65.
108. Quinn B, Murphy F, Ewins C. Validation of density separation for the rapid recovery of microplastics from sediment. *Analytical Methods* 2016;9:1491-8.
109. Corcoran PL, Biesinger MC, Grifi M. Plastics and beaches: A degrading relationship. *Marine Pollution Bulletin* 2009;58(1):80-4.
110. Corcoran PL. Benthic plastic debris in marine and freshwater environments. *Environmental Science Processes & Impact* 2015;17(8):1363-9.
111. Zhang K, Xiong X, Hu H, Wu C, Bi Y, Wu Y, Liu J. Occurrence and characteristics of microplastic pollution in Xiangxi Bay of three gorges reservoir, China. *Environmental Science & Technology* 2017;51(7):3794-801.
112. Sfriso AA, Tomio Y, Rosso B, Gambaro A, Sfriso A, Corami F, Rastelli E, Corinaldesi C, Mistri M, Munari C. Microplastic accumulation in benthic invertebrates in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Environment International* 2020;137:105587.
113. Velasco A, Rard L, Blois W, Lebrun D, Lebrun F, Pothe F, Stoll S. Microplastic and fibre contamination in a remote mountain lake in Switzerland. *Water*, 2020;19(9):2410.
114. Kelly A, Lannuzel D, Rodemann T, Meiners KM, Auman HJ. Microplastic contamination in east Antarctic sea ice. *Marine Pollution Bulletin* 2020;154:111130.
115. Käppler AK, Windrich F, Löder M, Malanin M, Fischer D, Labrenz M, Eichorn KJ, Voit B. Identification of microplastics by FTIR and Raman microscopy: a novel silicon filter substrate opens the important spectral range below 1300 cm<sup>-1</sup> for FTIR transmission measurements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2018;407(22):6791-801.
116. Kniggendorf AK, Wetzel C, Roth B. Microplastics detection in streaming tap water with Raman Spectroscopy. *Sensors* 2019;19(8):1839.
117. Erni-Cassola G, Gibson MI, Thompson RC, Christie-Oleza J. Lost, but found with Nile red; a novel method to detect and quantify small microplastics (20 µm–1 mm) in environmental samples. *Environmental Science and Technology* 2017;51:13641-8.
118. Karlsson TM, Vethaak AD, Almroth BC, Ariese F, van Velze, Hasselov M, Leslie HA. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation. *Marine Pollution Bulletin* 2017;122:403-8.

119. Crichton E, Noel M, Gies E, Ross PS. A novel, density-independent and FTIR-compatible approach for the rapid extraction of microplastics from aquatic sediments. *Analytical Methods* 2017;9:1419-28.
120. Imhof HK, Schmid J, Niessner R, Ivleva NP, Laforsh C. A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. *Limnology and Oceanography Methods* 2012;10:524-37.
121. Shim WJ, Song YK, Hong SH, Jang M. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine Pollution Bulletin* 2016;113:469-76.
122. Maes T, Jessop R, Wellner N, Haupt K, Mayes AG. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Nature Scientific Reports* 2017;7:44501.
123. Greenspan P, Fowler SD. Spectrofluorometric Studies of the Lipid Probe, Nile Red. *Journal of Lipid Research* 1985;26:781-9.
124. Jee A, Park S, Kwon H, Lee M. Excited state dynamics of Nile Red in polymers. *Chemical Physics Letters* 2009;477:112-5.
125. Hermsen E, Mintenig SM, Besseling E, Koelmans AA. Quality criteria for the analysis of microplastic in biota samples: a critical review. *Environmental Science and Technology* 2018;52:10230-40.



*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di febbraio 2021*

*Stampato in proprio  
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, febbraio 2021*