



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE
Dottorato di ricerca in Scienze Veterinarie
Coordinatore: Prof.ssa Rosaria Laurà

Curriculum:
Sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare
S.S.D. Vet/04

OSSERVAZIONI ED ESPERIENZE SUL PROBLEMA DELLE MICROPLASTICHE NEI MITILI

Tesi di:

Luca NALBONE

Tutor:

Chiar.mo prof. F. GIARRATANA

ABSTRACT

During the last years, the presence of plastic waste dispersed in the environment has aroused concerns among the scientific community. Several studies have investigated its impact on marine and terrestrial ecosystems, with attention to those fragments small enough to be ingested by living organisms that can reach humans through the consumption of contaminated food, the so-called microplastics. While the effects of these particles on the environment have been studied in-depth, the data on their presence in food are not yet sufficient, the exposure levels are largely unknown and the potential effects on consumers are poorly understood. Furthermore, the lack of a standardized analytical protocol makes difficult to compare data available. More data is needed relating to microplastic distribution in food as well as the implementation of high-performance analytical protocols. In this regard, the research project was divided into two distinct trials:

- The presence of microplastics was evaluated in 150 samples (1500 specimens) of mussels belonging to the three species most marketed in Europe, considering different commercial categories of sale, fresh and processed. In addition, a preliminary risk assessment associated with the consumption of an average meal of mussels contaminated with microplastics was performed. The mussel samples were digested using a 30% Vol. hydrogen peroxide solution and separated from undigested residues by adding a supersaturated saline solution. The filtered samples were observed under a stereomicroscope and the detected items were identified through the "hot point test" and with FTIR spectroscopy. A total of 0.14 ± 0.18 items/g was calculated. The

amount of items found for *Mytilus galloprovincialis* was 0.25 ± 0.25 items/g, higher than that found for *Mytilus edulis* and *Mytilus chilensis*, of 0.10 ± 0.09 items/g and 0.08 ± 0.09 items/g, respectively. A higher quantity of particles was observed for fresh mussels (0.19 ± 0.21 particles / g) compared to precooked, shelled and frozen ones (0.09 ± 0.09 particles / g). FTIR spectroscopy confirmed the presence of particles in polyethylene, polypropylene, polyethylene terephthalate, polyvinyl chloride, and polystyrene. A quantity of 56 microplastics that can be ingested during the consumption of an average meal of mussels has been estimated, corresponding to $0.44 \mu\text{g}$ of plastic material.

- Considering the hydrophobic nature of plastic materials, several studies have tested the effectiveness of some lipophilic dyes in identifying microplastics. Their use in biota has so far been excluded given the high amount of post-digestion organic residues that would inevitably be coloured, resulting in overestimates. The limits of use of the Nile Red dye for the identification of microplastics in marine mussels (*Mytilus edulis*) intended for human consumption were evaluated. The samples were subjected to experimental contamination with low density polyethylene microplastics. The mussel samples were digested using a 10% KOH solution and subsequently filtered on cellulose polycarbonate filters. The dye is absorbed on the surface of the particles, making them fluorescent when irradiated with blue light. The fluorescence of the particles was assessed by observing magnified photographs of the samples taken

through an orange filter. The results obtained were validated by confirming the chemical composition of the particles found through analysis with FTIR spectroscopy. The lipophilic and solvatochromic nature of Nile red has allowed the identification of plastic particles only in some cases.

Riassunto

Negli ultimi anni, la presenza di rifiuti plastici dispersi nell'ambiente ha destato non poche preoccupazioni da parte della comunità scientifica. Diversi studi ne hanno indagato l'impatto sugli ecosistemi marini e terrestri, con particolare attenzione verso quei frammenti piccoli abbastanza da poter essere ingeriti dagli organismi viventi e giungere all'uomo attraverso il consumo di alimenti contaminati, le cosiddette microplastiche. Mentre gli effetti di queste particelle sull'ambiente sono stati oggetto di approfonditi studi, i dati sulla loro presenza negli alimenti non sono ancora sufficienti, i livelli di esposizione sono in gran parte sconosciuti ed i potenziali effetti sui consumatori poco compresi. Inoltre, l'assenza di un protocollo analitico standardizzato rende complicata la comparazione dei dati disponibili in letteratura. Tenendo conto delle più recenti raccomandazioni sulla richiesta di maggiori dati relativi alla presenza di microplastiche negli alimenti e l'implementazione di protocolli analitici performanti, il progetto di ricerca si è articolato in due distinte sperimentazioni:

- La presenza di microplastiche è stata valutata in 150 campioni (1500 esemplari) di cozze appartenenti alle tre specie maggiormente commercializzate in ambito comunitario considerando differenti categorie commerciali di vendita, fresche e trasformate. Inoltre, è stata eseguita una valutazione preliminare dei rischi associati al consumo di un pasto medio di cozze contaminate con microplastiche. I campioni di cozze sono stati digeriti utilizzando una soluzione di perossido d'idrogeno al 30% Vol. e le microplastiche separate dai residui non digeriti attraverso l'aggiunta di una soluzione salina satura. I campioni filtrati sono stati osservati allo

stereomicroscopio e le particelle individuate sono state identificate attraverso l'"hot point test" e con spettroscopia FTIR. È stato calcolato un totale di 0.14 ± 0.18 particelle/g. Il quantitativo di particelle riscontrato per *Mytilus galloprovincialis* era di 0.25 ± 0.25 particelle/g, più elevato rispetto a quello riscontrato per *Mytilus edulis* e *Mytilus chilensis*, di 0.10 ± 0.09 particelle/g e 0.08 ± 0.09 particelle/g, rispettivamente. Un maggior quantitativo di particelle è stato osservato per le cozze fresche (0.19 ± 0.21 particelle/g) rispetto a quelle precotte, sgusciate e surgelate (0.09 ± 0.09 particelle/g). La spettroscopia FTIR ha confermato la presenza di particelle in polietilene, polipropilene, polietilene tereftalato, polivinilcloruro e polistirene. È stato stimato un quantitativo di 56 microplastiche ingeribili durante il consumo di un pasto medio di cozze corrispondenti a $0.44 \mu\text{g}$ di materiale plastico.

- Considerata la natura idrofoba dei materiali plastici, diversi studi hanno testato l'efficacia di alcuni coloranti lipofili nell'identificazione delle microplastiche. Il loro impiego nel biota è stato finora escluso considerato l'elevato quantitativo di residui organici post-digestione che verrebbero inevitabilmente colorati determinando sovrastime. Sono stati valutati i limiti di utilizzo del colorante Rosso Nilo per l'identificazione di microplastiche in cozze marine (*Mytilus edulis*) destinate al consumo umano. I campioni sono stati sottoposti ad una contaminazione sperimentale con microplastiche in polietilene a bassa densità. I campioni di cozze sono stati digeriti con l'ausilio di una soluzione di KOH al 10% e successivamente filtrati su filtri in policarbonato di cellulosa. Il colorante viene assorbito sulla superficie

delle particelle, rendendole fluorescenti se irradiate con luce blu. La fluorescenza delle particelle è stata valutata attraverso l'osservazione di fotografie ingrandite dei campioni scattate attraverso un filtro arancione. I risultati ottenuti sono stati validati confermando la composizione chimica delle particelle riscontrate attraverso analisi con spettroscopia FTIR. La natura lipofila e solvatocromica del rosso nilo ha consentito solo in alcuni casi l'identificazione delle particelle plastiche.

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, l'impatto dei rifiuti plastici sugli ecosistemi marini e terrestri e le potenziali ripercussioni sulla salute pubblica hanno destato un interesse globale. Sebbene i benefici apportati dall'avvento della plastica e il suo impiego su scala industriale siano indiscutibili, le modalità di utilizzo e la gestione dello smaltimento ne hanno determinato un accumulo nell'ambiente (Andrady, 2011; Rillig, 2012). La sintesi dei primi polimeri plastici risale agli anni '50 e da allora il trend di produzione è stato caratterizzato da una costante crescita. Secondo quanto riportato da PlasticsEurope (2019), nell'anno 2018 sono stati prodotti circa 359 milioni di tonnellate di materiali plastici, 11 milioni di tonnellate in più rispetto all'anno 2017. L'Europa contribuisce al 17% della produzione mondiale, mentre è l'Asia il principale produttore con il 51%; il 30% del quale solo in Cina. Attualmente, in commercio sono presenti circa un centinaio di differenti polimeri plastici. Tra questi, sei costituiscono l'80% dei

prodotti in plastica, nonché la maggior parte dei rifiuti plastici dispersi nell'ambiente, ovvero: il polietilene (sia ad elevata densità, HDPE, sia a bassa densità, LDPE), il polipropilene (PP), il polivinilcloruro (PVC), il poliuretano (PUR), il polietilene tereftalato (PET) e il polistirene (PS) (Figura 1). Il packaging rappresenta il settore dominante per l'impiego di questi polimeri, seguito dal settore edilizio e da quello tessile (Figura 2).

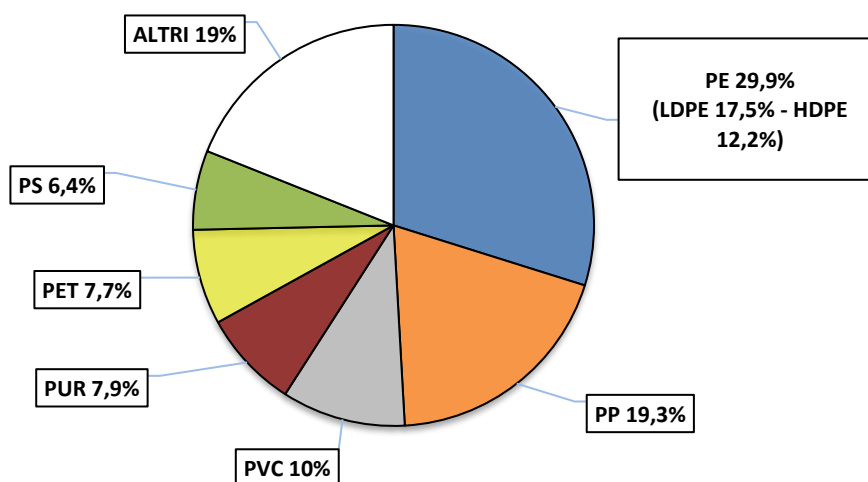


Figura 1: Distribuzione della domanda di materie plastiche per tipi di resine nel 2018 (Dati per EU28+NO/CH). PE = polietilene (HDPE = elevata densità, LDPE = bassa densità); PP = polipropilene; PVC = polivinilcloruro; PUR = poliuretano; PET = polietilene tereftalato; PS = polistirene; Altri include Teflon, Acrilonitrile-Butadiene-Stirene, Polimetilmetacrilato, Policarbonato, etc.

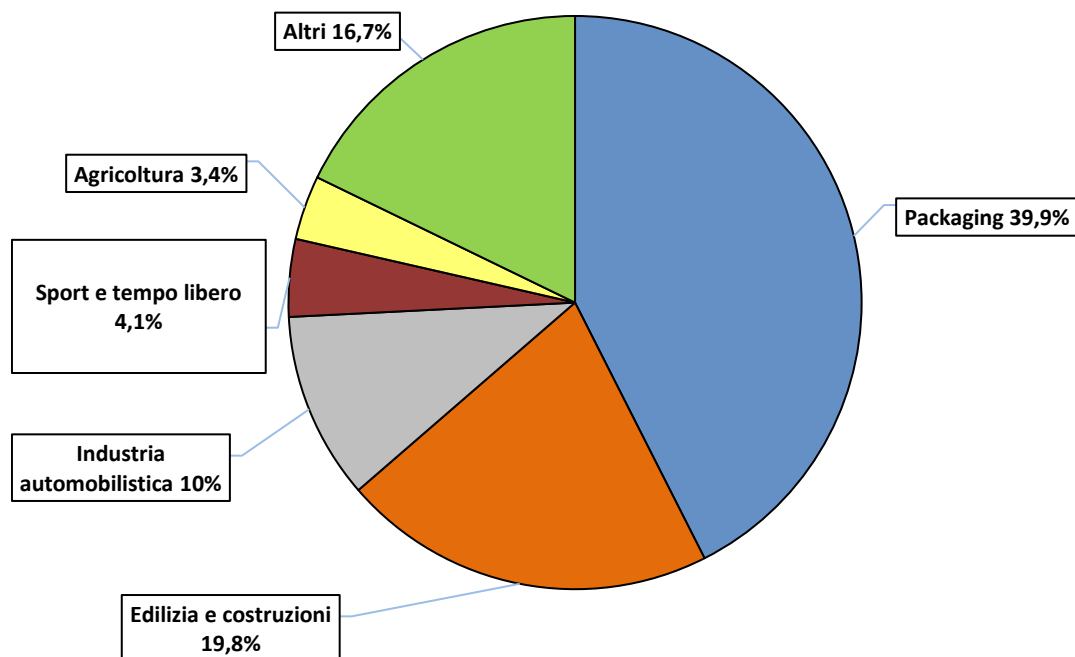


Figura 2: Domanda globale di materie plastiche per settore industriale. Altri include: elettrodomestici, meccanica, ingegneria, mobili, strumentario medico etc.

La persistenza nell'ambiente e il conseguente accumulo è dovuto alle caratteristiche fisico-chimiche di questi materiali che risultano particolarmente resistenti a quei processi che presiedono alla loro degradazione. Il risultato è un lungo periodo di decomposizione, nell'ordine di anni o centinaia d'anni, che

ne determinano un accumulo nell'ambiente inevitabilmente crescente (Andrady, 2017). La comunità scientifica si è quindi concentrata sulla determinazione delle caratteristiche del fenomeno analizzandone la diffusione, le interazioni con l'ambiente e gli effetti che ne derivano. I dati bibliografici disponibili in merito sono esponenzialmente aumentati negli ultimi dieci anni in parallelo ad un crescente impegno da parte di organizzazioni governative, intergovernative e private nella divulgazione di piani per la mitigazione della problematica (HELCOM, 2015; NOAA, 2019; OSPAR Convention, 2014; The Society of Wilderness, 2013; UNEP, 2011; UNEP & NOAA 2015). La maggior parte degli studi scientifici si sono focalizzati sulla diffusione, distribuzione e sugli effetti dei rifiuti plastici nell'ecosistema marino e più recentemente anche nell'ecosistema terrestre (Chae & An, 2018; Panebianco et al., 2019). La maggior parte delle conoscenze in materia sono infatti il risultato di un'analisi delle dinamiche di distribuzione del

cosiddetto "marine litter", termine coniato dalla comunità scientifica per indicare "qualsiasi materiale solido trasformato, scartato, smaltito o abbandonato che persiste nell'ambiente marino e costiero" (UNEP, 2018). La plastica costituisce circa l'80-85% del marine litter, comprendendo una vasta gamma di materiali di forma, dimensioni e proprietà chimiche differenti che ne condizionano la distribuzione e il destino nell'ambiente. Tra i principali argomenti di studio, l'impatto ambientale correlato alla formazione di frammenti plastici di dimensioni micro- e nanoscopiche, le cosiddette micro- e nanoplastiche, ha destato non poche preoccupazioni. Infatti, questi frammenti sono piccoli abbastanza da poter essere ingeriti dagli organismi viventi e quindi giungere all'uomo attraverso il consumo di alimenti contaminati (Efsa, 2016; Mercogliano et al., 2020). Mentre gli effetti delle microplastiche sull'ambiente sono stati oggetto di approfonditi studi, in letteratura i dati di conseguenze dirette sulla salute umana sono pressoché assenti o solo ipotizzati. La

presenza di piccole particelle plastiche nell'ambiente è nota dai primi anni '70 (Buchanan, 1971), ma solo all'inizio del 2010 la loro presenza è stata segnalata negli alimenti (Barboza et al., 2018a). Quali siano i pericoli associati al consumo di micro e nanoplastiche è tutt'ora argomento di dibattito e ulteriori approfondimenti sono ancora necessari per effettuare una corretta valutazione dei rischi (Avio et al., 2020).

1.1 Microplastiche: definizioni e formazione

Ad oggi, non esistono definizioni standardizzate per descrivere i materiali plastici dispersi nell'ambiente. Una prima classificazione prende in considerazione le dimensioni dei frammenti stessi, che possono variare da diversi metri fino a dimensioni così piccole da non essere visibili ad occhio nudo (Tabella 1) (Gesamp, 2019).

Tabella 1. Classificazione del “plastic marine litter” sulla base delle dimensioni dei frammenti: range di misura comuni e alternativi appropriati per gli studi di settore

Prefisso	Range di misura	Unità di misura	Range di misura alternativi
Mega	> 1 m	Metri	-
Macro	25 – 1000 mm	Metri Centimetri Millimetri	25 – 50 mm
Meso	5 – 25 mm	Centimetri Millimetri	< 25 mm 1 – 25 mm
Micro	< 5 mm	Millimetri Micrometri	1 – 5 mm < 1 mm > 330 µm
Nano	< 1 µm	Nanometri	< 100 nm

Negli anni, la comunità scientifica ha più volte revisionato la definizione di microplastiche sulla base delle loro dimensioni, adottando diversi range di misura per definirne i limiti (Barnes et al., 2009; Van Cauwenberghe et al., 2013; Kelly et al., 2020). “Micro” è un prefisso adottato nel Sistema Internazionale che esprime il fattore 10^{-6} , corrispondente alla millesima parte di un millimetro. Per questo motivo, diversi scienziati hanno supposto che la definizione più corretta di microplastiche dovesse comprendere frammenti di dimensioni sicuramente inferiori al millimetro: $< 1000 \mu\text{m}$ ($<1 \text{ mm}$) (Claessens et al., 2011; Van Cauwenberghe & Janssen, 2014). Tuttavia, sulla scia di quanto raccomandato da diversi piani di monitoraggio per un approccio più armonico alla problematica, i più recenti studi hanno adottato una definizione comune di microplastiche, le cui dimensioni sono comprese tra $1 \mu\text{m}$ e 5 mm (Eriksen et al., 2014; Ospar, 2017). Questo range permette di tener conto delle diverse forme di microplastiche identificate nei campioni

ambientali, includendo quei frammenti di frequente riscontro le cui dimensioni sono spesso superiori al millimetro, come ad esempio le fibre. Nel corso degli anni, l'attenzione posta sulla descrizione della forma dei frammenti ha acquisito sempre più valore, in quanto fondamentale per comprendere le loro origini e il potenziale destino (Koelmans et al., 2019). Per tanto, ai fini di un accurato e corretto monitoraggio, le analisi di routine dovrebbero prevedere la descrizione delle caratteristiche morfologiche dei frammenti plastici eventualmente riscontrati. Nel report Efsa (2016), le microplastiche vengono definite come "una miscela eterogenea di materiali di forma differente (frammenti, fibre, sferoidi, granuli, pellet, schegge o perline) le cui dimensioni sono comprese tra 0.1 – 5000 μm ". Una più recente e condivisa classificazione su base morfologica è stata proposta nel report Gesamp (2019) che suggerisce l'adozione di cinque distinte categorie (Tabella 2).

Tabella 2. Descrizione morfologica delle microplastiche secondo GESAMP (2019)

Descrizione	Caratteristiche	Abbreviazione
Frammenti	Particelle dure di forma irregolare che sembrano derivare dalla rottura un frammento più grande.	MP-fr
Granuli	Particelle quasi sferiche parzialmente elastiche che si deformano facilmente sotto pressione, a seconda dello stato di esposizione agli agenti atmosferici.	MP-gr
Film	Particella piatta e flessibile con bordi lisci o angolari.	MP-fl
Fibre	Particelle di aspetto fibroso caratterizzate da una lunghezza sostanzialmente maggiore della sua larghezza.	MP-fb
Pellet	Particella dura di forma sferica, liscia o granulata.	MP-pe

Oltre a definirne dimensioni e forma, viene sovente descritto il colore delle microplastiche, dato utile per risalire all'origine dei frammenti. Sebbene in certi studi siano stati formulati alcuni schemi di riferimenti come il "8-colour classification scheme"

proposto da Galgani et al. (2017), la determinazione del colore è spesso un parametro particolarmente soggettivo e anche in questo caso non esistono dei veri e propri parametri di riferimento. Una classificazione condivisa e ampiamente adottata distingue le microplastiche in primarie e secondarie in base alla loro origine (Gesamp, 2015):

- **Microplastiche primarie:** Sono particelle in plastica di dimensioni microscopiche progettate e impiegate a livello industriale per gli scopi più disparati. Le microplastiche primarie sono diffusamente impiegate nei prodotti della cura e l'igiene personale come i cosmetici, nei dentifrici, nei deodoranti, nelle schiume da barba, nei bagnoschiuma, nelle creme solari, nei repellenti per insetti e altre ancora si riscontrano in alcune sostanze abrasive per la pulizia delle superfici, in alcuni oli industriali, ect... (Cole et al., 2011; Alomar et al., 2016, Efsa, 2016; Deng et al., 2020). La percentuale di microplastiche primarie

nell'ambiente rappresenta di fatto la minor parte, fatta eccezione per alcuni ambienti "chiusi" come riscontrato in certi grandi laghi statunitensi per la massiccia presenza di impianti industriali nelle vicinanze (Boucher & Friot, 2017; Eriksen et al., 2013).

- **Microplastiche secondarie:** Derivano dalla frammentazione o dall'usura di prodotti in plastica di dimensioni maggiori, sia durante l'uso che nel corso della loro permanenza nell'ambiente. Alcuni esempi sono: fibre tessili, frammenti di sacchetti o bottiglie in plastica, frammenti di vernici di rivestimento delle navi, particelle derivanti dall'abrasione dei pneumatici ecc. Queste microplastiche sono il tipo più diffuso nell'ambiente marino, con una stima di 68500–275000 tonnellate/anno emesse (Efsa, 2016; IMO, 2015).

I materiali plastici dispersi nell'ambiente, sebbene siano dotati di una elevata persistenza, non sono comunque immuni al degrado (Ryan, 2015). Numerosi sono infatti gli additivi aggiunti in fase di produzione per rallentarne i ritmi di degradazione come ad esempio stabilizzanti, biocidi chimici, ritardanti, etc. (Hahladakis et al., 2018). Secondo Andrady (2011), sono quattro i meccanismi che presiedono alla degradazione della plastica dispersa nell'ambiente marino, ovvero:

1. l'effetto delle radiazioni ultraviolette (UV);
2. l'azione meccanica dell'acqua;
3. l'attività ossidativa dell'aria;
4. i processi biodegradativi esercitati da specifici microrganismi.

La formazione di microplastiche secondarie deriverebbe, infatti, da una continua esposizione di frammenti più grandi alle radiazioni UV, agli stimoli meccanici delle correnti marine e

all'attività ossidativa dell'aria, che determinano un lento processo di destabilizzazione dei forti legami chimici che costituiscono i polimeri plastici. Quest'ultimi diventano così più suscettibili alla frammentazione a seguito di stimoli meccanici, determinando un accumulo continuo nell'ambiente di particelle via via sempre più piccole (Karlsson et al., 2017). La totale decomposizione si realizza grazie all'azione di alcuni microrganismi, come batteri e funghi, attraverso particolari enzimi che agiscono sui radicali liberi formati nelle strutture polimeriche dei frammenti logorati, portando ad una loro graduale e completa degradazione (Shimao, 2001; Urbanek et al., 2018). Le radiazioni UV svolgono un ruolo principale nel processo di frammentazione della plastica e dal momento che la luce viene assorbita dall'acqua, i processi di decomposizione impiegano generalmente molto più tempo in mare che in terra. Inoltre, il tasso di degradazione è influenzato dalla temperatura, di modo che, essendo l'acqua un ottimo dissipatore di calore, i

processi di decomposizione sono notevolmente rallentati negli ecosistemi marini rispetto a quelli terrestri (Andrady, 2003). Queste considerazioni sono fondamentali se si pensa che ancora oggi, poco si sa sul destino della plastica che affonda sui fondali marini dove, al riparo dalle radiazioni UV e a basse temperature, il tasso di degradazione si abbassa drasticamente (Andrady, 2015).

1.2 Fonti principali e distribuzione nell'ambiente

Le microplastiche devono essere considerate come particelle particolarmente complesse, disperse nell'ambiente come frammenti singoli o aggregati, libere o adese alle superfici; ciascuna con specifiche caratteristiche fisico-chimiche, soggette a variazioni nel corso del tempo, che ne condizionano la distribuzione e il destino (Koelmans et al., 2019). La presenza di microplastiche è stata documentata in svariati ecosistemi sparsi in tutto il mondo: diffusamente riscontrate nei mari e negli

oceani, dalle coste alle profondità marine, nei laghi e nei fiumi, nelle spiagge, nel suolo e persino in ambienti particolarmente ostili come in prossimità dei circoli polari (Imhof et al., 2013; Andrady, 2017; Lots et al., 2017; Rillig et al., 2017; Zhang, 2017; Gesamp, 2019; Suaria et al., 2020). La loro presenza in ambienti così remoti è stata imputata al ruolo chiave svolto dalle correnti marine che veicolerebbero le microparticelle in distretti molto distanti rispetto al loro punto di rilascio (Alomar et al., 2016; Cole et al., 2011) mentre le mareggiate, le spingerebbero a depositarsi in prossimità delle coste (Lo et al., 2020). Col trascorrere del tempo, il trasporto di piccole particelle verso la riva e la loro deposizione negli ambienti bentonici sono facilitati dalla colonizzazione superficiale dei frammenti plastici da parte di microrganismi in grado di formare biofilm che ne determinano un aumento di peso favorendone la deposizione (Miao et al., 2019; Tu et al., 2020). In uno studio condotto da Cole et al. (2016), è stato dimostrato come l'incorporazione di microplastiche nelle

feci di copepodi (*Calanus helgolandicus* e *C. typicus*) alimentati con particelle in PS, contribuisce ad aumentare il peso delle particelle stesse, favorendone il deposito sui sedimenti. Proprio i fondali e i canyon sottomarini rappresenterebbero, invece, le principali sedi di accumulo a lungo termine delle microplastiche disperse nei mari (Jones, 2019). Nel tempo, le particelle possono però essere risospese per effetto delle perturbazioni marine, tempeste o correnti ascensionali e al contempo subire modifiche delle caratteristiche fisiche come dimensioni, forma e densità (Carbery et al., 2018). È noto come la densità dei materiali plastici condizioni la loro distribuzione lungo la colonna d'acqua esponendo gli organismi viventi demersali o pelagici a certe plastiche piuttosto che altre (Tabella 3).

Tabella 3: Densità dei polimeri plastici e loro applicazioni (Gesamp, 2016)

Polimeri	Impieghi comuni	Densità specifica (g/cm ³)	Comportamento
Polistirene espanso	Box termici, galleggianti, bicchieri	0,02 – 0,64	Galleggiano
Polipropilene	Corda, tappi di bottiglia, attrezzi, cinghie	0,90 – 0,92	
Polietilene	Sacchetti di plastica, contenitori alimentari	0,91 – 0,95	
Stirene butadiene	Pneumatici	0,94	
Acqua di mare		1,03	
Polistirene	Utensili, contenitori	1,04 – 1,09	Affondano
Nylon	Reti da pesca, corde	1,13 – 1,15	
Acrilico	Tessuti	1,18	
Polivinilcloruro	Film sottili, tubi di drenaggio, contenitori	1,16 – 1,30	
Poliuretano	Schiume rigide e flessibili per isolamento e arredamento	1,20	
Acetato di cellulosa	Filtro per sigarette	1,22 – 1,24	
Polietilene tereftalato	Bottiglie	1,34 – 1,39	
Rayon	Tessuti, prodotti sanitari	1,50	

I polimeri meno densi rispetto all'acqua di mare, tendono a galleggiare (es. PE, il PP e il PS espanso) e, assecondando le correnti marine, possono confluire e accumularsi in superficie, portando alla formazione di vere e proprie isole di rifiuti plastici galleggianti noti come “garbage patches” (Cole et al., 2013;

Lebreton et al., 2018). Al contrario, i materiali più densi (es. PET, PVC e Nylon) tendono a depositarsi nei sedimenti (Browne et al., 2007; Carr et al., 2016). Gli ecosistemi marini e in particolare quelli costieri sono costantemente soggetti ad una forte pressione antropica che può determinare l'immissione nell'ambiente di sostanze inquinanti e dannose sia per l'uomo che per gli ecosistemi naturali. Numerosi sono infatti gli studi che testimoniano la presenza nei mari e negli oceani di tutto il mondo di sostanze quali pesticidi, inquinanti organici persistenti, idrocarburi, metalli pesanti e, con sempre più frequente riscontro, plastica e microplastiche (Wang et al., 2016; Ren et al., 2018).

L'uso eccessivo di prodotti in plastica monouso e la scarsa standardizzazione dei processi di smaltimento sono le principali cause di formazione del "plastic marine litter" (Schnurr et al., 2018). Comprendere l'origine e le modalità di immissione dei rifiuti plastici nell'ambiente è di fondamentale importanza per la

determinazione dei percorsi più adeguati al controllo della problematica (Auta et al., 2017). Le microplastiche che giungono negli ecosistemi marini possono avere diverse origini. Tra le principali fonti di microplastiche primarie si annoverano i prodotti per la cura e l'igiene personale la cui peculiarità è quella di essere lavati via subito dopo l'utilizzo. Le microplastiche eventualmente presenti sono veicolate dagli scarichi domestici verso gli impianti di trattamento delle acque reflue per poi giungere nei fiumi e nei mari tramite effluenti o nel suolo attraverso i fanghi di depurazione (Castañeda et al., 2014; Laskar & Kumar, 2019; Edo et al., 2020). Gouin et al. (2011) hanno stimato che sono circa 263 le tonnellate di microplastiche in PE immesse ogni anno nell'ambiente associate all'utilizzo di questa tipologia di prodotti. Gli scarichi domestici sono, inoltre, un importante via attraverso cui un elevato quantitativo di fibre sintetiche può giungere nell'ambiente dopo l'utilizzo di lavatrici per il lavaggio degli indumenti in ambito domestico (Pirc et al.,

2016). Un'altra importante fonte è rappresentata sicuramente dalle attività di pesca e dalle maestranze a bordo delle navi. Le reti da pesca sono state riconosciute come una tra le principali fonti di fibre plastiche distribuite nei mari (Lee et al., 2014; Gesamp, 2019). Frammenti plastici possono giungere in mare anche durante tempeste o veicolate dal vento (Zalasiewicz et al., 2016; Murphy et al., 2016). Sebbene le fonti di immissione dirette di microplastiche nell'ambiente siano numerose, va comunque ricordato che la frammentazione di oggetti in plastica più grandi, sottoposti a stimoli fisico-chimici durante la loro permanenza in acqua, rappresenta la principale modalità di formazione delle microplastiche nell'ambiente, cosiddette secondarie (Efsa, 2016). Secondo i dati riportati in letteratura, la distribuzione delle microplastiche nell'ambiente marino è molto eterogenea e varia da un'area geografica all'altra (Tabella 4).

Tabella 4: Distribuzione delle microplastiche in ambienti marini e costieri

Area geografica	Concentrazione particelle	Riferimento
Circolo Polare Artico	0,7 particelle/m ³	La Daana et al. (2018)
Svalbard, Norvegia	0,34±0,31 particelle/m ³	Lusher et al. (2015)
Svezia	102000 particelle/m ³	Norén & Naustvoll (2010)
Arcipelago di Fonia, Mar Baltico	0,07 ± 0,02 particelle/m ³	Tamminga et al. (2018)
Plymouth, Sudovest UK	0-1,5 particelle/m ³	Maes et al. (2017)
Isole Frisone Orientale, Germania	621 particelle /10 g	Liebezeit & Dubaish (2012)
Mare giallo, Cina	545 ± 282 particelle/m ³	Zhu et al. (2018)
Estuario di Yangtze, Cina	4137,3 ± 2461,5 particelle/m ³	Zhao et al. (2014)
Baia di Tokio, Giappone	1,72x10 ⁶ particelle/km ²	Isobe et al. (2015)
Louisiana, Golfo del Messico	5,0–18,4 particelle/m ³	Di Mauro et al. (2018)
Rio de Janeiro, Brasile	1,4–21,3 particelle/m ³	Olivatto et al. (2019)
Coste sud-est del Sud Africa	204,5–1491,7 particelle/m ³	Nel & Froneman (2015)
Capo Cod, Caraibi, Oceano Atlantico	6,06 × 10 ⁻⁵ -8,32 × 10 ⁻³ particelle/m ³	Colton et al. (1974)
Nord-est dell'Oceano Atlantico	2,46 particelle/m ³	Lusher et al. (2014)
Canada, Oceano Pacifico	8–9200 particelle/m ³	Desforges et al. (2013)
Vortice subtropicale del sud Pacifico	26898 particelle/km ²	Eriksen et al. (2013b)
Mar Mediterraneo	0,90 ± 0,10 particelle/g	Alomar et al. (2016)
	1,12x10 ⁵ particelle/km ²	Schmidt et al. (2018)
	42 ± 46,7 particelle/m ³	Güven et al. (2017)
	135 particelle/m ²	Faure et al. (2015)
	0,243 particelle/m ²	Cózar et al. (2015)
	7,68 ± 2,38 particelle/m ³	van der Hal et al. (2017)

Analizzando gli studi in materia, è fondamentale tener presente che non esiste una metodica analitica standardizzata per la ricerca di microplastiche in campioni ambientali, per tanto i risultati disponibili sono di difficile comparazione (Rainieri &

Barranco, 2019). La Daana et al. (2018) hanno calcolato una concentrazione di microplastiche di 0,7 particelle m^{-3} nelle acque del bacino centrale del circolo polare artico. Isobe et al. (2015) hanno stabilito una concentrazione di microplastiche di circa 1,72 milioni di particelle per km^2 nei mari dell'Asia orientale intorno al Giappone, 10 volte maggiore rispetto alla concentrazione di particelle plastiche stimate dagli stessi autori nel Nord del Pacifico. In Sud Africa, Nel e Froneman (2015) calcolano una presenza di 204,5 – 1491,7 particelle m^{-3} lungo la colonna d'acqua. Una concentrazione compresa tra le 8 e le 9200 particelle m^{-3} è stata stimata al largo delle acque del Pacifico, aumentando fino a 27 volte in prossimità delle coste Canadesi (Desforges et al., 2013). Lusher et al. (2014) hanno rilevato, invece, una concentrazione di 2,46 particelle m^{-3} nelle acque a nord dell'Oceano Atlantico. Nelle acque del Mar Mediterraneo sono state rilevate diverse concentrazioni. Alomar et al. (2016) hanno stimato un quantitativo di $0,90 \pm 0,10$

microplastiche g^{-1} di sedimenti marini mentre Schmidt et al. (2018) hanno calcolato una concentrazione potenziale massima di 10^6 frammenti per km^2 . Lo studio delle modalità di immissione e la determinazione del grado di distribuzione ambientale delle microplastiche, sono dati utili ai fini di una corretta valutazione del rischio a cui sono esposti gli organismi che popolano gli ecosistemi marini e terrestri.

1.3 Microplastiche e alimenti

La presenza di microplastiche nell'ambiente, oltre che per il loro impatto ecologico, desta non poche preoccupazioni in materia di sicurezza alimentare. I pericoli a cui ci si espone col consumo di alimenti contaminati da microplastiche è ancora oggi argomento parecchio dibattuto e controverso con potenziali e importanti ripercussioni anche di carattere socioeconomico. Mentre gli effetti delle microplastiche sull'ambiente sono stati abbondantemente discussi, ancora pochi sono gli studi in merito

alla loro distribuzione negli alimenti destinati al consumo umano (Tabella 5).

Tabella 5: Presenza di microplastiche nei prodotti della pesca e in altri alimenti (Barboza et al., 2018a)

	Tipo di alimento	Concentrazione particelle	Campioni Testati (% positivi)	Area geografica di Pesca	Riferimento
Pesce	<i>Merluccius merluccius</i>	0,40 ± 0,89 particelle/campione	12 (29)	Oceano Atlantico, Portogallo	Neves et al. (2015)
	<i>Pagellus erythrinus</i>	0,8 ± 0,2 particelle/campione	19 (42.1)	Mar Ionio, Grecia	Digka et al. (2018)
	<i>Sardina pilchardus</i>	4,63 particelle/campione	80 (90)	Mar Adriatico, Italia	Renzi et al. (2019)
	<i>Scomber scombrus</i>	0,29–2,50 particelle/campione	19 (100)	Oceano Atlantico, Portogallo	Lopes et al. (2020)
	<i>Solea solea</i>	1,73±0,05 particelle/campione	533 (95)	Mar Adriatico, Italia	Pellini et al. (2018)
	<i>Trachurus trachurus</i>	0,07±0,25 particelle/campione	44 (7)	Oceano Atlantico, Portogallo	Neves et al. (2015)
	<i>Thunnus thynnus</i>	0,31 particelle/campione	34 (34.4)	Mar Mediterraneo,	Romeo et al. (2015)
	<i>Thunnus albacares</i>	5 particelle/campione	50 (2)	Rapa nui, Cile	Chagnon et al. (2018)
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	0,30±0,61 particelle/campione	40 (23)	Oceano Atlantico, Portogallo	Bessa et al. (2018)
	<i>Epinephelus areolatus</i>	1,8 particelle/campione	5 (20)	Mar Rosso, Arabia Saudita	Baalkhuyur et al. (2018)
	<i>Pleuronectes platessa</i>	1,46±1,02 particelle/campione	109 (49.5)	Mare Celtico	Welden et al. (2018)
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	1,25 particelle/campione	80 (90)	Mar Adriatico, Italia	Renzi et al. (2019)
	<i>Diplodus vulgaris</i>	3,14±3,25 particelle/campione	40 (73)	Estuario di Mondego, Portogallo	Bessa et al. (2018)
	<i>Mugil cephalus</i>	2,25 particelle/campione	60 (13.8)	Coste di Hong Kong	Cheung et al. (2018)
	<i>Mullus barbatus</i>	0,66 particelle/campione	207 (66)	Mar Mediterraneo	Guyen et al. (2017)

	Tipo di alimento	Concentrazione particelle	Campioni Testati (% positivi)	Area geografica di Pesca	Riferimento
Molluschi	<i>Amiantis umbonella</i>	6 particelle/campione	-	Golfo di Persia, Iran	Naji et al. (2018)
	<i>Cyclina sinensis</i>	4,82 ± 2,17 particelle/campione	-	Mercato locale, Cina	Li et al. (2015)
	<i>Meretrix lusoria</i>	9,22 particelle/campione	-	Mercato locale, Cina	Li et al. (2015)
	<i>Tapes philippinarum</i>	0,34 ± 0,31 particelle/g	-	GDO, Sud Korea	Cho et al. (2019)
	<i>Ruditapes decussatus</i>	6,78 ± 1,43 particelle/g	-	Laguna di Bizerte, Tunisia	Abidli et al. (2019)
	<i>Crassostrea gigas</i>	0,6 particelle/g	-	Mercato locale, California, USA	Rochman et al. (2015)
	<i>Patinopecten yessoensis</i>	57,17 ± 17,34 particelle/campione	-	Mercato locale, Cina	Li et al. (2015)
	<i>Mytilus edulis</i>	0,36 ± 0,07 particelle/g	-	Mar del Nord	Van Cauwenberghe and Janssen (2014)
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	6,2–7,2 particelle/g	-	Mar Adriatico, Italia	Renzi et al. (2018)
	<i>Perna perna</i>	26,7% dei campioni	-	Estuario di Santos, Brasile	Santana et al. (2016)
	<i>Nephrops norvegicus</i>	83% dei campioni	-	Clyde, UK	Murray e Cowie (2011)
	<i>Penaeus semisulcatus</i>	7,8 particelle/campione	-	Golfo di Persia	Abassi et al. (2018)
	<i>Eriocheir sinensis</i>	13% dei campioni	-	Mar Baltico	Wójcik-Fudalewska et al. (2016)
	<i>Thais mutabilis</i>	3 particelle/campione	-	Golfo di Persia, Iran	Naji et al. (2018)

	Tipo di alimento	Concentrazione particelle	Campioni Testati (% positivi)	Area geografica di Pesca	Riferimento
Altri alimenti	<i>Helix spp.</i>	0,92±1,21 particelle/campione		Sud Italia	Panebianco et al. (2019)
	Birra	16-254 particelle/campione	24 (100)	Mercato locale, Germania	Liebezeit and Liebezeit (2014)
	Zucchero	247±130 particelle/Kg	5 (100)	GDO, Germania, Francia, Italia, Spagna e Messico	Liebezeit and Liebezeit (2013)
	Miele	175±156 particelle/Kg	19 (100)		
	Sale	550–681 particelle/Kg	15 (100)	Mercato Locale, Cina	Yang et al. (2015)
	Sardine e spratti in scatola	-	20 (20)	GDO, Australia e Malesia	Karami et al. (2018)
	Acqua Minerale	2–44 particelle/L	38 (100)	Mercato Locale, Germania	Schymanski et al. (2018)
	Acqua di rubinetto	0–61 particelle/L	159 (81)	Vari paesi Europei	Kosuth et al. (2018)
	Latte	1-14 particelle/L	-	Mercato locale, Messico	Kutralam-Muniasamy et al. (2020)

La presenza di microplastiche è stata documentata oltre che in moltissimi prodotti della pesca anche in diversi alimenti di uso comune: nell'acqua di bevanda (Schymanski et al., 2018), nella birra (Liebezeit & Liebezeit, 2014), nel sale da cucina (Yang et al., 2015), nel miele e nello zucchero (Liebezeit & Liebezeit, 2013). Più recentemente sono state identificate microplastiche anche

in chioccioline terrestri edibili appartenenti alle specie *Helix aspersa*, *Helix aperta* ed *Helix pomatia* (Panebianco et al., 2019). Come detto, il maggior quantitativo di dati disponibili fa riferimento al riscontro di microplastiche in pesci e molluschi anche di notevole interesse commerciale (Mercogliano et al., 2020). Neves et al. (2015) hanno, infatti, riportato la presenza di microplastiche in 17 specie di pesci diffusamente consumati, tra cui *Merluccius merluccius*, *Pagellus acarne*, *Sardina pilchardus*, *Scomber scombrus*, *Solea solea* e *Trachurus trachurus*. Meso e microplastiche sono state riscontrate anche in specie di pesci commerciali come grandi migratori quali *Thunnus thynnus* (Romeo et al., 2015) e *Thunnus albacares* (Chagnon et al., 2018), migratori stagionali come *Dicentrarchus labrax* (Bessa et al., 2018) e pesci stanziali come *Epinephelus areolatus* (Baalkhuyur et al., 2018) e *Pleuronectes platessa* (Welden et al., 2018). La presenza di microplastiche è stata anche segnalata in specie diffuse nel Mediterraneo, talune anche di importante valore

commerciale, come *Engraulis encrasicolus* (Collard et al., 2017), *Diplodus vulgaris* (Bessa et al., 2018), *Mugil cephalus* (Cheung et al., 2018) e *Mullus barbatus* (Güven et al., 2017).

Nei lavori sopra riportati, le microplastiche sono state, per la maggior parte, estratte e identificate dal tratto digerente dei pesci ed in minor misura anche nei tessuti.

La specie, le strategie alimentari e la stagionalità sono in grado di influenzare il quantitativo e il tipo di microplastiche a cui ciascuna specie è esposta (Redondo-Hasselerharm et al., 2018).

I molluschi bivalvi come le cozze, essendo organismi filtratori, sono particolarmente esposti all'ingestione di microplastiche a bassa densità che tendono a galleggiare lungo la colonna d'acqua. Altre specie invece, demersali o bentoniche, vivendo più a stretto contatto con i fondali, sono più esposte a polimeri plastici più densi (Van Cauwenberghe et al., 2013). I frammenti plastici più piccoli potrebbero essere involontariamente ingeriti o essere scambiati per prede (Nelms et al., 2018).

Un altro aspetto fondamentale da tenere in considerazione sono le correnti marine che veicolano i frammenti plastici disperdendoli nell'ambiente. Ne consegue che la stagione di campionamento e particolari fenomeni atmosferici influenzino inevitabilmente la dispersione delle microplastiche in acqua (Stock et al., 2019).

Alcuni studi hanno dimostrato la possibilità che le microplastiche possano passare da un organismo all'altro accumulandosi a concentrazioni crescenti salendo lungo la piramide alimentare (Farrell & Nelson, 2013; Setälä et al., 2014; Mattsson et al., 2017; Nelms et al., 2018; Elizalde-Velázquez et al., 2020). Ne consegue che i processi di bioaccumulo e biomagnificazione esporrebbero gli organismi viventi all'apice della catena a quantitativi maggiori di microplastiche, come nel caso dei grandi pesci predatori e dell'uomo (Galloway et al., 2017).

Per quanto riguarda i molluschi, sebbene diversi studi si siano concentrati sulla presenza di microplastiche in organismi

campionati direttamente in natura o negli allevamenti, pochi lavori ne hanno indagato l'incidenza in campioni provenienti direttamente da mercati e supermercati (Cho et al., 2019; De Witte et al., 2014; Li et al., 2015, 2018; Rochman et al., 2015). Van Cauwenberghe e Janssen (2014) hanno rilevato la presenza di microplastiche in due importanti specie commerciali di bivalvi, *Mytilus edulis* e *Crassostrea gigas*, contenente una media di $0,36 \pm 0,07$ particelle/g e $0,47 \pm 0,16$ particelle/g, rispettivamente. Potenzialmente, questi risultati rivelano che i consumatori europei potrebbero ingerire fino a 11.000 microplastiche all'anno derivanti dal consumo di mitili contaminati. Li et al. (2015) hanno riportato la presenza di microplastiche in nove specie di bivalvi commerciali campionate in un mercato in Cina riportando una concentrazione compreso tra 2,1 e 10,5 particelle/g. Uno studio condotto su campioni di cozze appartenente alla specie *Mytilus edulis* riporta, invece, un'incidenza differente nel numero di microplastiche riscontrate in categorie commerciali di vendita

differenti, riportando valori superiori in cozze trasformate rispetto a quelle fresche (Li et al., 2018). La capacità dei molluschi bivalvi di catturare, filtrare e ingerire microplastiche disperse nell'ambiente è stata correlata a diversi fattori in relazione alle caratteristiche fisico-chimiche delle particelle, alla loro concentrazione ambientale e alle caratteristiche delle strutture anatomiche dei molluschi (Ward et al., 2019). Le microplastiche riscontrate nei molluschi bivalvi possono essere state filtrate (ingerite o in alternativa veicolate nel mantello pronte ad essere eliminate come pseudofeci) o più semplicemente rimaste adese ai tessuti (Kolandhasamy et al., 2018). Tuttavia, non è da escludere che il riscontro di microplastiche in prodotti alimentari trasformati sia da correlare ad una contaminazione in fase di lavorazione piuttosto che ad una contaminazione ambientale vera e propria. Infatti, un importante aspetto da considerare è la carenza di studi riguardanti il destino delle microplastiche durante i processi di trasformazione degli alimenti. Si consideri ad

esempio che la maggior parte delle microplastiche riscontrate nelle specie di pesci destinati al consumo umano, siano state ritrovate nel tratto digerente, quindi il processo di eviscerazione sarebbe in grado di ridurre il rischio di esposizione rispetto a quei prodotti che invece vengono consumati per intero, come i molluschi bivalvi (Efsa, 2016).

Comparando i dati ottenuti analizzando campioni di mitili "wild" prelevati direttamente in natura con quelli allevati ed eventualmente sottoposti a processi di depurazione pre-vendita, sono emersi risultati contrastanti. Alcuni studi hanno, infatti, riscontrato un maggior quantitativo di microplastiche (per lo più fibre) in cozze "wild" rispetto a campioni di cozze allevate vendute all'interno di reti in plastica presso la Grande Distribuzione Organizzata (GDO) (Li et al., 2016; Li et al., 2018; Mathalon & Hill, 2014). Questo risultato ha indotto diversi autori ad ipotizzare che i processi di depurazione pre-vendita impiegati nei mitili, possano ridurre anche i livelli di

microplastiche accumulate risultando utili per mitigare il rischio di esposizione durante il consumo (Birnstiel et al., 2019; Li et al., 2018; Mathalon & Hill, 2014). Di contro, altri studi hanno invece evidenziato una maggiore presenza di microplastiche in cozze e vongole allevate rispetto alle “wild” (Davidson & Dudas, 2016, Li et al., 2015).

Recentemente, Li et al. (2018) hanno osservato un maggior numero di microplastiche in campioni di cozze precotte, sgusciate e surgelate rispetto a campioni freschi, ipotizzando una possibile contaminazione durante le fasi della lavorazione. Microplastiche in PE e PET sono state estratte e identificate anche in campioni di sardine in scatola (Karami et al., 2018), confermando in tal modo la possibilità di contaminazione durante le fasi di produzione. La manipolazione degli alimenti, l'aggiunta di ingredienti o additivi, il rilascio di particelle dai macchinari, attrezzature e vestiario del personale sono, infatti, tutte potenziali fonti di contaminazione. Per esempio, Kedzierski

et al. (2020) hanno evidenziato la presenza di microparticelle in plastica sulla superficie di carne di pollo confezionato, della stessa struttura polimerica dei vassoi in PE estruso solitamente utilizzati nel packaging degli alimenti. Kutralam-Muniasamy et al. (2020) hanno identificato microplastiche di polisolfone (PES) in confezioni di latte. Il PES è il principale polimero utilizzato per la produzione di membrane impiegate nei processi di ultra e microfiltrazione del latte, potenziale fonte di contaminazione dei campioni analizzati. Non esistono inoltre dati significativi sull'influenza dei trattamenti termici degli alimenti e i loro effetti sulle microplastiche (Efsa, 2016). È noto che il peso molecolare del PS esposto a temperature comprese tra 200-300 °C diminuisce a seguito della rottura delle catene di carbonio che lo costituiscono portando alla formazione di diversi composti di degradazione. Più la temperatura si avvicina ai 300 °C, maggiore è il rilascio di composti volatili tossici come stirene gassoso, etilbenzene, metilbenzene, benzene, naftalene etc

(McNeill et al. 1990). Nei processi di pastorizzazione e sterilizzazione degli alimenti, le temperature si mantengono ben distanti da quelle sopra menzionate. In altri trattamenti termici invece, impiegate anche in ambito domestico, come la cottura alla griglia o al forno, si potrebbero raggiungere temperature superiori ai 200 °C. Tuttavia, il quantitativo di microplastiche riscontrate negli alimenti sembrerebbe troppo basso per poter determinare il rilascio di sostanze tossiche post-cottura in modo significativo.

Le microplastiche come contaminanti alimentari non sono attualmente regolamentati in modo specifico dalla legislazione UE. Si potrebbe fare riferimento al Reg. (CE) 178/02 per quanto riguarda la presenza di corpi estranei negli alimenti o alla Direttiva 2008/56/CE in materia di rifiuti marini. Le microplastiche però sono riconosciute a livello comunitario come indice dello stato ambientale delle acque marine e gli stati membri sono tenuti a stabilire dei valori soglia lungo la colonna d'acqua e

negli organismi marini (Commissione Europea, 2017). La tendenza internazionale è quella di regolamentare e limitare la presenza di microplastiche nell'ambiente e negli alimenti. Alcune iniziative hanno preso piede in tal senso e diversi stati hanno deciso di limitare l'uso e la distribuzione delle microplastiche primarie. Gli USA, ad esempio, hanno vietato la produzione di prodotti contenenti microplastiche a partire da Luglio 2018 vietandone completamente la vendita entro la fine del 2019 (Microbead-Free Waters Act, 2015). Ad oggi, non è ancora possibile effettuare una corretta valutazione dei rischi associati all'ingestione di microplastiche con gli alimenti. L'apporto di diversi alimenti e il contributo di ciascuno sull'esposizione totale attraverso la dieta, la magnitudine di ciascun pericolo associato alle differenti forme, dimensioni e struttura chimica di ciascuna tipo di microplastiche, la capacità e le condizioni di assorbimento e rilascio di sostanze chimiche

sono conoscenze alla base di una corretta valutazione dei rischi (SAM, 2018).

1.4 Pericoli associati alle microplastiche

I dati sulla presenza di microplastiche negli alimenti non sono ancora sufficienti, i relativi livelli di esposizione sono in gran parte sconosciuti ed i potenziali effetti sui consumatori poco compresi (Barboza et al., 2018b; EFSA, 2016). L'esposizione di organismi marini a concentrazioni note di microplastiche, ha permesso di dimostrare diversi effetti negativi, come: i) mortalità (Aljaibachi & Callaghan, 2018); ii) riduzione del tasso di ingestione di cibo a seguito dell'"effetto riempimento" per l'azione meccanica esercitata sui recettori dello stomaco e conseguente calo peso (Welden & Cowie, 2016); iii) riduzione del tasso di crescita (Farrell & Nelson, 2013); iv) ridotte performance predatorie (Charles-de-Sá et al., 2015); v) ridotta

risposta agli stimoli esterni (Barboza et al., 2018c); vi) diminuzione della fertilità e difetti anatomici nello sviluppo larvale (Martínez-Gómez et al., 2017); vii) neurotossicità (conseguente all'inibizione dell'acetilcolinesterasi) e stress ossidativo (Barboza et al., 2018b; Lei et al., 2018a); viii) lesioni al tratto gastro-enterico (Lei et al., 2018b); ix) numerosi altri effetti negativi (Foley et al., 2018).

Tutte queste evidenze indicano che in natura diverse specie di animali, compresi quelli destinati al consumo umano, possono essere influenzate negativamente dalla presenza di microplastiche soprattutto in quelle aree caratterizzate da una elevata pressione antropica. Le evidenze finora raccolte indicherebbero che gli organismi viventi alla base della piramide alimentare, potrebbero ridursi nel tempo con conseguenze negative per la salute dell'ambiente, la conservazione della biodiversità ed il mantenimento della catena alimentare (Barboza et al., 2018a).

Un altro pericolo associato al consumo di microplastiche deriverebbe dalla possibilità che esse agiscano come veicolo di sostanze chimiche, comprendendo sia quelle intenzionalmente aggiunte durante i processi di produzione sia i contaminanti presenti nell'ambiente che possono essere assorbiti durante la permanenza nell'ambiente (Barletta et al., 2019). Tra queste sostanze si annoverano lo stirene, diversi metalli, gli ftalati, bisfenolo A (BPA), i policlorobifenili (PCB) e idrocarburi policiclici aromatici (PAHs) (Beckingham & Ghosh, 2017; Brennecke et al., 2016; Cau et al., 2019; Wu et al., 2019). È noto che diversi additivi impiegati nella produzione dei materiali plastici posseggono un elevato e riconosciuto potere tossico sia per l'uomo che per gli animali con effetti cancerogeni, neuro-tossici e interferenti endocrini (Hahladakis et al., 2018). È stato osservato che le sostanze chimiche presenti nei frammenti plastici possono essere trasferite ai tessuti degli organismi viventi una volta ingerite (Hartmann et al., 2017). In concomitanza dei processi di

biomagnificazione delle microplastiche, queste sostanze potrebbero quindi accumularsi in quantitativi crescenti aumentando il rischio degli effetti tossici soprattutto per gli animali all'apice della piramide alimentare (Browne et al., 2013; Koelmans et al., 2016). Alcuni autori hanno anche dimostrato la capacità delle microplastiche di assorbire metalli pesanti, compresi il mercurio, cadmio e piombo (Eagles-Smith et al., 2018), ma anche alluminio, cromo, manganese, ferro, cobalto, nickel e zinco (Rochman et al., 2014). Le microplastiche inoltre agirebbero come nuovo e importante veicolo per la diffusione di microrganismi esotici o patogeni in grado di formare biofilm sulla superficie dei frammenti, alterando gli equilibri naturali di ecosistemi anche molto distanti tra loro (McCormick et al., 2014; Zettler et al., 2013). Alcuni studi hanno, infatti, riscontrato la presenza di batteri la cui patogenicità è già nota, come *Vibrio* spp. (Kirstein et al., 2016), *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* (Van der Meulen et al., 2014) ed *Aeromonas salmonicida* (Virsek et al.,

2017). Tuttavia, sono ancora insufficienti i dati disponibili sui possibili pericoli chimici e microbiologici e sulle ripercussioni sulla salute pubblica derivanti dal consumo di microplastiche con gli alimenti. Sebbene alcune sperimentazioni condotte in laboratorio abbiano dimostrato come le microplastiche possano aumentare gli effetti dei contaminanti chimici ambientali in talune specie di pesci (Raineri et al., 2018), sono ancora troppo pochi gli studi su campo che evidenzino delle influenze significative sul bioaccumulo e sulla biomagnificazione di queste sostanze (Lohmann, 2017). Infatti, secondo altri autori, l'esposizione a tali composti tossici relativi all'ingestione di alimenti contaminati da microplastiche, sarebbe limitata se comparate con altre più importanti fonti come l'acqua, i sedimenti o la catena trofica (Koelmans et al., 2013; Koelmans et al., 2016; Gesamp, 2016). Secondo quanto stimato dall'EFSA (2016), l'apporto medio annuo di PCBs e PAHs ottenuto calcolando il quantitativo di plastica ingerito annualmente

attraverso il consumo di cozze contaminate, sarebbe irrisorio, contribuendo ad un aumento di esposizione a tali sostanze tossiche in una percentuale molto bassa: < 0.006% per i PCBs e < 0.004% per i PAHs. Stessa considerazione vale per l'apporto di bisfenolo A, noto additivo impiegato per la produzione di materiali plastici, con un apporto massimo stimato del 2% dell'esposizione totale attraverso il consumo di alimenti contaminati con microplastiche. Inoltre, questi risultati sono stati ottenuti considerando un "ambiente chiuso" in cui le sostanze tossiche vengono completamente assorbite e rilasciate dalle microplastiche. Tuttavia, considerati i pochi studi a riguardo, l'incertezza e la difficoltà di comparazione dei risultati derivante dall'assenza di protocolli analitici standardizzati, la comunità scientifica presta comunque parecchia attenzione ai pericoli chimici associati al consumo di alimenti contaminati con microplastiche (Rainieri & Barranco, 2019). Nonostante la presenza di microplastiche sia stata documentata in diversi

alimenti, non ci sono ad oggi informazioni certe circa il loro destino una volta ingerite. Si presume che l'uomo possa esporsi alle microplastiche tramite tre vie principali: ingerendo alimenti contaminati, inalando le particelle plastiche fluttuanti nell'aria e per contatto attraverso l'epidermide (Prata et al., 2020).

È stato stimato che il quantitativo di microplastiche pro capite ingerite è di 39.000–52.000 particelle/anno (Cox et al., 2019), di queste 11.000 particelle/anno deriverebbe dal consumo di bivalvi e circa 37-100 particelle/anno dal sale da cucina (Efsa, 2016).

Oltre all'apporto derivante dagli alimenti, va comunque sottolineato l'apporto secondario da contaminazioni derivanti dall'aria. Secondo Catarino et al. (2018), infatti, la sedimentazione di polveri sui piatti durante il pasto potrebbe addirittura contribuire maggiormente all'apporto di microplastiche rispetto a quelle già presenti nell'alimento.

Ulteriori fonti di contaminazioni di microplastiche negli alimenti sono rappresentati dagli imballaggi plastici primari e secondari degli alimenti (Rist et al., 2018).

Le microplastiche una volta ingerite, potrebbero comportarsi come dei veri e propri corpi estranei provocando dei fenomeni infiammatori localizzati i cui effetti a lungo termini e il loro coinvolgimento nello sviluppo di patologie croniche, come neoplasie, è ancora controverso e ignoto. A livello del tratto gastrico, a seguito dell'aumento della permeabilità di membrana per flogosi localizzate, il risultato potrebbe essere quello di provocare delle dismicrobie con conseguente alterazione dell'attività digestiva (Salim et al., 2013). Nell'intestino, le microplastiche potrebbero essere captate e sequestrate dai macrofagi intestinali e trasportate a livello delle placche del Peyer.

In vitro è stato osservato che le microplastiche interagendo con il sistema immunitario possono avere effetti immunotossici

determinando immunosoppressione o risposte infiammatorie esagerate (Lusher et al., 2017a; Wright & Kelly, 2017). Alcuni scienziati hanno supposto che particelle plastiche di dimensioni < 150µm, siano in grado di passare tra le giunzioni cellulari della parete gastrica e intestinale e giungere al sistema linfatico e circolatorio ed essere quindi veicolate in altri distretti. Tuttavia, soltanto una percentuale molto bassa ($\leq 0.3\%$) potrebbe essere assorbita, in quanto la maggior parte viene eliminata con le feci, mentre soltanto le particelle di < 20µm sarebbero in grado di penetrare in profondità nello stomaco e nell'intestino e soltanto quelle di dimensioni < 10µm sarebbero in grado di penetrare in altri organi, come fegato e muscoli e di superare la barriera emato-encefalica e placentare (Browne et al., 2008; Efsa, 2016; Galloway, 2015; Prata et al., 2020). Schirinzi et al. (2017) in uno studio *in vitro* hanno evidenziato potenziali effetti citotossici di microplastiche (10µm) e nanoplastiche (40–25 nm) attraverso stress ossidativi su cellule umane nervose ed epiteliali.

1.5 Tecniche analitiche

Negli anni, sono state proposte diverse metodiche di estrazione e di identificazione delle microplastiche da campioni biologici. Tuttavia, ancora oggi non esistono delle tecniche analitiche standardizzate, rendendo complicata l'interpretazione e la comparazione dei risultati disponibili in letteratura (Hanvey et al., 2017).

Recentemente Hermsen et al. (2018) hanno proposto una procedura per la ricerca di microplastiche negli organismi viventi per un corretto e condiviso approccio metodologico. Sebbene la procedura sia stata elaborata sul biota marino, può essere estesa anche ad altri tipi di matrici come acqua e sedimenti, con gli opportuni accorgimenti. Di seguito vengono elencate e discusse le varie fasi.

1.5.1 Il campionamento

Le tecniche di campionamento variano a seconda del tipo di organismo da esaminare. Per il campionamento di pesci direttamente in mare, vengono sovente utilizzate delle reti, la grandezza delle maglie e la profondità di cattura influenzano le specie e l'età dei soggetti esaminati. Il campionamento dei molluschi bivalvi in natura, come cozze e vongole, è solitamente manuale con l'ausilio di scalpelli o rastrelli. L'acquisto dei campioni presso supermercati è consigliabile solo per studi finalizzati all'esposizione dell'uomo derivante dall'ingestione di alimenti contaminati, perdono invece significato per eventuali considerazioni sull'impatto ambientale (Hermsen et al. 2018). Le microplastiche trovate in questi campioni potrebbero infatti derivare da contaminazioni dovute alla manipolazione prima della vendita piuttosto che dall'ingestione da parte degli organismi stessi. Analizzando gli articoli scientifici disponibili in letteratura, è emerso che l'influenza delle modalità di

campionamento sono spesso sottovalutate e pochi sono i dettagli sovente riportati a riguardo a fronte di approfondite analisi delle fasi successive (Hermsen et al. 2018). Le tecniche di campionamento possono influenzare notevolmente il risultato di uno studio; pertanto, è importante che ne vengano registrate e riportate le caratteristiche per una sua riproducibilità. Inoltre, riportando tali dettagli, potrebbe essere più semplice l'interpretazione dei risultati e/o risalire ad eventuali fonti di contaminazione dei campioni (Ospar, 2015). Una volta campionati, gli esemplari devono essere stoccati in modo idoneo, al fine di evitare contaminazioni esogene, fino al momento della loro analisi in laboratorio. Ospar (2015) consiglia di congelare a -20 °C gli organismi viventi avvolgendoli in fogli d'alluminio, essicarli o includerli in alcuni fissativi come la formalina, l'etanolo o la formaldeide. Fondamentale che questa fase venga eseguita il più rapidamente possibile dopo la cattura, per evitare che stress o processi fisiologici (come rigurgiti

o defecazione) determinino potenzialmente l'allontanamento di talune particelle (Lusher et al., 2017b).

1.5.2 Rappresentatività dei campioni

La comunità scientifica si è allungo interrogata sulla rappresentatività di taluni studi che, sebbene fornissero dei dati di indubbio interesse scientifico, erano stati eseguiti analizzando un numero esiguo di campioni. Secondo quanto proposto prima nel MSFD-TSML (2013) e confermato poi da Ospar (2015), gli studi dovrebbero comprendere un minimo di 50 esemplari per ogni tipologia di campione. Non sono stati ufficialmente riconosciuti degli organismi target per lo studio della distribuzione di microplastiche nell'ambiente. La scelta del valore è puramente arbitraria e si è basata sui dati disponibili in letteratura. Viene inoltre consigliato di settare il numero di campioni presi in esame sulla base dell'incidenza di microplastiche riscontrate in corso di analisi così che, qualora l'incidenza fosse relativamente bassa,

si renderà necessario aumentare il numero di campioni per una maggiore rappresentatività dei dati ottenuti. Viceversa, qualora si riscontrasse un elevato quantitativo di microplastiche nei campioni analizzati, sarà possibile processare un minor numero di esemplari. Allo stato attuale, non disponendo di dati certi e comparabili sulla distribuzione e frequenza di microplastiche negli organismi viventi, viene comunque consigliato di analizzare quanto più campioni possibili. Per ciascun soggetto, inoltre, dovrebbero essere sempre forniti quanti più dati possibili come la specie, il sesso, la lunghezza totale, l'età, fase della maturità sessuale, il peso totale e il peso del tratto digerente (Ospar, 2015).

1.5.3 Preparazione degli ambienti di lavoro

La contaminazione da microplastiche esogene durante l'analisi dei campioni in laboratorio è una eventualità frequente ed ampiamente documentata (Torre et al., 2016). La principale

fonte di contaminazione è rappresentata da fibre plastiche presenti nell'aria (Davison & Asch, 2011). Pertanto, insieme a tecniche di lavorazione meticolose, devono essere necessariamente adottate misure preventive riguardanti i locali e le attrezzature. Sarà necessario assicurarsi che tutti i materiali, preferibilmente mai in plastica, che entrano a contatto con i campioni, a partire dalla fase di campionamento, devono essere quanto più possibile microplastics-free. A tal proposito è consigliato sciacquare il più accuratamente possibile, prima dell'analisi e sotto cappa, le superfici di lavorazione e tutta l'attrezzatura di laboratorio con acqua ultra-pura precedentemente filtrata. Al termine delle analisi è consigliato lavare accuratamente tutti gli utensili utilizzati e disporli in armadietti appositi chiusi con fogli di alluminio (Foekema et al., 2013). Si dovrebbe disporre di un laboratorio apposito per la ricerca di microplastiche in campioni ambientali in cui ridurre al minimo i rischi di contaminazione e valutare la qualità dell'aria

periodicamente (in termini di fibre plastiche) con l'ausilio di piastre a caduta. L'impiego di cappe a flusso laminare è sconsigliato, in quanto il flusso d'aria proveniente dall'esterno potrebbe convogliare particelle contaminanti sui campioni. Da preferire l'impiego di cappe aspiranti che spingono l'aria dall'interno della cappa verso l'esterno diminuendo il rischio di contaminazione (Wesch et al., 2017). Un'importante fonte di fibre plastiche è rappresentata dai vestiti degli operatori, pertanto è suggerito di indossare vestiti al 100% in fibra naturale, come il cotone, per mitigare il rischio associato (Vandermeersch et al., 2015). Aldilà della pulizia di superfici e attrezzi di lavoro, anche i campioni devono essere correttamente preparati. Infatti, la superficie esterna di taluni organismi, come ad esempio il guscio dei mitili bivalvi, deve essere accuratamente sciacquato e ispezionato per verificare possibili contaminazioni, controllando la superficie al microscopio qualora lo si ritenesse necessario (Desforges et al., 2015).

1.5.4 Controlli negativi e positivi

Durante l'analisi dei campioni, la probabilità di contaminazione da microplastiche ambientali è elevata. Pertanto, è necessario associare a meticolose tecniche di lavorazione e ad una accurata pulizia dei locali, dei controlli negativi che permettano di interpretare eventuali contaminazioni scongiurando sovrastime. Questi controlli possono essere effettuati processando dei campioni rappresentativi di tessuto degli organismi viventi in questione (solitamente tre repliche) che siano sicuramente privi di microplastiche processandoli in parallelo ai campioni oggetto di ricerca. Considerate le difficoltà nel reperire campioni microplastics-free, si potrebbe eseguire l'intera procedura analitica su dei filtri puliti e al contempo disporre altri in prossimità dei campioni durante tutte le fasi di lavorazione. Al termine dell'analisi verranno osservati i filtri controllo al microscopio annotando l'eventuale presenza di potenziali particelle plastiche da comparare con quelle

eventualmente individuate nei campioni osservati (Rummel et al., 2016; Hermsen et al., 2017). Inoltre, è fondamentale valutare il tasso di recupero del metodo utilizzato processando dei campioni contaminati con un numero noto di particelle plastiche (controlli positivi). Conoscendo le dimensioni di quest'ultime, sarà anche possibile stabilire le dimensioni minime che consentono la corretta individuazione e identificazione delle particelle con la tecnica analitica impiegata (Davidson & Dudas, 2016; Hermsen et al., 2017).

1.5.5 Estrazione delle microplastiche mediante digestione dei campioni

Per estrarre le microplastiche da campioni biologici è di fondamentale importanza sottoporli ad un processo di digestione al fine di dissolvere il materiale organico presente. Questa fase è ovviamente cruciale e indispensabile per processare gli organismi viventi. Negli anni sono state proposte diverse sostanze e modalità d'utilizzo cercando il miglior

compromesso tra costi, efficacia di digestione ed effetti degradativi sui diversi polimeri plastici (Tabella 6). Sono quattro le tecniche maggiormente utilizzate e vengono classificate in base al tipo di sostanze chimiche impiegate:

- **Digestione acida:** L'acido cloridrico (HCl) e l'acido nitrico (HNO₃) sono stati entrambi impiegati per la digestione del materiale organico (Cole et al., 2014; Panebianco et al., 2019). L'HNO₃ ha mostrato un'efficacia maggiore in termini di digestione del campione se comparato al HCl, all'H₂O₂ e al NaOH. Tuttavia, alcuni studi ne hanno evidenziato importanti effetti degradativi delle microplastiche in PS e PE, ampiamente diffuse nell'ambiente, oltre ad aver notato che le particelle plastiche tenderebbero a fondersi tra loro e a colorarsi di giallo (Claessens et al., 2013; Avio et al., 2015). Se comparato con altre sostanze, l'utilizzo dell'HCl invece non è più raccomandato per gli effetti

degradanti nei confronti di polimeri comuni come PET e PVC (Karami et al., 2017).

- **Digestione alcalina:** Sono state impiegate alcune basi come l'idrossido di sodio (NaOH) e l'idrossido di potassio (KOH) per la digestione del materiale organico. Una soluzione di 10 M di NaOH è stata utilizzata con una percentuale di digestione prossima al 90% (Cole et al., 2014). All'aumentare della temperatura di trattamento e della concentrazione della soluzione, l'efficacia aumentava. Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato che è in grado di degradare il PC, i materiali in acetato di cellulosa, il PET e il PVC (Hurley et al., 2018). Ottimi risultati sono stati invece ottenuti dall'impiego di KOH, che permette una degradazione ottimale con nessun effetto degradativo sui polimeri plastici più diffusi in natura ad un costo contenuto (Foekema et al., 2013).

- **Digestione ossidativa:** Il perossido di idrogeno (H_2O_2) è un efficiente agente ossidante per la degradazione della materia organica (Mathalon & Hill, 2014). La maggior parte degli studi hanno utilizzato una concentrazione del 30% per ottenere una discreta efficacia di digestione e minimi effetti sui più importanti polimeri plastici. Tuttavia, l' H_2O_2 tende a scolorare i frammenti plastici e determina spesso una reazione schiumogena con la maggior parte dei substrati organici con cui è stata utilizzata provocando la perdita di un certo quantitativo di campione. Inoltre, sebbene il rapporto costi/beneficio sia favorevole, se comparato con altre sostanze, difficilmente può essere impiegata per analisi di routine a causa dei lunghi tempi di lavorazione (Claessens et al., 2013).
- **Digestione enzimatica:** Alcuni autori hanno dimostrato l'efficacia di alcuni enzimi, come la tripsina e la proteina chinasi-K nella digestione della materia organica negli

studi per la ricerca di microplastiche in campioni biologici (Cole et al., 2014; Courtene-Jones et al., 2017). Gli enzimi, diversamente dai composti chimici, non hanno alcun effetto nei confronti dei polimeri plastici, inoltre, il loro utilizzo è molto meno pericoloso. Tuttavia, i test eseguiti sono stati effettuati su bassi quantitativi di campione considerato l'elevato costo di queste sostanze. Inoltre, il loro utilizzo richiede diversi accorgimenti in termini di temperatura e pH a cui gli enzimi riescono ad espletare la loro massima funzione, che non sempre è ottimale variando molto da una matrice organica all'altra (Stock et al., 2019). A tal proposito, Karlsson et al. (2017) ne hanno proposto l'utilizzo in combine con un successivo trattamento con H₂O₂. Sebbene la metodica sia particolarmente efficace, i costi eccessivi e le accortezze nell'utilizzo non lo rendono utile per analisi di routine.

Tabella 6: Sostanze utilizzate per la digestione del materiale organico (Prata et al., 2019a)

Tipo di digestione	Trattamento	Digestione dei Polimeri	Digestione materia organica	Riferimenti
Acida	HNO ₃ (35%)	Fusione di PET e HDPE Degradazione PA	~100%	Catarino et al. (2017)
	HNO ₃ (65%)	Degradazione PA, PS, PE Nylon, Colorazione gialla delle particelle	-	Dehaut et al. (2016)
	HNO ₃ (65%)+HClO ₄ (68%) (4:1)	Degradazione PA, Colorazione gialla delle particelle	-	Vandermeersch et al. (2015)
	HCl (5-37%),	Modificazione PET e PVC	>95%	Karami et al. (2017)
Alcalina	NaOH (10M)	Degradazione CA, PE, PVC e PL	~90%	Cole et al., 2014
	K ₂ S ₂ O ₈ (0.27 M) e NaOH	Degradazione CA	-	Dehaut et al. (2016)
	KOH (10%)	No	~100%	
Ossidativa	H ₂ O ₂ (30%)	-	Formazione di schiuma	Erni-Cassola et al. (2017)
	H ₂ O ₂ (35%)	Degradazione PVC e PA e variazioni di colore	Formazione di schiuma	Karami et al. (2017)
Enzimatica	Protein kinase-K (500 mg/mL)	Strato di calcio	-	Karlsson et al. (2017)
	Tripsina	No	88%	Courtene-Jones et al. (2017)
	Collagenasi	No	76%	
	Papaina	No	72%	
	Pepsina (0.5%)+HCL (0.063)	No	-	Dehaut et al. (2016)

Dehaut et al. (2016) hanno testato sei differenti tipi di sostanze (acide, alcaline, ad attività ossidante ed enzimatica) precedentemente impiegate da altri autori comparandone

l'efficacia di digestione su comuni matrici organiche (come muscolatura dei pesci e mitili) e gli effetti nei confronti dei più diffusi polimeri plastici. Una rivisitazione del protocollo di Foekema et al., (2013) è risultato il più performante. La metodica originale prevedeva l'impiego di una soluzione al 10% di KOH in cui incubare i campioni biologici a temperatura ambiente per tre settimane. Aumentando la temperatura di incubazione a 60 °C, era stato possibile ridurre i tempi di incubazione a 24 h pur mantenendo inalterata la capacità digestiva, con minime ripercussioni sulla struttura dei frammenti plastici testati. Infatti, è possibile che temperature elevate di trattamento determinino una deformazione delle microplastiche favorendone una fusione tra di loro. Ad oggi, l'utilizzo di una digestione alcalina che preveda l'impiego del KOH è il miglior compromesso in termini di costi/beneficio per la digestione del materiale organico in campioni ambientali processati per la ricerca di microplastiche.

1.5.6 Separazione per densità

L'utilizzo di soluzioni ad elevate concentrazioni saline, sature o soprasature, addizionate ai campioni biologici post digestione, sono state frequentemente utilizzate per separare le microplastiche dai sedimenti o da altri componenti organici o inorganici che non sono stati degradati durante la fase di digestione (Tabella 7) (Rocha-Santos & Duarte, 2015). Sono state utilizzate diverse sostanze come il cloruro di sodio (NaCl), ioduro di sodio (NaI) e il cloruro di zinco ($ZnCl_2$). A causa della bassa densità della maggior parte dei più comuni polimeri plastici dispersi nell'ambiente ($0,8-1,4 \text{ g/cm}^3$), nei campioni addizionati con soluzioni saline, le microplastiche tenderanno a galleggiare in superficie, facilitando la successiva fase di filtrazione in cui verrà processato esclusivamente il surnatante (Hidalgo-Ruz et al., 2012).

Tabella 7: Soluzioni saline utilizzate nella separazione per densità

Trattamento	Sensibilità delle microplastiche	Bibliografia
NaCl (1,202 g cm ⁻³)	Densità microplastiche < acqua di mare	Prata et al., 2019a
NaI (1,8 g cm ⁻³)	Densità microplastiche > acqua di mare	
ZnCl ₂ (1,5-1,7cm ⁻³)		
Tungstato di sodio (1,4 cm ⁻³)		

1.5.7 Filtrazione, cernita e identificazione delle microplastiche

Una volta digeriti, i campioni vengono solitamente filtrati. Questa fase di filtrazione, nei campioni d'acqua e di sedimenti, può precedere la fase di digestione, tramite l'ausilio di maglie, solitamente in acciaio, di diverse misure che permettono una prima cernita dei campioni, separandone i frammenti sulla base delle loro dimensioni (Prata et al., 2019a). Per quanto riguarda gli organismi viventi, in cui la digestione dei campioni è indispensabile per le successive fasi di lavorazione, vengono impiegati dei filtri. I materiali che li compongono sono di vario genere e tipo, ma la caratteristica fondamentale è il diametro

dei pori. Essi indicano il limite di grandezza sotto il quale eventuali particelle non verrebbero trattenute andando quindi perse. I pori dovrebbero consentire una filtrazione dei campioni rapida evitando che un gran numero di residui rimangano sulla superficie ostacolando le successive fasi di individuazione delle particelle. Dall'altro, tanto più piccolo è il diametro tanto maggiore sarà la possibilità di trattenere un numero elevato di particelle, evitando una sottostima delle microplastiche eventualmente presenti. A questo punto, si procede individuando e identificando le particelle plastiche eventualmente presenti tra tutti i frammenti e residui rimasti sulla superficie dei filtri (Tabella 8). Una prima fase prevede un'attenta osservazione dei filtri attraverso uno stereo-microscopio (Mathalon & Hill, 2014; Bellas et al., 2016; Devriese et al., 2015). Questo approccio non consente di identificare con certezza la natura plastica dei frammenti, ma permette una prima selezione delle potenziali microplastiche. In uno studio eseguito su

campioni di sedimenti marini, l'utilizzo della spettroscopia per l'identificazione della composizione chimica di particelle preselezionate attraverso un esame visivo, ha rivelato che soltanto l'1,4% era effettivamente costituito da materiale plastico e che le fibre di lunghezza $> 500 \mu\text{m}$ erano per la maggior parte di natura organica (Löder et al., 2015). La qualità dell'esame visivo è influenzata dall'esperienza dell'osservatore, dalle dimensioni e dal tipo di frammenti e dall'ingrandimento del microscopio (Wesch et al., 2016). Ne consegue che l'incertezza che ne deriva aumenta al diminuire delle dimensioni delle particelle. Infatti, alcuni studi hanno proposto l'impiego della microscopia elettronica a scansione, che permette di osservare le particelle ad elevati ingrandimenti ad alta risoluzione, anche quelle più piccole, consentendone una ispezione minuziosa. Tuttavia, questa tecnica difficilmente può essere impiegata per analisi di routine considerate le difficoltà nella preparazione laboriosa dei campioni (Fries et al., 2013). Una delle prime

metodiche impiegate per l'identificazione delle microplastiche è il cosiddetto "hot-point test". La tecnica prevede l'impiego di un ago riscaldato con cui toccare le particelle che, se in plastica, verranno marcate da un segno nero appiccicoso, mentre le fibre iniziano ad arricciarsi (OSPAR, 2015). Questa tecnica però dovrebbe essere considerata solo come una agevolazione all'ispezione visiva in quanto parecchio soggettiva, poco utile per i polimeri termoresistenti e per le particelle molto piccole e non consente l'identificazione dei differenti polimeri plastici. Ad oggi, le principali tecniche impiegate per l'identificazione della composizione chimica delle microplastiche sono le tecniche di spettroscopia (Murphy et al., 2017; K ppler et al., 2016) e le analisi di degradazione termica (Fischer & Scholz-Böttcher, 2017). Le tecniche di spettroscopia prevedono l'utilizzo della spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) e la spettroscopia di scattering Raman, mentre l'analisi di degradazione termica consiste nella

pirolisi accoppiata con gas cromatografia e spettrometria di massa (Pir-GC-MS). La spettroscopia FTIR e la Raman, colpendo la particella con un fascio di onde elettromagnetiche di varia lunghezza, consentono di ottenere uno spettro di ciascuna particella analizzata che viene confrontato con una serie di spettri di riferimento specifici di certi materiali plastici, permettendone quindi una corretta e attendibile identificazione. Inoltre, queste tecniche non distruttive consentono di calcolare anche le dimensioni delle particelle analizzate. Tuttavia, entrambe le tecniche sono limitate dalla necessità di analizzare un frammento alla volta (isolandolo per quanto possibile da eventuali residui circostanti) e dalla grandezza dei frammenti stessi (per particelle <10-20 μm l'identificazione non risulta attendibile). La Pir-GC-MS consente, invece, di analizzare particelle non isolate, aggregate tra loro o insieme a residui organici. Questa tecnica, quindi, non ha dei limiti in termini di grandezza minima delle particelle ma non

consente di calcolarne le dimensioni; non permette di quantificare le microplastiche presenti ma di quantificare solo la massa totale (Hermsen et al., 2018). Se da un lato quindi la Pir-GC-MS potrebbe non essere soddisfacente per gli studi riguardanti l'impatto ecologico, dall'altro potrebbe risultare utile per le analisi in ambito di sicurezza alimentare per calcolare i livelli di esposizione derivante dall'ingestione di alimenti contaminati da microplastiche. Una considerazione importante riguarda il numero di particelle da sottoporre a questo tipo di identificazione. Infatti, i tempi di analisi, qualora il quantitativo di particelle da analizzare siano considerevoli, sono piuttosto lunghi. D'altro canto, l'analisi di pochi campioni potrebbe non essere rappresentativa. Hermsen et al. (2018) consigliano di analizzare il 50% delle particelle pre-selezionate dall'esame visivo qualora queste siano >100, mentre di analizzarle tutte se <100.

Tabella 8: Tecniche di identificazione delle microplastiche

Metodiche	Criteri di riconoscimento delle particelle	Criticità	Bibliografia
Identificazione visiva + "Hot point test"	Forma e colore + segno appiccicoso sulla superficie	Utile per una prima selezione delle particelle. Tecnica distruttiva. Non consente una identificazione del tipo di polimeri.	Crawford & Quinn, 2017
Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)	Comparazione dello spettro ad infrarosso ottenuto con spettri di materiali noti	Elevata attendibilità. Tecnica non distruttiva. Può identificare Mp > 10e20 µm.	Shim & Hong, 2018
Spettroscopia di scattering Raman	Comparazione dello spettro ottenuto con spettri specifici di materiali chimici noti	Elevata attendibilità. Tecnica non distruttiva. Lo spettro dei polimeri è suscettibile ai possibili additivi e residui biologici nelle microplastiche	Araujo et al., 2018
Microscopia elettronica a scansione (SEM)	Ispezione visiva	L'elevata risoluzione permette di individuare microplastiche molto piccole e le impurità superficiali. Tuttavia preparazione campione laboriosa	Crawford & Quinn, 2017
Pirolisi accoppiata con gas cromatografia e spettrometria di massa (Pir-GC-MS)	Analisi dei prodotti di degradazione post trattamento termico	Elevata attendibilità. Non indicato per microplastiche < 100 µm.	Fries et al., 2016

Un'alternativa ai metodi appena descritti, è rappresentato dall'impiego di coloranti lipofili per marcare le microplastiche. Le tecniche di colorazione sono state studiate e proposte come metodi d'identificazione alternativi o complementari per

un'analisi più rapida, più economica e di routine delle microplastiche in campioni biologici (GESAMP, 2019). Il “Rosso Nilo” è un colorante lipofilo che sfrutta la proprietà idrofobe della plastica che, una volta colorate, emettono fluorescenza se colpite con determinate lunghezze d'onda (Cole, 2016; Stanton et al., 2019; Klein & Fischer; 2019). La fluorescenza delle microplastiche faciliterebbe l'operatore nella loro enumerazione, riducendo il rischio di sottostima, aiutando nella selezione dei frammenti da sottoporre alle successive fasi di identificazione chimica (GESAMP, 2019). Un problema riconosciuto nell'utilizzo di questo colorante è la presenza nei campioni ambientali di materia organica residua che sarebbe anch'essa colorata divenendo fluorescente, determinando possibili sovrastime (Shim et al., 2016). Pertanto, il colorante Rosso Nilo è stato utilizzato finora solo in campioni di sedimenti e d'acqua per i quali le fasi di digestione e di separazione per densità, limitano la co-colorazione dei residui organici (Shim et

al., 2016; Maes et al., 2017; Lv et al. al., 2019). Tuttavia, più recentemente, alcuni studi ne hanno valutato il possibile utilizzo in campioni di biota ottenendo risultati interessanti (Dowarah et al., 2020; Maxwell et al., 2020).

2. Scopo del lavoro

La quantità e la caratterizzazione delle potenziali microplastiche presenti negli alimenti è la base di partenza per effettuare una corretta valutazione dei rischi correlati all'ingestione degli alimenti. Il presente studio ha tenuto conto delle più recenti raccomandazioni in materia, concentrandosi sulla richiesta di maggiori dati relativi alla presenza e alla distribuzione delle microplastiche negli alimenti e lo sviluppo e la validazione di metodiche analitiche accurate, economiche e quanto più rapide e semplici. Pertanto, il progetto di ricerca si è articolato in due distinte sperimentazioni, ovvero:

1. *Quantificazione e caratterizzazione delle microplastiche presenti nelle tre specie di cozze più comunemente commercializzate nell'Unione Europea.* Tale valutazione mira ad aumentare il numero di dati riguardanti la presenza e la distribuzione di microplastiche nelle tre specie di cozze più importanti e regolarmente

commercializzate nel territorio europeo in differenti condizioni di vendita (fresche o trasformate). I risultati ottenuti forniranno dati utili per la corretta gestione del rischio microplastiche nelle cozze fresche e trasformate, nonché per la valutazione preliminare dei livelli di esposizione ai POPs associati al consumo di un pasto medio di cozze contaminate.

2. *Studio preliminare sull'utilizzo del colorante Rosso Nilo per l'identificazione di microplastiche in cozze marine:*
L'obiettivo della presente sperimentazione è stato quello di valutare i limiti di utilizzo del colorante Rosso Nilo per l'identificazione di microplastiche in campioni di cozze marine destinate al consumo umano.

SPERIMENTAZIONE 1

Quantificazione e caratterizzazione delle microplastiche presenti nelle tre specie di cozze più comunemente commercializzate nell'Unione Europea.

L'attività di ricerca durante questa prima sperimentazione è stata condotta presso i laboratori dell'"Unità d'Ispezione degli Alimenti di Origine Animale", Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Messina, Italia.

3. Materiali e metodi

3.1 Campionamento

Un totale di 1500 esemplari di cozze è stato analizzato per valutare la distribuzione e la composizione di microplastiche (MPs) eventualmente presenti (Tabella 9). I mitili sono stati suddivisi in 150 campioni composti da 10 esemplari ciascuno. Per il presente studio, sono state individuate due differenti categorie commerciali di vendita: 75 campioni erano costituiti da cozze fresche di dimensioni adulte (8.3 ± 1.1 cm) commercializzate all'interno di reti in plastica, mentre altri 75 campioni erano costituiti da cozze precotte, sgusciate e surgelate, confezionate sottovuoto all'interno di contenitori in plastica. Tutti i campioni sono stati reperiti presso diversi mercati locali e la GDO nella città di Messina (ME, Italia). I molluschi bivalvi appartenevano alle tre specie di cozze più commercializzate in Europa (EUMOFA, 2019), ciascuna proveniente da diverse Zone Fao di pesca: *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis* e *Mytilus chilensis* allevate

rispettivamente nelle acque del Mar Mediterraneo, dell'Oceano Atlantico e dell'Oceano Pacifico. Non appena acquistate, i campioni di cozze fresche venivano avvolti in fogli d'alluminio e, per evitarne uno stress eccessivo, erano mantenute a temperatura controllata di 6-8°C durante il trasporto in laboratorio, dove venivano prontamente congelate a -30 °C fino al momento dell'analisi. I campioni di cozze trasformati venivano trasportati presso il laboratorio, in contenitori isotermici e immediatamente stoccati a -30 °C all'interno della loro confezione originale fino al momento dell'analisi.

Tabella 9: Distribuzione dei campioni

Specie di cozze	n. campioni freschi	n. campioni trasformati*	n. campioni totali	Peso in g
<i>M. galloprovincialis</i>	37 (370)	13 (130)	50 (500)	1000.67
<i>M. edulis</i>	38 (380)	12 (120)	50 (500)	998.44
<i>M. chilensis</i>	0(0)	50 (500)	50 (500)	993.79
TOTALE	75 (750)	75 (750)	150 (1500)	2992.9

*Campioni trasformati: cozze precotti, sgusciate e surgelate. Tra parentesi, il numero dei singoli esemplari analizzati

3.2 Preparazione e digestione dei campioni

Al fine di escludere ogni possibile fonte di contaminazione, tutte le attrezzature e le superfici utilizzate per il campionamento e le analisi dei campioni sono state rigorosamente pulite con acqua deionizzata ultrafiltrata attraverso filtri sterili in acetato di cellulosa con pori del diametro di 0.22 μm (VWR International). Durante la processazione dei campioni, ogni fase è stata eseguita all'interno di una cappa aspirante per minimizzare il rischio di contaminazione da fibre plastiche veicolate dall'aria; come già detto, fenomeno ricorrente in questo tipo di studi (Prata et al., 2020). Un'intera procedura analitica in bianco (campione controllo) è stata inclusa ad ogni sessione di digestione e filtrazione per valutare il grado di contaminazione in corso d'analisi (Davison, & Asch, 2011; Foekema et al., 2013). Una volta scongelate, il guscio delle cozze fresche veniva accuratamente sciacquato con acqua deionizzata ultrafiltrata. Ciascun campione veniva suddiviso in due sotto campioni

ognuno costituito da un mix di 5 cozze della stessa specie e tipologia commerciale per un totale di 10 g di polpa. I campioni venivano posti all'interno di beute graduate (250 ml) a cui venivano aggiunti 150 ml di perossido di idrogeno 30% Vol. (Carlo Erba Reagents S.r.l., Cornaredo, Italy), secondo la metodica proposta da Li et al. (2015). Per agevolare la digestione dei tessuti, i campioni venivano posti in agitazione costante (80 rpm) ad una temperatura di 65 °C per una durata di 36-48h. Ciascun campione veniva quindi trasferito in un imbuto separatore a cui venivano aggiunti 800 ml di una soluzione salina in acqua deionizzata ultrafiltrata (250 g NaCl/L) (Sodium Chloride, Carlo Erba Reagents S.r.l., Cornaredo, Italy). Per flottazione, le MPs affioravano in superficie separandosi per densità dai residui organici non digeriti e da eventuali sedimenti presenti. Il surnatante veniva prelevato con una pipetta in vetro da 10 ml e filtrato attraverso filtri in nitrato di cellulosa (Whatman AE98) con pori del diametro (\emptyset) di 5 μm . Ciascun filtro era quindi

posto su di una piastra petri in vetro (90mm Ø, Biosigma, Milan, Italy) e lasciato ad asciugare per qualche ora.

3.3 Osservazione dei filtri e identificazione delle MPs con spettroscopia ad infrarossi (FTIR) e “hot point test”

I filtri di ciascun campione e dei campioni controllo venivano osservati allo stereomicroscopio (Leica M205C) per indentificare visivamente potenziali MPs sulla base delle caratteristiche fisiche delle particelle individuate (Hidalgo-Ruz et al., 2012; Free et al., 2014). Particelle di dimensioni <5 mm, di colore e spessore uniforme lungo tutta la loro lunghezza (se fibre) venivano selezionati per le successive fasi di identificazione. Ciascun filtro veniva osservato tre volte da due differenti operatori per confermare il numero di frammenti individuati. I filtri dei campioni controllo venivano osservati attentamente allo stereomicroscopio e ogni eventuale particella riscontrata veniva morfologicamente comparata con quelle individuate

nei filtri dei campioni. Se quest'ultime erano troppo simili tra loro, le particelle corrispondenti riscontrate nei filtri dei campioni venivano escluse dal conteggio finale. Durante l'osservazione allo stereomicroscopio, due filtri puliti venivano posti a sinistra e a destra dell'operatore, al fine di valutare eventuali contaminazioni ambientali durante questa fase. Ogni due ore, i filtri puliti venivano osservati attentamente allo stereomicroscopio e per le particelle eventualmente individuate valevano le stesse considerazioni fatte per quelle dei campioni controllo. Tutte le particelle identificate venivano classificate morfologicamente secondo quanto proposto da GESAMP (2019): i) "frammenti" (MP-fr); ii) "granuli" (MP-gr); iii) "film" (MP-fl); iv) "fibre" (MP-fb); "pellet" (MP-pe). Circa il 14% delle particelle individuate tra i filtri dei campioni, sono state selezionate in base alla rappresentatività e analizzate per stabilirne la composizione chimica attraverso la tecnica di spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FTIR). Questa

tecnica non distruttiva si basa sul riconoscimento di certi gruppi funzionali tipici della struttura chimica della matrice in esame sulla base di modificazioni molecolari dovute a un dipolo elettrico (Hind et al., 2001; Martinelli et al., 2020). Ad oggi, la spettroscopia FTIR è ampiamente utilizzata nell'identificazione delle MPs estratte dai campioni ambientali e diversi studi ne hanno messo in evidenza l'elevata affidabilità (Xu et al., 2019). Nel presente studio, l'analisi FTIR è stata effettuata con l'ausilio di uno spettroscopio IR Affinity-1 (Shimadzu, Japan) in modalità ATR in singola riflettanza. Gli spettri FTIR sono stati misurati nella lunghezza d'onda compresa tra i 400 e i 4000 cm^{-1} con una risoluzione di 4 cm^{-1} e una media di oltre 45 scansioni. Le particelle venivano identificate comparando gli spettri di assorbanza FTIR delle particelle in esame con quelli dei polimeri di riferimento della libreria interna dello strumento. Un indice di affinità di almeno il 70% è stato considerato accettabile per poter definire MPs le particelle analizzate. Per tutte le altre

particelle individuate nei filtri è stato invece eseguito l'“hot point test” per una “identificazione” di tutte le restanti particelle individuate.

3.4 Validazione del protocollo analitico

Il tasso di recupero del protocollo d'estrazione impiegato e le dimensioni minime delle particelle individuabili allo stereomicroscopio, sono state determinate contaminando sperimentalmente dei campioni di cozze con particelle in LDPE (ICO Polymers UK Ltd, Gainsborough, England, United Kingdom) testando singolarmente differenti range di dimensioni (da 63µm a 90µm; da 91µm a 125µm; da 126µm a 180µm; da 181µm a 355µm e da 356 a 510µm). Nove esemplari di cozze fresche e nove esemplari di cozze trasformate sono stati scelti casualmente tra i campioni precedentemente analizzati contaminando ciascun soggetto con 20 MPs di LDPE. Per minimizzare le variazioni derivanti dall'utilizzo di esemplari

differenti, ciascun campione era costituito da due cozze omogenizzate e divise in due sub campioni di ugual peso: uno veniva contaminato e l'altro rappresentava il campione controllo. I campioni sono stati processati secondo la stessa metodica analitica descritta sopra. Le particelle di LDPE eventualmente presenti nei filtri dei campioni venivano individuate allo stereomicroscopio ed enumerate. Il 10% delle particelle individuate per ciascun gruppo di cozze fresche e trasformate sono analizzate con spettroscopia FTIR per confermarne la composizione chimica.

3.5 Analisi statistica

Per valutare eventuali differenze significative tra i campioni, considerando le zone di pesca, le specie e le differenti tipologie commerciali, sono stati effettuati un'analisi della variazione tramite ANOVA ad una-via e T-test (Addinsoft, Microsoft excel). Il livello di significatività è stato determinato fissando il valore di $p < 0,05$.

4. Risultati e discussioni

4.1 Distribuzione e caratteristiche delle MPs nei campioni di cozze

Diverse potenziali MPs sono state individuate nel 68,6 % (103) dei campioni con un valore medio $0,14 \pm 0,18$ particelle/g (peso bagnato) dei campioni totali e $0,21 \pm 0,18$ particelle/g (peso bagnato) dei campioni positivi (Tabella 10). Un totale di 428 particelle è stato individuato allo stereomicroscopio, con un quantitativo variabile da 1 a 20 particelle/campione, con un valore medio di $2,85 \pm 3,55$ particelle/campione totali e $4,15 \pm 3,60$ particelle/campione positivo. Un quantitativo minimo di fibre è stato contato nei filtri dei campioni controllo con una media di $0,33 \pm 0,84$ fibre/filtro. Il numero totale di particelle per grammo riscontrato in questo studio è minore rispetto ai quantitativi di $0,7 - 2,9$ particelle/g e $0,9 - 4,6$ particelle/g riportati rispettivamente da Li et al. (2018) e da Li et al. (2016). Altri studi invece, come quelli condotti da Van Cauwenberghe & Janssen

(2014) e da Van Cauwenberghe et al., (2015) riportano valori più simili ai nostri, rispettivamente di $0,36 \pm 0,07$ particelle/g e $0,2 \pm 0,3$ particelle/g. I nostri risultati invece, si discostano molto da quelli riportati da Murphy (2018), il quale ha segnalato il maggior numero di MPs riscontrate fino ad oggi in campioni di cozze: da 5,6 a 657,5 MPs/g. In ogni caso, è importante sottolineare che questi studi sono stati condotti con differenti tecniche analitiche e per tanto ogni possibile comparazione potrebbe perdere di significato (Li et al., 2018). In questo studio, le MP-fb sono state il morfotipo maggiormente individuato con il 70,09% (n=300) di particelle (Figura 3), mentre il 17,06% (n=73) erano MP-fr (Figura 4) e il 12,85% (n=55) erano MP-fl (Figura 5).

Tabella 10: Distribuzione del numero di particelle tra le varie specie di cozze

Specie di cozze	n.	Peso in g	% Campioni con particelle	n. particelle	Rapporto sui campioni totali		Rapporto sui campioni positivi		
					Particelle/campione	Particelle/g	Peso in g	Particelle/campione	Particelle/g
<i>M. galloprovincialis</i>	50	1000,67	37 (74%)	248	4,96±5,04	0,25±0,25	740,56	6,7±4,75	0,34±0,23
<i>M. edulis</i>	50	998,44	37 (74%)	98	1,96±1,80	0,10±0,09	737,98	2,65±1,58	0,13±0,08
<i>M. chilensis</i>	50	993,79	29 (58%)	82	1,64±1,71	0,08±0,09	557,76	2,22±1,30	0,007±0,003
TOTALE	150	2992,9	103 (68,7%)	428	2,85±3,55	0,14±0,18	2036,3	4,15±3,60	0,21±0,18

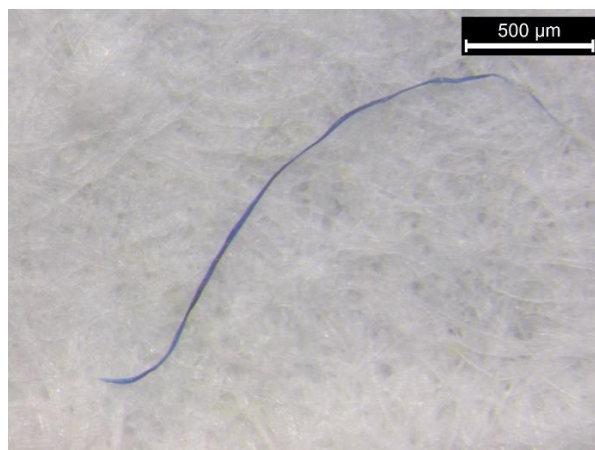


Figura 3: Esempio di MP-fb riscontrata nei campioni in corso d'analisi

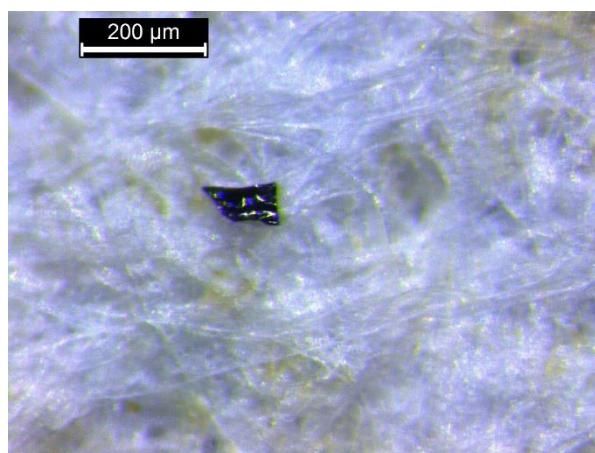


Figura 4: Esempio di MP-fr riscontrata nei campioni in corso d'analisi



Figura 5: Esempio di MP-fl riscontrata nei campioni in corso d'analisi

Il numero di MP-fb era significativamente maggiore ($p < 0,05$) rispetto a quello delle MP-fr e delle MP-fl per tutte le specie di cozze (Figura 6). Il test ANOVA riportava differenze significative ($p < 0,05$) tra le specie e le Zone Fao di pesca. Un maggiore numero di particelle è stato riscontrato nella specie *M. galloprovincialis* (Mar Mediterraneo) con un quantitativo di $0,25 \pm 0,25$ particelle/g, maggiore ($p < 0,05$) rispetto a quello riscontrato in *M. chilensis* (Oceano Pacifico) ($0,08 \pm 0,09$) e *M. edulis* ($0,10 \pm 0,09$) (Oceano Atlantico). Nessuna differenza significativa ($p > 0,05$) è stata riscontrata tra *M. chilensis* (Oceano Pacifico) e *M. edulis* (Oceano Atlantico). Considerando le categorie commerciali di vendita, potenziali MPs sono state identificate nel 77,3% (58) delle cozze fresche e nel 60,0 % (45) delle cozze trasformate (Tabella 11).

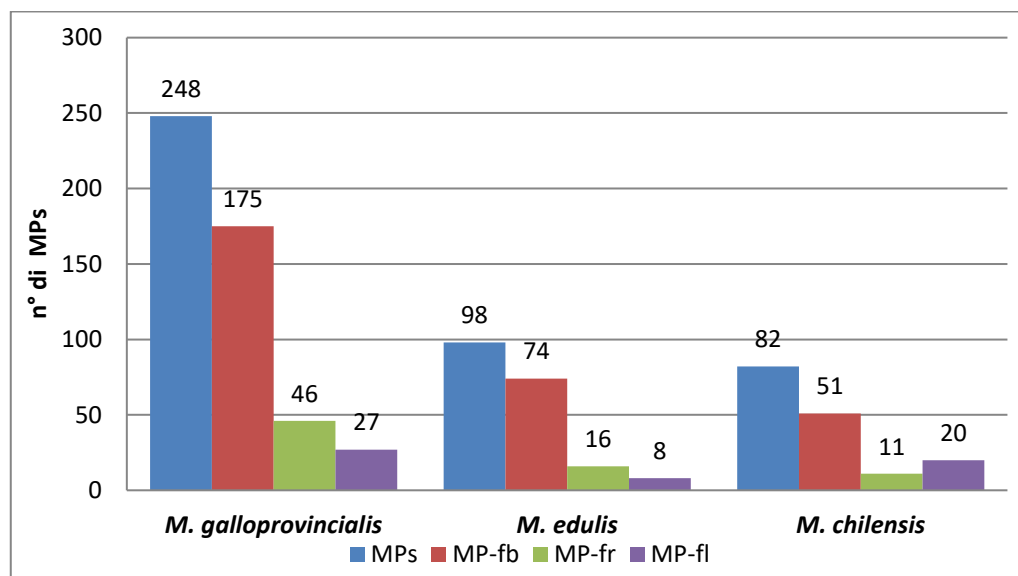


Figura 6: Distribuzione per morfotipo delle particelle tra le specie di cozze analizzate

Tabella 11: Distribuzione del numero di particelle tra i tipi commerciali di cozze analizzate

Cozze	n.	Peso in g	% Campioni con particelle	n. particelle	Rapporto sui campioni totali		Rapporto sui campioni positivi		
					Particelle/ campione	Particelle/g	Peso in g	Particelle/ campione	Particelle/ g
Fresche con guscio	75	1500.86	58 (77.3%)	296	3.95±4.24	0.19±0.21	1139.57	5.10±4.17	0.25±0.21
Precotte senza guscio	75	1492.04	45 (60%)	132	1.76±1.77	0.09±0.09	896.73	2.93±1.32	0.15±0.07
TOTAL	150	2992.9	103 (68.7 %)	428	2.85±3.55	0.14±0.18	2036.3	4.15±3.60	0.21±0.18

Un maggior numero di particelle è stato ritrovato nei campioni di cozze fresche con un rapporto particelle/campione più del doppio rispetto a quello riscontrato per i campioni di cozze trasformati ($p < 0,05$) (Figura 7).

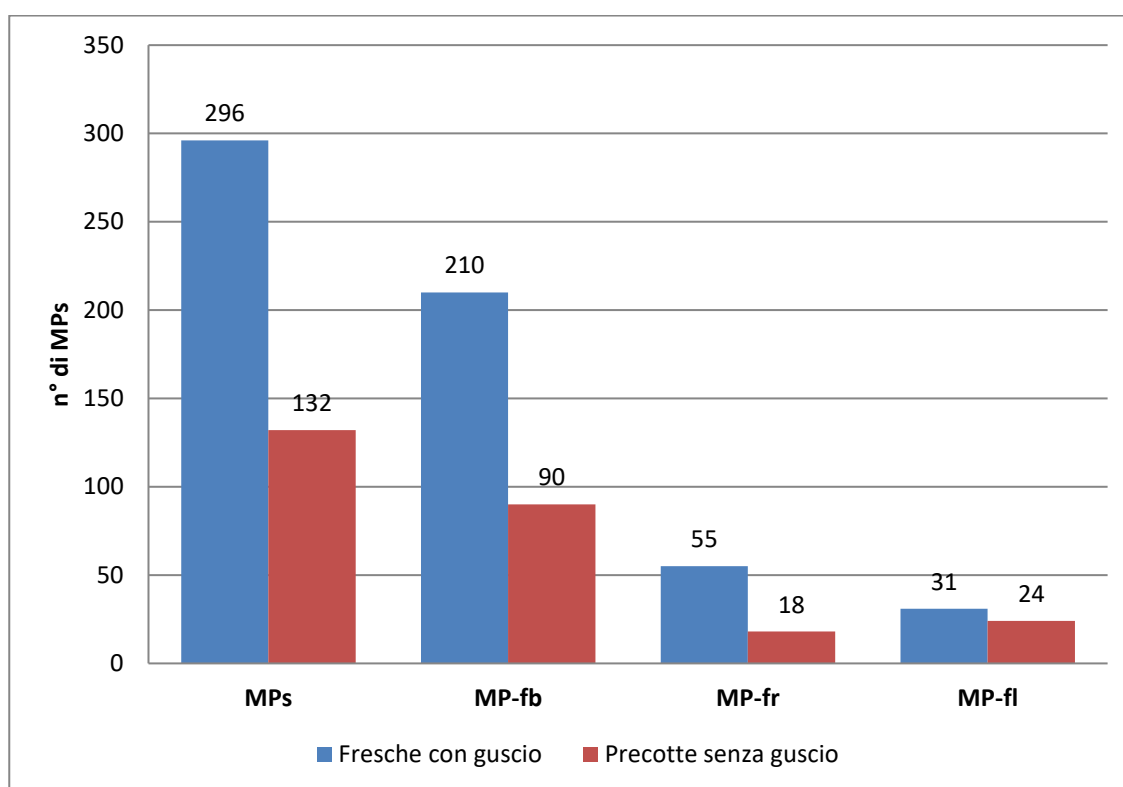


Figura 7: Distribuzione per morfotipo delle particelle tra i tipi commerciali di cozze analizzate

In particolare, il numero di MP-fb e MP-fr era il doppio nei campioni di cozze fresche rispetto a quelle trasformate, mentre nessuna differenza significativa è stata calcolata per le MP-fl ($p>0,05$). Complessivamente, le dimensioni delle MP-fr ed MP-fl erano comprese tra 150 μm e 1000 μm (considerando la diagonale maggiore) mentre il range di lunghezza delle MP-fl era circa 250 μm - 6000 μm . Le MP-fl le cui dimensioni erano comprese tra ~1000 μm e 1500 μm sono state quelle più riscontrate, mentre le MP-fr e le MP-fl erano prevalentemente di dimensioni comprese tra i ~150 μm e 500 μm (Figure 8-10).

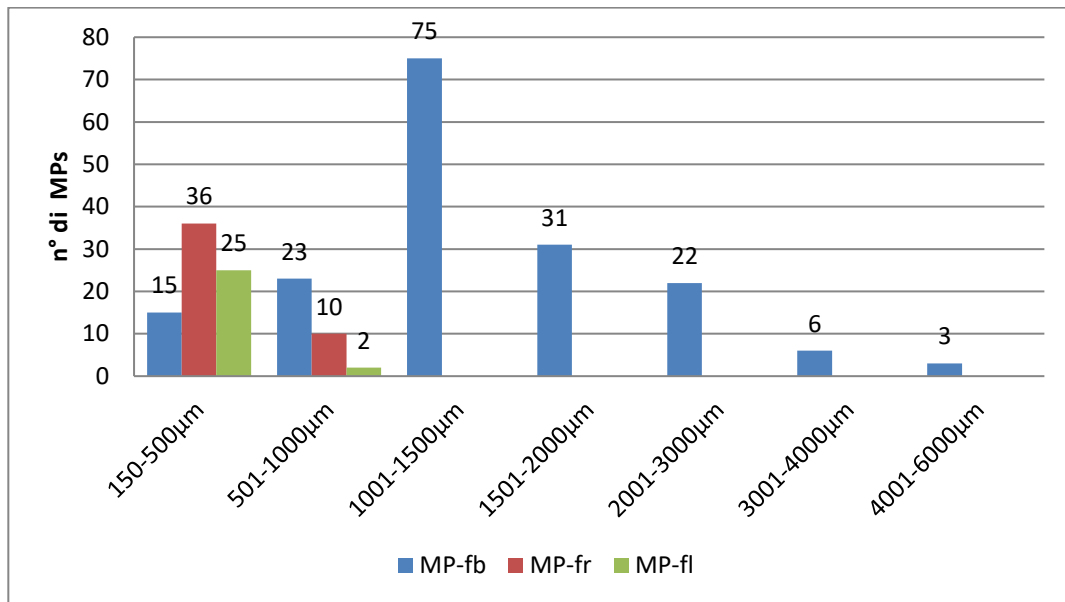


Figura 8: Dimensioni delle particelle individuate tra i campioni di *M. galloprovincialis* analizzati

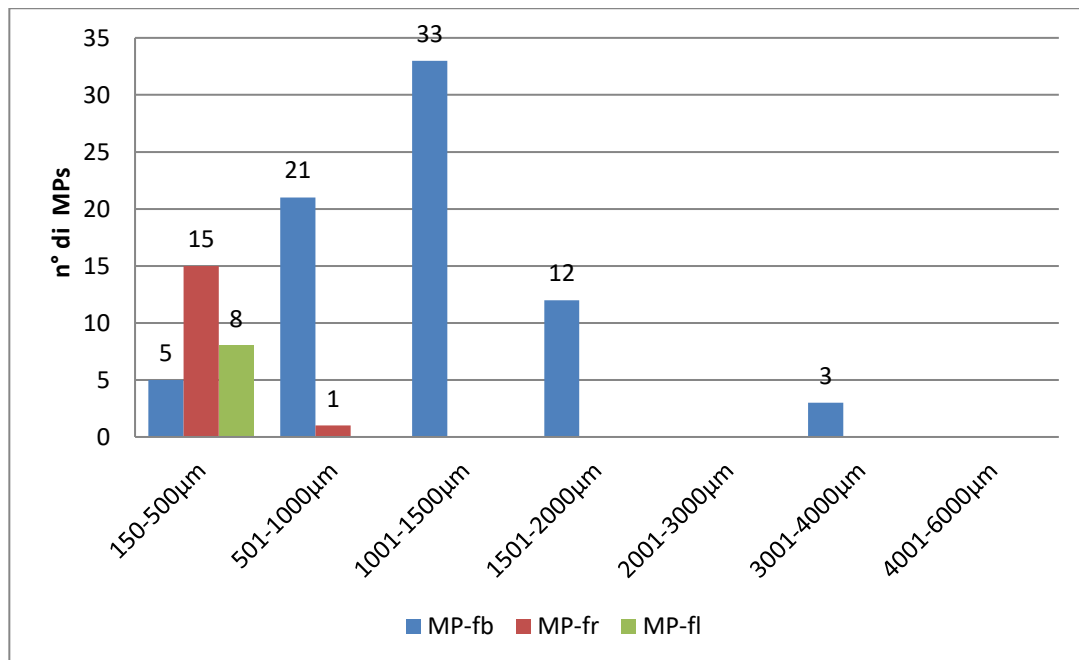


Figura 9: Dimensioni delle particelle individuate tra i campioni di *M. edulis* analizzati

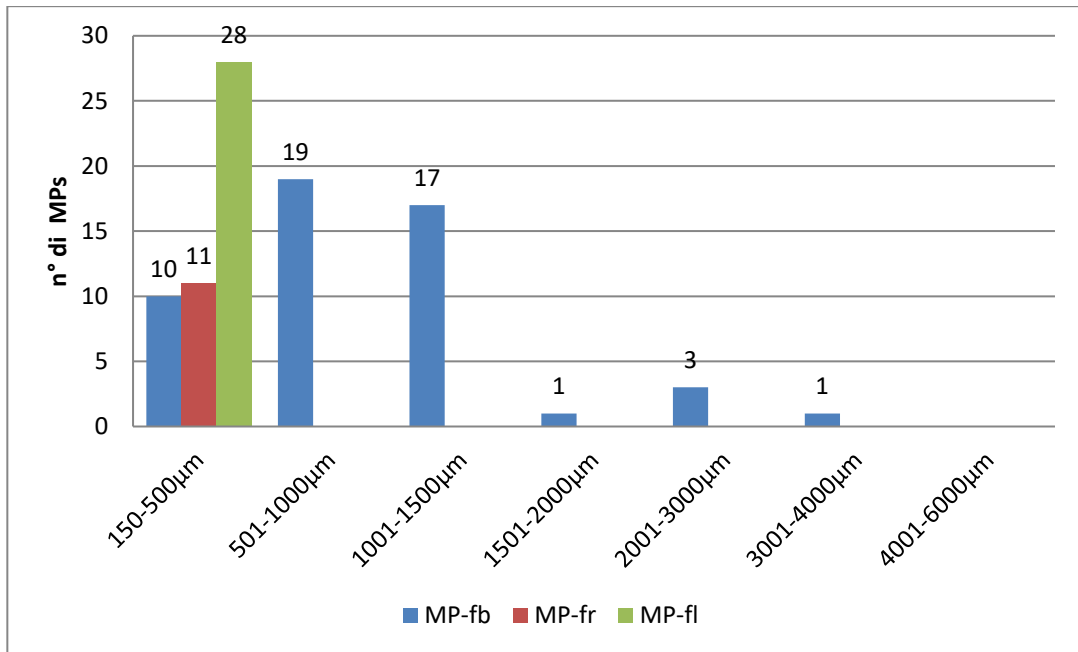


Figura 10: Dimensioni delle particelle individuate tra i campioni di *M. chilensis* analizzati

4.2 Composizione chimica delle particelle individuate nei campioni di cozze

Sul totale di 428 particelle identificate nei filtri, 59 di queste (36 MP-fl, 19 MP-fr e 4 MP-fl), di dimensioni comprese tra i 150 μm e i 1500 μm , sono state analizzate con spettroscopia FTIR per identificarne la composizione chimica, confermandone la natura plastica. Tra queste, l'analisi spettrometrica ha confermato che 44 particelle, di dimensioni comprese tra i 150 μm e i 1000 μm , erano effettivamente MPs (Figura 11, Tabella 12 a e 12 b). In entrambe le categorie commerciali, il PE era il polimero maggiormente rappresentato seguito dal PP e dal PET. In minor percentuale, sono state identificate anche particelle in PS e in PVC. Il 19 % di tutte le particelle analizzate, corrispondenti ad 11 MP-fb di dimensioni superiori a $\sim 500 \mu\text{m}$, sono state identificate come fibre di cotone ed un altro 7%, costituito da 4 MP-fr, come materiale organico (probabilmente frammenti di guscio). I dati ottenuti sottolineano l'incertezza che deriva

dall'identificazione delle particelle plastiche attraverso l'osservazione al microscopio, che aumenta al diminuire della dimensione delle particelle stesse (Hermsen et al., 2018; Remy et al., 2015; Wesch et al., 2016).

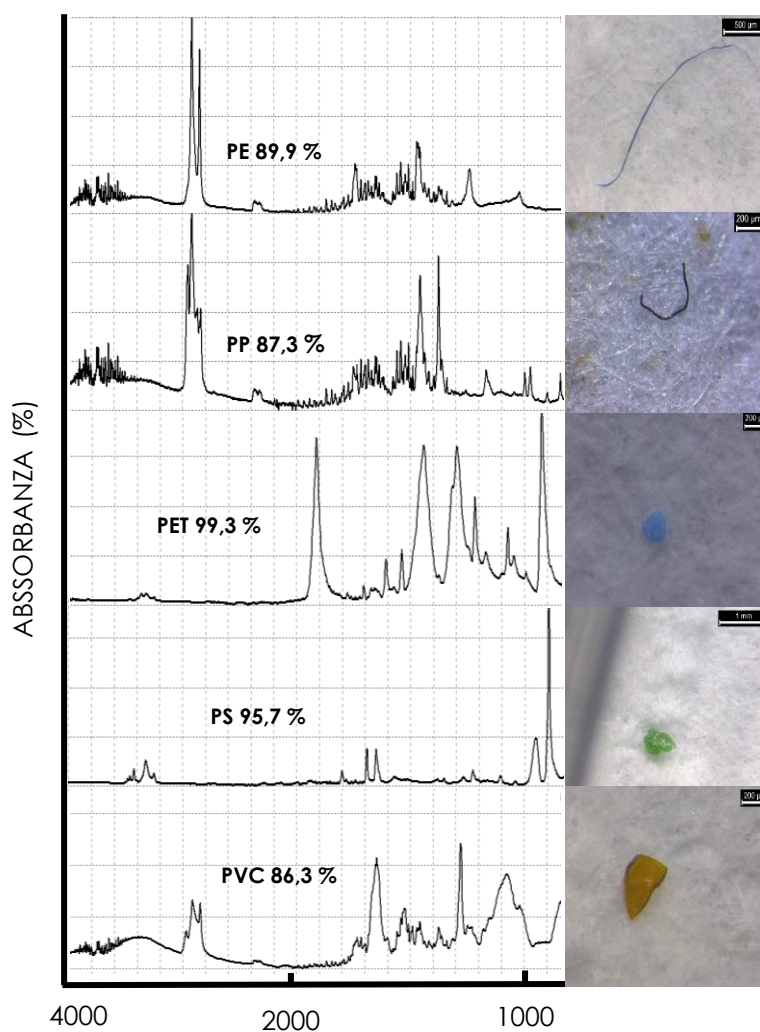


Figura 11: Composizione chimica di frammenti identificati tramite spettroscopia FTIR

Tabella 12a: Tipi di polimeri identificati tra 59 particelle selezionate per l'analisi con spettroscopia FTIR tra le differenti specie analizzate

Polimeri (n. particelle)	Specie di cozze		
	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>	<i>M. chilensis</i>
Polietilene (20)	8 (MP-li)	6 (5 MP-li/1 MP-fr)	6 (1 MP-li/5 MP-fr)
Polipropilene (11)	5 (MP-li)	3 (MP-li)	3 (MP-li)
Poliethilene tereftalato (7)	2 (MP-fr)	2 (MP-fr)	3 (MP-fr)
Polivinilcloruro (4)	0	1 (MP-fi)	3 (MP-fi)
Polistirene (2)	1 (MP-fr)	1 (MP-fr)	0
Cotone (11)/ Organico (4)	3 (MP-li)/1 (MP-fr)	4 (MP-li)/2 (MP-fr)	4 (MP-li)/1 (MP-fr)
TOTALE (59 particelle)	20 (16 MP-li/4 MP-fr)	19 (12 MP-li/6 MP-fr/1 MP-fi)	20 (8 MP-li/9 MP-fr/3 MP-fi)

Tabella 12b: Tipi di polimeri identificati tra 59 particelle selezionate per l'analisi con spettroscopia FTIR tra le differenti tipologie analizzate

Polimeri (n. particelle)	Categorie commerciali	
	Fresche con guscio	Precotte sgusciate
Polietilene (20)	11 (MP-li)	9 (3 MP-li/6 MP-fr)
Polipropilene (11)	8 (MP-li)	3 (MP-li)
Poliethilene tereftalato (7)	4 (MP-fr)	3 (MP-fr)
Polivinilcloruro (4)	1 (MP-fi)	3 (MP-fi)
Polistirene (2)	2 (MP-fr)	0
Cotone (11)/ Organico (4)	3 (MP-li)/3 (MP-fr)	8 (MP-li)/1 (MP-fr)
TOTALE (59 particelle)	32 (22 MP-li/9 MP-fr/1 MP-fi)	27 (14 MP-li/10 MP-fr/3 MP-fi)

4.3 Tasso di recupero e dimensione minima individuabile delle particelle

Le dimensioni minime delle particelle che consentivano una individuazione agevole delle potenziali MPs presenti nei filtri dei campioni erano comprese tra ~91-125µm. Il materiale organico non completamente digerito poteva trarre in inganno l'operatore rendendo complicata l'individuazione di particelle più piccole da dover sottoporre alle successive fasi di identificazione. Un totale di 173 e 169 potenziali particelle di LDPE sono state contate nei campioni di cozze fresche e in quelle trasformate, rispettivamente. Abbiamo notato che le particelle mancanti erano spesso rimaste adese alla superficie delle beute filtranti, sottolineando la necessità di analisi meticolose e precise. Inoltre, le particelle tendevano a aderire tra di loro rendendo ancor più complicata l'enumerazione. La spettroscopia FTIR confermava la composizione chimica dei frammenti di LDPE analizzati. Complessivamente, un tasso medio di recupero delle

particelle del 95% permetteva una valutazione dei risultati ottenuti con un buon livello di affidabilità.

4.4 Livelli di esposizione a PCB e PAHs associati al consumo di cozze contaminate con MPs

EFSA (2016) ha stimato il quantitativo medio di plastica ingerita durante il consumo di un piatto di cozze (225g senza guscio), corrispondente a circa 7 µg di plastica ovvero 900 MPs. Questi dati sono stati ottenuti moltiplicando la più alta concentrazione di MPs riportati in letteratura all'epoca (4 particelle/g) in campioni di cozze destinate al consumo umano (Li et al., 2015). Basandoci sullo stesso principio sono stati calcolati, per le 3 specie oggetto della tesi, i quantitativi di MPs a cui il consumatore è esposto durante il consumo di un piatto di cozze (225g senza guscio). In 225 grammi di *M. galloprovincialis* erano presenti fino a 56,25 particelle plastiche, corrispondenti a 0,44 µg di plastica. Quantitativi più bassi pari a 22,5 e 18 di MPs si

rinvenivano in *M. edulis* e *M. chilensis* rispettivamente, ciascuno corrispondenti a 0,17 μ g e 0,14 μ g di plastica.

Relativamente allo stato di commercializzazione nelle cozze fresche (*M. galloprovincialis* e *M. edulis*) il numero di particelle plastiche ingeribili da un pasto medio ammonterebbe a 47,25, per un totale di 0,37 μ g di plastica; mentre sarebbero 20,25 le particelle plastiche assunte con un pasto di cozze precotte, sgusciate e surgelate, corrispondenti a 0,16 μ g di plastica (Tabella 13).

Tabella 13: Numero di MPs potenzialmente ingerite durante un pasto di 225g di cozze

Cozze	n. MPs/pasto	μg di plastica ingerita
<i>M. galloprovincialis</i>	56,25	0,44
<i>M. edulis</i>	22,5	0,17
<i>M. chilensis</i>	18	0,14
Fresche con guscio	47,25	0,37
Precotte sgusciate	20,25	0,16

Considerando i valori medi dei nostri risultati (Tabelle 10 e 11) ed il consumo medio pro capite annuo di 1,33 kg di cozze/persona (EUMOFA, 2017), ne deriva che in un anno, un uomo potrebbe ingerire fino a 186,2 MPs per un totale di 1,45 µg di plastica.

Infine sulla base dei livelli annui di plastica ingerita a seguito del consumo di cozze, considerando i livelli massimi di POPs (PCBs e PAHs) potenzialmente rilasciati da MPs disperse nell'ambiente (PCBs fino a 2,750 ng/g e PAHs fino a 24,000 ng/g (EFSA, 2016)), è stato calcolato il livello di esposizione giornaliero derivante dal consumo di cozze contaminate.

I livelli di MPs riscontrati nei campioni analizzati contribuirebbero solo con una piccolissima percentuale ai livelli di esposizione giornaliera di PCBs e di PAHs, rispettivamente dello 0,00004 % e dello 0,0001%. L'EFSA (2012), sul monitoraggio delle diossine e dei PCB negli alimenti e nei mangimi disponibili sul mercato europeo, ha stimato, infatti, un'esposizione media giornaliera alle non-dioxin-like PCBs di 0,3–1,8 µg (considerando un individuo

di 70 kg). Mentre, per quanto riguarda i PAHs, l'EFSA (2008) ha stimato per un consumatore medio un'esposizione giornaliera media di 3,8 µg. Pertanto, anche se considerassimo i livelli più elevati di accumulo e rilascio di questi POPs riscontrati nelle MPs, i nostri risultati sono sicuramente confortanti.

5. Considerazioni

L'elevata persistenza delle MPs nell'ambiente ne sta comportando un accumulo sempre crescente (Andrady, 2017; Barboza et al., 2018). Inoltre, come già precisato, diversi studi hanno dimostrato la possibilità che le MPs possano accumularsi a concentrazioni crescenti salendo lungo la piramide alimentare, destando preoccupazioni soprattutto per gli organismi viventi all'apice della catena (Akhbarizadeh et al., 2019; Nelms et al., 2018; Welden et al., 2018). Studi sulla quantificazione di MPs eventualmente presenti negli alimenti sono fondamentali per comprendere i livelli di esposizione per una corretta analisi dei rischi associati. La prevalenza di fibre tra i morfotipi delle particelle riscontrate, così come il tipo di polimeri identificati, confermano quanto riportato in diversi studi precedenti (Qu et al., 2018; Gündoğdu et al., 2020).

Così come già riportato in letteratura (Li et al., 2015), relativamente all'origine di tali frammenti è ipotizzabile che le

fibre in PP possano derivare dalle corde in plastica utilizzate nelle fasi di all'allevamento dei mitili mentre per le cozze trasformate non si può escludere che le particelle in PE e PVC possano originare dalle confezioni in plastica utilizzate per il packaging. A tal proposito sarebbe auspicabile sostituire le attrezzature in plastica impiegate nella mitilicoltura con del materiale biodegradabile e utilizzare dei materiali innovativi quanto più eco-friendly per il packaging dei prodotti alimentari.

Relativamente all'origine di PET e PS, essendo materiali plastici comunemente utilizzati per la fabbricazione di bottiglie, bicchieri e sacchetti di plastica, la loro presenza è da correlare alla loro notevole diffusione nell'ambiente sotto forma di rifiuti plastici.

Il riscontro di fibre di cotone, maggiormente rinvenute nelle cozze trasformate, potrebbe essere correlato ad una contaminazione dei campioni con fibre tessili durante le fasi di lavorazione delle cozze nelle industrie alimentari (considerando che i controlli intermedi nel corso delle analisi ci permettevano

di scongiurare contaminazione importanti dei campioni in fase di processazione).

Il maggior riscontro di MPs nei campioni di *M. galloprovincialis* potrebbe riflettere il loro maggior grado di distribuzione nel bacino del Mar Mediterraneo piuttosto che nell'Oceano Atlantico e Pacifico, così come riportato in uno studio precedente (de Lucia et al., 2014), così come a caratteristiche tipiche della specie (capacità di filtrazione, dimensioni, ect...).

Sebbene il riscontro di MPs in campioni di cozze sia un dato oggettivo, non è possibile determinarne con certezza l'origine. La contaminazione con particelle plastiche potrebbe di fatto avvenire, infatti, in qualsiasi fase della produzione, trasformazione e commercializzazione dei mitili e non derivare direttamente da una contaminazione delle cozze nell'ambiente marino. In questo studio tuttavia, un maggior quantitativo di particelle è stato riscontrato nei campioni freschi piuttosto che in quelli trasformati, in contrasto con quanto riportato in altri studi

simili (Li et al., 2018; Karami et al., Li et al., 2019). A tal proposito, ulteriori indagini si rendono necessarie per comprendere se i trattamenti di lavorazione dei mitili, come il lavaggio, la sgusciatura e la precottura, possano influire sull'apporto di MPs ed eventualmente contribuire ad aumentare o mitigare i rischi tossicologici correlati. Uno studio preliminare condotto da Renzi et al. (2018) ha evidenziato un minor numero di MPs, di dimensioni inferiori, in cozze sottoposte a cottura rispetto a campioni di cozze crude. Ad oggi, non ci sono informazioni certe sul destino delle MPs assunte con la dieta. In questo scenario, i possibili effetti avversi sull'uomo sono ancora poco compresi soprattutto per quanto riguarda le esposizioni croniche (Barboza et al., 2018). Per determinare una corretta valutazione e gestione dei rischi, andrebbe adottato un protocollo analitico uniforme e piani armonici di monitoraggio andrebbero incoraggiati per comprendere le variazioni nello spazio e nel tempo delle MPs disperse nell'ambiente (Li et al., 2019).

SPERIMENTAZIONE 2

Studio preliminare sull'utilizzo del colorante Rosso Nilo per l'identificazione di microplastiche in cozze marine.

L'attività di ricerca durante questa seconda sperimentazione è stata condotta presso i laboratori del "Marine Scotland Science", The Scottish Government, Aberdeen, Scotland, United Kingdom.

6. Materiale e metodi

6.1 Esperimento di esposizione

Per questa prova di contaminazione sperimentale sono stati utilizzati campioni di cozze prelevate in natura (CN) e campioni di cozze allevate (CA) appartenenti alla specie *Mytilus edulis*. Gli organismi filtratori come le cozze sono da molti considerati ottimi bioindicatori della contaminazione da MPs negli ambienti costieri (Li et al., 2019). Le CN sono state campionate nel mese di Aprile 2019, lungo le coste della baia di Nigg (Aberdeen, Scozia, UK) in prossimità del porto della città (57°08'33.82"N – 2°03'21.92"W). Le CN al momento del campionamento erano ancorate alle rocce, fuori dall'acqua (bassa marea), ricoperte di sabbia e di altro materiale organico. Una volta prelevate con l'aiuto di scalpelli e forbici, sono state rapidamente trasportate all'interno di contenitori chiusi e puliti presso il laboratorio d'analisi. Le CA, allevate su pali di legno e corde in plastica, venivano acquistate presso un centro di depurazione locale

della città di Aberdeen. Al momento del campionamento, le CA si trovavano all'interno di una gabbia, immerse in uno specchio d'acqua per i processi di rifinitura prevendita e, una volta prelevate, venivano rapidamente trasportate presso il laboratorio d'analisi in contenitori chiusi e puliti. Ciascun gruppo di CN e CA è stato suddiviso in tre sottogruppi: i campioni in bianco (CaB) (180 esemplari) sono stati prontamente avvolti in fogli di alluminio e stoccati immediatamente ad una temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, i campioni da contaminare (CaE) (135 esemplari) e i campioni controllo (CaC) (45 esemplari) sono stati posti all'interno di acquari contenenti 60 litri di acqua di mare pulita e filtrata, muniti di aeratore per assicurare una ossigenazione costante ed un continuo movimento dell'acqua. L'acqua di mare utilizzata era stata prelevata direttamente dalla baia di Nigg e, una volta a terra, veniva filtrata attraverso uno strato di sabbia e ghiaia e pompata all'interno di un serbatoio. Dalla vasca di stoccaggio, l'acqua veniva spinta

all'interno di un sistema ad alta pressione composto da una serie di filtri successivi, quindi trattata con raggi UV per rimuovere plankton, alghe e altre possibili fonti di contaminazione organica. Le MPs utilizzate nella contaminazione sperimentale erano particelle di polietilene a bassa densità (LDPE) (0.924 g/cm^3). Una polvere di LDPE a granulometria variabile era stata acquistata presso ICO Polymers UK Ltd, Gainsborough, Inghilterra, Regno Unito. La polvere veniva accuratamente setacciata attraverso una serie di maglie in acciaio (Endecotts Laboratory Test Sieves, Londra, Regno Unito) di dimensioni scalari (1,00 mm, 710 μm , 500 μm , 355 μm , 250 μm , 180 μm , 125 μm , 90 μm , e 63 μm) al fine di separare le particelle in lotti di dimensioni specifiche. Ciascun lotto era quindi costituito da granuli di LDPE non uniformi in termini di forma ma con un diametro e un'area superficiale simile. Particelle di LDPE $<250\mu\text{m}$ (2g) e tra 500 e 710 μm (2 g) sono state aggiunte in ciascuna vasca contenenti i CaE. La contaminazione sperimentale è stata condotta ad una

temperatura costante di 15 °C per 2 ore in regime di luce. I CaE e i CaC una volta prelevati dalle vasche sono stati avvolti in tre strati di fogli d'alluminio e stoccati a -20 °C. Un totale di 3 cozze per ciascuno sottogruppo è stato processato singolarmente. Tutti i materiali utilizzati per il campionamento e le analisi sono stati rigorosamente puliti con acqua deionizzata ultrafiltrata ottenuta da filtri in cellulosa rigenerata con pori del diametro di 0.2 µm (Whatman filters, Merck, UK). I campioni di cozze venivano lasciati scongelare all'interno di fogli d'alluminio e il guscio rigorosamente sciacquato prima dell'analisi per rimuovere eventuali particelle di LDPE rimaste adese. La lunghezza, la larghezza e il peso (con e senza guscio) di ciascuna cozza è stato misurato prima di processare i campioni. La polpa di ciascuna cozza veniva posta in una beuta (250 ml) e digerita con una soluzione di 10% KOH (40 g/ml) overnight a 60°C (Dehaut et al., 2016). I campioni venivano quindi filtrati attraverso filtri in policarbonato traslucido (PCTE) con pori del

diametro di 10 μ m (Whatman filters, Merck, UK). Un filtro PCTE in bianco è stato preventivamente colorato con del rosso nilo (RN) per valutarne la possibile fluorescenza. Il RN è stato preparato ad una concentrazione di 1 mg/ml in etanolo (Maes et al. 2017) e filtrata utilizzando filtri in cellulosa rigenerata con pori del diametro di 0,2 μ m per escludere ogni possibile fonte di contaminazione ambientale. Ciascun filtro è stato esposto per 30 minuti a 25 ml della soluzione di RN. Le fasi di digestione, filtrazione e colorazione sono state eseguite sotto cappa chimica aspirante. Una fotocamera Canon EOS-760D, equipaggiata con una lente di ingrandimento e un filtro giallo (Foster & Freeman, Worcestershire, UK), è stata montata su di una fresatrice, la quale consentiva dei movimenti automatici lungo gli assi XYZ. Un totale di 30 fotografie che ricoprono l'intera superficie di ciascun filtro veniva scattato sotto una luce a LED blu (420–470nm; Crimelite 2, Foster & Freeman, Worcestershire, UK) e sotto una luce bianca. Il software Autostich

(<https://autostitch.download.it/>) veniva utilizzato per assemblare le foto di ciascun filtro in un'unica immagine ingrandita di modo che di ogni filtro era possibile ottenere una immagine sotto luce blu (immagine blu) ed una sotto luce bianca (immagine bianca). Le potenziali MPs erano individuate valutando la fluorescenza, la forma e l'aspetto delle particelle comparando le immagini ingrandite. Le particelle selezionate erano quindi analizzate allo stereomicroscopio e il tipo di polimero identificato attraverso un Nicolet™ iN10 microFTIR microscope (Thermo Fisher Scientific, USA) utilizzato in modalità riflettanza e controllato dall'interfaccia Thermo Scientific OMNIC™ Picta™. Una particella di polistirene veniva analizzata come controllo prima di ogni analisi. Gli spettri FTIR sono stati misurate nella lunghezza d'onda compresa tra i 400 e i 4000 cm^{-1} con una risoluzione di 8 cm^{-1} e una media di oltre 64 scansioni. Le particelle venivano identificate comparando gli spettri di assorbanza FTIR delle particelle in esame con quelli di polimeri

presenti in una libreria di riferimento composta in parte da spettri ottenuti da particelle ambientali (“sporche” e alterate”) e in parte da particelle di plastica vergine (Hummel Polymer). Un indice di affinità di almeno il 70% è stato considerato accettabile per poter definire MPs le particelle analizzate.

6.2 Validazione del protocollo analitico

Le dimensioni minime delle particelle rilevabili con il metodo impiegato sono state stabilite distribuendo MPs di dimensioni note in filtri puliti. In particolare, sono state aggiunte 20 particelle di LDPE in filtri in PCTE puliti testando singolarmente vari range di dimensioni (da 63 μm a 90 μm ; da 91 μm a 125 μm ; da 126 μm a 180 μm ; da 181 μm a 355 μm e da 356 a 510 μm). L'influenza della soluzione di KOH sulla colorazione con RN delle particelle è stata valutata considerando la fluorescenza delle particelle di LDPE su filtri in PCTE puliti prima e dopo una fase di digestione. Il tasso di recupero e le dimensioni minime delle particelle rilevabili in

campioni di cozze è stata valutata contaminando sperimentalmente dei CaB-CA con 20 particelle di LDPE singolarmente per ciascun range di dimensione (da 91 μ m a 125 μ m; da 126 μ m a 180 μ m; da 181 μ m a 355 μ m e da 356 a 510 μ m), processandoli secondo la stessa metodica analitica descritta sopra. Nove esemplari sono stati scelti casualmente tra i campioni precedentemente analizzati contaminando ciascun soggetto con le particelle di LDPE. Per minimizzare le variazioni derivanti dall'utilizzo di esemplari differenti, ciascun campione era costituito da due cozze omogenizzate e divise in due sub campioni di ugual peso: uno veniva contaminato e l'altro rappresentava il campione controllo. Tutti i frammenti individuati nelle immagini ingrandite dei filtri che per dimensioni, fluorescenza e forma potevano essere considerate delle MPs, venivano analizzate allo stereomicroscopio e sottoposte a spettroscopia FTIR. Le particelle di LDPE venivano quindi

enumerare per calcolare il tasso di recupero e la riproducibilità del metodo.

7. Risultati

I filtri in PCTE sono stati scelti per questo studio dal momento che non mostravano una fluorescenza di fondo se colorati con il RN (Figura 12), diversamente da altri materiali come già mostrato in uno studio condotto da Prata et al. (2019b).

La dimensione dei pori di 10 μm permetteva una rapida ed efficiente filtrazione dei campioni. Osservando le immagini blu dei CaE, materiale organico residuale non digerito di differente forma, colore e fluorescenza interferisce a vari livelli con l'identificazione delle particelle di LDPE utilizzate per l'esposizione sperimentale. Un numero considerevole di frammenti aggregati l'un con l'altro caratterizzati da un intenso colore giallo/verde fluorescente erano evidenti dalle immagini blu dei filtri dei campioni CaE-CN (Figura 13).

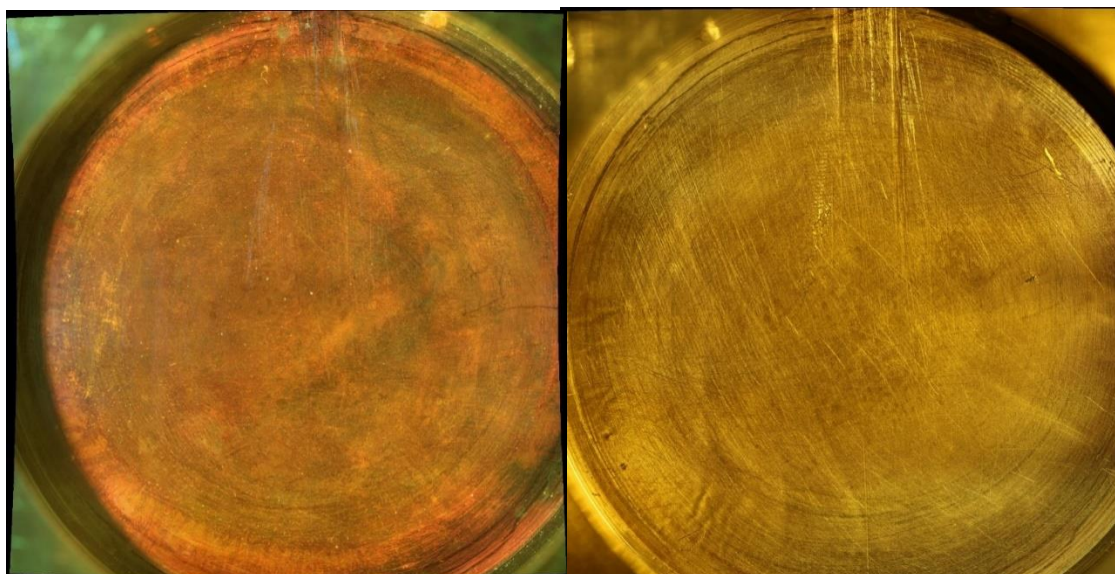


Figura 12: Immagine blu e bianca di un filtro in PCTE pulito

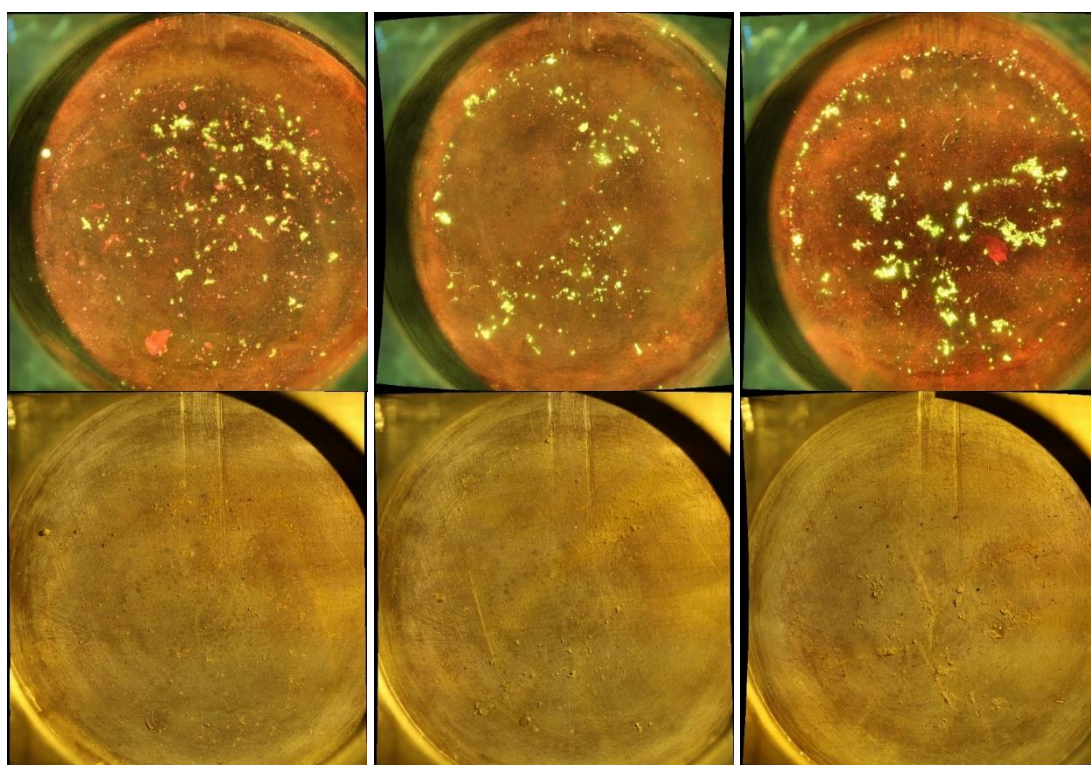


Figura 13: Immagini blu e bianche dei 3 CaE-CN

Osservando i filtri allo stereomicroscopio, questi aggregati erano costituiti da un insieme di potenziali particelle di LDPE e materiale organico residuale. Considerato l'elevato numero di particelle riscontrate, non è stato possibile effettuare un'analisi spettroscopica su tutti i frammenti, pertanto 20 particelle rappresentative sono state selezionate individualmente da ciascuno dei tre filtri dei CaE-CN e identificate come particelle di LDPE allo spettroscopio FTIR. Un quantitativo inferiore di particelle è stato osservato nei CaE-CA (Figura 14).

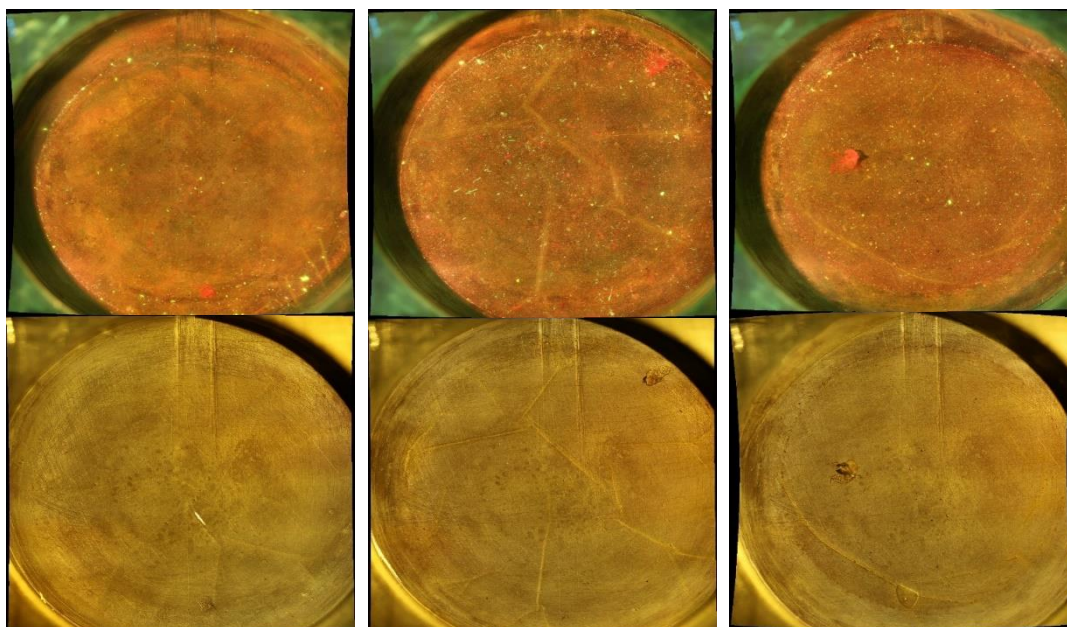


Figura 14: Immagini blu e bianche dei 3 CaE-CA

Tutti i 26 frammenti complessivamente individuati dai tre CaE-CA sono stati identificati dallo spettroscopio FTIR come LDPE. In tutti gli altri campioni, è stato identificato un frammento di colore rosso in PET, caratterizzato da una intensa fluorescenza rossa facilmente distinguibile dalla corrispettiva immagine blu del filtro in un CaB-CN (Figura 15).

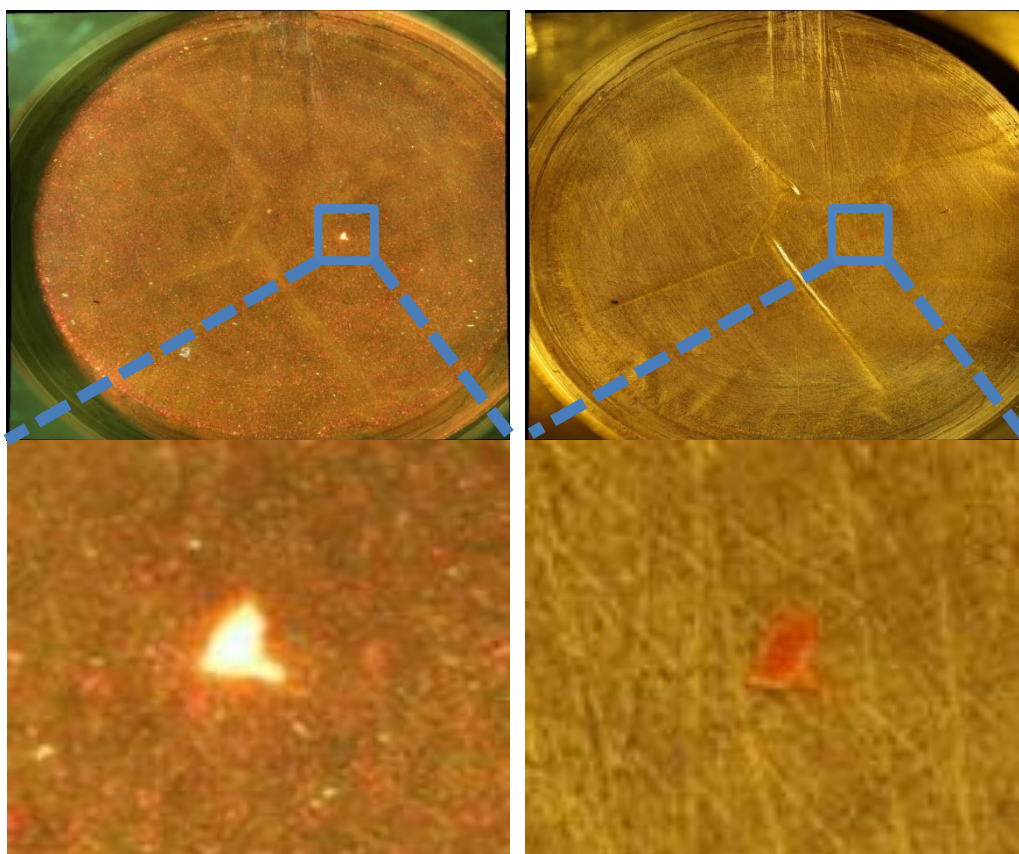


Figura 15: Frammento in PET identificato in un CaB-CN

Nonostante numerose fibre fluorescenti fossero visibili dalle immagini blu dei vari campioni esaminati, il limite di rilevabilità dello spettroscopio FTIR ha consentito l'identificazione di solo 2 fibre in PP in differenti CaB-CN (Figure 16-17).

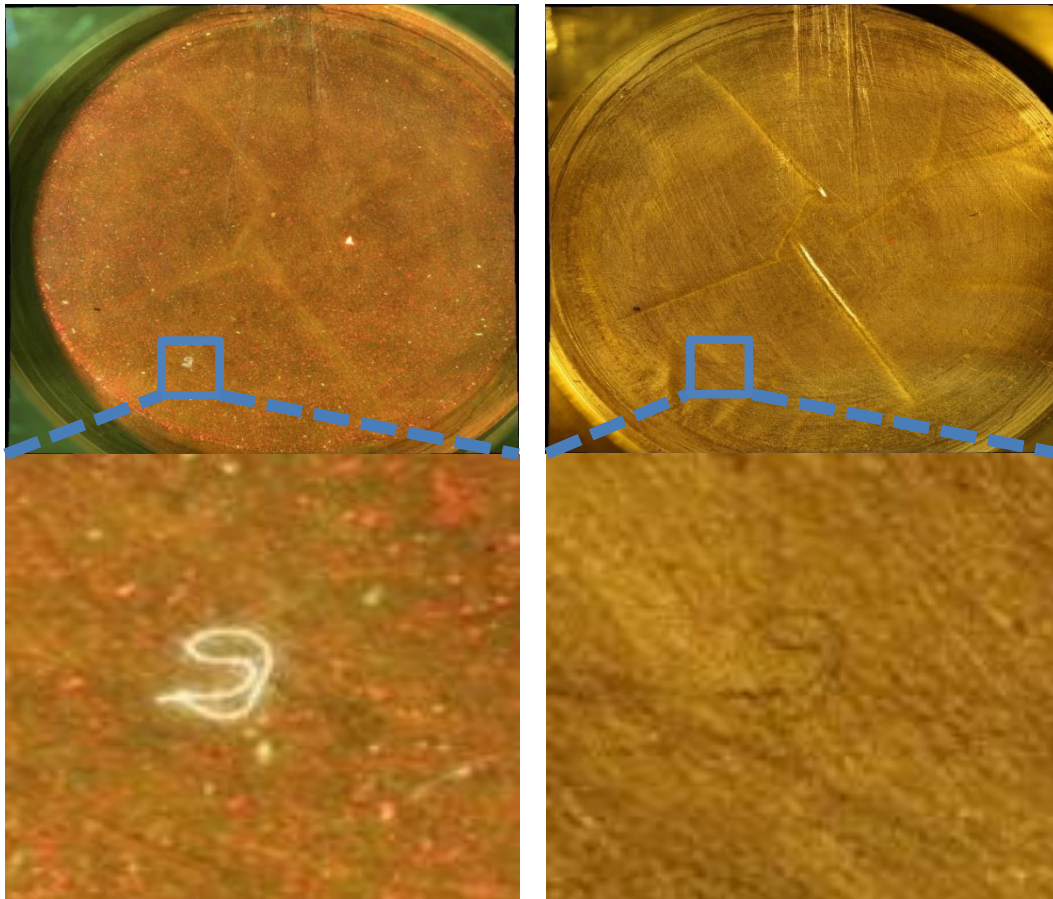


Figura 16: Fibra in PP identificato in un CaB-CN

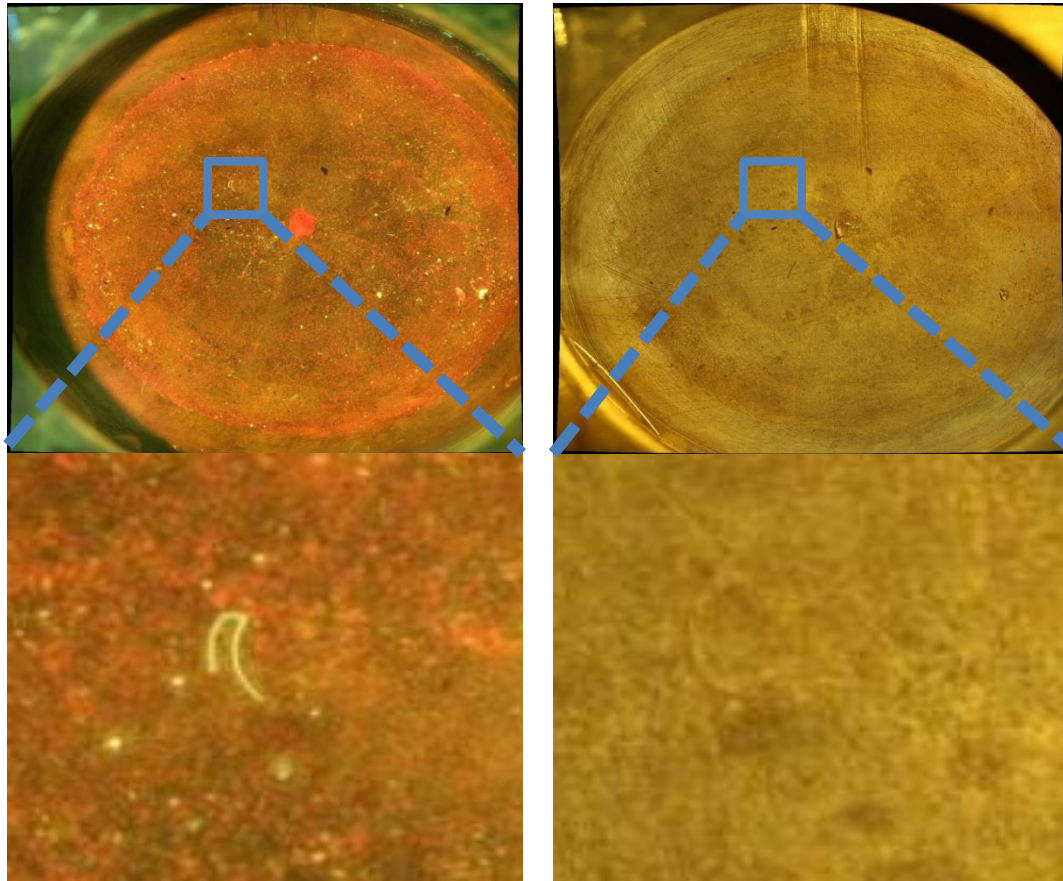


Figura 17: Fibra in PP identificato in un CaB-CN

I risultati ottenuti per i CaC permettevano di escludere ogni possibile contaminazione in corso d'analisi dal momento che nessuna MPs apparente era visibile dalle immagini dei campioni analizzati (Figure 18-19).

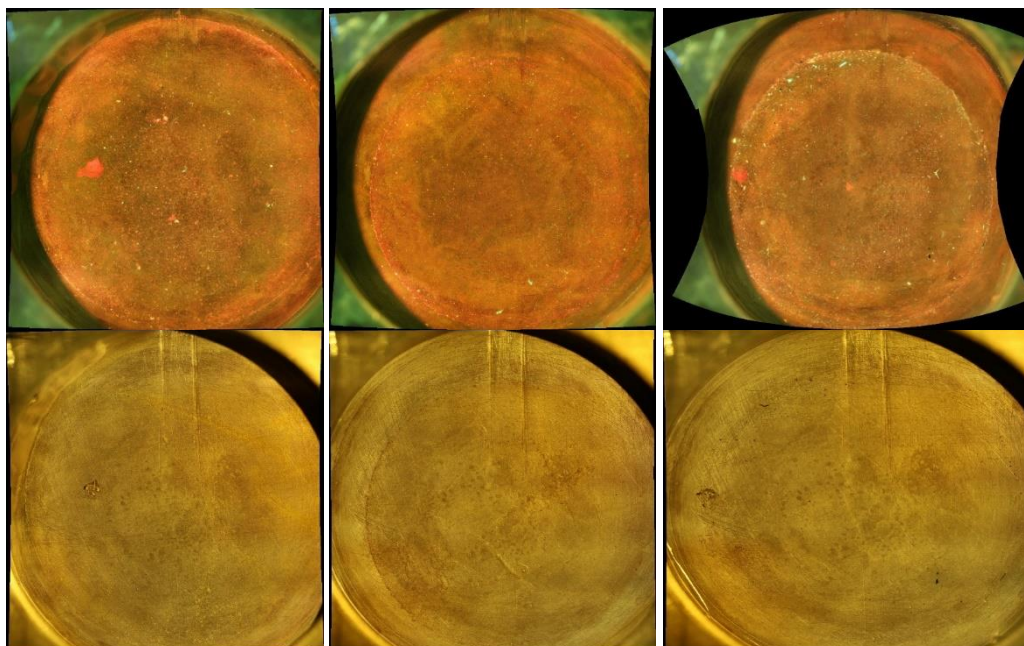


Figura 18: Immagini blu e bianche dei CaC-CN

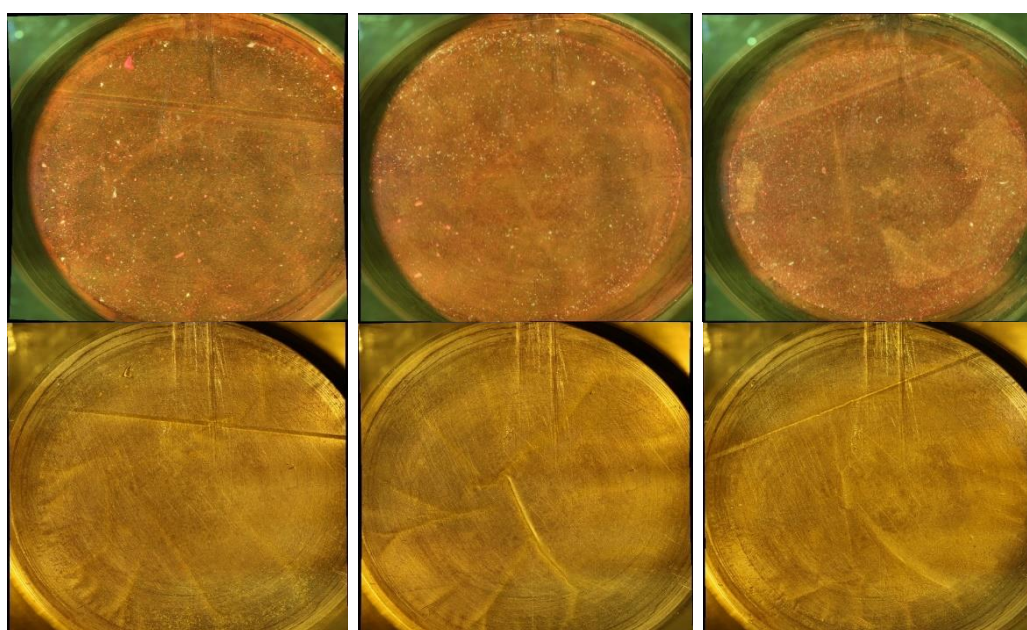


Figura 19: Immagini blu e bianche dei CaC-CA

Empiricamente, la forma e la dimensione influiscono sulla capacità di riconoscere e distinguere particelle fluorescenti dalle immagini blu dei filtri. I residui organici sono caratterizzati da un profilo “morbido” e “sfumato” diversamente da quello definito e solido delle particelle plastiche. Una forte e intensa fluorescenza caratterizzava i frammenti plastici rispetto ad una fluorescenza più lieve ed opaca dei residui organici, talvolta, del tutto assente. Inoltre, possiamo affermare che al diminuire delle dimensioni delle particelle, diminuiva anche la capacità di distinguere i frammenti plastici più piccoli dalle immagini dei filtri.

6.1 Validazione del protocollo analitico

Nei filtri in PCTE puliti, piccolissime particelle fluorescenti erano visibili sullo sfondo (Figura 12). Con l'utilizzo esclusivo del RN, a causa delle dimensioni e dell'aspetto, quest'ultimi particelle potevano interferire con l'identificazione dei frammenti in LDPE più piccoli (63-90 μ m) aggiunti ai filtri di PCTE puliti (Figura 20).

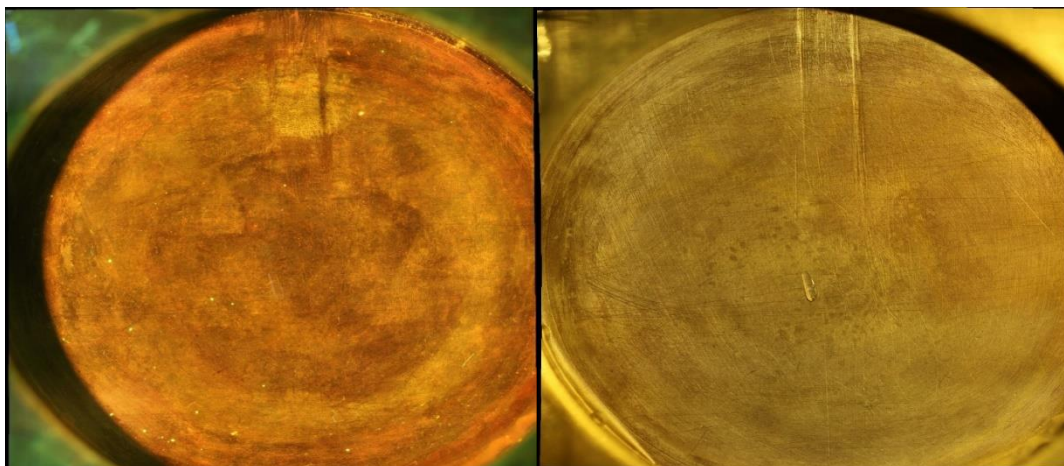


Figura 20: Immagini blu e bianche di un filtro in PCTE contaminato con 20 LDPE di dimensioni 63-90 μm

Osservando le immagini blu, le dimensioni minime della particella che ne consentivano una distinzione dallo sfondo dei filtri erano comprese tra 126 μm e 180 μm (Figura 21).

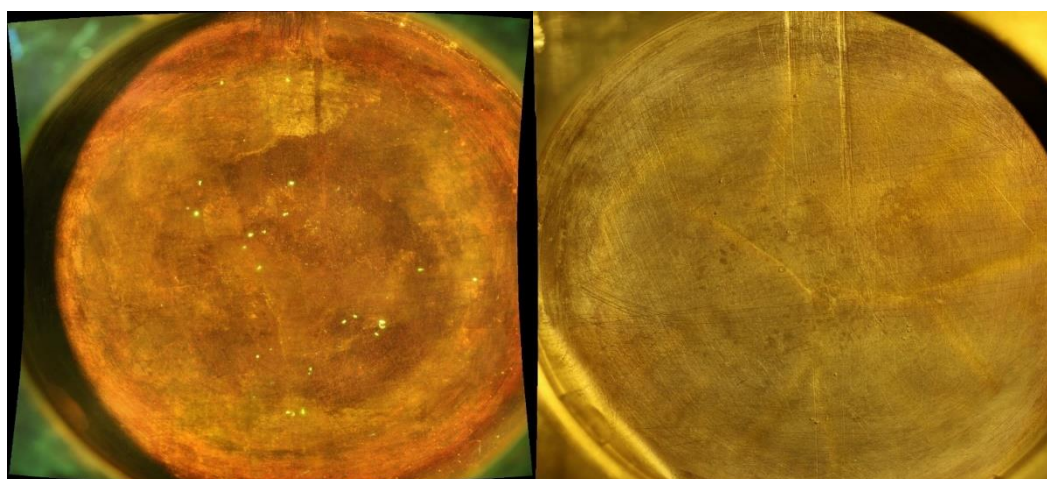


Figura 21: Immagini blu e bianche di un filtro in PCTE contaminato con 20 LDPE di dimensioni 126-180 μm

La fluorescenza delle particelle in LDPE di dimensioni differenti aggiunte sperimentalmente a campioni di cozze è stata valutata comparando le immagini tra la metà contaminata e quella non dei CaB-CA. Le dimensioni delle particelle di LDPE comprese tra 180-355 μm sono la taglia minima al di sotto della quale risultava laborioso distinguerle dal materiale organico residuo non digerito (Figura 22).

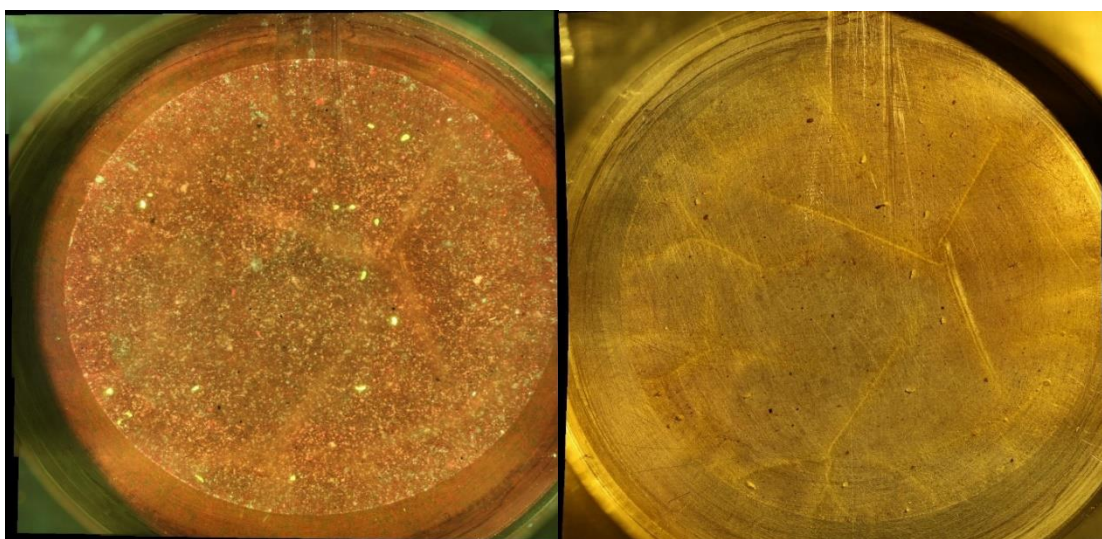


Figura 22: Immagini blu e bianche di un CaB-CA contaminato con 20 LDPE di dimensioni 180-355 μm

Tuttavia, dalle immagini blu dei campioni testati, un'intensa fluorescenza di colore giallo delle particelle di LDPE era distinguibile dallo sfondo dei filtri per tutte le dimensioni testate. Dai 9 campioni di cozze analizzati, un totale di 169 potenziale particelle in LDPE sono state sottoposte ad analisi spettroscopica per confermarne la composizione chimica. La spettroscopia FTIR ha confermato che 165 su 169 erano in LDPE, con un tasso di recupero compreso tra l'80% e il 100%/cozza. La fluorescenza delle particelle di LDPE non era apprezzabilmente influenzata dal trattamento di digestione dei tessuti con la soluzione al 10% (w/v) di KOH. Le particelle mancanti erano spesso rimaste adese alla superficie delle beute utilizzate per la filtrazione sottolineando ancora una volta la necessità di analisi attente e precise. Anche in questo caso, le particelle tendevano a aderire tra loro rendendone complicata l'enumerazione, sia dalle immagini dei filtri che allo stereomicroscopio. Per quanto performante possa essere, la digestione dei campioni era

sempre associata a dei residui organici che interferivano a vario titolo con l'individuazione delle particelle plastiche. Comparando le immagini della metà controllo con quella sperimentalmente contaminata risulta chiaro l'importanza di una digestione efficace dei campioni (Figura 23).

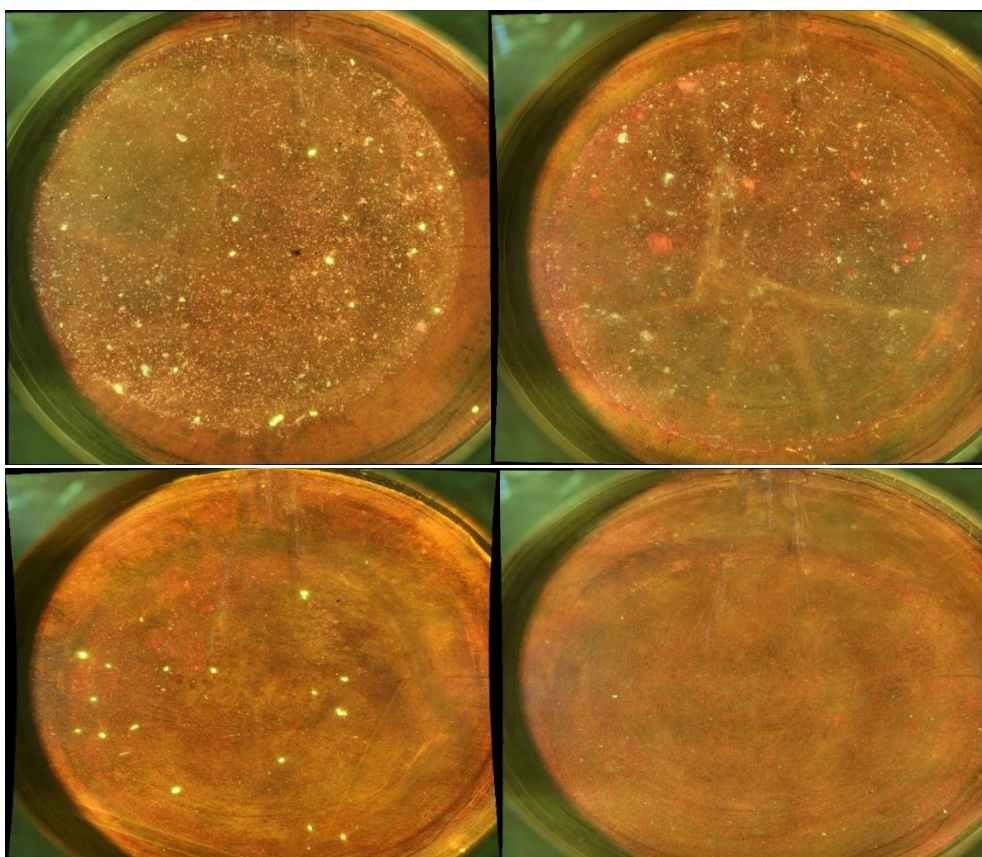


Figura 23: Comparazione della digestione dalle immagini blu di due CaB-CA contaminati con 20 LDPE di dimensioni 180-355 μm . Da sx a dx, le rispettive metà contaminate e metà controllo.

Il materiale organico residuo colorato con RN appariva come frammenti di varia forma e dimensione, talvolta come puntini neri o colorati di varie sfumature di rosso e verde, più o meno fluorescenti. Tuttavia, per tutti i campioni testati, le immagini blu e bianche dei filtri sono stati degli eccellenti supporti per l'individuazione allo stereomicroscopio delle particelle di LDPE da sottoporre alla fase successiva di identificazione chimica.

7. Considerazioni

Non è stato possibile quantificare con assoluta certezza il numero di particelle in LDPE presenti in ogni CaE attraverso l'utilizzo esclusivo della colorazione con RN. La fluorescenza delle particelle non sembra essere sufficiente per l'identificazione delle particelle plastiche, almeno al di sotto di certe dimensioni. Tuttavia, la tecnica di colorazione con RN risulta un ottimo supporto nell'individuazione e nella selezione allo stereomicroscopio delle particelle da sottoporre alle successive analisi di identificazione chimica. La principale limitazione dell'utilizzo del RN per la ricerca di MPs nel biota è la persistenza di un eccessivo quantitativo di materiale organico residuo. I frammenti in LDPE erano facilmente individuali dalle immagini blu dei filtri solo se la digestione determinava una fine ed uniforme degradazione dei tessuti dei mitili. A tal proposito, i risultati ottenuti mostrano una elevata variabilità. L'utilizzo del KOH è stato proposto come uno dei migliori compromessi per

una digestione efficace del materiale organico insieme a nessun effetto degradativo nei confronti dei polimeri plastici più comuni (HDPE, LDPE, PA-12, PA-6, PC, PET, PMMA, PP, PS, PSXL, PTFE, PUR e uPVC) eccetto per l'acetato di cellulosa (Dehaut et al. 2016; Stock et al., 2019; Thiele et al., 2019). In taluni studi sulla valutazione dell'efficacia del RN, la possibile presenza di materiale organico in campioni d'acqua e sedimenti è stata esclusa da una fase di digestione dei campioni e da una fase di separazione per flottazione delle MPs (Erni-cassola et al., 2017, Prata et al., 2019b). Anche se la digestione con KOH permetteva una filtrazione agevole dei campioni attraverso filtri con pori da 10 μm , talvolta i residui organici non completamente digeriti interferivano con l'identificazione dalle immagini blu delle MPs colorate con RN, determinando possibili sovrastime. Da un'attenta analisi delle immagini blu dei campioni, l'identificazione delle particelle colorate con RN sembra essere correlata alle dimensioni delle particelle. Un buon tasso di

recupero è stato ottenuto testando particelle di dimensioni >180µm, quando le caratteristiche fisiche dei frammenti fluorescenti erano più ovvie (ovvero quando dalle dimensioni e della forma, era ovvio che fossero particelle plastiche). Sulla base della fluorescenza di questi frammenti, le particelle in LDPE erano simili solo a certi residui organici e diversi da altri che non emettevano fluorescenza o erano di diverso colore. Il RN è un colorante lipofilo, metacromico e solvatocromico caratterizzato da uno spettro di emissione strettamente dipendente dalla polarità del mezzo (Ghoneim, 2000). La forte influenza dell'ambiente sul RN è stata sfruttata per valutare la composizione lipidica delle cellule dei mammiferi, nei lieviti, nelle muffe, nelle microalghe e per valutare la composizione delle membrane cellulari (Greenspan et al., 1985; Ira & Krishnamoorthy, 2001; Kimura et al., 2004; Rumin et al., 2015). Quando le molecole che compongono un materiale sono eccitate da onde elettromagnetiche ad una certa lunghezza d'onda, passano da

un livello energetico fondamentale ad uno eccitato. Perdendo energia, le molecole decadono e tornano al loro stato originale, rilasciando altre onde elettromagnetiche a certe lunghezze d'onda, emettendo fluorescenza. Pertanto, a differenti lunghezze d'onda di eccitazione corrispondono certe lunghezze d'onda di emissione che dipendono dalle proprietà ottiche delle molecole e dalle interazioni delle stesse con l'ambiente circostante (Albrecht C., 2008). Eccitato con specifiche lunghezze d'onda, il RN agisce come un fluorocromo rendendo fluorescente e quindi visibili talune particelle che altrimenti non lo sarebbero. Diaz et al. (2008) ha stabilito per il RN, quale fossero le lunghezze d'onda più adatte per il riconoscimento dei diversi lipidi sulla base della loro polarità. Lunghezze d'onda di eccitazione corte (da 450 a 500 nm) sono utili per l'identificazione degli ambienti altamente idrofobi caratterizzati da una fluorescenza emessa tendente sempre più al giallo/oro (≤ 580 nm) mentre lunghezze d'onda di eccitazione più lunghe

(da 515 a 560 nm) favoriscono la fluorescenza di ambienti polari caratterizzati da una fluorescenza di emissione tendente sempre più al rosso (≥ 590 nm). In uno studio condotto da Prata et al. (2019b), sono state stabilite le lunghezze d'onda più performanti per il riconoscimento dei più comuni polimeri plastici, vergini e "usurati", colorati con una soluzione di RN in etanolo (0.01 mg ml⁻¹). A 470 nm, quasi tutti i polimeri testati mostravano una forte fluorescenza, tuttavia, allo stesso tempo, questa lunghezza d'onda determinava la fluorescenza anche di campioni di materiale organico, principalmente legno, piume, carapace di gamberi (chitina), tessuto muscolare di gambero e pesce. Effettivamente, anche nel nostro studio il materiale organico residuo non completamente digerito emetteva un certo grado di fluorescenza se colorato con RN ed eccitate con lunghezze d'onda simili. Entro certi limiti, la natura solvatocromica del RN potrebbe essere sfruttata per discriminare le MPs dal materiale organico. Allo stesso modo, Maes et al. (2017) ha proposto di

utilizzarne questa proprietà per riconoscere i differenti tipi di polimeri plastici. Ad oggi, sulla base dei risultati ottenuti, sembra improbabile determinare con assoluta certezza la presenza di particelle plastiche con l'uso esclusivo del RN senza considerare altre caratteristiche fisiche. Tuttavia, diversi aspetti che potrebbero influenzare le lunghezze d'onda di emissione di particelle colorate con RN dovrebbe essere ulteriormente investigati. Oltre alle caratteristiche chimiche strutturali, andrebbe valutato quanto il colore dei frammenti possa influenzare la loro fluorescenza. Inoltre, altre metodiche di digestione andrebbero testate per valutare l'efficacia in termini di residui organici residuali ed efficacia di colorazione con RN. L'impiego di soluzione saline potrebbe essere utili per separare le MPs per flottazione dai residui organici sulla base della loro densità. Questo approccio è già stato ampiamente utilizzato soprattutto per campioni d'acqua e sedimenti (Quinn et al., 2017; Prata et al., 2019b). La separazione per densità andrebbe

investiga per gli studi condotti per la ricerca di MPs nel biota colorato con il RN, in quanto potrebbe ridurre sostanzialmente il quantitativo di materiale organico residuale durante l'analisi dei campioni.

La standardizzazione di una metodica analitica performante che includa la colorazione con RN nelle analisi di routine per la ricerca di MPs nel biota richiede ancora degli sforzi. La presenza di piccolissimi frammenti fluorescenti visibili dalle immagini blu dei filtri in PCTE puliti potrebbero derivare dall'ambiente di lavorazione sottolineando la necessità di processare i campioni in ambienti di lavoro estremamente puliti e di includere sempre dei controlli intermedi, sia positivi che negativi, in questo tipo di analisi. La presenza di residui organici di diverso colore e fluorescenza fa nascere una serie di perplessità sull'attuale possibilità di utilizzare il RN sul biota così come già fatto per campioni d'acqua e sedimenti. Nella prospettiva di un uso combinato con una osservazione allo stereomicroscopio dei

filtri, il metodo implementato ha sicuramente delle implicazioni favorevoli. Inoltre, altre tecniche di digestione in combinazione con una separazione delle MPs per densità da altri materiali, andrebbero investigate per migliorare l'impiego del RN per la ricerca di MPs nel biota.

8. Conclusioni e prospettive future

Ad oggi, la presenza di microplastiche negli alimenti destinati al consumo umano rappresenta ancora un rischio da non sottovalutare per la sicurezza alimentare e la salute umana. Ulteriori sforzi sono richiesti alla comunità scientifica considerato che sono scarse le informazioni sull'incidenza di microplastiche negli alimenti, i livelli di esposizione sono per la maggior parte sconosciuti e gli effetti potenziali sulla salute dei consumatori ancora poco compresi. Attualmente, le ricerche di settore hanno dimostrato una esposizione alle microplastiche potenzialmente costante dell'uomo, principalmente attraverso gli alimenti e l'aria. Considerata l'elevata persistenza delle microplastiche nell'ambiente, la loro concentrazione è destinata ad aumentare in futuro e risulterà sempre più importante attuare dei piani di monitoraggio sulla loro presenza in vari campioni biologici. La ricerca dovrebbe concentrarsi sulla valutazione dei rischi chimico-tossicologici e microbiologici

associati, implementando i dati di evidenze dirette sull'uomo. Comprendere il destino delle microplastiche nei tessuti umani è un fattore fondamentale per definirne il reale pericolo (Barboza et al., 2018). Il tutto non può prescindere dalla standardizzazione di tecniche analitiche accurate e condivise, senza le quali la comparazione dei dati a disposizione risulta complicata e di difficile interpretazione. Relativamente alle metodiche di digestione saggate, possiamo concludere che sia il H_2O_2 che KOH sono stati efficaci nella digestione dei campioni senza particolari effetti degradativi sulle microplastiche testate, inoltre l'approvvigionamento di entrambi i composti presentano costi contenuti. L' H_2O_2 è una sostanza sicura che non richiede particolari accorgimenti d'impiego. Tuttavia, i tempi di digestione particolarmente lunghi, un effetto schiumogeno e uno "sbiancante" ne condizionano l'utilizzo nelle analisi di routine. Il KOH invece permetteva una digestione dei campioni in tempi brevi anche se strettamente correlati alle temperature

di incubazione che devono essere relativamente elevate (60 °C) ponendo dei dubbi sulla possibile degradazione di frammenti plastici.

Sarebbe inoltre necessario attenzionare contestualmente quei frammenti plastici di dimensioni ancora più piccole del micrometro, le cosiddette nanoplastiche, di cui poco si sa delle dinamiche di distribuzione ambientale e praticamente nulla sulla loro presenza negli alimenti. Per quest'ultima categorie di particelle, dovrebbero essere fortemente migliorate ed approfondite le tecniche di estrazione e identificazione considerato che il numero di queste particelle è certamente maggiore rispetto a quello delle microplastiche, così come i pericoli potenziali associati (Ranieri & Barranco, 2019).

La questione delle microplastiche è un argomento parecchio sentito dal punto di vista sociale e ha avuto una forte risonanza a livello internazionale. Siamo ancora agli albori delle ricerche in materia e sebbene qualche passo in avanti sia stato fatto, sono

ancora tanti gli interrogativi a cui dar risposta per comprendere il reale pericolo della presenza di particelle plastiche micro e nanoscopiche disperse nell'ambiente.

Bibliografia

- Alomar, C., Estarellas, F., & Deudero, S. (2016). Microplastics in the Mediterranean Sea: deposition in coastal shallow sediments, spatial variation, and preferential grain size. *Marine Environmental Research* 115, 1–10.
- Abbasi, S., Soltani, N., Keshavarzi, B., Moore, F., Turner, A., & Hassanaghahi, M. (2018). Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. *Chemosphere*, 205, 80-87.
- Abidli, S., Lahbib, Y., & El Menif, N. T. (2019). Microplastics in commercial molluscs from the lagoon of Bizerte (Northern Tunisia). *Marine Pollution Bulletin*, 142, 243-252.
- Albrecht, C. (2008). Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 390(5), 1223-1224.
- Akhbarizadeh, R., Moore, F., & Keshavarzi, B. (2019). Investigating microplastics bioaccumulation and biomagnification in seafood from the Persian Gulf: a threat to human health?. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(11), 1696-1708.
- Aljaibachi, R., & Callaghan, A. (2018). Impact of polystyrene microplastics on *Daphnia magna* mortality and reproduction in relation to food availability. *PeerJ*, 6, e4601.
- Andrady, A. L. (Ed.). (2003). *Plastics and the Environment*. John Wiley & Sons.

- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 62 (8), 1596-1605.
- Andrady, A. L. (2015). Persistence of plastic litter in the oceans. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 57-72). Springer, Cham.
- Andrady, A.L. (2017). The plastic in microplastics: a review. *Marine Pollution Bulletin* 119 (1), 12–22.
- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international*, 102, 165-176.
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: first observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 111, 18-26.
- Avio, C. G., Pittura, L., d'Errico, G., Abel, S., Amorello, S., Marino, G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2020). Distribution and characterization of microplastic particles and textile microfibers in Adriatic food webs: General insights for biomonitoring strategies. *Environmental Pollution*, 258, 113766.
- Baalkhuyur, F. M., Dohaish, E. J. A. B., Elhalwagy, M. E., Alikunhi, N. M., AlSuwailem, A. M., Røstad, A., Coker, D.J., Berumen, M. L., & Duarte, C. M. (2018). Microplastic in the gastrointestinal tract of fishes along the Saudi Arabian Red Sea coast. *Marine Pollution Bulletin*, 131, 407-415.

- Barboza, L. G. A., Vethaak, A. D., Lavorante, B. R., Lundebye, A. K., & Guilhermino, L. (2018a). Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine pollution bulletin*, 133, 336-348.
- Barboza, L. G. A., Vieira, L. R., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., & Guilhermino, L. (2018b). Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Toxicology*, 195, 49-57.
- Barboza, L.G.A., Vieira, L.R., Guilhermino, L., (2018c). Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*): changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time. *Environ. Pollut.* 236, 1014–1019.
- Barletta, M., Lima, A. R., & Costa, M. F. (2019). Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. *Science of the Total Environment*, 651, 1199-1218.
- Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C. & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 364, 1985–1998.
- Beckingham, B., & Ghosh, U. (2017). Differential bioavailability of polychlorinated biphenyls associated with environmental particles: microplastic in comparison to wood, coal and biochar. *Environmental Pollution*, 220, 150-158.

- Bellas, J., Martínez-Armental, J., Martínez-Cámara, A., Besada, V., & Martínez-Gómez, C. (2016). Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. *Marine pollution bulletin*, 109(1), 55-60.
- Bessa, F., Barría, P., Neto, J. M., Frias, J. P., Otero, V., Sobral, P., & Marques, J. C. (2018). Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Marine pollution bulletin*, 128, 575-584.
- Birnstiel, S., Soares-Gomes, A., & da Gama, B. A. (2019). Depuration reduces microplastic content in wild and farmed mussels. *Marine pollution bulletin*, 140, 241-247.
- Boucher, J., & Friot, D. (2017). Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources (pp. 2017-002). Gland, Switzerland: IUCN.
- Browne, M., Dissanayake, A., Galloway, T., Lowe, D., & Thompson, R. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5026–5031.
- Browne, M.A., Galloway, T.S., & Thompson, R. C. (2007). Microplastic e an emerging contaminant of potential concern? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 559e561.
- Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology*, 23(23), 2388-2392.
- Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., & Canning-Clode, J. (2016). Microplastics as vector for heavy metal

contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 189-195.

- Buchanan, J. B. (1971). Pollution by synthetic fibres. *Marine Pollution Bulletin*, 2, 23. Cook, P. M., & Olson, G. F. (1979). Ingested mineral fibers: Elimination in human urine. *Science*, 204(4389).
- Carbery, M., O'Connor, W., & Palanisami, T. (2018). Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environment international*, 115, 400-409.
- Carr, S.A., Liu, J., & Tesoro, A.G., (2016). Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Research*, 174–182.
- Castañeda, R.A., Avlijas, S., Simard, M.A., & Ricciardi, A. (2014). Microplastic pollution in St. Lawrence River sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70:1767–1771.
- Catarino, A.I., Macchia, V., Sanderson, W.G., Thompson, R.C., & Henry, T.B. (2018). Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibers fallout during a meal. *Environ. Pollut.* 237, 675–684.
- Cau, A., Avio, C. G., Dessì, C., Follesa, M. C., Moccia, D., Regoli, F., & Pusceddu, A. (2019). Microplastics in the crustaceans *Nephrops norvegicus* and *Aristeus antennatus*: Flagship species for deep-sea environments?. *Environmental Pollution*, 255, 113107.
- Chagnon, C., Thiel, M., Antunes, J., Ferreira, J. L., Sobral, P., & Ory, N. C. (2018). Plastic ingestion and trophic transfer

between Easter Island flying fish (*Cheilopogon rapanouiensis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from Rapa Nui (Easter Island). *Environmental Pollution*, 243, 127-133.

- Chae, Y., & An, Y. J. (2018). Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review. *Environmental Pollution*, 240, 387–395.
- Charles-de-Sá, L., Gontijo-de-Amorim, N. F., Takiya, C. M., Borojevic, R., Benati, D., Bernardi, P., ... & Rigotti, G. (2015). Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*, 135(4), 999-1009.
- Cheung, L. T., Lui, C. Y., & Fok, L. (2018). Microplastic contamination of wild and captive flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). *International journal of environmental research and public health*, 15(4), 597.
- Cho, Y., Shim, W. J., Jang, M., Han, G. M., & Hong, S. H. (2019). Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea. *Environmental Pollution*, 245, 1107-1116.
- Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., & Janssen, C. R. (2011). Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Marine pollution bulletin*, 62(10), 2199-2204.
- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2013). New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine pollution bulletin*, 70(1-2), 227-233.

- Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., & Galloway, T.S. (2016). Microplastics alter the properties and sinking rates of zooplankton faecal pellets. *Environ. Sci. Technol.* 50:3239–3246.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moge, R.J., & Galloway, T.S. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* 47:6646–6655.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T.S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597.
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific reports*, 4, 4528.
- Collard, F., Gilbert, B., Compère, P., Eppe, G., Das, K., Jauniaux, T., & Parmentier, E. (2017). Microplastics in livers of European anchovies (*Engraulis encrasicolus*, L.). *Environmental pollution*, 229, 1000-1005.
- Colton, J. B., Knapp, F. D., & Burns, B. R. (1974). Plastic particles in surface waters of the northwestern Atlantic. *Science*, 185(4150), 491-497.
- Commissione Europea (2017). Commission Decision 2017/848 of 17 May 2017 laying down criteria and methodological standards on good environmental status of marine waters and specifications and standardised methods for monitoring and assessment and repealing Decision 2010/477/EU. *Official Journal of the European Union*, L125, 43–74.

- Courtene-Jones, W., Quinn, B., Murphy, F., Gary, S. F., & Narayanaswamy, B. E. (2017). Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Analytical Methods*, 9(9), 1437-1445.
- Cox, K.D., Covernton, G.A., Davies, H.L., Dower, J.F., Juanes, F., & Dudas, S.E. (2019). Human consumption of microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 53 (12), 7068–7074.
- Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J. I., Ubeda, B., Gálvez, J. Á., ... & Duarte, C. M. (2015). Plastic accumulation in the Mediterranean Sea. *PLoS One*, 10(4), e0121762.
- Davidson, K., & Dudas, S. E. (2016). Microplastic ingestion by wild and cultured Manila clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(2), 147-156.
- Davison, P., & Asch, R. G. (2011). Plastic ingestion by mesopelagic fishes in the North Pacific Subtropical Gyre. *Marine Ecology Progress Series*, 432, 173-180.
- de Lucia, G. A., Caliani, I., Marra, S., Camedda, A., Coppa, S., Alcaro, L., Campani, T., Giannetti, M., Coppola, D., Cicero, A. M., Panti, C., Baini, M., Guerranti, C., Marsili, L., Massaro, G., Fossi, M. C., & Mattidi, M. (2014). Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea). *Marine Environmental Research*, 100, 10-16.
- De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., & Robbens, J. (2014). Quality

assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine pollution bulletin*, 85(1), 146-155.

- Dehaut, A., Cassone, A. L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G. & Paul-Pont, I. (2016). Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, 215, 223-233.
- Deng, H., Wei, R., Luo, W., Hu, L., Li, B., & Shi, H. (2020). Microplastic pollution in water and sediment in a textile industrial area. *Environmental Pollution*, 258, 113658.
- Desforges, J.W., Galbraith, M., & Ross, P.S. (2015). Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69:320–330.
- Devriese, L. I.; van der Meulen, M. D.; Maes, T.; Bekaert, K.; Paul-Pont, I.; Frère, L.; Robbens, J.; & Vethaak, A. D. (2015). Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. *Mar. Pollut. Bull.* 98 (1), 179–187.
- Di Mauro, R., Kupchik, M. J., & Benfield, M. C. (2017). Abundant plankton-sized microplastic particles in shelf waters of the northern Gulf of Mexico. *Environmental Pollution*, 230, 798-809.
- Diaz, G., Melis, M., Batetta, B., Angius, F., & Falchi, A. M. (2008). Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron*, 39(7), 819-824.

- Digka, N., Tsangaris, C., Torre, M., Anastasopoulou, A., & Zeri, C. (2018). Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine pollution bulletin*, 135, 30-40.
- Dowarah, K., Patchaiyappan, A., Thirunavukkarasu, C., Jayakumar, S., & Devipriya, S. P. (2020). Quantification of microplastics using Nile Red in two bivalve species *Perna viridis* and *Meretrix meretrix* from three estuaries in Pondicherry, India and microplastic uptake by local communities through bivalve diet. *Marine Pollution Bulletin*, 153, 110982.
- Eagles-Smith, C. A., Silbergeld, E. K., Basu, N., Bustamante, P., Diaz-Barriga, F., Hopkins, W. A., Kidd, K. A., & Nyland, J. F. (2018). Modulators of mercury risk to wildlife and humans in the context of rapid global change. *Ambio*, 47(2), 170-197.
- Edo, C., González-Pleiter, M., Leganés, F., Fernández-Piñas, F., & Rosal, R. (2020). Fate of microplastics in wastewater treatment plants and their environmental dispersion with effluent and sludge. *Environmental Pollution*, 259, 113837.
- EFSA (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. In: E. F. S. Authority (Ed.), Question No. EFSA-Q-2007-136 (Adopted on 9 June 2008 ed., pp. 1–114). Brussels, Belgium.
- EFSA (2012). Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed. *EFSA Journal*, 10(7), 2832.
- EFSA (2016). Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *Efsa Journal*, 14(6), e04501.

- Elizalde-Velázquez, A., Carcano, A. M., Crago, J., Green, M. J., Shah, S. A., & Cañas-Carrell, J. E. (2020). Translocation, trophic transfer, accumulation, and depuration of polystyrene microplastics in *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environmental Pollution*, 113937.
- Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., & Amato, S. (2013a). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 177-182.
- Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., Cummins, A., Lattin, G., Wilson, S., Hafner, J., Zellers, A., & Rifman, S. (2013b). Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. *Marine pollution bulletin*, 68(1-2), 71-76.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. G., & Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PloS one*, 9(12), e111913.
- Erni-Cassola, G., Gibson, M. I., Thompson, R. C., & Christie-Oleza, J. A. (2017). Lost, but found with Nile red: a novel method for detecting and quantifying small microplastics (1 mm to 20 µm) in environmental samples. *Environmental science & technology*, 51(23), 13641-13648.
- EU (European Union). DIRETTIVA 2008/56/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 17 giugno 2008 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo

della politica per l'ambiente marino (direttiva quadro sulla strategia per l'ambiente marino)

- EU (European Union). REGOLAMENTO (CE) N. 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
- EUMOFA (2017). The EU fish Market, Edition 2017. Highlights the EU in the World EU market supply consumption trade EU landings aquaculture production. Disponibile all'indirizzo: <http://www.eumofa.eu/documents/20178/108446/The+EU+fish+market+2017.pdf>
- Farrell, P., & Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, 177, 1–3.
- Faure, F., Saini, C., Potter, G., Galgani, F., De Alencastro, L. F., & Hagmann, P. (2015). An evaluation of surface micro-and mesoplastic pollution in pelagic ecosystems of the Western Mediterranean Sea. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(16), 12190-12197.
- Fischer, M., & Scholz-Böttcher, B. M. (2017). Simultaneous trace identification and quantification of common types of microplastics in environmental samples by pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry. *Environmental science & technology*, 51(9), 5052-5060.

- Foekema, E. M., De Grijter, C., Mergia, M. T., van Franeker, J. A., Murk, A. J., Koelmans, A. A. (2013). Plastic in North Sea Fish. *Environ. Sci. Technol.* 47 (15), 8818–8824.
- Foley, C.J., Feiner, Z.S., Malinich, T.D., & Höök, T.O. (2018). A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. *Sci. Total Environ.* 550–559.
- Free, C. M., Jensen, O. P., Mason, S. A., Eriksen, M., Williamson, N. J., & Boldgiv, B. (2014). High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. *Marine pollution bulletin*, 85(1), 156-163.
- Fries, E., Dekiff, J. H., Willmeyer, J., Nuelle, M. T., Ebert, M., & Remy, D. (2013). Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(10), 1949-1956.
- Galgani, F., Giorgetti, A., Vinci, M., Le Moigne, M., Moncoiffe, G., Brosich, A., Molina, E., Lipizer, M., Holdsworth, N., Schlitzer, R., Hanke, G., & Schaap, D. (2017). Proposal for gathering and managing data sets on marine micro-litter on a European scale..
- Galloway, T.S. (2015). Micro and nanoplastics and human health. In: Bergmann, M. (Ed.), *Marine Anthropogenic Litter*. 2015 Springer, New York (343–366 p).
- Galloway, T. S., Cole, M., & Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology & Evolution*, 1 (5), 1-8.

- GESAMP (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. (P. J. Kershaw, ed.). (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 90, 96 pp.
- GESAMP (2016). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment (part 2). Disponibile all'indirizzo: <http://www.gesamp.org/publications/microplastics-in-the-marine-environment-part-2>
- GESAMP (2019). Guidelines on the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean. In P.J Kershaw., A. Turra, & F. Galgani (Eds.), (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 99, 130p.
- Ghoneim, N. (2000). Photophysics of Nile red in solution: steady state spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular*.
- Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., & Hodges, G. (2011). A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic. *Environ. Sci. Technol.* 45:1466–1472.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of cell biology*, 100(3), 965-973.

- Gündoğdu, S., Çevik, C., & Ataş, N. T. (2020). Stuffed with microplastics: Microplastic occurrence in traditional stuffed mussels sold in the Turkish market. *Food Bioscience*, 100715.
- Güven, O., Gökdağ, K., Jovanović, B., & Kideyş, A. E. (2017). Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish. *Environmental Pollution*, 223, 286-294.
- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E., & Purnell, P. (2018). An overview of chemical additives present in plastics: migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of hazardous materials*, 344, 179-199.
- Hanvey, J. S., Lewis, P. J., Lavers, J. L., Crosbie, N. D., Pozo, K., & Clarke, B. O. (2017) A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments. *Anal. Methods*, 9 (9), 1369–1383.
- Hartmann, N. B., Rist, S., Bodin, J., Jensen, L. H., Schmidt, S. N., Mayer, P., Meibom, A., & Baun, A. (2017). Microplastics as vectors for environmental contaminants: exploring sorption, desorption, and transfer to biota. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 488-493.
- HELCOM (2015). Regional Action Plan for Marine Litter in the Baltic Sea. 20 pp. Disponibile all'indirizzo: <https://helcom.fi/media/publications/Regional-Action-Plan-for-Marine-Litter.pdf>
- Hermsen, E., Mintenig, S. M., Besseling, E., & Koelmans, A. A. (2018). Quality criteria for the analysis of microplastic in biota

samples: a critical review. *Environmental science & technology*, 52(18), 10230-10240.

- Hermsen, E., Pompe, R., Besseling, E., & Koelmans, A. A. (2017). Detection of low numbers of microplastics in North Sea fish using strict quality assurance criteria. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 253-258.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental science & technology*, 46(6), 3060-3075.
- Hind, A. R., Bhargava, S. K., & McKinnon, A. (2001). At the solid/liquid interface: FTIR/ATR—the tool of choice. *Advances in colloid and interface science*, 93(1-3), 91-114.
- Hurley, R. R., Lusher, A. L., Olsen, M., & Nizzetto, L. (2018). Validation of a method for extracting microplastics from complex, organic-rich, environmental matrices. *Environmental science & technology*, 52(13), 7409-7417.
- IMO (2015). International Maritime Organization. Plastic particles in the ocean may be as harmful as plastic bags, report says. International Maritime Organization Press Briefing Archives. 27/04/2015. Disponibile all'indirizzo: <http://www.imo.org/en/MediaCentre/PressBriefings/Pages/15-microplastics.aspx>
- Imhof, H. K., Ivleva, N. P., Schmid, J., Niessner, R., & Laforsch, C. (2013). Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Current biology*, 23(19), R867-R868.

- Ira and, & Krishnamoorthy, G. (2001). Probing the link between proton transport and water content in lipid membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(7), 1484-1488.
- Isobe, A., Uchida, K., Tokai, T., & Iwasaki, S. (2015). East Asian Seas: a hot spot for pelagic microplastics. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 618–623.
- Jones, E. S. (2019). Plastic Debris in Deep-Sea Canyon, Estuarine, and Shoreline Sediments (Doctoral dissertation, University of Oregon).
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Larat, V., Karbalaei, S., & Salamatinia, B. (2018). Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats. *Science of the Total Environment*, 612, 1380-1386.
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Romano, N., Ho, Y. B., & Salamatinia, B. (2017). A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of the Total Environment*, 578, 485-494.
- Karlsson, T. M., Vethaak, A. D., Almroth, B. C., Ariese, F., van Velzen, M., Hassellöv, M., & Leslie, H. A. (2017). Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: method development and microplastic accumulation. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 403-408.
- Kedzierski, M., Lechat, B., Sire, O., Le Maguer, G., Le Tilly, V., & Bruzaud, S. (2020). Microplastic contamination of packaged meat: Occurrence and associated risks. *Food Packaging and Shelf Life*, 24, 100489.

- Kelly, A., Lannuzel, D., Rodemann, T., Meiners, K. M., & Auman, H. J. (2020). Microplastic contamination in east Antarctic sea ice. *Marine Pollution Bulletin*, 154, 111130.
- Kimura, K., Yamaoka, M., & Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 331-338.
- Kirstein, I.V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Erler, R., Löder, M., & Gerdt G., (2016). Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Mar. Environ. Res.* 120, 1–8.
- Klein, M., & Fischer, E. K. (2019). Microplastic abundance in atmospheric deposition within the Metropolitan area of Hamburg, Germany. *Science of The Total Environment*, 685, 96-103.
- Koelmans, A. A., Bakir, A., Burton, G. A., & Janssen, C. R. (2016). Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies. *Environmental science & technology*, 50(7), 3315-3326.
- Koelmans, A.A., Besseling, E., Wegner, A., & Foekema, E.M. (2013). Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: a model analysis. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7812–7820.
- Koelmans, B., Pahl, S., Backhaus, T., Bessa, F., van Calster, G., Contzen, N., ... & Kalcikova, G. (2019). A scientific perspective on microplastics in nature and society. SAPEA.

- Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K., & Shi, H. (2018). Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: a novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Science of the Total Environment*, 610, 635-640.
- Kosuth, M., Mason, S. A., & Wattenberg, E. V. (2018). Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PloS one*, 13(4), e0194970.
- Kuttralam-Muniasamy, G., Pérez-Guevara, F., Elizalde-Martínez, I., & Shruti, V. C. (2020). Branded milks–Are they immune from microplastics contamination? *Science of The Total Environment*, 714, 136823.
- Käppler, A., Fischer, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K. J., & Voit, B. (2016). Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both?. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(29), 8377-8391.
- La Daana, K. K., Gårdfeldt, K., Lyashevskaya, O., Hassellöv, M., Thompson, R. C., & O'Connor, I. (2018). Microplastics in subsurface waters of the Arctic Central Basin. *Marine pollution bulletin*, 130, 8-18.
- Laskar, N., & Kumar, U. (2019). Plastics and microplastics: A threat to environment. *Environmental technology & innovation*, 14, 100352.
- Lebreton, L., Slat, B., Ferrari, F., Sainte-Rose, B., Aitken, J., Marthouse, R., ... & Noble, K. (2018). Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific reports*, 8(1), 1-15.

- Lee, H., Shim, W.J., & Kwon, J.H. (2014). Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1545–1552.
- Lei, L., Liu, M., Song, Y., Lu, S., Hu, J., Cao, C., ... & He, D. (2018a). Polystyrene (nano) microplastics cause size-dependent neurotoxicity, oxidative damage and other adverse effects in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science: Nano*, 5(8), 2009-2020.
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., ... & He, D. (2018b). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of the Total Environment*, 619, 1-8.
- Li, J., Green, C., Reynolds, A., Shi, H., & Rotchell, J. M. (2018). Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom. *Environmental pollution*, 241, 35-44.
- Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I. L. N., ... & Shi, H. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental pollution*, 244, 522-533.
- Li, J., Qu, X., Su, L., Zhang, W., Yang, D., Kolandhasamy, P., ... & Shi, H. (2016). Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environmental Pollution*, 214, 177-184.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., & Shi, H. (2015). Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental pollution*, 207, 190-195.

- Liebezeit, G., & Dubaish, F. (2012). Microplastics in beaches of the East Frisian islands Spiekeroog and Kachelotplate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(1), 213-217.
- Liebezeit, G., & Liebezeit, E. (2013). Non-pollen particulates in honey and sugar. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(12), 2136-2140.
- Liebezeit, G., & Liebezeit, E. (2014). Synthetic particles as contaminants in German beers. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(9), 1574-1578.
- Lo, H. S., Lee, Y. K., Po, B. H. K., Wong, L. C., Xu, X., Wong, C. F., ... & Cheung, S. G. (2020). Impacts of Typhoon Mangkhut in 2018 on the deposition of marine debris and microplastics on beaches in Hong Kong. *Science of The Total Environment*, 716, 137172.
- Lohmann, R. (2017). Microplastics are not important for the cycling and bioaccumulation of organic pollutants in the oceans—but should microplastics be considered POPs themselves? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13, 460–465.
- Lopes, C., Raimundo, J., Caetano, M., & Garrido, S. (2020). Microplastic ingestion and diet composition of planktivorous fish. *Limnology and Oceanography Letters*, 5(1), 103-112.
- Lots, F. A., Behrens, P., Vijver, M. G., Horton, A. A., & Bosker, T. (2017). A large-scale investigation of microplastic contamination: abundance and characteristics of microplastics in European beach sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 123(1-2), 219-226.

- Lusher, A.L., Burke, A., O'Connor, I., & Officer, R. (2014). Microplastic pollution in the North East Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. *Mar. Pollut. Bull.* 88, 325–333.
- Lusher, A.L., Hollman, P.C.H., & Mendoza-Hill, J.J. (2017a). Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 615. Rome, Italy.
- Lusher, A.L., Tirelli, V., O'Connor, I., & Officer, R. (2015). Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Sci. Rep.* 5: 14947.
- Lusher, A.L., Welden, N.A., Sobral, P., & Cole, M. (2017b) Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates, *Anal. Methods* 9, 1346e1360.
- Lv, L., Qu, J., Yu, Z., Chen, D., Zhou, C., Hong, P., ... & Li, C. (2019). A simple method for detecting and quantifying microplastics utilizing fluorescent dyes-Safranin T, fluorescein isophosphate, Nile red based on thermal expansion and contraction property. *Environmental Pollution*, 255, 113283.
- Löder, M. G., & Gerdtz, G. (2015). Methodology used for the detection and identification of microplastics—A critical appraisal. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 201-227). Springer, Cham.
- Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., & Mayes, A. G. (2017). A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.

- Martinelli, J. C., Phan, S., Luscombe, C. K., & Padilla-Gamiño, J. L. (2020). Low incidence of microplastic contaminants in Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) from the Salish Sea, USA. *Science of The Total Environment*, 715, 136826.
- Martínez-Gómez, C., León, V. M., Calles, S., Gomáriz-Olcina, M., & Vethaak, A. D. (2017). The adverse effects of virgin microplastics on the fertilization and larval development of sea urchins. *Mar. Environ. Res*, 130, 69-76.
- Mathalon, A., & Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine pollution bulletin*, 81(1), 69-79.
- Mattsson, K., Johnson, E.V., Malmendal, A., Linse, S., Hansson, L.A., & Cedervall, T. (2017). Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Sci. Rep.* 7, 11452.
- Maxwell S, H., Melinda K, F., & Matthew, G. (2020). Counterstaining to separate Nile Red-stained microplastic particles from terrestrial invertebrate biomass. *Environmental Science & Technology*, 54(9), 5580-5588.
- McCormick A., Hoellein T. J., Mason S. A., Schlupe J. & Kelly J.J. (2014). Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environmental Science and Technology*, 48, 11863–11871.
- McNeill, I. C., Zulfiqar, M., & Kousar, T. (1990). A detailed investigation of the products of the thermal degradation of polystyrene. *Polymer Degradation and Stability*, 28(2), 131–151

- Mercogliano, R., Avio, C. G., Regoli, F., Anastasio, A., Colavita, G., & Santonicola, S. (2020). Occurrence of Microplastics in Commercial Seafood under the Perspective of the Human Food Chain. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(19), 5296-5301.
- Miao, L., Wang, P., Hou, J., Yao, Y., Liu, Z., Liu, S., & Li, T. (2019). Distinct community structure and microbial functions of biofilms colonizing microplastics. *Science of the Total Environment*, 650, 2395-2402.
- Microbead-Free Waters Act of 2015 (2015). Public Law No. 114-114. 129 Stat. 3129. Pedá, C., Caccamo, L., Fossi, M. C., Andaloro, F., Genovese, L., Perdichizzi, A., et al. (2016). Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution*, 212, 251–256.
- MSFD-TSML (Technical Subgroup on Marine Litter), (2013). Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. Disponibile all'indirizzo: <https://mcc.jrc.ec.europa.eu/documents/201702074014.pdf>
- Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., & Quinn, B. (2016). Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.*
- Murphy, F., Russell, M., Ewins, C., & Quinn, B. (2017). The uptake of macroplastic & microplastic by demersal & pelagic fish in the Northeast Atlantic around Scotland. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 353-359.

- Murray, F., & Cowie, P. R. (2011). Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Marine pollution bulletin*, 62(6), 1207-1217.
- Naji, A., Nuri, M., & Vethaak, A. D. (2018). Microplastics contamination in molluscs from the northern part of the Persian Gulf. *Environmental pollution*, 235, 113-120.
- Nel, H. A., & Froneman, P. W. (2015). A quantitative analysis of microplastic pollution along the south-eastern coastline of South Africa. *Marine pollution bulletin*, 101(1), 274-279.
- Nelms, S. E., Galloway, T. S., Godley, B. J., Jarvis, D. S., & Lindeque, P. K. (2018). Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environmental Pollution*, 238, 999-1007.
- Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J. L., & Pereira, T. (2015). Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine pollution bulletin*, 101(1), 119-126.
- NOAA (2019). A Guide to Plastic in the Ocean. National Oceanic and Atmospheric Administration. U.S. Department of Commerce. Disponibile all'indirizzo: <https://oceanservice.noaa.gov/hazards/marinedebris/plastics-in-the-ocean.html>
- Norén, F., & Naustvoll, L. J. (2010). Survey of microscopic anthropogenic particles in Skagerrak. Report commissioned by Klima-og Forurensningsdirektoratet.
- Olivatto, G. P., Martins, M. C. T., Montagner, C. C., Henry, T. B., & Carreira, R. S. (2019). Microplastic contamination in surface waters in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine pollution bulletin*, 139, 157-162.

- OSPAR Commission, (2017). Annual Report 2016-2017 (2017) Publication number: 691/2017. London. Disponibile all'indirizzo: <https://www.ospar.org/documents?v=38007>
- OSPAR Convention, (2014). Disponibile all'indirizzo: <https://www.ospar.org/convention>.
- OSPAR, (2015). Ospar request on development of a common monitoring protocol for plastic particles in fish stomachs and selected shellfish on the basis of existing fish disease surveys. ICES Advice 2015, 1, 1–6. Disponibile all'indirizzo: https://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Advice/2015/Special_Requests/OSPAR_PLAST_advice.pdf
- Panebianco, A., Nalbhone, L., Giarratana, F., & Ziino, G. (2019). First discoveries of microplastics in terrestrial snails. *Food Control*, 106, 106722.
- Pellini, G., Gomiero, A., Fortibuoni, T., Ferrà, C., Grati, F., Tasseti, A. N., Polidori, P., Fabi, G., & Scarcella, G. (2018). Characterization of microplastic litter in the gastrointestinal tract of *Solea solea* from the Adriatic Sea. *Environmental pollution*, 234, 943-952.
- PlasticEurope (2019). *Plastics - the Facts 2019. An analysis of European plastics production, demand and waste data.* (2019). Disponibile all'indirizzo: https://www.plasticseurope.org/application/files/9715/7129/9584/FINAL_web_version_Plastics_the_facts2019_14102019.pdf
- Pirc, U., Vidmar, M., Mozer, A., & Kržan, A. (2016). Emissions of microplastic fibers from microfiber fleece during domestic

washing. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(21), 22206-22211.

- Prata, J. C., da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019a). Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: a critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, 150-159.
- Prata, J. C., Reis, V., Matos, J. T., da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019b). A new approach for routine quantification of microplastics using Nile Red and automated software (MP-VAT). *Science of The Total Environment*, 690, 1277-1283.
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2020). Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of the Total Environment*, 702, 134455.
- Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M., & Shi, H. (2018). Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels. *Science of the total environment*, 621, 679-686.
- Quinn, B., Murphy, F., & Ewins, C. (2017). Validation of density separation for the rapid recovery of microplastics from sediment. *Analytical Methods*, 9(9), 1491-1498.
- Rainieri, S., & Barranco, A. (2019). Microplastics, a food safety issue?. *Trends in food science & technology*, 84, 55-57.
- Rainieri, S., Conlledo, N., Larsen, B.K., Granby, K., & Barranco, A. (2018). Combined effects of microplastics and

chemical contaminants on the organ toxicity of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Res.* 162, 135–143.

- Redondo-Hasselerharm, P. E., Falahudin, D., Peeters, E. T. H. M., & Koelmans, A. A. (2018). Microplastic Effect Thresholds for Freshwater Benthic Macroinvertebrates. *Environ. Sci. Technol.*, 52 (4), 2278–2286.
- Remy, F., Collard, F., Gilbert, B., Compère, P., Eppe, G., & Lepoint, G. (2015). When microplastic is not plastic: the ingestion of artificial cellulose fibers by macrofauna living in seagrass macrophytodetritus. *Environmental science & technology*, 49(18), 11158-11166.
- Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wan, J., Liu, Y., ... & Deng, R. (2018). Sorption, transport and biodegradation—an insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil. *Science of the total environment*, 610, 1154-1163.
- Renzi, M., Guerranti, C., & Blašković, A. (2018). Microplastic contents from maricultured and natural mussels. *Marine pollution bulletin*, 131, 248-251.
- Renzi, M., Specchiulli, A., Blašković, A., Manzo, C., Mancinelli, G., & Cilenti, L. (2019). Marine litter in stomach content of small pelagic fishes from the Adriatic Sea: sardines (*Sardina pilchardus*) and anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(3), 2771-2781.
- Rillig, M. C. (2012). Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil?. *Sci. Technol.* 46, 6453–6454 (2012).
- Rillig, M. C., Ziersch, L., & Hempel, S. (2017). Microplastic transport in soil by earthworms. *Scientific reports*, 7.

- Rist, S., Almroth, B.C., Hartmann, N.B., & Karlsson, T.M. (2018). A critical perspective on early communications concerning human health aspects of microplastics. *Sci. Total Environ.* 626, 720–726.
- Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2015). A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 65, 47-53.
- Rochman C. M., Hentschel B. T. & Teh S. J. (2014). Long-term sorption of metals is similar among plastic types: implications for plastic debris in aquatic environments. *PLoS ONE*, 9, e85433.
- Rochman, C. M., Tahir, A., Williams, S. L., Baxa, D. V., Lam, R., Miller, J. T., The, F. C., Werorilangi, S., & Teh, S. J. (2015). Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific reports*, 5, 14340.
- Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., & Fossi, M. C. (2015). First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 95(1), 358-361.
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J. P., & Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 42.
- Rummel, C. D., Löder, M. G., Fricke, N. F., Lang, T., Griebeler, E. M., Janke, M., & Gerdtts, G. (2016). Plastic ingestion by pelagic

and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. *Marine pollution bulletin*, 102(1), 134-141.

- Ryan, P. G. (2015). A brief history of marine litter research. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 1-25). Springer, Cham.
- Salim, S.Y., Kaplan, G.C., & Madsen, K.L. (2013). Air pollution effects on the gut microbiota. *Gut Microbes* 5 (2), 215–219.
- SAM (2018). In: *Microplastic Pollution: The Policy Context – Background Paper*. The Scientific Advice Mechanism Unit of the European Commission, p. 68. Disponibile all'indirizzo:https://ec.europa.eu/research/sam/pdf/topics/microplastic_pollution_policy-context.pdf.
- Santana, M. F. M., Ascer, L. G., Custódio, M. R., Moreira, F. T., & Turra, A. (2016). Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: rapid evaluation through bioassessment. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1-2), 183-189.
- Schirinzi, G. F., Pérez-Pomeda, I., Sanchís, J., Rossini, C., Farré, M., & Barceló, D. (2017). Cytotoxicity effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environ. Res.* 159, 579–587.
- Schmidt, N., Thibault, D., Galgani, F., Paluselli, A., & Sempéré, R. (2018). Occurrence of microplastics in surface waters of the Gulf of Lion (NW Mediterranean Sea). *Progress in Oceanography*, 163, 214-220.
- Schnurr, R. E., Alboiu, V., Chaudhary, M., Corbett, R. A., Quanz, M. E., Sankar, K., Srain, S. H., Thavarajah, V., Xanthos, D.,

& Walker, T. R. (2018). Reducing marine pollution from single-use plastics (SUPs): A review. *Marine pollution bulletin*, 137, 157-171.

- Schymanski, D., Goldbeck, C., Humpf, H.U., & Fuß P. (2018) Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Res* 129:154–162. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.011>

- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., & Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.* 185, 77–83.

- Shim, W. J., Song, Y. K., Hong, S. H., & Jang, M. (2016). Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine pollution bulletin*, 113(1-2), 469-476.

- Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 242-247.

- Stanton, T., Johnson, M., Nathanail, P., Gomes, R. L., Needham, T., & Burson, A. (2019). Exploring the efficacy of Nile red in microplastic quantification: A costaining approach. *Environmental Science & Technology Letters*, 6(10), 606-611.

- Stock, F., Kochleus, C., Bänsch-Baltruschat, B., Brennholt, N., & Reifferscheid, G. (2019). Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment—A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.

- Suaria, G., Perold, V., Lee, J. R., Lebouard, F., Aliani, S., & Ryan, P. G. (2020). Floating macro-and microplastics around the Southern Ocean: Results from the Antarctic Circumnavigation Expedition. *Environment International*, 136, 105494.

- Tamminga, M., Hengstmann, E., & Fischer, E. K. (2018). Microplastic analysis in the South Funen Archipelago, Baltic Sea, implementing manta trawling and bulk sampling. *Marine pollution bulletin*, 128, 601-608.
- The Society of Wilderness (2013) Introduction to Taiwanese Ocean Cleanup Alliance (in Chinese). Disponibile all'indirizzo: <http://ocean.sow.org.tw>
- Thiele, C. J., Hudson, M. D., & Russell, A. E. (2019). Evaluation of existing methods to extract microplastics from bivalve tissue: Adapted KOH digestion protocol improves filtration at single-digit pore size. *Marine pollution bulletin*, 142, 384-393.
- Torre, M., Digka, N., Anastasopoulou, A., Tsangaris, C., & Mytilineou, C (2016). Anthropogenic microfibrils pollution in marine biota. A new and simple methodology to minimize airborne contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 113 (1), 55–61.
- Tu, C., Zhou, Q., Zhang, C., Liu, Y., & Luo, Y. (2020) Biofilms of Microplastics. In: He D., Luo Y. (eds) *Microplastics in Terrestrial Environments. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 95. Springer, Cham.
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(18), 7669-7678.
- UNEP (2011). United Nations Environmental Programme, *UNEP year book: Emerging issues in our global environment* (79 p). United Nations Environmental Programme, Nairobi.

Disponibile all'indirizzo:
<http://wedocs.unep.org/handle/20.500.11822/8276>

- UNEP (2018). Exploring the potential for adopting alternative materials to reduce marine plastic litter. United Nations Environment Programme (UNEP), Nairobi, 124 pp.

Disponibile all'indirizzo:
<https://www.unenvironment.org/resources/report/exploring-potential-adopting-alternative-materials-reduce-marine-plastic-litter>

- UNEP and NOAA (2015). United Nations Environmental Program and National Oceanography and Atmospheric Administration, The Honolulu Strategy: a global framework for prevention and management of marine debris. Disponibile all'indirizzo:

https://marinedebris.noaa.gov/sites/default/files/publications-files/Honolulu_Strategy.pdf

- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental Pollution*, 199, 10-17.

- Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental pollution*, 193, 65-70.

- Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., & Janssen, C. R. (2013). Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental pollution*, 182, 495-499.

- van der Hal, N., Ariel, A., & Angel, D. L. (2017). Exceptionally high abundances of microplastics in the oligotrophic Israeli Mediterranean coastal waters. *Marine pollution bulletin*, 116(1-2), 151-155.
- Van der Meulen, M. D., De Vriese, L., Lee, J., Maes, T., Van Dalfsen, J. A., Huvet, A., ... & Vethaak, A. D. (2014). Socio-economic impact of microplastics in the 2 Seas, Channel and France Manche Region. An initial risk assessment.
- Vandermeersch, G., Van Cauwenberghe, L., Janssen, C. R., Marques, A., Granby, K., Fait, G., ... & Devriese, L. (2015). A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*, 143, 46-55.
- Virsek, M.K., Lovsin, M.N., Koren, S., Krzan, A., & Peterlin, M. (2017). Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species *Aeromonas Salmonicida*. *Mar. Pollut. Bull.* 125 (1-2), 301-309.
- Wang, X., Sun, D., & Yao, T. (2016). Climate change and global cycling of persistent organic pollutants: a critical review. *Science China Earth Sciences*, 59(10), 1899-1911.
- Ward, J. E., Rosa, M., & Shumway, S. E. (2019). Capture, ingestion, and egestion of microplastics by suspension-feeding bivalves: a 40-year history. *Anthropocene Coasts*, 2(1), 39-49.
- Welden, N. A., Abylkhani, B., & Howarth, L. M. (2018). The effects of trophic transfer and environmental factors on microplastic uptake by plaice, *Pleuronectes platessa*, and spider crab, *Maja squinado*. *Environmental Pollution*, 239, 351-358.

- Welden, N.A.C., & Cowie, P.R. (2016). Long-term microplastic retention causes reduced body condition in the langoustine, *Nephrops norvegicus*. *Environ. Pollut.* 218, 895–900.
- Wesch, C., Bredimus, K., Paulus, M., & Klein, R. (2016). Towards the suitable monitoring of ingestion of microplastics by marine biota: A review. *Environmental Pollution*, 218, 1200-1208.
- Wesch, C., Elert, A. M., Wörner, M., Braun, U., Klein, R., & Paulus, M. (2017). Assuring quality in microplastic monitoring: about the value of clean-air devices as essentials for verified data. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8.
- Wright, S.L., & Kelly, F.J., (2017). Plastic and human health: a micro issue? *Environ. Sci. Technol.* 51 (12), 6634–6647.
- Wójcik-Fudalewska, D., Normant-Saremba, M., & Anastácio, P. (2016). Occurrence of plastic debris in the stomach of the invasive crab *Eriocheir sinensis*. *Marine pollution bulletin*, 113(1-2), 306-311.
- Wu, P., Cai, Z., Jin, H., & Tang, Y. (2019). Adsorption mechanisms of five bisphenol analogues on PVC microplastics. *Science of the Total Environment*, 650, 671-678.
- Xu, J. L., Thomas, K. V., Luo, Z., & Gowen, A. A. (2019). FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 119, 115629.
- Yang, D., Shi, H., Li, L., Li, J., Jabeen, K., & Kollandhasamy, P. (2015). Microplastic pollution in table salts from China. *Environmental science & technology*, 49(22), 13622-13627.

- Zalasiewicz, J., Waters, C. N., Summerhayes, C. P., Wolfe, A. P., Barnosky, A. D., Cearreta, A., ... & Haff, P. (2017). The Working Group on the Anthropocene: Summary of evidence and interim recommendations. *Anthropocene*, 19, 55-60.
- Zettler, E.R., Mincer, T.J., & Amaral-Zettler, L.A., (2013). Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47 (13), 7137–7146.
- Zhang, H. (2017). Transport of microplastics in coastal seas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 199, 74-86.
- Zhao, S., Zhu, L., Wang, T., & Li, D. (2014). Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution. *Marine pollution bulletin*, 86(1-2), 562-568.
- Zhu, L., Bai, H., Chen, B., Sun, X., Qu, K., & Xia, B. (2018). Microplastic pollution in North Yellow Sea, China: Observations on occurrence, distribution, and identification. *Science of the Total Environment*, 636, 20-29.