Protocolli di intesa MATTM - Regioni per l'esecuzione di attività di indagine integrative ai fini della attuazione della strategia marina di cui al DLgs. 190/2010

Metodologie analitiche di riferimento

MICROPARTICELLE PRESENTI SULLA SUPERFICIE DEL MARE E LUNGO LA COLONNA D'ACQUA

Metodologie di campionamento

INTRODUZIONE E OBIETTIVI

L'indicatore 10.1.3 della Strategia Marina richiede di reperire informazioni sui *"Trend nella quantità, nella distribuzione e, se possibile, nella composizione di microparticelle (in particolare microplastiche)".* Le attività di campionamento e analisi di laboratorio del *microlitter* sono finalizzate a valutarne l'abbondanza nell'ambiente marino. E' bene sottolineare però che al momento a livello globale non sono state mai eseguite azioni di intercalibrazione tra laboratori e non sono disponibili standards di qualità a cui far riferimento. Lo stesso Gruppo di Lavoro nominato dalla Commissione Europea per la redazione di protocolli comuni di monitoraggio del marine litter afferma che lo sviluppo di protocolli e approcci standard è considerato un obiettivo futuro (Galgani *et al*., 2013). Questo perché molti fenomeno legati al destino ambientale delle micro particelle e al loro reale impatto sul biota sono allo stato ancora ignoti.

Poiché le microplastiche costituiscono la parte preponderante delle microparticelle (microlitter) in mare, l'interesse a livello globale è dedicato a questa componente (*Galgani et al*., 2013). Peraltro, il microlitter, che deriva dal processo di frammentazione del *macrolitter* dopo periodi più o meno lunghi di permanenza nell'ambiente di quest'ultimo, è da considerarsi ubiquitario e presente anche in zone remote, ovvero prive di sorgenti puntuali di inquinamento (de Lucia *et al*., 2013).

Sebbene non sia stata stabilita una dimensione limite verso il basso, il microlitter comprende tutto il materiale solido di dimensioni inferiori ai 5mm, differentemente disperso nell'ambiente.

Le metodologie che seguono sono riferite al campionamento e analisi in laboratorio delle microplastiche presenti nell'acqua di mare.

CAMPIONAMENTO

In conseguenza delle ridottissime dimensioni, del peso e della densità relativa del materiale indagato (0,9-1,5 g/cm^3) (Hidalgo-Ruz *et al.,* 2012), le microplastiche tendono ad accumularsi

fonte: http://burc.regione.campania.it

preferibilmente sulla superficie del mare e, in seconda battuta nella zona basale del termoclino. Per tale ragione, il campionamento viene preferenzialmente eseguito sulla superficie e, laddove possibile, sulla colonna d'acqua.

Nel caso del campionamento superficiale, è importante considerare lo strato influenzato dal rimescolamento, causato dal moto ondoso. E' quindi preferibile eseguire il campionamento in condizioni di mare calmo.

Campionamento superficiale

Per il campionamento, viene utilizzata una rete tipo "manta" costruita appositamente per navigare nello strato superficiale della colonna d'acqua e campionare quindi entro lo strato interessato dal rimescolamento causato dal moto ondoso. L'utilizzo della rete in generale permette di campionare grandi volumi d'acqua, trattenendo il materiale d'interesse. La Manta (figura 1) è costituita da una bocca rettangolare metallica da cui si diparte il cono di rete ed un bicchiere raccoglitore finale; due ali metalliche vuote, esterne alla bocca, la mantengono in galleggiamento sulla superficie.

Dimensioni della bocca e lunghezza. Le dimensioni della bocca non sono prestabilite, essendo funzione della stazza dell'imbarcazione trainante; si consiglia di mantenere sempre un rapporto fra larghezza ed altezza della bocca pari ad ½. Per un confronto a livello Nazionale, vista la stazza delle imbarcazioni in uso nelle principali Aree Marine Protette ed ARPA regionali, si consiglia una misura della bocca di 50 cm di larghezza per 25 cm di altezza ed una lunghezza della rete di circa 2,5m. Si tratta di dimensioni idonee per maneggiare l'attrezzo a bordo di uno Sciallino o da imbarcazioni della Capitaneria di Porto. Le dimensioni si riferiscono alla parte interna della bocca, parte alla quale viene collegata la rete. La parte esterna è più larga assumendo una forma complessiva a tronco di piramide.

Maglia della rete. La rete deve avere un vuoto di maglia di intorno ai 330 µm, come anche indicato dal Gruppo di Lavoro nominato dalla Commissione Europea per la redazione di protocolli comuni di monitoraggio del marine litter (Galgani *et al*., 2013), munita di flussometro. Il In presenza di.

Al fine di evitare problemi di rigurgito in seguito ad intasamento, come può accadere soprattutto in presenza di acque eutrofiche, si consiglia di verificare costantemente l'efficacia di campionamento.

Dimensioni delle ali. Le dimensioni delle ali sono funzione del peso della bocca, dato che servono per la galleggiabilità dello strumento. Si suggerisce una dimensione di 40 - 70 cm di lunghezza

Flussimetro. Per il calcolo dei volumi di acqua filtrati, si suggerisce l'utilizzo di un flussimetro elettronico piuttosto che di uno meccanico.

fonte: http://burc.regione.campania.it

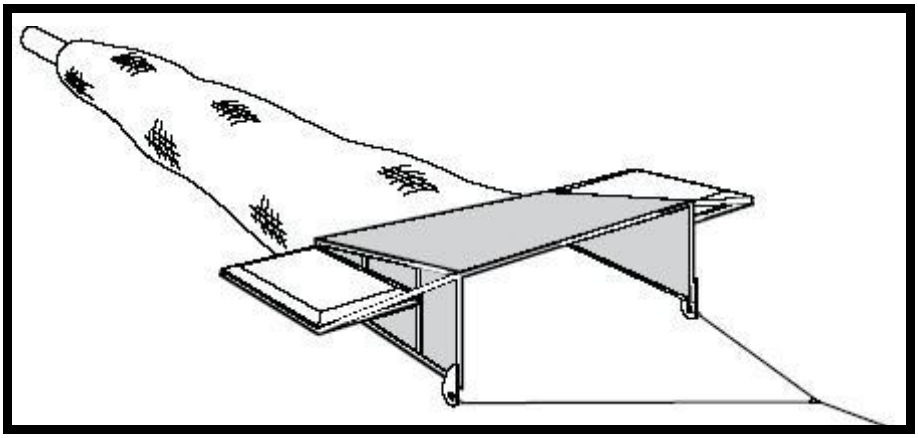

Figura 1: Manta net (swfsc.noaa.gov)

Utilizzo della rete. La rete viene calata lentamente dall'imbarcazione e lasciata in galleggiamento, essendo assicurata al battello tramite una cima sino alla distanza di 50-70m dallo stesso. La manta va lasciata comunque fuori dalla scia provocata dalla navigazione dell'imbarcazione poiché la turbolenza indotta determina un'alterazione del valore reale di abbondanza delle microplastiche (Fig. 2-3). Laddove possibile è quindi opportuno calare l'attrezzo lateralmente,facendo passare la cima di traino da un idoneo tangone installato su un lato dell'imbarcazione

Figura 2: Manta net (Foto A. Camedda Cnr-IAMC Oristano)

Figura 3: Manta net (Foto A. Camedda Cnr-IAMC Oristano)

Durata del transetto. I prelievi verranno effettuati lungo transetti ortogonali alla costa di lunghezza minima di 20 Km. All'interno di ogni transetto vengono definite 4 stazioni di prelievo. Una volta posizionati nell'area della stazione di prelievo, la rete viene calata e trainata per 20 minuti secondo un transetto lineare, con velocità compresa tra 1 e 2 nodi, e comunque non superiore ai 3 nodi, in modo da permettere alla rete di filtrare l'acqua senza rigurgiti (*avoidance*). La tirata di 20 minuti deve essere realizzata in senso opposto alla corrente; una volta conclusa la tirata il transetto va ripreso dalla posizione originale di partenza. In almeno una delle stazioni di prelievo devono essere eseguite tre repliche, ripercorrendo la stazione più volte.

Definizione dell'area di studio. L'area di studio è rappresentata dall'intera Regione, all'interno della quale andranno stabiliti un numero di transetti in funzione delle caratteristiche dell'area considerata (quali zone di *upwelling* e *downwelling*, aree di accumulo per condizioni idrodinamiche locali, distanza da fonti di immissione diretta, quali foci fluviali, etc). Il numero di transetti e le coordinate geografiche degli stessi andranno stabiliti in modo da avere un immagine rappresentativa dell'intera Regione, considerando sia zone di massimo che minimo impatto antropico. I criteri di scelta dei transetti dovranno essere registrati su apposite schede di campionamento.

Campionamento colonna d'acqua (OPZIONALE)

Il campionamento in colonna d'acqua viene eseguito utilizzando una rete standard da plancton WP-2 oppure Bongo con vuoto di maglia 330-500µm, munita di flussometro. La Manta, data la galleggiabilità dello strumento, non può infatti essere utilizzata per il campionamento in colonna d'acqua.

La rete da plancton è costituita da un anello circolare metallico da cui si diparte il cono di rete ed un bicchiere raccoglitore finale (Fig. 4-5).

fonte: http://burc.regione.campania.it

Figura 4: Bongo net (HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH)

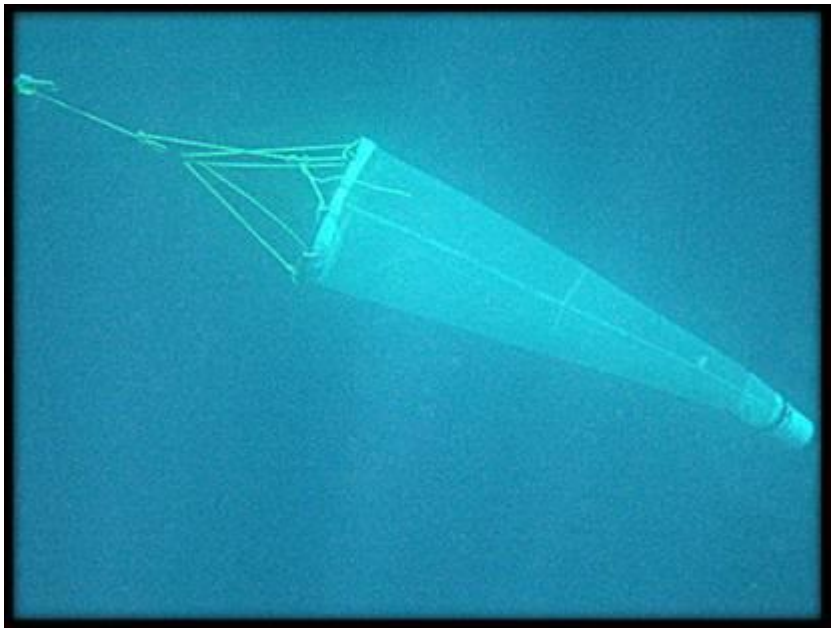

Figura 5: Rete da plancton tipo WP

Sotto la rete deve essere collocato un peso depressore (circa 10-20 kg) che aiuta a calarla e ne rallenta la risalita. La rete viene calata lentamente da un battello fermo fino alla massima profondità (evitando il contatto con il fondo) e subito salpata obliquamente ad una velocità compresa tra 0,5-1 m/s, o comunque non superiore ai 2 nodi, in modo da permettere alla rete di filtrare l'acqua senza rigurgiti. Vengono eseguite un minimo di tre repliche per sito

Si consiglia di eseguire un doppio obliquo per ogni replica, soprattutto in acque poco profonde.

Per l'individuazione dei siti all'interno delle aree si fa riferimento al campionamento superficiale, mantenendo lo stesso numero e coordinate.

Calcolo dei volumi con Manta e WP2

In entrambe le tipologie di campionamento (superficiale o colonna d'acque) il volume di acqua di mare filtrata (m^3) viene calcolato mediante la formula:

V = **N** x **A** x **c**

dove: **N** è il numero di giri dell'elica registrato dal flussometro durante il transetto;

A è l'area della bocca della rete utilizzata;

c è un valore costante, tipico di ogni flussometro, e fornito dalla casa madre

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Una volta in superficie le reti devono essere sciacquate con acqua di mare dall'esterno verso l'interno in modo da convogliare tutto il materiale raccolto verso il bicchiere raccoglitore.

Il collettore viene poi staccato dalla rete ed il campione viene versato in un barattolo da 500 ml o 250 ml in vetro, per le successive analisi quali-quantitative (Fig. 6). Qualora non fosse possibile utilizzare, per specifici motivi di sicurezza, contenitori di vetro a bordo del natante, si possono utilizzare in sostituzione barattoli in materiale plastico rigido, prestando particolare cura nel travasare il contenuto raccolto per evitare che delle micro particelle rimangano adese al barattolo. Il campione può essere conservato in frigo (non nel congelatore), comunque sempre lontano da fonti di luce e calore.

Figura 6: Materiale raccolto (Foto S. Coppola Cnr-IAMC Oristano)

ANALISI DI LABORATORIO

Analisi del microlitter in laboratorio

Conservazione del campione

Premettendo che l'analisi è rivolta alla quantificazione della microplastica (come tale non degradabile) è consigliabile aggiungere un fissativo (alcol etilico al 70%), solo al fine di prevenire la decomposizione della sostanza organica presente (zooplancton, fitoplancton, etc.) che sprigionerebbe cattivi odori nella fase di lettura del campione. Qualora fossero prevista anche analisi allo spettrofotometro IR, l'utilizzo di un solvente organico, quale l'alcool, andrebbe evitato in quanto potrebbe inficiare i risultati delle analisi.

Materiali

- Setaccio da 5 mm;
- setaccio da 300 µm;
- supporto per filtrazione;
- filtri in nylon con pori da 100 µm;
- stufa da laboratorio;
- essiccatore;
- bilancia analitica;
- piastre Petri in vetro;
- vial (10 ml o 30 ml)
- becker;
- pinzette;
- stereoscopio;
- pc, videocamera e software di acquisizione (facoltativo).

IMPORTANTE: tutta l'attrezzatura di laboratorio deve essere di vetro o metallo al fine di evitare che i frammenti di microplastiche aderiscano alle pareti. Inoltre, particolare attenzione va prestata alla pulizia dell'area di lavoro onde evitare contaminazione del campione.

Procedimento

Utilizzare, possibilmente, acqua di mare durante tutte le fasi di trasferimento e lavaggio del campione.

- Agitare accuratamente il campione all'interno del contenitore di prelievo al fine di favorire il distacco delle microplastiche sia dal macro-materiale presente che dalle pareti del contenitore stesso.

- Trasferire tutto il campione su una serie composta da due setacci (da 5 mm e 300 µm) lavando più volte il contenitore con acqua di mare, al fine di recuperare tutte le microplastiche.
- La frazione composta da residui vegetali o animali superiori ai 5 mm (trattenuta dal setaccio con le maglie maggiori) deve essere a sua volta accuratamente lavata.
- Dal setaccio da 300 micron eliminare i residui vegetali e animali, avendo cura di lavarli con acqua di mare.
- Trasferire la frazione di campione contenente le microplastiche in un becker di vetro e successivamente spostare i frammenti di plastica flottanti in piastre Petri.
- Allo stereoscopio procedere con lo smistamento del flottante separando con l'ausilio di una pinzetta il materiale plastico da altri residui di tipo organico (vegetali, legno ecc.).
- Allo stesso modo si procede con lo smistamento del precipitato nel becker per verificare la presenza di plastiche con una densità maggiore rispetto all'acqua di mare oppure rimaste "bloccate" dentro ai residui vegetali o animali .
- Tutti i frammenti di plastica raccolti vengono contati e trasferiti (in numero massimo di 30) in vials con acqua distillata (creando dei **subcampioni**).
- Procedere alla filtrazione per caduta di ogni vial sul rispettivo filtro in nylon da 100 µm (utilizzando il supporto per filtrazione), avendo cura di non tralasciare i microframmenti che restano eventualmente adesi alle pareti del supporto.
- Trasferire ogni filtro su piastra Petri; procedere al conteggio dei frammenti, registrare per ciascuno il colore.

<u>Identificazione dei polimeri</u> (OPZIONALE)

Per la corretta identificazione delle microplastiche, potrebbe essere necessario l'utilizzo di uno spettrofotometro IR, il cui uso viene sempre consigliato almeno per un 10% del campione.

Volendo eseguire una divisione grossolana dei diversi possibili polimeri plastici, è possibile operare una separazione per densità. Infatti, i valori di densità per le plastiche variano da 0,9 - 0,91 g cm^{-3} per il polipropilene a valori superiori per il di 1,4 g/cm^{-3} per il poliossimetilene.

Una tabella con la suddivisione dei polimeri in funzione della loro densità è disponibile su Hidalgo-Ruz *et al.,* 2012 e riproposta in *Galgani et al*., 2013.

Tipo di polimero	Densità (g/cm^{-3})
Polietilene	0,917 - 0,965
Polipropilene	0,9 – 0,91
Polistirene	1,04 – 1,1
Poliammide (nylon)	1,02 – 1,05

Poliestere	1,24 – 2,3
Acrilico	1,09 – 1,20
Poliossimetilene	1,41 – 1,61
Polivinil alcool	1,19 – 1,31
Polivinil cloruro	1,16 – 1,58
Polimetil acrilato	1,17 – 1,20
Polietilene tereftalato	1,35 – 1,45
poliuretano	1,20

Determinazione del peso (opzionale)

- Riunire tutti i **subcampioni** contenenti frammenti di plastica su un unico filtro a membrana in nylon con pori da 100 µm previamente pesato.
- Riporre il filtro in stufa a 50°C per 24 ore, trasferirlo in un essiccatore fino a peso costante e procedere alla pesatura (usando una bilancia analitica e considerando 3 cifre decimali).

Unità di misura

La concentrazione di microplastiche nel campione viene espressa come oggetti per m^3 di acqua di mare campionata Opzionale può essere esprimere la concentrazione come oggetti per superficie di mare indagata o prendendo in considerazione il peso.

BIBLIOGRAFIA

François Galgani, Georg Hanke, Stefanie Werner, Lex Oosterbaan, Per Nilsson, David Fleet, Susan Kinsey, Richard C. Thompson, Jan van Franeker, Thomais Vlachogianni, Michael Scoullos, Joana Mira Veiga, Andreja Palatinus, Marco Matiddi, Thomas Maes, Samuli Korpinen, Ania Budziak, Heather Leslie, Jesus Gago and Gerd Liebezeit, 2013. *Monitoring Guidance for Marine Litter in European Seas*. MSFD GES Technical Subgroup on Marine Litter (TSG-ML). DRAFT REPORT.

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*. Environ. Sci. Technol.46, 3060−3075.