

Università della Calabria

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della
Terra



Corso di Studio in Biodiversità e Sistemi Naturali

Tesi di Laurea Magistrale

**Caratterizzazione di microplastiche provenienti da siti marini
calabresi mediante un approccio analitico integrato**

Relatori

Prof. Mauro Francesco La Russa

Prof.ssa Silvia Mazzuca

Dr. Emilio Cellini

Dott. Emilio Cellini
Dirigente/Direttore
Unità Operativa Complessa
Centro Regionale Strategia Marina
CNR

Candidata

Marzia Verduci

Matricola: 189163

Anno Accademico 2019/2020

INDICE

SCOPO DEL LAVORO E SINOSSI DEI RISULTATI	3
CAPITOLO I	6
1. La plastica	6
1.1 Storia e produzione globale	7
1.2 Il “Marine Litter”	9
1.2 Fonti di immissione dei rifiuti marini e la loro diffusione nell’ambiente marino	12
CAPITOLO II	14
2. Le microplastiche primarie e secondarie	14
2.1 Distribuzione globale e abbondanza delle microplastiche	16
2.2 Conseguenze sugli organismi e sugli ecosistemi	20
CAPITOLO III	23
3. La Direttiva Marine Strategy	23
3.1 Programmi di monitoraggio della strategia marina	23
3.2 MODULO 2 della Marine Strategy: Analisi delle microplastiche, macroplastiche e altri rifiuti flottanti	26
3.3 Concentrazione di microplastiche nella Sottoregione Mar Ionio – Mediterraneo centrale .	28
CAPITOLO IV	31
4. Materiali e metodi	31
4.1 Aree di studio e fasi di campionamento	31
4.2 Metodi	35
4.2.1 Analisi in stereomicroscopia ottica	35
4.2.2 Analisi all’infrarosso in trasformata di Fourier	36
4.3 Modello biologico: <i>Arthrospira maxima</i>	37
4.3.1 Metodi biologici	39
CAPITOLO V	43
5. Risultati e discussioni	43
5.1 Analisi microscopica mediante stereomicroscopio	43
5.2 Caratterizzazione chimico-molecolare	55

5.3 Valutazione della densità ottica e clorofilla <i>a</i> in <i>Arthrospira maxima</i>	68
CONCLUSIONI	71
BIBLIOGRAFIA	73
SITOGRAFIA	77
RINGRAZIAMENTI	78

SCOPO DEL LAVORO E SINOSSI DEI RISULTATI

La plastica rappresenta uno dei contaminanti emergenti che più di tutti minaccia l'integrità degli ecosistemi marini e terrestri. A partire dalla terza rivoluzione industriale, intorno al 1950, la produzione mondiale della plastica ha subito un notevole incremento, registrando sempre maggiori richieste nel mercato. I processi di sintesi dei polimeri plastici hanno condotto alla realizzazione di materiali che prevedono un ampio spettro di utilizzo, grazie alle numerose ed eccellenti proprietà che li caratterizzano. La resistenza e la versatilità permette la realizzazione di materiale da imballaggio, di isolanti termici, di contenitori per alimenti, buste, bottiglie, tappi e molti altri oggetti, spesso monouso, destinati ad un utilizzo quotidiano. I polimeri plastici sono ampiamente usati anche nell'industria tessile, per la realizzazione di indumenti, nella realizzazione di vernici e pitture, materiale destinato alle attività di pesca, come reti o lenze. Tra i numerosi polimeri sintetizzati sei sono quelli maggiormente prodotti nel mondo che prevedono l'utilizzo in innumerevoli settori: polietilene (PE), polipropilene (PP), polistirene (PS), polietilene tereftalato (PET), polivinilcloruro (PVC), poliuretano (PUR).

Le ottime proprietà della plastica, però, rappresentano dei benefici legati solamente alla vita all'interno delle società umane. Le proprietà di resistenza, versatilità e leggerezza fanno sì che le plastiche siano identificate come una delle più gravi minacce ambientali registrate ai giorni nostri. Un eccessivo utilizzo dei prodotti in plastica, un errato smaltimento e l'abbandono accidentale o volontario dei rifiuti e degli oggetti monouso ha determinato negli anni un accumulo di questi all'interno degli ecosistemi. La plastica è ubiquitaria, la sua presenza è stata registrata ovunque nel mondo, grazie alla leggerezza del materiale, in associazione con l'azione degli agenti atmosferici, dei moti ondosi e dei movimenti orizzontali e verticali determinati dalle correnti, viene trasportata facilmente anche negli angoli più remoti del pianeta.

Durante gli anni intorno al 1960 sono emerse le prime testimonianze riguardanti la presenza dei rifiuti nell'ambiente terrestre ma soprattutto in quello marino, rivolgendo l'attenzione ai rifiuti galleggianti in acqua e sono state descritte le interazioni tra questi e gli organismi marini, i quali, entrandovi in contatto, vi rimangono aggrovigliati o li ingeriscono accidentalmente, andando incontro, nella maggior parte dei casi alla morte. Per molto tempo sono state osservate e descritte questo tipo di interazioni e la presenza degli oggetti di grandi dimensioni negli ambienti marini. Negli ultimi decenni un altro tipo di contaminante ha catturato l'attenzione della comunità scientifica, si tratta delle particelle di plastica di piccole dimensioni provenienti dalla degradazione e frammentazione degli oggetti più grandi o di quelli prodotti originariamente secondo quelle dimensioni. Queste particelle sono state identificate come *microplastiche*, aventi dimensioni minori di 5 mm fino ad 0.1 μm . Considerate le ridotte

dimensioni, le microplastiche rappresentano una grave minaccia per gli ecosistemi poiché sono in grado di entrare all'interno della catena alimentare, entrando in contatto con gli organismi invertebrati che non erano minacciati dagli oggetti di maggiori dimensioni. Questi organismi sono quelli appartenenti ai livelli trofici che stanno alla base della catena alimentare, essi interagiscono con le microparticelle di plastica essendo dello stesso range dimensionale degli alimenti di cui si nutrono (fitoplancton o zooplancton). Esistono numerose testimonianze di organismi filtratori o depositivori che ingeriscono accidentalmente le microplastiche, le quali riescono così a raggiungere i più alti livelli trofici, arrivando anche all'uomo. Esistono diversi studi, infatti, che hanno descritto la presenza di particelle di plastica all'interno dello stomaco dei pesci. L'ingestione delle plastiche determina anche danni fisici e strutturali agli organismi, ha ripercussioni sui tassi di natalità, determinando conseguenze negative nei confronti di intere popolazioni. L'argomento riguardante le microplastiche richiede numerose indagini mirate alla conoscenza della loro distribuzione nell'ambiente e le fonti più comuni di immissione, per risalire all'origine del problema, cercando di ridurre le immissioni, e sviluppare delle metodologie e proposte per ridurre la loro concentrazione all'interno degli ecosistemi.

Il lavoro di tesi ha interessato sei aree ubicate presso le coste calabresi, precisamente: la foce del fiume Corace, la foce del fiume Neto, Gioia Tauro, Villapiana, Cetraro e Vibo Marina. I siti di indagine sono quelli stabiliti in accordo con il modulo 2 della Marine Strategy Framework Directive e fanno parte della regione del Mediterraneo, nello specifico della sottoregione del Mar Ionio – Mediterraneo centrale. Lo scopo del lavoro è quello di analizzare le microplastiche ed effettuare la loro classificazione mediante un approccio analitico integrato. In particolare, sono state effettuate: analisi microscopiche, mediante stereomicroscopia, volte a identificare e suddividere le particelle di plastica in base alle loro classi dimensionali, forma e colore; analisi chimico-molecolare mediante infrarosso in trasformata di Fourier (FT-IR) per definire la tipologia del polimero. I risultati raggiunti hanno permesso di ottenere diverse informazioni circa tempi di permanenza in acqua, polimeri più abbondanti utilizzati per la loro produzione, e maggiori tipologie di rifiuti a base di plastica presenti in acqua.

Inoltre, per valutare le conseguenze dell'interazione tra gli organismi planctonici e le microplastiche alcune tra quelle provenienti dai campionamenti sono state poste a contatto per 28 giorni con una coltura del cianobatterio *Spirulina Arthrospira maxima*, valutando ogni 7 giorni i valori della densità ottica delle colture per determinare i tassi di crescita e i valori della clorofilla *a*. È stato osservato un aumento dei valori della densità ottica del cianobatterio all'aumentare del tempo trascorso a contatto con le plastiche, il risultato è interessante da approfondire nell'ipotesi che tali microrganismi siano in grado di sfruttare i polimeri della plastica come fonte di carbonio, fenomeno già noto in alcuni ceppi batterici. La concentrazione della clorofilla in funzione del tempo rileva un iniziale effetto stimolante

delle microplastiche nei primi 14 gg sulla funzionalità fotosintetica del cianobatterio seguito da un rapido decremento. Anche questo aspetto merita approfondimento in studi futuri.

I risultati delle analisi saranno utili ad ottenere informazioni circa la presenza e la dinamica delle microplastiche nella sotto-regione del Mar Ionio-Mediterraneo centrale, per valutarne l'abbondanza in relazione ai siti di campionamento, e, quindi, stabilire quanto sia influente la vicinanza alla costa e alle zone di intense attività antropiche (per esempio in prossimità di aree portuali o zone densamente abitate). Ottenere questa tipologia di dati, quali prassi metodologica abbinata alla analisi morfologica e numerica, sarà utile per la definizione di misure atte a contrastare la notevole presenza dei rifiuti in mare, riuscendo, prima di tutto, a risalire all'origine del problema e alle varie fonti di immissione delle microplastiche in mare e alla definizione delle varie tipologie maggiormente riscontrate.

CAPITOLO I

1. La plastica

Pensando alla plastica visualizziamo un'innumerabile quantità di oggetti di uso quotidiano. La plastica è un materiale malleabile, resistente, versatile e leggero, con cui è possibile realizzare diversi oggetti destinati a molteplici usi. Il termine "plastica" fa riferimento ad una categoria di materiali chiamati polimeri, cioè delle molecole costituite da lunghe catene e da pesi molecolari elevati. In natura esistono numerosi polimeri, uno tra questi è rappresentato dalla cellulosa, costituente delle specie vegetali. La produzione della plastica può avere origine dalla sintesi dei polimeri a partire da materiale naturale, come la cellulosa, ma nella maggior parte vengono utilizzati atomi di carbonio provenienti dal petrolio e da altri carburanti fossili. Questi elementi vengono poi lavorati insieme al carbone, al gas e al sale comune consentendo di realizzare diverse tipologie di materiali (sciencehistory.org). La plastica viene prodotta in particolari stabilimenti attraverso il processo di polimerizzazione, ovvero la produzione di polimeri sintetici a partire dalla distruzione delle molecole che compongono la sostanza in molecole di piccole dimensioni, i monomeri, fino alla ricostruzione delle molecole in lunghe catene, i polimeri, che vengono poi fusi tra di loro mediante il calore prodotto dai macchinari. I polimeri possono essere modellati con il calore acquisendo, quindi, diverse caratteristiche. Questi processi sono attribuibili sia ai pellet di materia plastica pura, prodotta direttamente dalla materia prima sia ai materiali plastici che hanno subito ulteriori trasformazioni come l'aggiunta di additivi per esaltare o attenuare le proprietà del materiale in relazione al suo futuro utilizzo. Gli additivi comprendono i plastificanti, coloranti, stabilizzatori e coadiuvanti alla trasformazione. La realizzazione di questi materiali rappresenta una vera e propria rivoluzione nel mercato poiché la sintesi dei polimeri permette la produzione di materiali con eccellenti proprietà di resistenza, leggerezza, versatilità che prevedono un ampio spettro di applicazioni ad un costo, spesso, molto contenuto. A livello globale sono prodotti diversi tipi di plastica, ma il mercato è dominato da sei principali classi di materiale: il polietilene (PE) ha ottime proprietà isolanti e viene utilizzato per la produzione di isolanti per cavi elettrici, buste, borse, contenitori di vario tipo, sacchetti della spesa e tubazioni. Il polipropilene (PP), che possiede un alto potere sterilizzante e per questo motivo viene utilizzata nel settore medico per la realizzazione di siringhe ed è ampiamente utilizzato nella produzione di tappi, etichette per le bottiglie, bicchieri di plastica e diversi tipi di contenitori. Il polivinilcloruro (PVC), che consente la realizzazione di tubi, isolanti termici e infissi per le abitazioni e settore edile. Il polistirene (PS), che viene generalmente usato per la produzione di posate, bicchieri, come materiale da imballaggio o isolamento. Il poliuretano (PUR), utilizzato principalmente per la produzione di materiale isolante e il polietilene tereftalato (PET), utilizzato per la realizzazione di bottiglie e contenitori per alimenti (Fig. 1).



Fig. 1 Nella figura sono rappresentate le principali classi dei polimeri della plastica richieste dal mercato globale e alcuni tra gli oggetti che ne derivano, destinati ad innumerevoli usi. (www.ecoo.it)

Grazie alle sue caratteristiche ed eccellenti proprietà la scoperta della plastica e la sua produzione sono stati avvenimenti che hanno rivoluzionato e semplificato diversi aspetti della vita quotidiana dell'uomo. Le caratteristiche della plastica, però, presentano un duplice risvolto: se da un lato rappresentano un aspetto positivo per la vita all'interno delle società umane dall'altro lato le stesse caratteristiche pongono la plastica al centro dell'attenzione per le problematiche legate agli ecosistemi sia terrestri che marini. La notevole resistenza del materiale rende difficile il suo smaltimento e, una volta raggiunti gli ambienti naturali, tende a persistere per centinaia e migliaia di anni. Inoltre, a causa della loro leggerezza possono raggiungere notevoli distanze rispetto alla loro fonte di produzione o di immissione nell'ambiente.

1.1 Storia e produzione globale

Nel 1869 è stato sintetizzato il primo polimero partire dalla cellulosa, derivata da fibre di cotone, ad opera di John Wesley Hyatt. Egli scoprì una plastica che poteva essere modellata in una varietà di forme. L'utilizzo odierno della plastica risale al 1800 con lo sviluppo delle tecnologie della gomma, grazie alla scoperta della vulcanizzazione della gomma naturale da parte di Charles Goodyear. Durante tale periodo si è assistito a numerosi tentativi per lo sviluppo di polimeri sintetici, che includevano polistirene (PS) e polivinilcloruro (PVC), ma all'epoca questi materiali erano troppo friabili per essere modellati e, dunque, per ottenere un successo di tipo commerciale. Il primo polimero completamente

sintetico (non conteneva, cioè, nessuna molecola esistente in natura) è stato sintetizzato nel 1907 da parte di Leo Baekeland, che lo ha identificato con il nome di Bakelite ed è stato ampiamente prodotto con successo. Più tardi, intorno al 1930, sono state sviluppate moderne forme di polivinilcloruro (PVC), polietilene tereftalato (PET), poliuretano (PUR) e polistirene (PS).

Tra il 1930 e 1940 le materie plastiche hanno subito un significativo sviluppo commerciale registrando maggiori richieste nel mercato. L'inizio della terza rivoluzione industriale, a partire dal 1950, ha interessato anche la produzione della plastica, la quale ha subito un brusco incremento legato alle numerose richieste di tali materiali, i quali, grazie alle loro proprietà e al loro costo contenuto, prevedono una molteplicità di applicazioni in diversi campi e in numerosi aspetti della vita quotidiana. Il brusco aumento della produzione degli oggetti in plastica ha determinato, per oltre 20 anni, un accumulo di questi sulla superficie degli oceani. L'inquinamento legato alla presenza del materiale plastico rappresenta una delle maggiori minacce per gli ecosistemi marini. È un prodotto altamente resistente alla degradazione e per questo prevede lunghi tempi di residenza negli ambienti in cui si trova, alcuni materiali richiedono più di 500 anni per la loro decomposizione. La plastica è uno dei più comuni e persistenti inquinanti negli ambienti costieri e marini a livello mondiale (Moore, 2008) e il problema è in costante aumento. Tra il 1996 e il 1999, l'industria globale della plastica è cresciuta di circa il 4.5% ogni anno (Andrady, 2003). Dal 2010 il mondo sta producendo approssimativamente 270 milioni di tonnellate di plastica all'anno (Jambeck *et al.* 2015). Si stima che il diffuso utilizzo del materiale plastico abbia condotto ad una produzione annuale di 1.7 milioni di tonnellate nel 1950, l'anno di inizio della produzione di massa di plastica, fino a 288 milioni di tonnellate nel 2012 (PlasticsEurope, 2013), nel 2017 la produzione annuale ha raggiunto 348 milioni di tonnellate ed è in continuo aumento (PlasticEurope, 2018). Recenti stime suggeriscono che circa 270.000 tonnellate di plastica fluttuano negli oceani (Eriksen *et al.* 2014) e si prevede un probabile aumento di queste stime. Una quantità compresa tra 5 e 13 milioni di tonnellate di plastica viene rilasciata negli oceani di tutto il mondo ogni anno e, inoltre, circa 6.5 milioni di tonnellate di plastiche vengono scaricate in mare da una varietà di fonti legate alle imbarcazioni (Derraik, 2002). Mentre una parte dei rifiuti plastici è correttamente gestita (riciclata o bruciata), è probabile che il 10% di tutta la plastica prodotta finirà prima o poi nei mari e negli oceani (Thompson 2006). Dalla metà del XX secolo, l'incremento di produzione mondiale di plastica è stato accompagnato da un accumulo di rifiuti negli ecosistemi marini (Barnes *et al.* 2009; Thompson *et al.* 2004). I rifiuti plastici sono, a livello mondiale, incredibilmente persistenti negli oceani e si distribuiscono lungo tutti gli strati della colonna d'acqua, rappresentando gli inquinanti principali delle acque superficiali, pelagiche e del benthos marino. Nonostante la presenza di plastica venga attribuita maggiormente agli ambienti marini, recentemente è stata registrata in tutte le acque del mondo, dall'Artico al Mar Mediterraneo, nell'Oceano Pacifico (Fig. 2),

nei fiumi continentali e nei laghi. Anche gli ecosistemi terrestri ne risultano interessati, infatti la presenza di plastica è stata documentata ovunque nel mondo, è stata rinvenuta nei ghiacciai, fino a 10 Km di profondità (fossa delle Marianne) e a più di 8000 metri di altezza (Monte Everest). La notevole concentrazione di plastica nell'ambiente marino è da considerarsi un'emergenza globale, che necessita di un repentino intervento per contrastare l'inevitabile perdita della diversità biologica che ne conseguirà.



Fig. 2 L'immagine ritrae la cosiddetta "Great Pacific Garbage Patch", formatasi per opera delle correnti oceaniche che hanno convogliato i rifiuti, provenienti dai fiumi, al centro dei vortici oceanici. Le dimensioni stimate sono comprese tra i 700 mila e i 10 milioni di Km². (www.forbes.com)

1.2 Il "Marine Litter"

L'ambiente marino rappresenta una risorsa naturale di vitale importanza per il Pianeta. Gli ecosistemi marini ed oceanici ospitano una vasta biodiversità, e nonostante il benessere umano sia legato strettamente al mare e alle sue risorse, l'uomo ne ha alterato gli equilibri durante gli ultimi secoli. La pesca, l'inquinamento, l'esplorazione delle profondità marine alla ricerca degli idrocarburi, l'acidificazione oceanica e il riscaldamento della temperatura degli oceani accompagnata da un innalzamento del livello del mare come conseguenza dello scioglimento dei ghiacciai (IPCC 2004) sono importanti esempi riferiti alla pressione che l'essere umano esercita nei confronti degli ambienti marini, che determinano negative ripercussioni ecologiche e socio-economiche. Durante le recenti decenni la presenza dei rifiuti di origine antropica, che rappresenta una delle principali fonti di inquinamento degli oceani, è stata identificata come uno dei più gravi problemi ambientali di interesse

globale. Il “Marine Litter” è definito come “qualsiasi materiale solido scartato, fabbricato o trasformato, smaltito o abbandonato in ambiente marino o costiero”. È costituito da oggetti, spesso monouso, utilizzati da persone e volutamente scartati nei fiumi, in mare, sulle spiagge, trasportati dai fiumi, dalle acque reflue, dall’acqua piovana o dai venti, o quelli accidentalmente persi (UNEP, 2009). La presenza di questi rifiuti causa danni, spesso gravi, alla varietà di organismi che costituiscono gli ecosistemi marini. Sono molto diffuse le immagini degli uccelli marini, dei pesci, delle tartarughe e dei mammiferi marini che rimangono, spesso, ingarbugliati tra i rifiuti o subiscono le conseguenze dell’ingestione degli oggetti di plastica, di diverse dimensioni. Nonostante ciò, si hanno ancora limitate conoscenze circa le implicazioni del “marine litter” sugli invertebrati meno carismatici, lontani dall’opinione pubblica, ma che ricoprono un importante ruolo all’interno degli ecosistemi marini.

La presenza di rifiuti in mare è stata menzionata per la prima volta nella letteratura scientifica nel 1960, e le numerose ricerche che ne seguirono affermarono una costante crescita della quantità di detriti negli ecosistemi oceanici. Diversi studi hanno mostrato che il costituente principale dei rifiuti è la plastica, associata ad un continuo aumento della produzione globale annuale di 299 milioni di tonnellate (PlasticsEurope, 2015). È stato stimato che il 10% di tutti i rifiuti plastici si ritrova negli oceani (Thompson 2006). Eriksen *et al.* (2014) hanno stimato che circa 5.25 trilioni di particelle di plastica equivalenti ad un peso di 268,940 di tonnellate galleggiano nel mare, senza considerare i rifiuti sul fondale o sulle spiagge. Una delle prime testimonianze riguardo la presenza dei rifiuti galleggianti e i loro spostamenti dovuti ai moti ondosi, alle correnti o alle spirali oceaniche appare tra le pagine del famoso romanzo “Ventimila leghe sotto i mari” di Jules Verne, nel 1870. Nella letteratura scientifica Kenyon e Kridler (1969) sono stati i primi ad aver evidenziato le interazioni negative tra gli organismi e i rifiuti di plastica, descrivendo la presenza di oggetti di plastica nello stomaco dell’Albatro di Laysan (*Phoebastria immutabilis*) nel nord-est delle isole Hawaii, evidenziando le ripercussioni che questi oggetti avrebbero potuto avere nei confronti dei pulcini, provocando loro un blocco del tratto digestivo, e quindi sulla vitalità dell’intera popolazione.

Sono presenti numerosi documenti relativi al ritrovamento di oggetti di plastica ingeriti da parte di diverse specie di uccelli marini, per esempio quelle appartenenti al genere *Pachyptila*, in Nuova Zelanda nel 1960 (Harper and Fowler 1987). Dal 1969 al 1971 sono stati documentati dei ritrovamenti di fili elastici all’interno dello stomaco di alcuni esemplari di pulcinella di mare (*Fratercula arctica*), appartenenti ad una colonia che ha registrato un basso tasso di natalità durante la stagione riproduttiva. In alcuni uccelli, questi fili assumevano una conformazione sferica con dimensioni fino a 10 mm di diametro, determinando un possibile blocco delle valvole piloriche che conducono all’intestino.

Sebbene esistano numerose testimonianze riferite agli uccelli marini e alle loro problematiche legate al contatto con i rifiuti plastici, questi non sono gli unici animali a rischio. Intorno al 1950 sono stati documentati diversi ritrovamenti di tartarughe marine che avevano ingerito buste di plastica, provocandone, a volte, la morte (Cornelius 1975; Balazs 1985). Un groviglio di lenze e altre attrezzature per la pesca sono stati ritrovati all'interno dell'intestino del lamantino dei caraibi (*Trichechus manatus*) nel 1974 (Forrester *et al.* 1975), dal 1970 risultano ritrovamenti di cetacei la cui morte è stata causata dall'ingestione di materiale plastico (Cawthorn 1985). Tra il 1967 e il 1975 si è registrato un aumento costante di foche impigliate nelle isole Pribilof (Fowler, 1987). Più di 660 specie, tra gli animali marini, entrano in contatto, in un modo o in un altro, con i rifiuti plastici (GEF, 2012). (Fig. 3a, b)



Fig. 3a. L'immagine ritrae un esempio di interazione tra vertebrati marini e i rifiuti di plastica abbandonati nell'ambiente. (www.oggiscienza.it)



Fig.3b. L'immagine ritrae un esempio di interazione tra vertebrati marini e i rifiuti di plastica abbandonati nell'ambiente. (www.greenme.it)

I rifiuti marini derivanti da fonti naturali, come i resti di vegetazione fluttuanti o i depositi di ceneri vulcaniche sono comunemente presenti all'interno degli oceani. La dannosa presenza di un'altra tipologia di rifiuti, derivante dai manufatti umani, è incrementata notevolmente negli ultimi cento anni. I rifiuti provenienti da fonti non-naturali sono definiti come "qualsiasi materiale solido scartato, fabbricato o trasformato, smaltito o abbandonato in ambiente marino o costiero" (Galgani *et al.* 2011). Il Marine Litter ricopre vaste superfici del pianeta, è presente in tutti i mari del mondo e in tutti gli oceani, non solo nelle regioni densamente popolate, ma anche in aree remote, lontano dalle fonti dirette di immissione e dal contatto umano (Ryan, 2015). È costituito da oggetti di diversa composizione e dimensione, da oggetti in metallo, vetro, carta, tessuto o plastica. Tra questi, i rifiuti di plastica sono considerati come i più persistenti e problematici, corrispondono al 60-80% di tutto il Marine Litter (Derraik, 2002). La plastica è stata documentata all'interno di molti habitat marini e degli

ecosistemi a livello mondiale, è ingerita da numerosi organismi e sono stati documentati i ritrovamenti di diverse tipologie di plastica dislocate in differenti punti del globo. La leggerezza dei materiali plastici permette che questi siano trasportati per lunghe distanze rispetto all'area di immissione nell'ambiente. La fonte di immissione della plastica è definita *source*, i punti in cui si accumula vengono definiti *sinks*, corrispondenti principalmente ad aree oceaniche (Thompson *et al.* 2009 a, b; UNEP 2005). Risalire alle dinamiche che correlano le *sources* e i *sinks* (Fig. 4) è importante per monitorare i rifiuti di plastica e capire se questi provengono dalla terraferma o dagli oceani. Analizzando le componenti del Marine Litter è possibile risalire, in molti casi, alla loro fonte di ingresso. Gli oggetti di plastica all'interno del Marine Litter aumentano allontanandosi dalla fonte perché questi vengono trasportati più facilmente rispetto ai materiali che presentano valori maggiori di densità, come il vetro o il metallo, e perché hanno una durata maggiore rispetto agli oggetti di minore densità, come i materiali di carta. Molti oggetti di plastica sono meno densi rispetto all'acqua circostante, mentre altri presentano una densità maggiore (per esempio la poliammide, il polietilene tereftalato, il polivinilcloruro).

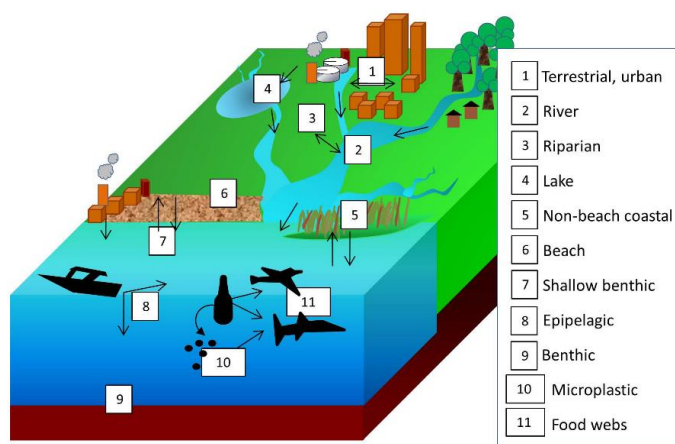


Fig. 4 La figura rappresenta i principali percorsi attraverso i quali i rifiuti antropici raggiungono gli habitat terrestri, i fiumi e gli ecosistemi marini. (www.journals.plos.org)

1.3 Fonti di immissione dei rifiuti marini e la loro diffusione nell'ambiente marino

È possibile risalire a due fonti principali da cui deriva la plastica all'interno degli ecosistemi marini: i rifiuti di origine marina gettati in mare dalle imbarcazioni e i rifiuti di origine terrestre, come i rifiuti trasportati dai fiumi, il trattamento delle acque reflue, il trasporto ad opera dei venti e i rifiuti abbandonati sulle spiagge. Molti tra questi oggetti derivano, quasi con certezza, da fonti quali attrezzature da pesca, da rifiuti correlati ai liquami e da oggetti utilizzati durante i periodi interessati dalle intense attività turistiche.

I rifiuti di origine terrestre includono principalmente quelli derivanti da un uso ricreativo delle coste, dalle industrie, dai porti, dalle discariche non protette e da quelle situate nei pressi delle coste, ma anche dalla fuoriuscita dei liquami e dalla perdita accidentale degli oggetti di uso quotidiano. Circa il 18% del materiale plastico trovato all'interno degli ecosistemi oceanici è attribuito all'industria della pesca. Anche l'acquacoltura contribuisce in modo significativo alla presenza dei rifiuti in mare (Hinojosa and Thiel, 2009). Un'altra comune componente dei rifiuti è rappresentata dai pellets di resina vergine, che raggiungono gli oceani a causa delle perdite accidentali durante il loro trasporto o vengono rilasciati dagli impianti di trasformazione (Gregory, 1996; Ogata *et al.*, 2009). Il Marine Litter può raggiungere il mare per mezzo dei fiumi o può essere addirittura trasportato dai venti. Circa l'80% di tutti i rifiuti plastici è rappresentato dai rifiuti provenienti da fonti terrestri, inclusi i detriti sulle spiagge (Andrady, 2009). I rifiuti marini trovati sulle spiagge consistono principalmente in oggetti di plastica (bottiglie, buste, tappi, etc.), di alluminio (barattoli) e di vetro (bottiglie), la cui principale origine è dovuta alle attività ricreative vicino alle spiagge ma anche dalle correnti marine che ne determinano dei lunghi spostamenti. La parte più consistente del Marine Litter, infatti, ha origine terrestre piuttosto che marina (Galgani *et al.* 2011b).

I rifiuti di origine marina includono le navigazioni commerciali, i traghetti e i transatlantici, le navi da pesca sia commerciali che per l'utilizzo ricreativo, le flotte militari e di ricerca, le imbarcazioni da diporto e le installazioni a largo quali le piattaforme, gli impianti e i siti di acquacoltura.

Nei mari e negli oceani i rifiuti sono sottoposti alle azioni esercitate dalle correnti oceaniche, dalle maree, dai moti ondosi o dalle spirali oceaniche che ne determinano il trasporto raggiungendo aree lontane da fonti di immissione diretta. Inoltre, la tipologia e la quantità di rifiuti sono notevolmente influenzati dalla prossimità ai centri urbani, alle aree industriali, portuali e ricreative, alle rotte di navigazione e alle zone di pesca. Le valutazioni effettuate sulla composizione del Marine Litter in diverse aree marine hanno dimostrato che gli oggetti di plastica, i quali includono tutti i materiali sintetici a base di petrolio, costituiscono la più grande porzione di tutti i rifiuti inquinanti

CAPITOLO II

2. Le microplastiche primarie e secondarie

Gli ecosistemi marini e terrestri sono gravemente minacciati dalla presenza della plastica poiché è costituita da materiali che tendono a persistere per centinaia e migliaia di anni nell'ambiente. Una volta raggiunti gli ecosistemi marini o terrestri, durante il lungo periodo di residenza, i rifiuti di plastica, di varie dimensioni, sono sottoposti ad una serie di processi di frammentazione e degradazione, legati a diversi processi fotochimici, meccanici e biologici, come l'assorbimento delle radiazioni UV, le proprietà ossidative dell'atmosfera, le proprietà idrolitiche dell'acqua del mare e le forze meccaniche esercitate dall'azione delle onde. Il risultato di questi processi condurrà ad una graduale riduzione degli oggetti di plastica in pezzi e frammenti di dimensioni minori, fino a diventare quelle che sono oggi identificate come *microplastiche*, definite come particelle di plastica aventi dimensioni minori di 5mm. Queste particelle sono attualmente considerate e trattate come una classe di inquinanti che differisce da quella degli inquinanti di materiale plastico di maggiori dimensioni. La presenza di un elevato numero di piccoli frammenti di plastica, fibre e granuli è stata rilevata in grandi concentrazioni all'interno degli ecosistemi marini (Cole *et al.* 2011).

La definizione di taglia delle microplastiche è stata discussa al primo workshop internazionale sulla presenza, gli effetti e il destino delle microplastiche in mare nel 2008, ospitato dal NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) negli USA (Arthur *et al.* 2009). I partecipanti concordarono l'adozione di una definizione pragmatica, suggerendo una dimensione compresa tra $0.1\ \mu\text{m}$ e $< 5\ \text{mm}$. Questa decisione si basava sulla premessa di voler includere un'ampia gamma di piccole particelle di plastica, le quali possono essere facilmente ingeribili dagli organismi viventi o, comunque, rappresentare ulteriori tipologie di minacce diverse rispetto a quelle rappresentate dagli oggetti di plastica di maggiori dimensioni, le quali sono state maggiormente descritte fino a quel momento. Le microplastiche possono essere distinte in due categorie: le microplastiche primarie e le microplastiche secondarie. Questa distinzione si basa sull'origine delle particelle di plastica, se la particella di plastica è stata pensata per essere originariamente prodotta secondo quelle dimensioni allora si parlerà di microplastica primaria. Se invece, il frammento di plastica è il risultato della frammentazione di un oggetto di dimensioni maggiori si parlerà di microplastica secondaria. Le microplastiche primarie includono gli "*scrubbers*" usati per pulire le superfici, le polveri di plastica usate per modellare, le micro-particelle usate nella formulazione di cosmetici e le nanoparticelle di plastica usate in una varietà di processi industriali. In aggiunta, pellets di resina di forma sferica o cilindrica, della dimensione approssimativa di 5 mm di diametro, sono ampiamente utilizzati durante il processo di manifattura della plastica e durante il trasporto delle materie prime di resina di base necessaria per la produzione

di altri prodotti di plastica. Le microplastiche secondarie, invece, sono il risultato della frammentazione di oggetti di plastica di maggiori dimensioni.

Inoltre, la plastica è sottoposta, oltre ad una variazione delle dimensioni, ad un cambiamento significativo delle proprietà chimiche e fisiche rispetto alle caratteristiche possedute in origine. La tipologia e il grado di degradazione che subisce è strettamente correlata al comparto marino in cui si trova e al tempo di residenza in quell'ambiente. Il processo è complesso ed è influenzato dal tipo di polimero da cui è costituito il materiale plastico e dall'eventuale presenza di additivi chimici aggiunti ad esso. Da un punto di vista chimico la degradazione determina una riduzione del peso molecolare dei polimeri della plastica, la diminuzione del peso molecolare influisce sull'integrità meccanica delle plastiche indebolendole e determinando una suddivisione in frammenti di più piccole dimensioni. Questi frammenti possono subire una biodegradazione microbica, i microorganismi utilizzano i polimeri plastici come fonte di carbonio e, con la disponibilità dell'ossigeno, la plastica verrà degradata completamente usando la CO₂ e la biomassa come prodotto finale (Shah *et al.*, 2008). Andrady (2011) ha classificato la degradazione in accordo con gli agenti che la determinano in:

- Biodegradazione: azione degli organismi viventi, di solito microbi.
- Fotodegradazione: azione della luce (solitamente durante un'esposizione in ambiente esterno alla luce del sole).
- Degradazione termo-ossidativa: ripartizione ossidativa lenta a temperature moderate.
- Degradazione termale: azione delle alte temperature.
- Idrolisi: reazione con l'acqua.

Andrady (2011) ha comparato la perdita di integrità meccanica di diversi oggetti in plastica esposti alle radiazioni durante la fluttuazione in acqua e altri esposti sulle spiagge negli stessi siti. È risultata una significativa riduzione nel tasso di degradazione degli oggetti fluttuanti in acqua, dovuta ad un valore di temperatura minore e ad una minore concentrazione di ossigeno nell'ambiente marino. Quindi i tassi di degradazione sono maggiori a temperature ambientali elevate. Un altro fenomeno che ritarda il processo di degradazione è la colonizzazione degli oggetti di plastica che fluttuano in mare da parte di biofilm, alghe e da colonie di invertebrati (Muthukumar *et al.*, 2011).

Sebbene i problemi legati ai detriti di plastica di maggiori dimensioni godano di un'esaustiva documentazione, solo di recente l'attenzione si sta focalizzando sull'entità dell'impatto dei frammenti di plastica sugli organismi marini, in particolar modo sugli invertebrati. I frammenti risultanti dai processi di degradazione presentano un alto potere di ingestione da parte degli organismi (Browne *et al.* 2008). A causa dell'elevato tempo di residenza dei rifiuti plastici nei mari e negli oceani, le probabilità che gli oggetti di plastica saranno degradati in frammenti di dimensioni minori sono molto elevate.

Non esistono ancora studi che forniscano delle risposte chiare riguardo l'impatto dell'ingestione delle microparticelle di plastica, poiché risulta difficile quantificare le plastiche all'interno dei tessuti (Browne *et al.*, 2008). Nonostante la diffusione a livello mondiale dei frammenti di plastica, gli studi riguardanti il carico globale di plastica sulla superficie degli oceani non hanno ancora fatto emergere i dati rispecchianti le aspettative, portando alla conclusione che è necessario effettuare un numero maggiore e approfondito di studi per quantificare la presenza delle microplastiche nel mare e le possibili conseguenze sia sugli ecosistemi che sugli organismi.

2.1 Distribuzione globale e abbondanza delle microplastiche

In riferimento ai rifiuti è necessario considerare anche i frammenti derivanti dalla degradazione di questi ultimi, costituenti le meso-particelle (5 – 2.5 cm) e le microparticelle (<5 mm), che sono diventati sempre più numerosi e fluttuano raggiungendo notevoli distanze, rispetto alla fonte di immissione. La plastica costituisce generalmente la parte più consistente dei rifiuti in mare ed è ubiquitaria, raggiungendo il valore del 95% dei rifiuti accumulati sulla battigia, sulla superficie del mare e sul sedimento. Recenti studi hanno dimostrato che anche le microplastiche, così come i rifiuti di maggiori dimensioni sono diffuse nelle superfici oceaniche, nella colonna d'acqua e nei sedimenti e sono state ritrovate persino nelle profondità marine. Una considerevole parte di questi materiali si decompone molto lentamente, impiegando centinaia di anni, o, in alcuni casi, non si decompone mai del tutto. L'abbondanza, la distribuzione, l'accumulo e il tipo di rifiuti che si trovano in mare aperto o lungo le spiagge mostrano delle variabili spaziali notevoli e sono influenzati da diversi fattori geomorfologici e idrografici (Barnes *et al.*, 2009; Galgani *et al.*, 2000), dai modelli oceanici, dal clima e dalle maree, dalla vicinanza alle aree urbane, industriali e ricreative, dalle attività idrodinamiche e marittime, dalle rotte di navigazione e dalle zone di pesca. In molti Stati sono stati effettuati dei monitoraggi delle spiagge e regolari pulizie e sopralluoghi in mare per ottenere informazioni circa la distribuzione spaziale e temporale del "Marine Litter". Bacini chiusi come il Mediterraneo o il Mar Nero possono accumulare alcune tra le più alte densità di rifiuti marini nel sedimento, raggiungendo più di 100.000 pezzi per km² (Galgani *et al.* 2000). A partire dai primi studi nel 1972, la quantità delle microplastiche nei mari Europei è aumentata notevolmente, comparando i dati risalenti agli anni 2000 (Thompson *et al.* 2004). Dati recenti suggeriscono che le quantità di microplastiche sembrano aver raggiunto un livello stabile nel nord dell'oceano Atlantico durante l'ultima decade (Law *et al.* 2010). È necessario tenere in considerazione che le tendenze temporali di accumulo sono influenzate dai cambiamenti stagionali nei tassi del flusso dei fiumi, delle correnti, dell'azione delle onde, dei venti etc. A causa delle molteplici variabili che influiscono sulla distribuzione dei rifiuti, le conoscenze riguardanti le tendenze di accumulo sono ancora limitate.

Per quanto riguarda la distribuzione globale delle microplastiche in mare, una recente stima ha suggerito che potrebbero esserci tra 7000 e 35.000 tonnellate di plastica fluttuanti negli oceani. Un altro studio ha stimato la presenza di più di 5 trilioni di pezzi di plastica e più di 250.000 tonnellate fluttuano attualmente negli oceani (Eriksen *et al.* 2014). La continua richiesta di produzione di prodotti plastici ha raggiunto 299 milioni di tonnellate nel 2013 e continua ad aumentare (PlasticsEurope 2015). Infatti, la produzione globale di plastica è aumentata da 5 milioni di tonnellate l'anno durante gli anni intorno al 1950 fino a più di 280 milioni di tonnellate oggi (Thompson *et al.* 2009; PlasticsEurope 2011). Nonostante i frammenti di plastica subiscano i processi di degradazione, la plastica non è biodegradabile ed è probabile che quasi tutti i materiali plastici prodotti siano ancora presenti sul pianeta (a meno che non siano stati inceneriti). Quindi, anche se si dovesse interrompere la produzione e l'utilizzo degli oggetti di plastica, la quantità di microplastiche in mare continuerebbe ad aumentare come conseguenza della frammentazione degli oggetti di dimensioni maggiori già esistenti. Sembra, infatti, che la loro abbondanza e distribuzione globale negli oceani abbia raggiunto un progressivo incremento durante le recenti decadi (Cole *et al.* 2011). Una volta arrivate in mare le microplastiche sono trasportate attraverso il globo dalle correnti oceaniche, la loro presenza è descritta all'interno degli ecosistemi oceanici a livello mondiale. La contaminazione da microplastiche è stata riportata, su scala globale, dai poli all'equatore (Barnes *et al.* 2009; Browne *et al.* 2011), attraverso le acque superficiali degli oceani (Law *et al.* 2010), negli estuari e nei laghi, nei mari (Browne *et al.* 2011) sulle battaglie delle acque dolci e nei sedimenti subtidali (Browne *et al.* 2011) fino alle profondità marine. Recentemente la presenza di notevoli concentrazioni di microplastiche è stata registrata anche nei mari Artici, con valori di densità due ordini di magnitudo più alti rispetto a quelle che contaminano le acque superficiali, come quelle del vortice subtropicale del Nord del Pacifico (Obbard *et al.* 2014). La presenza delle microplastiche nei ghiacciai potrebbe contribuire ad un ulteriore rilascio di queste ultime negli ecosistemi marini dell'Artico, a seguito dello scioglimento dei ghiacciai, dovuto ai cambiamenti climatici su scala globale. Le microplastiche si accumulano negli strati superficiali dell'acqua, soprattutto negli habitat neustonici (Ryan *et al.*, 2009). Questa tipologia di habitat dà rifugio alla fauna, specializzata per vivere in quei determinati ambienti, dello zooplancton. Da diversi studi oceanografici è emersa la presenza di un alto valore di concentrazione di microplastiche sulla superficie degli oceani e dei mari: nel nord-est del Pacifico, nell'oceano Pacifico del nord (Moore *et al.*, 2001), nel mar dei Sargassi (Law *et al.*, 2010) e nelle acque a largo della California.

Con il passare degli anni si è registrato un continuo aumento dell'abbondanza delle microplastiche: Thompson *et al.* (2004) hanno dimostrato l'estensione spaziale dell'accumulo di questo tipo di contaminanti. Hanno registrato la presenza di piccole particelle di plastica nei sedimenti dalle spiagge dell'UK e archivi di campionamenti, risalenti al 1960, che registravano piccolissime particelle di plastica

nel plancton. Thompson *et al.* (2004) hanno utilizzato i campioni di plancton per esaminare i cambiamenti temporali nelle acque superficiali nel nord della Scozia e hanno mostrato un significativo aumento nell'abbondanza delle microplastiche come risultato della comparazione dei dati risalenti agli anni tra il 1960 e il 1970 con quelli compresi tra il 1980 e 1990. Goldstein *et al.* (2012) hanno comparato l'abbondanza nelle aree altamente contaminate del Pacifico, registrando un incremento dell'abbondanza nel tempo. Le concentrazioni di microplastiche nei vortici subtropicali del nord del Pacifico sono aumentate di due ordini di magnitudo nelle quattro decadi passate (Goldstein *et al.* 2013). La distribuzione e l'abbondanza delle microplastiche sono influenzate notevolmente dai vortici e dalle correnti oceaniche, dipendendo dai pattern stagionali (Doyle *et al.* 2011). Sospese nella colonna d'acqua, le microplastiche possono essere intrappolate dalle correnti oceaniche e accumulate nelle regioni oceaniche centrali (e.g. Law *et al.* 2010). Le spirali oceaniche (Fig.5) e le zone convergenti sono aree note per l'accumulo dei rifiuti, il pattern rotazionale delle correnti causa un'alta concentrazione di oggetti di plastica che vengono catturati e spostati verso il centro della regione oceanica.



Fig.5 I 5 vortici oceanici che influenzano la distribuzione e l'accumulo della plastica in hot-spot.
(www.21stcentech.com)

I numerosi ed estesi campionamenti effettuati da Law *et al.* (2010) hanno dimostrato il ruolo, su larga scala, dei fattori fisici che conducono ad un aumento dell'abbondanza nelle spirali oceaniche del nord dell'Atlantico, pur essendo molto distanti dalla terraferma. Altre comparazioni hanno anche dimostrato, su scala più piccola, che le località usate per riversare i liquami mostrano quantità di microplastiche maggiori rispetto alle aree dove non è avvenuto alcun rilascio di liquami (Browne *et al.* 2011). Inoltre, i sedimenti intertidali delle zone sottovento rispetto alla direzione del vento prevalente possono avere una maggiore quantità di microplastiche rispetto a quelli sulle coste esposte al vento.

Anche le caratteristiche fisiche dei polimeri della plastica, inclusa la loro densità, possono influenzare la loro distribuzione nella colonna d'acqua e negli habitat bentonici. Gli oggetti di plastica galleggianti fluttuano in superficie, mentre le microplastiche più dense o quelle colonizzate dagli animali tendono ad andare verso il fondo. È stato stimato recentemente che il 50% degli oggetti di plastica proveniente dai rifiuti urbani ha una densità maggiore rispetto all'acqua di mare ed è, quindi, probabile che tenderà ad affondare (Engler 2012). La densità è un parametro importante da tenere in considerazione poiché influenza strettamente la distribuzione delle microplastiche nell'ambiente. La densità delle particelle di un polimero vergine è spesso alterata durante i processi di manifattura (per esempio la densità aumenta a seguito dell'aggiunta di fissativi organici, invece diminuisce allo schiumare del polimero) così come a seguito dell'accumulo dei microrganismi sulla superficie. Visto che molti polimeri sintetici hanno una densità minore rispetto a quella dell'acqua di mare, una grande quantità di particelle di plastica fluttua sulla superficie dell'acqua ma è presente anche negli strati sottostanti della colonna d'acqua e anche il sedimento sembra rappresentare un'area in cui avviene il deposito delle microplastiche, mentre nelle spiagge, che rappresentano un ambiente intermedio, si possono accumulare oggetti che occuperanno la parte superficiale delle acque o che finiranno sul fondale. Comunque, il galleggiamento e la gravità specifici degli oggetti di plastica possono cambiare in relazione al tempo trascorso in mare, essendo sottoposti all'erosione causata dagli agenti atmosferici e alla colonizzazione da parte di organismi viventi, che influenzano la loro distribuzione sulla superficie dell'acqua, negli strati più profondi della colonna d'acque, nel sedimento, nelle spiagge e nel ghiaccio.

Alcuni studiosi sostengono che le profondità marine rappresentino i luoghi in cui è maggiormente probabile che le microplastiche si accumulino (Galgani *et al.* 1996). Durante le prime supervisioni sono stati registrati valori di abbondanza più bassi nel mare profondo rispetto agli habitat superficiali (Van Cauwenberghe *et al.* 2013), ma gli studi più approfonditi, usando differenti approcci per registrare la presenza delle particelle di plastica, hanno evidenziato l'importanza della profondità marina come punto di arrivo per le microplastiche. Sebbene siano ancora richieste ulteriori investigazioni per confermare la relativa importanza del mare profondo come luogo in cui affondano le microplastiche e per comprendere il loro destino a lungo termine nelle acque profonde e l'entità di ogni successivo deterioramento o biodegradazione in tempi prolungati (Zettler *et al.* 2013).

È evidente, dunque, che le microplastiche presentino diversi input di immissione nell'ambiente e sono diffuse ampiamente negli habitat naturali, inoltre sono ingerite da un ampio range di organismi viventi, inclusi gli invertebrati bentonici, numerose specie di pesci, uccelli e mammiferi marini. Esistono numerosi studi riguardanti i possibili danni fisici e tossicologici provocati dall'ingestione delle particelle di plastica.

2.2 Conseguenze sugli organismi e sugli ecosistemi

A causa delle loro ridotte dimensioni, i piccoli frammenti di plastica sono disponibili per gli invertebrati che occupano i più bassi livelli trofici poiché hanno lo stesso range dimensionale della sabbia, del plancton e delle particelle in sospensione. Gli invertebrati marini con cui entrano in contatto sono quelli che, di solito, non sono interessati dai rifiuti plastici di dimensioni maggiori. Molti di essi ingeriscono, insieme al cibo, le particelle di plastica. L'assorbimento delle microplastiche da parte degli organismi invertebrati dipende da una combinazione di parametri (la taglia, la forma e la densità delle particelle di plastica) che determinano la posizione delle microparticelle all'interno della colonna d'acqua, e perciò la disponibilità nei confronti degli animali. Solitamente, le particelle a bassa densità fluttuano negli strati più alti della colonna d'acqua, mentre le particelle ad alta densità tendono ad affondare e ad accumularsi nel sedimento, la prima tipologia sarà disponibile per gli organismi filtratori, la seconda per gli organismi depositivori (Browne et al., 2007). L'ingestione delle microplastiche produce effetti negativi da un punto di vista fisico e chimico nei confronti degli organismi, i monomeri e gli additivi plastici possono, infatti, determinare carcinogenesi e distruzione delle ghiandole endocrine. I composti possono bioaccumularsi all'interno degli organismi vertebrati o invertebrati che ingeriscono plastica, con conseguenze, ancora non del tutto conosciute, nei confronti delle specie di ogni livello trofico della catena alimentare. Il destino di questi inquinanti è ancora poco conosciuto, ma di recente le microplastiche sono state identificate come importanti vettori di contaminanti per gli organismi marini esposti ad esse, provocando un accumulo supplementare, con un conseguente aumento della concentrazione chimica all'aumentare del livello trofico nelle reti alimentari, secondo il processo della biomagnificazione. (Fig.6)

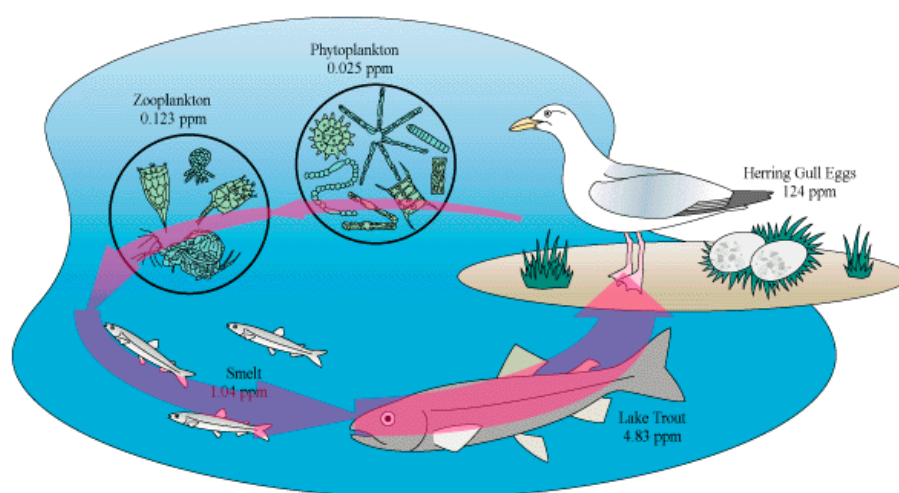


Fig.6 L'immagine rappresenta il processo di biomagnificazione dei contaminanti nella catena alimentare. Secondo tale processo i contaminanti ingeriti vengono trasferiti dai livelli trofici più bassi (fitoplancton o zooplancton) fino agli organismi dei livelli trofici più alti, aumentando i valori di concentrazione ad ogni livello trofico. (chem.libretexts.org)

Da diversi esperimenti in laboratorio è emerso che numerosi invertebrati marini, con differenti strategie di alimentazione, ingeriscono le microplastiche: i detritivori (*Amphipoda*), i depositivori (*Anellida*) e i filtratori (*Cirripeda*) (Thompson *et al.*, 2004) così come le oloturie (depositivori e filtratori di particelle in sospensione) (Graham and Thompson, 2009). Una volta ingerite, le microplastiche verranno traslocate dal tratto digestivo al sistema circolatorio degli organismi. Browne *et al.* (2008) hanno descritto l'ingestione di microsfele di polistirene (3 e 10 μm) da parte dei bivalvi appartenenti alla specie *Mytilus edulis* e la traslocazione di queste verso il sistema circolatorio. Le particelle più piccole sembrano essere quelle più facilmente trasportabili rispetto a quelle più grandi. Ancora si hanno a disposizione pochi dati riguardanti l'assorbimento e l'accumulo delle microplastiche all'interno degli organismi (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). Le microplastiche sono state ritrovate anche nello stomaco di alcuni pesci planctivori (*Myctophidae*, *Stomiidae* e *Scomberesocidae*) nelle spirali a nord dell'oceano Pacifico. Insomma, diversi aspetti relativi all'impatto, sia fisiologico che ecologico, che le microplastiche possono rappresentare sia sugli organismi che sull'ambiente richiedono numerosi studi, così come è importante analizzare gli effetti che l'ingestione della plastica determina sulla catena alimentare.

Viste le negative conseguenze che le microplastiche determinano nei confronti degli ecosistemi, la valutazione della distribuzione delle microplastiche sta diventando un argomento che ha raggiunto l'interesse di diversi studiosi. Esistono numerosi percorsi che determinano l'introduzione delle microplastiche nell'ambiente marino, delle quali non si conoscono gli orizzonti temporali dei tassi di degradazione (Ryan *et al.* 2009). Quantificare le microplastiche risulta essere un lavoro arduo comparando la loro piccola taglia con la vastità degli oceani (Cole *et al.* 2011). Fino ad ora è stato condotto solo un limitato numero di studi riguardanti la quantità e la distribuzione delle microplastiche negli oceani. Per comprendere l'impatto delle microplastiche, sono stati effettuati diversi studi per quantificare la loro abbondanza nell'ambiente marino. L'esistenza di diverse metodologie, adottate per isolare, identificare e quantificare le microplastiche, rende difficile la comparazione, su grande scala spaziale e temporale, dei dati estrapolati dagli studi già esistenti. Risulta evidente, perciò, la necessità di operare seguendo una linea comune, stabilendo dei criteri universali per stimare l'abbondanza, la distribuzione e la composizione delle microplastiche. Le conoscenze circa le implicazioni future dovute alle microplastiche sono ancora limitate. È chiaro ed inevitabile che la quantità di microplastiche nell'ambiente tenderà ad aumentare come conseguenza della frammentazione dei rifiuti di maggiori dimensioni o dell'introduzione delle microplastiche primarie, risultano meno chiari i loro percorsi e gli hot-spot di accumulo. In conclusione, 10 anni dopo che il termine "microplastica" è entrato a far parte del linguaggio scientifico e dopo una consistente quantità

di ricerche riferite a questi piccoli detriti rimangono ancora molte domande in sospeso riguardo l'accumulo e le conseguenze della contaminazione da microplastiche nell'ambiente.

CAPITOLO III

3. La Direttiva Marine Strategy

La Direttiva quadro 2008/56/CE denominata Marine Strategy Framework Directive (MSFD) sulla Strategia per l'Ambiente Marino è stata emanata il 17 giugno 2008 dal Parlamento Europeo ed il Consiglio dell'Unione Europea. La direttiva è stata recepita in Italia con il d.lgs. n. 190 del 13 ottobre 2010.

L'emanazione di tale direttiva risponde all'esigenza di salvaguardare gli ecosistemi marini, sottoposti a sempre più frequenti minacce legate alle attività antropiche, le quali determinano diversi tipi di alterazione degli ambienti marini dovute sia ad attività svolte sulla terraferma che a quelle svolte direttamente in mare. A seguito dello sviluppo industriale, negli ultimi decenni, sono aumentate notevolmente le pressioni e le richieste nei confronti dei servizi ecosistemici marini. L'eccessivo sfruttamento degli ambienti marini ha dimostrato quanto questi siano delicati e fragili e, soprattutto, l'importanza del mantenimento degli equilibri ecosistemici per poter garantire un buono stato di salute a tutte le specie viventi, uomo compreso. L'esigenza del mantenimento di uno stato di buona salute degli ecosistemi marini risponde a questa consapevolezza: "l'ambiente marino costituisce un patrimonio prezioso che deve essere protetto, salvaguardato e, ove possibile, ripristinato al fine ultimo di mantenere la biodiversità e preservare la diversità e la vitalità di mari ed oceani che siano puliti, sani e produttivi" (strategiamarina.isprambiente.it).

L'obiettivo di tale direttiva è il raggiungimento di un buono stato ambientale delle acque marine, inteso come la capacità di preservare la diversità biologica (rappresentata dalla complessità degli ecosistemi e la varietà di organismi facenti parte di essi), la vitalità dei mari e degli oceani affinché siano puliti, sani e produttivi, utilizzando le risorse in modo sostenibile, salvaguardandole per le generazioni presenti e future. L'Unione Europea considera, dunque, l'ambiente marino in un'ottica ecosistemica e gli Stati Membri condividono l'obiettivo di raggiungere il buono stato ambientale (GES, "Good Environmental Status") entro il 2020. Ogni stato deve mettere in atto un "programma di misure".

3.1 Programmi di monitoraggio della strategia marina

Per l'attuazione di un efficiente programma di monitoraggio sono state individuate due principali fasi costituenti la direttiva. La prima è definita "fase di preparazione" ed è costituita da:

- Elaborazione di una Valutazione iniziale (2012);
- Determinazione del Buono Stato Ambientale e definizione dei Traguardi ambientali (D.M. 17 ottobre 2014);

- predisposizione e avvio dei Programmi di monitoraggio e individuazione degli indicatori ambientali (D.M.11 febbraio 2015).

La seconda fase è costituita dall'identificazione dei Programmi di Misure:

- elaborazione di Programmi di Misure (POM) entro il 2015;
- avvio dei Programmi di Misure entro il 2016.

La MSFD segue un ciclo d'attuazione di sei anni, al termine del quale queste strategie sono sottoposte a valutazione ed eventuale aggiornamento.

La direttiva ha suddiviso le acque marine europee in quattro regioni: Mar Baltico, Oceano Atlantico nordorientale, Mar Mediterraneo e Mar Nero. Per alcune di queste sono state individuate delle sotto-regioni, nel Mediterraneo ne sono state individuate tre: il Mediterraneo occidentale; il mar Adriatico; il mar Ionio e Mediterraneo centrale (Fig 7). Le acque marine italiana appartengono a tutte le tre sotto-regioni.



Fig. 7 Le tre sotto-regioni del Mediterraneo individuate dalla Strategia Marina. (Marine Strategy Framework Directive)

Nonostante le divisioni in regioni e sotto-regioni è bene ricordare il legame esistente tra tutti gli ambienti marini rendendoli assimilabili ad un unico grande ecosistema, è, dunque, necessario che gli Stati Membri cooperino per garantire che le strategie siano coordinate per ogni regione o sotto-

regione marina e che siano coerenti e ben integrate con le strategie previste da atti normativi comunitari già esistenti (sui trasporti, sulla pesca, sul turismo etc.) e accordi internazionali.

Per mettere in atto queste strategie e le valutazioni previste dalla Direttiva sono stati stabiliti 11 descrittori che descrivono l'ecosistema una volta che il buono stato ambientale è stato raggiunto (Tabella 1).

Descrittore 1	La biodiversità è mantenuta. La qualità e la presenza di habitat nonché la distribuzione e l'abbondanza delle specie sono in linea con le prevalenti condizioni fisiografiche, geografiche e climatiche.
Descrittore 2	Le specie non indigene introdotte dalle attività umane restano a livelli che non alterano negativamente gli ecosistemi.
Descrittore 3	Le popolazioni di tutti i pesci, molluschi e crostacei sfruttati a fini commerciali restano entro limiti biologicamente sicuri, presentando una ripartizione della popolazione per età e dimensioni indicativa della buona salute dello stock.
Descrittore 4	Tutti gli elementi della rete trofica marina, nella misura in cui siano noti, sono presenti con normale abbondanza e diversità e con livelli in grado di assicurare l'abbondanza a lungo termine delle specie e la conservazione della loro piena capacità riproduttiva.
Descrittore 5	È ridotta al minimo l'eutrofizzazione di origine umana, in particolare i suoi effetti negativi, come perdite di biodiversità, degrado dell'ecosistema, fioriture algali nocive e carenza di ossigeno nelle acque di fondo.
Descrittore 6	L'integrità del fondo marino è ad un livello tale da garantire che la struttura e le funzioni degli ecosistemi siano salvaguardate e gli ecosistemi bentonici, in particolare, non abbiano subito effetti negativi.
Descrittore 7	La modifica permanente delle condizioni idrografiche non influisce negativamente sugli ecosistemi marini.
Descrittore 8	Le concentrazioni dei contaminanti presentano livelli che non danno origine a effetti inquinanti.
Descrittore 9	I contaminanti presenti nei pesci e in altri prodotti della pesca in mare destinati al consumo umano non eccedono i livelli stabiliti dalla legislazione comunitaria o da altre norme pertinenti.
Descrittore 10	Le proprietà e le quantità di rifiuti marini non provocano danni all'ambiente costiero e marino
Descrittore 11	L'introduzione di energia, comprese le fonti sonore sottomarine, è a livelli che non hanno effetti negativi sull'ambiente marino.

Nel 2014 sono stati avviati dal Ministero i Programmi di Monitoraggio ai sensi dell'Art. 11 del D.Lgs.190/2010. Nel Dicembre 2014 il Ministero dell'Ambiente ha stipulato un Accordo con le Regioni costiere per l'attuazione dei Programmi di monitoraggio ai sensi dell'art. 11 del D.Lgs 190/2010.

Nel 2015 le attività di monitoraggio, previste dall'Art. 11 del D.Lgs.190/2010, sono state affidate dal MATTM (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare) alle ARPA (Agenzia Regionale Protezione Ambientale) delle varie regioni, in virtù della Convenzione stipulata alla fine del 2014. Il MATTM ha stipulato 3 convenzioni con le ARPA capofila, una per ciascuna sotto-regione, per svolgere attività di monitoraggio organizzate in 9 Moduli operativi:

Modulo 1: Analisi della colonna d'acqua;

Modulo 2: Analisi delle microplastiche;

Modulo 3: Specie non indigene;

Modulo 4: Rifiuti spiaggiati;

Modulo 5: Contaminazione;

Modulo 6: Input da nutrienti;

Modulo 7: Habitat coralligeno;

Modulo 8: Habitat fondi a Maerl;

Modulo 9: Habitat di fondo marino sottoposti a danno fisico.

Così come è di fondamentale importanza che gli Stati Membri attuino una strategia univoca per i monitoraggi degli ecosistemi marini è altrettanto importante che tutte le Arpa incaricate dello svolgimento dei monitoraggi utilizzino metodologie di campionamento ed analisi uguali in tutte le regioni, che vengano svolte delle attività di formazione per gli operatori che garantiscano l'uniformità dei dati derivanti dal monitoraggio e che venga creata una banca dati centrale per la raccolta, gestione e condivisione dei dati, anche a livello comunitario.

3.2 MODULO 2 della Marine Strategy: Analisi delle microplastiche, macroplastiche e altri rifiuti flottanti

Il modulo 2 focalizza l'attenzione sulle microplastiche. Negli ultimi decenni la produzione e l'utilizzo della plastica è aumentata in modo esponenziale determinando il rilascio negli ambienti marini e terrestri da una notevole varietà di fonti. Le microplastiche rappresentano quella componente del *marine litter* avente dimensioni minori di 5 mm e che inevitabilmente entra a far parte della catena trofica di moltissimi organismi marini che ne ingeriscono i frammenti accidentalmente. La presenza del *microlitter* all'interno delle catene alimentari genera delle disastrose conseguenze a livello dell'intero

habitat. L'obiettivo del modulo 2 è quello di indagare gli effetti delle microplastiche, su scala internazionale, a livello di habitat ed ecosistemi marini ed in particolare sulle comunità di *plancton* (organismi marini vegetali e animali di piccole dimensioni) e *necton* (pesci, cefalopodi, rettili, mammiferi e uccelli marini). Le strategie di attuazione di questo modulo prevedono attività di campionamento ed analisi di laboratorio al fine di valutare l'abbondanza e la composizione delle microplastiche flottanti in mare.

Le aree di indagine del modulo 2 in riferimento alla sotto-regione del Mar Ionio-Mediterraneo centrale sono scelte sulla base delle indicazioni del Piano Operativo delle Attività (POA), in corrispondenza di plume fluviale (Foce fiume Crati, Foce fiume Neto, Cetraro), strutture portuali di grosso cabotaggio (Gioia Tauro e Vibo Marina), rilevanti insediamenti urbani ed industriali (Catanzaro Lido), tra 0.5 Mn e 6 Mn dalla costa (Fig 10).

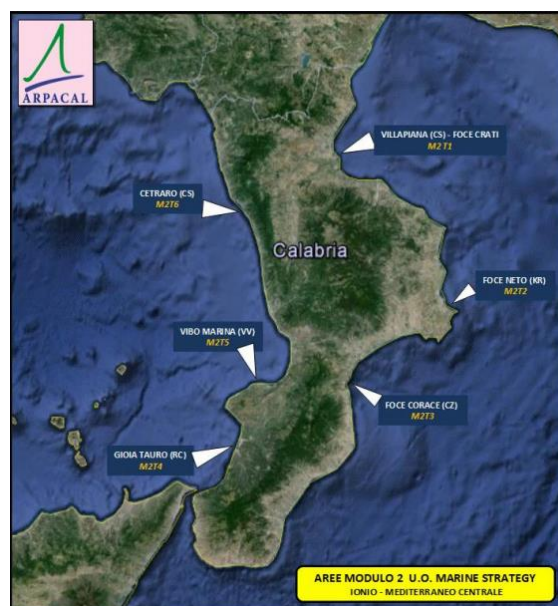


Fig. 8 Aree di indagine stabilite dal modulo 2 della strategia marina. (Arpacal-Marine Strategy)

Le metodologie di campionamento delle microplastiche verranno descritte nel capitolo IV, sui materiali e metodi.

Per quanto riguarda l'analisi delle macroplastiche e dei rifiuti flottanti l'obiettivo riguarda la raccolta sistematica di dati per la valutazione del descrittore 10 su rifiuti flottanti ed in particolare su: composizione, quantità e distribuzione territoriale dei rifiuti nello strato superficiale della colonna d'acqua. I transesti in cui vengono effettuate le indagini sono i medesimi di quelli scelti per l'analisi delle microplastiche. Il monitoraggio visivo viene effettuato all'interno di una striscia di 10 m. Perché si effettui un'osservazione ottimale degli oggetti è importante che le indagini vengano svolte con mare calmo e, inoltre, la striscia osservata non deve essere interessata dalle turbolenze provocate dal

motore della barca. Per ogni oggetto osservato vengono annotate una serie di caratteristiche: codice GPS, sorgente, tipo di uso, galleggiamento, composizione, classe di grandezza, colore, stato.

3.3 Concentrazioni di microplastiche nella Sottoregione Mar Ionio-Mediterraneo Centrale

La Commissione europea con la Nuova Decisione-Decisione (UE) 2017/848- che definisce i criteri e le norme metodologiche relative al buono stato ambientale delle acque marine, nell'ambito del Descrittore 10 della Marine Strategy Framework Directive (MSFD), ha condotto gli stati membri al monitoraggio dei rifiuti marini tenendo in considerazione i seguenti elementi: rifiuti marini spiaggiati, rifiuti marini flottanti, rifiuti marini sul fondo, microrifiuti, rifiuti ingeriti da animali marini, e specie di uccelli, mammiferi, rettili, pesci o invertebrati a rischio a causa dei rifiuti. Gli Stati Membri, durante il triennio 2015-2017, hanno svolto le indagini per valutare la presenza e l'impatto dei rifiuti marini e i risultati sono stati presentati, a livello nazionale, durante il convegno "Un quadro di plastica. I rifiuti e le plastiche in mare", tenutosi il 9 ottobre a Roma, a cura del ministero dell'Ambiente, Ispra e Snpa, che ha permesso di trattare globalmente un tema di particolare rilievo come quello dei rifiuti e della plastica a mare.

In riferimento alle problematiche legate alla presenza di microplastiche nella sotto-regione Mar Ionio-Mediterraneo centrale sono state effettuati i monitoraggi coordinati da Arpa Calabria. La sotto-regione comprende le regioni Calabria, Sicilia e Basilicata (Fig. 9) e copre 2.487 km di costa (il 33% della costa italiana).

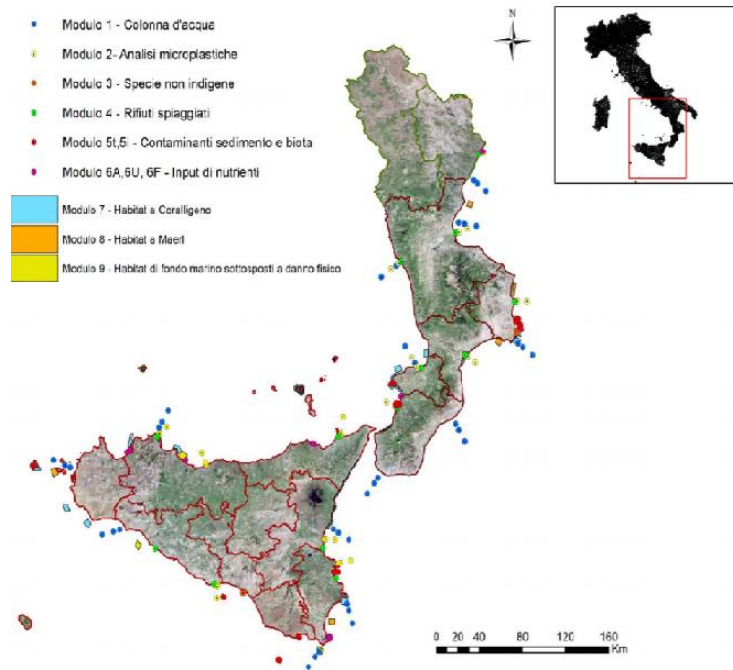


Fig 9. 11 Sotto-regione Mar Ionio- Mediterraneo Centrale. Aree all'interno delle quali sono state svolte, dall'Arpa, le attività previste dalla strategia marina nel triennio 2015-2017. (Report Arpacal 2015-2017)

Riguardo i microrifiuti nello strato superficiale della colonna d'acqua, il numero di oggetti per la Sottoregione Mar Ionio - Mediterraneo centrale è risultato pari a $0,3/m^3$, valore piuttosto basso rispetto alla media nazionale. Dall'analisi della forma la più dominante è stata il frammento, col 55% del totale, seguita da filamento (27%) e foglio (17%), Fig. Dato che si è evidenziato anche a livello di singola regione, sia per la Calabria che per la Basilicata dove i più abbondanti sono stati i frammenti, rispettivamente 51% e 86%, seguiti da foglio (13%) per la Basilicata e filamento (27%) per la Calabria. La Sicilia invece ha evidenziato come forma principale il filamento (52%) seguita dal frammento (28%). Il colore prevalente è stato il bianco (37%), seguito dal trasparente (22%) e dal blu (12%). Come per le forme, anche per i colori Calabria e Basilicata hanno riportato una situazione simile, con circa il 50% del totale di bianco, seguito dal 21% di trasparente, mentre per la Sicilia si è riscontrata una percentuale pressoché costante, intorno al 20-22% per i colori blu, nero, rosso e trasparente, e solo il 12% di bianco (dati pubblicati su Ecoscienza, numero 1, anno 2020). (Fig 10a, b)

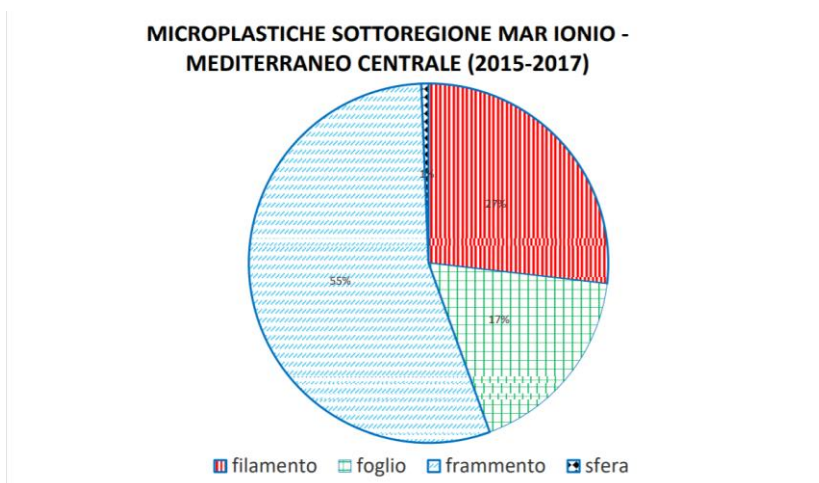


Fig. 10a Valori in percentuale delle microplastiche suddivise in base alla forma, nella Sotto-regione Mar Ionio-Mediterraneo centrale. (Report Arpacal 2015-2017)

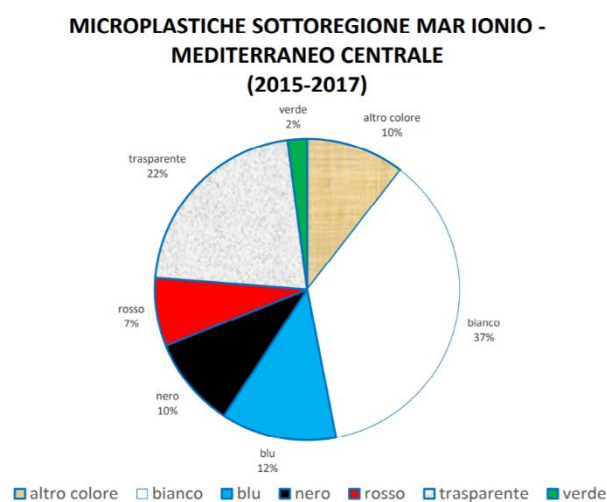


Fig. 10b Valori in percentuale delle microplastiche suddivise in base al colore, nella Sotto-regione Mar Ionio-Mediterraneo centrale. (Report Arpacal 2015-2017)

È evidente, dai risultati dei monitoraggi, che la sotto-regione del Mar Ionio-Mediterraneo centrale sia interessata dalla presenza delle microplastiche. È di fondamentale importanza, dunque, conoscere la concentrazione delle microplastiche, poiché le plastiche di tali dimensioni riescono ad entrare facilmente all'interno delle catene trofiche a partire dai livelli più bassi fino a raggiungere i livelli più alti. Viste le ridotte dimensioni le microplastiche non si trovano soltanto nelle aree in prossimità delle fonti di immissione ma presentano una distribuzione ubiquitaria, essendo sottoposte a tutti i processi idrodinamici.

CAPITOLO IV

4. Materiali e metodi

4.1 Aree di studio e fasi di campionamento

La raccolta dei campioni di microplastiche è avvenuta durante il mese di gennaio 2020 e durante il periodo primaverile-estivo, tra i mesi di maggio e agosto 2020, in corrispondenza di 6 aree all'interno delle quali sono stati individuati dei transetti di indagine.

Le aree si trovano al centro del bacino del Mediterraneo, lungo le coste della Calabria, ovvero: Cetraro, Vibo Marina, Gioia Tauro, Foce del fiume Neto, Foce del fiume Corace, Villapiana (Fig. 11). Il numero e la posizione dei transetti sono stati stabiliti sulla base delle indicazioni del Piano Operativo delle Attività (POA), in modo da fornire un'immagine rappresentativa dell'intera regione, tenendo in considerazione le aree di massimo e minimo impatto antropico. I prelievi sono stati effettuati considerando le zone di *upwelling* e *downwelling* e le aree di accumulo per condizioni idrodinamiche locali, in corrispondenza delle aree fluviali, delle aree portuali, delle aree in prossimità di insediamenti urbani e industriali.

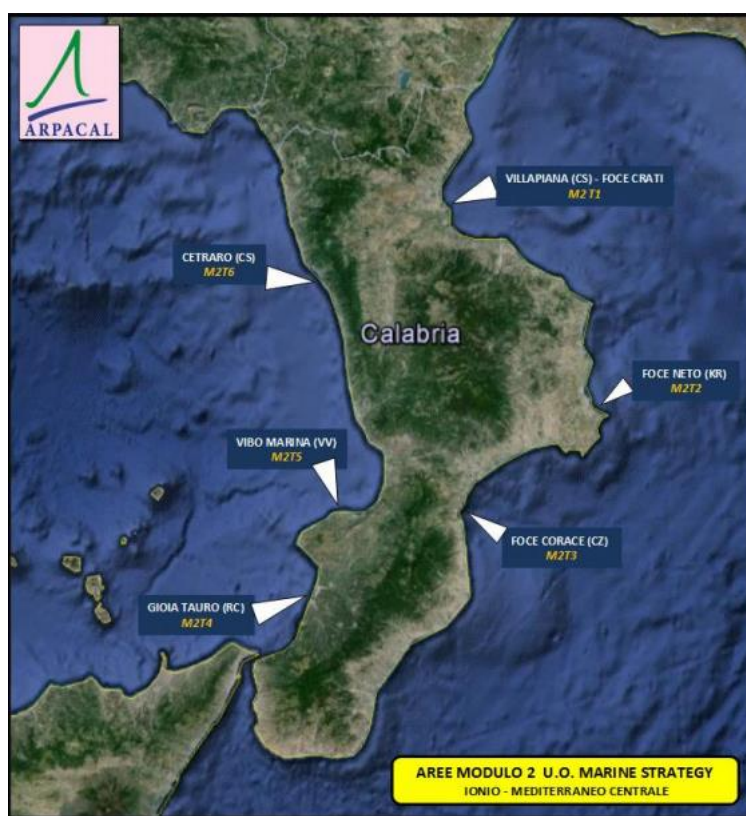


Fig. 11 In figura sono evidenziati i siti, descritti nel modulo 2 della Marine Strategy, in cui è avvenuto il campionamento. (Arpacal-Marine Strategy)

Inoltre, le fasi di campionamento sono effettuate in corrispondenza di 6 stazioni, poste a diversa distanza dalla costa, 0,5, 1,5 e 6 Mn (miglia nautiche), lungo transetti ortogonali alla linea di costa. La rete viene poi calata e trainata per 20 minuti attraverso un percorso lineare, in senso opposto alla corrente superficiale o alla direzione del vento. Le fasi iniziali del campionamento hanno previsto il rilievo delle caratteristiche, per ogni stazione posta a diversa distanza dalla costa, relative alla profondità del fondale ad inizio retinata, l'altezza delle onde (m), la velocità del vento (m/s), la direzione del vento (° dal N), la velocità di imbarcazione (Mn/h) e la trasparenza (m), mediante di Disco di Secchi (Tabella 2).

Aree di indagine	Profondità Fondale Inizio retinata	Altezza Onde (m)	Velocità vento (m/s)	Direzione Vento (° dal N)	Velocità Imbarcazione (Mn/h)	Trasparenza (m)
Neto 0,5 Mn	30	0,1	0,2	50°	2,9	10
Neto 1,5 Mn		0,1	0,2	50°	2,8	9,5
Neto 6 Mn		0,1	0,2	50°	2,9	11
Corace 0,5 Mn	236	0,3	2	270°	2	3,5
Corace 1,5 Mn	150	0,5	2	270°	2,3	10
Corace 6 Mn	915	0,5	2	270°	2	10
Vibo M. 0,5 Mn		0	<0,1		2,5	6
Vibo M. 1,5 Mn		0	<0,1		2	8,8
Vibo M. 6 Mn		0	>0,1		2	9
Villapiana 0,5 Mn		0,2	0,1	220°	3	3,5
Villapiana 1,5 Mn	680	0,2	0,1	220°	3	3,5
Villapiana 6 Mn	1200	0,3	0,1	220°	3	4,5
Gioia Tauro 0,5 Mn	60	0	0		2,8	6
Gioia Tauro 1,5 Mn	140	0	0		2,7	9,5
Gioia Tauro 6 Mn	320	0	0		3	10

Cetraro 0,5 Mn	18	0,1	0,3	90°	3	6,5
Cetraro 1,5 Mn	68	0,1	0,3	90°	3	17,9
Cetraro 6 Mn	512	0,1	0,3	90°	3	13

Tabella 2 Parametri registrati durante il campionamento.

Le microplastiche tendono ad accumularsi sulla superficie del mare, a causa delle loro dimensioni ridotte, del peso e della densità relativa. Il campionamento, dunque, viene effettuato mediante l'utilizzo di una rete, di tipo "manta" (Fig. 12), adatta per navigare nello strato superficiale della colonna d'acqua. La manta è costituita da una bocca rettangolare metallica da cui si diparte il cono di rete ed un bicchiere raccogliitore finale; il galleggiamento sulla superficie è garantito dalla presenza di due ali metalliche vuote esterne alla bocca. La misura della bocca di riferimento è 25 cm di altezza per 50 cm di larghezza, la lunghezza della rete è di circa 2,5 m. La rete deve avere un vuoto di maglia di 330 µm, e deve essere munita di flussimetro, uno strumento di misura della portata di un fluido, ovvero definisce la quantità di sostanza che passa attraverso una sezione nell'unità di tempo. Il flussimetro è, dunque, utile per il calcolo della quantità di microplastiche in relazione al volume di acqua filtrato, che viene calcolato mediante la formula: $V = N \times A \times c$

Dove: N rappresenta il numero di giri dell'elica registrato dal flussimetro durante il transetto, A rappresenta l'area della bocca della rete utilizzata, c è una costante, tipica di ogni flussimetro.

Le dimensioni delle ali della manta sono in funzione del peso della bocca ed è consigliabile che abbiano dimensioni comprese tra 40-70 cm di lunghezza. La manta viene calata lentamente dall'imbarcazione e lasciata in galleggiamento, assicurandosi che sia lontana dalla scia di navigazione dell'imbarcazione, poiché la turbolenza potrebbe alterare il reale valore relativo alla presenza delle microplastiche.



Fig. 12 Rete di tipo "manta". (Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare)

Di seguito, nella tabella 3, è riportato il numero del registro dei campioni, il codice dei campioni, il codice del punto e la descrizione del punto, ogni informazione è relativa ad ogni transetto di indagine a diversa distanza dalla costa.

N° registro campioni	Codice campione	Codice punto	Descrizione punto
2442 CRSM/2020	2006C02T1ASW-Manta	M2-T1	Villapiana (CS) 0.5 Mn
2443 CRSM/2020	2006C02T1BSW-Manta	M2-T1	Villapiana (CS) 1.5 Mn
2444 CRSM/2020	2006C02T1CSW-Manta	M2-T1	Villapiana (CS) 6 Mn
2455 CRSM/2020	2006C02T2ASW-Manta	M2-T2	Foce fiume Neto (Kr) 0.5 Mn
2454 CRSM/2020	2006C02T2BSW-Manta	M2-T2	Foce fiume Neto (Kr) 1.5 Mn
2453 CRSM/2020	2006C02T2CSW-Manta	M2-T2	Foce fiume Neto (Kr) 6 Mn
2447 UOMS/2020	2006C02T3ASW-Manta	M2-T3	Foce fiume Corace (CZ) 0.5 Mn
2448 UOMS/2020	2006C02T3BSW-Manta	M2-T3	Foce fiume Corace (CZ) 1.5 Mn
2449 UOMS/2020	2006C02T3CSW-Manta	M2-T3	Foce fiume Corace (CZ) 6 Mn
2456 CRSM/2020	2006C02T4ASW-Manta	M2-T4	Gioia Tauro (RC) 0.5 Mn
2457 CRSM/2020	2006C02T4BSW-Manta	M2-T4	Gioia Tauro (RC) 1.5 Mn
2458 CRSM/2020	2006C02T4CSW-Manta	M2-T4	Gioia Tauro (RC) 6 Mn
2236 UOMS/2020	2001C02T5ASW-Manta	M2-T5	Vibo Marina (VV) 0.5 Mn
2237 UOMS/2020	2001C02T5BSW-Manta	M2-T5	Vibo Marina (VV) 1.5 Mn
2238 UOMS/2020	2001C02T5CSW-Manta	M2-T5	Vibo Marina (VV) 6 Mn
2450 CRSM/2020	2006C02T6ASW-Manta	M2-T6	Cetraro (CS) 0.5 Mn
2452 CRSM/2020	2006C02T6BSW-Manta	M2-T6	Cetraro (CS) 1.5 Mn
2451 CRSM/2020	2006C02T6CSW-Manta	M2-T6	Cetraro (CS) 6 Mn

Tabella 3 Sigle dei campioni per ogni sito in cui è stato effettuato il prelievo primaverile-estivo.

Una volta riportata in superficie la rete viene sciacquata con acqua di mare dall'esterno verso l'interno in modo da convogliare tutto il materiale raccolto verso il bicchiere raccoglitore. Il campione viene versato in un barattolo da 500 ml in vetro per le successive analisi, a cui viene aggiunto un fissativo (alcol etilico al 70%), al fine di prevenire la decomposizione della sostanza organica presente (zooplancton, fitoplancton etc.).

4.2 Metodi

4.2.1 Analisi in stereomicroscopia ottica

Le osservazioni delle microplastiche sono state effettuate tramite le analisi allo stereomicroscopio (Fig. 13), un tipo di microscopio ottico che consente una visione stereoscopica (binoculare) dell'oggetto che si sta osservando. Tramite tale strumento è possibile effettuare un'osservazione preliminare del campione senza intaccarne l'integrità, definendone gli aspetti morfologici più evidenti. In uno stereomicroscopio si osserva la luce riflessa dal campione e non quella trasmessa, essa rende possibile l'osservazione di campioni spessi o opachi, difficilmente osservabili tramite un microscopio a trasmissione. Grazie alle coppie di obiettivi e oculari, lo stereomicroscopio è uno strumento ottico a bassi ingrandimenti che consente una visione 3D di ciò che si sta osservando. Gli ingrandimenti variano da 9x a 10x e, in alcuni casi, possono raggiungere i 180x. Lo strumento è costituito da due percorsi ottici ben distinti, i quali captano l'immagine da un'unica lente posta frontalmente e la visione di ciò che si sta riprendendo si ottiene tramite due oculari applicati al termine dei due percorsi ottici. I due percorsi ottici riprendono due porzioni distinte dell'oggetto in esame e sarà il nostro occhio a ricomporre le due immagini distinte, restituendoci una visione 3D.

Le componenti meccaniche dello stereomicroscopio sono:

- un robusto basamento dotato di colonna, adibita a sostenere il corpo dello stereomicroscopio, nel quale trovano posto i due percorsi ottici e la lente frontale;
- una testa binoculare con i due oculari di visione posti al disopra del corpo dello stereomicroscopio;
- una manopola esterna su cui sono incisi i rapporti di ingrandimento, per comandare gli zoom e i vari spostamenti.

Allo stereomicroscopio è possibile adattare una fotocamera per la ripresa dei campioni e un sistema di illuminazione dotato di regolatore d'intensità e temperatura di colore.



*Fig.13 Stereomicroscopio.
(wikipedia)*

4.2.2 Analisi all'infrarosso in trasformata di Fourier

Le analisi all'infrarosso in trasformata di Fourier (Fig.14) hanno reso possibile la caratterizzazione chimico-molecolare di ogni microplastica proveniente dal campionamento. Le tecniche spettroscopiche agiscono mediante l'interazione tra la luce e la materia fornendo informazioni di tipo qualitativo (elementi, composti) e di tipo quantitativo (concentrazione). La spettroscopia infrarossa si basa sul principio dell'interazione delle radiazioni elettromagnetiche nel campo dell'infrarosso con la materia, le radiazioni vengono assorbite dalle molecole, passando da uno stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. Gli spettrometri in trasformata di Fourier possono utilizzare la tecnica ATR, dall'inglese *Attenuated Total Reflectance*, che sfrutta la riflessione di un fascio IR senza che questo attraversi il campione. Quando la radiazione IR colpisce un campione avente un diverso indice di rifrazione, crea un'onda evanescente che penetra nel campione per una piccola e ben definita profondità per poi essere riflessa ed essere misurata dal rivelatore. La misura di questo breve ma ben definito cammino ottico consente di ottenere ottimi risultati su una vasta gamma di campioni senza dover sottoporli a preparazione. È una tecnica non distruttiva, ed è adatta per analisi chimiche di solidi, polveri, paste, liquidi e gel. Le analisi delle microplastiche sono state effettuate mediante spettroscopia infrarosso in trasformata di Fourier con modalità di acquisizione in Riflettanza Totale Attenuata (ATR).

La sostanza da investigare viene deposta in polvere al di sopra di un prisma costituito da un materiale ad elevato indice di rifrazione per tutte le radiazioni infrarosse (AgCl o FRS-5, una miscela di bromuri e ioduri di tallio). A strumento azionato, quando la radiazione IR viene emessa dalla sorgente (10), interagendo con la superficie del prisma, desta una serie di riflessioni tali per cui ad ogni riflessione il raggio penetra per qualche frazione di micron nella sostanza (campione), venendone in minima parte assorbito (o attenuato). Dopo alcune riflessioni sulla superficie del campione (9-10, ma anche 25 con sistemi ottici più complessi) la diminuzione dell'intensità del raggio (I) è sufficiente per essere rilevata dallo spettrofotometro, restituendo uno spettro IR in Riflettanza Totale Attenuata (ATR). Tramite gli spettri è possibile risalire alla tipologia di polimero di ogni microplastica, poiché le radiazioni infrarosse interferiscono con i legami delle molecole e degli atomi, i quali assorbono energia, ogni legame ha un certo assorbimento ed una lunghezza d'onda nell'infrarosso. Il grafico dello spettro IR mostrerà, in ascissa, una correlazione tra il numero d'onda del fotone incidente e, in ordinata, la trasmittanza.

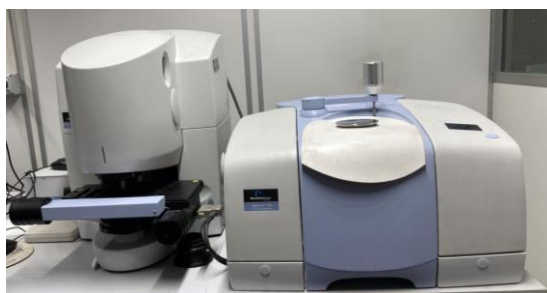


Fig.14 Foto dell'Infrarosso in trasformata di Fourier (FT-IR) utilizzato per le analisi delle microplastiche, presso i laboratori del dipartimento di Scienze della Terra (Unical).

4.3 Modello biologico: *Arthrospira maxima*

Dominio: Bacteria

Phylum: Cyanobacteria

Classe: Cyanophyceae

Ordine: Oscillatoriales

Famiglia: Microcoleaceae

Genere: *Arthrospira*

Specie: *Arthrospira maxima*



Fig. 15 Colonie di *Arthrospira maxima* (www.ansa.it)

Biologia. *Arthrospira maxima* (Fig. 15), conosciuta comunemente come Spirulina, è una specie appartenente al phylum dei Cyanobacteria. I cianobatteri sono organismi procarioti, autotrofi, in grado di compiere la fotosintesi e quindi di nutrirsi in modo autonomo producendo composti organici a partire da molecole inorganiche. Sono unicellulari e presentano diverse morfologie: filamentosa, ramificata o non ramificata.

Generalmente sono in grado di compiere una fotosintesi ossigenica, utilizzando l'ossigeno, ma, in condizioni di necessità, possono effettuare una fotosintesi anossigenica ed una respirazione anaerobica, utilizzando lo zolfo elementare al posto dell'ossigeno.

I cianobatteri possono presentarsi come singole cellule o come un aggregato di cellule disposte in colonie tenute insieme da una guaina mucillaginosa oppure presentano una serie di cellule unite le une alle altre a formare un filamento avvolto, spesso, da una guaina mucillaginosa. La guaina è costituita da polisaccaridi ed è utile per l'adesione al substrato e per la protezione dall'essiccamento e dai raggi UV.

La cellula dei cianobatteri (Fig. 16) è costituita da un nucleoide, la regione in cui si trovano i ribosomi, le sostanze di riserva azotate e gli enzimi carbonico-anidrasi e Rubisco (in grado di assimilare la CO₂ e di organicarla in molecole organiche saccaridiche).

All'interno del citoplasma si trovano i tilacoidi, contenenti i pigmenti responsabili dell'assorbimento delle radiazioni luminose per avviare il processo di fotosintesi: la clorofilla a, i carotenoidi e le ficobiline associate alle proteine per formare le ficobiliproteine, costituite da molecole che assorbono le radiazioni a diverse lunghezze d'onda, la ficoeritrina assorbe nel verde, la ficocianina nel rosso-arancio e l'alloficocianina nel rosso.

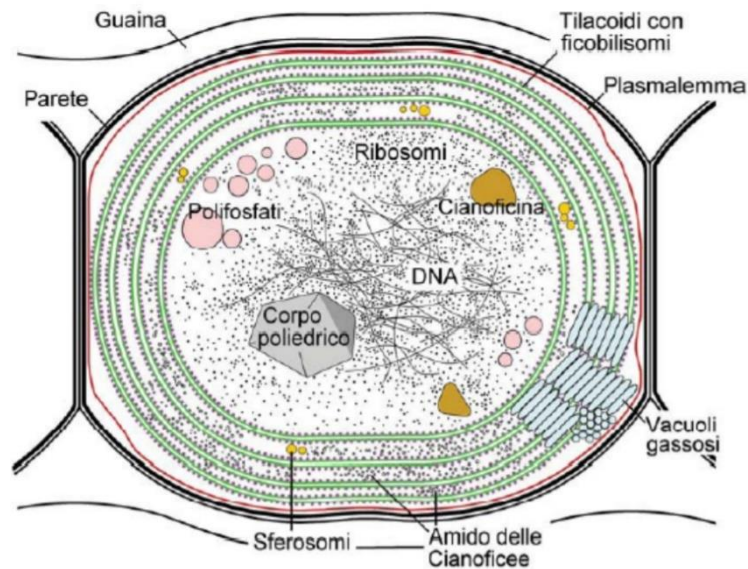


Fig. 16 rappresentazione di una cellula cianobatterica.
(www.scienze.uniroma2.it)

Ecologia. I cianobatteri sono ubiquitari, colonizzano sia gli ambienti acquatici, le acque dolci, i mari e gli oceani, che gli ambienti terrestri. Diverse specie hanno sviluppato adattamenti ad habitat che presentano condizioni estreme, è possibile trovarli, infatti, nelle regioni artiche o nelle sorgenti termali.

Arthrospira maxima. Il genere *Arthrospira* è costituito da cianobatteri liberamente fluttuanti. Vivono aggregati in colonie filamentose, presentando una caratteristica forma elicoidale, costituita da tricoli cilindrici multicellulari uniti tra loro a spirale.

Le specie appartenenti a questo genere vivono solitamente in zone costituite da climi tropicali e subtropicali in habitat caratterizzati da condizioni altamente alcaline e saline, preferendo valori di pH e sodio elevati.

Arthrospira maxima riesce a tollerare alti livelli di bicarbonato, carbonati e pH. È stata osservata, infatti, in acque con valori di concentrazione di pH pari o maggiori di 11. Grazie all'elevato contenuto di nutrienti e proteine questi organismi sono stati inseriti nella dieta di diverse popolazioni umane per centinaia di anni.

4.3.1 Metodi biologici

Ai fini di valutare un eventuale impatto dei polimeri di plastica sulla colonia di cianobatteri, coltivata seguendo i protocolli della azienda OILFOX Italia-Biorisi srl, sono stati presi due becher ponendo all'interno:

- una coltura di 500 ml di spirulina tal quale;
- una coltura di 500 ml di spirulina e 1% gr/l di microplastiche *aged*.

Entrambe le colture sono state sottoposte ad un ciclo luce/buio 12h/12h, ad una temperatura di $21 \pm 1^\circ\text{C}$, pH $9 \pm 0,5$ ed è stato aggiunto un agitatore per favorire un flusso all'interno del becher per una durata di 28 gg (Fig. 4). Le microplastiche utilizzate per la realizzazione dell'esperimento sono state ottenute dal campionamento presso i siti di Vibo Marina, dalla foce del fiume Neto e del fiume Corace. I campioni di microplastiche precedentemente caratterizzate sia dal punto di vista morfologico che strutturale con tecnologia FT-IR, sono stati disposti su una piastra Petri (Fig. 17) e pesate. Le microplastiche messe nella coltura corrispondono ai polimeri del polietilene PE, polipropilene PP e polietilene tereftalato PET, con un peso complessivo di 0,0497gr. (Fig.18)

Ogni sette giorni sono stati effettuati prelievi di Spirulina sia dalla coltura di controllo che dal trattato, prendendo in esame la crescita cellulare e il contenuto in clorofilla A a tempo T_0 , T_1 (7giorni), T_2 (14giorni), T_3 (21giorni) e T_4 (28 giorni).



Fig.17 microplastiche disposte su una piastra Petri. (Foto Lab.Bio.Pro.Ve. DipCTC, Unical)

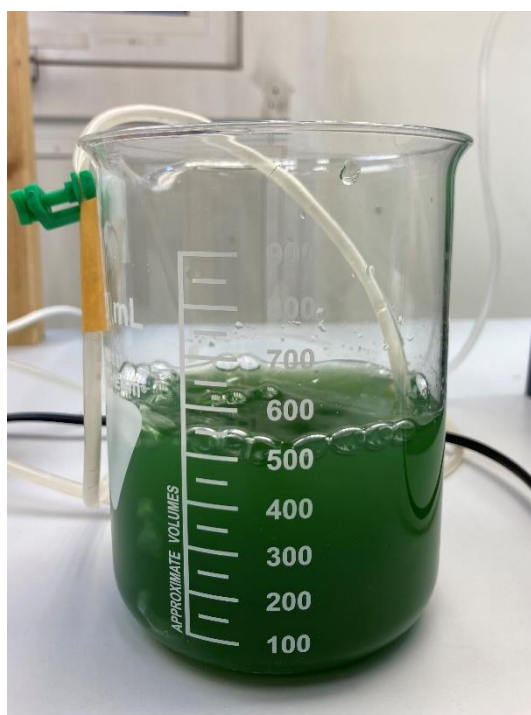


Fig. 18 Becher contenente 500 ml di una colonia di *Arthrospira maxima*, trattata con microplastiche. (Foto Lab.Bio.Pro.Ve. DipCTC, Unical)

Ogni giorno, inoltre, le colture sono state monitorate regolarmente controllando la temperatura, il pH e osservando e confrontando i campioni trattati e di controllo al microscopio ottico (Fig. 19a, b) per valutarne la forma.

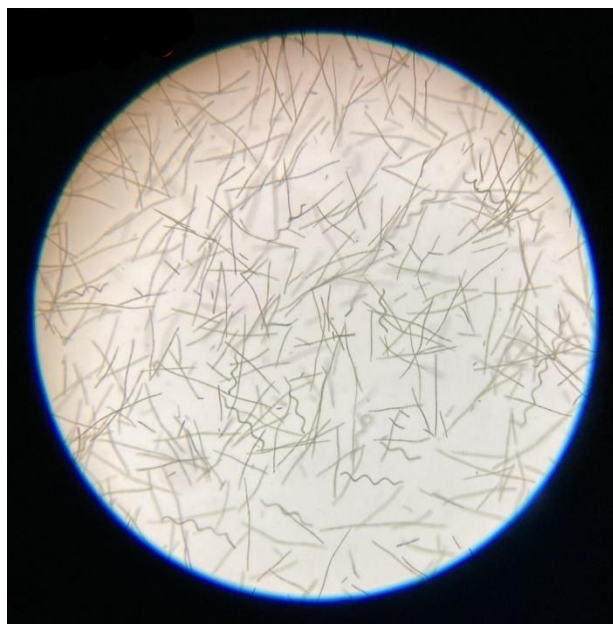


Fig. 19a Foto di *A. maxima* al M.O. con ingrandimento 10x.



Fig. 19b Foto di *A. maxima* al M.O. con ingrandimento 40x.

Per lo svolgimento dell'esperimento sono stati utilizzati diversi strumenti:

- La centrifuga, uno strumento utilizzato nel processo di separazione della fase liquida (sovranatante) e di quella solida (pellet);
- Il thermomixer, utilizzato per l'agitazione e il riscaldamento del campione;
- Lo spettrofotometro: uno strumento di analisi spettroscopica che sfrutta l'interazione tra la luce e la materia fornendo informazioni di tipo qualitativo (molecole e composti) e di tipo quantitativo (concentrazione). Da tali analisi, dunque, è possibile il riconoscimento e la quantizzazione di una sostanza in base al suo spettro di assorbimento della luce.

La capacità della luce di essere assorbita, a diverse frequenze, dalle sostanze chimiche o biologiche è il principio su cui si basano le analisi allo spettrofotometro. Lo strumento risulta essere così costituito (Fig.20):

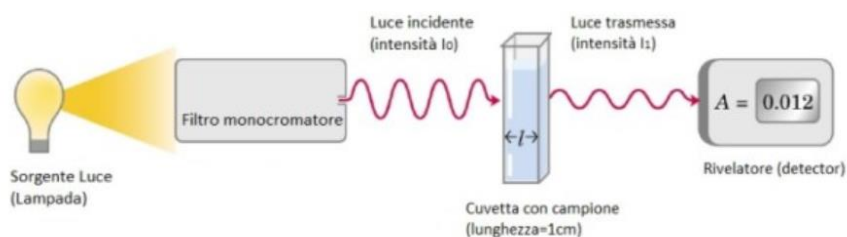


Fig. 20 Rappresentazione dell'interazione tra le radiazioni luminose e un campione all'interno dello spettrofotometro.
(www.tuttochimica.it)

Le radiazioni luminose, nell'UV/visibile, generate da una sorgente di luce passano attraverso un filtro monocromatore che permette il passaggio di una singola radiazione ad una determinata lunghezza d'onda, impostata prima dell'inizio delle analisi.

La radiazione luminosa colpisce il campione posto all'interno di una cuvetta, una particolare provetta in grado di lasciar passare, solitamente, radiazioni luminose tra 300 e 1000 nm. La radiazione luminosa verrà in parte assorbita dal campione e il raggio incidente e quello trasmesso avranno valori di intensità luminosa differenti. Il rilevatore (detector) è in grado di valutare i valori dell'intensità luminosa determinando un parametro: l'Assorbanza.

$$A = \log(I_0/I_1)$$

Prima di analizzare il campione è necessario effettuare un'azione di taratura dello strumento poiché una parte della radiazione luminosa si potrebbe disperdere o bloccare anche a causa della cuvetta o del solvente utilizzato.

Estrazione della clorofilla. L'analisi quantitativa della clorofilla *a* è stata eseguita effettuando un prelievo di 5 ml di coltura di *Spirulina* trattata con le microplastiche e 5 ml di coltura dal becher di controllo. Centrifugati per 20' a 5000 rpm a temperatura ambiente ed eliminato il sopranatante, al pellet sono stati aggiunti 5 ml di etanolo puro. Le eppendorf sono state poste in thermomixer ad 80°C per 10 minuti e successivamente raffreddate per 30 minuti. Il sopranatante è stato posto in una cuvetta per leggerne l'assorbanza a 750 nm e a 665 nm. Il contenuto in clorofilla è stato calcolato come in (Ritchie, 2006):

$$Chla \text{ (mg/L)} = 11,9035 * (Abs_{665} - Abs_{750})$$

Sono state effettuate più letture delle assorbanze a 665 nm e 750 nm: letture fuori range, ovvero con assorbanza maggiore di 1, hanno determinato la diluizione del campione con etanolo puro fino alla riduzione della loro assorbanza nel range 0-1.

Conta cellulare. La determinazione della densità ottica con il metodo semiquantitativo è stata effettuata attraverso il prelievo giornaliero di una aliquota della coltura, che è stata poi analizzata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro. Per ottenere, quindi, una correlazione tra l'assorbanza misurata e la concentrazione di cellule è necessario effettuare una retta di taratura a concentrazioni note; si ottiene così una relazione di linearità. Tuttavia, al termine della fase di crescita esponenziale del cianobatterio, la relazione tra assorbanza e concentrazione cellulare perde l'iniziale linearità per via dell'accumulo dei detriti cellulari.

Per determinare la conta cellulare ed una eventuale crescita cellulare di *A. maxima* è stata utilizzata la lettura allo spettrofotometro della densità ottica, poiché le cellule di questo cianobatterio non sono rotondeggianti ma filamentose. Un prelievo di coltura fresca viene posto in una cuvetta e viene effettuata una misurazione dell'assorbanza attraverso uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 680 nm. L'operazione è stata eseguita sia per i campioni di controllo che di trattato secondo Dubinsky Z et al., 1995.

CAPITOLO V

5. Risultati e discussioni

5.1 Analisi microscopica mediante stereomicroscopio.

L'osservazione e l'analisi dei campioni è stata effettuata presso i laboratori dell'Università della Calabria, Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra.

Come descritto precedentemente all'interno dei siti di Vibo Marina, della Foce del fiume Neto, della Foce del fiume Corace, di Cetraro, di Gioia Tauro e di Villapiana sono stati effettuati 3 campionamenti in punti differenti, ciascuno ad una determinata distanza dalla costa .. Per ogni campione è riportata la quantità di microplastiche per ogni m³ di acqua campionata.

L'analisi microscopica è stata utilizzata al fine di:

- a) quantificare le microplastiche presenti all'interno del campione
- b) definire le varie classi dimensionali;
- c) Individuare forma e colore.

A tal fine le microplastiche presenti all'interno dei contenitori con l'alcol etilico al 70% sono state disposte su una piastra Petri, smistate e contate mediante l'aiuto di una pinzetta, eliminando i residui di etanolo per evitare che potesse provocare interferenze o alterazioni dei risultati delle successive analisi (Fig. 21)

L'osservazione dei campioni è avvenuta mediante l'utilizzo di uno stereomicroscopio (Fig. 22), che sfrutta la luce riflessa dal campione, consentendo l'analisi di campioni piuttosto spessi.

Le classi dimensionali prese in considerazione sono state 6, precisamente gli intervalli dimensionali sono i seguenti: < 1 mm, 1.01-2.00 mm, 2.01-3.00 mm, 3.01-4.00 mm, 4.01-5.00 mm, >5 mm.

Riguardo alla forma la suddivisione è stata eseguita in: frammenti, fogli, filamenti, granuli, pellet, fibre e microbeads.

Infine, riguardo al colore, la classificazione ha preso in considerazione i seguenti colori: bianco, nero, rosso, blu, verde, trasparente e altro colore.

Tutte le particelle di plastica sono state contate, risultando con un totale pari a 1753. In particolare, il sito che presenta una maggiore quantità di microplastiche è quello di Cetraro (863 microparticelle), 627 microparticelle a Gioia Tauro, 136 alla foce del fiume Neto, 68 microparticelle a Villapiana, 46 a Vibo Marina ed infine 39 microparticelle presso la Foce del fiume Corace.

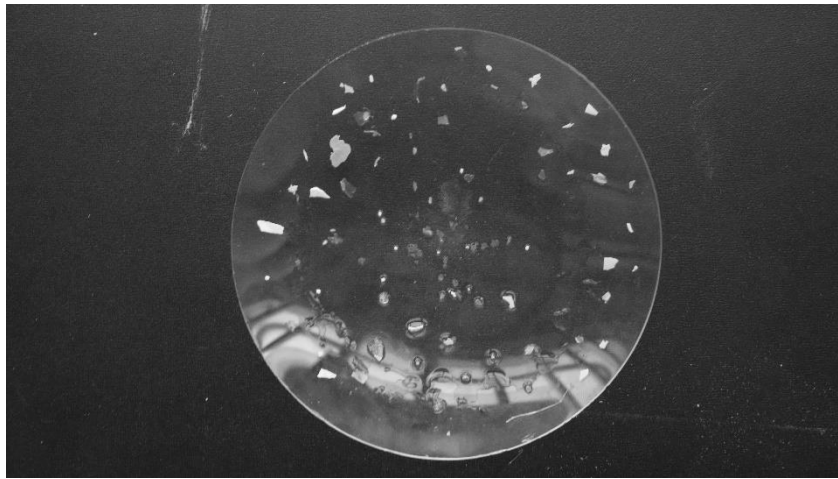


Fig. 21 Microplastiche disposte su una piastra Petri. (foto scattata presso il laboratorio di Scienze della Terra, Unical)

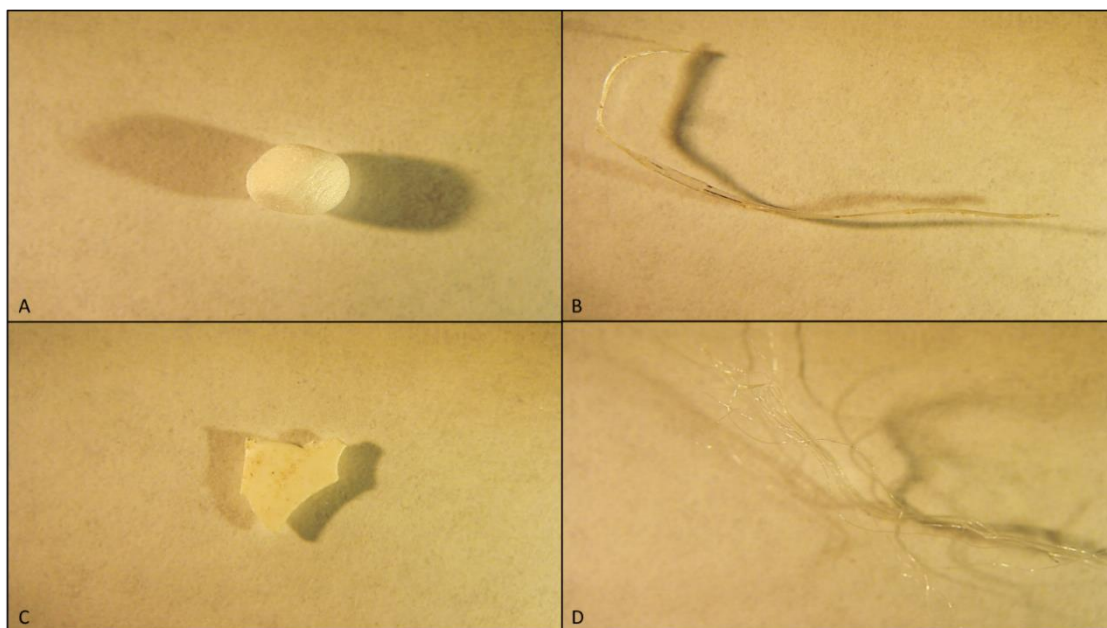
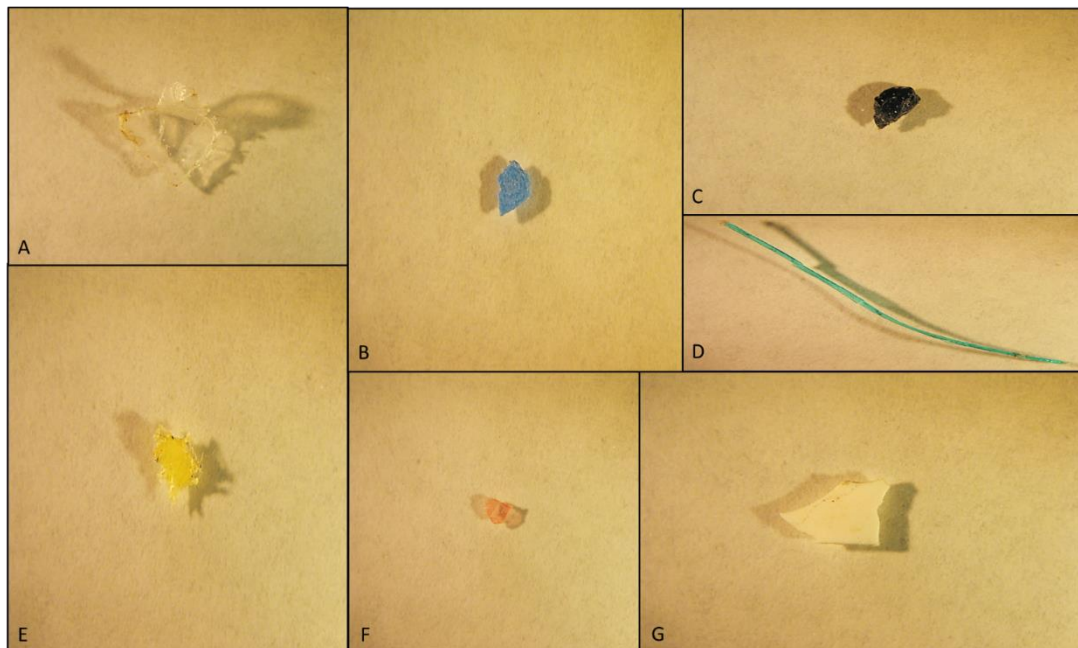


Fig. 22 Microplastiche osservate allo stereomicroscopio. (foto scattata presso il laboratorio di Scienze della Terra, Unical)

Dimensioni. Ogni particella di plastica è stata disposta su un foglio di carta millimetrata per la valutazione delle dimensioni (Fig. 23) e il successivo inserimento all'interno di una delle classi dimensionali stabilite prima dell'inizio dell'osservazione.

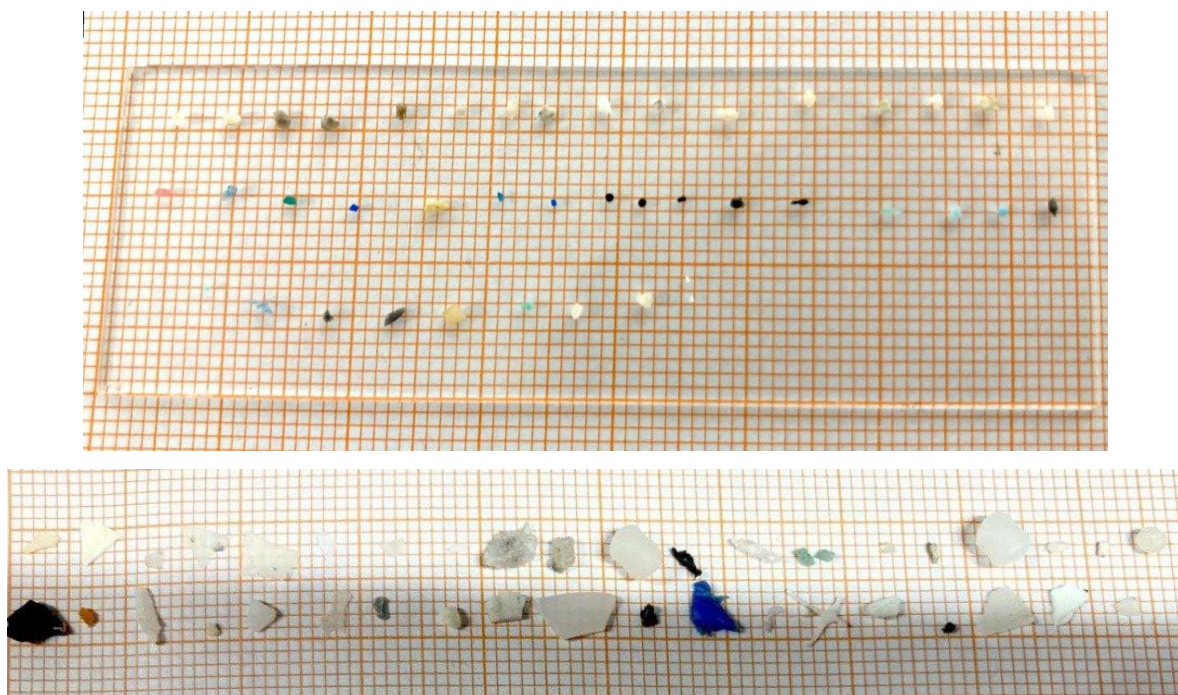


Fig. 23 Microplastiche disposte su un foglio di carta millimetrata. (foto scattata presso il laboratorio di Scienze della Terra, Unical)

All'interno dei siti nei pressi della foce del fiume Corace sono state analizzate 36 micro frammenti, queste presentano una maggiore quantità di microparticelle di plastica con dimensioni comprese tra 1.01-2.00 mm, con un valore pari al 44%, il 28% di particelle con dimensioni >5 mm, il 15% di particelle con dimensioni comprese tra 2.01-3.00 mm, l'8% di particelle con dimensioni comprese tra 3.01-4.00 mm e il 5% di particelle con dimensioni <1 mm. (Fig. 24a)

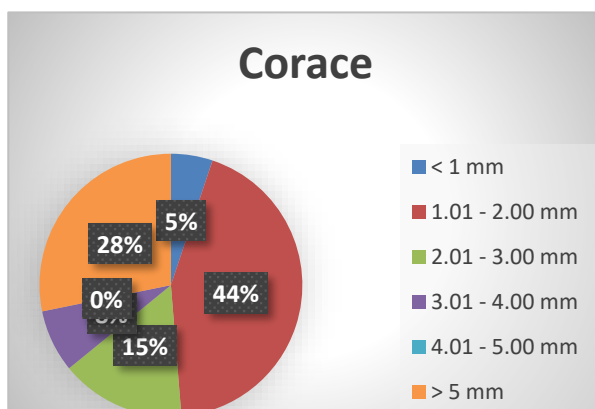


Fig. 24a Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, suddivise all'interno delle classi dimensionali presso la foce del fiume Corace.

All'interno dei siti nei pressi della foce del fiume Neto la maggiore quantità di microplastiche presenta dimensioni comprese tra 1.01-2.00 mm, con un valore pari al 42%, il 19% di particelle ha dimensioni <1 mm, il 18% di presenta dimensioni comprese tra 2.01-3.00 mm, il 9% dimensioni comprese tra 3.01-4.00 mm, il 7% ha una range tra 4.01-5.00 mm, ed infine il 5% di particelle ha dimensioni >5mm. (Fig. 24 b)

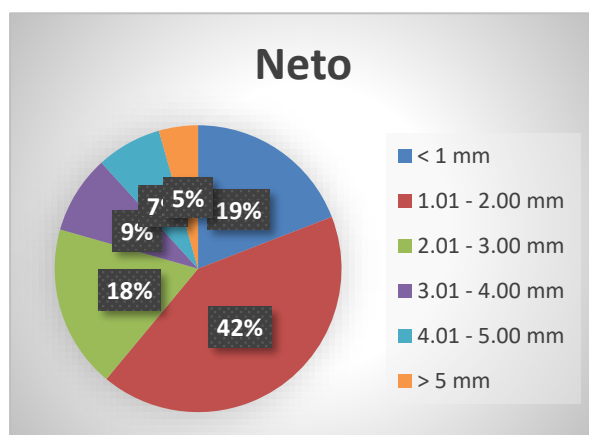


Fig. 24b Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, suddivise all'interno delle classi dimensionali presso la foce del fiume Neto.

Riguardo ai siti nei pressi di Gioia Tauro si osserva una maggiore quantità di microplastiche con dimensioni comprese tra 1.01-2.00 mm, con un valore pari al 37%, il 19% ha dimensioni <1 mm, il 21% presenta un range dimensionale dim tra 2.01-3.00 mm, il 10% ha dimensioni comprese tra 3.01-4.00 mm, il 9% di tra 4.01-5.00 mm ed infine il 4% di particelle ha dimensioni >5mm. (Fig. 24c)

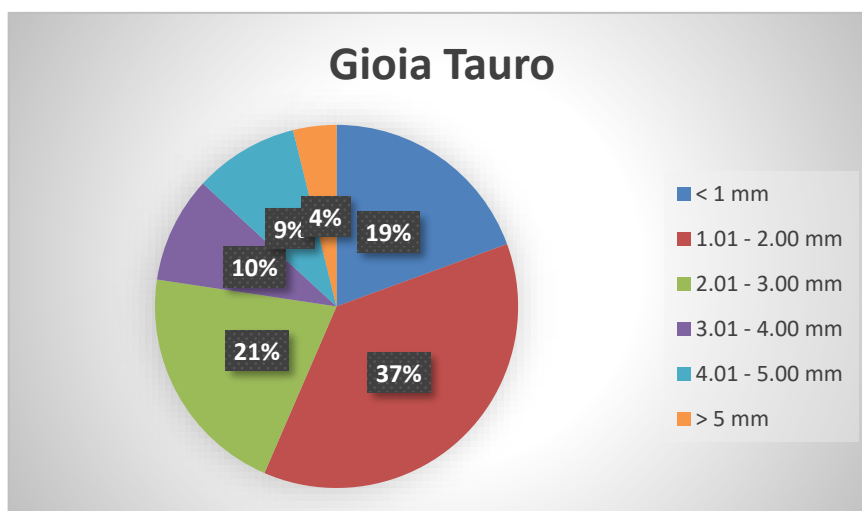


Fig. 24c Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, suddivise all'interno delle classi dimensionali presso il sito di Gioia Tauro.

I siti campionati nei pressi di Villapiana presentano una maggiore quantità di microplastiche con dimensioni comprese tra 1.01-2.00 mm, con un valore pari al 44%, il 27% di particelle con dimensioni <1 mm, il 15% con dimensioni comprese tra 2.01-3.00 mm, il 7% di particelle mostra un range tra 3.01-4.00 mm, il 4% ha dimensioni comprese tra 4.01-5.00 mm, mentre il 3% ha dimensioni >5mm. (Fig 24d)

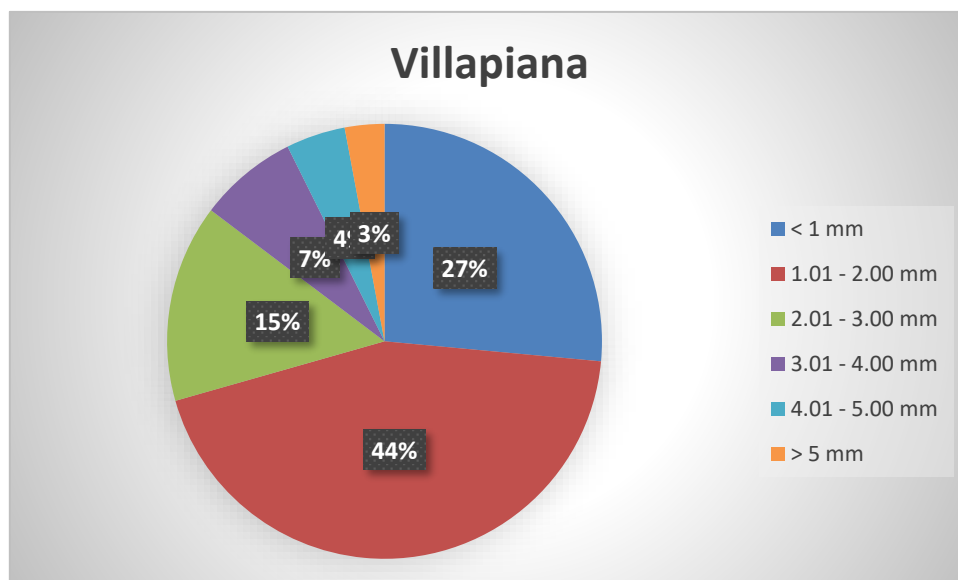


Fig. 24d Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, suddivise all'interno delle classi dimensionali presso il sito di Villapiana.

Infine, riguardo al sito di Cetraro, alcuni campioni presentano dimensioni comprese tra 1.01-2.00 mm, con un valore pari al 31%, il 12% di particelle con dimensioni <1 mm, il 25% con dimensioni comprese tra 2.01-3.00 mm, l'11% presentano un range tra 3.01-4.00 mm, il 9% ha dimensioni tra 4.01-5.00 mm, infine il 12% ha dimensioni >5mm. (fig 24e)

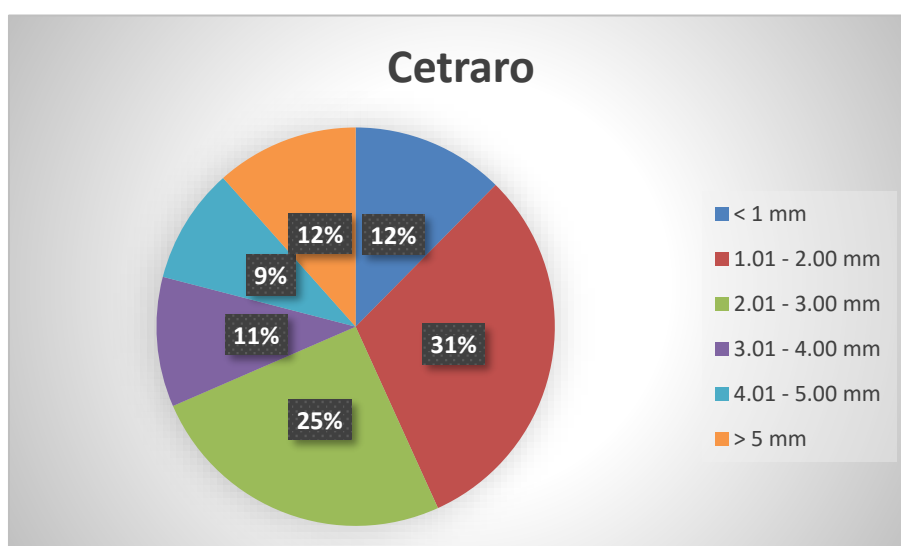


Fig. 24e Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, suddivise all'interno delle classi dimensionali presso il sito di Cetraro.

Nonostante le quantità di microplastiche differenti riscontrate all'interno dei cinque siti analizzati, è possibile osservare un elemento in comune condiviso da tutti i siti, una maggiore abbondanza di particelle di plastica con dimensioni comprese tra 1.01-2.00. Il seguente grafico rappresenta tutti i siti campionati e le quantità di microplastiche relative ad ogni classe dimensionale determinata. (Fig.25)

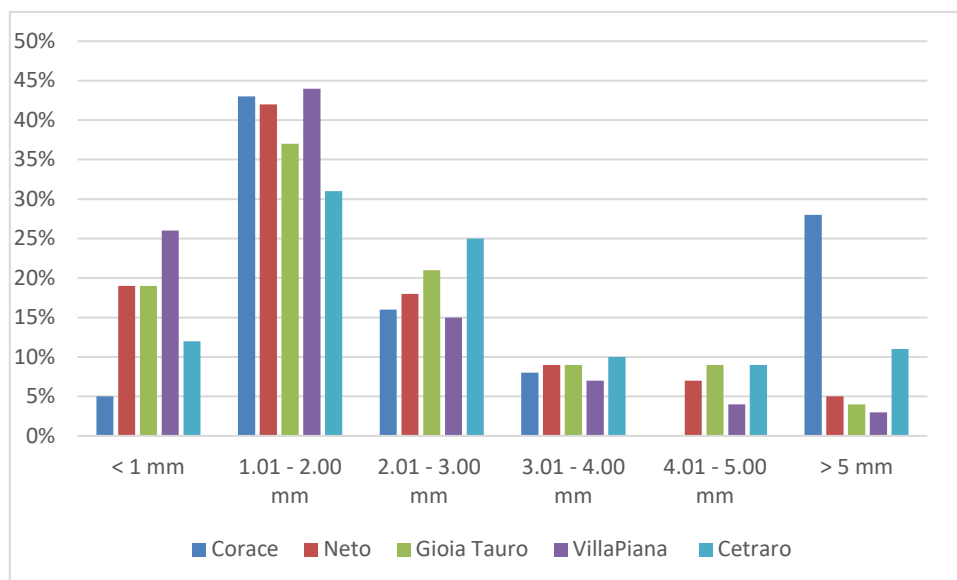


Fig. 25 Grafico della distribuzione delle dimensioni delle microplastiche ricorrenti nei siti analizzati.

In relazione alla forma, ogni particella di plastica è stata inserita all'interno di una categoria relativa alla forma, stabilite prima dell'inizio delle analisi, dopo diverse osservazioni allo stereomicroscopio.

Tra le 39 microparticelle di plastica presso la Foce del fiume Corace è presente una maggiore quantità di microplastiche assimilabili a frammenti, con un valore pari al 72%. Un valore pari al 26% di fibre e il 2% di pellet. (Fig.26a)

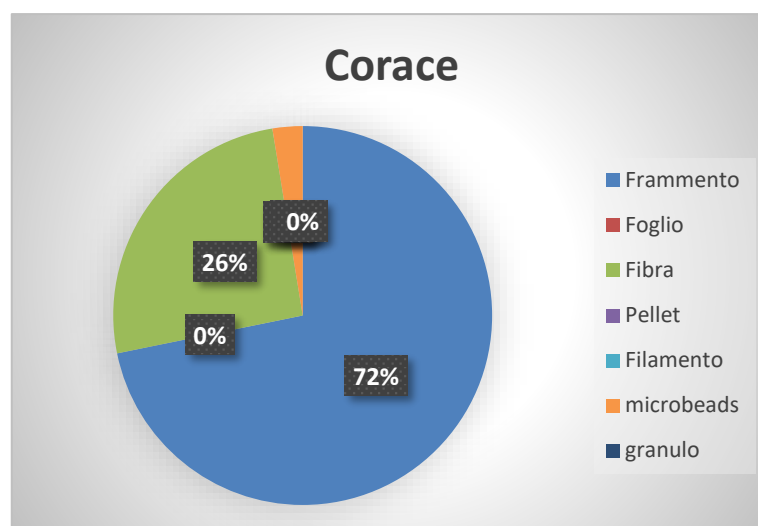


Fig. 26a Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla forma presso il sito della foce del fiume Corace.

Presso la Foce del fiume Neto si è registrata una maggiore quantità di frammenti, con un valore pari all'74%, il 17% di fogli, il 4% di filamenti, il 4% di microbeads l'1% di pellet. (Fig.26b)

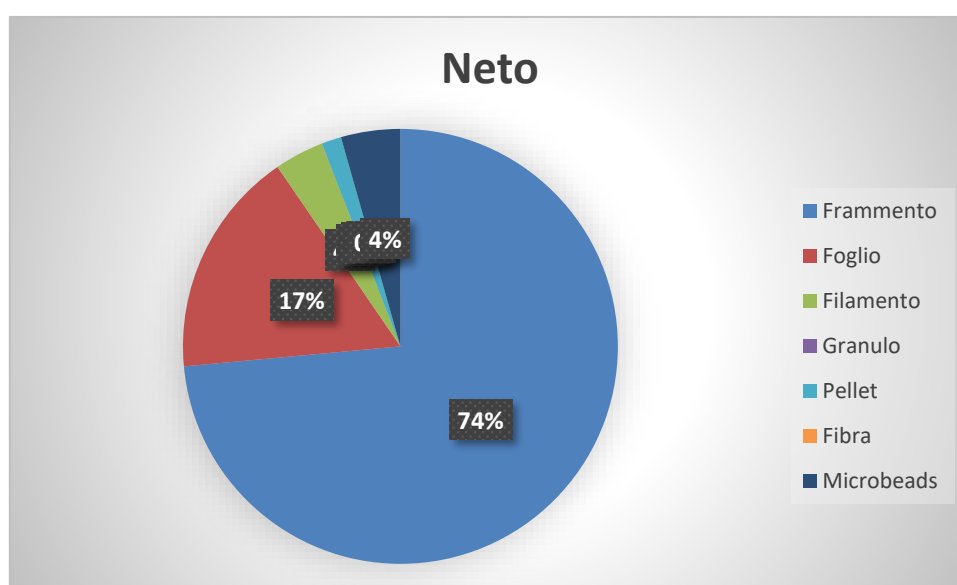


Fig. 26b Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla forma presso il sito della foce del fiume Neto.

I siti di Gioia Tauro hanno una maggiore quantità di frammenti, con un valore pari al 71%, il 3% di pellet, il 3% di filamenti, il 22% di fogli e l'1% di microbeads (Fig.26c)

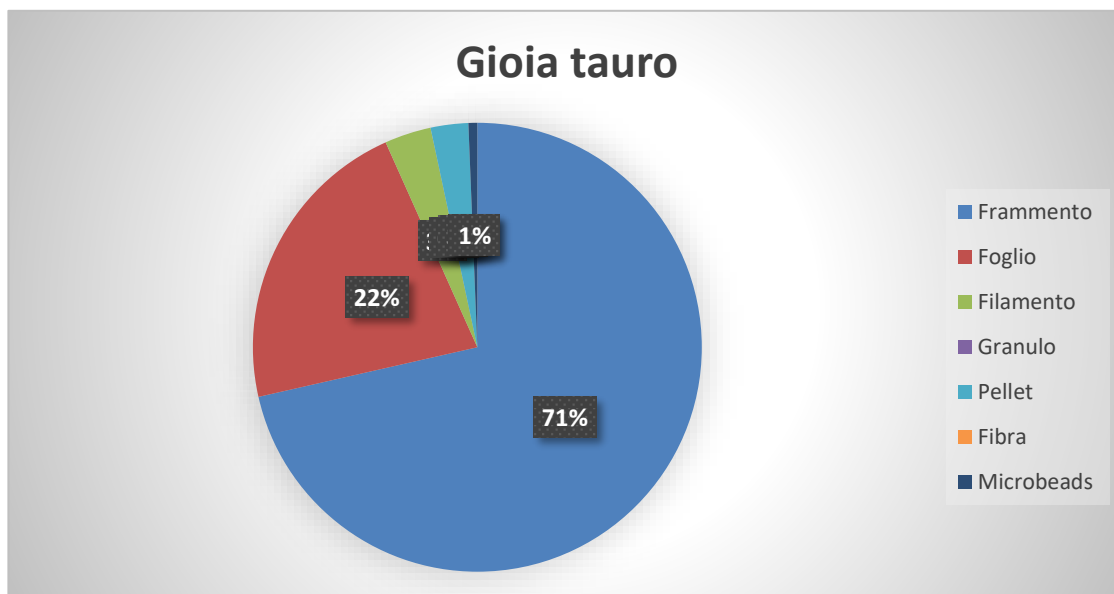


Fig. 26c Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla forma presso il sito di Gioia Tauro.

Per quanto riguarda i siti di Villa Piana si è determinata una maggiore quantità di frammenti, con un valore pari al 79%, il 2% di pellet, il 2% di filamenti, il 13% di fogli e l'1% di fibre. (fig. 26d)

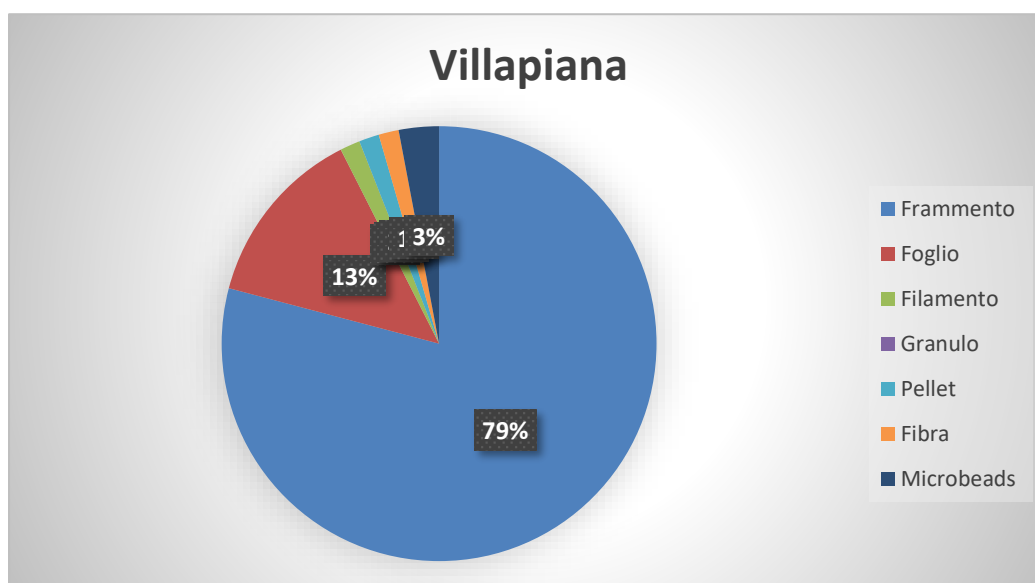


Fig. 26d Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla forma presso il sito di Villapiana.

Infine, i siti di Cetraro presentano una maggiore quantità di frammenti, con un valore pari al 65%, l'1% di pellet, il 25% di fogli, l'8% di filamenti, l'1% di microbeads. (Fig.26e)

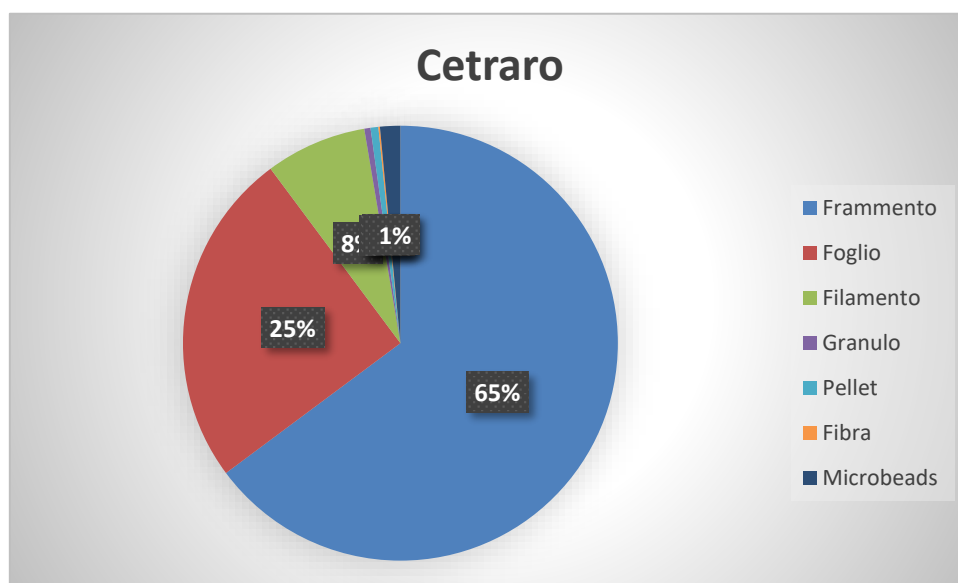


Fig. 26e Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla forma presso il sito di Cetraro.

Dalle osservazioni eseguite il frammento risulta essere la forma più abbondante all'interno di tutti i siti analizzati, presentando sempre valori maggiori della metà dell'intera quantità di microplastiche. Di seguito è riportato un grafico con il raggruppamento di tutti i siti e le microplastiche presenti, incluse all'interno di ogni categoria relativa alle diverse forme (Fig. 27).

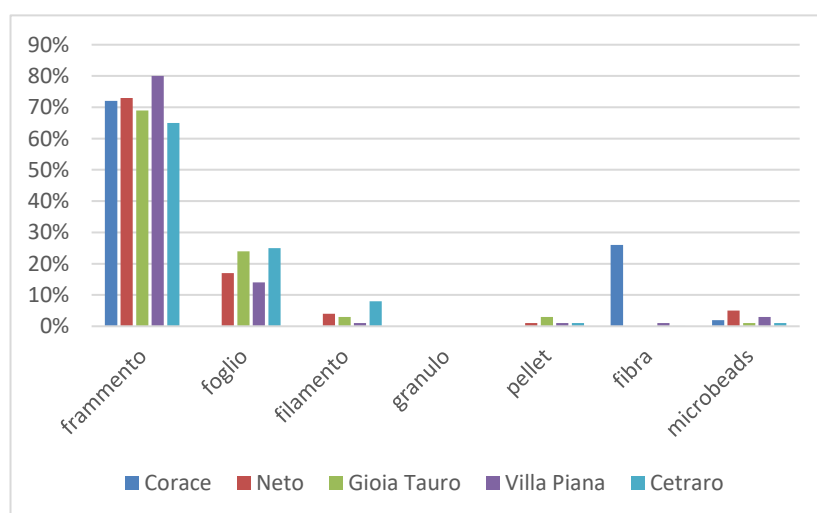


Fig. 27 Grafico della distribuzione delle forme di microplastiche ricorrenti nei siti analizzati.

Colore. Le osservazioni allo stereomicroscopio hanno permesso un'accurata valutazione dei colori delle particelle di plastica.

Riguardo ai campioni provenienti dal fiume Corace il 64% dei campioni corrisponde a microplastiche trasparenti, il 28% a microplastiche bianche e l'8% corrisponde a microplastiche blu. (fig.28a)

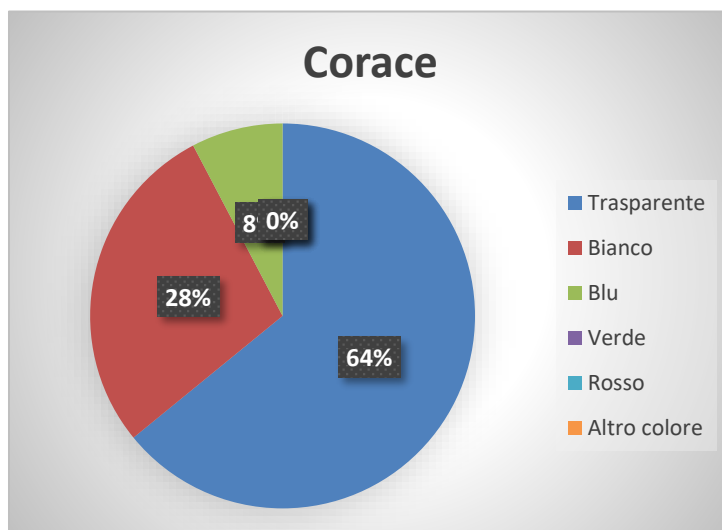


Fig.28a Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base al colore presso il sito della foce del fiume Corace.

Riguardo la foce del fiume Neto il 48% corrisponde a microparticelle bianche, il 35% trasparenti, il 7% gialle, il 6% blu, il 2% altro colore, l'1% rosse e l'1% nere. (fig.28b)

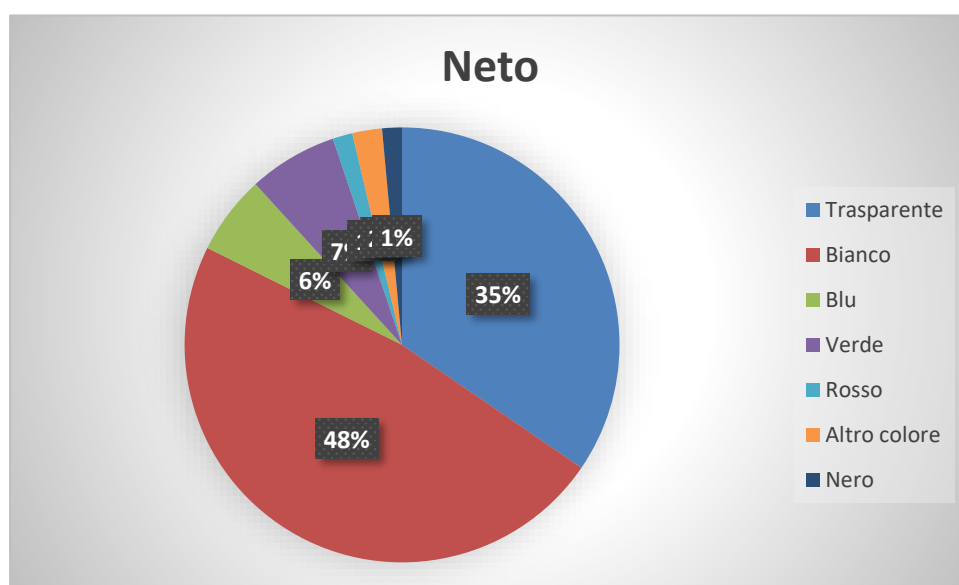


Fig.28b Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base al colore presso il sito della foce del fiume Neto.

Per i siti di Gioia Tauro si è osservata una percentuale pari al 50% di plastiche trasparenti, il 21% bianche, il 10% altro colore, l'8% nere, il 6% blu, il 4% verdi e l'1% rosse. (fig.28c)

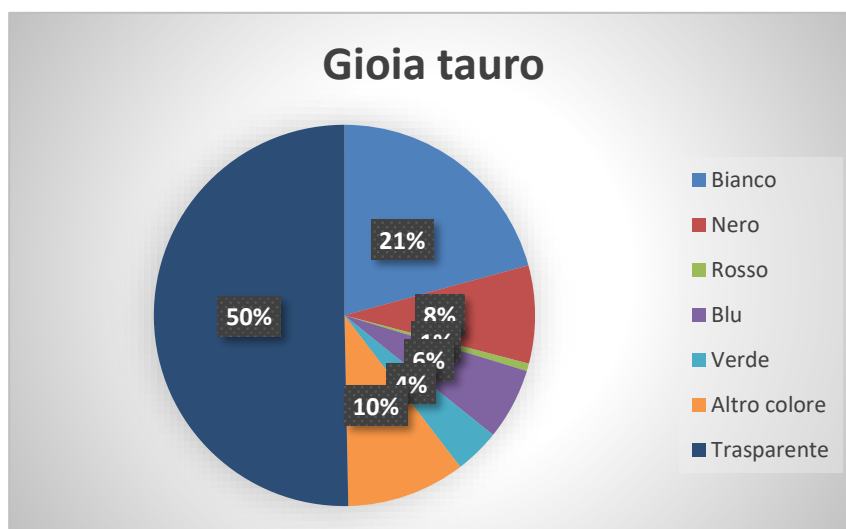


Fig.28c Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base al colore presso il sito di Gioia Tauro.

I siti di Villapiana mostrano una percentuale pari al 56% di plastiche trasparenti, il 21% bianche, il 9% nere, il 9% altro colore, il 4% blu e l'1% rosse. (fig.28d)

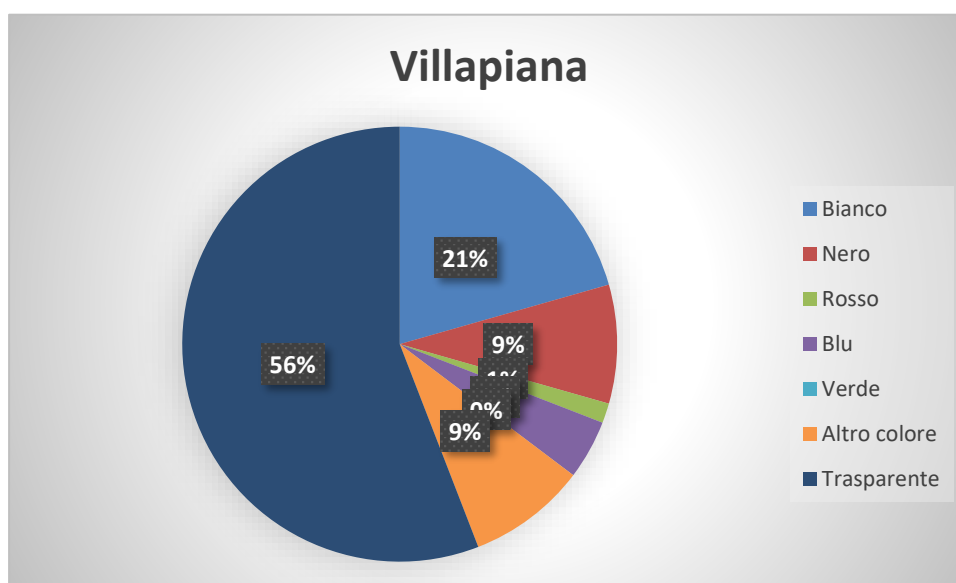


Fig.28d Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base al colore presso il sito di Villapiana.

Infine, i siti nei pressi di Cetraro mostrano una concentrazione pari al 50% di plastiche trasparenti, il 22% bianche, il 9% altro colore, il 7% nere, il 6% verdi, il 5% blu e l'1% rosse. (fig. 28e)

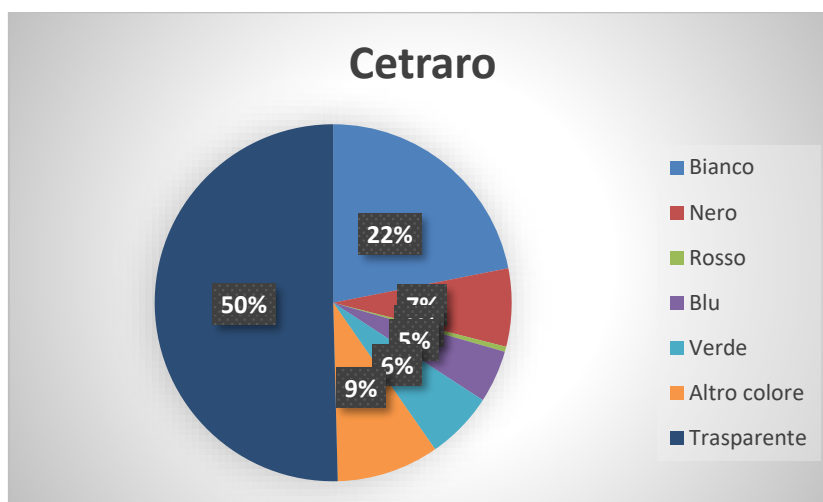


Fig.28e Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base al colore presso il sito di Cetraro.

All'interno di tutti i siti la maggior parte delle microplastiche presentano un colore trasparente, tranne per il sito corrispondente alla foce del fiume Neto, in cui si osserva una maggiore quantità di microplastiche bianche, che, comunque, risulta essere la seconda categoria di colore più abbondante in tutti gli altri siti. Di seguito è riportato un grafico che rappresenta tutte le categorie di colore e le relative quantità descritte all'interno di ogni sito. (Fig. 29).

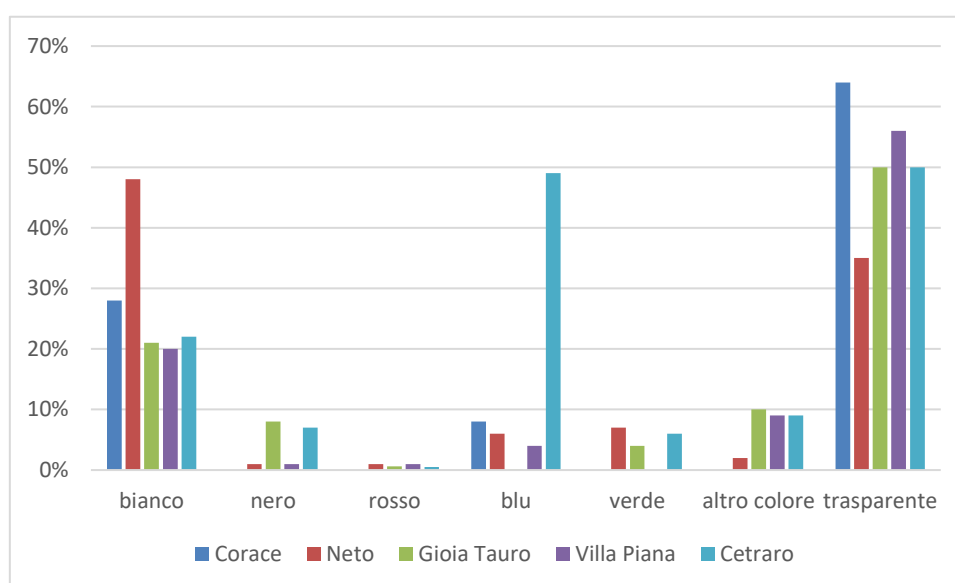


Fig.29 Grafico della distribuzione percentuale dei campioni in base al colore determinato.

5.2 Caratterizzazione chimico-molecolare.

Le analisi in spettroscopia in trasformata di Fourier (FT-IR) hanno permesso la caratterizzazione chimico-molecolare di ogni particella di plastica proveniente dai campionamenti all'interno dei 6 siti. Ogni microparticella è stata analizzata singolarmente e ne è stato acquisito il relativo spettro infrarosso,

Per la caratterizzazione chimico-molecolare dei polimeri si è fatto riferimento ad un database contenente gli spettri infrarossi (Fig.29a, b, c, d) dei più comuni polimeri di plastica e ai relativi valori corrispondenti all'altezza dei picchi (riferiti al numero d'onda e alla percentuale di trasmittanza o assorbanza).

Sono stati utilizzati, inoltre, spettri di riferimento acquisiti in passato a partire da oggetti in plastica comunemente impiegati nella vita quotidiana, quali: bottiglie, buste, bicchieri, contenitori per salumi ecc.

Le figure 30a, b, c, d mostrano gli spettri infrarossi dei polimeri della plastica più comuni, quelli destinati ad un maggiore utilizzo per le varie attività antropiche.

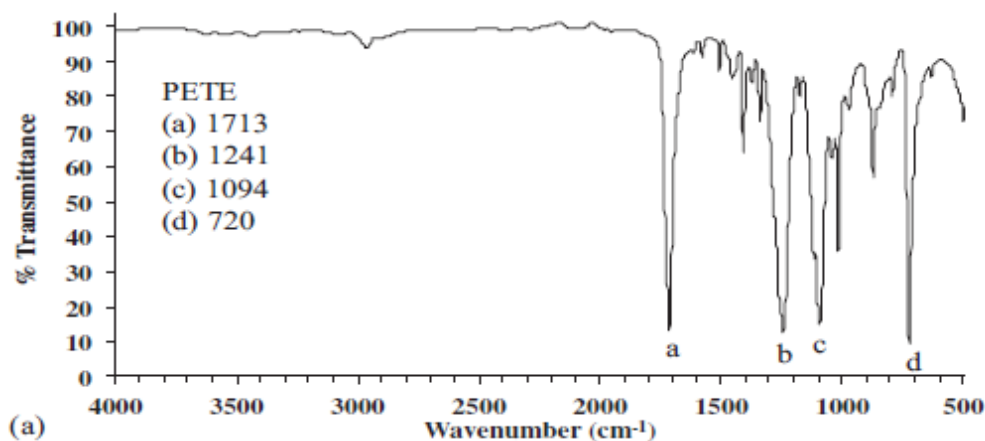


Fig.30a Spettro infrarosso del polietilene tereftalato (PET) con le relative bande di assorbimento.

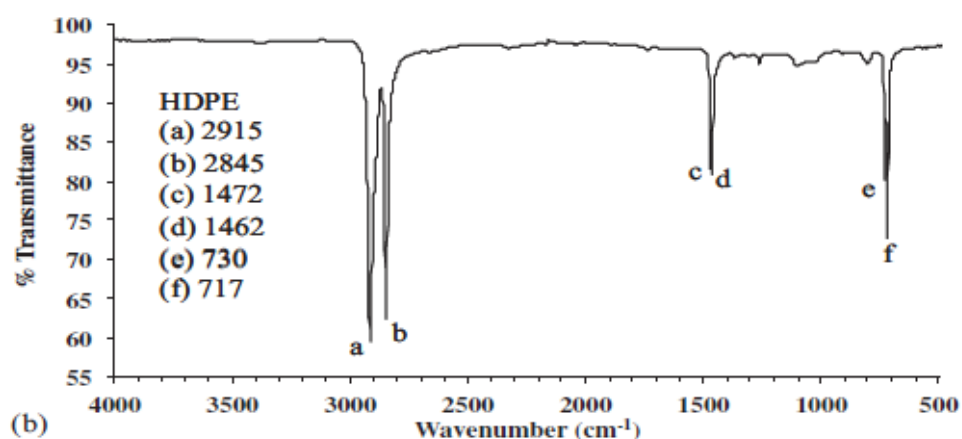


Fig.30b Spettro infrarosso del polietilene ad alta densità (PE) con le relative bande di assorbimento.

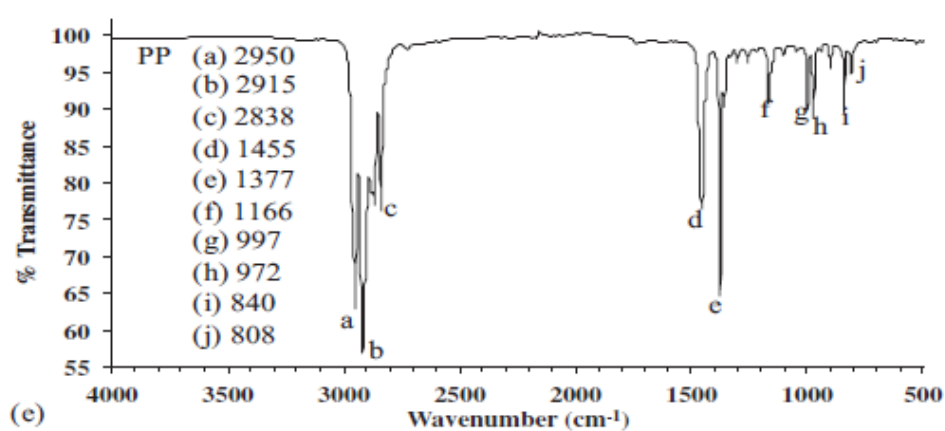


Fig.30c Spettro infrarosso del polipropilene (PP) con le relative bande di assorbimento.

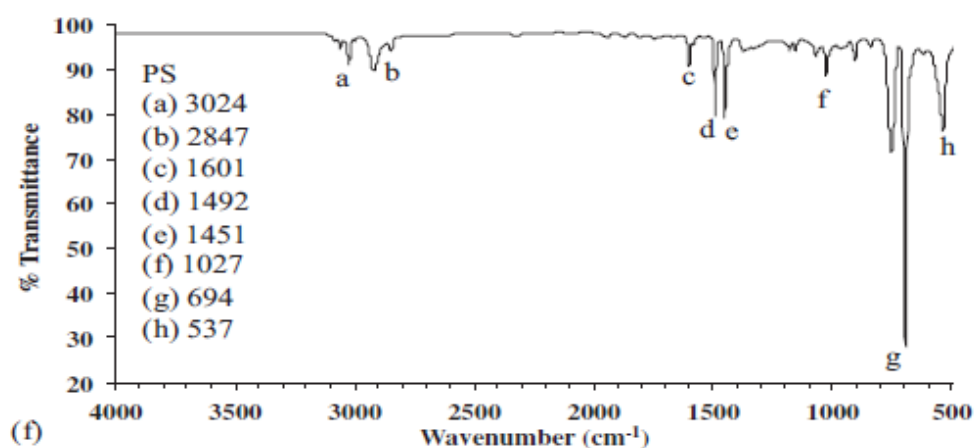


Fig.30d Spettro infrarosso del polistirene (PS) con le relative bande di assorbimento.

Nella figura 31a è rappresentato lo spettro relativo al campione (in rosso) e, in blu, lo spettro noto del polietilene. Queste operazioni sono state ripetute per ogni microparticella di plastica ed è stato possibile effettuare una stima delle abbondanze dei polimeri rappresentata in seguito per ogni sito di indagine.

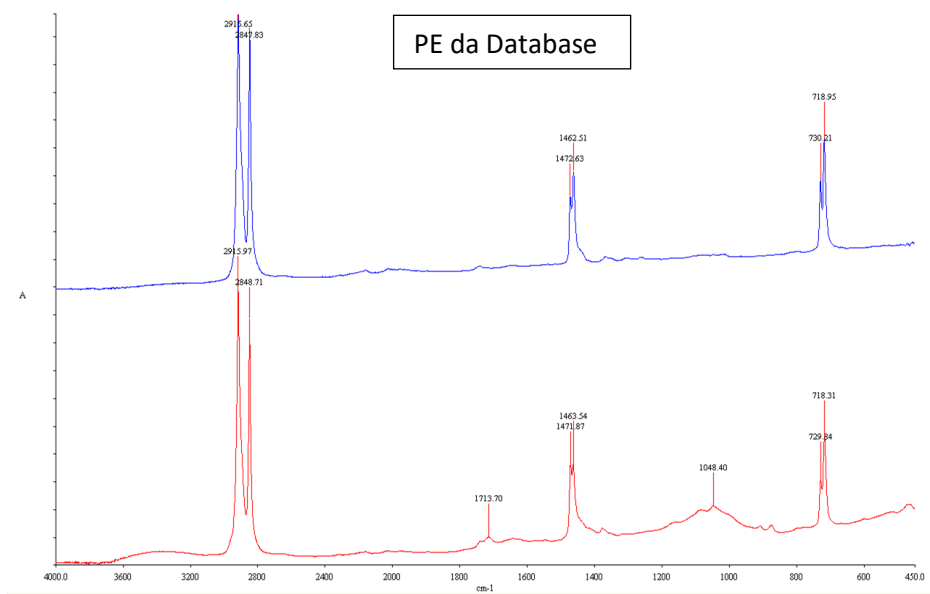


Fig. 31a Spettro IR del polietilene PE di un campione di microplastica posto a confronto con lo spettro noto (in blu) del database.

A seguire sono illustrati alcuni tra gli spettri acquisiti durante la fase analitica (Fig. 31b; 32a,b; 33a,b; 34a,b)

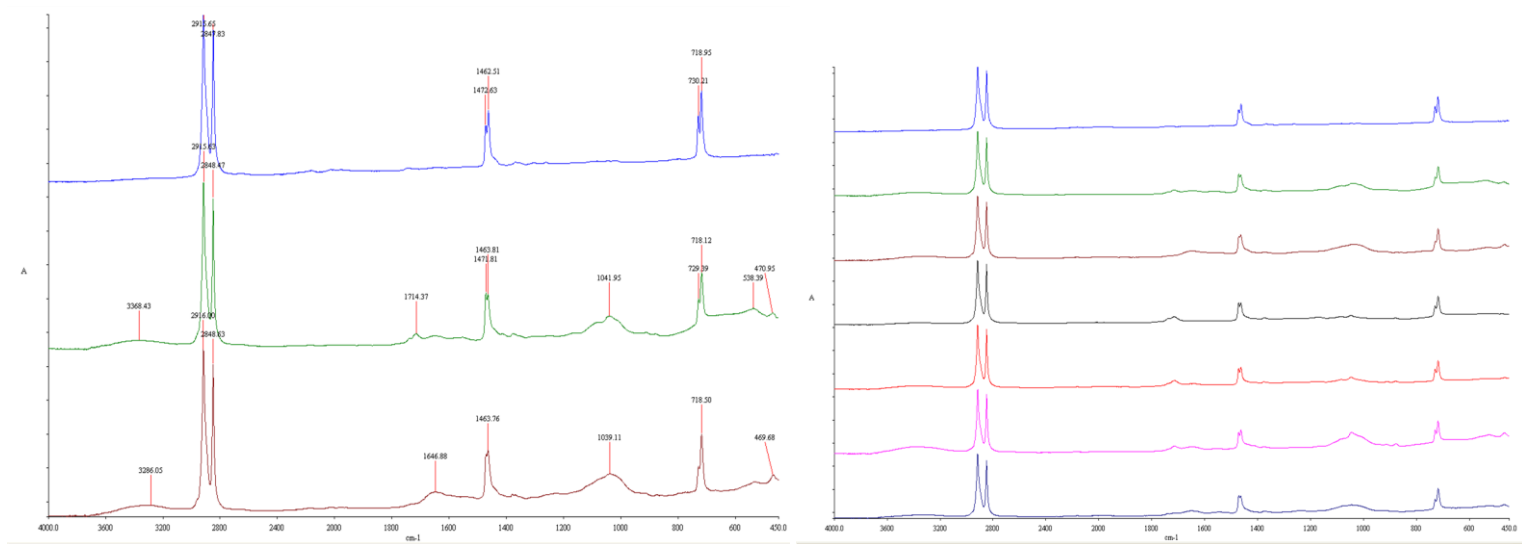


Fig. 31b Spettro IR del polietilene PE di alcuni campioni di microplastiche posti a confronto con lo spettro noto (in blu) del database.

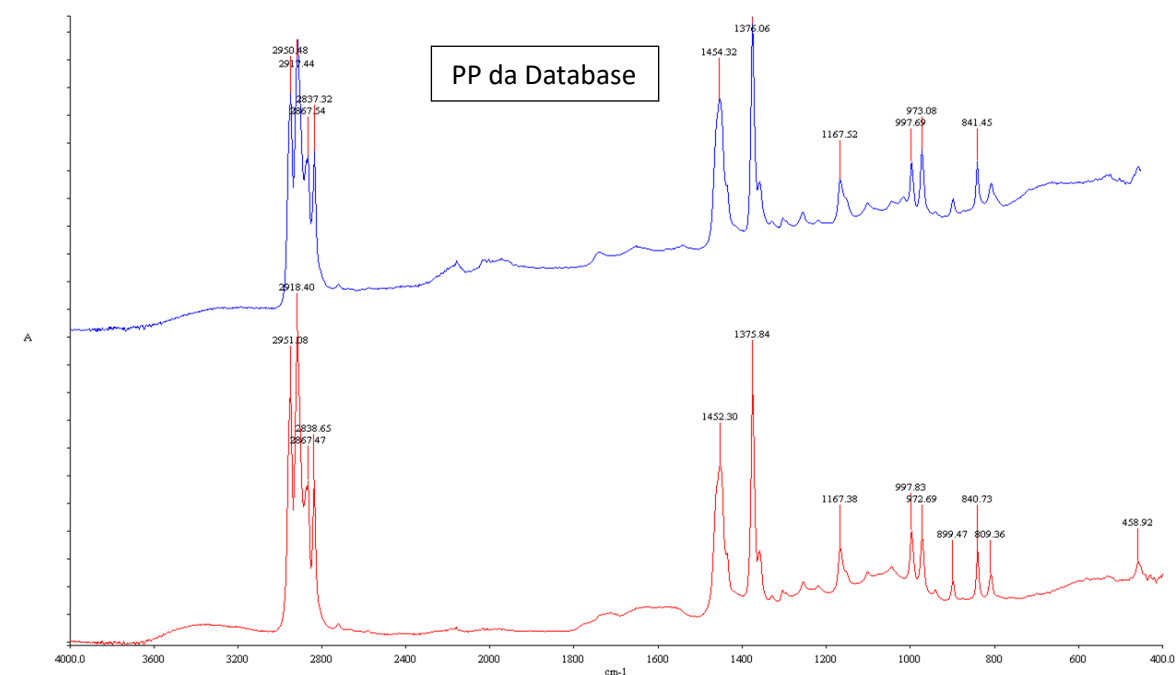


Fig. 32a Spettro IR del polipropilene PP di un campione di microplastica posto a confronto con lo spettro noto (in blu) del database.

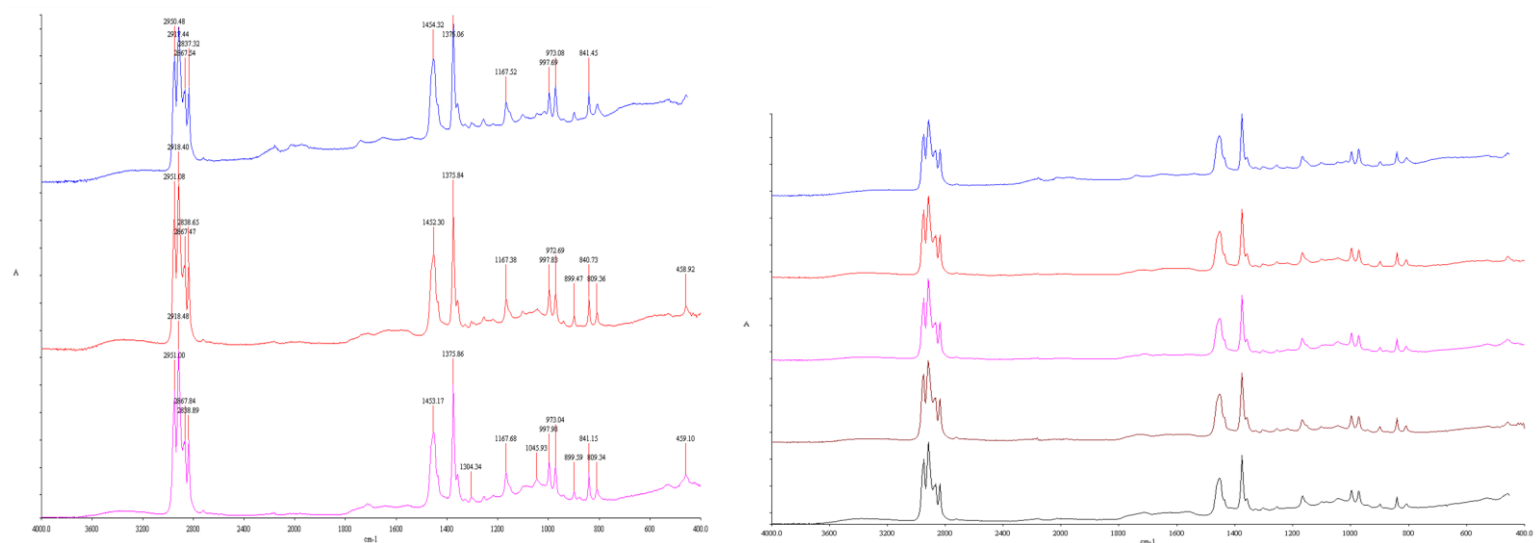


Fig. 32b Spettri IR del polipropilene PP di alcuni campioni di microplastiche confrontati con lo spettro noto (in blu) del database.

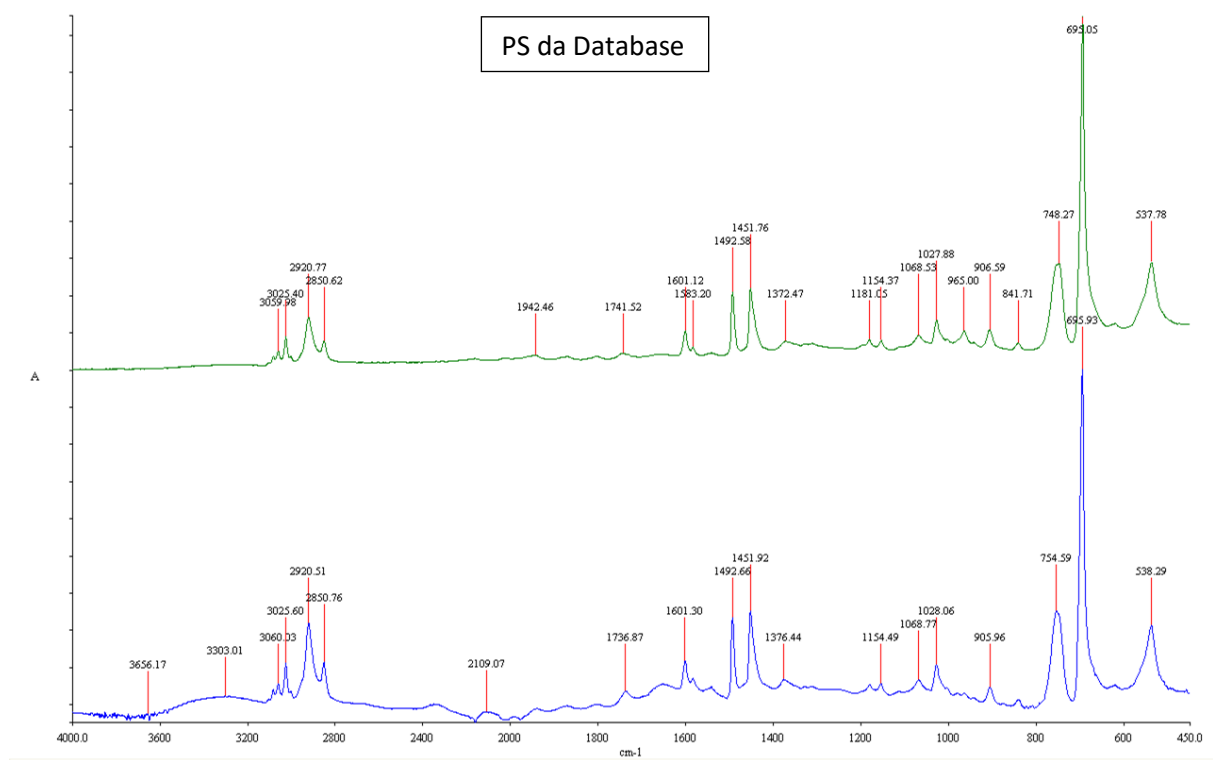


Fig. 33a Spettro IR del polistirene PS di un campione di microplastica posto a confronto con lo spettro noto (in verde) del database.

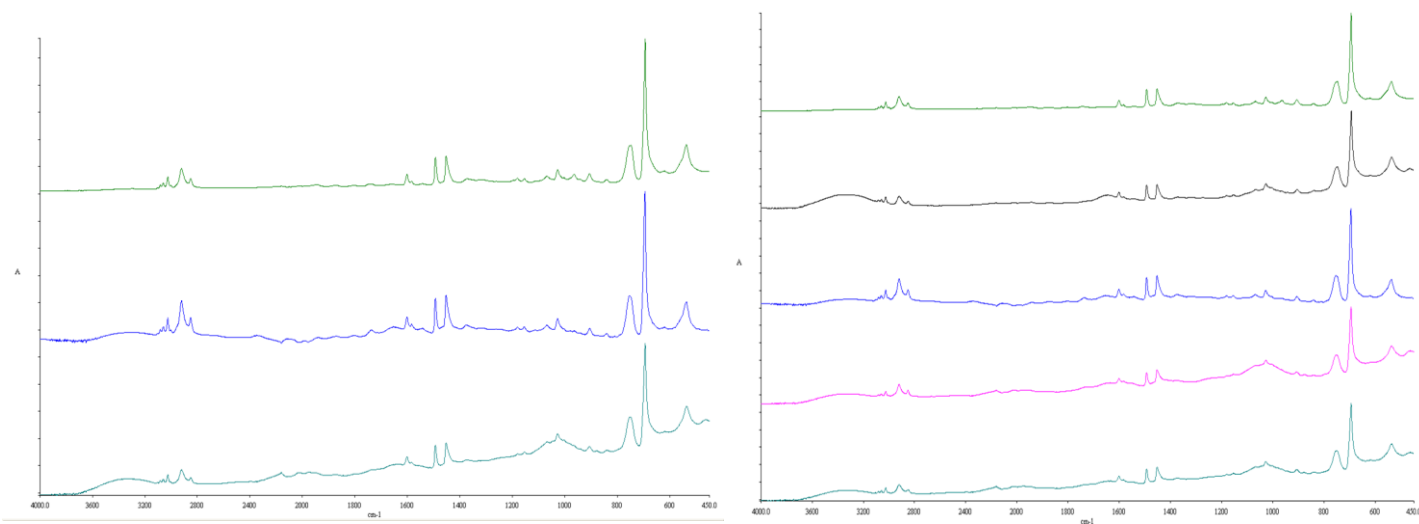


Fig. 33b Spettri IR del polistirene (PS) di alcuni campioni di microplastiche confrontati con lo spettro noto (in verde) del database.

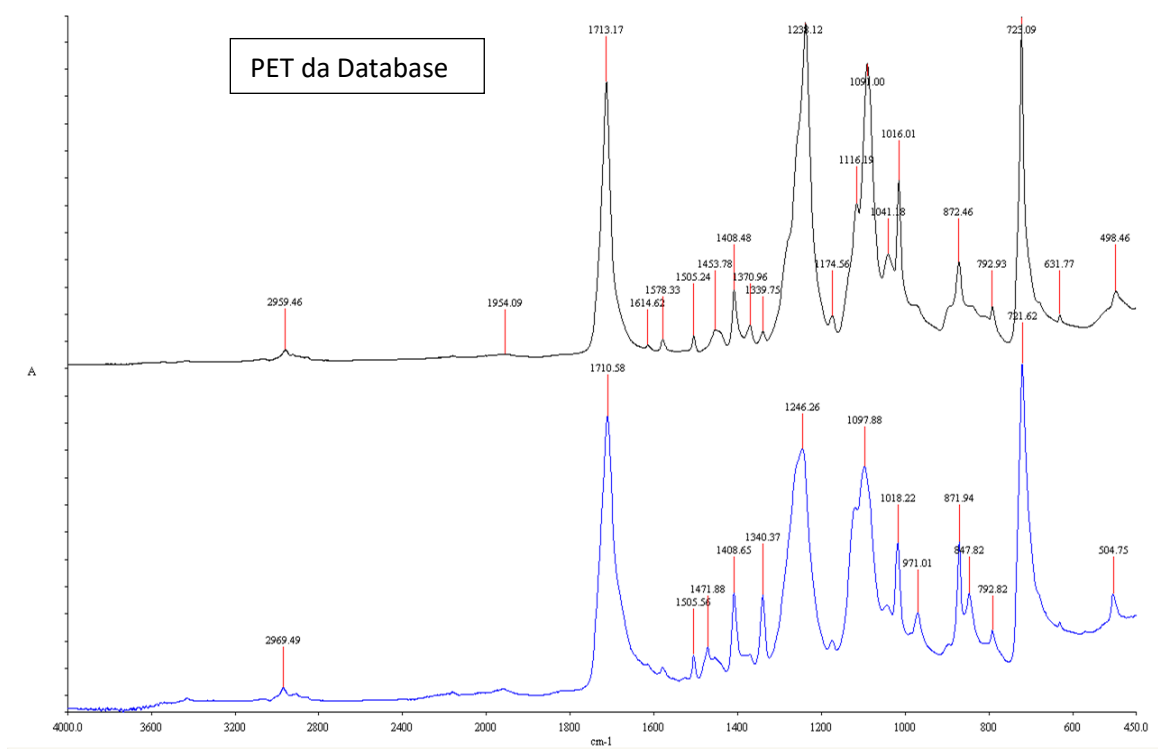


Fig. 34a Spettro IR del polietilene tereftalato PET di un campione di microplastica posto a confronto con lo spettro noto (in nero) del database.

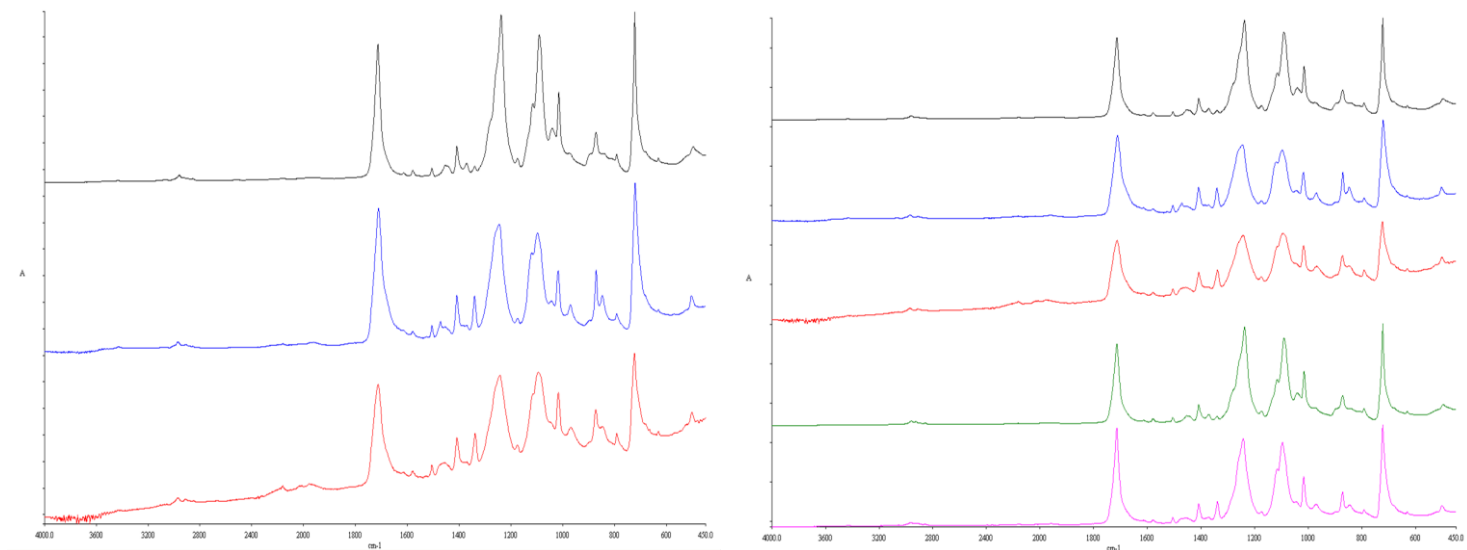


Fig. 34b Spettri IR del polietilene tereftalato (PET) di alcuni campioni di microplastiche confrontati con lo spettro noto (in nero) del database.

I polimeri risultanti dalle analisi sono, in maggiore percentuale, il polietilene (PE) e il polipropilene (PP). È stata registrata anche la presenza di polistirene (PS) e polietilene tereftalato (PET).

A seguire è rappresentata graficamente la quantità e la tipologia dei polimeri all'interno di ogni sito (Fig.35 a, b, c, d, e, f)

Nell'area corrispondente alla foce del fiume Corace è presente una concentrazione pari al 67% di PE, il PET rappresenta il 25% e il PP l'8% (Fig. 35a).

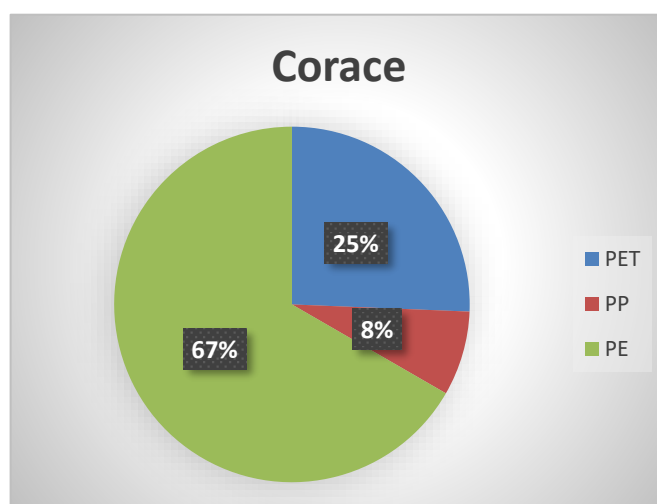


Fig.35a Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla tipologia del polimero presso la foce del fiume Corace.

All'interno dell'area corrispondente alla foce del fiume Neto è presente un'elevata abbondanza di PE, l'81%, e un valore pari al 19% di PP (Fig. 35b).

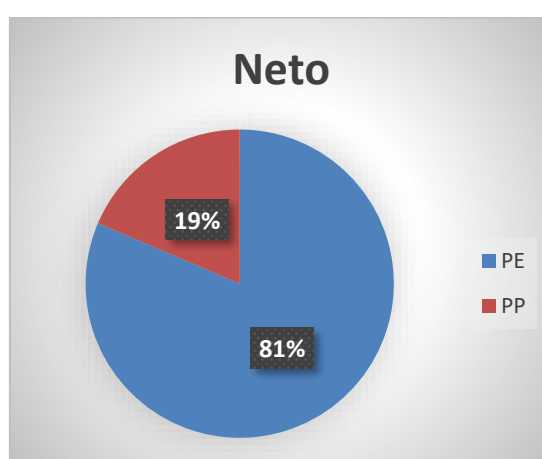


Fig.35b Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla tipologia del polimero presso la foce del fiume Neto.

Riguardo al sito di Vibo Marina il PE è pari al 72%, e un valore pari a 28% di PP (Fig. 35c).

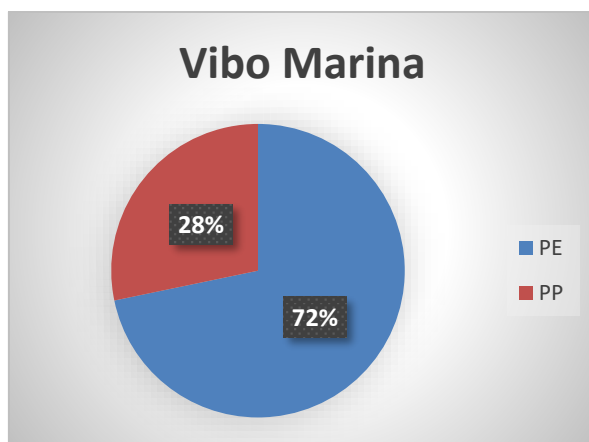


Fig.35c Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla tipologia del polimero presso il sito di Vibo Marina.

L'area corrispondente al sito di Gioia Tauro presenta una percentuale pari al 75% di PE, il 24% di PP e l'1% di PS (Fig. 35d).

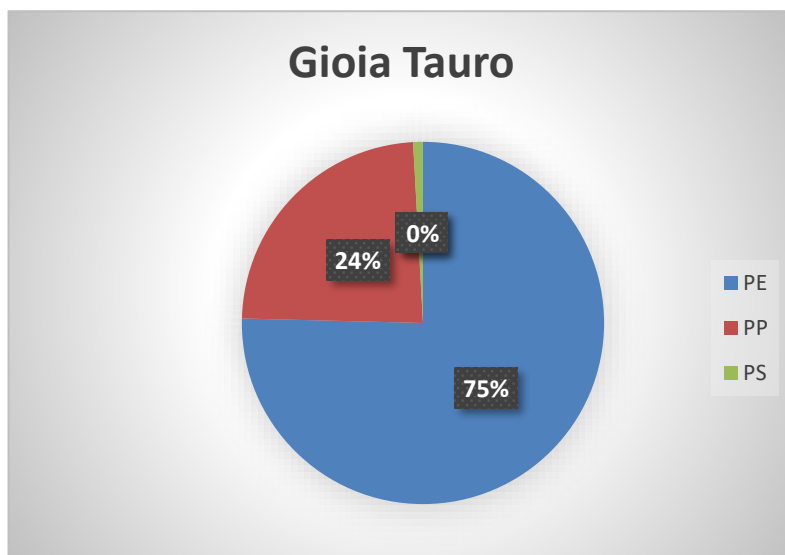


Fig.35d Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla tipologia del polimero presso il sito di Gioia Tauro.

All'interno dell'area corrispondente al sito di Villapiana è stata registrata una percentuale pari al 73% di PE, il 21% di PP e il 4% di PS e l'1% di PET (Fig. 35e)

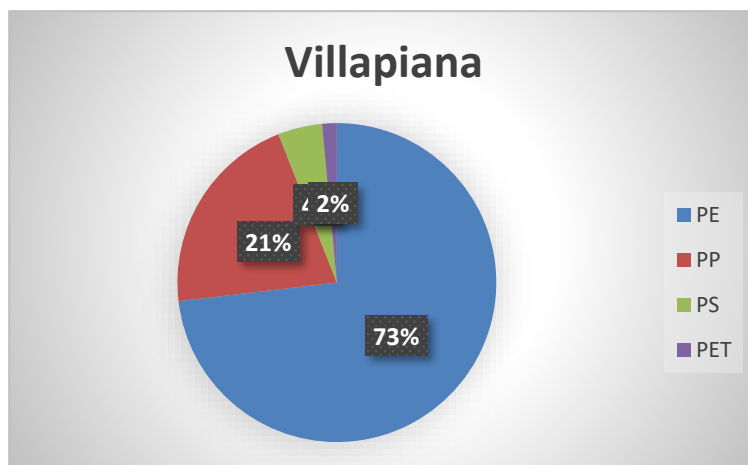


Fig.35e Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla tipologia del polimero presso il sito di Villa Piana.

Nel sito di Cetraro il PE risulta essere il più abbondante con una percentuale pari al 73%, il PP ha una percentuale pari al 24% e il PS pari al 3% (Fig. 35f).

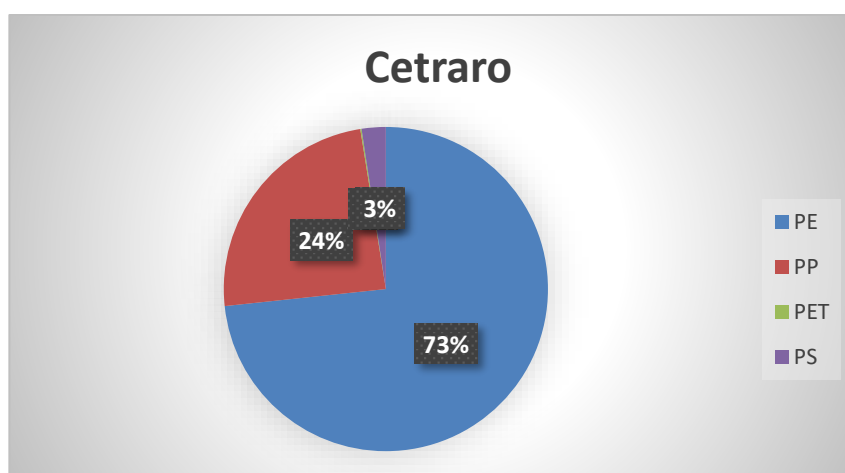


Fig.35f Diagramma a torta rappresentante la quantità di microplastiche, espressa in percentuale, classificate in base alla tipologia del polimero presso il sito di Cetraro.

All'interno di tutti i 6 siti analizzati è chiaramente osservabile un elemento in comune, una grande abbondanza del polimero del polietilene PE, il quale presenta alti valori di percentuale. Il secondo polimero più abbondante, in tutti i siti, è il polipropilene PP, seguito da percentuali minori di polistirene PS e polietilene tereftalato PET. Di seguito è riportato un grafico che rappresenta tutte le aree di indagine e le relative quantità dei polimeri di microplastiche trovate all'interno (Fig. 36)

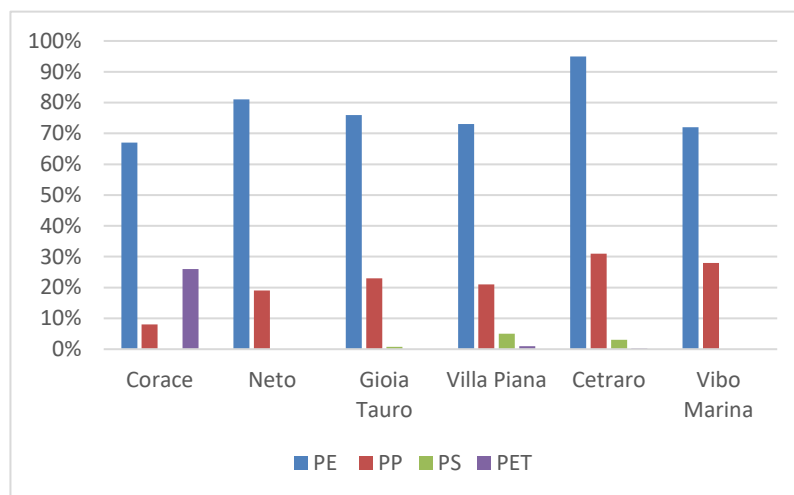


Fig.36 Grafico della distribuzione percentuale dei campioni in base alla caratterizzazione chimico-molecolare.

Le microplastiche sono presenti in tutte le 6 aree di indagine. Il sito che presenta una maggiore concentrazione di microplastiche corrisponde a quello di Cetraro, con 863 particelle, quello con una minore concentrazione risulta essere la foce del fiume Corace, con 36 particelle di plastica. Un altro sito dove è stata registrata un'elevata concentrazione di microplastiche è quello di Gioia Tauro, con 627 particelle, a seguire i siti corrispondenti alla foce del fiume Neto con 136 particelle e, per finire, Villapiana e Vibo con, rispettivamente, 68 e 46 particelle. I campionamenti, come precedentemente descritto, sono stati effettuati nello strato superficiale della colonna d'acqua e per ogni area sono stati effettuati 3 transetti, ciascuno a diversa distanza dalla costa (0.5, 1.5 e 6 Mn, miglia nautiche). Nei siti presso Gioia Tauro e Cetraro è possibile osservare una maggiore concentrazione di microplastiche nei transetti campionati a 0.5 Mn dalla costa, con una concentrazione pari al 54% del totale delle microplastiche trovate. Il risultato è interessante considerando che entrambi i siti si trovano in aree in prossimità di zone portuali ed essendo delle zone interessate da intense attività antropiche è molto probabile la presenza di numerose quantità di rifiuti. Diversi studi confermano la stretta correlazione esistente tra un'alta prevalenza di microplastiche e la vicinanza alle zone dove si svolgono diverse

attività antropiche. All'interno delle zone portuali è importante considerare anche le acque di scarico che potrebbero trasportare rifiuti plastici (Mohamed Nor, Obbard 2013).

I siti corrispondenti alla foce del fiume Neto e Corace, invece, presentano una maggiore concentrazione di microplastiche nei transetti campionati a 6 miglia dalla costa (rispettivamente 82% e 62% del totale). La maggiore presenza delle microplastiche nelle zone più distanti rispetto alla costa probabilmente è dovuta alle condizioni idrodinamiche, per esempio i moti ondosi o l'azione delle correnti che determinano il trasporto delle particelle a distanze considerevoli sia negli strati superficiali che in quelli più profondi. Le microplastiche che si trovano sulla superficie del mare sono soggette al trasporto da parte delle correnti, che ne favoriscono una diffusione omogenea all'interno degli ambienti marini. Le particelle plastiche essendo ubiquitarie possono essere ritrovate anche in aree remote apparentemente sgombre da possibili fonti di immissione di materiale plastico e ciò rende difficile risalire alla fonte di immissione.

Un recente studio, condotto in Corsica, pubblicato su Science da Kane A. *et al* (2020) ha descritto il trasporto delle particelle di plastica da parte delle correnti che determinano uno spostamento verticale causando un accumulo di microplastiche nei fondali marini, che risulterebbero essere in concentrazioni maggiori rispetto a quelle che permangono nello strato superficiale. Il movimento verticale delle correnti non è l'unico motivo della grande abbondanza di microplastiche nei fondali marini, con il trascorrere del tempo negli ambienti marini, infatti, queste vengono colonizzate da diversi microrganismi tendendo ad affondare.

In riferimento alla forma quella più abbondante risulta essere il frammento (Villapiana 79%, Cetraro 65%, Gioia Tauro 71%, Corace 72% e Neto 74%). La maggiore presenza di frammenti riscontrati potrebbe ricondursi alla degradazione e frammentazione degli oggetti di dimensioni maggiori. Una grande quantità di questi oggetti proviene dai rifiuti abbandonati sulle spiagge o dagli oggetti galleggianti che vanno incontro alla degradazione dovuta, per esempio, alla forza esercitata dalle onde o all'azione dei raggi UV. I rifiuti marini generalmente osservati risultano essere le reti da pesca, i contenitori dei detergenti in plastica, le bottiglie di plastica, i bidoni, i contenitori del cibo etc. I frammenti sono indicati come microplastiche secondarie, poiché le loro dimensioni non rispecchiano quelle prodotte in origine. Alcuni di questi frammenti presentano margini smussati dovuti al tempo passato in mare, altri presentano margini appuntiti, che potrebbe provocare danni ai tessuti interni del tratto digestivo degli organismi che vi entrano in contatto. In tutte le aree campionate è stata riscontrata una bassa percentuale di pellet.

La tipologia di colore più abbondante riscontrata all'interno di tutti i siti risulta essere quella trasparente (Corace 64%, Gioia Tauro 50%, Villapiana 56% e Cetraro 50%), mentre la seconda categoria

corrisponde al colore bianco. L'unica eccezione è rappresentata dal sito della foce del fiume Neto, con una percentuale del 48% di microplastiche bianche e il 35% trasparenti. La grande abbondanza di microplastiche trasparenti e bianche è da associare all'innumerabile produzione di bottiglie, bicchieri o altri contenitori monouso di questi colori, ma è da considerare anche la possibilità che alcune particelle, dopo aver trascorso molto tempo in mare, si siano sbiadite e abbiano perso gli additivi o i coloranti ad essi associati. Infatti, osservando i frammenti bianchi alcuni erano ingialliti a causa del lungo periodo di residenza in acqua e gli stessi presentavano, non a caso, gli angoli smussati. I frammenti più bianchi presentavano angoli più appuntiti, indice di un minore trasporto e quindi un tempo inferiore trascorso in acqua.

Il colore e la forma delle microplastiche sono parametri importanti da determinare, in quanto la forma influenza la posizione all'interno della colonna d'acqua, mentre il colore è un indicatore della presenza di additivi associati al polimero della plastica e potrebbe essere causa dell'ingestione accidentale da parte del biota, che potrebbe confondere la particella di plastica per cibo (Boerger *et al.*, 2010; Browne *et al.*, 2008; Lusher *et al.*, 2013; Van Cauwenberghe *et al.*, 2012).

In riferimento alle dimensioni delle microplastiche riscontrate tutti i siti sono confrontabili per una maggiore presenza di particelle con dimensioni comprese tra 1.01-2.00 mm (il 42% alla foce del fiume Neto, 44% Corace, 37% Gioia Tauro, 44% Villapiana, 31% Cetraro). Un altro aspetto da considerare è riferito alle concentrazioni di microplastiche <1 mm, il 19% alla foce del fiume Neto, il 19% a Gioia Tauro, il 27% a Villapiana, il 12% a Cetraro. Le microplastiche che presentano tali dimensioni hanno un grande potenziale di ingestione da parte ampio range di organismi (Moore *et al.*, 2011). In particolare, i filtratori o i depositivori accidentalmente ingeriscono le particelle di plastica con lo stesso range dimensionale del cibo di cui si nutrono e, da qui ha inizio il percorso delle plastiche all'interno della catena trofica, partendo dai livelli più bassi fino a raggiungere quelli più alti aumentando di concentrazione ad ogni livello. Come dimostrato dallo studio di Nadal *et al.* (2016), presso le isole Baleari, le microplastiche raggiungono i livelli trofici più alti a partire da quelli che stanno alla base. Lo studio ha confermato, infatti, l'ingestione delle particelle di plastica da parte della specie *Boops boops*, un pesce semipelagico del Mediterraneo. Questo dato risulta di notevole importanza poiché *B. boops* è predato dal pesce spada *Xiphias gladius*, comunemente consumato dall'uomo, da cui si evince che le microplastiche si trovano all'interno di tutti i livelli della catena trofica. L'ingestione delle microplastiche, inoltre, è stata descritta in alcune specie di pesci bentonici (Anastasopoulou *et al.*, 2013; Neves *et al.*, 2015) così come microplastiche di differenti dimensioni sono state documentate all'interno dello stomaco di pesci pelagici nel Mar Mediterraneo (Romeo *et al.*, 2015). Questo fenomeno determina effetti fisici e chimici dannosi, così come la presenza di monomeri e additivi causa carcinogenesi e distruzione endocrina (Wright *et al.*, 2013).

Dalle analisi all'infrarosso in trasformata di Fourier i risultati hanno mostrato una netta abbondanza di polietilene (PE) e polipropilene (PP), in particolare il polietilene risulta essere il polimero maggiormente presente all'interno di tutti i siti (81% per il fiume Neto, 72% Vibo Marina, 67% Corace, 76% Gioia Tauro, 73% Villapiana e 76% Cetraro), seguito dal polipropilene. Sono stati riscontrati, in percentuali minori, anche i polimeri del polistirene (PS) e del polietilene tereftalato (PET). Non sorprende che il PE sia il polimero più abbondante perché quest'ultimo risulta il polimero maggiormente prodotto nel mondo e si trova comunemente in commercio. La grande abbondanza di polietilene PE potrebbe associarsi alla versatilità, alla stabilità e alle eccellenti proprietà isolanti del polimero, risultando, anche, un materiale abbastanza economico. La sintesi del polimero prevede la realizzazione di numerosi oggetti monouso, confermando la notevole presenza dei materiali in polietilene nell'ambiente. Il 40% del volume totale della produzione mondiale di materie plastiche è rappresentata infatti dal polietilene (www.materieplastiche.eu). La realizzazione degli oggetti in polietilene è destinata ai più svariati usi rendendolo uno dei polimeri maggiormente prodotti nel mondo. Il PE è comunemente utilizzato per la realizzazione di isolanti per i cavi elettrici, film per l'agricoltura, borse e buste di plastica, tappi, pellicole e contenitori di vario tipo per i liquidi o per il cibo. Il polipropilene è, così come il PE, uno dei polimeri maggiormente prodotti nel mondo ed è usato ampiamente nell'industria tessile e nella fabbricazione di corde, filtri dell'aria, pannolini, tappi ed etichette per le bottiglie, bicchieri di plastica per il caffè e le reti da pesca. PE e PP sono inoltre comunemente utilizzati per le plastiche da imballaggio e buste. La percentuale minore in cui il polipropilene è stato riscontrato nelle analisi potrebbe essere dovuta alla sua maggiore suscettibilità alle radiazioni UV e alla tendenza a degradarsi in pezzi più piccoli più rapidamente rispetto al PE.

Bisogna, inoltre, evidenziare, in accordo con altri studi (Andrady, 2011), che i polimeri a bassa densità, come il polietilene e il polipropilene, sono predominanti negli strati superficiali della colonna d'acqua ed è possibile trovarli entro i primi 10 metri di profondità, in accordo con i campionamenti effettuati negli strati superficiali all'interno delle 6 aree investigate. Al contrario, i polimeri ad alta densità sono generalmente riscontrati nel benthos.

Dalle analisi è emersa, in percentuale minore, la presenza dei polimeri PS, polistirene (l'1% a Gioia Tauro, il 4% a Villapiana e il 2% a Cetraro) e PET, polietilene tereftalato (il 22% a Corace). Il polistirene è un materiale usato per l'isolamento e l'imballaggio. Il PET è utilizzato per la realizzazione di bottiglie, ma principalmente per la realizzazione di fibre e fiocchi, non a caso tutte le particelle analizzate che sono risultate PET erano fibre.

La bassa percentuale di PET riscontrata è da ricondurre alla sua densità maggiore rispetto a quella dell'acqua e quindi, come precedentemente spiegato, tende a precipitare verso il fondo. Nonostante

ciò, sono stati riscontrati alcune microplastiche corrispondenti al polimero PET probabilmente dovuto ai fenomeni di rimescolamento delle acque o al movimento verticale legato alle correnti.

Un'ultima considerazione è rivolta alla presenza dei rifiuti spiaggiati, i monitoraggi previsti, nel modulo 4, dalla Marine Strategy Framework Directive hanno confermato che la plastica rappresenta la maggior parte dei rifiuti marini spiaggiati (il 78% del totale nella sotto-regione del Mar Ionio-Mediterraneo centrale). In Calabria l'82% dei rifiuti abbandonati sulle spiagge è costituito da materiale plastico (Arpa Calabria, 2020). La plastica come costituente principale dei rifiuti spiaggiati conferma l'elevata concentrazione di microplastiche riscontrate nelle acque superficiali, poiché, come è stato descritto ampiamente, i rifiuti di grandi dimensioni vanno incontro a processi di degradazione e frammentazione.

5.3 Valutazione della densità ottica e clorofilla *a* in *Arthrospira maxima*

I prelievi effettuati dalle colture di *Arthrospira maxima* sono stati analizzati, seguendo i passaggi descritti nei protocolli, allo spettrofotometro permettendo di risalire ai valori relativi alla quantità di clorofilla *a* e al calcolo della densità ottica. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Densità ottica per la determinazione della crescita cellulare (Fig.37)

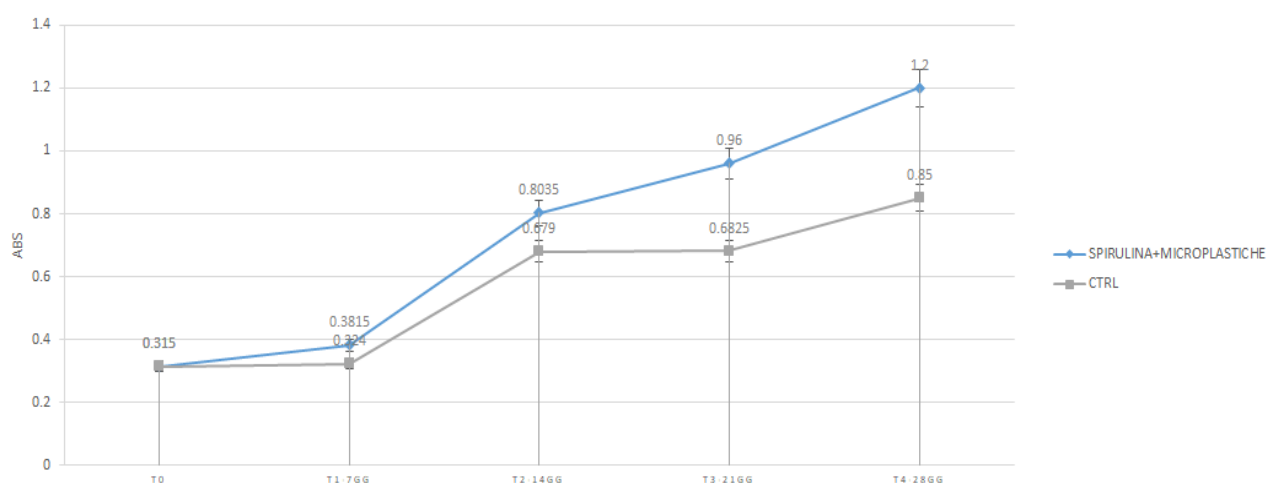


Fig.37 Il grafico riporta i valori, misurati allo spettrofotometro, della densità ottica relativi alla coltura di *A. maxima*, di controllo (CTRL) e trattato con le microplastiche a 0, 7, 14, 21 e 28 giorni.

Il grafico rappresenta i valori relativi alla densità ottica registrati a 750 nm per la coltura di *A. maxima* trattata con le microplastiche a 0, 7, 21, 14 e 28 giorni e per la coltura senza alcun tipo di trattamento (il controllo). La registrazione dei valori di densità ottica è utile per determinare la concentrazione cellulare del cianobatterio. È possibile osservare un aumento dei valori della densità ottica

direttamente proporzionale al tempo di esposizione di *Spirulina* alle microplastiche. Diversi studi confermano l'aumento dei tassi di concentrazione cellulare da parte dei cianobatteri o delle microalgae. Uno studio di Muslihuddin M. *et al*, 2020 ha analizzato il tasso di crescita della microalga *Chlorella pyrenoidosa*, ponendo 500 mg di microplastiche corrispondenti al polimero PET in 25 ml di coltura. Il tasso di crescita della microalga è aumentato a seguito dell'esposizione ai polimeri della plastica; l'ipotesi più accreditata è che i microorganismi possano sfruttare i polimeri plastici come fonte di carbonio per la produzione di biomassa. Un ulteriore studio condotto da Khoironi A. *et al*, 2019 riguardante l'interazione tra *Spirulina sp.* e i polimeri del polietilene tereftalato PET e polipropilene PP ha dimostrato un generale decremento del tasso di crescita del cianobatterio trattato con le plastiche rispetto a quelli senza alcun contaminante. I ricercatori hanno concluso che il risultato è da ricondurre alla interferenza delle microplastiche con la captazione della radiazione luminosa da parte del cianobatterio e, quindi, aver inibito il processo di fotosintesi (Hadiyanto et al., 2012).

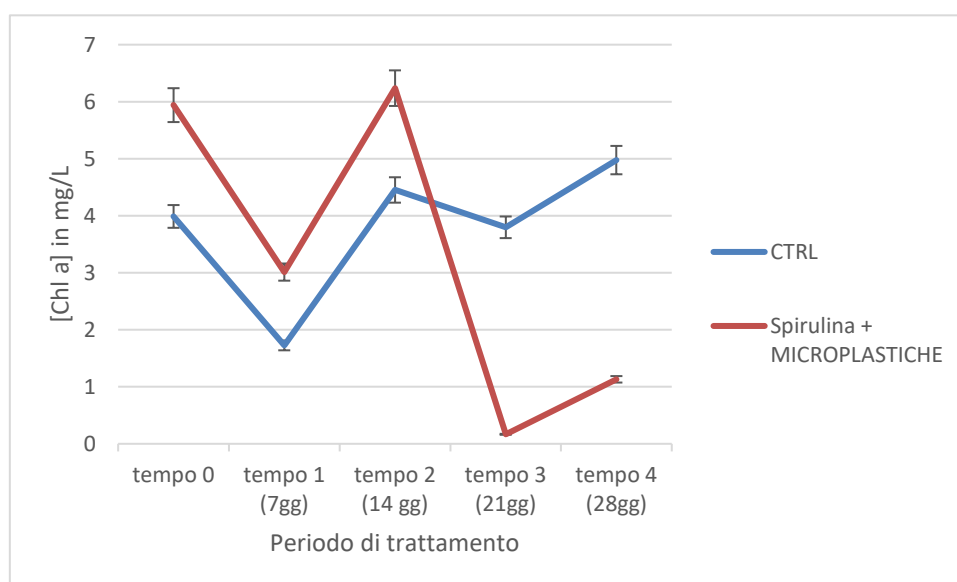


Fig. 38 Il grafico riporta i valori, misurati allo spettrofotometro, della clorofilla *a* riferiti ad una coltura di *A. maxima* trattata con le microplastiche e ad *A. maxima* senza alcun trattamento (il controllo a 0,7,14, 21, e 28 giorni).

Il grafico (Fig.38) rappresenta i valori della clorofilla *a* relativi alla coltura di *A. maxima* trattata con le microplastiche e ad una coltura senza la presenza di alcun tipo di contaminante. I valori della clorofilla espressi in mg/L sono stati misurati al tempo 0 e dopo 7, 14, 21 e 28 giorni. Al Tempo 0, 1 e 2 è possibile osservare valori più alti di Chl *a* per la coltura trattata con le microplastiche rispetto al controllo, al tempo 3 e 4, invece, i valori di clorofilla *a* per *Spirulina* con le microplastiche mostrano un brusco decremento rispetto ai tempi precedenti.

Il valore relativo alla quantità di clorofilla *a* è un indicatore della presenza di pigmenti funzionali e di un buon apparato fotosintetico (Lichtenthaler et al., 1981). Dunque, i bassi valori della quantità di clorofilla *a* registrati al tempo 3 e 4 potrebbero indicare le condizioni di stress a cui è stato sottoposto il cianobatterio in interazione con le microplastiche e dei possibili danni all'apparato fotosintetico. Resta da approfondire il dato relativo a Tempo 0 che farebbe supporre ad un fenomeno aggregativo immediato delle colture all'intorno delle microplastiche, che determinerebbe un aumento della concentrazione di organismi nello stesso volume rispetto al controllo; questo trend si mantiene inalterato fino ai 14 gg per poi subire il rapido decremento probabilmente dovuto a fenomeni degradativi.

CONCLUSIONI

Il lavoro di tesi è stato focalizzato sul problema relativo all'inquinamento legato ai rifiuti plastici che, come evidenziato, rappresentano la parte più cospicua (circa il 60-80% secondo gli studi di Derraik, 2002) di tutto il "Marine Litter", cioè di tutti i rifiuti presenti all'interno degli ambienti marini. I rifiuti plastici hanno ormai raggiunto un'ampia distribuzione a livello globale e sono stati ritrovati nelle aree più remote del globo, a causa della loro persistenza e resistenza alla degradazione. Esistono innumerevoli fonti di immissione dei rifiuti presenti nell'ambiente, i quali possono avere origine terrestre o marina. Lo studio è stato rivolto in particolare alle microplastiche, ovvero frammenti di plastica derivanti dalla degradazione e frammentazione di oggetti di dimensioni maggiori oppure particelle di plastiche prodotte originariamente in piccole dimensioni. È stato dimostrato da numerose ricerche che anche le microplastiche, così come i rifiuti di maggiori dimensioni, presentano una distribuzione ubiquitaria in tutti gli ecosistemi marini e terrestri. La distribuzione delle particelle di plastica nell'ambiente è influenzata dagli agenti atmosferici, dai moti ondosi, dai movimenti verticali e orizzontali delle correnti ma anche dalla loro densità, differente per ogni tipologia di polimero, che influisce sulla distribuzione all'interno della colonna d'acqua, disponendolo sia negli strati superficiali che nei fondali. Le caratteristiche delle plastiche e la loro distribuzione globale trovano un riscontro positivo con i risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi. La ricerca ha interessato alcune aree calabresi e ha dimostrato la presenza di microplastiche in tutti i siti indagati, i quali sono stati selezionati seguendo le disposizioni della direttiva Marine Strategy interessando la sottoregione del Mar Ionio-Mediterraneo centrale appartenente alla regione del Mediterraneo. In particolare, i siti di indagine corrispondono a transetti posti a diversa distanza dalla costa dimostrando che le microparticelle possono ottenere un'ampia distribuzione essendo sottoposte ai moti ondosi, alle correnti e al rimescolamento delle acque. Inoltre, si è osservata una maggiore concentrazione di microplastiche nelle aree in prossimità delle zone portuali, quindi aree interessate da intense attività antropiche. Questo ha dimostrato la stretta correlazione esistente tra le attività dell'uomo e la presenza della plastica in mare. La tipologia di forma maggiormente riscontrata corrisponde ai frammenti di colore bianco o trasparenti, dovuti agli innumerevoli oggetti del Marine Litter che vanno incontro a processi di frammentazione e degradazione. I polimeri più abbondanti sono risultati essere il polietilene, con elevate concentrazioni in tutti i siti, e il polipropilene. In concentrazioni minori sono stati determinati anche il polietilene tereftalato e il polistirene. La presenza dei polimeri di PE e di PP è in accordo con numerosi studi effettuati sulle acque superficiali, si tratta infatti di polimeri che maggiormente vengono rilevati in quelle zone del mare in relazione alla loro densità, minore dell'acqua del mare, che gli permette di galleggiare. Inoltre, il PE e il PP sono tra i polimeri maggiormente prodotti nel mondo poiché le loro caratteristiche li rendono utili in molti campi di applicazione.

È stato anche trattato l'aspetto inerente l'interazione delle microplastiche con i microrganismi, ponendo alcune tra quelle campionate in interazione per 28 giorni con il cianobatterio *Arthrospira maxima* e attraverso la valutazione della densità ottica e della quantità di clorofilla *a* è stato osservato che il cianobatterio mostrava un aumento del tasso di crescita, infatti i microrganismi utilizzano i polimeri come fonte di carbonio per la produzione di biomassa. Le variazioni della quantità di clorofilla *a* dimostrano un effetto immediato delle microplastiche, probabilmente dovuto alla variazione dello stato di aggregazione delle colonie di *A. maxima* sulla superficie dei frammenti la cui natura merita di essere investigata in futuri studi. Ciò che possiamo affermare è che le microplastiche interagiscono con gli organismi ed è necessario tenere in considerazione le negative ripercussioni che questo effetto può avere sull'intero ecosistema.

Dai risultati ottenuti dal lavoro di tesi è confermata l'importanza di effettuare questa tipologia di analisi per valutare i valori di concentrazione delle microplastiche, le loro fluttuazioni e la tipologia che più frequentemente viene riscontrata in modo da risalire alla fonte e al destino dei rifiuti e proporre delle soluzioni per ridurre la presenza nell'ambiente di questo pericoloso contaminante. Sono, quindi, necessarie ulteriori ricerche in questa direzione per evitare che gli equilibri degli ecosistemi vengano irrimediabilmente compromessi e suggerire strategie di biorimediazione mediata da microrganismi.

BIBLIOGRAFIA

Andrady A. L., *Plastics and the Environment*. John Wiley & Sons. (2003)

Andrady L. "Microplastics in the marine environment". *Marine Pollution Bulletin* 62, 1569-1605. (2011)

Arthur C., Baker J., Bamford H. "Proceedings of the international research workshop on the occurrence, effects, and fate of microplastic marine debris". Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, Technical Memorandum NOS-OR&R-30. (2009)

Barnes D. K., Galgani F., Thompson R. C., Barlaz M. "Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1526), 1985–1998. (2009)

Bergmann M., Gutow L., Klages M. "Marine Anthropogenic Litter". Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. ISBN 978-3-319-16509-7, ISBN 978-3-319-16510-3 (eBook), DOI 10.1007/978-3-319-16510-3. (2015)

Betts, K. "Why small plastic particles may pose a big problem in the oceans". *Environmental science & technology* 42 (24), 8995–8995. (2008)

Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R. "Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks". *Environmental science & technology* 45 (21), 9175–9179. (2011)

Caron A., Thomas C., Ariel E., Berry K., Boyle S., Motti C. e Brodie J. "Extraction and identification of microplastics in sea turtles: method development and preliminary results". *TropWATER Report no.* 15/52 (2016)

Carpenter E. J., Smith K. "Plastics on the sargasso sea surface". *Science* 175 (4027), 1240–1241. (1972)

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

Claessens M., Cauwenberghe L., Vandegehuchte M e Janssen. "New techniques for the detection of microplastics in sediments and fields collected organisms". *Marine Pollution Bulletin* 70, 227-233. (2013)

Cole M., Lindeque P., Halsband C., Galloway T. "Microplastics as contaminants in the marine environment: a review". *Marine pollution bulletin* 62 (12), 2588–2597. (2011)

Collignon A., Hecq J., Galgani F., Voisin P., Collard. e Goffart A. "Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea". *Marine Pollution Bulletin* 64, 861-864. (2012)

- D'alessandro M., Porporato E., Giacobbe S., Deidun A., Nasi F., Ferrante L., Auriemma R., Berto D., Renzi M., Scotti G., Consoli P., Del Negro P. e Andalaro F., Romeo T. "Common pattern of functional and biotic indices in response to multiple stressors in marine harbours ecosystems". *Environmental Pollution* 259 113959. (2020)
- Derraik J. G. "The pollution of the marine environment by plastic debris: a review". *Marine pollution bulletin* 44 (9), 842–852. (2002)
- Dubinsky Z., R. Matsukawa, I. Karube. "Photobiological aspects of algal mass culture". *Journal of Marine Biotechnology.*, 2, 61-65). (1995)
- Engler, R. E. "The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean". *Environmental science & technology* 46 (22), 12302–12315. (2012)
- Eriksen M., Lebreton L. C., Carson H. S., Thiel M., Moore C. J., Borerro J. C., Galgani F., Ryan P. G., Reisser J. "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. (2014)
- Fendall L. S., Sewell M. A. "Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers". *Marine Pollution Bulletin* 58 (8), 1225–1228. (2009)
- Fowler C. W. "Marine debris and northern fur seals: a case study". *Marine Pollution Bulletin* 18 (6), 326–335. (1987)
- Galgani F., Leaute J., Moguedet P., Souplet A., Verin Y., Carpentier A., Goraguer H., Latrouite D., Andral B., Cadiou Y., et al. "Litter on the sea floor along european coasts". *Marine pollution bulletin* 40 (6), 516–527. (2000)
- Galgani F., Souplet A., Cadiou Y. "Accumulation of debris on the deep-sea floor off the french mediterranean coast". *Marine Ecology Progress Series* 142 (1), 225–234. (1996)
- Gambardella C., Piazza V., Albentosa M., Bebiannoc M., Cardosoc C., Faimalia M., Garaventa F., Garrido S., Gonzalezd S., Pérezd S., Sendrac M e Beirasd. "Microplastic do not affect standard ecotoxicological endpoints in marine unicellular organismis". *Marine Pollution Bullettin* 143 , 140-143. (2019)
- GESAMAP. "Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment" (Kershaw, P.K, ed.). (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMEP No. 90, 96 p. (2015)
- Graham E.R. e Thompson J.T. "Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (*Echinodermata*) ingest plastic fragments". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 368 , 22-29. (2009)
- Gregory M. R. "Plastic scrubbers in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified". *Marine Pollution Bulletin* 32 (12), 867–871. (1996)
- Herrera A., Garrido-Amador P., Martinez I., Samper M.D., Lòpez-Martínez, Gòmez M. e Packard T. "Novel methodology to isolate microplastics from vegetal-rich samples". *Marine Pollution Bulletin* 129 , 61-69. (2018)

- Hinojosa I. A., Thiel M. "Floating marine debris in fjords, gulfs and channels of southern Chile". *Marine Pollution Bulletin* 58 (3), 341–350. (2009)
- Ito M., Ito K., Ohta K., Hano T., Onduka T., Mochida K. e Fujii K. "Evaluation of bioremediation of three benthic anellids in organically polluted marine sediment". *Chemosphere* 163, 392–399. (2016)
- Jambeck J. R., Geyer R., Wilcox C., Siegler T. R., Perryman M., Andrady A., Narayan R., Law K. L. "Plastic waste inputs from land into the ocean". *Science* 347 (6223), 768–771. (2015)
- Kenyon K. W., Kridler E. "Laysan albatrosses swallow indigestible matter". *The Auk*, 339–343. (1969)
- Kroon F. J., Motti C. E., Jensen L. H. e Berry K. L. E., "Classification of marine microdebris: A review and case study on fish from the Great Barrier Reef, Australia". *Australian Institute of Marine Science (AIMS)*, 8:16422 (2018).
- Kuhn S., van Oyen A., Booth A.M., Meijboom A. e van Franeker J.A. "Marine microplastic: Preparation of relevant test materials for laboratory assessment of ecosystem impacts" *Chemosphere* 213 , 103–113. (2018)
- Lagarde F., Olivier O., Zanella M., Daniel P. Hiard S. e Caruso A. "Microplastic interactions with freshwater microalgae: Heteroaggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type". *Environmental Pollution* 215, 331–339. (2016)
- Law K. L., Morét-Ferguson, S., Maximenko N. A., Proskurowski G., Peacock, E. E., Hafner, J., Reddy, C. M. "Plastic accumulation in the north Atlantic subtropical gyre". *Science* 329 (5996), 1185–1188. (2010)
- Loder M. e Gerdt G. Chapter 8, "Methodology used for the detection and identification of microplastics – a critical appraisal". *Marine anthropogenic litter*, DOI 10.1007/978-3-319-16510-3_8. (2015)
- Marengo M., Fullgrabe L., Fontaine Q., Mazzotti N., Lejeune P., Boissery P. e Gobert S. "Abundance, composition and spatial distribution of marine plastic litter in sea surface waters around Cap Corse". *Nanotechnology and advanced material science*. Vol 3 issue 1. (2020)
- Mato Y., Isobe T., Takada H., Kanehiro H., Ohtake C., Kaminuma T. "Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment". *Environmental science & technology* 35 (2), 318–324. (2001)
- Moore R., Millar C. e Moore J. "Antimicrobial resistance (AMR) and marine plastics: Can food packaging litter act as a dispersal mechanism for AMR in oceanic environments?". *Marine Pollution Bulletin* 150 , 110702. (2020)
- Moore C. J. "Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat". *Environmental research* 108 (2), 131–139. (2008)
- Moore C. J., Moore S. L., Leecaster, M. K., Weisberg, S. B. A comparison of plastic and plankton in the north Pacific central gyre. *Marine Pollution Bulletin* 42 (12), 1297–1300. (2001)

- Murray F. e Cowie P.R. "Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephops norvegicus* (Linnaeus, 1758)". *Marine Pollution Bulletin* 62 , 1207-1217. (2016)
- Muthukumar T., Aravinthan A., Lakshmi K., Venkatesan R., Vedaprakash L., Doble M. "Fouling and stability of polymers and composites in marine environment". *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (2), 276–284. (2011)
- Nadal M.A., Alomar C. e Deudero S. "High levels of microplastics ingestion by the semipelagic fish bogue *Boops boops* (L.) around the Balearic Islands". *Environmental Pollution* 214, 517-523. (2016)
- Nor N. H. M., Obbard J. P. "Microplastics in singapore's coastal mangrove ecosystems". *Marine pollution bulletin* 79 (1), 278–283. (2014)
- Ogata Y., Takada H., Mizukawa K., Hirai H., Iwasa S., Endo S., Mato Y., Saha M., Okuda K., Nakashima A., et al. "International pellet watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (pops) in coastal waters. 1. initial phase data on pcbs, ddts, and hchs". *Marine pollution bulletin* 58 (10), 1437–1446. (2009)
- Piha H., Hanke G., Galgani F., Werner S., Alcaro L., Mattidi M., Fleet D., Kamizoulis G. *et al.* *Marine litter: Technical recommendations for the implementation of msfd requirements.* (2011)
- Remy F., Collard F., Gilbert B., Compère P., Eppe G. e Lepoint G. "When Microplastic Is Not Plastic: The Ingestion of Artificial Cellulose Fibers by Microfauna Living in Seagrass Macrophytodebris". *Environmental Science & Technology*, 49, 11158-11166. (2015)
- Renner G., Schmidt T.C. e Schram J. "Analytical methodologies for monitoring micro(nano)plastics: Which are fit for purpose?". *Current opinion in Environmental Science & Health*, 1:55- 61. (2018)
- Rochman C. M., Browne M. A., Halpern B. S., Hentschel B. T., Hoh E., Karapanagioti H. K., Rios-Mendoza L. M., Takada H., Teh S., Thompson R. C. "Policy: Classify plastic waste as hazardous". *Nature* 494 (7436), 169–171. (2013a)
- Ryan G.P., Moore C.J., Van Franeker J.A. e Moloney C.L. "Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment". *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 1999-2012. (2009)
- Ryan P. G. "A brief history of marine litter research". Springer. (2015)
- Ryan P. G., Moore C. J., van graneker J. A., Moloney, C. L. "Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1526), 1999–2012. (2009)
- Setälä O., Norkko J. e Lehtiniemi M. "Feeding type microplastic ingestion in a coastal invertebrate community". *Marine Pollution Bulletin* 102, 95-101. (2016)
- Shah A. A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S."Biological degradation of plastics: a comprehensive review". *Biotechnology advances* 26 (3), 246–265. (2008)
- Shen M., Zeng G., Zhang Y., Wen X., Song B. e Tang W. "Can biotechnology strategies effectively manage environmental (micro)plastics?" *Science of the Total Environment* 697, 134200. (2019)

- Silva A.B., Bastos A.S., Justino C., da Costa J.P., Duarte A.C. e Rocha-Santos T. "Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry-A review". *Analytica Chimica Acta* 1017, 1-19. (2018)
- Small, C. & Nicholls, R. J. "A global analysis of human settlement in coastal zones". *Journal of Coastal Research*, 19, 584–599. (2003)
- Teuten E. L., Rowland S. J., Galloway T. S., Thompson R. C. "Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants". *Environmental science and technology* 41 (22), 7759–7764. (2007)
- Thompson R. C. "Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions". *Marine Nature Conservation in Europe* 2006, 107. (2006)
- Thompson R. C., Olsen Y., Mitchell R. P., Davis A., Rowland S. J., John A. W., McGonigle D., Russell A. E. "Lost at sea: where is all the plastic?" *Science* 304 (5672), 838–838. (2004)
- Van Cauwenberghe, L., Vanreusel A., Mees J., Janssen C. R. "Microplastic pollution in deep-sea sediments". *Environmental Pollution* 182, 495–499. (2013)
- Zettler, E. R., Mincer T. J., Amaral-Zettler L. A. "Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris". *Environmental science & technology* 47 (13), 7137–7146. (2013)

SITOGRAFIA

www.corepla.it

www.ipcc.ch/

www.materieplastiche.eu

www.minamambiente.it

www.plasticseurope.org/it

www.sciencehistory.org

www.strategiamarina.isprambiente.it

www.unep.org

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato desidero ringraziare tutte le persone che hanno reso possibile lo svolgimento del lavoro.

Ringrazio il Professore Mauro La Russa e la Professoressa Silvia Mazzuca per i loro preziosi insegnamenti, per i consigli e la fornitura del materiale utile alla stesura della tesi.

Ulteriori ringraziamenti sono rivolti al Dr. Alessandro Marrone per l'aiuto nell'analizzare tutti i campioni, per la rielaborazione e discussione dei dati. Al Dr. Emilio Cellini e alla Dott.ssa Stefania Giglio per la disponibilità nel fornire i campioni e tutto il materiale inerente al campionamento. Ringrazio la Dott.ssa Amalia Piro, la Dott.ssa Daniela Oliva e il Dr. Matteo Nisticò per avermi guidata durante lo svolgimento dell'esperimento in laboratorio e per i loro utili consigli.