

# MICROPLASTICHE NELLE ACQUE: ELEMENTI DI ANALISI DEL RISCHIO

Lorenzo Martellone (a, b), Daniela Mattei (a), Gabriele Favero (b)

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

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

## Introduzione

Le microplastiche rappresentano una classe di contaminanti ambientali "emergenti" il cui interesse per la ricerca è rapidamente cresciuto, soprattutto nell'ultimo decennio, in linea con la crescente preoccupazione riguardante possibili ripercussioni di carattere sanitario e ambientale.

Sebbene siano da tempo oggetto di studio (1-2), una definizione univoca di microplastica ancora non è stata concordata (3), a causa dell'estrema eterogeneità di questi composti e della mancanza di uniformità dei metodi di campionamento.

Le microplastiche rappresentano un insieme variegato di polimeri di dimensioni, tipologie, forme e colori differenti (4) ai quali vengono spesso aggiunti diversi additivi per motivazioni di natura tecnologica. I criteri dimensionali e relativi alla loro composizione chimica sono quelli che maggiormente interessano la comunità scientifica per la loro utilità nel caratterizzarle e quantificarle, almeno in maniera grossolana. La maggior parte degli esperti è d'accordo nel definire le microplastiche come particelle plastiche, solide e insolubili in acqua, di dimensioni inferiori a 5 mm in lunghezza (3); alcuni suggeriscono di inserire in questa definizione anche un limite inferiore (intorno ad 1  $\mu\text{m}$ ) per distinguerle dalle nanoplastiche (5), anche se risulta determinante sotto questo profilo la tecnica di campionamento utilizzata. Risultano altresì controversi gli aspetti relativi alla composizione chimica. La maggior parte degli studi si è focalizzata sui polimeri esclusivamente sintetici, quali il polivinilcloruro (PVC), il polipropilene (PP) e il polietilene tereftalato (PET) diversamente da quanto definito a livello normativo (ISO/TR21960) (6), che esclude ad esempio da questo gruppo gli elastomeri. È da considerare inoltre che una estensiva definizione delle microplastiche può comprendere anche caratteristiche secondarie delle sostanze, quali forma, colore e origine. Il concetto di origine viene spesso utilizzato per spiegare le modalità con le quali questi contaminanti si diffondono nell'ambiente. Per microplastiche primarie (3-5) si intendono quelle prodotte all'origine nel range dimensionale in cui le stesse vengono ritrovate (es. abrasivi industriali utilizzati per le sabbature o le microsferi di polietilene utilizzate come esfolianti nei cosmetici); le microplastiche secondarie si formano invece in seguito al logoramento di oggetti di plastica più grandi (es. bottiglie, buste, vestiti).

Le microplastiche sono state ritrovate in un'estesa varietà di matrici biologiche (7, 8) e ambientali (9, 10), essendo ormai ubiquitaria la loro diffusione. A differenza della macroplastiche, i cui meccanismi di tossicità sono sufficientemente noti, i pattern legati alle microplastiche sembrano essere maggiormente eterogenei e prevalentemente indiretti. Oltre ad un danno diretto questi polimeri sono infatti coinvolti in meccanismi di tossicità secondaria; questa è dovuta alle caratteristiche chimiche dei materiali costituenti le plastiche e alla capacità di queste ultime di trasportare microrganismi e additivi pericolosi per la salute umana.

Il danno diretto può essere associato alla capacità degli organismi viventi di inalare o ingerire le microplastiche tramite ad esempio il consumo di acqua contaminata o attraverso processi di biomagnificazione. Studi sulla fauna marina (11) hanno mostrato come le microplastiche possano essere accumulate nei vari tessuti determinando danni anche severi al tratto gastrointestinale,

ritardo della crescita, riduzione della fertilità e del tasso di sopravvivenza della progenie. Gli elementi di valutazione di rischio tossicologico per la salute umana sono piuttosto frammentati e precludono una analisi esaustiva. Effetti sistemici sembrano da escludere (12-13), vista la scarsa tendenza delle particelle superiori a 150 µm di venir assorbite nel tratto gastrointestinale umano; anche per le particelle più piccole l'assorbimento appare essere limitato. Gli effetti diretti delle microplastiche sembrano per questo essere focalizzati sul tratto gastrointestinale. L'ingestione di microplastiche, anche se a concentrazioni elevate, è stata associata con lieve irritazione intestinale e infiammazione; le microplastiche avrebbero anche la capacità di accumularsi all'interno di fagociti di questa regione compromettendone l'immunità locale (14). Per quanto riguarda la tossicità secondaria, gli aspetti da considerare sono molteplici.

Le microplastiche potrebbero essere infatti dannose per l'ambiente e per l'uomo tramite il rilascio per degradazione di monomeri o additivi in esse incorporate (15). Questi possono essere dispersi nell'ambiente danneggiando anche gli organismi viventi. Additivi come i polibromodifenileteri (PBDE), gli ftalati, il biossido di titanio e alcuni coloranti contenenti cadmio sono universalmente riconosciuti come nocivi per la salute umana e animale. Le microplastiche possono inoltre agire come adsorbenti di metalli pesanti, di pesticidi o di inquinanti organici persistenti (*Persistent Organic Pollutants*, POP) (16) e da vettori per il loro trasporto nell'ambiente o lungo la catena trofica; il contributo di questi contaminanti alla loro diffusione appare però trascurabile, rispetto a quello di altre fonti ambientali.

Inoltre, la natura idrofobica delle microplastiche potrebbe favorire lo sviluppo di biofilm batterici permettendo il trasporto, anche a lunga distanza, di colonie microbiche anche patogene e incrementare la possibilità di scambio di materiale genetico contribuendo alla diffusione dell'antibiotico-resistenza (17). Non vi sono però al momento evidenze di danni per salute umana riguardo a questo aspetto.

## Evidenze di diffusione nelle acque

È ormai noto come le microplastiche siano ampiamente diffuse in ogni tipologia di ambiente acquatico. A causa della presenza di rifiuti plastici di grosse dimensioni e ad alto impatto ambientale, l'ecosistema marino è stato il primo ad essere indagato (2) ed è quello su cui si sono focalizzate la maggior parte delle ricerche. Le microplastiche possono raggiungere l'ambiente marino attraverso differenti vie. La maggior parte delle microplastiche marine (69-81%) è di tipo secondario (18, 19) ed è una diretta conseguenza della contaminazione dei mari da plastiche di grandi dimensioni. La restante parte è microplastica primaria che raggiunge il mare tramite agenti atmosferici o (prevalentemente) acqua dolce.

Gli ambienti di acqua dolce possono risultare cruciali non solo per la contaminazione del mare ma anche per la filiera idropotabile. Per questo motivo, negli ultimi anni l'interesse della ricerca sulle microplastiche si è parzialmente spostato sull'indagine delle modalità con le quali questi contaminanti raggiungono questi ambienti e l'impatto che hanno sulla distribuzione di acqua potabile (19). Sebbene sia estremamente difficile, rispetto all'ambiente marino, definire estensivamente i fattori che contribuiscono alla contaminazione delle acque dolci, i pattern di distribuzione possono essere essenzialmente attribuibili a fonti terrestri, agli impianti di trattamento delle acque reflue, ai sistemi fognari misti, alla degradazione di plastiche più grandi e al deposito atmosferico. Diversi studi suggeriscono la possibilità di contaminazione delle acque da elementi di usura stradale (in particolare delle vernici utilizzate per la segnaletica orizzontale) e dagli pneumatici delle automobili (20, 21); a questo può inoltre contribuire la cosiddetta *city dust*, il risultato dell'abrasione di diversi oggetti come le suole delle scarpe e dei tappeti erbosi sintetici e i prodotti utilizzati per l'agricoltura. Un'altra fonte di contaminazione universalmente riconosciuta sono le acque di scarico e gli impianti di trattamento

delle acque reflue (21, 22). Le acque reflue raccolgono infatti un'innumerabile varietà di microplastiche utilizzate in ambito domestico (tra cui principalmente le fibre tessili perse durante i lavaggi e microsferule utilizzate in cosmetica) e industriale e l'efficacia degli impianti di trattamento nel rimuoverle è molto dibattuta. Le caratteristiche degli impianti di trattamento sono infatti tra loro differenti e comunque non vengono in genere adottate tecnologie specifiche per la rimozione delle microplastiche. Inoltre, al di là dell'efficacia del processo, l'ampio volume d'acqua trattato in questi impianti potrebbe contribuire, comunque, ad introdurre quantità non trascurabili di microplastiche nell'ambiente acquatico. Possono contribuire alla contaminazione delle acque anche i sistemi fognari misti (21), estremamente diffusi nella gran parte dei Paesi, che raccolgono contemporaneamente le acque reflue dalle abitazioni e le precipitazioni meteoriche recepite a livello stradale per convogliarle all'impianto di trattamento. Quando i volumi d'acqua superano la capacità di carico dell'impianto di trattamento (es. durante intense perturbazioni meteo), per motivi di sicurezza l'acqua bypassa l'impianto attraverso scolmatori di piena e viene riversata direttamente nel corpo idrico recettore, contribuendo in maniera massiccia alla diffusione ambientale di microplastiche. Infine, come per le acque salate, la frammentazione di rifiuti di plastica più grandi può determinare il rilascio di microplastiche nell'ambiente in questione (23, 24). Per quanto concerne le acque potabili, può giocare un ruolo cruciale anche la componentistica delle tubazioni e dei filtri utilizzati negli impianti di potabilizzazione (9).

Sebbene i risultati dei numerosi studi pubblicati finora sul *tracking* delle microplastiche risultino decisamente disomogenei, una certa tendenza all'accumulo è stata osservata intorno alle zone urbanizzate e industriali (25, 26). Come prevedibile, le concentrazioni generalmente risultano più elevate in acque superficiali rispetto a quelle sotterranee (9) che non subiscono l'effetto del deposito atmosferico.

## Criteri metodologici

La maggior parte degli studi sulle microplastiche è stata condotta su campioni ambientali quali acqua, sedimenti e fanghi di depurazione degli impianti di trattamento. In Figura 1 sono riportate le pubblicazioni su microplastiche, microplastiche in ambienti acquatici e in acque destinate al consumo umano dal 2006 al 2019 nel database MEDLINE.

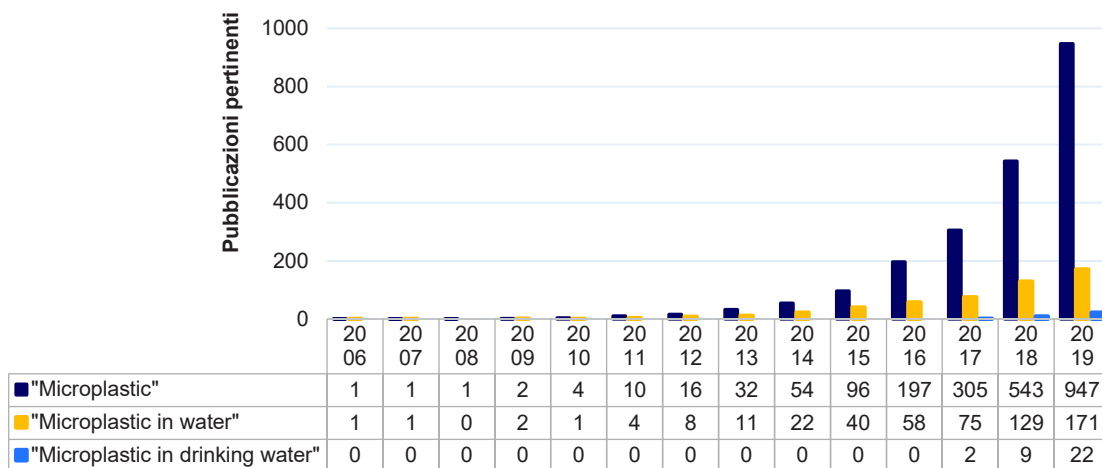


Figura 1. Numero di pubblicazioni su microplastiche e microplastiche in ambienti acquatici e acque destinate al consumo umano nel database MEDLINE (2006-2019)

Risultano in letteratura ricerche su altre tipologie di campioni come ad esempio matrici biologiche di animali (per lo più sangue e feci) (7, 8), aria (14, 27) e acqua in bottiglia (28). Sebbene non vi siano al momento metodi standard per identificare e quantificare efficacemente le microplastiche, i campioni ambientali condividono parte della fase di pretrattamento del campione e dei criteri strumentali frequentemente utilizzati.

## Campionamento

Il campionamento, soprattutto per le acque, è la fase più critica dell'intero processo. Il metodo prescelto per il campionamento deve garantire l'analisi di un volume sufficiente affinché i risultati ottenuti possano essere significativi ma allo stesso tempo deve essere in grado di evitare gli inconvenienti di natura tecnica (es. intasamento dei filtri) che spesso si verificano in questa fase. Diversi studi (29) hanno mostrato come le particelle più piccole siano più abbondanti, per cui volumi minori saranno preferibili se si vogliono ottenere informazioni su particelle di grandezza compresa tra i 100 e i 300  $\mu\text{m}$ , che sono generalmente le più difficili da identificare. Se invece sono le microplastiche più grandi ( $>300 \mu\text{m}$ ) l'oggetto dell'indagine, un volume più ampio sarà richiesto per non ricadere in sottostime. Koelmans *et al.* (29), sulla base di tali presupposti, suggeriscono dei volumi di campionamento ottimali per ciascuna tipologia di acqua dolce sul quale vengono effettuate le analisi. Per le acque superficiali, date le basse concentrazioni, la relatività facilita a campionare volumi elevati e la maggiore suscettibilità a variabili temporali e atmosferiche, lo standard è stato fissato a 500 L; volumi ancora maggiori sono richiesti in caso di località remote e ipoteticamente meno contaminate. Per gli impianti di depurazione (*WasteWater Treatment Plant*, WWTP) occorre differenziare tra flusso in entrata e flusso in uscita. I flussi in entrata, a causa della loro origine, sono notevolmente più contaminati da microplastiche rispetto ad altre matrici e pertanto un volume di 1 L è considerato sufficiente (29). Viceversa, dopo il trattamento, il quantitativo aspettato è notevolmente minore, ed è consigliato come valore di riferimento 500 L (29). Per l'acqua di rubinetto il volume di campionamento consigliato è fino a 1000 L, dato che si tratta di acqua destinata al consumo umano che può aver subito trattamenti anche spinti di potabilizzazione e per cui le concentrazioni attese di microplastiche sono decisamente basse (29).

Per campionare l'acqua vengono solitamente utilizzate delle specifiche reti o delle pompe connesse a diverse tipologie di filtri, entrambe collegate ad uno specifico misuratore di flusso. Le reti da campionamento per grandi volumi d'acqua, il cui prototipo è la rete manta (30), vengono trascinate da barche (es. in corpi idrici) o fissate ad appositi sostegni nella zona di campionamento di interesse. Le microplastiche vengono trattenute dalla rete a seconda dell'apertura della maglia (con valore ottimale nell'ordine di 300  $\mu\text{m}$ ) (29) per poi essere raccolte e processate per l'analisi. Il grande vantaggio dell'utilizzo di reti nel campionamento delle microplastiche è che queste sono in grado, nelle maggior parte dei casi, di filtrare grandi volumi d'acqua rappresentando in maniera migliore la distribuzione dei contaminanti nell'area campionata. D'altro canto, la grandezza della maglia è un fattore limitante in questa tipologia di strumenti perché esclude dal campionamento tutto ciò che è dimensionalmente più piccolo dell'apertura prescelta. Ciò che però limita maggiormente l'utilizzo delle reti è l'aspetto pratico: è impraticabile effettuare studi di questa tipologia in regioni non navigabili; gli studi presso i WWTP (in entrata o all'interno dell'impianto), gli impianti di potabilizzazione (*Drinking Water Treatment Plant*, DWTP) o su acqua in distribuzione richiedono l'utilizzo di sistemi di pompaggio o l'allaccio ad un rubinetto (9, 31-32). In questi casi, l'acqua viene convogliata mediante una pompa o direttamente attraverso il rubinetto in direzione di un sistema di filtraggio implicato. Per le operazioni, vengono generalmente impiegati filtri con aperture inferiori a quelle che si osservano nel campionamento con rete (solitamente 55-10  $\mu\text{m}$ ). Ciò permette di recuperare microplastiche di classi dimensionali

inferiori rispetto agli approcci basati sulle reti ma in molti casi non si riesce a filtrare volumi elevati per la possibilità di intasamento del filtro. In ogni caso, una volta raccolto, il materiale campionato viene conservato in contenitori *plastic-free* evitando ogni possibile contaminazione ambientale. L'approccio al campionamento per le altre matrici ambientali è sostanzialmente più semplice. Sedimenti e fanghi di depurazione vengono infatti solitamente raccolti tramite delle benne o *box-corer* e poi conservati refrigerati fino alla successiva analisi.

## Pretrattamento del campione

I campioni derivanti da acque, sedimenti e fanghi di depurazione devono subire diversi processi di pretrattamento prima di essere pronti per l'analisi. In generale, i campioni ricavati da matrici più pulite richiedono minori trattamenti rispetto a quelli più complessi; anche il metodo analitico finale gioca un ruolo di primo piano in questa fase dell'analisi. Non esistono comunque, alla stregua del campionamento, procedure di pretrattamento standardizzate e gli approcci che si trovano in letteratura possono variare anche molto tra studi dello stesso tipo. È possibile comunque osservare delle strategie comuni (33, 34).

L'analisi di tutte queste tipologie di campioni, ad eccezione di quelli ottenuti a partire da acque potabili, necessita di una preventiva digestione che ha lo scopo di rimuovere il materiale organico adeso alle particelle plastiche. Questo potrebbe infatti, più o meno, interferire con i risultati a seconda della tecnica analitica prescelta. La digestione con acidi, basi o da ossidanti come il perossido d'idrogeno è uno dei pre-trattamenti più utilizzati. Durante questo processo è fondamentale tenere sotto controllo la temperatura e ottimizzare tempo di digestione e la concentrazione dei reagenti per evitare la decomposizione e la decolorazione delle microplastiche raccolte (33, 35).

I campioni ricavati da sedimenti e fanghi (e in alcuni casi anche da acque) subiscono spesso una procedura di purificazione addizionale, una separazione per densità, che ha lo scopo di rimuovere le impurezze inorganiche ancora adese ai campioni. Viene solitamente eseguita a posteriori della digestione e consiste nella miscelazione della soluzione ricavata dalla precedente fase con un'altra soluzione salina satura. Si sfrutta la tendenza delle microplastiche ad affiorare in superficie quando messe in contatto con una soluzione salina, visto che la maggior parte delle microplastiche ha densità inferiore a quella dei sedimenti ( $2,7 \text{ g/cm}^3$ ) o comunque delle impurezze inorganiche (33-34).

Il *Drinking Water Inspectorate* (DWI), l'autorità britannica per la sicurezza delle acque potabili, consiglia (35) inoltre di procedere con uno step di digestione enzimatica per eliminare l'eventuale biofilm adeso. Questo potrebbe infatti a sua volta interferire con le tecniche di analisi. La digestione enzimatica è spesso, oltre alla filtrazione, l'unica procedura che viene applicata ai campioni di acqua potabile prima dell'analisi. In diversi studi viene inoltre condotta un'essiccazione del campione per rimuovere le tracce di acqua presenti; questa potrebbe infatti interferire con l'analisi spettroscopica nell'infrarosso e produrre un elevato rumore di fondo. È essenziale tuttavia non eccedere nella temperatura perché questa, ancora una volta, potrebbe degradare i polimeri plastici. Koelmans *et al.* suggeriscono in ogni caso di non superare i  $50^\circ\text{C}$  (29).

## Analisi strumentale

Uno dei metodi maggiormente utilizzati per quantificare le plastiche del campione, vista anche la sua relativa semplicità, è quello dell'ispezione visiva diretta. Tramite microscopio (o stereomicroscopio per le particelle più piccole) le particelle di plastica vengono contate manualmente; è anche possibile classificarle per dimensione, colore e forma. Questa metodologia

è anche utilizzata come preselezione delle particelle quando viene eseguita successivamente la caratterizzazione chimica. L'ispezione visiva permette infatti di avere un quadro dell'abbondanza di microplastiche nel campione in tempi relativamente celeri, ma non permette la loro identificazione ed è suscettibile a valutazioni di carattere soggettivo che possono portare ad una loro sovrastima o sottostima; per questo motivo risulta cruciale eliminare le possibili fonti di confondimento nella fase di pretrattamento, specie per le matrici più complesse come i sedimenti o i reflui (29,36,37).

L'identificazione qualitativa delle microplastiche viene effettuata con tecniche spettroscopiche, termoanalitiche o chimiche convenzionali. Tramite le tecniche spettroscopiche, che comprendono la spettrometria vibrazionale FT-IR (spettrometria IR a trasformata di Fourier) e Raman, è possibile identificare le strutture chimiche dei polimeri coinvolti comparando i loro spettri di assorbimento, emissione, riflettanza o diffusione con apposite librerie; queste permettono infatti di riconoscere i gruppi funzionali delle molecole mediante l'interazione di questi ultimi con una radiazione elettromagnetica. Si tratta di tecniche non distruttive, estremamente accurate e tra loro complementari (29, 36, 37).

Diverse tecniche FT-IR sono state efficacemente utilizzate nella caratterizzazione di microplastiche. La spettrometria infrarossa a riflettanza totale attenuata (ATR-FT-IR) permette di ricavare informazioni sulle microplastiche di dimensioni maggiori ( $> 500 \mu\text{m}$ ) con superfici irregolari, spesse e opache (al contrario dello FTIR classico a trasmittanza). Le particelle più piccole (fino a  $20 \mu\text{m}$ ) possono essere analizzate tramite spettroscopia IR accoppiata alla microscopia (micro-FT-IR). Questo approccio è in grado di produrre una mappa ad alta risoluzione del campione senza una fase di ispezione visiva preliminare. La spettroscopia IR presenta però diversi svantaggi applicativi. Per produrre il relativo spettro, in riflettanza o assorbanza, il polimero deve essere attivo all'IR; le particelle più piccole ( $< 200 \mu\text{m}$ ) e non trasparenti difficilmente possono essere analizzate con queste tecniche in quanto non assorbono così efficacemente nell'infrarosso da produrre uno spettro facilmente interpretabile. L'umidità residua nel campione deve essere inoltre completamente eliminata perché può interferire severamente con l'analisi. La strumentazione specifica per le tecniche avanzate è inoltre costosa e richiede personale altamente formato per le operazioni e l'interpretazione dei dati (29, 36, 37).

La spettroscopia Raman, quando accoppiata ad un microscopio (micro-Raman), è l'unica tecnica analitica efficace per identificare le particelle più piccole ( $1\text{-}20 \mu\text{m}$ ) con un'ampia risoluzione spaziale. È possibile analizzare anche le particelle più opache e l'acqua contenuta nel campione non interferisce più di tanto con l'analisi. La fluorescenza delle impurezze presenti nel campione e la relativa debolezza dei segnali osservati può però interferire notevolmente con le analisi. La spettroscopia Raman comporta anche in questi casi l'utilizzo di strumentazione specifica che richiede la presenza di personale formato (29, 36, 37).

Tra le tecniche termoanalitiche la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) accoppiata a pirolisi è la tecnica d'eccellenza. Il campione viene degradato termicamente per produrre composti gassosi tipici che vengono trasferiti in una colonna GC e successivamente iniettati in un analizzatore di massa a quadrupolo. Lo spettro dei prodotti di pirolisi viene quindi confrontato con quelli contenuti in apposite librerie per l'identificazione chimica delle microplastiche. Questa tecnica permette non solo di ottenere informazioni sul tipo di plastica presente nel campione ma anche sugli additivi eventualmente presenti. Si tratta di un metodo sensibile e affidabile che però è adatto solo per le microplastiche più grandi ( $>500 \mu\text{m}$ ). È inoltre un metodo distruttivo e non restituisce informazioni sul numero, sulla forma e sulle dimensioni dei polimeri campionati (29, 35, 36).

Infine la spettrometria di massa al plasma accoppiata induttivamente (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS) può essere utilizzata per decomporre il campione e

identificare specifici frammenti dei polimeri o elementi ad essi legati, ma restituisce poche altre informazioni rispetto a quelle ottenibili con gli altri metodi (38).

## Conclusioni e necessità di ricerca

L'estesa diffusione di microplastiche rappresenta un problema ambientale e culturale, anche in considerazione del potenziale impatto sulla salute umana, nonostante non vi siano attualmente evidenze chiare su quali effetti potrebbero provocare e attraverso quali meccanismi.

Nonostante diversi Paesi, Italia compresa (39), abbiano già preso alcune misure restrittive al fine di contrastare la contaminazione da microplastiche attraverso una limitazione della loro produzione e diffusione, risulta ancora da definire estensivamente la pianificazione e l'armonizzazione delle misure in ambito legislativo.

Dal punto di vista analitico, nonostante le numerose tecniche strumentali a disposizione, ancora non è stato condiviso dalla comunità scientifica un protocollo standard. Vi sono differenze sensibili tra gli studi effettuati in termini di campionamento, pretrattamento e analisi strumentale che non permettono un confronto diretto dei risultati; in ogni caso ciascun metodo adottato presenta delle caratteristiche che lo rendono più o meno congruo per l'analisi a seconda delle finalità delle indagini, delle risorse disponibili e della tipologia di campione. Un altro fattore che può ostacolare l'analisi è la contaminazione ambientale che deve essere ridotta al minimo durante il campionamento per non compromettere l'intera analisi quantitativa. Risulta determinante anche comprendere meglio i *pattern* di distribuzione di questi contaminanti nelle acque dolci, con lo scopo di comprendere più approfonditamente gli effetti sull'ecosistema e sulla salute umana.

## Bibliografia

1. Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davies A, Rowland SJ, John A, McGonigle D, Russel A. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 2004;304(5672):838.
2. Ng KL, Obbard JP. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 2006;52(7):761-7.
3. Marsden P, Koelmans B, Bourdon-Lacombe J, Gouin T, D'Anglada L, Cunliffe D, Jarvis P, Fawell J, De France J. *Microplastic in drinking water*. Geneva: World Health Organization; 2019.
4. Thompson RC, Bergmann M, Gutow L, Klages M. Microplastics in the marine environment: sources, consequences and solutions. *Marine Anthropogenic litter* 2015;185-200.
5. Hartmann N, Huffer T, Thompson R, Hassello M, Verschoor A, Daugaard A, Rist S, Karlsson T, Brennholt N, Cole M, Herrling M, Hess M, Ivleva N, Lusher A, Wagner M. Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. *Environmental Science and Technology* 2019;53:1039-47.
6. ISO/TR21960:2020. *Plastic in the environment. Current state of knowledge and methodologies*. Geneva: International Organization for Standardization; 2020.
7. Provencher A, Vermaire JC, Avery-Gomm S, Braune, BM, Mallory ML. Garbage in guano? Microplastic debris found in faecal precursors of seabirds known to ingest plastics. *Science of Total Environment* 2018;644:1477-84.
8. Deng Y, Zhang Y, Lemos B, Ren H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Nature Scientific Reports* 2017;7:46687.
9. Mintenig SM, Löder MHJ, Primpke S, Gerdt G. Low number of microplastic detected in drinking water from ground water sources. *Science of total environment* 2019;648:631-5.

10. Lots FAE, Behrens P., Vijver M., Horton A., Bosker T. A large-scale investigation of microplastic contamination: Abundance and characteristics of microplastics in European beach sediment. *Marine Pollution bulletin* 2017;123(1-2) 219-26.
11. Guzzetti E, Sureda A, Tejada S, Faggio C. Microplastic in marine organism: environmental and toxicological effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2018;64:164-71.
12. Presence of microplastic and nanoplastic in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal*. 2016;14(6):4501.
13. Lusher A, Hollman P, Mendoza-Hill J. *Microplastics in fisheries and aquaculture. Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation;2017.
14. Wright SL, Kelly JF. Plastic and human health: a micro issue? *Environmental science and technology* 2017;51(12): 6634-47.
15. Hahladakis J, Velis Costas A, Weber R, Iacovidou E, Purnell P. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal, and recycling. *Journal of Hazardous Materials* 2018;344: 179-99.
16. Wang F, Wong CS, Chen D, Lu X, Wang F, Zeng EY. Interaction of toxic chemicals with microplastics: A critical review. *Water Research* 2018; 139:208-19.
17. McCormick AR, Hoellein TJ, London MG, Hittie J, Scott WJ, Kelly J. Microplastic in surface waters of urban rivers: concentration, sources, and associated bacterial assemblages. *Ecosphere* 2016;7(11).
18. Munoz-Pineiro MA. *Microplastics. Focus on Food and Health. European Commission Factsheet*. 2017. Disponibile all'indirizzo: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/brochures-leaflets/microplastics-focus-food-and-health>; ultima consultazione 23/04/2020.
19. Alimi OS, Budarz JF, Hernandez LM, Tufenkij N. Microplastics and Nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. *Environmental Science and Technology* 2018;52:1704-24.
20. Verschoor L, de Porter R, Dröge R, Kuenen J, de Walk E. *Emission of microplastic and potential mitigation measures: abrasive cleaning agents, paints and tyre wear*. Bilthoven: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM); 2016. (RIVM Report 2016-0026).
21. Horton A. *Microplastic in the Freshwater Environment*. Marlow: Foundation for Water Research (FWR);2017 (FR/R0027).
22. Burton GA. *White Paper. Microplastic in aquatic systems. An Assessment of Risk. Summer of critical issues and recommended path forward*. Alexandria: The Water Environment & Reuse Foundation (WE&RF);2017.
23. Gasperi J, Dris R, Bonin T, Rocher V, Tassin B. Assessment of floating plastic debris in surface water along the Seine River. *Environmental Pollution* 2014;195:163-6.
24. Morrit D, Stefanoudis PV, Pearce D, Crimmen OA, Clark PF. Plastic in Thames: A river runs through it. *Marine Pollution Bulletin* 2014;78:196-200.
25. Eriksen M, Mason S, Wilson S, Box C, Zellers S, Edwards W, Farley H, Amato S. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin* 2013;77:177-82.
26. Baldwin AK, Corsi SR, Mason SA. Plastic debris in 29 great lakes tributaries: relations to watershed attributes and hydrology. *Environmental Science and Technology* 2016;50:10377-85.
27. Panko JM, Hitchcock KM, Fuller GW, Green D. Evaluation of tire wear contribution to PM 2.5 in urban environments. *Atmosphere* 2019;10(2):99.
28. Mason AS, Welch V G, Neratko J. Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water. *Frontiers in Chemistry* 2018;6.

29. Koelmans B, Mohamed Nor NH, Hermsen E, Kooi M, Mintenig S, De France J. Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water research* 2019;155:410-22.
30. Brown D & Cheng L. New net for sampling the Ocean Surface. *Marine Ecology – Progress Series* 1981;5:225-7.
31. Ziajahromi S, Neale PA, Rintoul L, Leusch F. Wastewater Treatment Plants as a Pathway for Microplastic: Development of a New Approach to Sample Wastewater-Based Microplastic. *Water Research* 2017;112:93-9.
32. Mason AS, Garneu D, Sutton R, Chu Y, Ehmann K, Barnes J, Fink P, Papazissimos D, Rogers DL. Microplastic Pollution Is Widely Detected in US Municipal Wastewater Treatment Plant Effluent. *Environment Pollution* 2016;2018:1045-54.
33. Prata JC, da Costa JP, Duarte AC, Rocha-Santos T. Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: a critical review. *Trends in analytical chemistry* 2018;1017:1-19.
34. Masura J, Baker J, Foster G and Arthur C. *Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments*. Silver Spring: NOAA Marine Debris Program; 2015 (Technical Memorandum NOS-OR&R-48).
35. Ball H, Cross R, Grove E, Horton A, Johnson A, Jürgens M, Read D, Svendsen C. *Sink to River – River to Tap. A review of potential risks from nanoplastic and microplastic*. London: Drinking Water Inspectorate (DWI); 2019. (Report Ref. No. 19/EQ/01/18).
36. Li J, Liu H, Chen JP. Microplastic in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and method for microplastic detection. *Water Research* 2018;137:362-74.
37. Dris R, Imhof HK, Löder M, Gasperi J, Laforsch C, Tassin B. Microplastic Contamination in Freshwater Systems: Methodological Challenges, Occurrence and Source. In: Zeng E. (Ed.). *Microplastic contamination in aquatic environment. an emerging matter of environmental urgency*. Guangzhou: Elsevier; 2018;51-93.
38. Braun U, Jekel M, Gerdt G, Ivleva N, Reiber J. *Microplastic analytics. Sampling, preparation, and detection methods*. Berlin: German Federal Ministry of Education and Research; 2018.
39. Italia. Legge 27 dicembre 2017, n. 205. Bilancio di previsione dello Stato per l'anno finanziario 2018 e bilancio pluriennale per il triennio 2018-2020. *Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale - Serie generale* n. 302, 29 dicembre 2017.