

# Ingestion de micro-plastiques par les poissons des eaux continentales de France métropolitaine

## Compte-rendu de la Phase 1 - Test et élaboration d'un protocole standard

Pour HISA, Marie-Aurélia Sabatte, Gaëlle Darmon  
Pour le CEFE, Claude Miaud  
Pour l'INRAE, Stéphane Peyron

Mai 2023

### SOMMAIRE

1- Introduction.....	2
2- Partenaires du projet .....	3
3- Échantillons disponibles.....	4
4. Méthodologie de tests.....	6
4.1. Enjeux, objectifs et approches .....	6
4.2. Protocoles utilisés classiquement .....	8
4.3. Tests et résultats avec les poissons d'eau douce .....	12
5. Discussion .....	21
5.1. Identification des particules .....	21
5.2. Nombre d'échantillons .....	23
5.3. Taille minimale à prospector .....	23
6. Perspectives .....	24
7. Références .....	24



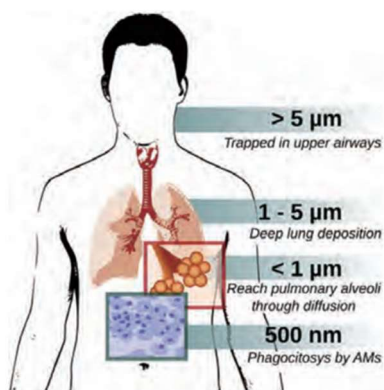
# 1- Introduction

Les plastiques sont omniprésents dans tous les espaces du globe. Leurs qualités de résistance et de légèreté sont aussi la source des problèmes qu'ils engendrent. Déversés en continu, ils peuvent se disperser pendant plusieurs décennies, mettant en danger de très nombreuses espèces animales, les risques d'ingestion augmentant avec leur fragmentation en micro puis nano particules (Santos et al., 2021).

De nombreuses études sur les impacts des plastiques, en particulier les micro-plastiques (taille inférieure à 5 mm), sont menées en milieu marin, probablement encouragées par les directives internationales visant à restaurer le Bon État Écologique de l'environnement marin comme la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) pour les eaux Européennes. Face au constat alarmant que ces études ne cessent de mettre en lumière, l'assemblée des Nations Unies pour l'Environnement (ANUE) pousse à la mise en œuvre d'un traité international pour la prise en compte de l'enjeu de la pollution causée par les déchets plastiques.

Bien que la plupart des déchets reste bloquée bien avant son arrivée en mer (Meijer et al., 2021), les projets d'acquisition de connaissance sur la distribution et les impacts des macro (> 5 mm) et micro-plastiques dans les environnements continentaux sont juste émergents. Alors que la DCSMM encourage à prendre en compte les voies de transfert des déchets pour anticiper les entrants en mer, la problématique de cette pollution n'est pas encore considérée dans le cadre de Directive Cadre sur l'Eau (DCE). Pourtant, les enjeux environnementaux et sanitaires liés aux plastiques doivent impérativement être mieux compris et anticipés.

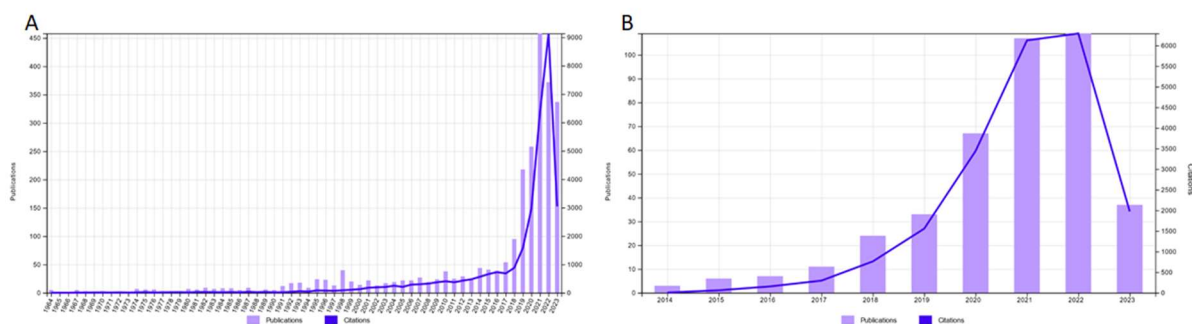
Une meilleure connaissance des impacts de l'ingestion primaire (directe) ou secondaire (via les proies) de micro-plastiques par la faune d'eau douce est primordiale. La faisabilité d'évaluer les impacts et l'efficacité des mesures de lutte contre les plastiques sauvages grâce à des bio-indicateurs doit être étudiée. A ce titre, contrairement à la DCE, la DCSMM (Descripteur 10 "Déchets marins") emploie des indicateurs de surveillance basés sur l'occurrence et les quantités de micro et macro-plastiques ingérés par les poissons, tortues et oiseaux marins. Mais avant tout, il est fondamental de pouvoir établir un état des lieux des impacts sur la faune continentale et anticiper les possibles répercussions sur notre santé. En effet, différents impacts sur la santé humaine ont été mis en évidence récemment (ex : présence dans le placenta, les poumons ou le cerveau (Lusher et al., 2017; Barboza et al., 2020 ; Ragusa et al. 2021, 2022) avec des risques de perturbation physiologique et endocrinienne (Hirai et al., 2011)) (Figure 1).



**Figure 1.** Effets de l'exposition aux microplastiques sur la santé humaine (Costa et al., 2016)

Quelques études disparates, généralement menées à court terme, ont été initiées pour évaluer l'ingestion des micro-plastiques par les poissons d'eau douce. A l'échelle européenne, l'occurrence d'ingestion chez les poissons varie de 7,5 % (N = 40 individus, Suisse) à 66 % (N = 76, Angleterre) (Parker et al., 2021). Quelques études ont également été menées en France comme chez le goujon *Gobio gobio* prélevé dans plusieurs rivières (12% d'ingestion parmi 186 individus ; Sanchez et al. 2014)

et le chevesne *Squalius cephalus* dans la Marne et la Seine (25 % parmi 60 individus ; Collard et al. 2018). Bien que le nombre de recherches sur les micro-plastiques ait considérablement augmenté (Figure 2), à notre connaissance, à ce jour, aucune étude globale n'a été menée sur la communauté des poissons d'eau douce, à une échelle nationale ou sur l'ensemble d'un continuum fleuve-mer.



**Figure 2** : A) Nombre de publications portant sur les microplastiques au fil des années (14600 au total) ; B) Nombre de publications avec les mots clefs "microplastique" + "poissons" (2406 au total dont 76,4% portent spécifiquement sur les poissons marins)

Comme pour l'étude des micro-plastiques dans les sédiments ou l'eau (Halfar et al., 2021), les recherches portant sur l'évaluation des quantités et des types de micro-plastiques ingérés par les poissons emploient des méthodologies différentes à chaque étape de l'analyse : extraction des déchets au sein des matrices biologiques, tailles minimales prospectées, dispositifs d'évaluation des types de polymères, évitement des contaminations... Ces disparités couplées, pour la plupart des études, à une faible taille d'échantillon, rendent les résultats difficilement comparables et compromettent une analyse globale des impacts (Collard et al., 2019). La mise en œuvre d'une méthodologie harmonisée est donc nécessaire pour étudier les variations spatio-temporelles de l'ingestion de microplastiques par les poissons et mieux évaluer leurs causes.

Ce projet vise à évaluer les impacts des microplastiques sur les poissons d'eau douce à l'échelle du territoire national métropolitain à partir d'un protocole standard évalué lors de la première phase dont la démarche et les résultats sont présentés dans ce rapport. L'objectif était de définir une méthodologie reproductible et idéalement à moindre coût, pour évaluer l'occurrence et les quantités de microplastiques ingérés dans les poissons d'eau douce, en optimisant la détectabilité, l'extraction, l'identification et la quantification des polymères contenus dans les systèmes digestifs des poissons. Pour ce faire, cette étude a bénéficié de poissons collectés en 2020 comme indicateurs des toxines dans les eaux douces par l'Office Français de la Biodiversité dans le cadre de la DCE. Différentes expérimentations ont été menées sur ces spécimens, en parallèle à une étude de littérature et à l'entretien d'experts. Dans un deuxième temps, ce protocole pourra être appliqué à l'ensemble des poissons prélevés dans divers plans et cours d'eau à l'échelle de la France métropolitaine afin d'établir un état des lieux de l'ingestion de microplastiques chez les poissons d'eau douce (occurrence, quantités) et tester l'influence de divers facteurs (espèces, gradients de pollution, etc.).

## 2- Partenaires du projet

Les expérimentations et mises au point de laboratoire ont été mise en œuvre par les institutions suivantes :

- Association HISA pour laquelle cette étude s'inscrit dans le cadre du projet RiverSe visant la collecte de connaissances sur la distribution et les impacts des micro et macro-déchets dans les continuums terre-mer. HISA a coordonné l'étude et effectué les manipulations de laboratoire.
- Le CEFE (Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive) qui a mené différents projets pour l'élaboration et la mise en œuvre de bioindicateurs de surveillance des impacts des impacts des

micro et macro-plastiques sur la faune marine, notamment les projets INDICIT & II et MedSeaLitter. Le CEFE a coordonné l'étude et accueilli certaines manipulations de laboratoire.

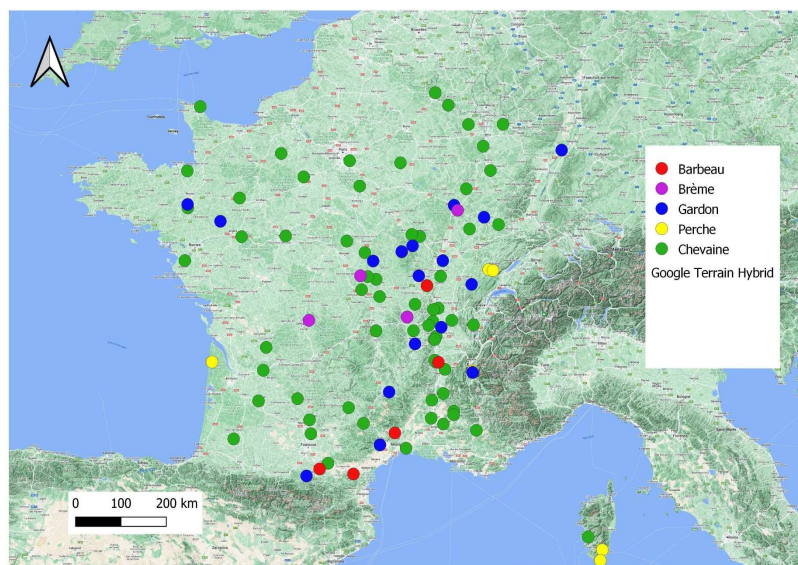
- L'INRAE (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement) de Montpellier, en partenariat avec l'université de Montpellier, qui est spécialisé sur l'étude des impacts des polymères plastiques et l'élaboration d'alternatives. Le laboratoire est adapté à la prise en compte des risques de contaminations et possède le matériel de pointe pour détecter les plus petites particules et évaluer les types de polymère.
- L'Office Français de la Biodiversité (OFB), qui a permis l'emploi des échantillons issus des poissons collectés dans le cadre DCE.
- Le Laboratoire d'analyses de la Drôme qui a fourni les échantillons (systèmes digestifs des poissons) après les analyses systématiques pour la DCE.

Le projet est assuré grâce à ses partenaires financiers dont l'expertise permet aussi la bonne interprétation des résultats et une bonne orientation des prochaines étapes de l'étude :

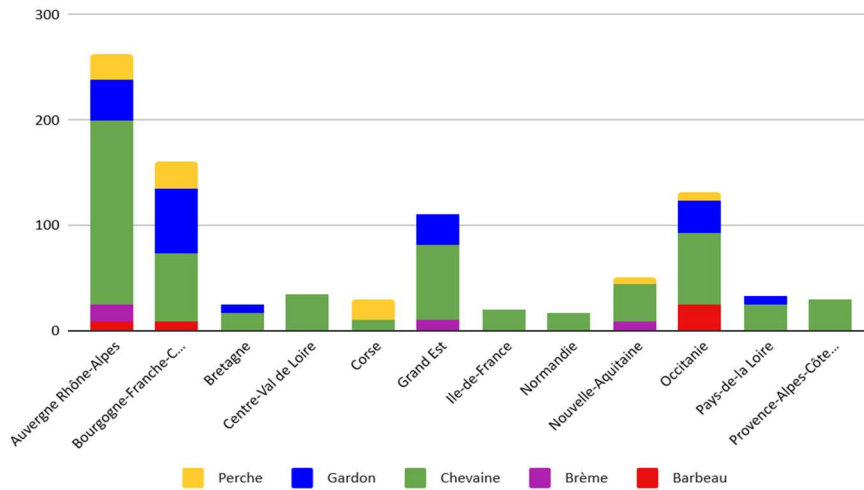
- L'Agence de l'eau Loire Bretagne (AELB) ;
- La Fédération nationale de la pêche en France (FNPF) ;
- Le Ministère de la transition écologique (MTE).

### 3- Échantillons disponibles

Le projet bénéficie de 903 tractus digestifs de poissons de 5 espèces : Chevesne (*Squalius cephalus*) (N=566 ; 62,7), Barbeau fluviatile (*Barbus barbus*) (N=40; 4,4%), Brème commune (*Abramis brama*) (N=36; 4%), Gardon (*Rutilus rutilus*) (N=175; 19,4%) et Perche commune (*Perca fluviatilis*) (N=86; 9,5%), répartis à l'échelle nationale avec une distribution plus concentrée en Auvergne Rhône Alpes, Occitanie et Bretagne et sans prélèvement dans la région Hauts-de-France (Figures 3 et 4). Les poissons ont été prélevés par lots d'une dizaine d'individus dont la taille (mm) et la masse (g) ont été relevées.



**Figure 3** : Répartition des prélèvements par espèce (collecte réalisée en 2020)  
Chaque cercle représente un point d'échantillonnage de 10 poissons en moyenne.

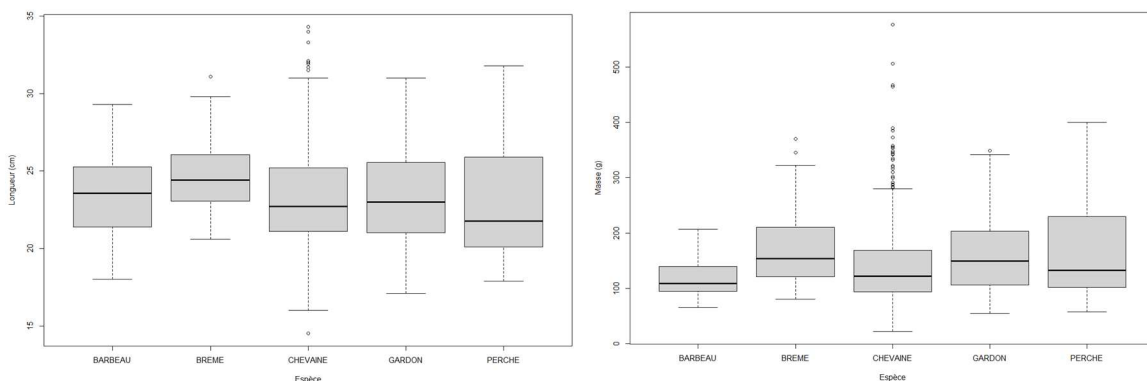


**Figure 4 :** Répartition des prélèvements par région et par espèce

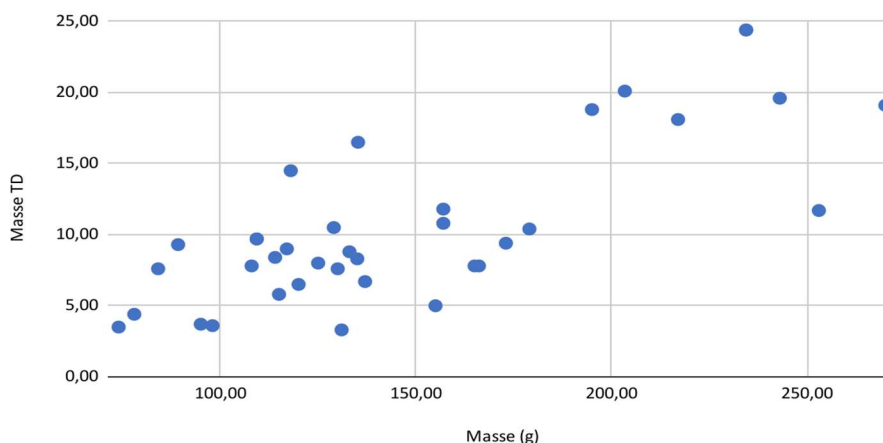
Plusieurs facteurs sont susceptibles d’influencer l’ingestion de déchets, et indirectement, la capacité à extraire les particules de plastique de leur contenu digestif. Ce sont notamment leur biotope et leur régime alimentaire (Tableau 1) qui peut varier avec leurs caractéristiques biométriques (masse et taille ; Figures 5 et 6).

**Tableau 1 :** Régime alimentaire des espèces étudiées

Espèce	Régime alimentaire
Chevaïne	Omnivore, insectes (nymphe, chironomes, insectes aériens), mollusques, végétaux et petits poissons pour les gros spécimens (MNHN, 2023).
Gardon	Omnivore, insectes, crustacés, mollusques, végétaux. Les adultes ont une tendance phytophage (plantes flétries, débris d'élodées, myriophylles, lentilles d'eau, charas, diatomées qui recouvrent les roseaux, souches et pierres) (DORIS, 2017).
Perche	Carnassier grégaire avec un large spectre de proies (poissons et invertébrés); régulièrement cannibale. (MNHN, 2003).
Brème	Insectes (larves de Chironomes), petits crustacés, mollusques et plantes; les grands spécimens peuvent manger des petits poissons (DORIS, 2019).
Barbeau	Invertébrés benthiques essentiellement (petits crustacés, larves d'insectes, mollusques, larves d'éphémères et de moucheron); les adultes peuvent manger des petits poissons (DORIS, 2014).



**Figure 5 :** Boîtes des longueurs et masses des individus échantillonnés, par espèce (boîte grise : moyenne (barre centrale), minimale et maximale, barre inférieure : 1er quartile, barre supérieure : 3ème quartile)



**Figure 6** : Relation entre la masse du tractus digestif et la masse de l'individu (38 chevesnes tests en début de protocole)

## 4. Méthodologie de tests

### 4.1. Enjeux, objectifs et approches

Les articles publiés dans les revues à comité de lecture emploient différentes méthodologies pour extraire puis identifier les microplastiques de la matrice étudiée. Certains auteurs prennent des mesures pour limiter les risques de contamination par des microplastiques extérieurs, essentiellement issus des vêtements portés lors des manipulations de terrain et de laboratoire, d'autres auteurs n'en prennent pas. L'enjeu dans cette première phase du projet est d'établir un protocole standard assurant la comparabilité des résultats, et pour cela, d'évaluer les procédures optimales pour détecter les particules présentes dans le système digestif des poissons. Le travail de la Phase 1 a visé à répondre à plusieurs questions :

- Comment détecter et extraire les particules du système digestif, dont le contenu peut être très chargé en fragments organiques et minéraux ?
- Quels sont les types de polymères qu'il est possible d'identifier (Tableau 2) ?
- Quels sont les risques de contamination lors des manipulations, et comment les limiter ?
- Quelles sont les manipulations les plus efficaces, rapides et/ou moins coûteuses ? Quels sont les dispositifs nécessaires pour mettre en œuvre le protocole ? Quel est l'impact de la durée et du type d'analyse sur la taille minimum détectée ?

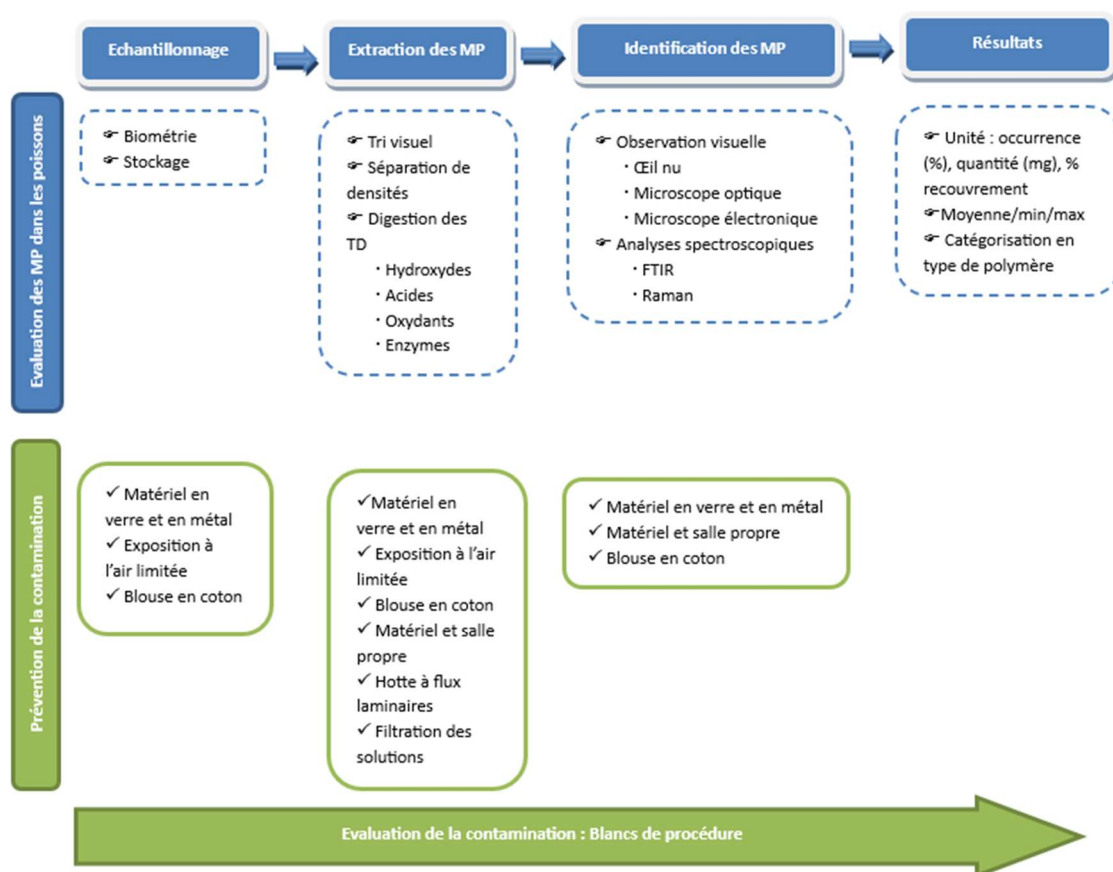
**Tableau 2** : Types de polymères

Catégorie de polymère	Variantes	Exemples d'utilisation
Polyéthylène haute densité	PHED	Jouets, tubes, poubelles urbaines, réservoir d'essence automobile...
Polyéthylène basse densité	PEBD	Emballages (sachets, films, sacs poubelles), jouets souples, films agricoles ou BTP, câbles...
Polypropylène	PP,PPs	Mobilier de jardin, boîtes avec charnières intégrées, pièces d'électroménager soumises à la chaleur, climatiseurs automobiles...
Polyéthylène	PE PET	Bouteilles d'eau et de soda en plastique, barquettes allant au four à micro-ondes, corps de pompe à eau...

Polyéthylène téréphtalate		
Polystyrène	PS	Vaisselle jetable (gobelets, couverts, assiettes), stylos à bille emballages de produits laitiers...
Polychlorure de vinyle	PVC	Tubes, raccords et profilés pour le bâtiment, cartes bancaires, revêtement de sol, chaussures ou tissus...
Acrylonitrile-butadiène-styrène	ABS	Capots et boîtiers (bureautique, automobile, etc.), téléphones, articles de sport...
Polycarbonate	PC	Vitrages de sécurité, éclairage, luminaires, feux de voitures , CD et DVD, matériel stérilisable (seringues)...
Polyméthacrylate de méthyl	PMMA	Verres de montre, lentilles optiques, signalisation routière, enseignes lumineuses...
Polyamide 6 ou Nylon	PA 66	Poulies, engrenages, récipients de forte épaisseur, tuyaux et réservoirs de freins en automobile...
Polymères fluorés	PTFE ou le PVDF	Paliers et coussinets en mécanique, robinetterie chimique et tuyauterie, revêtements des poêles anti-adhésives...

Pour répondre à ces questions, nous avons tout d'abord étudié les protocoles employés dans d'autres programmes, retrouvés dans la littérature scientifique à comité de lecture, présentés lors de conférences ou bien transmis par des chercheurs contactés directement. Nous nous sommes également inspirés des protocoles employés en mer. Nous avons testé, adapté et ajusté les diverses procédures au fur et à mesure des manipulations pour optimiser leur efficacité et leur durée, et pour faciliter l'extraction des microplastiques. Nous avons aussi mené des tests de détectabilité, en intégrant des microplastiques de nombre, taille et couleur contrôlés, afin d'évaluer d'une part, leur résistance aux procédés chimiques auxquels ils sont soumis durant la procédure, d'autre part, la capacité à les retrouver et à bien les identifier avec les dispositifs employés. Les procédures et résultats des tests et choix réalisés sont présentés ci-après.

## 4.2. Protocoles utilisés classiquement



**Figure 7** : Principales étapes utilisées pour analyser les microplastiques dans les tractus digestifs de poisson (MP = microplastique ; TD = tractus digestif ; FTIR = Infra-rouge à transformée de Fourier).

Nous avons pris comme protocole de référence le protocole développé dans le cadre du programme [MEDSEALITTER](#) (Matiddi et al., 2021) qui avait pour objet de mettre au point un protocole harmonisé pour évaluer l'ingestion des microplastiques par les poissons marins dans le cadre des programmes de surveillance de la DCSMM, le CEFE étant un des partenaires du projet. Ce protocole a été testé sur plusieurs espèces, et la bogue (*Boops boops*), un poisson marin essentiellement planctonophage, se nourrissant aussi de particules végétales ou de petits invertébrés présents en suspension dans l'eau (DORIS, 2023), a été retenue comme espèce indicatrice de la distribution des microplastiques dans le milieu marin côtier. Les spécimens marins étudiés pesaient 20 g en moyenne, avec un tractus digestif de l'ordre de 2 g.

Les étapes du protocole MedSeaLitter sont :

1. Collecte et mensuration des individus ;
2. Extraction du tractus digestif ;
3. Collecte du contenu digestif, lavage, élimination de la partie organique (phase appelée "digestion"), filtration sur tamis ;
4. Extraction et identification des microplastiques collectés.

Après la collecte (récupération auprès des pêcheurs, pêche au filet ou électrique) et les relevés biométriques (mensurations et masse) des individus, les étapes menant à la quantification et à l'identification des microplastiques ingérés que nous avons testées, sont décrites ci-dessous, en référence au protocole MEDSEALITTER et à la littérature.

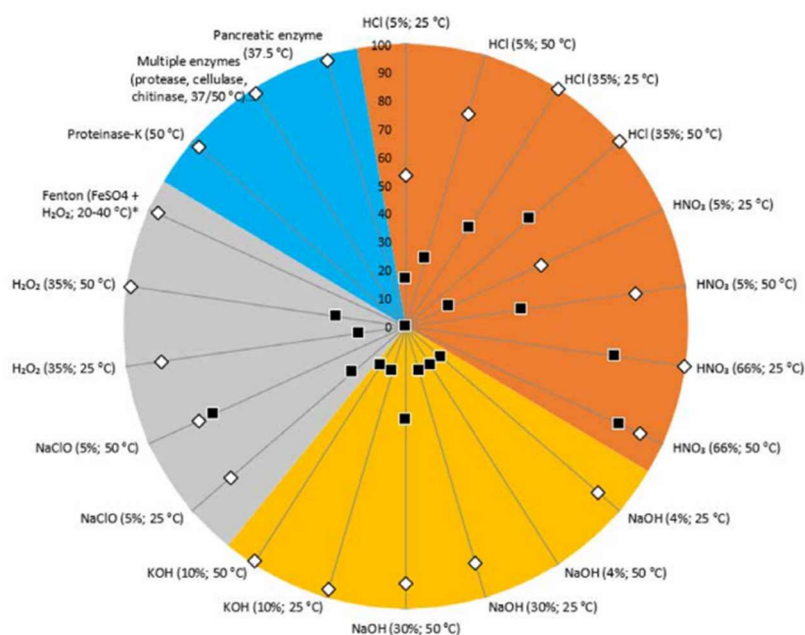
#### 4.2.1. Extraction du tractus digestif, collecte et lavage du contenu digestif

Quand les poissons ne sont pas collectés pour les besoins de l'étude mais récupérés a posteriori, les risques de contamination sur le terrain ne sont pas contrôlés, mais ils peuvent être discutés selon les moyens de collecte. Il existe des risques de contamination lors de l'extraction du tube digestif et un risque de perte de contenu digestif si le tractus est perforé, cette étape doit donc être menée avec précaution. Généralement, les tractus digestifs des poissons sont digérés entièrement, avec leur paroi (voir étape suivante). Pour l'analyse des micro et macro (> 5mm) déchets ingérés par les tortues marines, le tractus digestif est ouvert et rincé à l'eau filtrée au-dessus d'un tamis de maille ciblée (protocole INDICIT). Cette approche a aussi été testée. Elle permet un gain de temps considérable lors de la digestion.

#### 4.2.2. Digestion du contenu digestif

##### \* Utilisation de solutions chimiques

Plusieurs procédés chimiques sont employés dans la littérature pour éliminer la partie biologique du contenu digestif, étape appelée "digestion". Sur la Figure 8, chaque couleur du camembert reprend un type de méthode (enzymatique (bleu), acide (rouge), basique (jaune), oxydante (gris)).



**Figure 8** : Efficacité de la digestion du matériel biologique pour extraire les microplastiques du contenu digestif (selon Horiba, 2020; figure fournie par Claudia Lorenz, Université d'Aalborg). (■ : % max de microplastiques altérés par la solution; ◇ : % d'efficacité de la solution)

La méthode enzymatique (employant un combiné d'enzymes ; Bray et al. 2019 ; Horiba, 2020) apparaît particulièrement efficace mais elle est complexe à mettre en œuvre et nécessite des produits très chers, peu compatibles avec un suivi de routine (environ 400 € le gramme). La méthode acidifiante (ex : acide HCl) s'avère trop destructrice pour les polymères. Seules les méthodes oxydantes et basifiantes ont été testées. Ces dernières sont efficaces, peu altérantes et présentent un coût abordable. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est efficace, relativement peu impactant pour les micro-particules, biodégradable et sans danger pour l'environnement et le milieu de digestion testé dans cette étude. KOH est efficace mais les résidus de matières grasses sont un frein à la filtration et elle nécessite une gestion des effluents.

La concentration préconisée pour une digestion efficace du tractus digestif est de 15% à 60°C selon le protocole MEDSEALITTER. D'après Horiba et al. (2020), les polymères risquent cependant d'être affectés à partir d'une température supérieure à 40°C. D'après Digka et al. (2018), après oxydation, le polyéthylène (PE) voit ses couleurs altérées et le polypropylène (PP) se fragmente. D'après Savino et al. (2022), après oxydation, le polychlorure de vinyle (PVC) est le plus résistant alors que le Polyéthylène téréphtalate (PET) apparaît le plus faible.

#### \* Concentrations

Nous avons fait de nombreux tests à des températures et concentrations variables. Le KOH et le Tween20 ont été écartés car ils teintent la matière et leur aspect huileux ralentit la digestion. Nous avons gardé H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est un oxydant qui se détériore rapidement dans l'environnement et qui agit bien sur la digestion des tractus digestifs.

Les contenus digestifs sont mélangés avec les solutions chimiques dans des béchers à différentes concentrations (Figure 7). Des concentrations de 15% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de 10% de KOH ont été choisies au préalable en suivant les protocoles employés par différents auteurs (e.g, Tsangaris et al., 2021; Li et al., 2018; Munno et al., 2018) afin de minimiser l'éventuelle altération des microplastiques par la procédure de digestion.

#### \* Températures et vitesses d'homogénéisation

Généralement, les auteurs emploient des plaques chauffantes pour accélérer la digestion à l'aide d'un agitateur magnétique avec des vitesses variables, adaptées au contenu. D'autres placent les échantillons en digestion dans des bains chauds ou une étuve à ≤ 40°C (Lopes et al., 2022 ; Matiddi et al., 2021 ; Hara et al., 2020 ; Walkinshaw et al., 2022).

#### \* Fin de la digestion

La qualité de la digestion est appréciée par les résidus de matière biologique du contenu digestif visibles à l'œil nu. Outre la transparence de la solution, la qualité de filtration du contenu et l'absence de colmatage (voir étape suivante), confirment la qualité de la digestion.

La durée de la digestion est variable selon la taille de l'échantillon et le contenu (matériel biologique). Tous les auteurs ne précisent pas les durées, d'autres évoquent 24H et jusqu'à 1 semaine environ.

### 4.2.3. Extraction des microplastiques collectés

Sur les poissons marins, souvent de plus petite taille et avec un matériel biologique relativement rapide à digérer, la plupart des auteurs extraient les microplastiques à la pince, un à un, avant de les passer à ATR-FTIR<sup>1</sup>. Toutefois, cette méthode présente des risques de sous-estimations, si les particules tombent lors du transfert ou si elles ne sont pas repérées par le manipulateur. L'association La Pagaie Sauvage emploie le protocole de la NOAA (Masura et al., 2015) qui consiste à filtrer les solutions sur un tamis.

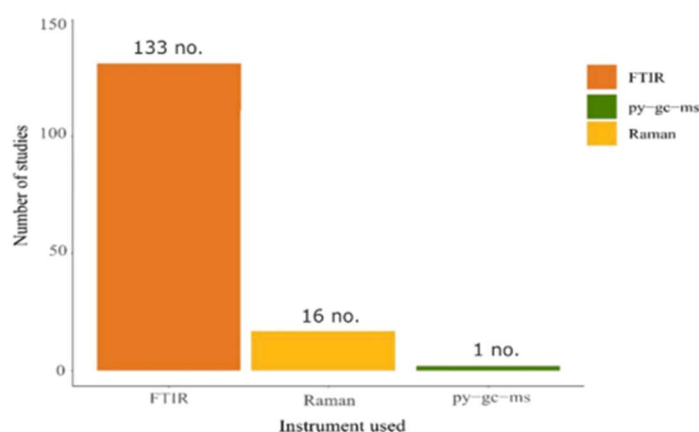
---

<sup>1</sup> La réflexion totale atténuée (ATR) est une méthode qui permet la mesure de surface d'échantillons pour FTIR (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy, spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier ou spectroscopie IRTF). La méthode ATR consiste à presser un seul échantillon contre un prisme à indice de réfraction élevé et à mesurer le spectre infrarouge évanescents réfléchi à l'intérieur du prisme. Ce dispositif permet une analyse de surface sur une profondeur de quelques micromètres.

#### 4.2.4. Identification des microplastiques collectés

La plupart des auteurs utilisent des dispositifs de spectrométrie vibrationnelles pour identifier les types de polymères grâce à leurs signatures spectrales en infra-rouge ou en Raman. Néanmoins, dans son protocole participatif, l'association La Pagaie Sauvage comptabilise les microplastiques à la binoculaire (taille minimale de 300  $\mu\text{m}$ ) en se focalisant sur PET et PE. Bien que cette méthode soit utile et appropriée dans un cadre de sciences participatives et pour la sensibilisation des citoyens, elle présente un taux d'erreur élevé (Hidalgo-Ruz et al., 2013). Digka et al. (2017) et Matiddi et al. (2021) précisent qu'en dessous de 200  $\mu\text{m}$ , il devient difficile de prélever et déterminer si les particules sont des plastiques sans avoir recours à un spectromètre.

Différentes techniques de microspectrométrie peuvent révéler la présence de microplastiques. Elles varient en fonction des microplastiques recherchés, de leur seuil de détectabilité et de leur résolution spatiale (Strungaru, 2019; Mettler Toledo, 2022). La technique de microspectroscopie Raman n'est pas adaptée à tous les types de polymères, certains peuvent être masqués par le phénomène de fluorescence : son signal est d'un ordre de grandeur plus élevé que la diffusion Raman et elle submerge souvent le signal Raman. La spectroscopie Raman offre une résolution spatiale particulièrement faible de l'ordre du micromètre. Elle permet donc une analyse de fines particules sur une surface réduite. La spectroscopie infrarouge (FTIR) se caractérise par une résolution plus élevée de l'ordre de la dizaine de micromètre, n'est pas affectée par les phénomènes de fluorescence, et n'induit aucune dégradation thermique de l'échantillon, contrairement à la spectroscopie Raman (qui utilise une source de lumière laser de forte intensité). La méta-analyse de Kannankai montre la préférence de l'outil FTIR pour la caractérisation des polymères (Figure 9).



**Figure 9 :** Dispositifs employés pour la caractérisation des polymères de microplastiques par les auteurs ayant publié dans la littérature à comité de lecture (FTIR: Infra-rouge à transformée de Fourier; py-gc-ms : Pyrolyse-chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (Pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry) ; Raman : Spectrométrie à infra-rouge; d'après Kannankai et al., 2022)

#### 4.2.5. Prévention de la contamination

Depuis Wesh (2016) jusqu'à Walkinshaw (2023), les procédures de prévention sont toujours les mêmes : Blouse de laboratoire en coton ou tissus naturels, gants, matériel de laboratoire nettoyé à l'éthanol, échantillons couverts de feuilles d'aluminium ou par des couvercles en verre, blancs de contrôle (membranes vierges laissées à l'air ambiant ou ayant subi le protocole) analysés à chaque étape du protocole. Cette étape est effectuée en début de protocole afin d'évaluer l'efficacité du protocole d'entretien du matériel et des locaux, et prendre en compte la contamination par le manipulateur pour les interprétations des résultats. Notons qu'aucun auteur ne publie les résultats de ses blancs. Il est donc difficile d'évaluer l'impact de la contamination, bien que les publications appuient la nécessité de cette procédure de vérification. Les fibres textiles sont omniprésentes et les moyens et

équipements des laboratoires ne sont souvent pas assez performants pour éviter cette source de contamination secondaire, aussi, la plupart des auteurs ne les considèrent plus dans leurs analyses.

#### 4.2.6. Conclusion

Le protocole MEDSEALITTER n'est pas directement transposable sur les poissons d'eau douce testés dans le cadre de ce projet car les poissons collectés dans les eaux douces sont plus gros et le tractus digestif contient plus de matériel résistant à la digestion (ex : sédiments, chair, arêtes et écailles des proies). Nous avons donc conduit une série d'expérimentations pour améliorer ce protocole dans le contexte de cette étude.

### 4.3. Tests et résultats avec les poissons d'eau douce

A partir de la littérature et de notre propre expérience sur les poissons marins (protocole MEDSEALITTER), nous avons conduit une série de tests sur les tractus digestifs des poissons d'eau douce, afin de vérifier la transférabilité des protocoles et tester leur opérabilité dans le cadre d'un programme de surveillance des impacts des microplastiques dans les eaux douces.

#### 4.3.1. Difficultés rencontrées, orientations prises et développement de dispositifs

Les poissons employés dans le projet MedSeaLitter (protocole dans Matiddi et al., 2021) ne pèsent que 20 g en moyenne. Sur les poissons d'eau douce récupérés dans la présente étude, ce protocole n'est pas entièrement applicable, car la masse des tractus digestifs est bien supérieure au poids d'un bogue entier (espèce de référence de l'étude MedSeaLitter). Nous avons donc travaillé à l'élaboration d'un protocole adapté, pour prendre en compte le temps de digestion beaucoup plus long, et la présence dans le contenu stomacal, de matière difficilement digérables comme les sédiments ou des fragments d'autres poissons (proies). Nous avons travaillé en essais-erreurs-adaptations.

#### 4.3.2. Précautions

Il est important d'être protégé car des produits corrosifs sont employés, toxiques et risquant d'irriter les voies respiratoires. Un masque respiratoire avec des filtres à gaz adaptés aux émanations de produits toxiques, des lunettes-masque de protection, des gants, une blouse épaisse couvrant les vêtements et avant-bras sont de rigueur afin de préserver la santé du manipulateur.

Les produits chimiques employés sont filtrés et réutilisés au maximum. Les produits non réutilisables ne sont en aucun cas rejetés dans les éviers, ils sont placés dans des cuves pour traitement spécial des déchets présentant un risque pour l'environnement.

#### 4.3.3. Prévention de la contamination

L'ensemble du matériel utilisé est d'abord désinfecté par nettoyage des dispositifs à l'alcool à 35 % puis protégé avec des feuilles d'aluminium afin de limiter la contamination par les microplastiques aéroportés.

La verrerie de laboratoire a été désinfectée dans un four à moufle. Le matériel en acier inoxydable a été nettoyé dans un bain ultrasonique (Retsch GmbH, 2016). Tous les équipements et matériels de laboratoire ont été méticuleusement rincés avec de l'eau déionisée pré-filtrée (0,2 µm ; Milli-Q) et de l'éthanol à 35 % avant et pendant toutes les étapes de travail afin d'éviter la contamination des

échantillons. Tous les matériaux ont été recouverts de couvercles en verre ou de papier d'aluminium pour éviter la contamination par l'air.

Les pinces et les tamis ont été minutieusement inspectés sous une loupe binoculaire afin d'éviter le risque de contamination croisée des résidus ou de toute particule coincée dans les mailles des tamis. Des blouses de laboratoire en coton et uniquement des vêtements non synthétiques ont été portés.

Les échantillons ont été placés dans un dessiccateur propre et fermé pour être séchés à l'abri de la poussière. Avant utilisation, et après nettoyage, les tamis ont fait l'objet d'un contrôle visuel pour vérifier qu'ils n'étaient pas endommagés et qu'ils étaient propres.

Les produits réutilisés comme le Chlorure de Zinc sont filtrés avec des membranes 1,2 µm après utilisation et sont stockés dans des bouteilles en verre.

Des échantillons "blancs" sont utilisés pour contrôler la contamination. Il s'agit de filtres sur boîtes de pétri apposées sur la table de manipulation. Ces échantillons "blancs" ayant subi la même procédure que les échantillons des digestats ont été analysés sous loupe binoculaire. Cette méthode s'avère chère et très chronophage, car elle est réalisée pour chaque étape du protocole et nécessite autant d'Anodiscs<sup>2</sup> que d'étapes dans la procédure. On utilise également un échantillon vierge "blanc" pour tester d'éventuelles contaminations. On ajoute dans un bécher vide, un volume similaire d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à celui utilisé dans les échantillons, et on suit le protocole.

#### 4.3.4. Extraction du tractus digestif, collecte et lavage du contenu digestif

L'extraction du tractus digestif a été réalisée par le Laboratoire d'analyses de la Drôme et les systèmes digestifs congelés ont été transférés au CEFÉ. Les tractus digestifs sont découpés dans le sens de la longueur et rincés sur un tamis afin d'en récupérer les particules inférieures à 1 mm (passée cette taille, elles ne sont plus discernables à l'œil nu). Un tamis de 50 µm est disposé en dessous. Cette maille correspond donc à la limite inférieure de la taille des déchets analysés. La matière récupérée est transposée dans un bécher pour mise en flottation.

#### 4.4.4. Mise en flottation

Suite à la difficulté à obtenir un digestat transparent et à la durée très longue de digestion, nous nous sommes inspirés des méthodes employées pour extraire les microplastiques des sédiments. Nous avons ajouté une étape consistant à séparer sédiments et particules synthétiques selon leur densité par mise en flottation. Avio et al. (2015) ont constaté qu'en utilisant une solution saline, la flottation avant digestion avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 15 % à 50°C, la récupération des microplastiques présentait une efficacité de 95 % pour le PE et le polystyrène (PS) dans les tubes digestifs de poissons.

Nous nous sommes inspirés de protocoles avec séparateur densimétrique pour fabriquer un dispositif pour cette étude (Nakajima et al., 2019 ; Coppock, 2021). Cette étape est arrivée en fin de projet, après différents tests. Aussi, le budget restant de l'étude n'était pas suffisant pour acheter ce dispositif (263 € + matériel associé). Cependant, nous avons construit et testé différents dispositifs semblables avec le matériel présent dans le laboratoire (Figure 10).

---

<sup>2</sup> Membrane inorganique en oxyde d'aluminium tolérée par le FTIR, seules les membranes minérales sont adaptées à la technologie FTIR



**Figure 10** : Différents séparateurs de sédiments testés

D'après Coppock et al. (2017), le tube en PVC est trop compliqué à nettoyer, et le contenant trop grand, or il n'était pas possible de construire un dispositif plus petit car nous possédions déjà la taille de vanne minimale. L'ampoule de décantation est impossible à nettoyer. L'entonnoir en verre est efficace mais trop évasé sur la partie haute. Nous avons donc opté pour une ampoule de coulée (Figure 11).



**Figure 11** : Ampoule de décantation sélectionnée

Nous avons ensuite recherché le type de produit pouvant faire remonter les polymères, ainsi que sa concentration :

- Le  $ZnCl_2$  est le produit qui permet d'augmenter la densité d'un liquide au-delà de  $1,7 \text{ g.cm}^{-3}$  (Cunsolo et al., 2021) (densité du PVC, le plus dense). Toutefois, il est toxique autant pour l'humain que pour l'environnement.

- Le NaCl (protocole NOAA, Masura et al. 2015) ne fait remonter que les plus légers, PE et PET.

- Le NaI est très gras, expansif, difficile à nettoyer et cher. Il est efficace, réutilisable, et utilisé par d'autres équipes comme celles rencontrées à l'ENTPE qui l'emploie à la densité de 1,7. Les équipes de l'IMT Nord Europe l'utilisent à une densité de 1,8, mais la digestion après immersion dans le NaI s'avère difficile.

Nous suivons donc le protocole de Coppock et al. (2017), qui préconise une densité (pd; masse volumique de sol sec) de  $ZnCl_2$  à  $1,5 \text{ g/cm}^3$  qui permet de dépasser la densité du PVC, polymère le plus dense ( $1,44$  à  $1,48 \text{ g/cm}^3$ ). Nous avons d'abord testé une solution de  $ZnCl_2$  préparée à partir de poudre et réalisé des tests avec un morceau de PVC d' $1 \text{ cm}^3$  plongé dans la préparation à différentes densités, puis nous avons employé un densimètre en verre gradué (amplitude : 1.500-2.000).

Par ailleurs, les contenus digestifs contiennent du limon, du sable et des graviers. La densité du limon est de  $\rho_d = 1,45 \text{ g/cm}^3$ , celle du sable  $\rho_d = 1,6 \text{ g/cm}^3$ , celle du gravier entre  $1,52$  et  $1,68 \text{ g/cm}^3$ , et celle du gravier mélangé au sable est de  $1,92 \text{ g/cm}^3$ . Il est donc nécessaire de ne pas dépasser le seuil de  $1.48 \text{ g/cm}^3$  afin d'éviter au maximum la remontée des matières minérales dans la colonne du séparateur de sédiment.

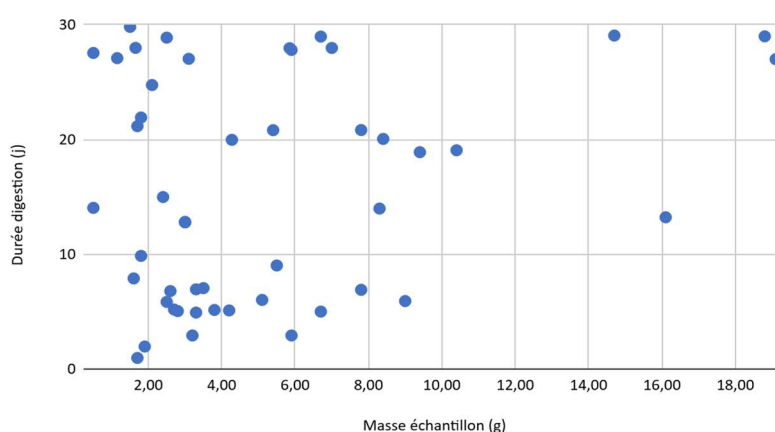
Pour passer du milieu  $\text{ZnCl}_2$  au milieu  $\text{H}_2\text{O}_2$  nous avons testé les réactions entre ces deux produits dans un laboratoire de chimie. En ajoutant  $100 \text{ ml}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $100 \text{ ml}$  de  $\text{ZnCl}_2$ , aucune réaction n'est obtenue. Cependant, le  $\text{ZnCl}_2$  ayant des propriétés acidifiant le milieu (pH voisin de 4), il est essentiel de rincer l'échantillon recueilli après passage dans la colonne de sédimentation. Le rinçage s'effectue à l'eau milliQ (marque déposée par la société Millipore Corporation, purifiée par un système de filtres/résines/membranes) sur un tamis, dans cette étude, testé avec un tamis de maillage  $\varnothing 25 \mu\text{m}$ , de  $\varnothing 50 \mu\text{m}$ , et de  $\varnothing 71 \mu\text{m}$ . Nous testerons sur un maillage moins fin, de  $100 \mu\text{m}$ . Le temps de décantation du contenu digestif optimal est d'environ 3 jours, en fonction de la matière contenue dans le tractus digestif.

#### 4.4.5. Digestion du contenu digestif

Différentes concentrations et températures ont été testées. Pour la méthode acidifiante, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été sélectionné, et pour la méthode basifiante, le KOH. Ce dernier est efficace mais les résidus de matières grasses sont un frein à la filtration et elle nécessite une gestion des effluents. Le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est efficace, relativement peu impactant sur l'intégrité des micro-particules, biodégradable et sans danger pour l'environnement et est donc le milieu de digestion qui a été choisi dans cette étude.

Aucun auteur, dans la littérature, ne précise un indice de digestion qui permet de décider quand arrêter cette étape du protocole. Afin de déterminer l'aboutissement du processus de digestion (état du liquide digéré), des phases de digestion, avec et sans agitation, ont été déterminées selon les solutions employées ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , KOH et KOH+Tween 20), en considérant un indice de couleur (KOH et Tween 20) et de turbidité (transparent/blanc/brun/gris/orange (selon la solution employée), niveau d'opacité évalué à dire d'expert.

A la fin de la digestion, les digestats doivent être filtrés. Nous avons observé que la digestion ne dépend pas de la masse de l'échantillon mais elle dépend de son contenu (Figure 12).



**Figure 12** : Durée de digestion (en jours) par rapport à la masse de l'échantillon (en grammes) (test réalisé avant séparation densimétrique sur 50 tractus digestifs)

La durée de digestion dépassant 15 jours, nous avons conclu que la méthodologie de digestion proposée dans le protocole MEDSEALITTER n'est pas assez efficace pour être appliquée aux poissons d'eau douce. La durée de digestion n'est pas tenable avec nos contraintes logistiques.

Pour pouvoir filtrer sur des membranes de porosité très fine (0,2 µm), adaptées au spectromètre (voir étapes ultérieures), nous avons testé différents autres produits chimiques (KOH, Tween20, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), concentrations et températures, afin d'optimiser la digestion des tractus digestifs, et sans affecter l'intégrité des polymères. Après plusieurs tests, la digestion reste problématique : Les membranes en fibre de verre de porosité 2,7 µm sont colmatées rapidement avec du sable [60µm-2mm] ou du limon [2µm-60µm]. Avant de filtrer le digestat sur des Anodiscs de 0,2 µm (4€/pièce), des essais ont été réalisés sur des membranes en fibres de verre moins coûteuses (1,6 €/pièce). Pour diminuer la quantité de matière organique, des concentrations plus élevées d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) ont été employées, avec des températures plus hautes, de 50°C, pendant la digestion. Grâce au tamisage et à la séparation densimétrique, la durée maximale de digestion a pu être diminuée à 15 jours. Par ailleurs, la vitesse de rotation (en rpm) des barreaux d'agitation en verre, qui permet d'agiter la solution en digestion, dépend de la densité du contenu du bécher. Nos expériences montrent qu'il faut que le tourbillon atteigne le bas du bécher, phénomène observé autour de 1000 rpm, pour une meilleure répartition des éléments. En effet, si le tourbillon n'atteint pas le fond, une masse centrale s'agglomère et échappe à l'oxydation.

#### 4.4.6. Filtration sur tamis

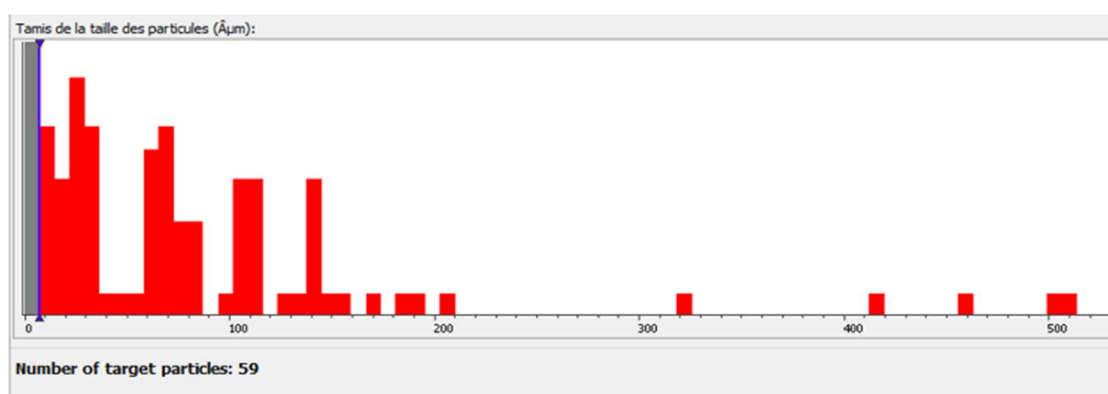
Afin d'optimiser la digestion, les échantillons doivent être tamisés lorsque le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne peut plus agir sur la matière, soit quand le milieu saturé de liquides digestifs ou bien que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'est évaporé. Différentes mailles de tamis ont été testées :

- 1 mm pour la limite supérieure, les déchets compris entre 1 et 5 mm peuvent être analysés<sup>3</sup> à l'aide de ATR-FTIR.
- Pour la limite de taille inférieure, une maille de 71µm en début d'expérience (matériel mis à disposition par le CEFE), 20 µm (matériel mis à disposition par l'INRAE, testé en fin de Phase 1), 50 µm (matériel acheté et reçu en toute fin de projet). Il est constaté que le tamis de 20 µm retient trop de particules, alors que celui de 50 µm laisse bien passer les fluides digestifs et retient bien les particules.

Il a été décidé de ne pas prendre en compte les fibres, d'une part à cause de leur diamètre (20 à 40 µm) rendant leur détectabilité difficile, d'autre part car elles représentent la majorité des déchets retrouvés et que les risques de contamination par le matériel employé (vêtements et filets) sont très forts. Il a donc été décidé de travailler avec le tamis de 50 µm pour cette étude.

Le temps de cartographie infra-rouge a été optimisé en calibrant le tamis de recherche du spectromètre sur 100 µm (Figure 13). Ainsi, en cohérence avec le tamis de recherche du spectromètre, nous utiliserons des tamis en inox de 100 µm pour faciliter la digestion.

En conclusion, la taille minimale des particules prospectées est de 100 µm.



**Figure 13** : Exemple de tamis virtuel de recherche spectrale modifiable avec un curseur.

<sup>3</sup> Les limites supérieures les plus utilisées sont 1 et 5 mm (ex : sur les tortues marines, Mattidi et al., 2019) mais la limite de taille inférieure est moins consensuelle (Gigault et al., 2018 ; Hartmann, et al., 2019)

#### 4.4.7. Extraction des microplastiques collectés

Nos expérimentations montrent que la porosité de membrane filtrante la mieux adaptée est celle de 10 µm mais celle-ci n'est disponible à l'achat qu'en cellulose, or comme les filtres en fibres de verre, les filtres en cellulose ne servent qu'à filtrer les produits chimiques après préparation, ou après utilisation en vue du nettoyage et recyclage du ZnCl<sub>2</sub>. Seules les membranes en alumine (ou Anodisc) de porosité 0,2 µm peuvent être employées pour filtrer le digestat et analyser le contenu au FTIR. Les étapes précédentes de digestion ont donc été ajustées en prenant en compte l'analyse des durées de filtrations en fonction des différents types de filtre, afin d'obtenir un digestat capable de passer à travers une maille de diamètre 0,2 µm.

Après filtration, les membranes sont séchées. Il faut éviter l'adhérence de la membrane d'alumine dans la boîte de pétri, et la faire sécher sur un morceau d'aluminium pour empêcher ce phénomène.

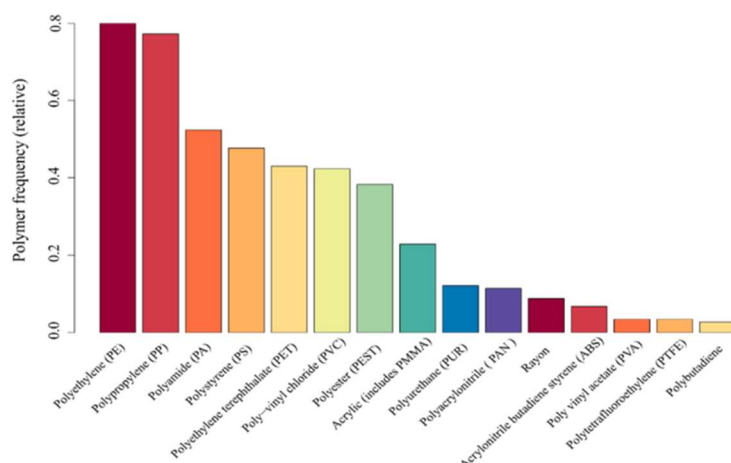
Les boîtes de Pétri n'existant que pour des membranes de diamètre 47 mm, nous avons fabriqué un adaptateur de boîte de Pétri pour passer de 47 mm à 13 mm. Ces adaptateurs ont été fabriqués en bois, puis poncés. Ils seront adaptés pour des Anodiscs de 25 mm que nous avons sélectionnés en fin de Phase de test, car ils sont plus adaptés à nos verreries de filtration et évitent les pertes de particules comparativement à des Anodiscs plus petits et des verreries plus fines.

Deux méthodes de séchage ont été expérimentées : séchage à l'air ambiant dans un placard fermé (évitements des contaminations) et dessiccateur avec gel de silice. La propreté est plus facile à contrôler dans le dessiccateur qui est aussi mieux isolé de l'air ambiant. En effet, les filtres séchés en placard contiennent plus de fibres. Nous retenons donc la méthode du dessiccateur avec gel de silice.

#### 4.4.8. Tests de détectabilité sur polymères connus

En parallèle aux expérimentations d'optimisation de la digestion et de la filtration à partir des contenus digestifs des poissons récupérés dans le cadre de cette étude, nous avons effectué des tests de détectabilité à partir de polymères connus.

Selon Yuan et al. (2022), PVC, PET et PS, sont prédominants dans l'environnement marin, et d'après la méta-analyse de Kannankai et al. (2022) (fig. 14), PE, PP, PS, PET, PVC arrivent en tête (le PA est essentiellement de la fibre textile qui ne rentre pas dans cette étude). Les polymères les plus détectés dans les études d'ingestion par les poissons de Méditerranée (Bellas et al., 2016; Alomar et al., 2017; Digka et al., 2018; Giani et al., 2019; Tsangaris et al., 2021) sont PE, PP et PET. Aucune étude de détectabilité n'a été menée, à notre connaissance, sur les milieux d'eaux douces. Nous avons donc effectué des tests de détectabilité sur les polymères les plus abondants en milieu marin, d'après la littérature. Ce sont néanmoins les types de polymères les plus répandus dans nos environnements courants.



**Figure 14** : Fréquence mondiale des polymères de microplastiques marins (Kannankai et al., 2022)

Afin d'effectuer des matrices de test avant l'application du protocole de routine, des fragments de différentes tailles de chaque type de polymères ont été réalisés à partir de matériaux bruts à l'aide d'une râpe puis tamisés sur un maillage de 200 µm (selon Matiddi et al. (2021)), les micro-plastiques inférieurs à 200 µm sont impossibles à prélever individuellement). Les micro-plastiques ainsi tamisés et calibrés ont ensuite été disposés dans une boîte de pétri en verre et placés sous loupe binoculaire. Ils ont alors été récoltés un à un à l'aide d'une minutie d'entomologie (aiguille) puis placés dans des tractus digestifs-tests (100 items/ind.) disposés dans d'autres boîtes de Pétri en verre. Il a été vérifié que les micro-plastiques insérés dans les tractus digestifs étaient bien retrouvés à la loupe binoculaire.

Nos tests (Tableau 4) révèlent que la détectabilité au FTIR des polymères ayant subi l'effet de le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, n'est pas affectée ni par la concentration et ni par la température bien que leur aspect puisse changer cependant. Ces résultats nous permettent de valider la solution de digestion H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec une concentration de 30 % à 50°C.

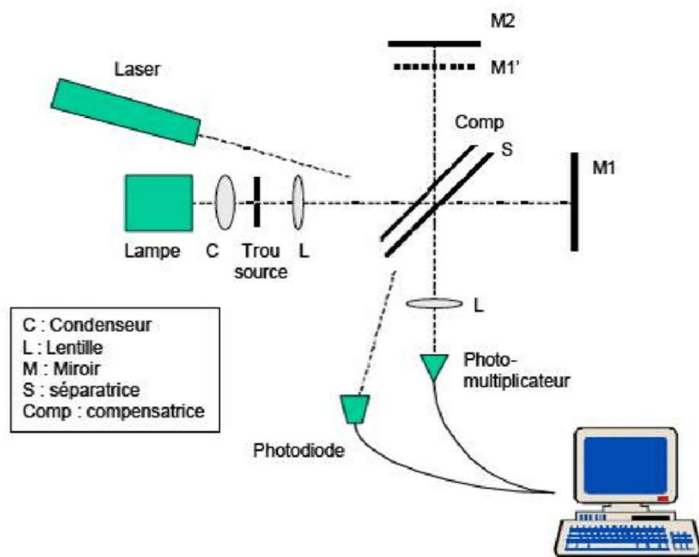
**Tableau 4** : Pourcentage de correspondance entre le spectre testé et la bibliothèque spectrale du logiciel OMNIC Picta en fonction du type de polymères (N: nombre de particules) ("match"), concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, température et durée de digestion.

Paramètres	N	PP 5mm	N	PP 1mm	N	PE 5mm	N	PE 1mm	N	PS 3mm	N	PET 5mm	N	PET 1mm	N	PVC 5mm	N	PVC 1mm	
Sans oxydation, sans découpe		89,86%		89,86%		83,19%		83,19%		77,11%		61,64%		61,64%		82,76%		82,76%	
Moyenne 15% 40°C 1 semaine	3	88,54%	3	86,79%	3	83,37%	3	82,63%	0				0		0				
Moyenne 15% 40°C 2 semaine																			
Moyenne 15% 40°C 3 semaine	0		3	84,95%	0		3	75,32%	3	75,82%			3	58,93%	0				
Moyenne 15% 40°C 4 semaine	6	88,42%	3	84,52%	0		0	0					0		0				
Moyenne 15% 50°C 1 semaine	0		3	75,74%	0		3	75,67%	3	82,51%			3	52,71%	0				
Moyenne 15% 50°C 2 semaine	3	86,72%	3	85,00%	3	80,07%	3	83,68%	0				0		0				
Moyenne 15% 50°C 3 semaine	0		0	0	0		3	80,13%	0		3	49,43%	3	44,70%	1	53,30%	3	64,03%	
Moyenne 15% 50°C 4 semaine	0		0	0	0		0	0					0		0				
Moyenne 35% 40°C 1 semaine	0		3	77,95%	0		3	77,46%	0				0		0				
Moyenne 35% 40°C 2 semaines																			
Moyenne 35% 40°C 3 semaines	0		3	73,01%	1	87,76%	6	64,99%	6	75,20%			3	47,84%	3	78,58%	3	61,97%	
Moyenne 35% 40°C 4 semaines	4	82,93%	6	73,79%	4	72,79%	9	76,90%	0				0		0		3	41,98%	
Moyenne 35% 50°C 1 semaine	0		3	79,88%	1	86,11%	9	63,62%	6	78,71%			3	52,92%	0			3	70,10%
Moyenne 35% 50°C 2 semaine	0		0	0	0		0	0					0		0				
Moyenne 35% 50°C 3 semaine	0		0	1	82,46%	3	79,77%	3	79,94%				0		0			3	86,06%
Moyenne 35% 50°C 4 semaines	0		0	0	0		0	0				3	58,95%	3	51,57%	3	65,36%	3	57,18%
Moyenne par polymère		82,17%		78,30%		78,44%		51,45%		64,28%									
Nombre de particules testées		46		58		21		24		25									

Le taux de similitude des spectres par rapport aux spectres de référence est moins bon pour le PET (moyenne 51,45%) que pour les autres polymères. Le PET est connu pour être le plastique le moins résistant aux réactions d'oxydation le plus résistant étant le PVC dont le taux de correspondance est cependant également assez faible (64,28%). Il est donc possible que la dégradation oxydative du PET libère des composés néoformés dont la présence dans le matériau modifie la signature spectrale.

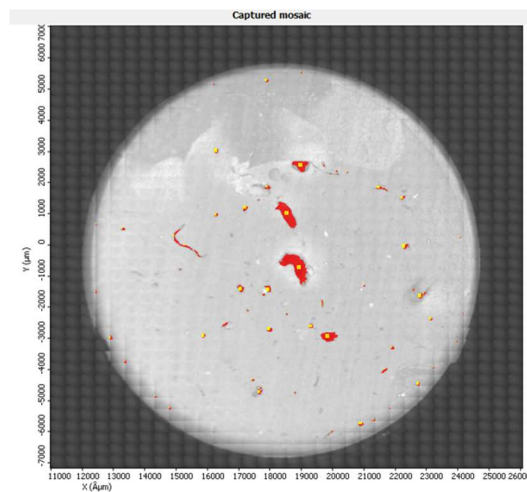
Nous avons cherché quelles méthodologies de micro-spectrométrie peuvent révéler la présence des microplastiques recherchés. Elles varient en fonction des microplastiques recherchés et de leur seuil de détectabilité (Strungaru, 2019; Mettler Toledo, 2022). Les tests effectués au Raman ont été infructueux : Plusieurs polymères ont eu leur spectre effacé par la fluorescence. Le FTIR a donc été choisi pour effectuer les analyses, dispositif présent à l'Institut Agro.

Nous avons procédé à différents paramétrages du spectromètre FTIR pour avoir les meilleurs résultats de détection possibles.

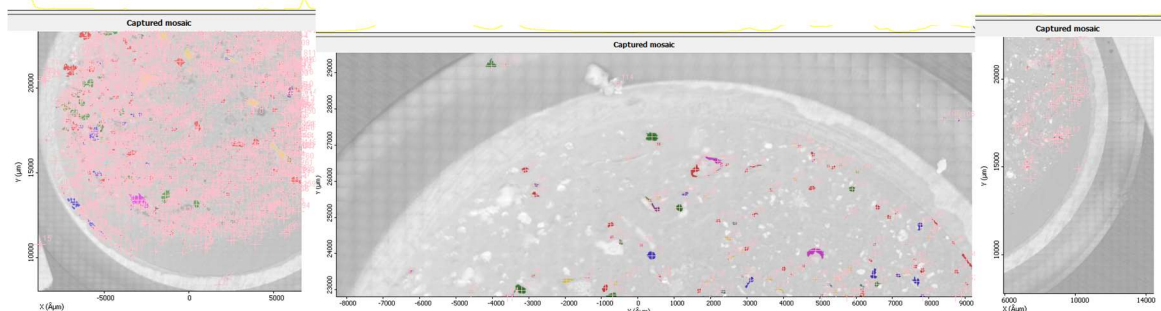


**Figure 15 :** Schéma de fonctionnement d'un spectrophotomètre FTIR (Sekkoum et al. 2012)

Les membranes (Anodiscs) de  $\varnothing$  25 mm dépassent la taille de la surface seuil d'analyse. Pour couvrir la totalité de la membrane de  $\varnothing$  25 mm, nous devons multiplier les analyses en effectuant 3 mesures juxtaposées alors qu'une seule analyse permet de couvrir la surface des membranes de  $\varnothing$  13 mm utilisées en début de protocole. Il faut compter environ 4 heures, du calibrage du FTIR jusqu'aux résultats des analyses qui en sont issues.



**Figure 16 :** Exemple d'analyse d'une membrane de  $\varnothing$  13mm entrant parfaitement dans le cadre de capture de mosaïque.



**Figure 17 :** Exemple d'analyse d'une membrane de  $\varnothing$  25mm sortant du cadre de capture de mosaïque. A gauche, on voit que la membrane sort du cadre de taille maximale. Il faut donc désormais 3 analyses pour couvrir une membrane entière.

L'analyse est effectuée au moyen d'un détecteur en composé de tellure de mercure-cadmium (MCT) refroidi à l'azote liquide (N) qui offre une meilleure résolution spectrale. La quantité d'azote liquide à  
 Micro-plastiques et poissons d'eaux douces - Elaboration d'un protocole standard – HISA-CEFE-INRAE – Mai 2023 - 19

prévoir est de 1,5 L/jour, soit environ 7,5 L/semaine pour une utilisation intensive. L'azote liquide ne se conserve pas au-delà d'une semaine dans la bonbonne (remplie par un organisme extérieur à l'INRAE, donc une commande préalable doit être planifiée).

Validation des tests de détectabilité sur polymères connus :

Ce n'est qu'au dernier jour de cette Phase 1 que nous avons reçu la platine pouvant accueillir les Anodiscs de Ø 25 mm. Un seul test a donc pu aboutir avec une unité de filtration de 25 mm. Nous n'avons eu le temps de tester qu'une seule membrane sèche, sur laquelle un digestat avait déjà été préalablement filtré. En cette fin de Phase de tests, un autre polymère inséré dans un tractus digestif, composé d'un alliage de PE et PP (Polyéthylène:Polypropylène), a été employé, car compte tenu de sa signature spectrale spécifique, il est plus facile à distinguer des autres polymères au FTIR. Ces particules ont affiché une correspondance de 84,30 % avec les spectres de la bibliothèque de référence (Fig 18).

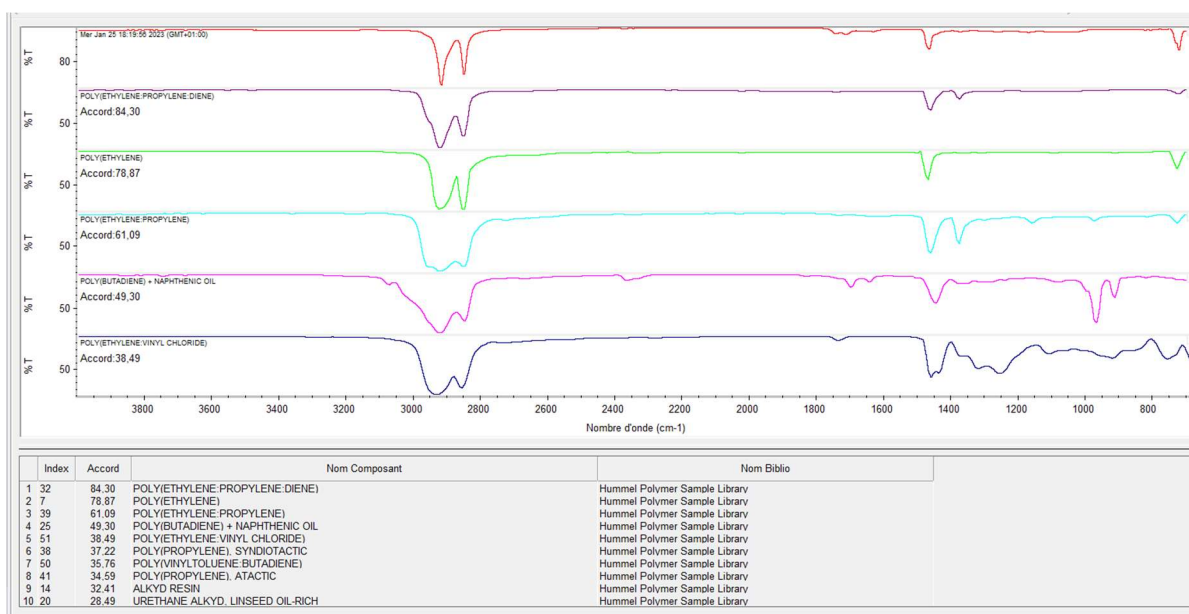


Figure 18 : propriétés spectrales du Polyéthylène:Polypropylène inséré dans le dernier échantillon testé

Nous avons pu connaître le nombre de particules de microplastiques insérées dans la matrice de test : Parmi les 100 particules de Polyéthylène:Polypropylène placées dans le tractus digestif, 85 ont pu être retrouvées.

Identified Library Components				
N° CID	Nom du composant identifié	% de correspondance	% de périmètre	Nbre de particules
1	CELLOPHANE	18,5	38,91	386
2	POLY(VINYLDIENE FLUORIDE:C3F6)	54,9	14,64	47
3	POLY(ETHYLENE:PROPYLENE)	59,6	8,54	54
4	POLY(PROPYLENE), SYNDIOTACTIC	49,8	7,01	17
5	POLYESTER, TERE-&ISO-PHTHALATE	46,4	3,78	4
6	CELLOPHANE	10,0	2,43	34
7	POLYAMIDE 6 + POLYAMIDE 6,6	12,2	1,47	12
8	URETHANE ALKYD, LINSEED OIL-RICH	41,3	1,47	8

Identified Library Components				
N° CID	Nom du composant identifié	% de correspondance	% de périmètre	Nbre de particules
1	POLY(ISOBUTENE:ISOPRENE)	42,7	29,42	37
2	POLY(ETHYLENE:PROPYLENE)	59,5	21,34	9
3	POLY(ISOBUTENE), CHLORINATED	47,9	14,32	9
4	CELLOPHANE	34,7	10,78	25
5	POLY(STYRENE:VINYLIDENE CHLORIDE)	23,5	10,10	4
6	POLYAMIDE 6 + POLYAMIDE 6,6	40,1	4,65	10
7	POLY(ARYL ETHER)	23,5	2,24	3
8	POLY(DIMETHYLSILOXANE)	33,3	1,73	3

Identified Library Components				
N° CD	Nom du composant identifié	% de correspondance	% de périmètre	Nbre de particules
1	POLY(ETHYLENE:PROPYLENE:DIENE)	68,1	37,32	22
2	POLY(METHYLPHENYLSILOXANE)	45,4	27,33	12
3	CELLOPHANE	33,6	19,50	9
4	POLY(BUTADIENE) + NAPHTHENIC OIL	16,4	5,18	2
5	URETHANE ALKYD, LINSEED OIL-RICH	52,9	0,99	2
6	POLYAMIDE 6 + POLYAMIDE 6.6	59,0	0,44	1
7	POLY(ETHYLENE:PROPYLENE)	75,1	0,34	1

**Figure 18** : Résultats des composants identifiés sur les 3 parties de la membrane analysée.

On retrouve 85 % (54+9+22) des particules de Polyéthylène:Polypropylène sur les membranes de  $\varnothing$  25 mm, contre moins de 10 % de particules sur les membranes de  $\varnothing$  13 mm (unités de filtrations retenant trop de particules sur la verrerie, le joint torique et le support de membrane).

#### 4.4.9. Unités

Les résultats pourront être exprimés en :

- Présence/absence : Présence ou absence de microplastiques dans l'échantillon ;
- Fréquence d'occurrence : Ratio du nombre d'échantillon présentant des microplastiques sur nombre total d'échantillon ;
- Abondance : Nombre de fragments de microplastique par échantillon, ou moyenne pour tous les échantillons ;
- Masse : Masse de microplastique par échantillon ( $10^{-x}$  g), ou moyenne pour tous les échantillons
- Surface : taux de recouvrement (% de la surface analysée)

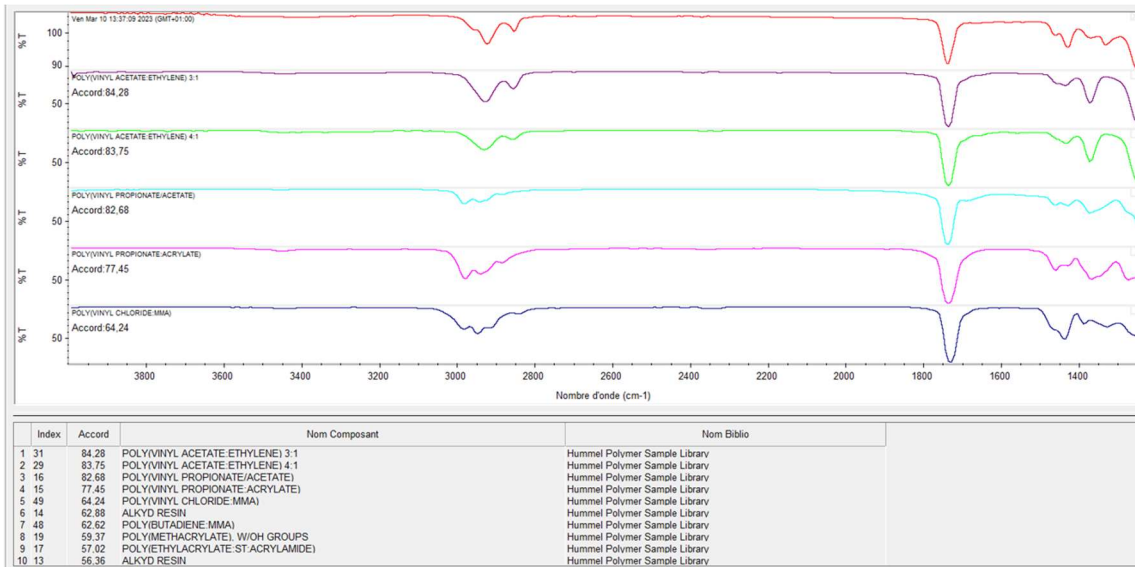
Les résultats pourront être exprimés par type de polymère.

## 5. Discussion

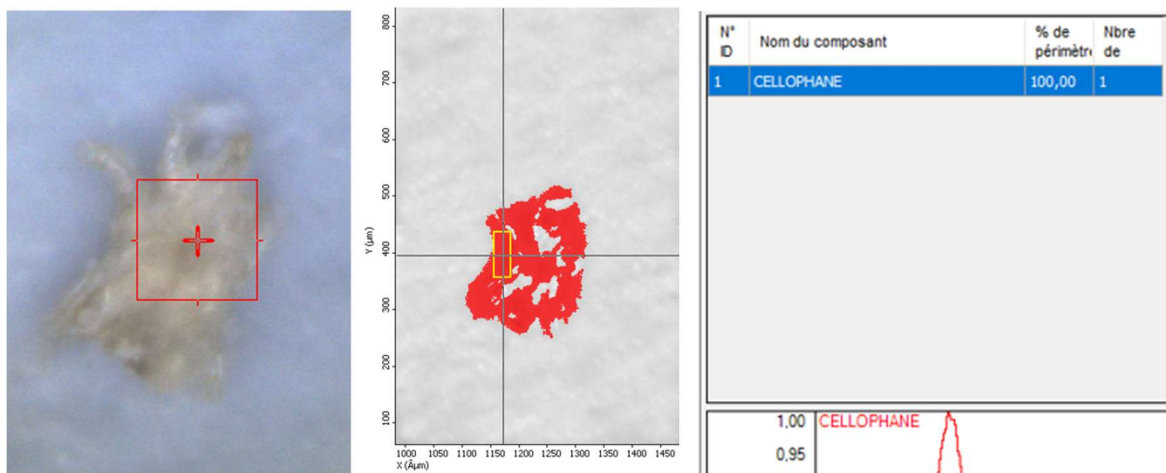
### 5.1. Identification des particules

Le seuil de décision, qui correspond au niveau seuil de correspondance entre le spectre du polymère testé et le spectre disponible dans la banque de données spectrales de référence ("good match") doit être défini. Selon Digka et al. (2017), il doit être de 85% au minimum. Il est rare d'obtenir des correspondances supérieures à 85 % avec la bibliothèque du logiciel OMNIC Picta, l'optimum se situant plutôt à 80 %.

Par ailleurs, il peut exister des confusions sur un polymère en particulier, la cellophane. En effet, il y a plusieurs taux de correspondances ("match") du spectre de ce polymère avec la bibliothèque spectrale (Figures 19 et 20). Le film étirable, appelé communément cellophane est du PVA (Polyvinyl alcohol) ou Polyvinyl Acetate Ethylène dans l'exemple ci-dessous. La vraie cellophane est la contraction de "cellulose diaphane". L'un est un polymère hydrosoluble issu de ressource fossile, l'autre un composé biosourcé et biodégradable. Ce problème de définition est à résoudre car la cellophane est omniprésente dans les échantillons de matières organiques digérées. En effet, les résidus d'éléments organiques sont assimilés à du cellophane ou de la cellulose par le dispositif.

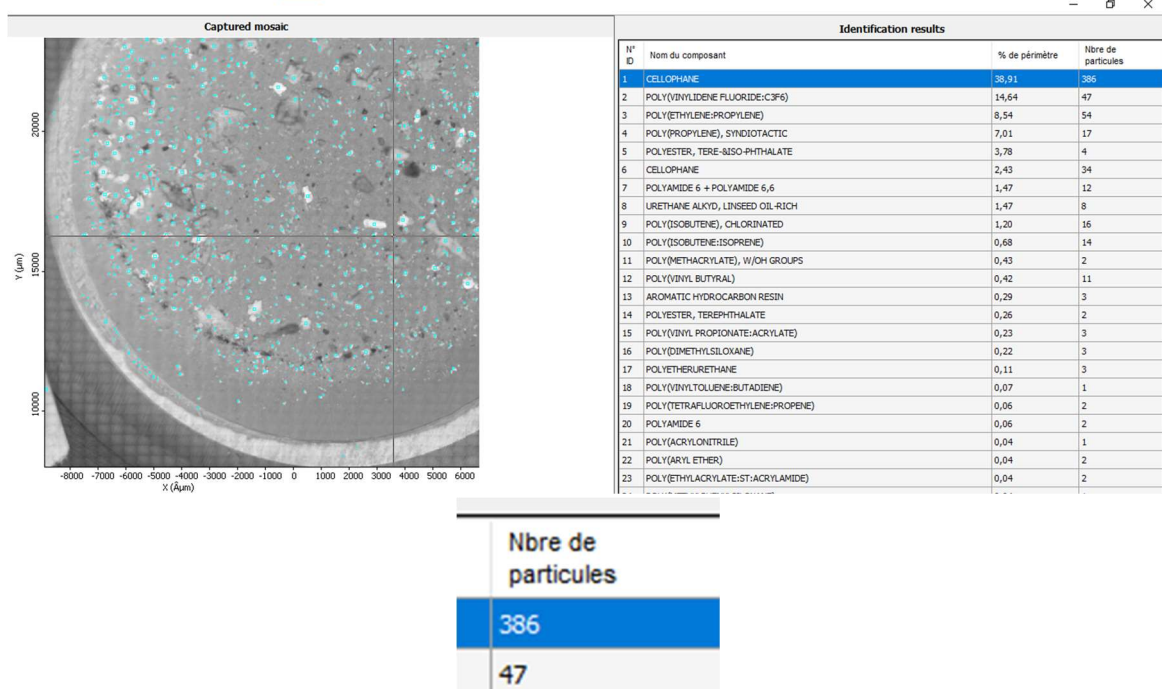


**Figure 19** : Exemple avec un morceau de film étirable, appelé cellophane par abus de langage, détecté comme étant du PVA par le FTIR



**Figure 20** : Exemple avec un acarien détecté comme étant de la cellophane par le FTIR

La cellophane regroupant dans sa définition FTIR tous les résidus organiques, elle domine l'occupation des membranes :



**Figure 21** : Exemple de membranes recouverte de particules de cellophane (bleu clair) et résultats du FTIR

Sur la figure 21, on observe 386 particules de cellophane (en bleu clair).

Alors que le mot “cellophane”, par abus de langage, est généralement employé pour désigner le film étirable, PVA, ici notre FTIR le considère comme un polymère organique (cellulose diaphane). Pour évaluer l’ingestion des microplastiques d’origine pétrochimique, il faudra donc seulement prendre en compte le spectre du PVA. Les auteurs généralement ne précisent pas quel type de cellophane ils cherchent à identifier. Pour une étude nationale, il sera important de définir le type de cellophane recherché.

## 5.2. Nombre d’échantillons

L’objectif final de ce projet est d’évaluer l’ingestion de microplastiques selon l’espèce, le lieu et l’habitat, qui d’après la méta-analyse d’Azizi et al. (2021) sont des facteurs influençant la probabilité d’ingestion de microplastiques chez les poissons. D’après la littérature, il faudrait un minimum de 50 individus par espèce (ICES 2015/MSFD-TSGML 2013) ou 30 selon d’autres auteurs (Matiddi et al., 2021). Le nombre d’échantillons à analyser et les valeurs des occurrences observées seront à tester par des analyses de puissance afin d’en évaluer les valeurs susceptibles de mettre en évidence des tendances temporelles ou des différences spatiales significatives.

## 5.3. Taille minimale à prospecter

D’après Andrade et al. (2019), les dimensions des plastiques ingérés varient en fonction du groupe trophique. Nous devons définir la taille des particules recherchées, sachant qu’en dessous de 100 µm, les analyses spectrales sont plus chronophages : Plus la maille de détection du FTIR est réduite, plus le FTIR détectera de particules. Ainsi une analyse démarrant à 25 µm aura des chances de détecter approximativement 1000 particules, tandis qu’une analyse débutant à partir d’un tamis de 100 µm aura plus de chance de repérer approximativement 400 particules. Il y a donc un compromis à établir entre la taille seuil de particule détectable souhaitée et la durée de l’analyse. En comptant 4 secondes pour

l'identification d'une seule particule (mosaïque, background, détection des particules, application du background, analyse des particules), il faut donc compter 133 minutes (environ 2 h 20) pour identifier 400 particules et 333 minutes (environ 5 h 30) pour 1000 particules.

Selon Collard et al. (2019), le système de filtration des branchies de poisson définit la taille limite des particules qui sont retenues, et 5 µm pourrait être la limite la plus basse d'investigation. Selon Matiddi et al. (2021), la détection d'éléments inférieurs à 100 µm ne doit être prise en considération que pour les études de recherche. En effet, en dessous de cette taille, le nombre de particules augmente probablement, mais peut être biaisé par les risques de contamination et la fragmentation des particules de tailles supérieures. La plupart des études sur l'ingestion de microplastiques par les poissons prend en compte une taille minimale de 100 µm, d'autres moins nombreuses, descendent à 50 µm. Ce seuil de taille minimale devra être défini pour la Phase 2 de l'étude. Les auteurs extrayant les microplastiques à la pince, plutôt qu'à la filtration, se limitent généralement à 200 µm.

## 6. Perspectives

Le protocole que nous avons élaboré, adapté pour l'extraction et l'identification des micro-plastiques ingérés par des poissons d'eau douce, vise à être mis en œuvre sur l'ensemble des poissons collectés par l'OFB en 2020 afin de

- (i) Mener le premier état des lieux des impacts des microplastiques sur les poissons d'eau douce à l'échelle métropolitaine en évaluant les variations spatiales et interspécifiques en termes d'occurrence, de quantités et de types de polymères ;
- (ii) évaluer les facteurs spécifiques, environnementaux et anthropiques influençant l'ingestion de déchets chez les poissons,

L'enjeu sera également d'évaluer si une des espèces collectées pourrait être un bon indicateur des impacts des microplastiques pour les eaux continentales et l'occurrence d'ingestion et les quantités ingérées peuvent être corrélées aux mesures mises en œuvre.

## 7. Références

- Alomar C., Sureda A., Capo X., Guijarro B., Tejada S., Deudero S. (2017). Micro- plastic ingestion by *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 fish and its potential for causing oxidative stress. *Environ. Res.* 159, 135e142. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.043>.
- Andrade M.C., Winemiller K.O., Barbosa P.S., Fortunati A., Chelazzi D., Cincinelli A., Giarrizzo T. (2018). First account of plastic pollution impacting freshwater fishes in the Amazon: Ingestion of plastic debris by piranhas and other serrasalmids with diverse feeding habits, *Environmental Pollution*, Volume 244, 2019, Pages 766-773, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.088>
- Avio C.G., Gorbi S., Regoli F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res. Particl. Ocea.: Impl. Safe Mar. Environ.* 111, 18e26. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres2015.06.014>
- Avio C.G., Pittura L., d'Errico G., Abel S., Amorello S., Marino G., Gorbi S., Regoli F. (2019). Distribution and characterization of microplastic particles and textile microfibers in Adriatic food webs: General insights for biomonitoring strategies, *Environmental Pollution*, Volume 258, 2020, 113766, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113766>
- Azizi N., Khoshnamvand N., Nasser S. (2021). The quantity and quality assessment of microplastics in the freshwater fishes: a systematic review and meta-analysis. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 2021 ; 47

- Barboza L.G.A., Cunha S.C., Monteiro C., Fernandes J.O., Guilhermino L. (2020). Bisphenol A and its analogs in muscle and liver of fish from the North East Atlantic Ocean in relation to microplastic contamination. Exposure and risk to human consumers, *Journal of Hazardous Materials*, 393, 2020, 122419, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122419>
- Barboza L.G.A., Lopes C., Oliveira P., Bessa F., Otero V., Henriques B., Raimundo J., Caetano M., Vale C., Guilhermino L. (2020). Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Sci. Total Environ.* 2020, 717, 134625
- Bellas J., Martínez-Armental J., Martínez-Cámara A., Besada V., Martínez-Gomez C. (2016). Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. *Mar. Pollut. Bull.* 109 (1), 55e60. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.026>
- Bray L., Digka N., Tsangaris C., Camedda A., Gambaiani D., de Lucia, G. A., et al. (2019). Determining suitable fish to monitor plastic ingestion trends in the Mediterranean Sea. *Environ. Pollut.* 247, 1071–1077. doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.100
- Collard F., Gasperi J., Gabrielsen G.W., Tassin B. (2019). Plastic particle ingestion by wild freshwater fish: a critical review. *Environmental Science and Technology*, 2019, 31, ff10.1021/acs.est.9b03083ff. fhal-02342839
- Collard F., Gasperi J., Gilbert B., Eppe G., Azimi S., Rocher V., Tassin B. (2018). Anthropogenic particles in the stomach contents and liver of the freshwater fish *Squalius cephalus*. *Sci. Total Environ.* 643, 1257–1264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.313>
- Coppock R., Queiros A. (2017). A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environmental Pollution*. 230. 829-837. 10.1016/j.envpol.2017.07.017
- Coppock R., Lindeque P., Cole M., Galloway T., Näkki P., Birgani H., Richards S., Queirós A. (2021). Benthic fauna contribute to microplastic sequestration in coastal sediments, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 415, 2021, 125583, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125583>
- Costa A., Pinheiro M., Magalhães J., Ribeiro R., Seabra V., Reis S., Sarmento B. (2016). “The formulation of nanomedicines for treating tuberculosis.” *Adv Drug Deliv Rev* 102:102-115. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.012>
- Corolla J.-P., Kupfer M. in : DORIS, 30/04/2014 : *Barbus barbus* (Linnaeus, 1758), <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/242> DORIS, 2017
- Corolla J.-P., Kupfer M. in : DORIS, 29/06/2016 : *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758), <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/615>
- Corolla J.-P., Boisneau P., Kupfer M. in : DORIS, 19/03/2019 : *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758, <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/330>
- Corolla J.-P., Parlier E., Kupfer M. in : DORIS, 12/06/2016 : *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/289>
- Coudre C., Le Bris S., André F. in : DORIS, 05/03/2023 : *Boops boops* (Linnaeus, 1758), <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/2701> Giani et al., 2019
- Digka N. (2017). Protocole microplastiques. Hellenic center\_HCMR 11.08.17
- Digka N., Tsangaris C., Torre M., Anastasopoulou A., Zeri C. (2018a). Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 135, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.063do>
- Digka N., Tsangaris C., de Lucia G.A., Palazzo L., Pérez del Olmo A., Raga J.A., Miaud C., Gambaiani D., Tomassetti P., Matiddi M. (2018b). Methods for the detection of microplastics ingested by fish. In: 6th International Marine Debris Conference (6IMDC), 12–16 March, 2018a, San Diego, California, USA
- Digka N., Tsangaris C., Kaberi H., Adamopoulou A., Zeri C. (2018c). Microplastic abundance and polymer types in a Mediterranean environment. In: *Proceedings of the International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea*. Springer Water, pp. 17–24

- Gargominy O., Terceirie S., Régnier C., Ramage T., Dupont P., Daszkiewicz P., Poncet L. (2022). *TAXREF, référentiel taxonomique pour la France : méthodologie, mise en œuvre et diffusion*. Rapport PatriNat (OFB-CNRS-MNHN), Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. 47 pp
- GESAMP, Guidelines on the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean P.J. Kershaw, A. Turra, F. Galgani (Eds.), IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (2019) Rep. Stud. GESAMP No. 99, 130p
- Gigault J., ter Halle A., Baudrimont M., Pascal P.-Y., Gauffre F., Phi T.-L., El Hadri H., Grassl B., Reynaud S. (2018). Current opinion: What is a nanoplastic?, *Environmental Pollution*, Volume 235, 2018, Pages 1030-1034, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>
- Halfar J., Brožová K., Čabanová K., Heviánková S., Kašpárková A., Olšovská E. (2021). Disparities in Methods Used to Determine Microplastics in the Aquatic Environment: A Review of Legislation, Sampling Process and Instrumental Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 7608. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147608>
- Hara J., Frias J., Nash R. (2020). Quantification of microplastic ingestion by the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* from Irish waters, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 152, 2020, 110905, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.110905>
- Hartmann N.B., Hüffer T., Thompson R.C., Hasselov M., Verschoor A., Daugaard A.E., Rist S., Karlsson T., Brennholt N., Cole M., Herrling M.P., Hess M.C., Ivleva N.P., Lusher A.L., Wagner, M. (2019). Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environ. Sci. Technol.* 53, 1039–1047. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05297>
- Hidalgo-Ruz V., Thiel M. (2013). Distribution and abundance of small plastic debris on beaches in the SE Pacific (Chile): a study supported by a citizen science project *Mar. Environ. Res.*, 87–88 (2013), pp. 12-18, 10.1016/j.marenvres.2013.02.015
- Hirai H., Takada H., Ogata Y., Yamashita R., Mizukawa K., Saha M., Kwan C., Moore C., Gray H., Laursen D., Zettler E.R., Farrington J.W., Reddy C.M., Peacock E.E., Ward M.W. (2011). Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Marine Pollution Bulletin* 62, 1683-1692
- Horiba D., Technical reports, July 10th, 2020, english edition n°54. <https://www.horiba.com/us/en/publications/readout/>
- Kannankai M.P., Babu A. J., Radhakrishnan A., Kumbukattu R., Borah A., Purushothaman Devipriya S. (2022). Machine learning aided meta-analysis of microplastic polymer composition in global marine environment, *Journal of Hazardous Material*
- Keith P., Dorson M. (2003). La Perche : *Perca fluviatilis* Linné, 1758. In : Pascal, M., Lorvelec, O., Vigne, J.-D., Keith, P. & Clergeau, P. *Évolution holocène de la faune de Vertébrés de France : invasions et extinctions*. Rapport INRA/CNRS/MNHN: 138-139
- Li J., Liu H., Chen J.P. (2018). Microplastics in freshwater systems: a review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Res.* 2018;137:362–374. Lopes et al., 2022
- Lusher A. L., Hollman P., Mandoza-Hill J. (2017a). Microplastics in Fisheries and Aquaculture: Status of Knowledge on their Occurrence and Implications for Aquatic Organisms and Food Safety. Rome: FAO
- Lusher A. L., Welden N. A., Sobral P., Cole M. (2017b). Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Anal. Methods* 9, 1346–1360. doi: 10.1039/C6AY02415G
- Masura J., Baker J.E., Foster G.D., Arthur C., Herring C (2015). Laboratory methods for the analysis of microplastics in the marine environment: recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments. 2015. NOAA Tech. Memo. NOS-OR&R-48
- Matiddi M., Pham C. K., Anastasopoulou A., Andresmaa E., Avio C. G., Bianchi J., et al. (2021). Monitoring Micro-Litter Ingestion in Marine Fish: A Harmonized Protocol for MSFD and RSCS Areas,

- Version 1. Available online at: <https://indicite-europa.eu/cms/wp-content/uploads/2021/06/Monitoring-microlitter-ingestion-in-marine-fish-1.pdf>
- MEDSEALITTER Consortium, 2019. Common monitoring protocol for marine litter. In: Interegg Med MEDSEALITTER Project
- Meijer L., van Emmerik T., van der Ent R., Schmidt C., Lebreton L. (2021). More than 1000 rivers account for 80% of global riverine plastic emissions into the ocean. *Sci. Adv.* 7, eaaz5803(2021). DOI:10.1126/sciadv.aaz5803
- Mettler Toledo (2022). Technical Documentation Library. Site web : [https://www.mt.com/in/en/home/products/L1\\_AutochemProducts/ftir-and-raman-spectrometers.html](https://www.mt.com/in/en/home/products/L1_AutochemProducts/ftir-and-raman-spectrometers.html)
- MNHN & OFB [Ed]. 2003-2023. Fiche de *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN). [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/69350](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/69350)
- MNHN & OFB [Ed]. 2003-2023. Fiche de *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758). Inventaire national du patrimoine naturel (INPN). Site web : [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/67310](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/67310)
- Munno K., Helm P.A., Jackson D.A., Rochman C., Sims A. (2018). Impacts of temperature and selected chemical digestion methods on microplastic particles. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 91–98
- Nakajima R., Lindsay D.J., Tsuchiya M., Matsui R., Kitahashi T., Fujikura K., Fukushima T. (2019). A small, stainless-steel sieve optimized for laboratory beaker-based extraction of microplastics from environmental samples. *MethodsX.* 2019;6:1677–1682. doi: 10.1016/j.mex.2019.07.012
- Nakajima R., Tsuchiya M., Lindsay D.J., Kitahashi T., Fujikura K., Fukushima T. (2019). A new small device made of glass for separating microplastics from marine and freshwater sediments. *PeerJ.* 2019 Oct 21;7:e7915. doi: 10.7717/peerj.7915. PMID: 31656703; PMCID: PMC6812663
- Parker B., Andreou D., Green I.D., Britton J.R. (2021). Microplastics in freshwater fishes: occurrence, impacts and future perspectives. *Fish Fish.* 22 (3), 467–488. <https://doi.org/10.1111/FAF.12528>
- Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali O., Papa F., Rongioletti M.C.A., Baiocco F., Draghi S., et al. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environ. Int.* 2021, 146, 106274
- Ragusa A., Lelli V., Fanelli G., Svelato A., D'Avino S., Gevi F., Santacroce C., Catalano P., Rongioletti M.C.A., De Luca C., Gulotta A., Rinalducci S., Timperio A.M. (2022). Plastic and Placenta: Identification of Polyethylene Glycol (PEG) Compounds in the Human Placenta by HPLC-MS/MS System. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(21):12743. <https://doi.org/10.3390/ijms232112743>
- Sanchez W., Bender C., Porcher J.M. (2014). Wild gudgeons (*Gobio gobio*) from French rivers are contaminated by microplastics: preliminary study and first evidence. *Environ Res* 128, 98-100
- Savino I., Campanale C., Trotti P., Massarelli C., Corriero G., Uricchio V.F. (2022). Effects and Impacts of Different Oxidative Digestion Treatments on Virgin and Aged Microplastic Particles. *Polymers.* 2022; 14(10):1958. <https://doi.org/10.3390/polym14101958>
- Sekkoum K., Fouzi Talhi M., Cheriti A., Bourmita Y., Belboukhari N., Boulenouar N., Taleb S. (2012). Water in Algerian Sahara: Environmental and Health impact. *InTech.* doi: 10.5772/50319
- Strungaru S.-A., Jijie R., Nicoara M., Plavan G., Faggio C. (2019). Micro- (nano) plastics in freshwater ecosystems: Abundance, toxicological impact and quantification methodology, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 110, 2019, Pages 116-128, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.025>
- Tsangaris C., Panti C., Compa M., Pedà C., Digka N., Bainsi M., D'Alessandro M., Alomar C., Patsiou D., Giani D., Romeo T., Deudero S., Fossi M. C. (2021). Interlaboratory comparison of microplastic extraction methods from marine biota tissues: A harmonization exercise of the Plastic Busters MPAs project, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 164, 2021, 111992, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.111992>
- Walkinshaw C., Tolhurst T.J., Lindeque P.K. et al. (2023). Impact of polyester and cotton microfibers on growth and sublethal biomarkers in juvenile mussels. *Micropl.&Nanopl.* 3, 5, 2023. <https://doi.org/10.1186/s43591-023-00052-8>

- Walkinshaw C., Tolhurst T.J., Lindeque P.K. *et al.* (2022). Detection and characterisation of microplastics and microfibrils in fishmeal and soybean meal, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 185, Part A, 2022, 114189, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114189>
- Wesch C., Bredimus K., Paulus M., Klein R. (2016). Towards the suitable monitoring of ingestion of microplastics by marine biota: A review. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*
- Yuan Z., Nag R., Cummins E. (2022). Ranking of potential hazards from microplastics polymers in the marine environment. *J. Hazard. Mater.* 429, 128399 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128399>