

R. MIROGLIO¹, R. NUGNES¹, G. LASTRICO¹, P. SORO¹, V. PIAZZA¹, F. GARAVENTA^{1,2},
M. FAIMALI^{1,2}, C. GAMBARDELLA^{1,2}

¹ National Research Council – Institute for the Study of Anthropic Impact and Sustainability in the Marine Environment (CNR-IAS), Genova, Italy

² NBFC, National Biodiversity Future Center, 90133 Palermo, Italy
corresponding author: roberta.miroglio@ias.cnr.it

EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI DEGLI PNEUMATICI SULLA RETE TROFICA PLANCTONICA DEL MEDITERRANEO

TYRE WEAR PARTICLES THREATEN THE MEDITERRANEAN PLANKTONIC FOOD WEB

Abstract - Tyre wear particles (TWP) pose a threat to marine ecosystems due to the leaching of harmful chemical mixtures that may affect biodiversity and ecosystem functioning. This study assessed the impact of TWP leachates on Mediterranean species through chemical analysis and ecotoxicological bioassays. Two phytoplankton species (*Isochrysis galbana*, *Chrysothila elongata*), the larval stage of the crustacean *Amphibalanus amphitrite* and the embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus* were exposed to different concentrations of TWP leachates. Algal growth inhibition, naupliar immobility and behaviour, and larval developmental anomalies were assessed after 48-72 hours. TWP leachates significantly affected *I. galbana* growth, *A. amphitrite* behaviour, and *P. lividus* development. Such toxicity was likely due to additives released from TWP leachates. These findings highlight the harmful impact of TWP-associated pollutants on the planktonic food web in coastal areas, emphasising the urgent need to reduce TWP emissions and regulate hazardous additives to protect marine biodiversity.

Keywords: biodiversity, zooplankton, phytoplankton, leachates, ecotoxicology

Introduzione - Le particelle rilasciate dall'usura degli pneumatici (TWP, <200 µm), generate dall'attrito con la superficie stradale, rappresentano una componente significativa delle emissioni non derivanti dallo scarico dei veicoli. Si stima che ogni anno vengano rilasciate circa 6,1 milioni di tonnellate di TWP, costituite da un insieme di particelle provenienti non solo dagli pneumatici, ma anche dalla pavimentazione stradale, dall'usura dei freni e da altri contaminanti aerodispersi che si depositano sul manto stradale (Kole *et al.*, 2017). In seguito all'azione degli agenti atmosferici e al dilavamento, le TWP possono essere trasportate nei corsi d'acqua, rappresentando un rischio per gli ecosistemi acquatici. A causa delle loro piccole dimensioni, infatti, possono essere facilmente ingerite da diversi organismi, generando un falso senso di sazietà, responsabile di una minore assunzione di cibo e di un conseguente calo energetico. Oltre all'ingestione diretta, recenti studi hanno evidenziato che il processo di "lisciviazione", responsabile del rilascio di composti chimici, rappresenta un ulteriore fattore di rischio. Questo fenomeno, favorito dall'invecchiamento delle particelle (es. stress meccanico, degradazione, colonizzazione microbica), determina il rilascio di una complessa miscela di additivi chimici e altri inquinanti, non legati covalentemente alla matrice polimerica, potenzialmente dannosi per il biota. Studi di letteratura hanno rivelato effetti letali e sub-letali dei lisciviati sul fitoplancton e sullo zooplancton marino, tra cui una inibizione della crescita algale, una riduzione della sopravvivenza, della crescita e della riproduzione. Tuttavia, le conoscenze attualmente disponibili risultano ancora scarse e frammentarie.

Considerando il ruolo chiave del plancton nel trasferimento di energia lungo la catena trofica, nella regolazione del ciclo del carbonio e nella produzione di ossigeno, e, la consapevolezza di una crescente minaccia ambientale, questo studio si propone di valutare l'impatto dei lisciviati delle TWP attraverso un approccio integrato che combina analisi chimiche ed ecotossicologiche. Nello specifico, due specie di organismi fitoplanctonici (*Isochrysis galbana* Parke, *Chrysothila elongata* (Droop) R.A.Andersen, J.I.Kim, Tittley & Yoon, e zooplanctonici - embrioni dell'echinoide *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) e nauplii del crostaceo cirripede *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) – appartenenti al Mar Mediterraneo, sono state esposte a diverse concentrazioni di lisciviato per 48-72 ore.

Materiali e metodi - Frammenti di TWP sono stati micronizzati in modo da ottenere particelle di dimensioni <250 µm. I lisciviati sono stati preparati lasciando in agitazione 1g/L di microparticelle in acqua di mare naturale filtrata 0,22 µm su un agitatore automatizzato (120 rpm) al buio a 20°C, per 72 ore. Successivamente, il lisciviato è stato filtrato (0,22 µm) e testato sia tal quale (1 g/L) che a diverse diluizioni: 0,25 – 0,50 – 0,75 g/L. Le analisi chimiche sono state condotte mediante la tecnica di gascromatografia al fine di rilevare i principali composti rilasciati dalle TWP.

Biosaggi

Culture di *I. galbana* e *C. elongata* in fase di crescita esponenziale sono state esposte alle soluzioni test utilizzando piastre multi pozzetto in polistirene, nelle quali, per ogni pozzetto sono stati posti 1,8 mL di campione e 200 µL di inoculo algale (10⁴ cell/mL). Inoltre, per ogni specie è stato allestito un controllo contenente solo il terreno di coltura (f/2). Dopo un'incubazione a 20±1°C in luce continua per 72 ore, la concentrazione algale è stata valutata tramite emocitometro (Camera di Bürker) con microscopio invertito. L'inibizione della crescita algale è stata valutata rispetto al controllo.

Circa 15-20 nauplii di *A. amphitrite* al II stadio larvale, sono stati posti in 1 mL di soluzione test in piastre multi-pozzetto di polistirene e, incubati a 20±1°C per 48 ore. Successivamente, sono state valutate l'immobilità e l'alterazione del nuoto. Nel primo caso è stato utilizzato uno stereomicroscopio, nel secondo, invece, un apposito sistema di registrazione ("Behavioural Alteration Recorder"), sviluppato presso i laboratori del CNR-IAS, completo di un software per l'analisi della velocità media (mm/s).

Per quanto riguarda *P.lividus*, esemplari adulti sono stati campionati nel Mar Ligure, trasportati in laboratorio e il rilascio dei gameti è stato indotto mediante iniezione di una soluzione 0,5M di cloruro di potassio. Uova e sperma sono stati raccolti separatamente e fecondati con un rapporto di 1:10. Il saggio di embriotossicità è stato eseguito esponendo 1 mL di soluzione di uova fecondate (1000 uova/mL) a 9 mL della soluzione test in piastre multipozzetto, incubate al buio a 18°C±1 per 72 ore. Le larve sono state poi fissate in formalina al 4%, fotografate con un microscopio invertito e le immagini analizzate per determinare le percentuali di anomalie dello sviluppo (100 plutei per replica).

Tutti i test hanno previsto l'allestimento di tre repliche per ciascuna diluizione di lisciviato e per i controlli. Dopo 48 e 72 ore, sono stati calcolati, dove possibile, i valori di EC50 (diluizione di lisciviato responsabile di un effetto sub-letale nel 50% degli organismi). L'analisi della varianza a una via (ANOVA) e il Dunnett test sono stati utilizzati per determinare eventuali differenze significative tra i controlli e i campioni trattati (*p < 0,05).

Risultati - I risultati ecotossicologici relativi all'esposizione di organismi fitoplanctonici e zooplanctonici ai lisciviati di TWP (0,25 – 0,5 – 0,75 - 1 g/L) sono riportati nella Fig. 1. *I. galbana* è risultata essere la specie algale più sensibile (Fig. 1a), evidenziando un'inibizione significativa della crescita algale a partire da 0,25 g/L. Al contrario, *C. elongata*, non ha mostrato effetti superiori al 15%, neanche alla massima concentrazione testata (1 g/L). Per quanto riguarda i nauplii di *A. amphitrite*, dopo 48 ore di esposizione non è stato osservato alcun effetto sull'immobilità (<5%), mentre l'attività natatoria ha evidenziato una riduzione significativa (21%) a partire dal 0,25 g/L (Fig.1). L'esposizione ai lisciviati ha inoltre mostrato un'elevata tossicità sullo sviluppo embrionale del riccio di mare *P. lividus*, con effetti prossimi al 30% a partire dalla concentrazione più bassa testata (0,25 g/L).

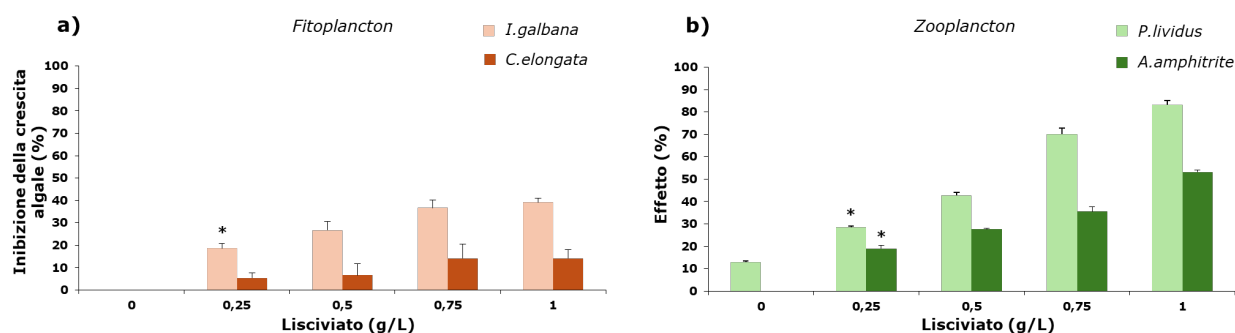


Fig. 1 - (a) *I. galbana* and *C. elongata* growth inhibition percentages after 72h exposure to TWP leachate at different concentrations; (b) *A. amphitrite* behavioural alteration and *P. lividus* developmental anomalies percentages after 48h and 72h exposure to TWP leachate at different concentrations. Asterisks indicate differences between treated samples and controls (* $p < 0.05$).

(a) Percentuali di inibizione della crescita algale di *I. galbana* and *C. elongata* dopo 72 ore di esposizione a diverse concentrazioni del lisciviato di TWP; (b) Percentuali dell'alterazione del nuoto di *A. amphitrite* e delle anomalie dello sviluppo larvale di *P. lividus* dopo 48 e 72 ore di esposizione a diverse concentrazioni del lisciviato di TWP. Gli asterischi indicano differenze significative tra i trattati e il controllo (* $p < 0.05$).

Sebbene non siano stati rilevati effetti tossici per la crescita algale e l'immobilità dei crostacei, è stato possibile calcolare valori di EC_{50} relativi alla riduzione dell'attività natatoria di *A. amphitrite* e alle anomalie dello sviluppo di *P. lividus* (0,95 (0,82 – 1,1) g/L e 0,59 (0,53 – 0,66) g/L). I composti chimici individuati nel lisciviato di TWC sono riportati in Tab. 1.

Tab. 1 - Compounds identified in the 1 g/L TWP leachate (ng/g)

Composti identificati nel lisciviato ad 1g/L di TWP (ng/g)

Composto	Lisciviato	Ctr	Ruolo
Benzofenone	330	22	Filtro UV
4-metilbenzofenone	35	5,3	
Trifenil fosfato	<23	3,5	Ritardante di fiamma
Tributil fosfato	33	4,6	
Tris(2-cloroetil)fosfato	<66	22	
2,4 Diisocianato di toluene	<0,9	0,3	Intermedio chimico
2,4 Diisocianato di toluene	<0,9	0,3	
Bisfenolo A	<3,4	1,1	
Bisfenolo S	<3,6	1,2	
Dimetil ftalato	97	11	Plasticizzante
Benzil butil ftalato	21	1,1	

Conclusioni - I risultati di questo studio evidenziano che l'esposizione ai lisciviati di TWP esercita effetti negativi sulla crescita delle microalghe, sull'attività natatoria dei crostacei e sullo sviluppo larvale degli echinodermi. Tuttavia, l'effetto sembra variare in funzione della specie e dell'end-point considerato. Il fitoplancton è risultato meno sensibile rispetto allo zooplancton. *I. galbana* e *C. elongata* hanno mostrato anche una minore sensibilità rispetto ad alcune diatomee riportate in letteratura, come *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve (Capolupo *et al.*, 2020), probabilmente grazie a meccanismi adattativi che aumentano la tolleranza agli stress ambientali (Wang *et al.*, 2024). Tuttavia, tra le due specie, *I. galbana* si è rivelata più sensibile, mostrando un effetto del 40% alla concentrazione massima testata (1 g/L), confermando la variabilità interspecifica nella risposta ai contaminanti (Faucher *et al.*, 2017). Effetti significativi sono stati osservati anche sul nuoto dei nauplii di *A. amphitrite* e sullo sviluppo embrionale di *P. lividus*, a partire dalla concentrazione più bassa (0,25 g/L).

Questo risultato sembra indicare che, gli organismi appartenenti ai livelli trofici più bassi, indipendentemente dalla specie considerata, possano avere un ruolo importante nella stima dei rischi ambientali associati ai lisciviati degli pneumatici.

Effetti tossici che coinvolgono i primi stadi di sviluppo potrebbero modificarne le dinamiche di popolazione e compromettere la struttura degli habitat costieri. I risultati ottenuti sono coerenti con quanto riportato in studi recenti e confermano lo sviluppo embrionale come uno degli endpoint più sensibili (Rist *et al.*, 2023).

La tossicità dei lisciviati - in termini di EC50 - riscontrata negli organismi zooplanctonici può essere attribuita alla co-esposizione di composti chimici rilasciati dai TWP, presenti in basse quantità nei campioni controllo di acqua di mare. Ritardanti di fiamma, intermedi chimici, plasticizzanti e filtri UV sono comunemente impiegati nella produzione della gomma. Come confermato da studi di letteratura, ftalati, benzofenone e bisfenolo A sono in grado di indurre tossicità in alghe, crostacei ed echinodermi (Beiras *et al.*, 2019; Chi *et al.*, 2019). La presenza di questi composti potrebbe costituire un rischio per l'ecosistema marino, come suggerito dal presente studio. Inoltre, altri additivi e composti non rilevabili o non analizzati con il metodo di estrazione adottato in questo studio potrebbero aver influenzato i risultati, come dimostrato in precedenza da Oliviero e colleghi (2019).

Bibliografia

- BEIRAS R., TATO T., LÓPEZ-IBÁÑEZ S. (2019) - A 2-Tier standard method to test the toxicity of microplastics in marine water using *Paracentrotus lividus* and *Acartia clausi* larvae. *Environ. Toxicol. Chem.*, **38** (3): 630–637. <https://doi.org/10.1002/etc.4326>
- CAPOLUPO M., SØRENSEN L., JAYASENA K. D. R., BOOTH A. M., FABBRI E. (2020) - Chemical composition and ecotoxicity of plastic and car tire rubber leachates to aquatic organisms. *Water Res.*, **169**: 115270.
- CHI J., LI Y., GAO J. (2019) - Interaction between three marine microalgae and two phthalate acid esters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **170**: 407–411. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.012>
- FAUCHER G., HOFFMANN L., BACH L. T., BOTTINI C., ERBA E., RIEBESELL U. (2017) - Impact of trace metal concentrations on coccolithophore growth and morphology: Species-specific responses in past and present ocean. *EGU General Assembly Conference Abstracts*, **19**: 15537
- KOLE P. J., LÖHR A. J., VAN BELLEGHEM F. G. A. J., RAGAS A. M. J. (2017) - Wear and Tear of Tyres: A Stealthy Source of Microplastics in the Environment. *IJERPH*, **14** (10): 10. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29053641/>
- OLIVIERO M., TATO T., SCHIAVO S., FERNÁNDEZ V., MANZO S., BEIRAS R. (2019) - Leachates of micronized plastic toys provoke embryotoxic effects upon sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environ. Pollut.*, **247**: 706–715. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.098>
- RIST S., LE DU-CARRÉE J., UGWU K., INTERMITE C., ACOSTA-DACAL A., PÉREZ-LUZARDO O., ZUMBADO M., GÓMEZ M., ALMEDA R. (2023) - Toxicity of tire particle leachates on early life stages of keystone sea urchin species. *Environ. Pollut.*, **336**: 122453. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122453>
- WANG J., ZENG C., FENG Y. (2024) - Meta-analysis reveals responses of coccolithophores and diatoms to warming. *Mar. Environ. Res.*, **193**: 106275. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106275>