

V. FERRARI^{1,2}, R. SIMONINI², S. RIGHI², D. PREVEDELLI², E. BERGAMI^{2,3}

¹Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche, Università di Modena e Reggio Emilia, via Campi 103, 41125, Modena (MO)

²Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena (MO)

³National Biodiversity Future Center, Palermo (PA)

valentina.ferrari@unimore.it

MONITORAGGIO DELLA CONTAMINAZIONE DA MICROPLASTICHE IN ESEMPLARI DEL VERME DI FUOCO *HERMODICE CARUNCULATA* (ANNELIDA) PROVENIENTI DALLE COSTE DEL MAR IONIO

MONITORING OF MICROPLASTIC CONTAMINATION IN THE FIREWORM *HERMODICE CARUNCULATA* (ANNELIDA) FROM THE IONIAN SEA

Abstract – Microplastics are widespread and persistent pollutants in the marine ecosystem. Because of polymer density or biofouling process, microplastics can accumulate in benthic habitats, which can act as a final sink for microplastic deposition. Thus, benthic invertebrates are particularly vulnerable to microplastic ingestion, raising growing concern on the impacts on macrobenthic communities. Therefore, information on the negative effects of microplastic pollution on marine benthic invertebrates are required. Here we investigate the microplastic content in the polychaete *Hermodice carunculata*, an opportunistic scavenger and predator. An optimized enzymatic and thermo-oxidative digestion method, followed by acid treatment to remove the worm's chaetae, was applied to isolate microplastics from specimens. Then, the suspected microplastics were quantified and characterized through stereomicroscope and spectroscopical technique. A total of 112 suspected microplastics were found in 95% of animals, showing the potential role of *H. carunculata* as a target for assessing microplastic pollution in Mediterranean benthic predators.

Keywords: polychaetes, Mediterranean Sea, benthos, predator, microplastic.

Introduzione – Le microplastiche (MP; <5 mm) sono inquinanti ubiquitari e persistenti, diffusi negli ecosistemi marini di tutto il mondo. Nonostante le sue dimensioni, il Mar Mediterraneo è uno dei bacini più colpiti al mondo dall'accumulo di MP, con elevate concentrazioni segnalate sulla superficie, nella colonna d'acqua e sui fondali, nonché nel biota marino (Sharma *et al.*, 2021). Infatti, essendo di piccole dimensioni, le MP possono essere ingerite direttamente o indirettamente da una vasta gamma di organismi, dallo zooplankton ai predatori apicali (Botterell *et al.*, 2019; Ugwu *et al.*, 2021). L'accumulo di MP negli organismi marini può causare una serie di effetti negativi, quali abrasioni/lacerazioni di organi sia esterni che interni e alterazioni nel funzionamento del tratto gastrointestinale. Oltre ai danni fisici, le MP possono esporre ad un pericolo chimico dovuto all'esposizione a sostanze tossiche aggiunte durante il processo di fabbricazione o adsorbite sulla superficie durante la permanenza in ambiente (Cássio *et al.*, 2022). L'ingestione di MP e i potenziali impatti sono stati documentati in numerose specie di vertebrati e invertebrati marini, che differiscono per livello trofico e strategie di alimentazione (Marmara *et al.*, 2023). Tuttavia, ad oggi, in alcuni gruppi di organismi bentonici, come ad esempio i policheti, l'accumulo di MP è stato poco studiato.

Tra i policheti bentonici mediterranei, il verme di fuoco *Hermodice carunculata* (Pallas, 1766) è presente in una grande varietà di habitat e negli ultimi anni fenomeni di espansione dell'areale sono stati descritti lungo le coste Tirreniche ed Adriatiche (Righi *et al.*, 2020). Inoltre, soprattutto nelle località in cui questa specie è considerata storicamente presente, la densità delle sue popolazioni è in aumento. In particolare, gruppi numerosi della specie sono frequenti in zone caratterizzate da input di materia organica di provenienza antropica come, ad esempio, aree prossime ad impianti di

acquacoltura e/o soggette a scarichi di rifiuti della pesca (Simonini *et al.*, 2021), aumentando la suscettibilità del verme di fuoco all'ingestione di plastica. *H. carunculata* è un vorace predatore generalista e saprofago, che si nutre di una grande varietà di invertebrati marini morti o in decomposizione (Righi *et al.*, 2020). L'ampia variabilità della sua dieta suggerisce che *H. carunculata* possa ingerire MP in seguito al consumo di prede contaminate da MP.

L'obiettivo di questo studio è determinare il contenuto di MP in esemplari selvatici di *H. carunculata*, al fine di aumentare le attuali conoscenze riguardo l'accumulo di questi inquinanti emergenti nei predatori bentonici del Mar Mediterraneo.

Materiali e metodi – Dopo essere stati raccolti da operatori subacquei lungo la costa ionica della Puglia, gli esemplari di *H. carunculata* sono stati lavati con acqua di mare artificiale (Istant Ocean) filtrata a 0,2 μm per rimuovere possibili MP presenti all'esterno degli organismi. Successivamente gli animali sono stati conservati in Etanolo (EtOH) al 70% all'interno di un barattolo di vetro al riparo dalla luce fino al momento del processamento. In laboratorio, i vermi di fuoco sono stati prelevati singolarmente con pinzette in metallo, avendo cura di non lesionare i tessuti degli animali per evitare di far fuoriuscire parte del contenuto corporeo e perdere così eventuali MP ingerite. Dopo aver misurato la lunghezza totale (cm) e annotato il peso (g) utilizzando una bilancia analitica, ogni esemplare è stato lavato con acqua Milli-Q filtrata e tagliato in più parti per facilitarne la digestione previo trasferimento in una bottiglia di vetro contenente una soluzione di Tripsina al 0,3%. I campioni sono stati quindi incubati in un bagno termostato per 1 ora a 37°C. Successivamente, in ciascuna bottiglia è stata aggiunta H_2O_2 , fino a raggiungere una concentrazione finale del 25% ed i campioni sono stati nuovamente incubati nel bagno termostato a 50°C per 48 ore. Al termine del periodo di incubazione, a ciascun campione è stato aggiunto CH_3COOH fino ad una concentrazione finale del 10%, lasciando a temperatura ambiente per 2 ore. Terminata la digestione della materia organica, i campioni sono stati inizialmente raccolti su un filtro metallico con maglia di 10 μm utilizzando un apparato filtratore in vetro collegato ad una pompa da vuoto. Il materiale depositato sul filtro di metallo è stato raccolto in un becher, lavando accuratamente con acqua Milli-Q filtrata ed EtOH. Successivamente, il contenuto del becher è stato concentrato su un filtro con maglia di 1,2 μm in fibra di vetro (Whatman GF/C, diametro 47 mm). Al termine del processo di filtrazione, tutti i campioni depositati su filtro sono stati conservati in piastre Petri in vetro siglate. Per stimare la possibile contaminazione durante le fasi di digestione e filtrazione, per ogni gruppo di campioni processati sono stati preparati due controlli: il bianco analitico e il bianco procedurale.

I filtri sui quali sono stati concentrati i campioni e i filtri dei bianchi sono stati osservati allo stereomicroscopio (Zeiss, Stemi 2000-C), fotografando tutti i potenziali materiali polimerici, organici/minerali ed eventuali residui riconducibili a prede del verme di fuoco. Le particelle identificate come MP sospette sono state classificate secondo tipologia, dimensione e colore. La misura dei materiali estratti è stata determinata mediante il software per l'analisi di immagine ImageJ (versione 1.53t).

Un sottocampione ($n = 25$) di MP sospette è stato analizzato utilizzando lo spettroscopio micro-Raman LabRAM HR Evolution (Horiba Scientific) accoppiato a un microscopio Olympus BXFM-ILHS disponibile al Centro Interdipartimentale Grandi Strumenti (CIGS) dell'Università di Modena e Reggio Emilia.

Risultati – L'osservazione allo stereomicroscopio dei filtri dei 20 esemplari processati ha permesso di identificare oltre 600 particelle. Di queste, 91 sono risultate essere di natura organica riconducibili a residui di prede digerite. Mediamente, sono stati trovati

4,5 ± 6,7 residui di prede per individuo. La restante parte delle particelle estratte dagli esemplari è invece stata associata alla contaminazione da MP. In seguito alla normalizzazione dei dati con i bianchi analitici e procedurali, il 39,5% delle particelle inizialmente individuate è stato rimosso. Le particelle rimanenti (n = 112) sono state considerate come MP sospette. Sul totale dei vermi di fuoco analizzati, solo in uno non sono state riscontrate MP sospette, mentre in tutti gli altri si sono registrate da 2 a 14 particelle per individuo. La quantità di MP sospette per individuo è risultata maggiore del numero di residui di prede, con in media 5,6 ± 4,2 MP per esemplare analizzato. Le MP sospette estratte dagli esemplari di *H. carunculata* appartenevano a due tipologie: fibre (46%) e frammenti (54%) (Fig. 1a). L'analisi della classe dimensionale ha mostrato che il 64% delle MP sospette era caratterizzato da una lunghezza totale inferiore a 0,5 mm, il 13% era compreso tra 0,5 e 1 mm e il 23% era maggiore di 1 mm (Fig. 1b). In media, le possibili MP individuate misuravano 0,7 ± 1,2 mm, con un massimo di 7,3 mm e un minimo di 0,02 mm. Nello specifico, le fibre erano caratterizzate da una lunghezza media di 1,4 ± 1,4 mm e un diametro medio di 0,02 ± 0,01 mm, mentre i frammenti avevano una lunghezza media inferiore, pari a 0,2 ± 0,4 mm. Le MP sospette sono state inoltre classificate in base ai colori osservati. Il colore più rappresentato era il blu (26%), seguito da verde (20%), grigio (16%), azzurro (8%) e bianco (4%). Colori secondari meno abbondanti, tra cui trasparente, rosa, giallo, viola e marrone, sono stati raggruppati in "altro" (26%), insieme a colori compositi come nero-blu, bianco-blu, rosso-blu, trasparente-blu, bianco-rosso e rosso-nero-blu (Fig. 1c). Relativamente alle due tipologie di MP considerate, la maggior parte delle fibre tessili erano di colore verde, mentre i frammenti erano per lo più di colore grigio.

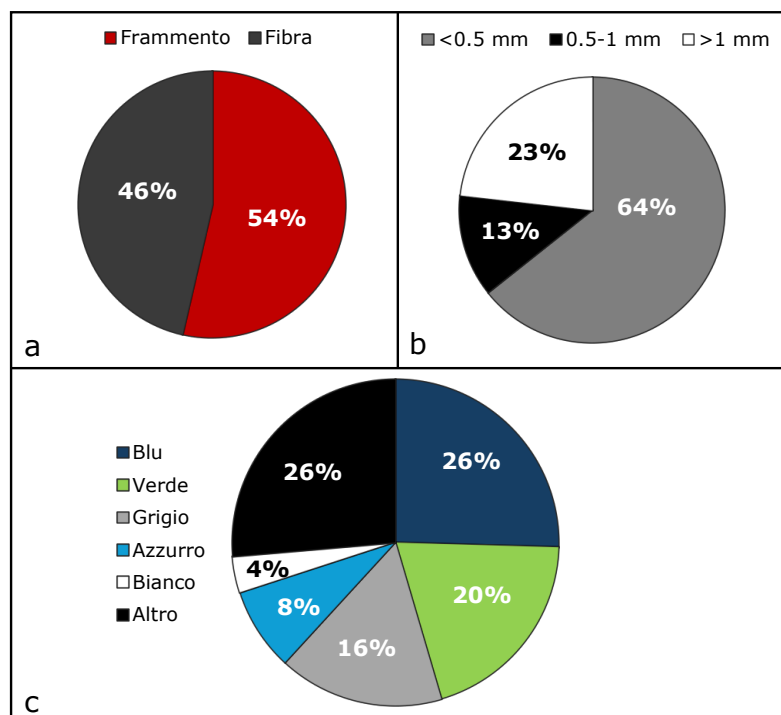


Fig. 1 - Classificazione delle MP sospette estratte dagli esemplari di *H. carunculata* in base alla tipologia (a), alla dimensione (b) e al colore (c).

Classification of suspected MP extracted from *H. carunculata* specimens according to type (a), size (b) and color (c).

Per quanto riguarda la natura chimica delle MP sospette, sono state individuate principalmente tre categorie di polimeri: naturale (24%), semisintetico (36%) e plastica (24%). La restante percentuale di MP sospette, equivalente al 16% delle particelle analizzate, è stata classificata come "non determinato" nei casi in cui la misurazione tramite micro-Raman non sia stata possibile. Nello specifico, i polimeri plastici più abbondanti sono risultati essere il polietilene tereftalato (PET) e il polipropilene (PP).

Conclusioni – I policheti sono considerati importanti "specie sentinella", in quanto buoni indicatori della struttura delle comunità bentoniche e del disturbo ambientale, venendo ampiamente impiegati in studi di biomonitoraggio e di tossicità (Giangrande *et al.*, 2005).

I dati ottenuti in questo studio hanno evidenziato che *H. carunculata* può ingerire e accumulare un elevato numero di MP. Ulteriori campagne di monitoraggio permetteranno di confermare il potenziale ruolo di questo polichete bentonico come bioindicatore dell'inquinamento da MP nelle aree costiere del Mar Mediterraneo. Inoltre, dal momento che il tasso di accumulo ed escrezione delle MP in questa specie non è noto, indagare ulteriormente questo fenomeno analizzando anche la presenza e la tipologia di MP nell'ambiente circostante può fornire informazioni sul potenziale dei vermi di fuoco nel riflettere accuratamente lo stato dell'inquinamento del sito nel momento di prelievo degli esemplari.

Bibliografia

- BOTTERELL Z.L., BEAUMONT N., DORRINGTON T., STEINKE M., THOMPSON R.C., LINDEQUE P.K. (2019) - Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. *Environ. Pollut.*, **245**: 98-110. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.10.065
- CÁSSIO F., BATISTA D., PRADHAN A. (2022) - Plastic Interactions with Pollutants and Consequences to Aquatic Ecosystems: What We Know and What We Do Not Know. *Biomol.*, **12** (6): 798. DOI: 10.3390/biom12060798
- GIANGRANDE A., LICCIANO M., MUSCO L. (2005) - Polychaetes as environmental indicators revisited. *Mar. Pollut. Bull.*, **50** (11): 1153-1162. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2005.08.003
- MARMARA D., KATSANEVAKIS S., BRUNDO M.V., TIRALONGO F., IGNOTO S., KRASAKOPOULOU E. (2023) - Microplastics ingestion by marine fauna with a particular focus on commercial species: a systematic review. *Front. Mar. Sci.*, **10**, 1240969. DOI: 10.3389/fmars.2023.1240969
- RIGHI S., PREVEDELLI D., SIMONINI R. (2020) - Ecology, distribution and expansion of a Mediterranean native invader, the fireworm *Hermodice carunculata* (Annelida). *Medit. Mar. Sci.*, **21** (3): 558-574. DOI: 10.12681/mms.23117
- SHARMA S., SHARMA V., CHATTERJEE S. (2021) - Microplastics in the Mediterranean Sea: sources, pollution intensity, sea health, and regulatory policies. *Front. Mar. Sci.*, **8**: 634934. DOI: 10.3389/fmars.2021.634934
- SIMONINI R., RIGHI S., ZANETTI F., FAI S., PREVEDELLI D. (2021) - Development and catch efficiency of an attracting device to collect and monitor the invasive fireworm *Hermodice carunculata* in the Mediterranean Sea. *Medit. Mar. Sci.*, **22** (3): 706-714. DOI: 10.12681/mms.26916
- UGWU K., HERRERA A., GÓMEZ M. (2021) - Microplastics in marine biota: A review. *Mar. Pollut. Bull.*, **169**: 112540. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2021.112540