



Venezia2021

**Programma di ricerca scientifica
per una laguna “regolata”**

Linea 2.1

***Qualità del sedimento lagunare a supporto
della sua gestione sostenibile***

Rapporto Finale

Periodo 01/11/2018 - 30/06/2022

Elena Semenzin (UNIVE-DAIS)

3/12/2022

Elena Semenzin

EXECUTIVE SUMMARY

1. Principali risultati emersi dalla Linea riferiti agli obiettivi iniziali

Di seguito vengono riportati i principali risultati per ciascun obiettivo iniziale previsto da progetto.

- a) *supportare la revisione e la fase di sperimentazione della nuova normativa per la gestione dei sedimenti lagunari (attualmente in fase di sviluppo) da cui dipendono le ipotesi gestionali relative alla movimentazione del sedimento.*

L'applicazione di un approccio Weight of Evidence (WoE) a un caso studio di canale navigabile lagunare ha dimostrato come l'integrazione delle evidenze di effetto e di esposizione (chimica, bioaccumulo, bioassays, biomarkers e trascrittomiche) possa aiutare a ottenere un quadro complessivo più accurato della qualità del sedimento rispetto a quello basato soltanto sulla caratterizzazione chimica. Nell'ottica di considerare il materiale prodotto dall'escavo di fondali marini e salmastri come una "risorsa" da recuperare e riutilizzare, un ventaglio composto da cinque classi di pericolo derivate da un quoziente numerico (Hazard Quotient, HQ) porta a una classificazione più dettagliata, rendendo così possibile discriminare situazioni che rischierebbero di risultare simili tra loro.

- b) *effettuare una prima valutazione dei possibili effetti cronici legati alla presenza di miscele di contaminanti nei sedimenti ed approfondire i possibili nessi di causalità tra esposizione ai contaminanti ed effetti acuti, subcronici e cronici.*

I test di tossicità hanno evidenziato la presenza di tossicità acuta nei confronti degli anfipodi (*Grandidierella japonica*) in tutto il canale Vittorio Emanuele III, mentre effetti significativi sullo sviluppo larvale di copepodi (*Acartia tonsa*) e bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*) sono stati rilevati sia nel canale Vittorio Emanuele III sia nel canale San Felice. Gli effetti a lungo termine nei confronti degli anfipodi (*Monocorophium insidiosum*) hanno riguardato tanto la sopravvivenza, quanto il tasso di crescita ed il raggiungimento della maturità sessuale e sono risultati particolarmente marcati nei sedimenti della seconda campagna.

- c) *analizzare il possibile contributo della frazione ultrafine del sedimento risospeso alla distribuzione di contaminanti tra i vari comparti ambientali e alla tossicità per gli organismi lagunari.*

I saggi di tossicità sono stati condotti sia con a) *A. fischeri* sulla frazione più fine del sedimento risospeso, che con b) *A. fischeri*, *A. tonsa* e *M. galloprovincialis* sulla frazione prevalentemente mineralogica del medesimo materiale, separato in tre diversi range dimensionali, al fine di comprendere il ruolo della dimensione delle particelle nell'indurre effetti avversi in tali specie target. Dall'insieme dei risultati ottenuti si può ipotizzare che la frazione ultrafine di per sé sia poco rilevante in termini di effetti sulle specie testate, mentre potrebbe essere maggiormente rilevante il suo ruolo come carrier di potenziali inquinanti presenti nel comparto acquatico.

- d) *creare delle mappe dei sedimenti della laguna basate sul potenziale metabolico dei microorganismi (dati di metagenoma) per geni legati ai metalli pesanti e agli inquinanti in generale, associati alla quantificazione dei flussi di carbonio nell'interfaccia acqua-sedimento.*

Le analisi hanno mostrato una chiara distribuzione spaziale delle altamente diverse comunità microbiche dei sedimenti dei diversi sottobacini della laguna di Venezia, principalmente a causa dei taxa poco abbondanti (biosfera rara). Salinità, granulometria e concentrazione di carbonio organico totale si sono dimostrati essere fattori determinanti nel plasmare la struttura delle comunità. L'approccio metagenomico ha permesso per la prima volta di valutare i potenziali pathways metabolici dei microorganismi lagunari. Sia a livello di ecosistema che di microscala e relativamente ai principali cicli biogeochimici, sottili ma significative differenze sono state rilevate tra i diversi siti. Lo studio e la mappatura delle funzioni legate all'impatto antropico hanno evidenziato come le aree cronicamente

inquinata siano da considerarsi hotspot per i geni di resistenza ad antibiotici e metalli pesanti, con implicazioni sulla gestione dei sedimenti in laguna.

- e) *integrare in via esplorativa nella valutazione della qualità del sedimento secondo un approccio Weight-of-Evidence i risultati di analisi genomiche in specie sentinella (*R. philippinarum*). Questo approccio potrà essere di estrema utilità per valutare i) la qualità del sedimento in aree per cui è richiesta la classificazione o il monitoraggio durante lo svolgimento di specifiche attività/modificazioni; ii) i possibili effetti/impatti del funzionamento del MOSE sulle attività produttive.*

È stato messo a punto un metodo innovativo di elaborazione dei dati trascrittomici che permette la derivazione di un "indice di pericolo trascrittomico" ("Transcriptomic Hazard Index" - THI) in grado di valutare non solo la severità delle alterazioni a livello di regolazione nell'espressione genica, ma anche la rilevanza di tali alterazioni in termini di reazione fisiologica dell'organismo. Il THI, utile a classificare le situazioni di alterazione genomica in cinque classi di pericolo (da assente a grave), ha permesso di aggiungere un'ulteriore linea di evidenza nella caratterizzazione dei sedimenti secondo un approccio Weight of Evidence (WoE). Nonostante i dati trascrittomici siano in grado di indicare gli effetti precoci negli organismi a seguito di un'esposizione a contaminanti, ulteriori applicazioni e verifiche sono necessarie al fine di una calibrazione ottimale dalla metodologia WoE.

- f) *identificare eventuali fattori di stress causati direttamente o indirettamente dal funzionamento del MOSE sulle produzioni di molluschi bivalvi anche mediante l'utilizzo di biosensori.*

Sono state condotte due campagne di monitoraggio su 4 siti di allevamento di vongole filippine *Ruditapes philippinarum* e due aree di allevamento di mitili *Mytilus galloprovincialis*. È stato quindi impiegato un approccio multidisciplinare che ha permesso i) la raccolta di parametri chimico-fisici caratterizzanti i diversi siti grazie all'installazione di 3 sonde multiparametriche; b) l'utilizzo di biosensori nei mitili volti alla raccolta di informazioni sulla filtrazione di questi animali; c) l'analisi cellulare, biochimica e molecolare in animali raccolti in diverse stagioni per due anni; d) la caratterizzazione del microbiota degli animali; e) la raccolta di informazioni biometriche e sulla mortalità. Complessivamente i dati raccolti hanno permesso di caratterizzare le diverse aree e di fornire linee guida volte a migliorare le produzioni e ridurre la mortalità. Nonostante il ritardo nell'entrata in funzione del MOSE abbia permesso di ottenere pochi confronti tra il periodo antecedente e successivo al suo funzionamento, non sono state evidenziate particolari differenze tra i due periodi, sia nei parametri ambientali che nella crescita e mortalità delle vongole e dei mitili. I risultati delle analisi molecolari, biochimiche, cellulari e fisiologiche hanno tuttavia messo in evidenza criticità importanti nelle aree più prossime alla bocca di porto (in particolare nel primo anno di monitoraggio), così come una maggior omogeneità tra le diverse aree di allevamento nel periodo successivo dell'entrata in funzione del MOSE.

2. Tre risultati concreti divulgabili ai decisori politici/ pubblico generico

2.1 Valutazione della tossicità acuta e cronica attraverso bioassay, biomarkers and omics

Il sedimento prelevato dal Canale Vittorio Emanuele III è caratterizzato da tossicità acuta variabile da media ad alta, mentre gli effetti sugli stadi larvali di bivalvi e copepodi e la tossicità cronica nei confronti degli anfipodi sono estremamente elevati, nonostante delle significative variazioni stagionali, emerse tanto per i copepodi, quanto per gli anfipodi. Le analisi trascrittomiche effettuate su vongole filippine esposte ai sedimenti campionati hanno messo in evidenza modificazioni di importanti pathway molecolari coinvolte nella regolazione della proliferazione cellulare (es. p53 pathway) e nello sviluppo, in particolare nei siti prossimi al polo industriale. Questo indica un'importante tossicità del sedimento per questi animali di rilevanza economica ed ecologica per la laguna di Venezia. I risultati evidenziano come, oltre all'analisi degli effetti di tipo acuto, sia fondamentale indagare gli effetti per esposizioni croniche (più frequenti in ambienti naturali rispetto a quelle acute) e a diversi livelli biologici (organismo, cellula e DNA).

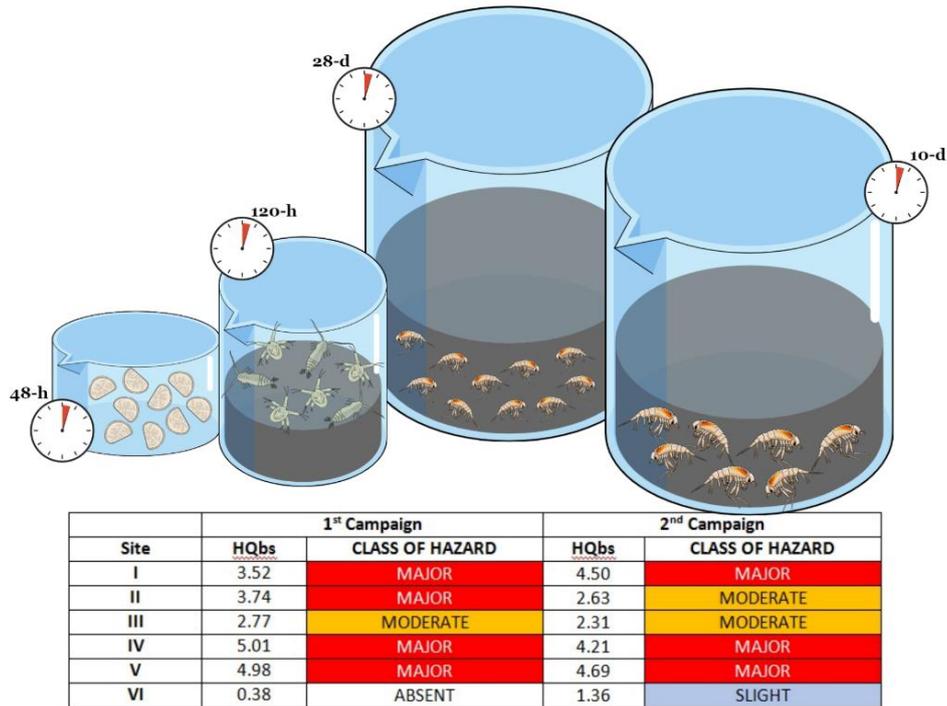


Figura 1. Risultati dei bioassays elaborati secondo l'approccio WoE.

2.2 Mappe dei sedimenti della laguna basate sul potenziale metabolico delle comunità microbiche

Dallo studio dei metagenomi, le aree cronicamente inquinate (Marghera e Tresse) sono risultate hotspot di geni legati alla resistenza agli antibiotici e ai metalli pesanti. La mobilitazione del sedimento da queste aree potrebbe portare alla diffusione e all'accumulo di questi tratti genetici. Dato che la contaminazione dei sedimenti ha effetti estesi e duraturi sulle comunità microbiche (che possono influenzare anche i livelli trofici più alti), la sua riduzione dovrebbe essere di primaria importanza per l'ecosistema lagunare al fine di prevenire fonti secondarie di contaminazione e ridurre i potenziali rischi per l'ambiente e la salute.

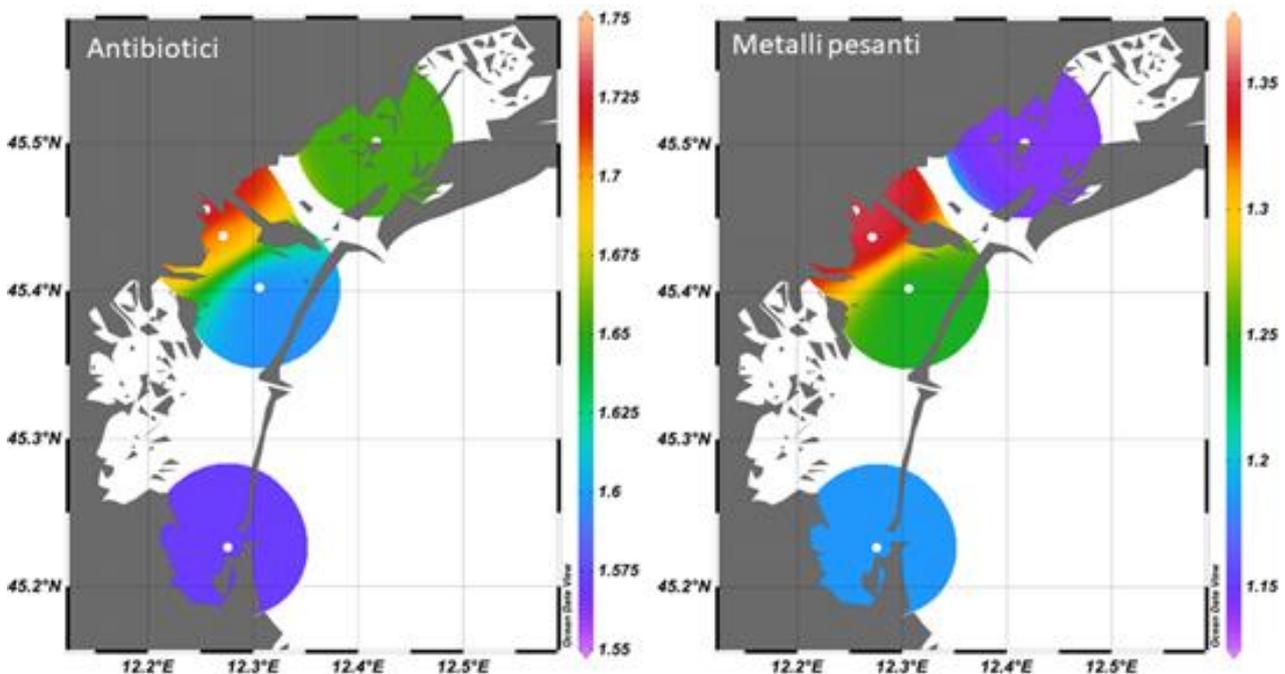


Figura 2. Abbondanza relativa media dei geni che codificano per tratti di resistenza.

2.3 Approccio Weight of Evidence integrante anche la linea di evidenza trascrittomicca

L'applicazione di una metodologia di valutazione basata sull'approccio Weight of Evidence (WoE) ha permesso di confermare l'importanza di integrare informazioni provenienti da più ambiti per una migliore caratterizzazione del rischio associato ai sedimenti contaminati. Tale metodologia prevede l'utilizzo di informazioni eterogenee organizzate in "linee di evidenza" (Line of Evidence, LoE) e la loro successiva integrazione al fine di derivare un quoziente di pericolo (HQ) e una classe (da *absent* a *severe*) per l'intera matrice sedimento. Oltre alle informazioni derivate dalla caratterizzazione chimica (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V, Zn, IPA, PCDD PCDF, PCB, esaclorobenzene, idrocarburi leggeri e pesanti e composti organostannici) del sedimento e del bioaccumulo negli organismi (*R. philippinarum*), dall'analisi di biomarkers (sempre in vongole filippine), e dall'uso di saggi ecotossicologici con diverse specie lagunari, è stata messa a punto una metodologia innovativa per tradurre in un indice quantitativo (integrabile nel WoE) le alterazioni nei profili di espressione genica di organismi acquatici esposti ai sedimenti contaminati. La metodologia WoE è stata applicata con successo sia per la valutazione della qualità dei sedimenti profondi lungo il canale Vittorio Emanuele III (considerando il tipico scenario di dragaggio del fondale di canali navigabili e successiva movimentazione), che per comparare le condizioni del sedimento superficiale in aree di allevamento di molluschi nei pressi di Chioggia.

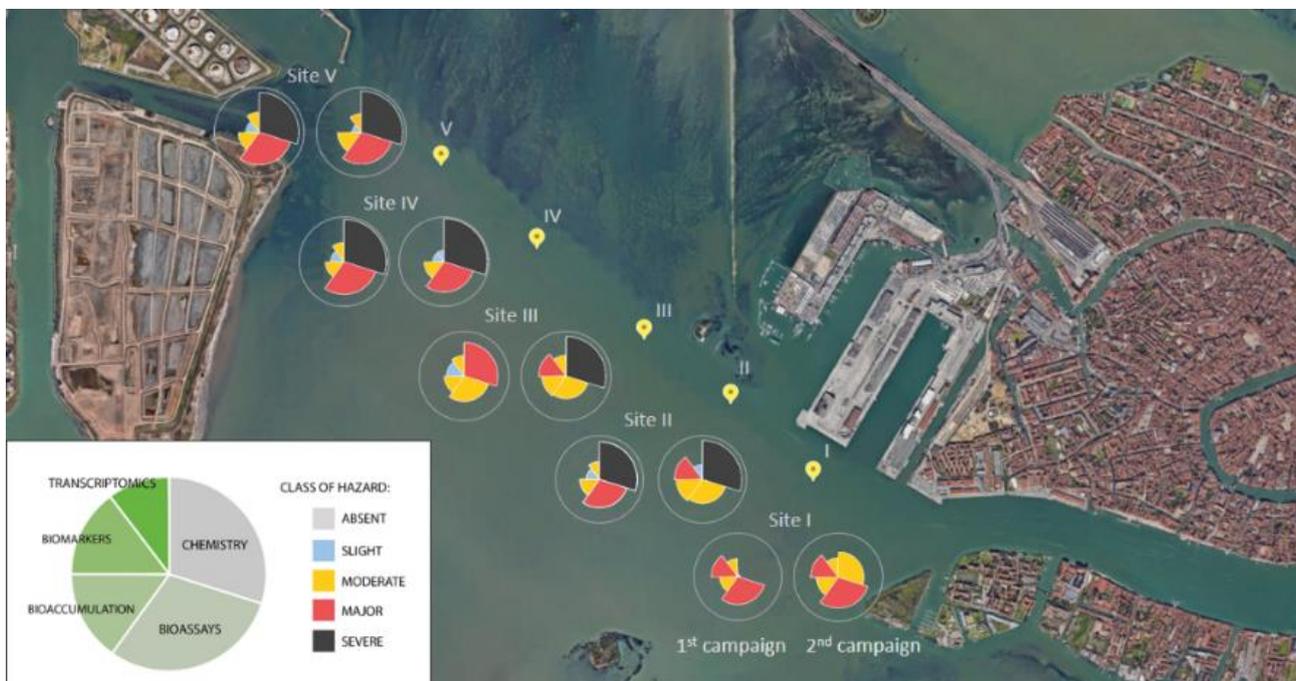


Figura 3. Risultato della valutazione della qualità dei sedimenti lungo il canale Vittorio Emanuele III per le due campagne.

3. Spunti per il futuro

Gli spunti sono riportati in relazione agli obiettivi del progetto (si veda la sezione 1 per l'elenco):

a/e) L'utilizzo di una metodologia integrata WoE a supporto della definizione di una nuova normativa nell'ambito della gestione dei sedimenti da escavo necessita di ulteriori applicazioni per testare l'affidabilità del metodo col fine di tradurre le classi di pericolo in concrete azioni di movimentazione e gestione dei sedimenti. In un'ottica più generale di sviluppo futuro, nelle applicazioni *in situ* del WoE è auspicabile l'elaborazione di un metodo per la valutazione della qualità del sito di controllo, un aspetto che faciliterebbe una più robusta inclusione della linea di evidenza trascrittomicca nel ventaglio di indagini il cui utilizzo è già consolidato. Si ritiene inoltre utile, al fine di una migliore caratterizzazione del rischio, un approfondimento sull'influenza che i processi idrodinamici e di trasporto dei sedimenti esercitano sulla

qualità chimica dei sedimenti e sulla biodisponibilità dei contaminanti, sia nei canali navigabili che nelle zone di basso fondale (ad esempio le aree di allevamento di bivalvi) soggetti a diverse dinamiche di deposizione e risospensione.

b) I dati di tossicità cronica in Laguna sono scarsi rispetto alla mole di informazioni relative agli effetti acuti e sugli stadi larvali. Appare quindi opportuno aumentare il monitoraggio degli effetti cronici al fine di predisporre dei piani di gestione a lungo termine dell'ambiente lagunare.

c) Ulteriori studi con altri organismi bersaglio potrebbero supportare le conclusioni relative al ruolo della frazione ultrafine come carrier di inquinanti, ma è importante sottolineare che lo sviluppo di protocolli per condurre saggi di tossicità con questo tipo di matrici ambientali è particolarmente complesso, come è stato osservato per i saggi di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis*.

d) I dati prodotti consentiranno di produrre Metagenome-Assembled Genomes (MAGs), ossia dei genomi individuali ricostruiti dai dati metagenomici. I MAGs, combinando tassonomia, filogenesi e funzioni, consentiranno il rilevamento e la stima dell'abbondanza di specifici taxa e dei loro potenziali metabolici, migliorando la comprensione dei membri della comunità procariotica dei sedimenti della laguna di Venezia. Analisi preliminari hanno permesso di identificare oltre 50 MAGs non ridondanti di media e alta qualità e completezza, con un'ampia diversità in termini tassonomici (soprattutto nei Proteobacteria) e funzionali.

f) Continuare ad effettuare campagne di monitoraggio nelle aree di allevamento di molluschi bivalvi. Negli ultimi vent'anni si è infatti assistito ad una drastica riduzione degli stock naturali e di allevamento di vongole filippine, con importanti ricadute economiche per l'intero settore. I motivi di questo declino non sono tutt'ora chiari pur avendo importanti indicazioni, anche dalle campagne effettuate durante il progetto, sul ruolo del cambiamento climatico in atto ed in particolare sulle sempre più frequenti ondate di calore e l'aumento della salinità. L'attivazione sempre più frequente delle barriere potrebbe comportare modificazioni importanti nei parametri chimico-fisici di queste aree con importanti ripercussioni sugli animali, con la necessità di fornire nuove linee guida sito-specifiche rivolte ai diversi processi di semina e ingrasso degli animali.

DESCRIZIONE ESTESA

4. Descrizione delle attività

Inventario delle informazioni disponibili e determinazione dei valori di fondo

Durante la fase iniziale del progetto, tutti i partner hanno contribuito alla realizzazione di un inventario delle conoscenze disponibili per la laguna di Venezia in relazione alle tematiche di interesse per la Linea 2.1. In particolare, l'obiettivo principale era quello di fornire un'analisi critica delle informazioni disponibili su: i) i valori di fondo dei contaminanti inorganici nella laguna di Venezia; ii) la qualità delle acque e dei sedimenti superficiali e profondi; iii) il ruolo del sedimento come sorgente secondaria di contaminazione.

Sono stati in primo luogo identificati tutti i progetti di ricerca e le attività di monitoraggio della qualità ambientale che hanno interessato la laguna di Venezia realizzati da enti di ricerca e autorità locali nel periodo 1998-2017. Inoltre, sono state condotte ricerche bibliografiche mirate per selezionare pubblicazioni rilevanti per i temi di interesse della Linea 2.1 e poterne tracciare lo stato dell'arte, identificare eventuali carenze conoscitive e meglio focalizzare le attività di ricerca previste nella Linea.

Per quanto riguarda la determinazione dei valori di fondo, la ricerca bibliografica si è focalizzata su pubblicazioni scientifiche che riportavano dati relative alla distribuzione spaziale delle concentrazioni di metalli in laguna di Venezia ricavati dall'analisi di carote di sedimento radiodatate. I dati selezionati sono stati inclusi in due dataset, relativi alle concentrazioni di metalli precedenti l'anno 1910 (considerate come l'inizio delle attività industriali a Porto Marghera) e successive al 1910, rispettivamente. Per ciascun metallo è stata calcolata il valore medio di concentrazione sia considerando i dati nel loro complesso, sia suddividendoli per aree (bacini settentrionale, centro-nord, centrale e meridionale) e per morfologia dell'area di prelievo della carota di sedimento (bassofondale o barena). I dati relativi al periodo pre-industriale sono stati successivamente elaborati secondo il metodo proposto da Matschullat e colleghi (2000)¹ per stimare, per ciascun metallo, un valore di concentrazione pre-industriale corrispondente a "the upper bound of the sub-dataset variability (i.e. the "2 σ -pIC"), defined by the mean+2 σ ".

Valutazione della qualità dei sedimenti per fini gestionali legati alla loro movimentazione

Al fine di completare e migliorare il quadro conoscitivo esistente relativo alla qualità dei sedimenti dei canali navigabili interessati da operazioni di dragaggio, sono state realizzate nuove indagini sperimentali riguardanti vari aspetti (o "linee di evidenza"): la contaminazione chimica, gli effetti ecotossicologici su diversi organismi acquatici, la potenzialità di bioaccumulo e gli effetti a livello di biomarker e di genomica in vongola filippina. L'obiettivo finale di questa attività era quello di stimare la qualità del sedimento dei canali navigabili attraverso l'integrazione dei dati generati, secondo una metodologia integrata per la valutazione del rischio basata sull'approccio Weight of Evidence.

Sono stati realizzati due campionamenti di sedimento, a novembre 2020 e marzo 2021, che hanno in entrambi i casi interessato 5 siti lungo il canale Vittorio Emanuele III (numerati progressivamente dal centro storico di Venezia-sito I- all'area industriale di Porto Marghera-sito V-) e un sito nel Canale San Felice (sito VI), quest'ultimo selezionato come sito di riferimento sulla base dei risultati di indagini pregresse. L'attività ha previsto il prelievo di 5 fustelle da 1 m dal piano fondale per ciascun sito e tempo di campionamento.

La caratterizzazione della contaminazione chimica del sedimento prelevato ha previsto le analisi delle concentrazioni totali di nove metalli (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V, Zn) da parte del Dip. UNIVE-DAIS, oltre alle analisi dei contaminanti organici (IPA, diossine e furani, PCB, esaclorobenzene, idrocarburi alifatici e composti organostannici), queste ultime realizzate da un laboratorio esterno.

¹ Matschullat J, Ottenstein R, Reimann C (2000) Geochemical background – can we calculate it? Environ Geol 39:990–1000. <https://doi.org/10.1007/s002549900084>

La caratterizzazione mediante saggi ecotossicologici ha previsto l'utilizzo di una suite di quattro bioassays, ovvero: un test di tossicità acuta sul sedimento tal quale con l'anfipode *Grandidierella japonica* (valutazione del tasso di mortalità), un test di tossicità sub-cronica all'interfaccia acqua-sedimento con il copepode *Acartia tonsa* (test di sviluppo larvale), un test di tossicità sub-cronica sull'elutriato con il mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis* e un test di tossicità cronica sul sedimento tal quale con l'anfipode *Monocorophium insidiosum* (valutazione del tasso di mortalità, del tasso di crescita giornaliero e del raggiungimento di maturità sessuale).

Per la valutazione del bioaccumulo, le analisi dei biomarker e le analisi trascrittomiche, parte del sedimento campionato nelle due campagne è stato trasferito presso il Dipartimento di Biologia (UNIPD) al fine di effettuare le esposizioni controllate di vongole filippine *R. philippinarum*. Sono state effettuate due esposizioni, la prima nel mese di gennaio 2021 e la seconda nel mese di maggio 2021 e in entrambi i casi sono state campionati dei pool di vongole dopo 3 e 14 giorni. Da queste sono state prelevate la ghiandola digestiva, le branchie e l'emolinfa al fine di poter effettuare: i) le analisi molecolari volte ad indagare alterazioni nei profili di espressione genica ed eventuali cambiamenti nelle comunità microbiche; ii) le analisi cellulari e biochimiche, in particolare la valutazione di biomarcatori immunologici, dell'attività di vari enzimi indicativi dello stress ossidativo, della capacità di detossificazione e della neurotossicità. Al termine dell'esposizione sono stati inoltre campionati corpi interi di vongole per valutare il bioaccumulo di inquinanti organici (da parte del Centro Studi Microinquinanti Organici di Voltabarozzo) e di metalli (da parte di UNIVE-DAIS).

Ai fini dell'integrazione di tutte le evidenze sperimentali raccolte in un quadro valutativo unitario, è stata adottata una metodologia per la valutazione del rischio basata sull'approccio Weight of Evidence, mutuata da Regoli et al. (2019)² e Piva et al. (2011)³. Tale metodologia prevede l'utilizzo di informazioni eterogenee organizzate in "linee di evidenza" (Line of Evidence, LoE) e la loro successiva integrazione al fine di derivare un quoziente di pericolo (HQ) e una classe (da *absent* a *severe*) per l'intera matrice sedimento. Nel corso del progetto è stato sviluppato un indice quantitativo (Transcriptomic Hazard Index, THI) per consentire l'integrazione dei risultati delle analisi trascrittomiche nella metodologia WoE. Il THI prevede di utilizzare i risultati delle analisi trascrittomiche su organismi acquatici esposti a sedimento potenzialmente inquinato (in laboratorio o in ambiente) ottenuti attraverso la Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Una serie di algoritmi permette di tradurre l'entità delle variazioni rilevate in set di geni (raggruppati in categorie biologiche) in un indice quantitativo di pericolo che considera la rilevanza relativa delle categorie biologiche considerate sulla base della "gravità" degli effetti che riflettono. Il valore finale del THI (sulla scala numerica 0-1000) viene poi classificato secondo 5 classi di pericolo, permettendo di ottenere una valutazione sintetica della rilevanza degli effetti rilevati a livello genomico.

La metodologia di valutazione WoE, ampliata con la LoE Trascrittomica, è stata applicata ai risultati delle indagini sperimentali sui sedimenti del canale Vittorio Emanuele III, ai fini di ottenere per ciascuna delle due campagne di indagine una valutazione integrata della qualità del sedimento. La metodologia prevede che i risultati di ciascuna LoE siano innanzitutto normalizzati su una scala comune (0 – 100) e poi integrati attraverso una media pesata, dove il peso di ciascuna LoE è definito in base alla rilevanza e affidabilità dei dati forniti.

Sono state inoltre condotte altre due attività i cui risultati non hanno trovato una diretta integrazione nella metodologia di valutazione WoE.

² Regoli, F.; d'Errico, G.; Nardi, A.; Mezzelani, M.; Fattorini, D.; Benedetti, M.; Di Carlo, M.; Pellegrini, D.; Gorbi, S. Application of a Weight of Evidence Approach for Monitoring Complex Environmental Scenarios: the Case-Study of Off-Shore Platforms. *Front. Mar. Sci.* 2019, 6:377. doi: 10.3389/fmars.2019.00377.

³ Piva, F.; Ciaprini, F.; Onorati, F.; Benedetti, M.; Fattorini, D.; Ausili, A.; Regoli, F. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: a practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere*, 2011, 83 (4):475-85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.064>.

La prima riguarda lo studio della geospeciazione dei metalli nei campioni di sedimento, ovvero la loro ripartizione tra diverse forme chimiche/frazioni, che si distinguono le une dalle altre per differente bioaccessibilità, mobilità, e quindi biodisponibilità per il biota, tramite una procedura di estrazione sequenziale (SEP) che ha permesso di identificare quattro frazioni degli elementi in traccia (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V, Zn) presenti nel sedimento, dalla più bioaccessibile e più mobile a quella residuale ed inerte. Le analisi di geospeciazione hanno riguardato i sedimenti prelevati nelle due campagne di campionamento, sia al tempo iniziale sia alla fine dell'esposizione nei test di bioaccumulo (dopo 14 giorni).

La seconda fa riferimento alla stima del bioaccumulo di selezionanti contaminanti organici ed inorganici in *R. philippinarum* attraverso l'utilizzo del modello di bioaccumulo incluso nel toolbox "MERLIN-Expo", in modo da poter supportare e fornire informazioni complementari agli esperimenti di bioaccumulo in vongole filippine esposte in condizioni controllate a diversi campioni di sedimento estratti nel canale Vittorio Emanuele III. Dopo una fase preliminare di revisione di alcuni parametri del modello per migliorarne le performance rispetto a precedenti applicazioni, il modello "Invertebrato acquatico" è stato applicato per un set di contaminanti organici ed inorganici per simulare l'esposizione di vongole a sedimenti contaminati in condizioni controllate. È stata realizzata inoltre un'analisi di sensibilità al fine di identificare i parametri che giocano un ruolo significativo nella stima modellistica ed identificare la necessità di ulteriori approfondimenti sperimentali.

Studio del sedimento lagunare come sorgente secondaria di contaminazione

Studio relativo ai processi all'interfaccia acqua-sedimento

Nel 2019 e 2020 sono stati svolti prelievi di sedimento stagionali con carotaggi e benne in triplicato in cinque stazioni (Figura 4) caratterizzate da diversi livelli di pressione antropica e distribuite nei quattro sottobacini della Laguna di Venezia. L'obiettivo era lo studio della diversità, delle dinamiche e dei processi metabolici delle comunità microbiche all'interfaccia acqua-sedimento.

I campioni di sedimento sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche, chimiche, fisiche e genetiche (Figura 4). Le analisi genetiche (con 16S rDNA metabarcoding e metagenomica) sono state utilizzate per la stima dell'abbondanza, della diversità e dei metabolismi microbici (Banchi et al. 2021⁴).

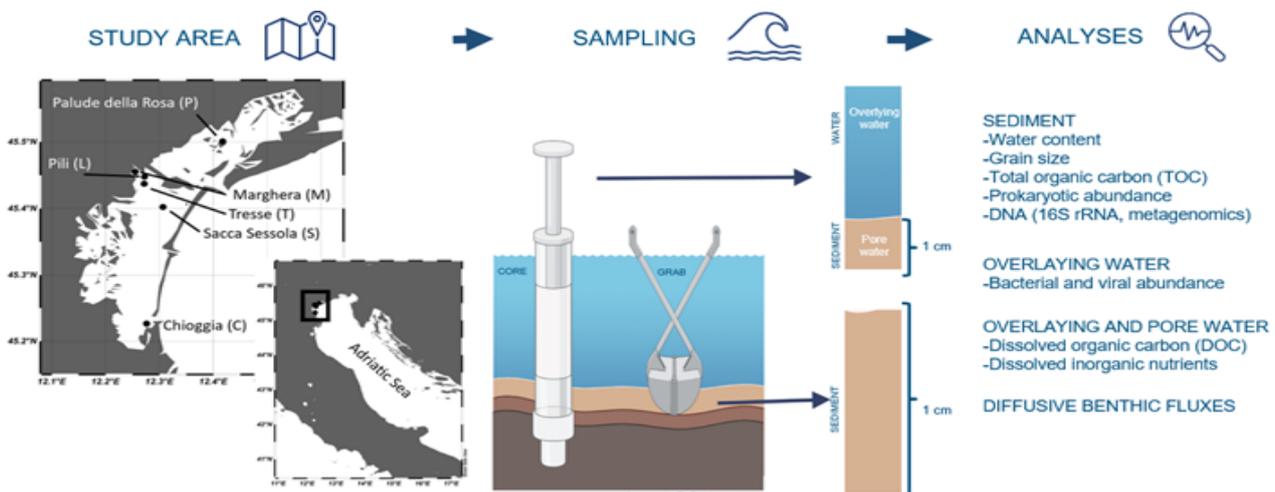


Figura 4. Area di studio, strategie di campionamento e analisi eseguite sui 5 siti lagunari. Mappa creata con Ocean Data View.

⁴ Banchi E., Del Negro P., Celussi M., & Malfatti F. (2021) Sediment Features and Human Activities Structure the Surface Microbial Communities of the Venice Lagoon. *Frontiers in Marine Science*, 8:1900. doi: 10.3389/fmars.2021.762292.

Il DNA è stato estratto dal sedimento con il DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen) e valutato per qualità e quantità.

Per il DNA metabarcoding, è stata amplificata la regione V4-V5 del gene 16S rRNA con i primer 515-Y e 926R. Le librerie sono state preparate seguendo il protocollo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation e corse su un sistema MiSeq Illumina per una read length di 2×250 bp presso ARGO Open Lab, Area Science Park di Trieste. Le analisi bioinformatiche sono state eseguite con QIIME2 2020.6 e R v. 4.0.3. Sono stati calcolati gli indici di alpha (in ogni campione) e beta diversità (tra campioni) e la tassonomia è stata assegnata con il database Silva v. 138. Sono state anche valutate le firme microbiche di batteri fecali e associati alle acque reflue. Le differenze tra le abbondanze relative dei taxa sono state calcolate con ANOVA e un test post-hoc Tukey-Kramer. Per esplorare l'effetto delle caratteristiche ambientali (temperatura, salinità, granulometria e TOC) sulle comunità microbiche, è stata utilizzata un'analisi di ridondanza basata sulla distanza (dbRDA).

Per i metagenomi, le librerie sono state preparate seguendo il protocollo Illumina Nextera DNA Flex Library Prep e corse su un sistema Illumina NovaSeq 6000 per una read length di 2×300 bp presso ARGO Open Lab, Area Science Park di Trieste. Il numero e la qualità delle reads sono stati controllati con FastQC. Le reads sono state assemblate in contigs utilizzando MEGAHIT-1.2.9, combinando le tre repliche di ciascun campione dopo aver verificato la significatività delle loro correlazioni. La gene prediction è stata eseguita con Prodigal 2.6.3 e i geni sono stati annotati con il Metagenome Analysis Rapid Annotation using Subsystem Technology (MG-RAST) utilizzando il database SEED Subsystem e la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Le annotazioni SEED e KEGG sono state normalizzate su recA prima di calcolare le abbondanze relative dei geni. I principali metabolismi del sedimento sono stati esplorati per avere una panoramica sui principali processi e cicli biogeochimici presenti a livello di ecosistema. È stata inoltre elaborata una lista funzioni per esplorare il potenziale microbico a livello di microscala. Le differenze tra le abbondanze relative dei geni sono state calcolate con ANOVA e con un test post-hoc Tukey-Kramer.

Studio della frazione ultrafine del sedimento

In merito allo studio della frazione ultrafine del sedimento ($\leq 4 \mu\text{m}$), l'attività di ricerca ha previsto, in primo luogo, uno screening della letteratura esistente al fine di mettere a punto una procedura per l'estrazione della frazione ultrafine dal sedimento prelevato in due siti nella Laguna di Venezia (San Giuliano -SG- e Fusina -FU-). In base alle informazioni raccolte, è stato possibile sviluppare un metodo (Figura 5) idoneo al trattamento del campione ed estrazione della frazione ultrafine del sedimento ai fini della sua valutazione ecotossicologica, con il duplice obiettivo di: 1) estrarre maggiore frazione ultrafine possibile dal sedimento e 2) alterare nel minor modo possibile le caratteristiche sia geo-morfologiche che biologiche.

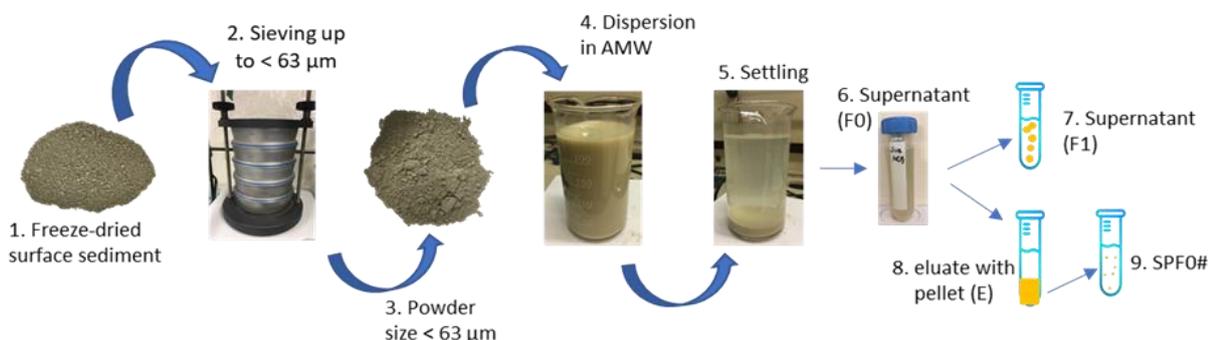


Figura 5. Procedura di estrazione della frazione ultrafine del sedimento superficiale: 1) liofilizzazione del sedimento superficiale; 2) Setacciatura fino a $< 63 \mu\text{m}$; 3) Frazione di polvere più fine con una dimensione delle particelle $< 63 \mu\text{m}$; 4) Dispersione della frazione più fine in acqua marina artificiale (AMW), agitando per 1h; 5) Decantazione per 30 min, sifonando il supernatante (denominato F0); 6) dispersione F0; 7) Dispersione F1, dopo centrifugazione di F0 a 221 forza centrifuga relativa (RCF) per 8 minuti; 8) Eluato (E), dopo centrifugazione a 12229 RCF per 10 min, con pellet sul fondo; 9) il pellet è stato quindi estratto e risospeso in un nuovo AMW e denominato SPFO#.

Tale metodo ha permesso di ottenere diversi sub-campioni, successivamente testati da un punto di vista ecotossicologico valutando l'inibizione alla bioluminescenza di *A. fischeri*.

Poiché questo primo test non ha permesso di discriminare al meglio se la dimensione della frazione ultrafine fosse la principale responsabile dell'inibizione della bioluminescenza, è stato deciso di testare le diverse frazioni dimensionali del sedimento dopo averle opportunamente trattate in modo che fossero prive di contaminanti.

A tale scopo è stato sviluppato il procedimento in Figura 6, che ha previsto di disperdere il campione originario (rapporto di circa 100 g per litro di soluzione) in successione in: 1) acqua deionizzata; 2) soluzione esametafosfato + NaCO₃ (rispettivamente 35 g e 7 g per litro); 3) soluzione di NaOH 0.5 M; 4) Acetone tecnico; 5) soluzione di H₂O₂ al 20% e 6) soluzione di Na-EDTA 0.5 M e acido citrico 0.5 M, tamponata a pH 6. Questo approccio di pretrattamento è stato sviluppato con l'obiettivo di ottenere una progressiva rimozione del liquido interstiziale (passaggi 1 e 2, con l'uso di esametafosfato per aumentare la dispersione delle particelle di sedimento), della fase organica (fasi 3, 4 e 5) e degli elementi inorganici. In seguito, il materiale è stato sottoposto ad un lavaggio finale con acqua distillata. Il medesimo procedimento è stato applicato sia ad un campione di terra di diatomee commestibile (DE) che ad un campione di caolinite (KA), utilizzati come materiali di riferimento privi di contaminanti.

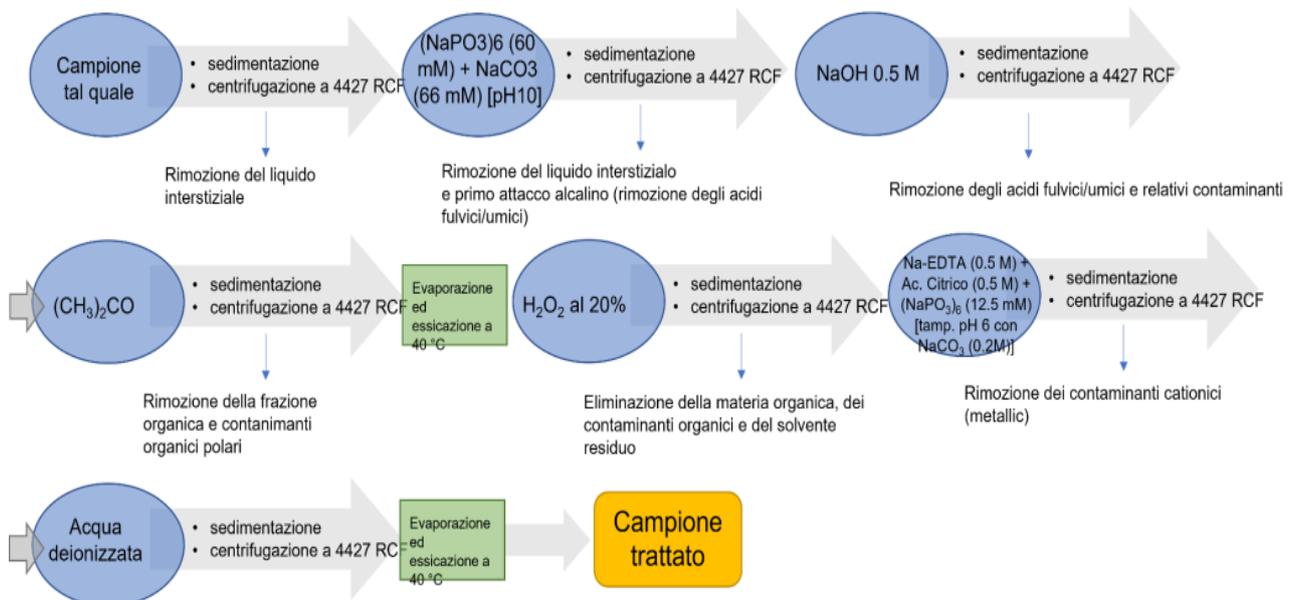


Figura 6. Fasi del trattamento dei campioni per l'eliminazione di contaminanti.

A seguito di tale procedura, il campione di sedimento superficiale è stato trattato come mostrato in Figura 7 per ottenere la massima quantità di frazione fine: 1) dispersione e miscelazione del campione in acqua deionizzata in un contenitore cilindrico dotato di rubinetti a diverse altezze; 2) recupero dei materiali non sedimentati dopo 1 h dalla dispersione mediante setacciatura a 20 µm ($\emptyset < 20 \mu\text{m}$ - Frazione Leggera, LF); 3) preparazione della frazione fine sotto forma di polvere mediante centrifugazione ed essiccamento di LF a temperatura $< 50 \text{ }^\circ\text{C}$; 4) recupero della frazione sedimentata dopo 1 h e lavaggio per separare ulteriori due frazioni di granulometria diversa mediante setacciatura ad umido a 20 µm. Ulteriore recupero della frazione dopo centrifugazione ed essiccamento a temperature inferiori a 50 °C ($\emptyset < 20 \mu\text{m}$ - Heavy Fraction, HF); 5) recupero della frazione dal setaccio a 20 µm ed essiccamento a temperature inferiori a 50 °C ($\emptyset > 20 \mu\text{m}$ – Limo e Sabbia, SS).

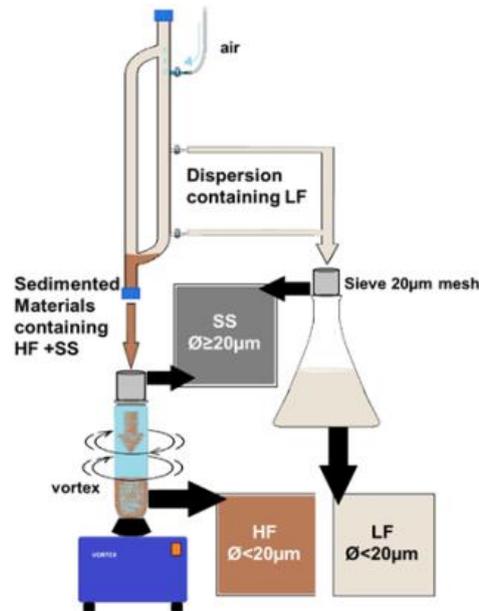


Figura 7. Schema della procedura utilizzata per ottenere le diverse frazioni più fini dal campione di sedimento originale.

È stata quindi verificata la dimensione media delle diverse frazioni sia tramite diffrazione laser sia tramite microscopio elettronico a scansione e diffrazione a raggi X.

In parallelo, sono stati condotti saggi di tossicità per valutare la qualità della frazione ultrafine del sedimento rispetto al sedimento totale tramite lo studio della bioluminescenza dei batteri *A. fischeri*, lo sviluppo larvale di *A. tonsa* e l'embriotossicità di *M. galloprovincialis*. La combinazione dei dati di caratterizzazione chimico-fisica e dei risultati tossicologici ha infine permesso di avanzare un'ipotesi circa il ruolo della frazione ultrafine del sedimento rispetto alla sua qualità globale.

Valutazione degli impatti della messa in funzione del MOSE sulla produttività delle aree di molluschicoltura della laguna di Venezia

Analogamente a quanto previsto dal WP2.1.2, la valutazione degli impatti sulle attività di molluschicoltura si è basata su un approccio Weight-of-Evidence (WoE) mutuato dai lavori di Piva et al. (2011) e Regoli et al. (2019), che prevede l'utilizzo di informazioni eterogenee organizzate in "linee di evidenza" (Line of Evidence, LoE) e la loro successiva integrazione al fine di derivare un quoziente di pericolo (HQ) e una classe (da *absent* a *severe*) per l'intera matrice sedimento. L'applicazione di tale approccio si basa su dati raccolti in due anni di monitoraggio (2019-2020 e 2020-2021) durante i quali sono state svolte attività di campo trimestrali (una per stagione, nei mesi di Maggio, Luglio, Ottobre e Febbraio) per la raccolta dei sedimenti superficiali e dei campioni di molluschi bivalvi (vongola filippina, *Ruditapes philippinarum*, e il mitilo mediterraneo, *Mytilus galloprovincialis*), allevati in diverse zone del bacino sud della Laguna poste a distanze graduali dalla bocca di porto di Chioggia.

Nello specifico, la caratterizzazione della contaminazione chimica del sedimento ha previsto analisi delle concentrazioni totali degli elementi in traccia (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, V, Zn), oltre alle analisi dei contaminanti organici (IPA, diossine e furani, PCB, esaclorobenzene, composti organostannici e alifatici alogenati). Il bioaccumulo di composti organici e metalli pesanti è stato valutato nei tessuti degli organismi prelevati dai siti di molluschicoltura. Inoltre, tali campioni sono stati utilizzati per effettuare analisi molecolari (trascrittomica – RNA-seq - e caratterizzazione del microbiota – 16S) e per lo studio di un set di biomarcatori per identificare le loro caratteristiche a livello cellulare e biochimico.

Per quattro siti di allevamento di vongole e due siti di allevamento di mitili, i dati ottenuti dalle diverse task hanno costituito linee di evidenza indipendenti tra loro a supporto della caratterizzazione ecologica dei

sedimenti in due diversi momenti rispetto l'attivazione del sistema MOSE, Maggio 2020 (pre-attivazione) e Maggio 2021 (post-attivazione). L'integrazione ponderata delle diverse evidenze si è basata sull'affidabilità e riproducibilità dei risultati raccolti.

A completare la valutazione della qualità delle aree produttive sono state inoltre raccolte informazioni sulle caratteristiche biometriche degli organismi, il Condition Index e, limitatamente ai mitili (in sinergia con la Linea 5.2), effetti a livello fisiologico di apertura/chiusura delle valve tramite biosensori. In aggiunta, durante i due anni sono stati rilevati in continuo i valori di diversi parametri chimico-fisici delle acque (temperatura, salinità, pH, torbidità, clorofilla, ossigeno e saturazione) mediante l'utilizzo di sonde multiparametriche fisse posizionate in prossimità dei siti di allevamento di vongole.

5. Risultati per attività

Inventario delle informazioni disponibili e determinazione dei valori di fondo

Per quanto riguarda la determinazione dei valori di fondo, questi sono stati stimati per otto elementi in tracce (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) applicando la metodologia scelta (Matschullat et al., 2000) al dataset ricavato dalla selezione di dati di letteratura su 17 carote di sedimento radiodatate (per un totale di 165 campioni). A seguito del costruttivo contributo di uno dei revisori anonimi dell'articolo scientifico sottoposto alla rivista "Environmental Science and Pollution Research", si è ritenuto più appropriato definire i valori stimati come "Concentrazioni Pre-Industriali" (indicate come "2 σ -pIC") anziché valori di fondo. Questa scelta è stata motivata dalla necessità di tenere conto dei contributi antropici che per alcuni elementi (in particolare il mercurio) risultano significativi in laguna di Venezia già prima dell'avvio di un'attività industriale "intensa" (anni '20 del secolo scorso). In Marchese et al. (2022)⁵, i valori ottenuti per ciascuno degli elementi considerati sono stati discussi attraverso il confronto con valori di fondo precedentemente stimati per la laguna di Venezia e il mare Adriatico, e con "standard di qualità ambientale" definiti per la matrice sedimento nel contesto italiano.

Valutazione della qualità dei sedimenti per fini gestionali legati alla loro movimentazione

Le indagini sperimentali effettuate sul sedimento prelevato nel canale Vittorio Emanuele III e nel Canale San Felice nel corso delle due campagne di campionamento (2020 e 2021) hanno fornito informazioni rilevanti ai fini della valutazione della qualità. L'applicazione della metodologia WoE ha infatti permesso di ottenere un giudizio di qualità per ciascun sito rispetto ad ogni singola LoE e poi di stimare una classe qualitativa complessiva dall'integrazione di tutte le LoE.

Per quanto riguarda la caratterizzazione della contaminazione (LoE Chimica), la stima del relativo HQ per ciascun sito e ciascuna campagna fa osservare, in generale, un peggioramento della qualità per i sedimenti della seconda campagna, attribuibile in buona parte alle più elevate concentrazioni di metalli misurate, in particolare per Cu, Zn, As, Cd e Pb. Il superamento dei limiti normativi (Standard di Qualità Ambientale, SQA) per le diossine e/o i PCB in alcuni siti (dal II al V) e anche per alcuni IPA e il TBT (solo nel sito II) ha contribuito all'attribuzione della classe "major" o "severe" ai siti dal II al V. Dal confronto con gli SQA, si conferma la buona qualità del sedimento prelevato del sito VI (presso il Canale San Felice) e, quindi, la scelta di usare tale sito come controllo per le linee di evidenza del bioaccumulo, dei biomarker e dei dati trascrittomici.

Per la LoE Bioassay, la valutazione fornita dalla stima degli HQ per 6 siti oggetto di indagine si allinea con la classificazione fornita dalla LoE Chimica. Non si evidenziano differenze significative tra i risultati per le due campagne, e la classe più rappresentata è "major". Il sito I riceve una valutazione peggiorativa rispetto alla LoE Chimica (major contro absent/moderate), un risultato che forse può essere associato alle

⁵ Marchese E., Bizzotto E.C., Giubilato E., Semenzin E., Marcomini A., 2022. Pre-industrial sediment concentrations of metals: insights from the Venice lagoon (Italy). Environmental Science and Pollution Research 29: 85829–85838.

caratteristiche di tessitura del sedimento (con lenti argillose molto compatte) più che ad un effetto della contaminazione, mentre il sito VI si conferma in buono stato.

Per la LoE Bioaccumulo, la valutazione in termini di HQ ha restituito la classificazione “moderate” per tutti i siti, benchè con alcune variazioni significative in termini di valore numerico di HQ. In particolare, all’interno di ciascuna campagna si nota un peggioramento per i siti II e V rispetto agli altri siti, associato ai valori di alcuni IPA, mentre si è osservato un lieve peggioramento tra la prima e la seconda campagna dovuto all’aumento delle concentrazioni di Pb e Hg negli organismi. Infine, è interessante notare che il sito V presenta una classe “major” in entrambe le campagne limitatamente alla somma delle diossine.

Per quanto riguarda la LoE Biomarker, dai risultati è stata rilevata una differenza tra i due tempi di esposizione (3 e 14 giorni) in entrambi gli esperimenti (novembre 2020 e marzo 2021), ma il pattern di variazione è diverso tra i due. Per esempio, le vongole esposte ai sedimenti durante il primo esperimento presentavano un danno ossidativo più elevato rispetto agli animali del secondo. Queste ultime, invece, hanno mostrato una maggiore attività degli enzimi antiossidanti, che potrebbe aver portato a una migliore protezione. Tuttavia, i biomarker di neurotossicità hanno mostrato un’attività più elevata nei bivalvi utilizzati nell’esperimento di marzo 2021. In generale, le analisi dei biomarcatori di stress non hanno evidenziato un chiaro pattern di variazione tra i siti. In particolare, le vongole esposte al sedimento del sito di riferimento (sito VI, Canale San Felice) hanno mostrato risposte simili a quelle degli animali esposti ai sedimenti del Vittorio Emanuele III. La valutazione dei risultati dei biomarker in termini di HQ, basata sulle risposte misurate dopo 14 giorni di esposizione, mostra un peggioramento per i siti II e III tra la prima e la seconda campagna (in linea con il peggioramento della LoE Bioaccumulo). Per la prima campagna solo il sito I riceve un HQ “major” (gli altri sono “slight”) mentre per la seconda risulta “slight” il sito IV e “absent” il V.

Per la LoE Trascrittomico, le analisi hanno evidenziato importanti modificazioni trascrizionali nelle vongole esposte a sedimenti prelevati nei siti prossimi a Porto Marghera. Al contrario la caratterizzazione del microbiota ha dimostrato lievi alterazioni delle comunità microbiche della ghiandola digestiva degli animali. La classificazione in termini di HQ dei risultati ottenuti dopo le esposizioni a 14 giorni ha portato ad una classe “moderate” per tutti i siti della prima campagna, e ad un’alternanza di “moderate” e “slight” per la seconda.

Dall’integrazione delle informazioni disponibili (Tabella 1) è risultata confermata la buona qualità del sedimento nel sito di controllo nel Canale San Felice. L’integrazione di cinque tipologie di risultati ha portato, per i cinque siti dislocati lungo il canale Vittorio Emanuele III, ad una valutazione variabile tra “slight” e “major”, con un peggioramento per i campioni prelevati nei punti più prossimi all’area industriale di Porto Marghera. Un’elevata corrispondenza caratterizza i risultati della LoE chimica e bioassay lungo il canale Vittorio Emanuele III, facendo emergere una lieve diminuzione del pericolo presso il sito III. Le evidenze associate alle indagini a livello biologico hanno permesso di evidenziare un potenziale pericolo per gli organismi esposti al sedimento del sito I che la linea di evidenza chimica non ha riscontrato. La presenza di contaminanti o di altri fattori non considerati nelle analisi potrebbe essere alla base delle differenze osservate. I valori di qualità stimati nelle due campagne presentano una leggera differenza, che probabilmente è originata dalle concentrazioni di inquinanti inorganici più elevate nella seconda campagna, benchè non contraddistinte da particolari criticità e sempre all’interno del range di variabilità osservabile in laguna.

Tabella 1. Valori di HQ normalizzati e relative classi di qualità ottenute dall'integrazione delle LoE.

Sites	1st Campaign		2 nd Campaign	
	HQ WoE	FINAL CLASS	HQ WoE	FINAL CLASS
I	39.86	SLIGHT	59.41	MODERATE
II	60.46	MAJOR	65.25	MAJOR
III	56.68	MODERATE	63.68	MAJOR
IV	65.28	MAJOR	62.25	MAJOR
V	64.49	MAJOR	63.99	MAJOR
VI	24.85	SLIGHT	18.20	ABSENT

La metodologia basata su un WoE quantitativo ha dimostrato essere un approccio efficace per combinare e integrare in maniera quantitativa set di dati ampi e complessi con l'obiettivo finale di valutare in maniera completa ed esauriente la qualità del sedimento potenzialmente soggetto a dragaggio e movimentazione. La combinazione di analisi chimiche e di stima degli effetti ecotossicologici (a differenti livelli biologici) ha facilitato la valutazione dello stato di qualità di ciascun sito, permettendo di superare approcci del tipo "one out-all out", in cui un singolo parametro può essere determinante nella classificazione del sedimento. Il nuovo indice trascrittomico ha inoltre permesso di tradurre in classi di pericolo le alterazioni genomiche e di creare una linea di evidenza associata ai dati trascrittomici, dimostrando la flessibilità dell'approccio WoE nell'includere ulteriori dati e analisi utili a una migliore determinazione della qualità del sedimento. Tuttavia, essendo questa la prima applicazione dell'indice trascrittomico a caratterizzazione del rischio *in situ* si ritengono necessari ulteriori sviluppi e controlli prima di poter includere tale linea di evidenza nel ventaglio di evidenze che compongono un approccio WoE.

Per quanto concerne le altre due attività i cui risultati non hanno trovato una diretta integrazione nella metodologia di valutazione WoE, lo studio della geospeciazione ha mostrato come la somma della frazione bioaccessibile e delle due frazioni mobili superava sempre la concentrazione residua in tutti i siti in entrambe le campagne. La geospeciazione ha inoltre evidenziato che l'incremento della concentrazione totale osservato nella seconda campagna era in linea con l'aumento della frazione bioaccessibile e delle due frazioni mobili, fornendo così informazioni aggiuntive utili a una più accurata stima del pericolo dovuto alla presenza di elementi in traccia. In relazione alla stima modellistica del bioaccumulo, in generale i risultati mostrano come per *R. philippinarum* sia necessario un tempo di esposizione più lungo di quello utilizzato nel protocollo sperimentale (14 giorni) per raggiungere una situazione di stato stazionario (concentrazione negli organismi in equilibrio con quella nelle matrici acqua e sedimento). Al fine di evidenziare quali siano i parametri che maggiormente influenzano i risultati modellistici ottenuti, è stata effettuata un'analisi di sensitività. Questa ha evidenziato per i metalli l'opportunità di ulteriori approfondimenti riguardanti la frazione di contaminante assimilato dal sedimento e da altri organismi, e la stima del fattore di bioconcentrazione. Per quanto riguarda i contaminanti organici, i parametri che potrebbero beneficiare di approfondimenti sperimentali per migliorare la capacità predittiva del modello sono risultati essere la velocità di metabolizzazione e il fattore di bioconcentrazione.

Studio del sedimento lagunare come sorgente secondaria di contaminazione

Studio relativo ai processi all'interfaccia acqua-sedimento

Per quanto riguarda le comunità microbiche del sedimento della laguna, i dati di DNA metabarcoding hanno mostrato una pronunciata diversità, tipica degli ambienti lagunari e costieri. La beta diversità ha evidenziato come i campioni formino cluster distinti raggruppati principalmente in base al sito. La granulometria, la salinità, e il carbonio organico totale (TOC) hanno mostrato un ruolo significativo nello strutturare le comunità microbiche.

Per quanto riguarda l'assegnazione tassonomica (Figura 8a), considerando le abbondanze medie relative, i phyla più rappresentati erano i Proteobacteria e i Bacteroidota. Tra i generi identificati, il più abbondante è risultato essere *Woeseia*, il più comune genere di batteri rilevato nei sedimenti a livello globale, sia in zone costiere che in acque profonde. L'archeon ammonio-ossidante *Candidatus Nitrosopomilus* era presente con una proporzione significativamente più alta in Chioggia rispetto agli altri siti.

I dati del DNA metabarcoding sono anche stati utilizzati per indentificare le "firme microbiche" relative a specifici stress antropogenici, come la presenza di taxa associati a contaminazione fecale e da fognature. Sacca Sessola ha mostrato una più alta proporzione di taxa associati alla contaminazione fecale dovuta principalmente alla famiglia Clostridiaceae, presenti nel tratto gastro-intestinale umano e in generale dei mammiferi, mentre Marghera era caratterizzata da una più alta proporzione di taxa associati alla contaminazione da reflui, dovuta principalmente ai generi *Acinetobacter* e *Trichococcus*, prevalenti all'interno delle infrastrutture fognarie.

Per i metagenomi, i geni più abbondanti erano legati alla fissazione del carbonio e ai metabolismi di ferro, fosforo e azoto (Figura 8b). I pathway metabolici legati allo zolfo sono risultati significativamente meno rappresentati a Chioggia, dove viceversa erano significativamente più abbondanti le funzioni relative all'assemblaggio flagellare. I dati metagenomici sono anche stati utilizzati per indentificare funzioni relative a specifici stress antropogenici, come la resistenza a metalli pesanti e antibiotici. Marghera e Tresse hanno presentato proporzioni significativamente più alte di geni relativi a queste due categorie, essendo i siti maggiormente influenzati dalle attività industriali (composti tossici) e umane (resistenza ad antibiotici). In generale, la resistenza a Cobalto-Zinco-Cadmio e ad un ampio spettro di antibiotici (multidrug) sono state le più presenti in tutti i siti.

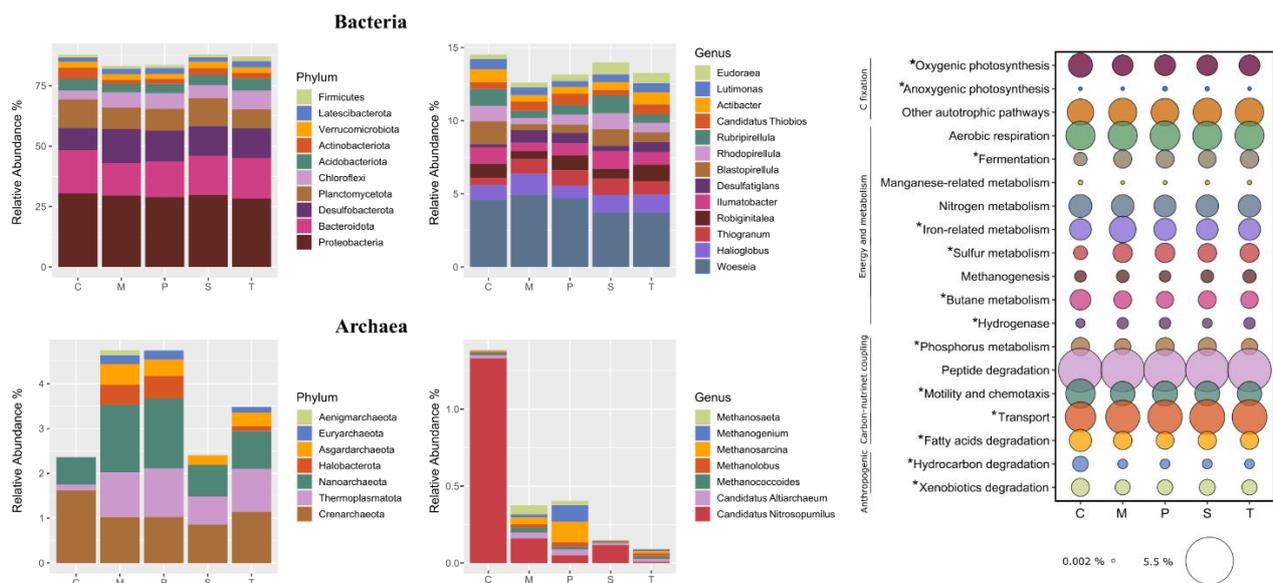


Figura 8. A sinistra: Composizione tassonomica dei batteri e archea al livello di phylum e di genere nei siti di campionamento. Per i batteri, sono mostrati i taxa che presentano un'abbondanza > 1 e 0.5% rispettivamente. Per gli archea, sono mostrati i taxa che presentano un'abbondanza > 0.1 %. A destra: Abbondanza relativa delle funzioni associate ai principali metabolismi del sedimento. L'asterisco indica differenze significative tra i siti. C: Chioggia; M: Marghera; P: Palude della Rosa; S: Sacca Sessola; T: Tresse.

I risultati dello studio, discussi e pubblicati in Banchi et al. (2021)⁶ dimostrano che le attività antropiche sovrapposte alle proprietà chimico-fisiche del sedimento hanno impatti profondi e a lungo termine sulle comunità microbiche dei sedimenti lagunari.

Studio della frazione ultrafine del sedimento

La prima procedura di estrazione della frazione ultrafine (illustrata in Figura 5) ha permesso di ottenere delle dispersioni di particelle con una media della distribuzione dimensionale tra 4 e 5 μm per F0 e tra 1.5 e 3 μm per F1. La valutazione della tossicità delle quattro frazioni ottenute (i.e., F0, F1, E, SPF0#) è stata condotta con *A. fischeri*, secondo il protocollo Microtox Solid Phase. In generale, i dati hanno mostrato che le particelle sospese (contenute in F0, F1 e SPF0#, ma non in E) fornirebbero un modesto contributo all'inibizione totale della bioluminescenza di *A. fischeri*. Tuttavia, non è da escludere che l'effetto negativo verificatosi sia dovuto principalmente ai contaminanti presenti nella fase liquida.

La seconda fase di estrazione delle frazioni più fini del sedimento ha evidenziato una dimensione media delle particelle di circa 5 μm per LF, 15 μm per HF, 36 μm per SS e 6.5 μm per DE. Inoltre, la caratterizzazione chimico-fisica dei campioni LF, SS e DE tramite la microscopia elettronica a scansione e la diffrazione a raggi X ha permesso di confermare l'effettiva separazione dimensionale delle diverse frazioni in funzione dei cut-off utilizzati, nonché la medesima struttura cristallina, prima e dopo il trattamento e separazione del campione originale nelle diverse frazioni.

A seguito della caratterizzazione chimico-fisica, sono stati condotti i relativi test ecotossicologici con *A. fischeri*, *A. tonsa* e *M. galloprovincialis*. I risultati dei saggi di *A. fischeri* e *A. tonsa* sono illustrati nella Figura 9, mentre, a causa dell'elevata complessità nel design sperimentale per condurre i test su *M. galloprovincialis*, i relativi risultati sono solo parziali (Tabella 2).

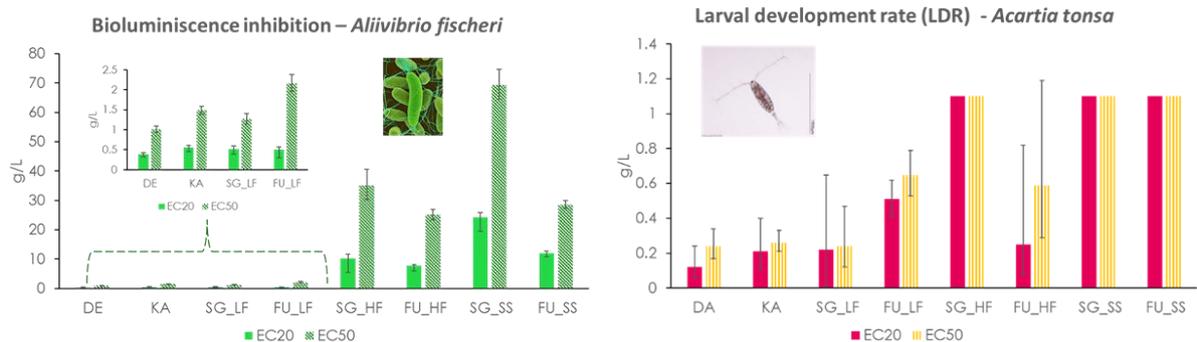


Figura 9. Valori EC20 e EC50 dei saggi di tossicità acuta con *A. fischeri* (sinistra) e *A. tonsa* (destra). DE = terra di diatomacee alimentare; KA = caolinite; SG = campione raccolto presso il sito di monitoraggio di San Giuliano; FU = campione raccolto presso il sito di monitoraggio di Fusina; LF = Frazione Leggera; HF = Frazione pesante; SS = limo e sabbia. Le barre maggiori di 1 (grafico a destra) rappresentano i campioni per cui l'effetto ecotossicologico è risultato > 1 g/L.

⁶ Banchi E., Del Negro P., Celussi M., & Malfatti F. (2021) Sediment Features and Human Activities Structure the Surface Microbial Communities of the Venice Lagoon. *Frontiers in Marine Science*, 8:1900. doi: 10.3389/fmars.2021.762292.

Tabella 2. Riepilogo dei risultati della granulometria delle diverse frazioni disperse in AMW e dei relativi valori di EC20 ed EC50, ottenuti mediante i test di tossicità condotti con *Mytilus galloprovincialis*. D10, D50 e D90 si riferiscono al 10°, 50° e 90° percentile della distribuzione dimensionale. La terra di diatomee alimentare (DE) e la caolinite (KA) sono state utilizzate come materiali di riferimento per i saggi biologici; SG = campione raccolto presso il sito di monitoraggio di San Giuliano; FU = campione raccolto presso il sito di monitoraggio di Fusina. I campioni con > 1 si riferiscono ad un effetto ecotossicologico non rilevato, considerando 1 g/L come dose massima per i test con *M. galloprovincialis*.

Parameters / tested organisms	Metrics	DE	KA	SG			FU		
		<20 µm	<5 µm	LF (<20 µm)	HF (<20 µm)	SS (20≥ µm)	LF (<20 µm)	HF (<20 µm)	SS (20≥ µm)
Hydrodynamic diameter distribution	D10-D50-D90 (µm)	2.0-6.5-16.5	1.5±0.2	1.9-5.5-14.4	8.5-16.5-29.1	21.8-37.5-64.0	1.8-4.7-12.1	6.3-14.2-26.7	19.6-36.7-66.9
<i>Mytilus galloprovincialis</i> - Embriotoxicity (Orbital Shaker)	EC20 (g/L)	0.21 (0.16-0.28)	>1	0.21 (0.14-0.32)			0.49 (0.38-0.63)		
	EC50 (g/L)	0.86 (0.72-1.02)	>1	0.56 (0.43-0.74)			1.17 (0.94-1.46)		
<i>Mytilus galloprovincialis</i> - Embriotoxicity (Overhead Mixer(Rotax))	EC20 (g/L)	0.005 (0.001-0.190)		0.03 (0.02-0.06)			0.02		
	EC50 (g/L)	0.36 (0.16-0.79)		0.16 (0.12-0.21)			0.11		

I risultati dei saggi di tossicità hanno evidenziato che: 1) le frazioni prive di contaminanti dei campioni lagunari (SG e FU), ottenute con la procedura in Figura 7, hanno mostrato valori di EC20 ed EC50 molto simili a quelli ottenuti per i materiali di riferimento caolinite e terra di diatomee. L'unica eccezione è rappresentata dai saggi con *M. galloprovincialis*, per i quali, come mostrato in Tabella 2, i risultati si riferiscono a due metodi differenti: uno basato sull'Orbital Shaker, come utilizzato per *A. tonsa*, e l'altro che implica l'utilizzo di un agitatore meccanico, che potrebbe incrementare l'effetto tossicologico. Data la complessità del design sperimentale con *M. galloprovincialis*, per tale test non sono disponibili i risultati per HF e SS mentre per la caolinite sono disponibili solo in parte (cioè solo per il metodo Orbital Shaker), non consentendo quindi una valutazione completa; 2) i valori di EC20 ed EC50 per *A. fischeri* e *A. tonsa* sono risultati sempre significativamente inferiori per le frazioni più fini (LF, mediana intorno a 5.5 µm), rispetto a HF (mediana: 15 µm) e SS (mediana: 37 µm).

In conclusione, anche se i risultati ottenuti supportano l'ipotesi che la dimensione delle particelle possa avere un ruolo nell'indurre effetti avversi su entrambi gli organismi bersaglio testati, ovvero *A. fischeri* e *A. tonsa*, vale la pena precisare che le concentrazioni testate utilizzate per questi saggi biologici di tossicità sono stati circa un ordine di grandezza superiore (g vs. mg) rispetto a quelli riscontrati nei siti di monitoraggio considerati (SG e FU) e quindi il ruolo della frazione più fine del sedimento potrebbe non essere così rilevante per le due specie testate.

Valutazione degli impatti della messa in funzione del MOSE sulla produttività delle aree di molluschicoltura della laguna di Venezia

L'applicazione dell'approccio WoE alle indagini sperimentali ha permesso di ottenere un giudizio di qualità rispetto ad ogni singola LoE (Figura 10) per poi stimare una classe qualitativa complessiva dall'integrazione di tutte le LoE in due tempi della campagna di campionamento (maggio 2020, pre-MOSE, e maggio 2021, post-MOSE) per ogni sito (siti di allevamento di vongole: 1VAR, 2VAR, 3VAR, 4SAU; allevamento di mitili: 5SCA e 6CAM).

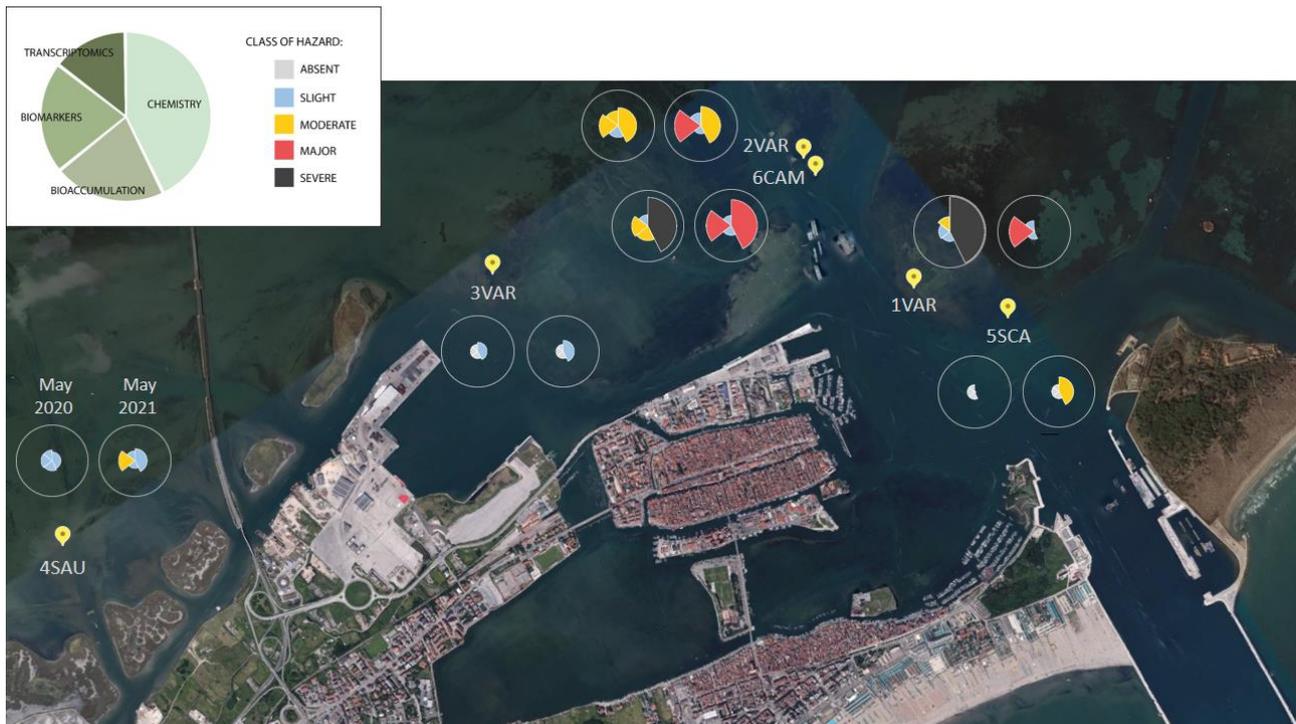


Figura 10. Risultati dell'applicazione del modello WoE a due siti di allevamento mitili (5SCA e 6CAM) e a tre siti di allevamento vongole (1VAR, 2VAR, 3VAR e 4SAU) nei due tempi di campionamento (maggio 2020 e maggio 2021).

La caratterizzazione chimica del sedimento (LoE chimica) ha evidenziato solo per i siti 1VAR e 6CAM delle concentrazioni maggiori di diossine, alcuni metalli (Cd, Cr, Ni e Hg), e IPA probabilmente a causa all'intenso traffico delle imbarcazioni da pesca nell'area di allevamento. Mentre per il sito 6CAM questa tendenza è confermata anche nell'anno successivo, la qualità del sedimento in 1VAR migliora notevolmente nel secondo anno con tutti i parametri analizzati inferiori ai limiti normativi. Negli altri siti si registra un pericolo variabile tra assente e moderato, senza differenze significative tra le due campagne, e con i siti 3VAR e 5SCA risultanti in buono stato chimico avvalorando così la scelta di questi siti come controllo rispettivamente per le aree di allevamento di vongole e di mitili nelle LoE bioaccumulo, biomarker e trascrittomico.

Per quanto riguarda la LoE bioaccumulo, il sito 6CAM è l'unico a presentare un pericolo moderato a causa delle concentrazioni di tre IPA misurati nei tessuti dei mitili. Tra gli altri siti, il cui bioaccumulo risulta sempre di bassa entità, l'HQ maggiore è stato osservato per il sito 2VAR relativamente alle concentrazioni di PCB, le quali risultano comunque in linea con il range di variazione osservato per la laguna di Venezia, in particolare nella zona di Chioggia.

A livello cellulare e biochimico le principali differenze nel biota sono state registrate durante il primo anno di campionamento rispetto al secondo, in particolare nei valori dei biomarcatori antiossidanti. Analogamente, i risultati delle analisi molecolari hanno messo in evidenza, in particolare nel corso del primo anno di monitoraggio, criticità importanti nei siti 1VAR e 2VAR con modificazioni trascrizionali associabili a risposte a stress ambientali. Considerato il basso se non assente bioaccumulo di sostanze tossiche riscontrate nei diversi tempi di campionamento, non è stato possibile ricondurre la sovraregolazione di meccanismi volti alla detossificazione a specifici stress chimici. Un'ulteriore causa di stress per gli animali allevati in queste zone, soggette ad importante mortalità nel primo anno di monitoraggio, potrebbe essere rappresentata dall'elevata salinità.

L'integrazione delle diverse linee ha evidenziato globalmente un basso livello di pericolo associato alle aree investigate a eccezione di due siti (6CAM e 2VAR) molto prossimi tra loro, la cui classe di pericolo è risultata moderata in entrambi gli anni sotto l'influenza dell'evidenza chimica e dei biomarcatori biochimici.

Nonostante un sito (1VAR) sia stato interessato da un miglioramento della qualità chimica del sedimento e quindi da una riduzione di pericolo nel secondo anno di campionamento, l'applicazione del modello WoE ha permesso di escludere differenze significative tra i due anni analizzati a livello di pericolo globale. A conferma di questo, il confronto dei dati ottenuti dalle altre indagini sperimentali nel periodo pre- e post-MOSE non evidenzia modificazioni significative nelle biometrie, nelle performances di crescita e nel Condition Index del biota. Il confronto delle comunità microbiche della ghiandola digestiva e della branchia di vongole cresciute nelle diverse aree di allevamento tra il periodo pre- e post-MOSE ha mostrato modificazioni minime in tutte le aree di allevamento. Si evidenzia tuttavia la sovra-rappresentazione di taxa potenzialmente patogeni, come *Vibrio spp.* nei siti prossimi alla bocca di porto di Chioggia e di *Arcobacter* nei siti più interni. Inoltre, non sono stati osservati trend particolarmente differenti dei parametri ambientali rilevati con sonde multiparametriche, se non una maggiore salinità media nei siti più esterni alla Laguna.

Variazioni osservabili all'interno di singole linee di evidenza tra i due campionamenti possono invece essere attribuite a diversi fattori che hanno agito nelle aree di allevamento tra Maggio 2020 e Maggio 2021, tra cui una parte del lock-down dovuto alla pandemia di COVID19, o l'alta marea dell'8 Dicembre 2020, nonché a caratteristiche specifiche del bacino studiato, come ad esempio la variabilità dei processi idrodinamici e sedimentologici, la risospensione dei sedimenti a causa del dragaggio meccanico impiegato nelle aree di allevamento, o l'attività di filtrazione, con conseguente deposito di pseudo-feci, dei mitili allevati che può portare a un'amplificazione della contaminazione. L'entrata in funzione del MOSE, tra Ottobre 2020 e Dicembre 2021, si è quindi inserita in un quadro di notevole complessità e, pertanto, risulta impossibile col grado di conoscenza attuale attribuire al sistema di controllo delle maree un'influenza sull'attività di molluschicoltura. Il modello WoE si è tuttavia rivelato utile alla caratterizzazione ecologica dei sedimenti, fornendo in futuro uno strumento idoneo alla valutazione dei possibili effetti del MOSE sull'ecosistema lagunare.

6. Obiettivi prefissati e raggiunti

Gli obiettivi previsti dalla Linea 2.1 sono stati raggiunti. In breve, l'applicazione di un approccio Weight of Evidence (WoE) a un caso studio di canale navigabile lagunare ha fornito risultati utili a supportare la revisione e la fase di sperimentazione della nuova normativa per la gestione dei sedimenti lagunari (attualmente in fase di sviluppo). Nell'ambito di tale studio è stata integrata in via esplorativa una nuova linea di evidenza basata sui risultati di analisi genomiche in specie sentinella (*R. philippinarum*). È stata inoltre approfondita la valutazione dei possibili effetti cronici legati alla presenza di miscele di contaminanti nei sedimenti evidenziando come, oltre all'analisi degli effetti di tipo acuto, sia fondamentale indagare gli effetti per esposizioni croniche (più frequenti in ambienti naturali rispetto a quelle acute) e a diversi livelli biologici (organismo, cellula e DNA). Lo studio condotto per la prima volta sulla frazione ultrafine del sedimento ha consentito di ipotizzare che tale frazione di per sé sia poco rilevante in termini di effetti sulle specie acquatiche testate, mentre potrebbe essere maggiormente rilevante il suo ruolo come carrier di potenziali inquinanti presenti nel comparto acquatico. La mappatura dei sedimenti della laguna basata sul potenziale metabolico dei microorganismi ha invece evidenziato come le aree cronicamente inquinate siano da considerarsi hotspot per i geni di resistenza ad antibiotici e metalli pesanti, con implicazioni sulla gestione dei sedimenti in laguna. Infine, le attività condotte in alcune aree di molluschicoltura in prossimità di Chioggia hanno permesso una loro caratterizzazione e la definizione di linee guida volte a migliorare le produzioni e a ridurre la mortalità degli organismi allevati.

Gli studi condotti hanno inoltre permesso di individuare i potenziali sviluppi futuri brevemente delineati in sezione 3.

In relazione agli obiettivi prioritari (OP) di Venezia2021, i risultati raggiunti nella Linea 2.1 hanno contribuito principalmente a migliorare il "Quadro conoscitivo" (OP1) sull'ecosistema lagunare in relazione a: i) la stima di "Concentrazioni pre-industriali" di otto elementi in tracce (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn); ii) la valutazione

degli effetti cronici legati alla presenza di miscele di contaminanti nei sedimenti dei canali navigabili; iii) la mappatura dei sedimenti superficiali basata sul potenziale metabolico dei microorganismi per geni legati ai metalli pesanti e agli inquinanti in generale; iv) il possibile contributo della frazione ultrafine del sedimento risospeso nell'indurre effetti avversi in organismi target e come carrier di potenziali inquinanti presenti nel comparto acquatico. I risultati così prodotti hanno fornito conoscenze aggiornate a supporto della valutazione dello stato di salute dell'ecosistema lagunare e di una sua adeguata gestione (Sfida 4).

Allo stesso tempo, le attività condotte hanno contribuito allo sviluppo di "Indicatori" (OP4) e di una "Visione strategica" (OP5) fornendo dei risultati utili ad altre sfide fondamentali.

Nello specifico, per quanto concerne "La problematica del riutilizzo dei sedimenti lagunari" (Sfida 3), la metodologia di valutazione basata sull'approccio Weight of Evidence (WoE), che ha incluso, oltre alle informazioni derivate dalla caratterizzazione della contaminazione chimica del sedimento e del bioaccumulo negli organismi (*R. philippinarum*), dall'analisi di biomarkers (sempre in vongole filippine), e dall'uso di saggi ecotossicologici con diverse specie lagunari, anche l'alterazione dei profili di espressione genica di organismi acquatici esposti ai sedimenti contaminati, è stata applicata con successo per la valutazione della qualità dei sedimenti profondi lungo il canale Vittorio Emanuele III (considerando il tipico scenario di dragaggio del fondale di canali navigabili e successiva movimentazione). Questa prima applicazione, in un'ottica di revisione dei criteri di classificazione del sedimento della laguna di Venezia, ha dimostrato come l'integrazione delle evidenze di effetto e di esposizione degli organismi possa aiutare a ottenere un quadro complessivo più accurato e, quindi, una gestione più informata dei sedimenti lagunari.

Infine, per la Sfida 5 "I servizi ecosistemici che la laguna offre all'uomo: quanto "valgono" e come mantenerli per le generazioni future", le attività di analisi e valutazione condotte in diverse aree di molluschicoltura in prossimità di Chioggia hanno permesso di evidenziare un quadro di notevole complessità, nell'ambito del quale l'applicazione di molteplici strumenti quali le analisi chimiche, di bioaccumulo e dei biomarcatori biochimici e molecolari, integrabili mediante una metodologia WoE, da un lato, e la raccolta di parametri chimico-fisici, di informazioni biometriche e sulla mortalità, anche mediante l'impiego di sonde multiparametriche e biosensori dall'altro, ha dimostrato l'importanza dell'utilizzo di approcci complementari e la necessità di continuare ad effettuare campagne di monitoraggio nelle aree di allevamento di molluschi bivalvi.