



Venezia2021

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

Linea 2.3

**Contaminanti emergenti in laguna,
esposizione ed effetti**

Rapporto Finale

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

Andrea Gambaro (DAIS-UNIVE)

29/09/2022

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Andrea Gambaro".

EXECUTIVE SUMMARY

1. Principali risultati emersi dalla Linea riferiti agli obiettivi iniziali

La Linea 2.3 “Contaminanti emergenti in laguna, esposizione ed effetti” si è focalizzata sullo studio degli inquinanti emergenti in diverse matrici ambientali lagunari quali acqua e sedimento al fine di individuarne le possibili sorgenti e di indagarne la distribuzione e il destino nell’ambiente acquatico lagunare, sia sperimentalmente che per via modellistica. Inoltre, sono stati indagati gli effetti ecotossicologici di alcuni di questi contaminanti su specie rappresentative dell’ecosistema lagunare.

La caratterizzazione della contaminazione chimica dell’acqua e sedimento lagunare si è concentrata su sette siti di campionamento della laguna di Venezia con caratteristiche diverse al fine di indagare diversi aspetti del sistema lagunare e fornire una panoramica di tre aree della laguna: nord, centro, sud. Alcuni siti sono stati scelti al fine di definire un fingerprint legato alle sorgenti di emissione specifiche di contaminanti emergenti, altri invece legati alla diffusione e rimescolamento degli inquinanti. La lista dei contaminati emergenti analizzati nel progetto comprende tutti gli inquinanti inseriti nelle Watch Lists 2015 e 2018 stilate dall’Unione Europea e altre classi di contaminanti emergenti che, seppure non inclusi all’interno di tali liste, destano particolare attenzione e preoccupazione a livello ambientale.

Sono state indagate almeno due potenziali sorgenti di contaminazione all’interno dell’ambiente lagunare: la foce del fiume Dese, con il suo apporto influenzato dalle attività agricole, industriali e urbane della terraferma, e l’impianto di trattamento delle acque di Sant’Erasmus. Le analisi condotte hanno mostrato possibili trend legati alla stagionalità soprattutto per i prodotti legati all’attività agricole della gronda lagunare.

Per alcune categorie di inquinanti emergenti oggetto di indagine, sono stati determinati in condizioni controllate i potenziali effetti per specie bivalvi di interesse ecologico ed economico per la laguna. Nel dettaglio, analisi delle modificazioni nei profili trascrizionali e delle modificazioni cellulari e biochimiche in organismi esposti in laboratorio hanno permesso di mettere in evidenza gli effetti di glifosato, AMPA, C6O4, PFOA ed Amyl salicilato in mitili e vongole e hanno fornito informazioni utili a definirne il meccanismo di azione.

Attraverso la valutazione degli effetti ecotossicologici e la stima del rischio ecologico associato a questi contaminanti sono state identificate quali classi e singole sostanze richiedono di essere incluse in future attività di monitoraggio, definendo una Watch List lagunare. Tale lista è stata il risultato finale di un robusto approccio scientifico basato sull’integrazione della valutazione sperimentale e modellistica dell’esposizione e i risultati della caratterizzazione degli effetti ecotossicologici dei contaminanti emergenti attraverso un’analisi di rischio ecologico di screening.

Tutti i criteri e le “soglie” considerati per la definizione della Watch List lagunare sono stati rappresentati attraverso un diagramma a flusso. La struttura è stata sviluppata in modo tale da coprire le possibili casistiche in termini di disponibilità dei dati e di loro valori. Inoltre, questo approccio trasparente e flessibile potrà essere adatto anche a future implementazioni con classi diverse di sostanze e a fronte di ulteriori studi ecotossicologici.

In conclusione, a fronte dell’applicazione del diagramma di flusso, vengono inseriti nella Watch List lagunare quattro prodotti fitosanitari (imidacloprid, clothianidin, thiacloprid, acetamiprid), un farmaco (diclofenac), un antibiotico (ciprofloxacina), un prodotto industriale (EHMC), un PFAS (PFOS), e tutte le fragranze considerate (Amyl salicylate, Oranger Crystals, Hexyl Salicylate, Peonile, Ambrofix, Benzyl Salicylate).

Per tre contaminanti (EE2, Amoxicillina e Triallate), nonostante l’esclusione dalla Watch List lagunare secondo i criteri adottati, si ritiene utile un ulteriore approfondimento sulla derivazione del loro valore di PNEC e sui metodi analitici utilizzati. Un ulteriore approfondimento viene anche suggerito per le microplastiche poiché sono state osservate concentrazioni elevate nei sedimenti lagunari rispetto alle acque sovrastanti. Trattandosi di un primo studio relativo alla presenza di small microplastics (microplastiche tra i 100 e i 5 µm),

è necessario un approfondimento, anche per colmare il gap della mancanza ad oggi di metodologie standardizzate per la valutazione della pericolosità e del rischio.

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

2.1 Contaminanti emergenti in acqua e sedimento della Laguna di Venezia

La Linea 2.3 “Contaminanti emergenti in laguna, esposizione ed effetti”, per la prima volta, ha indagato la presenza di inquinanti emergenti in acqua (Figura 1) e nei sedimenti (Figura 2) in sette siti della laguna veneta al fine di condurre un’indagine preliminare sulla loro presenza nel bacino lagunare e individuarne le possibili sorgenti. La lista degli analiti analizzati in questa Linea con il relativo metodo di analisi e i limiti strumentali sono riportati in Tabella 1. L’analisi del rischio si è basata su tre principali parametri riportati in tabella: i) Measured Environmental Concentrations (MEC) basate sulle concentrazioni ambientali misurate nelle quattro campagne di campionamento; ii) Predicted Environmental Concentrations (PEC) concentrazioni modellate attraverso un modello di trasporto multicompartimentale a partire dai dati di vendita, calibrato utilizzando i risultati sperimentali ottenuti dalle analisi dei campioni di acqua prelevati nelle campagne di campionamento; iii) Predicted No Effect Concentrations (PNEC) i cui valori sono stati ottenuti da un’attenta analisi dei dati ecotossicologici disponibili in letteratura e in database internazionali, a cui si sono aggiunti i risultati dei test ecotossicologici condotti su bivalvi e copepodi.

Tabella 1. Metodi analitici sviluppati durante la linea e relativi valori di Measured Environmental Concentrations (MEC), Predicted Environmental Concentrations (PECs) e Predicted No Effect Concentrations (PNEC). La dicitura “< LQ” indica che la sostanza non è mai stata quantificata nei campioni analizzati.

	Composti	Metodo di analisi	MEC (ng/l)	PEC (ng/l)	PNEC (ng/l)
Estrogenic compounds	17-alpha-ethinylestradiol (EE2)	LC-MS/MS	< LQ	1.07·10 ⁻⁴	0.02
	17-beta-estradiol (E2)		< LQ	1.06	10
	Estrone (E1)		0.74	2.53	25
Pharmaceuticals	Diclofenac	LC-MS/MS	43.07	1.06	11
	Amoxicillin		< LQ	15.25	1
	Ciprofloxacina		30.89	5.43	1
	Erythromycin		3.55	1.50	580
	Clarithromycin		12.64	8.44	270
	Azithromycin		< LQ	5.93	21.40
Neonicotinoid insecticides	Imidacloprid	LC-MS/MS	2.78	1.38	1.30
	Clothianidin		0.23	0.88	0.10
	Thiacloprid		0.11	0.34	0.01
	Thiamethoxam		0.42	0.69	10
	Acetamiprid		0.50	0.77	0.20
Plant Protection Products (PPPs)	Methiocarb	LC-MS	0.35	0.17	165
	Oxadiazon	LC-MS	0.68	0.29	14
	Metaflumizone	LC-MS	< LQ	0.02	25.70
	Triallate	GC-MS/MS	< LQ	0.28	0.10
Industrial chemicals	BHT	GC-MS/MS	14.1	-	-
	EHMC	GC-MS/MS	2.40	-	7.50
	Bisphenol A	LC-MS/MS	46.90	-	2364
	Glyphosate	IC-MS/MS	45.94	14.80	10000

	Composti	Metodo di analisi	MEC (ng/l)	PEC (ng/l)	PNEC (ng/l)
PFASs	PFHpA	GC-MS	77.41	-	-
	PFOA		285.79	-	11900
	PFNA		103.29	-	-
	PFDA		115.62	-	-
	PFAUnA		125.46	-	-
	PFDaA		34.33	-	-
	PFOS	LC-MS/MS	221.37	-	250
Fragrances	Amyl Salicylate 1	GC-MS/MS	137.13	-	0.0131
	Amyl Salicylate 2		16.22	-	0.0766
	Oranger Crystals		62.91	-	0.0057
	Hexyl Salicylate		89.13	-	2.6276
	Peonile		23.33	-	0.2034
	Ambrofix		30.67	-	0.2795
	Benzyl Salicylate				

Le concentrazioni misurate mostrano un possibile andamento stagionale per la presenza di alcuni contaminanti e supportano l'ipotesi che la foce del fiume Dese, con il suo apporto influenzato dalle attività agricole, industriali e urbane della terraferma, e l'impianto di trattamento delle acque di Sant'Erasmus rappresentino due potenziali sorgenti di questi contaminanti per la laguna.

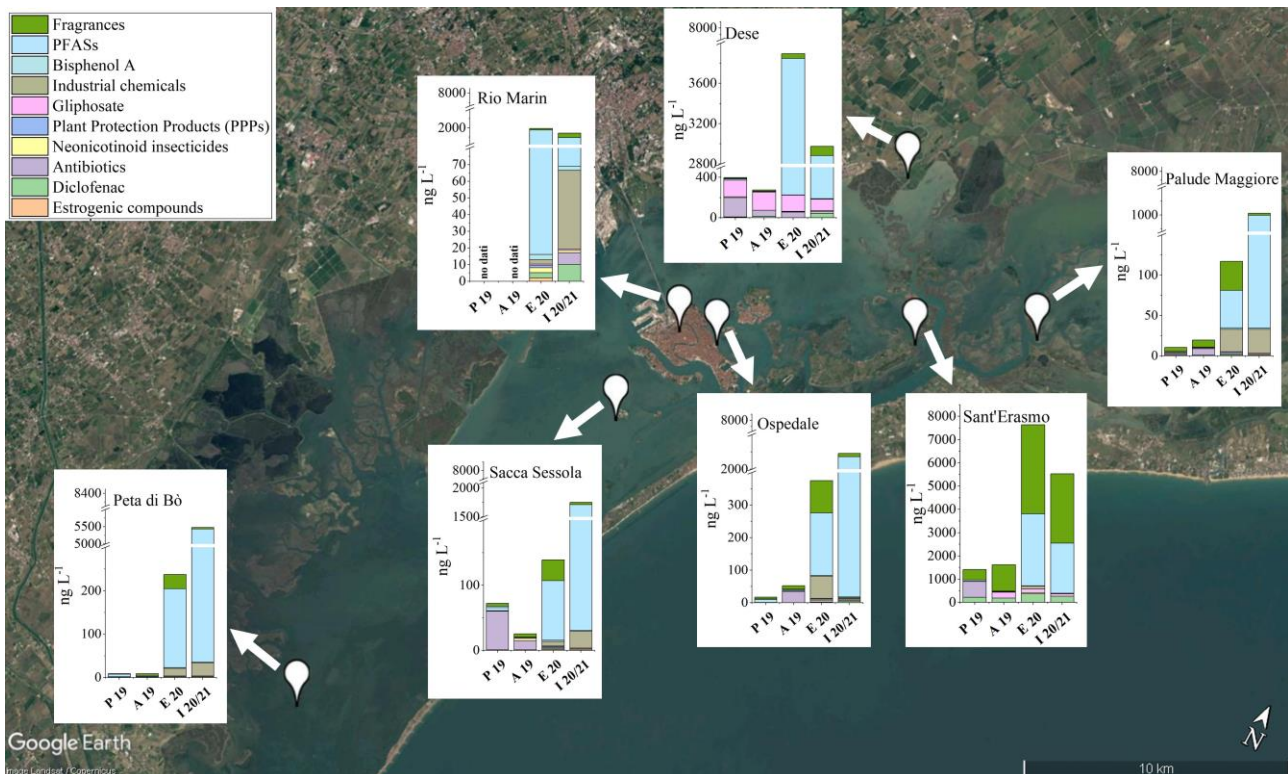


Figura 1. Concentrazioni di vari inquinanti emergenti nelle acque della laguna di Venezia in quattro stagioni (P 19 = primavera 2019; A 19 = autunno 2019; E 20= estate2020; I 20/21 = inverno 2020/2021).

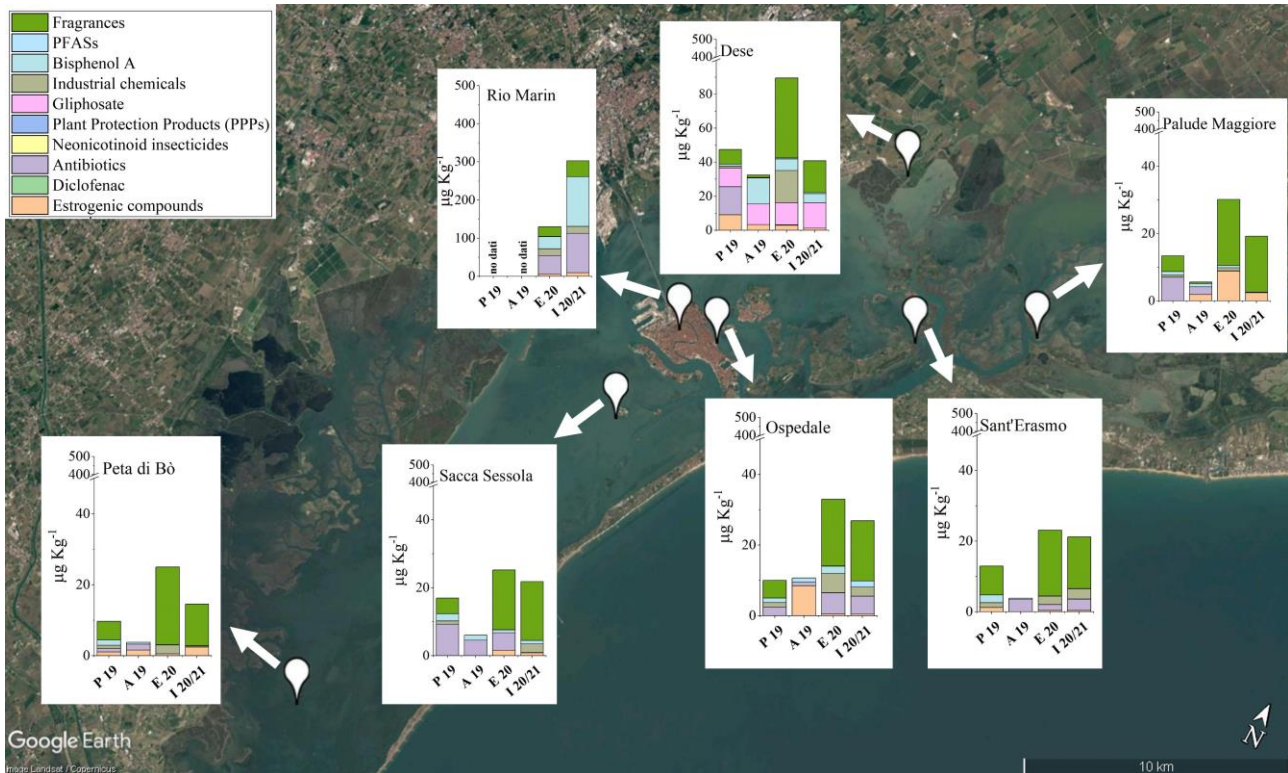


Figura 2. Concentrazioni di vari inquinanti emergenti nei sedimenti della laguna di Venezia in quattro stagioni (P 19 = primavera 2019; A 19 = autunno 2019; E 20= estate2020; I 20/21 = inverno 2020/2021).

2.2 Watch List lagunare per le acque

Il principale risultato della Linea è la definizione della Watch List lagunare per la matrice acqua e questa si basa su un approccio integrato che comprende: i) le concentrazioni ambientali misurate nelle quattro campagne di campionamento; ii) le concentrazioni modellate attraverso un modello di trasporto multicompartimentale a partire dai dati di vendita, calibrato utilizzando i risultati sperimentali ottenuti dalle analisi dei campioni di acqua e sedimento prelevati nelle campagne di campionamento; iii) i valori soglia di non effetto a valle di un'attenta analisi dei dati ecotossicologici disponibili in letteratura e in database internazionali, a cui si sono aggiunti i risultati dei test ecotossicologici condotti su bivalvi e copepod. In figura 3 si riporta il diagramma flusso aggiornato con gli inquinanti inseriti o meno nella Watch List lagunare in corrispondenza di ogni percorso/sottosezione. In azzurro sono evidenziati i contaminanti che non erano inclusi nella prima e nella seconda Watch List della Commissione Europea ma erano stati identificati come ulteriori contaminanti oggetto di studio nella Linea.

Adottando lo stesso approccio per la matrice sedimento, la maggior parte delle sostanze rientrerebbe nella Watch List, suggerendo come questa matrice meriti di essere inserita in future campagne di monitoraggio della qualità ambientale (soprattutto per quei contaminanti emergenti che presentano una maggiore tendenza a ripartirsi nel sedimento), nonché la necessità di ulteriori approfondimenti degli effetti ecotossicologici per poter derivare delle soglie di effetto sufficientemente robuste.

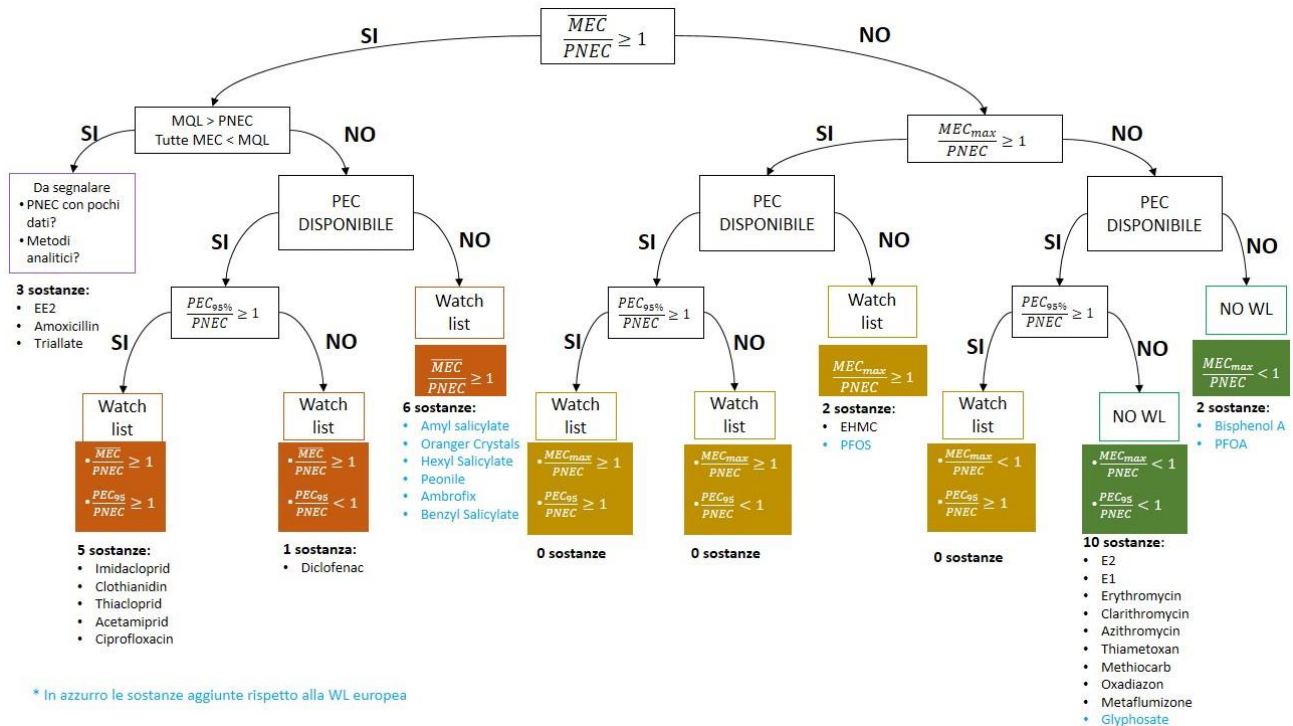


Figura 3. Diagramma a flusso per la definizione della Watch List lagunare con la definizione delle sostanze da inserire.

2.3 Effetti tossicologici del C6O4 su specie bivalvi di interesse ecologico e commerciale

Per la prima volta sono stati valutati i potenziali effetti di alcuni inquinanti emergenti su specie bivalvi di interesse economico ed ecologico per la Laguna di Venezia (la vongola filippina *Ruditapes philippinarum* e il mitilo *Mytilus galloprovincialis*) applicando approcci multidisciplinari in grado di investigare diversi livelli di organizzazione biologica.

In particolare vongole *Ruditapes philippinarum* sono state esposte in condizioni controllate a concentrazioni ambientali realistiche di C6O4 (perfluoro ([5-methoxy-1,3-dioxolan-4-yl]oxy) acetic acid), un composto recentemente introdotto da Solvay in sostituzione al PFOA già rinvenuto nelle falde acquifere e nel fiume Po. Lo studio ha messo in evidenza la presenza di questo composto, pur in basse concentrazioni, anche in vongole provenienti dalla laguna di Venezia, certificandone la ampia diffusione anche in ambienti naturali. I risultati dello studio, pur suggerendo un bioaccumulo 5 volte inferiore rispetto a quello riscontrato per il PFOA, ha messo in evidenza alterazioni importanti nel profilo di espressione genica. Tra queste sono state messe in evidenza alterazioni nei meccanismi di regolazione della risposta immunitaria e dell'apoptosi, nonché in pathway molecolari coinvolte nello sviluppo del sistema nervoso, nel metabolismo dei lipidi e nella composizione della membrana cellulare. Queste alterazioni appaiono del tutto simili a quelle riscontrate in seguito all'esposizione al PFOA, indicando che i potenziali rischi per gli organismi marini non vengono ridotti sostituendo il PFOA con C6O4 come indicato da Solvay.

3. Spunti per il futuro

I risultati della Linea 2.3 sono in realtà un punto di partenza che offre dei suggerimenti per studi futuri su specifiche classi di sostanze che necessitano indagini più approfondite e quindi la potenziale inclusione in programmi di monitoraggio futuri. Inoltre, lo studio condotto nella Linea ha evidenziato come per alcune sostanze, quali ad esempio i tre contaminanti EE2, Amoxicillina e Triallato, sia fondamentale un ulteriore approfondimento relativo ai possibili effetti ecotossicologici su specie estuarine e sia auspicabile un miglioramento nei metodi analitici utilizzabili.

Un ulteriore approfondimento è suggerito per le microplastiche a fronte delle concentrazioni di SMPs trovate in laguna. Trattandosi del primo studio che ha investigato la presenza e l'abbondanza di particelle comprese tra 100 e 5 μm , il confronto con i dati in letteratura è molto difficile, poiché generalmente sono plastiche > 300 μm (mesh size della rete manta). Gli impatti delle diverse classi dimensionali delle plastiche possono essere molto differenti. È emerso da recenti studi che anche gli additivi e plasticizzanti legati alla presenza di rifiuti di plastica e microplastiche in ambiente possono diffondersi negli ecosistemi acquatici e terrestri e diventare potenzialmente tossici per gli organismi e l'essere umano; questi composti possono essere dei *proxies* della presenza di polimeri specifici in ambiente, permettendo di approfondire lo studio delle loro sorgenti e dei loro percorsi.

Dal punto di vista normativo alcuni analiti che fanno parte della Watch List lagunare sono stati vietati per uso in campo aperto (es. clotianidin, imidacloprid e tiametoxam dal 2018) e saranno sostituiti da altri insetticidi. Da qui la necessità di un aggiornamento nel tempo della lista dei composti da monitorare e di un ampliamento dell'indagine di potenziali effetti di questi nuovi composti.

Si ritiene auspicabile incrementare gli studi volti a definire i potenziali effetti, anche a lungo termine, di inquinanti emergenti particolarmente presenti nella laguna di Venezia (inclusi nella *Watch List*) su una specie di interesse ecologico ed economico quale la vongola filippina *Ruditapes philippinarum*. Questa, verosimilmente a causa del cambiamento climatico e della presenza di inquinanti ambientali, ha subito negli ultimi anni un importante decremento nelle popolazioni naturali e diffusi eventi di mortalità negli allevamenti, comportando una profonda crisi del settore produttivo (da 40.000 tonnellate prodotte nel 2001 alle 3.000 tonnellate prodotte nel 2019). Anche alla luce dei risultati ottenuti si ritiene estremamente urgente ampliare il numero di classi di inquinanti emergenti investigate, focalizzandosi anche sullo studio degli effetti di questi in diverse fasi del ciclo riproduttivo e dello sviluppo larvale.

Infine, si auspica che in futuro possano essere studiati anche i possibili rischi per la salute umana associati alla presenza di contaminanti emergenti nella laguna di Venezia, ad esempio valutando l'importanza dell'accumulo lungo la rete trofica per i composti maggiormente bioaccumulabili.

DESCRIZIONE ESTESA

4. Descrizione delle attività

I “contaminants of emerging concern” (CEC), o più semplicemente “contaminanti emergenti”, sono composti chimici sintetici o naturalmente presenti che non sono comunemente monitorati nell’ambiente e per i quali non è del tutto chiarito il rischio per la salute umana e per l’ambiente. Essi comprendono tra gli altri erbicidi e pesticidi (ad es. glifosato, piretroidi e neonicotinoidi), farmaci e cosmetici, composti perfluoroalchilici (PFAS), bisfenolo A, microplastiche. Alcune classi di questi inquinanti possono potenzialmente contribuire allo stato di qualità delle acque, dei sedimenti e del biota lagunare più di quanto non contribuiscano gli inquinanti definiti prioritari. Recenti normative hanno introdotto alcuni inquinanti emergenti in aggiunta a quelli prioritari (D. Lgs. 172/2015), come ad esempio alcuni agenti antinfiammatori e pesticidi. Gli obiettivi specifici della Linea sono quindi quelli di approfondire la conoscenza sullo stato di contaminazione delle acque, sedimenti e biota della laguna di Venezia da parte dei contaminanti emergenti, di individuarne le principali sorgenti e di indagarne la loro distribuzione e il destino nell’ambiente acquatico lagunare, sia sperimentalmente che modellisticamente. Attraverso la valutazione degli effetti ecotossicologici e del rischio ambientale associato a questi contaminanti verranno identificate quali classi o singole sostanze (ed eventuali prodotti di biodegradazione) richiedono di essere incluse in future attività di monitoraggio.

Le attività della Linea 2.3 sono partite da un’attenta e scrupolosa ricerca bibliografica, tesa all’identificazione delle classi target di contaminanti emergenti, delle loro possibili principali sorgenti di contaminazione, dei percorsi di diffusione e dei bersagli. Quindi è stato pianificato il campionamento delle matrici ambientali al fine di meglio rappresentare la distribuzione di contaminanti in tutte le diverse aree del bacino lagunare. Il campionamento ha previsto la raccolta di campioni di acqua e sedimento in sei siti della laguna di Venezia durante le prime due campagne di campionamento (primavera ed autunno 2019), mentre per la terza e quarta campagna (estate 2020 e inverno 2020-2021) è stata aggiunta la stazione di Rio Marin in centro storico.

4.1 Caratterizzazione della contaminazione chimica dell’acqua e del sedimento lagunare

Le analisi chimiche dei contaminati emergenti oggetto d’indagine sono state condotte sugli inquinanti inseriti nelle *Watch Lists* 2015 e 2018 stilate dall’Unione Europea e su altri contaminanti emergenti di potenziale interesse per la laguna in base alle possibili sorgenti ma anche alla loro potenziale pericolosità e che quindi destano particolare attenzione e preoccupazione a livello ambientale. In aggiunta è stata anche condotta un’analisi untarget tesa a individuare altre sostanze presenti in laguna non considerate nell’analisi target.

Dopo attenta analisi dello stato dell’arte e delle linee guida fornite dal Joint Research Centre (JRC) per l’analisi in acque dolci, per ciascun analita è stato sviluppato un metodo analitico *ad hoc* per le matrici acqua e sedimento lagunare.

La determinazione dei composti farmaceutici (17 α -Ethinylestradiol, β -Estradiol, Estrone, Diclofenac, Erythromycin A, Clarithromycin, Azithromycin, Amoxicillin, Ciprofloxacina) e degli insetticidi neonicotinoidi e del bisfenolo A è stata condotta mediante la tecnica HPLC-MS/MS. La matrice acquosa è stata trattata mediante la tecnica di estrazione e purificazione Solid Phase Extraction (SPE) mentre i sedimenti hanno prima subito una fase di estrazione per poi essere purificati con SPE.

La determinazione del glifosato è stata effettuata tramite sistema HPAEC-MS/MS, previo abbattimento dei cloruri tramite cartucce di argento nitrate. Il campione non ha subito ulteriori manipolazioni preanalitiche per evitarne la contaminazione.

La determinazione di PFAS (sostanze poli- e per-fluoroalchiliche) nei campioni di acqua e sedimento della laguna di Venezia ha previsto l’identificazione e quantificazione di sei diversi acidi carbossilici perfluorurati (PFCA) a diversa lunghezza di catena carbonica (C₇-C₁₂) e di un acido solfonico perfluorurato (PFSA), l’acido perfluoroottansolfonico (PFOS). I PFCA sono stati analizzati mediante strumentazione GC-MS in seguito ad

una rapida procedura di micro-derivatizzazione in acetonitrile. A causa dell'instabilità del suo prodotto derivato, che tende a subire rapida solvolisi e reazioni di sostituzione nucleofila, il PFOS è stato invece analizzato mediante strumentazione HPLC-MS/MS.

Per l'analisi di sei fragranze (Amyl Salicylate, Hexyl Salicylate, Benzyl Salicylate, Oranger Crystals, Ambrofix e Peonile) nei campioni di acqua si è proceduto con un'estrazione SPE, mediante l'utilizzo di cartucce Oasis HLB con un metodo multi-analita per la determinazione anche di un altro prodotto personale come il filtro-UV 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EHMC), presente nella prima watchlist europea. Sempre con lo stesso metodo sono stati analizzati anche il conservante 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) e l'erbicida Triallato. La preparazione dei campioni di sedimento per la determinazione degli stessi composti è stata effettuata mediante QuEChERS. Infine, tutte le analisi strumentali dei campioni prelevati nelle quattro campagne di campionamento sono state svolte con tecnica GC-MS/MS.

Per la quantificazione e identificazione chimica delle small microplastics (SMPs, microplastiche delle dimensioni 100-5 μm) in matrici di acqua e sedimento è stata messa a punto un'oleo-estrazione sfruttando le proprietà idrofobiche delle SMPs a diversa densità, con successiva purificazione e filtrazione su filtri in ossido di alluminio (filtri ANODISC, Whatman® Anodisc 0.2 μm di porosità, 47 mm diam.). Dopo la filtrazione, i filtri sono stati lasciati ad asciugare a temperatura ambiente per 72 ore e quindi conservati fino all'analisi. Ogni operazione è stata effettuata in *clean room*, in una stanza priva di plastiche anche nei prefiltri dell'aria. L'analisi strumentale è stata condotta con il Micro FT-IR Nicolet™ iN™ 10, con rivelatore MCT (rivelatore di tellururo di cadmio di mercurio) in trasmittanza. La quantificazione è stata effettuata tramite conta microscopica. Oltre alla caratterizzazione polimerica, il software ha un imaging, che permette di ottenere la dimensione in lunghezza e larghezza di ogni particella (in μm). Questo ha permesso di ottenere l'*Aspect ratio* di ogni singola SMP, assimilandone la forma ad un solido geometrico, come avviene per altre particelle.

L'indagine untarget sulle matrici acqua salata e sedimento è stata compiuta in un primo momento mediante tecnica HPLC-HRMS. Successivamente visto il numero limitato di analiti rilevati nei campioni delle prime due campagne di campionamento è stato sviluppato un metodo analitico in UHPLC-nanoESI-HRMS che ha fornito risultati migliori per la terza e la quarta campagna di campionamento.

4.2 Analisi ecotossicologiche

La valutazione degli effetti *in vivo* dei contaminanti emergenti ha previsto le seguenti valutazioni attraverso uno studio sperimentale:

- test di sviluppo larvale con *Mytilus galloprovincialis* su acque contaminate artificialmente con 19 contaminanti emergenti (imidacloprid, acetamiprid, clothianidin, thiacloprid, thiamethoxam, benzil-salicilato, hexyl-salicilato, amyl-salicilato, oranger crystals, peonile, ambrofix, diclofenac, ciprofloxacina, amoxicillina, eritromicina, claritromicina, triallato, oxadiazone, methiocarb), utilizzando il protocollo Volpi Ghirardini et al. (2005). I test sono stati condotti nel range di concentrazioni 0.01 – 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ per ciascun prodotto.
- test di sviluppo larvale con il copepode *Acartia tonsa* su acque contaminate artificialmente con neonicotinoidi (imidacloprid, acetamiprid, clothianidin, thiacloprid e thiamethoxam) e fragranze (benzil-salicilato, hexyl-salicilato, amyl-salicilato, oranger crystals, peonile e ambrofix), secondo il protocollo descritto in Picone et al. (2021). I test sono stati eseguiti nel range di concentrazioni 0.01 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ per ciascun prodotto.
- test di sviluppo larvale con il copepode *A. tonsa* su sedimenti contaminati artificialmente con fragranze a base di salicilato (benzil-salicilato, hexyl-salicilato, amyl-salicilato), utilizzando la procedura di spiking definita "*dilution mixing*" descritta in Picone et al. (2022) ed il protocollo test descritto in Picone et al. (2018b). I test sono stati condotti a concentrazioni nel range 1 – 1000 ng g^{-1} per ciascun prodotto.
- test su ciclo vitale con il copepode *A. tonsa* su acque contaminate artificialmente con neonicotinoidi (acetamiprid, clothianidin, thiacloprid e thiamethoxam), secondo il protocollo interno UNIVE Picone et

al. (submitted). I test sono stati condotti a concentrazioni nominali di 10 e 100 ng L⁻¹ per ciascun pesticida.

- test cronico con l'anfipode *Monocorophium insidiosum* su sedimenti contaminati artificialmente con fragranze a base di salicilato (benzil-salicilato, hexyl-salicilato, amyl-salicilato), utilizzando la procedura di spiking definita "conventional spiking" descritta in Picone et al. (2022) ed il protocollo test descritto in Picone et al. (2018a). I test sono stati condotti a concentrazioni nel range 0.1 – 10 ng g⁻¹ per ciascun prodotto.

Le attività sperimentali che hanno riguardato infine i campioni ambientali hanno riguardato l'analisi di acque e sedimenti superficiali prelevati nei siti di progetto nel corso della terza e della quarta campagna di campionamento previste dalla Linea. In dettaglio, le attività eseguite sono le seguenti:

- test di sviluppo larvale con *M. galloprovincialis* su acque superficiali prelevate nel corso della terza e quarta campagna di campionamento, utilizzando il protocollo Volpi Ghirardini et al. (2005);
- test di sviluppo larvale con il copepode *A. tonsa* su acque superficiali prelevate nel corso della terza e quarta campagna di campionamento, secondo il protocollo descritto in Picone et al. (2021);
- test di sviluppo larvale con il copepode *A. tonsa* su campioni di sedimento superficiale prelevato nel corso della terza e quarta campagna di campionamento, secondo il protocollo descritto in Picone et al. (2018b);
- test cronico con l'anfipode *M. insidiosum* su campioni di sedimento superficiale prelevato nel corso della quarta campagna di campionamento, il protocollo test descritto in Picone et al. (2018a).

4.3 Esposizioni sperimentali di vongole e valutazione degli effetti mediante biomarkers e analisi trascrittomiche

L'attività si è focalizzata sulla valutazione degli effetti di alcuni inquinanti emergenti riscontrati nella laguna di Venezia in vongole (*Ruditapes philippinarum*) e mitili (*Mytilus galloprovincialis*). A questo fine, animali adulti provenienti da aree di allevamento sono stati trasportati in laboratorio e, dopo un periodo di acclimatazione, sono stati esposti a diverse concentrazioni di singoli contaminanti per tempi diversi. È stato quindi applicato un approccio multidisciplinare volto a determinare il bioaccumulo, modificazioni nei profili trascrizionali, modificazioni cellulari e biochimiche. Pur non essendo previsto nel progetto iniziale, sono state effettuate inoltre indagini molecolari volte a caratterizzare il microbiota della ghiandola digestiva degli animali esposti.

La scelta delle categorie di inquinanti emergenti su cui focalizzare l'attenzione è stata motivata da diversi fattori. Il Glifosato e il suo metabolita AMPA (acido aminometilfosfonico) rientravano tra gli inquinanti investigati nelle diverse campagne di campionamento previste dalla Linea. Per iniziare quanto prima le attività, l'esposizione in mitili è stata effettuata precedentemente alle diverse campagne di campionamento e per questo motivo le concentrazioni testate sono superiori a quelle riscontrate nella laguna di Venezia.

La scelta di analizzare il C6O4, un PFAS di nuova generazione, deriva dalla necessità di acquisire i primi dati sul possibile bioaccumulo e sugli effetti di questo composto in organismi residenti nella laguna di Venezia. Si tratta infatti di un composto del tutto nuovo che, alla luce delle concentrazioni rilevate del delta del Po, sta destando crescenti preoccupazioni. Lo studio ha permesso di determinarne la presenza anche in laguna e di ottenere le prime informazioni sui suoi possibili effetti, utilizzando come modello una specie di bivalve di interesse commerciale ed ecologico quale la vongola filippina (*R. philippinarum*).

Infine, mitili sono stati esposti ad Amyl salicilato, una delle fragranze maggiormente riscontrate nella laguna di Venezia durante le diverse campagne di campionamento. Gli animali sono stati esposti alle concentrazioni ambientali riscontrate nella laguna.

4.4 Analisi di rischio

È stata condotta una valutazione di screening del rischio ecologico associato ai contaminanti emergenti per la laguna di Venezia. A tal fine, sono state integrate le concentrazioni stimate di contaminanti emergenti alle quali gli organismi acquatici sono esposti (Predicted Environmental Concentrations, PEC) con le rispettive soglie di concentrazione ambientale al di sotto delle quali non sono attesi effetti avversi sull'ecosistema acquatico (Predicted No Effect Concentration, PNEC).

Per la stima dell'esposizione, l'applicazione del modello multicompartimentale QWASI basato sul concetto di bilancio di massa ha permesso la stima delle concentrazioni attese (PEC) di contaminanti emergenti in acque e sedimenti lagunari utilizzando come valori di input i dati ottenuti da un inventario di emissioni sviluppato per il bacino scolante. L'inventario include i contaminanti per i quali è stato possibile reperire dati statistici sulle quantità vendute, che hanno permesso di stimare i carichi annui immessi in laguna, come richiesto per l'applicazione del modello. Sono, quindi, considerati in questa modellizzazione i contaminanti emergenti appartenenti al gruppo dei prodotti farmaceutici e dei fitofarmaci. Il modello è stato calibrato utilizzando i risultati sperimentali ottenuti dalle analisi dei campioni di acqua e sedimento prelevati nelle campagne di campionamento. Il metodo utilizzato per la stima delle emissioni in laguna è stato affiancato da un'analisi di sensibilità per identificare, rispettivamente, i principali fattori che influiscono su ciascuna stima e quelli che contribuiscono maggiormente all'incertezza nei risultati. Il modello è stato anche utilizzato per stimare il tempo di residenza dei prodotti farmaceutici e dei fitofarmaci nella laguna e per studiare l'importanza relativa dei meccanismi (ad es. degradazione in acqua e sedimenti, volatilizzazione, trasporto avvevivo) che ne regolano l'eliminazione.

Per quanto riguarda la stima delle soglie di non effetto (Predicted No Effect Concentration, PNEC), si è proceduto alla determinazione di tali valori, in primo luogo, per acque marine o estuarine seguendo linee guida internazionali e le indicazioni dalla Commissione Europea per la derivazione degli Standard di Qualità Ambientale (Environmental Quality Standard, EQS) nell'ambito della Direttiva Quadro Acque. A tal fine, è stato in primo luogo costituito un database con dati ecotossicologici per la matrice acqua disponibili in letteratura e in database internazionali sui contaminanti di interesse (aggiornato fino a febbraio 2022), e tali dati sono stati successivamente integrati con i risultati dei test ecotossicologici condotti nella Linea su singoli contaminanti in condizioni controllate.

La derivazione dei valori di PNEC per le acque è stata effettuata seguendo due possibili approcci: un approccio deterministico attraverso l'applicazione di appropriati "Assessment Factors" (Fattori di valutazione) al dato ecotossicologico più stringente, oppure un approccio probabilistico tramite la costruzione di Curve di Sensibilità delle Specie (Species Sensitivity Distribution, SSD), nel caso in cui fosse disponibile un numero adeguato di dati di effetto per più gruppi trofici. La derivazione dei valori di non effetto nei sedimenti ($PNEC_{sed}$) non ha potuto seguire la stessa procedura a causa dell'estrema scarsità di dati ecotossicologici riferiti alla matrice sedimento per i contaminanti target; i valori di PNEC per i sedimenti, pertanto, sono stati derivati a partire da quelli definiti per le acque della laguna seguendo le indicazioni riportate nel regolamento REACH No 1907/2006 (ECHA, 2008), secondo le quali il valore di $PNEC_{sed}$ può essere in via preliminare estrapolato dal corrispondente valore in acqua salata, $PNEC_{sw}$, basandosi sull'equilibrio di ripartizione.

A valle di queste due attività è stato possibile valutare il rischio ecologico per gli inquinanti target (prodotti farmaceutici e fitofarmaci) con un'analisi di rischio di *screening* effettuata tramite l'integrazione dei dati di esposizione modellistici (PEC) con i dati rappresentanti la soglia di concentrazione ambientale al di sotto della quale non sono attesi effetti avversi sull'ecosistema acquatico ($PNEC_{sw}$). Da un iniziale confronto tra valori di PEC (media e 95° percentile) e PNEC gli inquinanti sono stati categorizzati in base al grado di rischio che risultava dal rapporto (Hazard Quotient, HQ) tra queste due grandezze. Valori di HQ maggiori dell'unità indicano una condizione di rischio non accettabile. Nelle situazioni più incerte, con HQ compreso tra 0.2 e 1, si è ritenuto utile affinare la caratterizzazione del rischio con un approccio probabilistico. Il calcolo di una probabilità di rischio tramite un approccio Monte Carlo a partire da valori di PEC e valori di PNEC descritti da distribuzioni di probabilità ha permesso di definire con maggior accuratezza la probabilità di essere in

presenza di un potenziale rischio per l'ecosistema e di identificare gli inquinanti emergenti per i quali ulteriori approfondimenti si rivelano necessari.

4.5 Definizione della Watch List lagunare

L'attività conclusiva ed obiettivo finale della Linea 2.3 ha previsto la definizione di una lista di priorità dei contaminanti emergenti.

Ispirandosi all'approccio proposto dal JRC, l'analisi di rischio per la matrice acqua si è basata su un confronto tra le concentrazioni ambientali, misurate nelle quattro campagne di campionamento (Measured Environmental Concentrations, MEC) e/o modellate attraverso un modello di trasporto multicompartimentale (Predicted Environmental Concentrations, PEC) con le concentrazioni ambientali al di sotto delle quali non sono attesi effetti avversi sull'ecosistema acquatico (Predicted No Effect Concentration, PNEC). A seconda dei dati disponibili, i valori di PNEC sono stati confrontati con le concentrazioni medie e massime misurate e con i valori di concentrazione previsti in ambiente, medi e corrispondenti al 95° percentile della distribuzione dei dati. L'utilizzo di valori estremi di esposizione corrisponde ad una scelta cautelativa così da poter escludere la presenza di una situazione di rischio significativo anche nei casi di concentrazioni meno probabili, ma più pericolose.

Per facilitare la definizione della Watch List lagunare, è stato sviluppato un diagramma di flusso per la valutazione integrata delle informazioni generate/raccolte/elaborate durante le attività della Linea in modo tale da coprire tutte le possibili casistiche in termini di disponibilità dei dati e di loro valori e di conseguente calcolo dell'Hazard Quotient (HQ). Considerata la diversa disponibilità di dati di esposizione per le sostanze considerate, dal momento che solo per alcune categorie (Plant Protection Products e composti farmaceutici/ormoni) è risultato possibile ottenere oltre alle MEC anche una PEC, si è deciso di considerare entrambi i valori se disponibili, dando priorità alle concentrazioni misurate (quindi attribuendo un peso maggiore all'evidenza sperimentale).

Dato che i dati sperimentali hanno rivelato la presenza contemporanea di più contaminanti emergenti nelle aree oggetto di indagine, sollevando anche la questione dei possibili effetti ecotossicologici associati all'esposizione combinata degli organismi lagunari a più sostanze, la valutazione del rischio ecologico per miscele di sostanze chimiche è stata affrontata con un approccio "component-based method (CBM)" che prevede la somma dei singoli Hazard Quotients (HQs). In questo modo, è stato poi possibile ottenere un'indicazione qualitativa di quali contaminanti all'interno della miscela "ambientale" giochino potenzialmente un ruolo più significativo nel determinare il rischio associato all'esposizione combinata.

L'approccio proposto per la Watch List della matrice acqua è stato infine applicato anche alla matrice sedimento. Tuttavia, l'estrema scarsità di dati ecotossicologici per specie marine ed estuarine per la matrice sedimento relativamente ai contaminanti considerati ha spinto a derivare i valori di soglia di non effetto ($PNEC_{sed}$) a partire da quelli ottenuti per le acque basandosi sull'equilibrio di ripartizione e ad applicare in via cautelativa un fattore moltiplicativo al rapporto MEC (o PEC) su PNEC per le sostanze con maggior tendenza a ripartirsi nel sedimento.

5. Risultati per attività / Unità Operative

5.1 Caratterizzazione della contaminazione chimica dell'acqua e del sedimento lagunare

Le analisi condotte hanno mostrato evidenze di contaminazione da prodotti farmaceutici nelle acque della laguna prelevate a Sant'Erasmus ed in prossimità della foce del fiume Dese, in particolare ad opera del farmaco Diclofenac e degli antibiotici Ciprofloxacina e Claritromicina, con livelli di concentrazione rilevati pari a centinaia di $ng L^{-1}$. Meno rilevante la presenza degli altri prodotti farmaceutici indagati e di questa classe di analiti nei campioni di sedimento. In generale, le concentrazioni dei contaminanti emergenti analizzati sono spesso al di sotto o vicine al limite di rivelabilità e non si evidenziano particolari criticità, sebbene si possa

notare come i siti di campionamento della laguna nord (Dese e Sant'Erasmus) e quello posto in prossimità dell'ospedale abbiano fatto registrare concentrazioni maggiori degli altri siti, sia nelle acque, sia nei sedimenti. Per quanto riguarda lo studio dei livelli di concentrazione degli insetticidi neonicotinoidi nell'acqua della laguna, si è osservato che i livelli maggiori sono stati registrati in primavera ed estate. Questo è dovuto probabilmente all'utilizzo stagionale di questi composti impiegati per proteggere le colture dall'attacco degli insetti. Nei sedimenti lagunari sono significative le concentrazioni riscontrate in primavera, estate e per alcuni siti anche in inverno. I siti maggiormente contaminati sono stati quelli situati alla foce del fiume Dese che raccoglie le acque del bacino scolante del fiume stesso e presso l'isola di Sant'Erasmus.

La concentrazione del bisfenolo A nelle acque della laguna non mostra un chiaro andamento stagionale. Il sito maggiormente contaminato risulta essere quello di Sant'Erasmus. Per quanto riguarda i livelli di questo analita nei sedimenti, escludendo le concentrazioni particolarmente alte determinate in entrambe le campagne svolte a Rio Marin, canale interno della città di Venezia, e le alte concentrazioni rilevate alla foce del fiume Dese, in generale risultano simili non mostrando una chiara tendenza stagionale.

Le concentrazioni di glifosato hanno mostrato concentrazioni maggiori in primavera ed autunno, suggerendo un consistente apporto dalle campagne del Veneto a causa dell'uso dell'erbicida nelle colture durante queste stagioni. La presenza nel particolato sospeso e nei sedimenti non sembra avere una tendenza stagionale.

La distribuzione spaziale delle fragranze analizzate mostra concentrazioni rilevabili in tutti i siti e maggiori nelle acque nei pressi del depuratore di Sant'Erasmus. La distribuzione nei sedimenti ha mostrato una marcata variabilità stagionale. In particolare, le concentrazioni minori sono state ritrovate durante la campagna autunnale. I salicilati sono risultati essere tra le fragranze con i livelli più elevati, sia nelle acque che nel sedimento; tuttavia, per tutte le fragranze si è riscontrata la diffusa presenza nei diversi ambienti lagunari presi in esame.

Durante la campagna estiva, sono state riscontrate le concentrazioni di EHMC più elevate nelle acque, probabilmente a causa di un maggiore utilizzo di creme solari contenenti questo filtro UV. Anche nei sedimenti le concentrazioni maggiori sono state rinvenute nelle campagne primaverile ed estiva e le concentrazioni maggiori sono state rilevate nei pressi di Sant'Erasmus. Similmente ad altri analiti, il conservante BHT ha esibito una marcata variabilità stagionale, raggiungendo i livelli più elevati nelle acque nella campagna estiva del 2020. Benché i siti di Sant'Erasmus e Rio Marin siano generalmente caratterizzati dalle concentrazioni più elevate, la presenza di BHT è stata riscontrata anche negli altri punti di campionamento, sia nelle acque che nel sedimento, indicandone la diffusione nell'ambiente lagunare. Nelle quattro campagne di campionamento, il triallato è sempre rimasto al di sotto dei limiti di quantificazione, sia nelle acque, che nei sedimenti.

Le indagini volte alla determinazione di PFAS hanno evidenziato un maggior grado di contaminazione nelle acque rispetto ai sedimenti. Per entrambe le matrici è stato osservato un marcato incremento delle concentrazioni passando dalle prime due campagne di campionamento (primavera e autunno) al campionamento estivo ed invernale, che hanno mostrato una contaminazione, principalmente da PFOA e PFOS, che spesso ha raggiunto anche i siti di campionamento considerati meno impattati (Petta di Bò e Palude Maggiore) con valori di concentrazione che hanno raggiunto anche le decine di $\mu\text{g L}^{-1}$.

Uno dei principali risultati è la messa a punto di un metodo analitico per la quantificazione e identificazione via Micro-FTIR delle SMPs in acque superficiali e sedimenti. Differenti concentrazioni (SMPs /L per acque e SMPs/Kg per sedimenti) sono state osservate nei campioni analizzati. Più di 25 tipologie polimeriche sono state identificate nella maggior parte dei campioni, soprattutto sedimenti. Tra i più abbondanti, sono presenti: il polietilene (PE HD, Alta Densità), i polimeri fluorurati, i polimeri acrilici, la Poliftalamide (PPA), la poliammide 6 (PA 6) e Poliiolefina (PO). Si osserva inoltre una differenza temporale di abbondanze e di polimeri presenti, soprattutto nei campioni pre- e post-lockdown. Nei campioni di acqua, tra i polimeri più abbondanti nella maggior parte dei siti campionati in tutte le campagne, vi sono i polimeri fluorurati, PE HD, poliestere (PES) e PA 6 (poliammide 6 o nylon). La media delle dimensioni delle SMPs analizzate nelle acque superficiali e nel sedimento è inferiore in media a 43 μm per la lunghezza e 23 μm per la larghezza.

Confrontando le abbondanze delle SMPs tra i diversi siti e i diversi campionamenti effettuati anche in stagioni diverse tra loro, si può notare una variabilità spaziale e temporale. Per quanto riguarda le acque lagunari, Sacca Sessola mostra la concentrazione più elevata nella prima campagna; nella campagna successiva l'abbondanza maggiore si osserva nel sito dell'Ospedale, che è circa 6 volte superiore all'abbondanza osservata rispettivamente nei siti di Palude Maggiore e Petta di Bò. Nelle due ultime campagne, è il sito urbano presso un rio interno, Rio Marin, a presentare l'abbondanza più elevata con una netta predominanza di polimeri acrilici. Generalmente, l'abbondanza di SMPs nei sedimenti è circa dieci volte superiore rispetto quanto osservato per le acque. I polimeri fluorurati sono predominanti in tutti i siti, sebbene nelle due ultime campagne Rio Marin si differenzi per la distribuzione dei polimeri (sono infatti presenti SBR, PVCPS, EPDM e anche PEEA-Zinc (una vernice antivegetativa di nuova generazione)). Il sito con l'abbondanza più elevata nella prima campagna è Ospedale, seguito da Palude Maggiore e Dese. Mentre nella seconda campagna i siti mostrano abbondanze simili, nella terza e nella quarta sono i sedimenti di Rio Marin che hanno l'abbondanza più elevata. Va comunque sottolineato che in queste due ultime campagne, anche Sacca Sessola e Ospedale mostrano delle abbondanze nettamente superiori rispetto alla seconda campagna.

La caratterizzazione untarget è stata condotta sia nelle acque che nei sedimenti. Per quanto riguarda l'acqua lagunare nelle varie campagne analizzate sono state rilevate specie ioniche riconducibili a prodotti per la cura della persona, farmaci e droghe, pesticidi e molecole derivanti dalla degradazione di pesticidi, erbicidi e fungicidi. Altri composti hanno altre fonti, come additivi della plastica, additivi alimentari, ritardanti di fiamma, PFAS, cianotossine ecc. In generale, il maggior numero di specie è stato rilevato presso i siti alla foce del fiume Dese e a Sant'Erasmo. L'analisi condotta sui sedimenti ha mostrato un numero molto limitato (9) di specie riconducibili a pesticidi, fungicidi ed erbicidi e farmaci osservati principalmente presso i siti di Petta di Bò e Palude Maggiore.

5.2 Analisi ecotossicologiche

I test con i mitili su acque contaminate artificialmente hanno evidenziato una generale bassa sensibilità ai 19 contaminanti emergenti saggiati. I prodotti che hanno generato le NOEC più basse sono il diclofenac ed il triallato con un valore di $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$. Per tutti gli altri prodotti, le NOEC sono risultate superiori a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Nel complesso, è possibile affermare che il livello attuale di contaminazione non è tale da determinare dei possibili impatti sullo sviluppo larvale dei mitili. Unica eccezione sembra essere il diclofenac per il quale sono state riscontrate concentrazioni superiori a NOEC e LOEC soprattutto nelle stazioni di Sant'Erasmo e Dese.

Il test di sviluppo larvale con i copepodi su acque contaminate artificialmente ha rilevato un potente effetto inibitorio di fragranze e neonicotinoidi sui primi stadi vitali di *A. tonsa*. Nel caso dei neonicotinoidi, il principio attivo che è risultato più tossico per lo sviluppo larvale è acetamiprid ($EC_{50} = 730 \text{ ng L}^{-1}$), mentre il meno tossico è risultato imidacloprid ($EC_{50} = 8840 \text{ ng L}^{-1}$). I dati di tossicità nel complesso evidenziano come le NOEC per il test di sviluppo larvale siano superiori rispetto alle concentrazioni ambientali per tutti i neonicotinoidi considerati. Anche nel caso delle fragranze sono stati rilevati significativi effetti sullo sviluppo larvale. In particolare, exyl-salicilato e amyl-salicilato hanno inibito significativamente lo sviluppo larvale già alla concentrazione testata più bassa (10 ng L^{-1}). Tra le altre fragranze, oranger crystals esercita significativi effetti a partire da 100 ng L^{-1} , mentre per peonile, benzil-salicilato e ambrofix un ritardo significativo nello sviluppo si registra solo intorno ai 1000 ng L^{-1} . In tutte le campagne condotte nell'ambito del Progetto Venezia2021 almeno una delle fragranze indagate ha superato le NOEC e gli EC_{20} calcolati per l'endpoint sviluppo larvale.

I neonicotinoidi si confermano particolarmente tossici per i copepodi anche dopo esposizione a lungo termine a concentrazioni in acqua di 10 e 100 ng L^{-1} , con l'eccezione di Acetamiprid che esercita i maggiori effetti, in quanto inibisce la produzione di uova, la schiusa e lo sviluppo larvale già a 10 ng L^{-1} . Thiacloprid inibisce schiusa e sviluppo larvale a partire da 10 ng L^{-1} , mentre non influisce su produzione di uova e sopravvivenza fino a 100 ng L^{-1} . Clothianidin inibisce lo sviluppo larvale della prole a 100 ng L^{-1} . Le NOEC ottenute per acetamiprid e clothianidin sottolineano come sia necessario monitorare il rischio associato all'esposizione a questi principi attivi.

I test con sedimenti contaminati artificialmente hanno messo in evidenza significativi effetti a concentrazioni di salicilati confrontabili con quelle ambientali. Nei test con copepodi, l'amyl-salicilato inibisce significativamente lo sviluppo larvale di *A. tonsa* ad una concentrazione di 10 ng g^{-1} , mentre non sono rilevabili effetti significativi né a 1 ng g^{-1} , né a 100 ng g^{-1} . Nel caso di hexyl-salicilato, non si rileva nessun effetto significativo fino a 100 ng g^{-1} mentre a 1000 ng g^{-1} si è osservata la completa inibizione dello sviluppo larvale, accompagnata da una elevata mortalità. Il benzil-salicilato presenta una significativa biostimolazione nei trattamenti da 1 ng g^{-1} fino a 100 ng g^{-1} , mentre a 1000 ng g^{-1} , la metamorfosi è stata completamente inibita. Nei test con anfipodi, effetti tossici significativi sono stati riscontrati solo per amyl-salicilato, nei confronti della produzione di prole a tutte le concentrazioni. Non sono stati rilevati effetti significativi di amyl-salicilato per gli endpoint sopravvivenza, crescita e tasso di maturazione delle femmine. Inoltre, nessun effetto è stato rilevato per benzil-salicilato e hexyl-salicilato. Dal momento che le concentrazioni di amyl-salicilato cui sono stati rilevati degli effetti sono confrontabili con quelle rilevate nei sedimenti lagunari, una diminuzione del reclutamento di nuovi individui di anfipodi legata alla presenza di questa fragranza è da considerarsi un fenomeno possibile.

I test condotti sui campioni ambientali hanno messo in evidenza una diffusa condizione di stress per le specie test selezionate. L'identificazione degli agenti causali è difficile, a causa della complessa miscela di contaminanti che caratterizza le acque superficiali e i sedimenti analizzati, in cui oltre ai contaminanti emergenti sono presenti anche contaminanti prioritari. Va, inoltre, sottolineato come le attuali conoscenze sulla tossicità dei contaminanti emergenti verso la maggior parte delle specie sperimentali impiegate in ecotossicologia sono ancora parziali. Di conseguenza, qualsiasi deduzione non può essere considerata conclusiva. Per i mitili, i dati di tossicità indicano una diffusa inibizione dello sviluppo larvale in tutti i siti di prelievo, soprattutto nella terza campagna. I dati disponibili indicano in PFOA, PFOS e diclofenac i contaminanti emergenti con il maggiore potenziale di inibire lo sviluppo larvale nelle acque superficiali della laguna di Venezia. I test con copepodi sulle acque superficiali hanno indicato una diffusa tossicità, che potrebbe essere legata alla presenza di fragranze, dal momento che in praticamente tutti i campioni risulta superato il valore di EC_{20} per l'amyl-salicilato e vi sono frequenti superamenti anche dell' EC_{20} per hexyl-salicilato. Tuttavia, non si può escludere la presenza di effetti additivi, sinergici o di potenziamento tra i contaminanti. Infine, per quanto concerne i test su sedimento, i dati di tossicità combinati ai dati di esposizione indicano un potenziale contributo delle fragranze agli effetti complessivi rilevati.

5.3 Esposizioni sperimentali di vongole e valutazione degli effetti mediante biomarkers e analisi trascrittomiche

Il Glifosato, l'erbicida più utilizzato al mondo, prende di mira l'enzima 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) nella *shikimate pathway* presente nelle piante e in alcuni microrganismi. Sebbene sia stato dimostrato che il Glifosato può indurre un'ampia gamma di effetti biologici negli organismi esposti, i meccanismi molecolari globali della tossicità e i potenziali effetti nel microbiota dell'ospite rimangono poco chiari, in particolare per specie marine ecologicamente importanti come i molluschi bivalvi. In un esperimento controllato sono stati valutati gli effetti del Glifosato, del suo prodotto di degradazione acido aminometilfosfonico (AMPA) e di una miscela di entrambi sulla cozza *Mytilus galloprovincialis*. I risultati suggeriscono che in seguito alla compromissione di diversi processi biologici e *pathway* molecolari (a causa della tossicità di AMPA e Glifosato) possono avvenire perturbazioni significative al microbiota, tra cui la diffusione di potenziali patogeni come *Vibrio* spp. La conseguente attivazione del sistema immunitario dell'ospite potrebbe essere finalizzata al controllo dei cambiamenti che si verificano nella composizione delle comunità microbiche simbiotiche. Nel complesso, i nostri dati sollevano ulteriori preoccupazioni sui potenziali effetti avversi del Glifosato e dell'AMPA nelle specie marine, suggerendo che sia gli effetti della tossicità diretta sia i conseguenti cambiamenti che si verificano nella comunità microbica dell'ospite devono essere presi in considerazione per determinare il rischio ecotossicologico complessivo di questi composti.

C'è una crescente preoccupazione per l'ampio utilizzo del PFOA a causa dei suoi effetti tossici sull'ambiente e sulla salute umana. Un nuovo composto – il cosiddetto C6O4 (perfluoro ([5-methoxy-1,3-dioxolan-4-yl]oxy)

acetic acid) – è stato recentemente introdotto da Solvay come una delle alternative al PFOA tradizionale. Tuttavia, ciò è stato fatto senza alcuna evidenza scientifica sugli effetti del C6O4 quando disperso nell'ambiente. Recentemente, ARPAV ha rilevato livelli elevati di C6O4 nelle falde acquifere e nel fiume Po, aumentando l'allarme per i potenziali effetti di questa sostanza chimica nell'ambiente naturale. Per la prima volta sono stati studiati gli effetti del C6O4 sulla vongola *Ruditapes philippinarum* esposta a concentrazioni ambientali realistiche di C6O4 ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1 \mu\text{g L}^{-1}$) per 7 e 21 giorni. Inoltre, per capire meglio se il C6O4 sia una valida e meno pericolosa alternativa al PFOA, sono state studiate anche alterazioni microbiche e trascrittomiche nelle vongole esposte a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ di PFOA. I risultati indicano che il C6O4 può causare perturbazioni significative al microbiota della ghiandola digestiva, determinando probabilmente la compromissione dell'omeostasi fisiologica dell'ospite. Nonostante le analisi chimiche suggeriscano un potenziale di accumulo 5 volte inferiore di C6O4 rispetto al PFOA nei tessuti molli delle vongole, le analisi trascrittomiche rivelano diverse alterazioni del profilo di espressione genica. Gran parte delle vie alterate, tra cui la risposta immunitaria, la regolazione dell'apoptosi, lo sviluppo del sistema nervoso, il metabolismo dei lipidi e la membrana cellulare è la stessa nelle vongole esposte a C6O4 e PFOA. Inoltre, le vongole esposte a C6O4 hanno mostrato possibili effetti narcotici o neurotossici e ridotta attivazione di geni coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici. Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che i potenziali rischi per gli organismi marini in seguito alla contaminazione ambientale non vengono ridotti sostituendo il PFOA con C6O4. Inoltre, la rilevazione sia di C6O4 sia di PFOA nei tessuti delle vongole che abitano la laguna di Venezia suggerisce una simile capacità di diffondersi nell'ambiente con potenziali rischi anche per la salute umana.

L'Amyl salicilato è una fragranza ampiamente utilizzata come *Personal Care Product*. In questo studio, è stato applicato un approccio multidisciplinare volto a studiare i potenziali effetti di questa fragranza sulle cozze mediterranee. Per raggiungere tale obiettivo, sono state effettuate analisi di bioaccumulo, cellulari, biochimiche e molecolari in cozze trattate per 7 e 14 giorni con diverse concentrazioni ambientali della laguna di Venezia ($0,1$ e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Nonostante le indagini chimiche suggeriscano una bassa capacità di bioaccumulo, le analisi cellulari e molecolari hanno evidenziato modificazioni significative in diversi processi cellulari chiave dopo esposizione prolungata alla concentrazione più elevata. In particolare, è stata osservata una potenziale immunotossicità, nonché cambiamenti nella regolazione trascrittoria di *pathway* coinvolte nel metabolismo energetico, nella risposta allo stress, nell'apoptosi e nelle regolazioni della morte cellulare. Al contrario, l'esposizione alla concentrazione meno elevata di AS ha dimostrato deboli cambiamenti trascrittomici e un aumento transitorio di specie microbiche patogene opportunistiche, come il genere *Arcobacter* e *Vibrio aestuarius*.

5.4 Analisi di rischio

Il modello multicompartimentale QWASI è stato applicato per la stima dei valori di PEC a partire dai carichi in entrata in laguna di Venezia stimati per i composti farmaceutici e per i pesticidi considerati. I dati sperimentali di concentrazione dei contaminanti in acque e sedimenti lagunari per tutte le quattro campagne sono stati utilizzati per la calibrazione del modello e per il calcolo dei valori di PEC definitivi. In particolare, dai risultati della modellistica di esposizione è risultato che le concentrazioni medie più elevate nella colonna d'acqua e nei sedimenti dei corpi idrici considerati sono quelle stimate per glifosate, imidacloprid, azitromicina e claritromicina. Inoltre è emerso che, secondo le stime modellistiche, percentuali anche significative della quantità di farmaci e prodotti fitosanitari presenti in laguna possono accumularsi nei sedimenti (si va dal 2% dell'acetamiprid al 90% del metaflumizone).

La ricerca e catalogazione dei dati ecotossicologici disponibili ha permesso per una sola sostanza, il Bisfenolo A, la determinazione probabilistica del valore di PNEC tramite utilizzo di SSD. Per tutte le altre sostanze, in base alla qualità e completezza dei dati di effetto, i valori di PNEC sono stati determinati da un'attenta selezione dell'AF più adeguato (da un massimo di 10000 – scelta più cautelativa - a un minimo di 10). Nonostante il contributo aggiuntivo fornito dai saggi ecotossicologici, questo lavoro ha evidenziato la necessità per alcuni composti di un ampliamento del dataset ecotossicologico al fine di derivare un valore di PNEC più robusto. Oltre alle lacune nei database di EHMC, ormoni e alcuni PPP (ad es., metaflumizone),

emerge la scarsità di dati di tossicità relativi alle fragranze, per le quali è stato possibile derivare il valore di PNEC solo sulla base dei test ecotossicologici condotti all'interno della Linea 2.3.

Dall'analisi di rischio di screening risultante dall'integrazione dei dati di PEC e di PNEC, i prodotti farmaceutici e i fitofarmaci sono stati suddivisi in quattro classi a seconda del grado di rischio indicato dal valore dell'Hazard Quotient. Se per alcuni inquinanti tale rapporto indicava inequivocabilmente un rischio significativo ($HQ > 1$) (è il caso di Amoxicillin, Ciprofloxacina, Triallate, Acetamiprid e Thiacloprid), l'analisi stocastica ha permesso di definire con maggior accuratezza la probabilità di essere in presenza di un potenziale rischio per l'ecosistema in situazioni che risultavano invece affette da una significativa incertezza. Nel caso infatti dei neonicotinoidi Clothianid e Imidacloprid, i cui HQ erano variabili tra 0.8 e 1, la probabilità di riscontrare una concentrazione prevista in ambiente superiore alla soglia di non effetto è risultata non trascurabile e pari rispettivamente al 23% e 53%. Essendo il rischio il risultato dell'integrazioni di due variabili, PEC e PNEC, sono stati infine identificati gli inquinanti per i quali le incertezze, legate in particolar modo alla derivazione dei valori di PNEC, possono aver influito nel calcolo del rischio. Tra le sostanze considerate, si segnalano soprattutto Imidacloprid, E2 e Azythromicin per scarsità di dati ecotossicologici. Per tali inquinanti si suggerisce un aggiornamento del database ecotossicologico, e conseguentemente della stima del rischio, non appena saranno disponibili nuovi dati di effetto su specie acquatiche marine o estuarine.

5.5 Watch List lagunare

La Watch List lagunare relativa al comparto acqua che è stata ottenuta attraverso il diagramma di flusso risulta composta da quattro prodotti fitosanitari (Imidacloprid, Clothianidin, Thiacloprid, Acetamiprid, tutti appartenenti alla classe dei neonicotinoidi), un farmaco (Diclofenac), un antibiotico (Ciprofloxacina), un prodotto industriale (EHMC), un PFAS (PFOS), e tutte le fragranze considerate (Amyl salicylate, Oranger Crystals, Hexyl Salicylate, Peonile, Ambrofix, Benzyl Salicylate). A causa dell'incertezza nella stima del rischio ad esse associato, si segnalano inoltre tre sostanze non incluse nella Watch List (EE2, Amoxicillin e Triallate) per le quali risulta fondamentale un approfondimento sulla derivazione dei PNEC e anche sul possibile miglioramento della sensibilità del metodo analitico. La capacità del rationale di coprire tutte le casiste possibili in termini di disponibilità dei dati e di loro valori fa sì che tale diagramma si presti ad essere usato anche in futuro, qualora diventassero disponibili ulteriori dati sui contaminanti studiati o su ulteriori composti.

L'applicazione di questo stesso approccio alla matrice sedimento, tuttavia, risente dell'incertezza associata alla derivazione dei valori di soglia di non effetto ($PNEC_{sed}$). Adottando l'approccio descritto, infatti, la maggior parte delle sostanze rientrerebbe nella Watch List, suggerendo come questa matrice meriti di essere inserita in future campagne di monitoraggio della qualità ambientale (soprattutto per quei contaminanti emergenti che presentano una maggiore tendenza a ripartirsi nel sedimento), nonché la necessità di ulteriori approfondimenti degli effetti ecotossicologici per poter derivare delle soglie di effetto sufficientemente robuste.

Nonostante l'evidenza fornita dalle campagne sperimentali sulla presenza e diffusione delle microplastiche in laguna, l'assenza di approcci standardizzati e condivisi sulla valutazione dell'entità di questa contaminazione e dei possibili effetti per gli ecosistemi non ha reso possibile raggiungere delle conclusioni sul rischio per l'ambiente lagunare. La conseguente mancata inclusione delle microplastiche nella Watch List solleva tuttavia la necessità di condurre ulteriori approfondimenti sia sperimentali che modellistici per l'area lagunare.

6. Obiettivi prefissati e raggiunti

Le attività realizzate nella Linea 2.3 hanno contribuito alla realizzazione degli obiettivi 4 "Indicatori" e 5 "Visione strategica" di Venezia2021 ovvero ha permesso di sviluppare degli indicatori misurabili dei possibili

cambiamenti, nonché contribuirà a sviluppare in tempi brevi una visione strategica, accurata e condivisa considerando anche gli scenari di cambiamento climatico.

I risultati di questa Linea si inseriscono nel contesto delle sfide di Venezia2021 quale ad esempio la valutazione dello stato di salute dell'ecosistema lagunare, utili quindi per definire le strategie per migliorarlo. In particolare, la Linea 2.3 si è focalizzata sulla caratterizzazione della contaminazione chimica in sette aree specifiche della laguna di Venezia con la determinazione della concentrazione di diverse classi di sostanze quali composti farmaceutici, fragranze, pesticidi e prodotti legati all'agricoltura, prodotti industriali, e microplastiche. Tali sostanze sono state determinate nelle acque superficiali e nei sedimenti in quattro diverse stagioni fornendo le prime evidenze di una possibile variazione stagionale.

Sono state quindi anche studiate per la prima volte sostanze come le microplastiche di dimensioni comprese tra $5 \mu\text{m} \leq x \leq 100 \mu\text{m}$, completamente trascurate in studi precedenti, poiché i classici sistemi di campionamento prevedono l'utilizzo della *manta trawl* con dimensioni della maglia pari a $330 \mu\text{m}$. In ogni sito di campionamento sia per matrice acqua che sedimento le microplastiche analizzate presentavano nella maggior parte dei casi dimensioni $< 100 \mu\text{m}$, con limite minimo di $5 \mu\text{m}$.

Per quanto riguarda la parte relativa ai saggi ecotossicologici *in vivo*, le attività eseguite ed i risultati ottenuti hanno consentito di identificare concentrazioni di non-effetto (NOEC) e concentrazioni di effetto (EC_{10} , EC_{20} ed EC_{50}) per un significativo numero di indicatori (mitili, anfipodi, copepodi) ed endpoint (sviluppo larvale, sopravvivenza di adulti e stadi larvali, schiusa, produzione di uova, produzione di prole) da poter utilizzare nella valutazione della possibile implicazione dei contaminanti emergenti nella tossicità misurata sulle matrici ambientali (sedimento ed acqua). Tale attività ha quindi raggiunto gli obiettivi prefissati ed ha consentito di colmare, almeno in parte, il forte gap di conoscenze che limita la valutazione dei rischi concernenti la presenza dei contaminanti emergenti oggetto dell'indagine in ambiente acquatico.

Sono stati testati gli effetti in vongole o mitili in tre diverse condizioni e miscele e sono stati inoltre testati complessivamente gli effetti di esposizione a tempi diversi di otto diverse condizioni/miscele (esposizione a Glifosato, AMPA, e alla miscela di questi; esposizione a due concentrazioni di C6O4 e PFOA; esposizione a due concentrazioni di Amyl salicilato).

L'obiettivo complessivo finale della Linea 2.3 era la definizione di una Watch List lagunare. La Watch List è frutto dell'integrazione di diverse tipologie di dati: i risultati ottenuti dalla caratterizzazione chimica preliminare dei contaminanti nelle acque e nei sedimenti della laguna (MEC), le stime di esposizione ottenute attraverso l'applicazione di un modello multicompartimentale (PEC), i dati relativi alla caratterizzazione degli effetti ecotossicologici dei contaminanti su organismi acquatici marini e estuarini, utilizzati per la derivazione di valori di PNEC. Questi dati sono stati integrati attraverso un'analisi di rischio ecologico di screening basata sul metodo degli Hazard Quotient (HQ). Sono stati inoltre definiti alcuni criteri, organizzati in un diagramma di flusso, per definire la "priorità" di inserimento di ciascuna sostanza nella Watch List. Tale diagramma si presta ad essere usato anche in futuro, qualora diventassero disponibili ulteriori dati sui contaminanti studiati o su ulteriori composti, in quanto copre tutte le casiste possibili in termini di disponibilità dei dati e di loro valori. La Watch List lagunare relativa al comparto acqua che è stata ottenuta risulta composta da quattro prodotti fitosanitari (Imidacloprid, Clothianidin, Thiacloprid, Acetamiprid, tutti appartenenti alla classe dei neonicotinoidi), un farmaco (Diclofenac), un antibiotico (Ciprofloxacina), un prodotto industriale (EHMC), un PFAS (PFOS), e tutte le fragranze considerate (Amyl salicylate, Oranger Crystals, Hexyl Salicylate, Peonile, Ambroxid, Benzyl Salicylate).

Vi sono poi delle sostanze che si è ritenuto di dover "segnalare" in quanto caratterizzate da carenze conoscitive importanti che non permettono di arrivare ad una conclusione in merito al loro inserimento nella Watch List lagunare. È questo il caso di tre contaminanti (EE2, Amoxicillina e Triallate), le cui concentrazioni rilevate non sono mai state superiori al rispettivo limite di quantificazione analitica (MQL), il quale però, allo stesso tempo, supera il valore di PNEC, rendendo così incerto il rischio calcolato. Per queste sostanze risulta fondamentale un approfondimento sulla derivazione del PNEC, per garantire che sia basato su dati per un numero sufficiente di specie, e anche sul possibile miglioramento della sensibilità del metodo analitico.

L'approccio proposto per la Watch List lagunare della matrice acqua potrebbe essere applicato anche alla matrice sedimento. Tuttavia, l'estrema scarsità di dati ecotossicologici per specie marine ed estuarine per la matrice sedimento relativamente ai contaminanti considerati ha spinto a derivare i valori di soglia di non effetto (PNEC_{sed}) a partire da quelli ottenuti per le acque, generando così una significativa incertezza nei risultati. La maggior parte delle sostanze rientrerebbe nella Watch List, suggerendo come questa matrice meriti di essere inserita in future campagne di monitoraggio della qualità ambientale (soprattutto per quei contaminanti emergenti che presentano una maggiore tendenza a ripartirsi nel sedimento) nonché la necessità di ulteriori approfondimenti degli effetti ecotossicologici per poter derivare delle soglie di effetto sufficientemente robuste, al fine di ridurre l'incertezza sulla valutazione e identificare con maggiore efficacia le sostanze che possono determinare un rischio significativo per l'ecosistema lagunare. I risultati prodotti nella linea 2.3, a partire dalla proposta di Watch List lagunare, rappresentano un primo passo per supportare una migliore comprensione e gestione dei processi di contaminazione chimica dell'ambiente lagunare.