

Linea 2.3

Contaminanti emergenti in laguna, esposizione ed effetti

A. Gambaro, E. Morabito, M. D'Amico, M. Feltracco, S. Pizzini, B. Rosso, A. Volpi Ghirardini, M. Picone, C. Bettiol, A. Bonetto, M. Boscherini, M. Cecchetto, L. Calgaro, E. Giubilato, M. Kratter, G.C. Lodi, E. Semenzin, A. Marcomini (UNIVE)

I. Bernardini, S. Iori, M.G. Marin, V. Matozzo, M. Milan (UNIPD)

E. Barbaro, F. Corami, M. Vecchiato, R. Zangrando (ISP)



Obiettivi

Linea 2.3: **Inquinanti emergenti:** composti chimici che non sono attualmente (o sono stati solo recentemente) regolamentati e su cui esistono preoccupazioni in merito al loro impatto sulla salute umana e sull'ambiente

Stato di contaminazione delle acque, sedimenti e biota della laguna di Venezia; principali sorgenti, distribuzione e destino nell'ambiente acquatico lagunare.

- Approccio sia sperimentale che modellistico.
- Attraverso la valutazione degli effetti ecotossicologici e del rischio ambientale, verranno identificate quali classi o singole sostanze richiedono di essere incluse in future attività di monitoraggio.



Watch list per la Laguna di Venezia



WP1: Valutazione della rilevanza del problema e sviluppo del modello concettuale.

Raccolta ed elaborazione di tutte le informazioni disponibili in letteratura e presso enti di riferimento relative alle analisi, alle sorgenti e i processi ambientali che coinvolgono i contaminanti emergenti considerati rilevanti per la laguna di Venezia.

Prendendo in considerazione:

- livelli di **concentrazione** degli inquinanti emergenti
- possibili **emissioni**
- diversi **metodi** di analisi
- soglie di **tossicità** acuta e cronica
- indici di **stress**



D2.3.1 Analisi della letteratura relativa alla chimica, all'ecotossicologia ed al rischio dei contaminanti emergenti

WP2: Caratterizzazione dell'esposizione

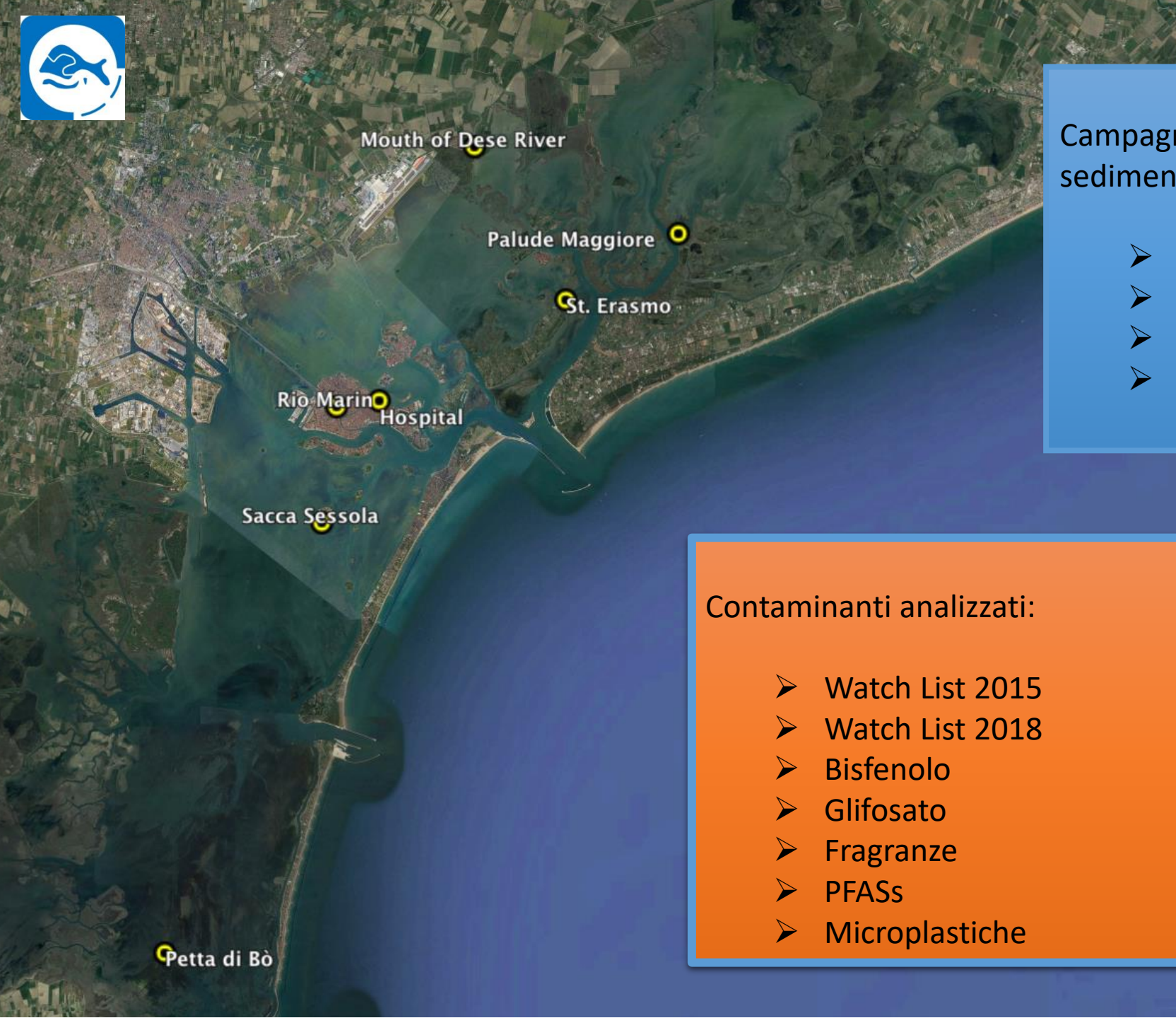
➤ **Messa a punto dei metodi analitici**



M2.3.2.1 Nuovi metodi analitici per la determinazione e quantificazione di alcune classi di inquinanti emergenti

D2.3.2.2 Messa a punto di metodi analitici per inquinanti emergenti

- Pianificazione e organizzazione del campionamento; preparazione del campione;
- **4 campagne** di campionamento di acqua e sedimento lagunari, in **7 siti** diversi
- Analisi di inquinanti emergenti in acqua e sedimento ed elaborazione dati



Campagne di campionamento di acqua e sedimento:

- Aprile-maggio 2019 - **primavera**
- Ottobre-novembre 2019 - **autunno**
- Luglio 2020 - **estate**
- Gennaio 2021 – **inverno**

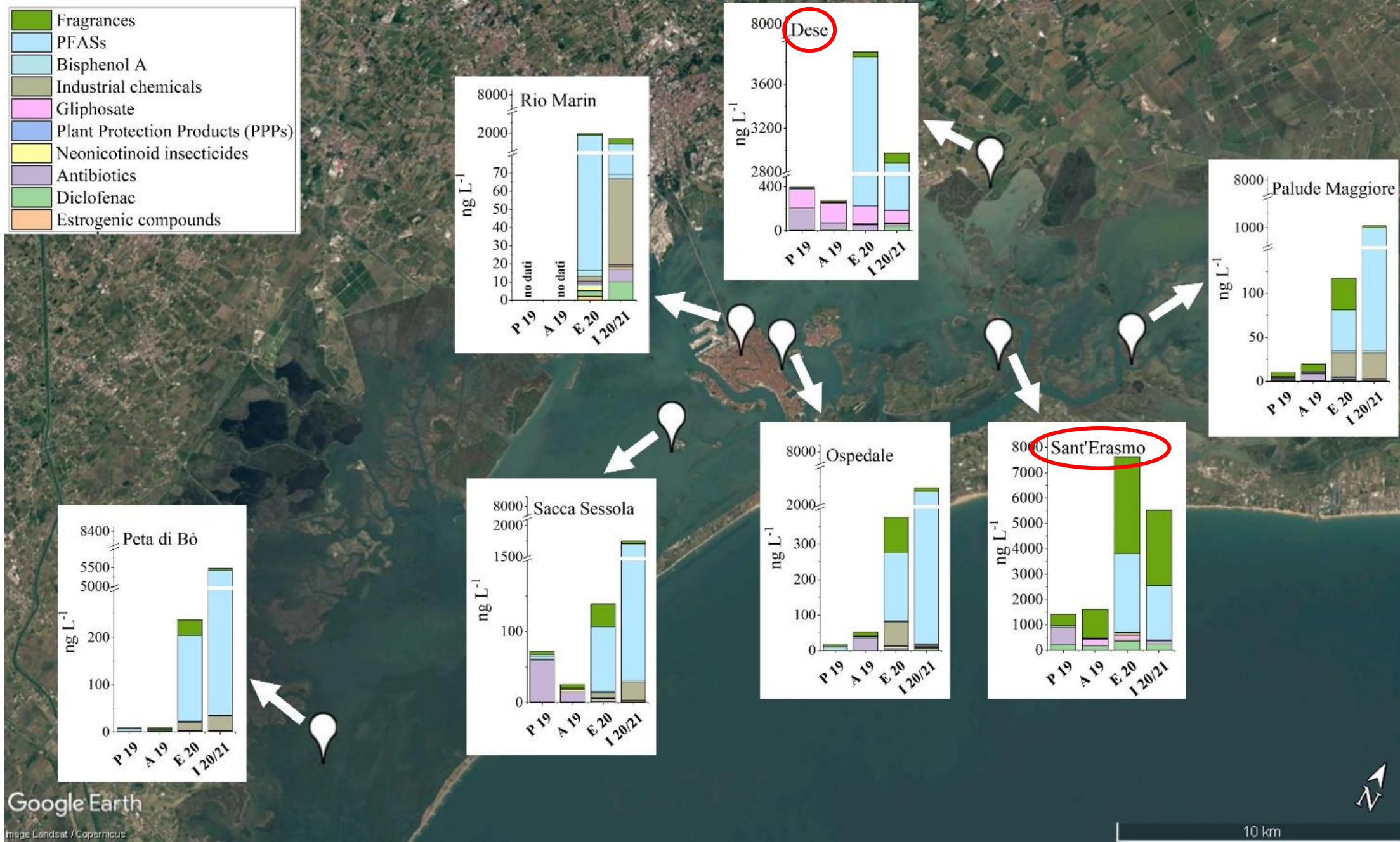
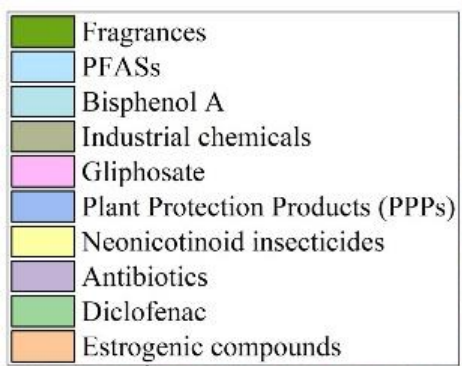
Contaminanti analizzati:

- Watch List 2015
- Watch List 2018
- Bisfenolo
- Glifosato
- Fragranze
- PFASs
- Microplastiche

		Acqua (ng/L)				Sedimento (ng/kg)					
		Min	Max	Quantification frequency (%)	Letteratura	Min	Max	Quantification frequency (%)	Letteratura		
Estrogenic compounds	EE2	<0,1	<0,1	0	<0,8-112	LW	<580	<580	0	<2000-41000	LV
	E2	<1,31	<1,31	0	<1,0-	LW	<700	1637	17	<0,3	LW
	E1	<0,63	4,15	27	<1,2-85	LW	<620	9082	58	<1,6-4,4	SW
	Diclofenac	<0,55	371	38	<3.3-150	FW	<720	<720	0	<0,1-3,36	FW
Antibiotics	Amoxicillin	<69,1	<69,1	0			<134800	<134800	0		
	Ciprofloxacin	<6,91	678	15			<17100	<17100	0		
	Erythromycin	<0,44	53,5	23	<0,1-43	FW	<640	8765	75	<0,5-36	FW
	Clarithromycin	<0,46	193	35	<0,3-28	FW	<960	5366	8	<0,8-10	FW
	Azithromycin	<1,38	<1,38	0			<1950	3210	42		
Neonicotinoid insecticides	Imidacloprid	<0,014	40,4	85	<50-480	FW	<29,4	<29,4	0	0,04-1,33	FW
	Clothianidin	<0,01	1,55	81	0,55-103	FW	<2,41	60,3	8	<0,002-1,91	FW
	Thiacloprid	<0,001	0,39	88	<0,05-9,35	FW	<0,51	54,3	12	0,01-0,11	FW
	Thiamethoxam	<0,011	1,97	73	6,21-145	FW	<2,98	12,7	27	<0,001-2,13	FW
	Acetamiprid	<0,004	2,64	92	3,13-67,6	FW	<0,60	51,8	15	<0,003-5,33	FW
Plant Protection Products (PPPs)	Methiocarb	<0,62	1,27	4			<780	<780	0		
	Oxadiazon	<0,76	2,83	19			<920	<920	0		
	Metaflumizone	<1,43	<1,43	0			<1510	<1510	0		
	Triallate	<4,9	<4,9	0			<6434	<6434	0		
Industrial chemicals	BHT	<1,7	104,3	42	25-620	FW	<655	17397	54	0,09-6,93 ng/kg	
	EHMC	<0,15	22,40	77	<1,0-106	SW	<469	4890	31	0,9-26,2	SW
	Bisphenol A	<0,14	47	88	<30-140	FW	320	130133	69	2000-118000	LW
	Gliphosate	<7	260	27	<100-11000	FW	<700	15000	23	0,25-1,38 ng/kg	FW
PFASs	PFHpA	<0,37	373,00	81	<5	LW	<18,7	556	50	0,39-1,06	FW
	PFOA	<0,72	2302	81	<5	LW	<62,3	423	19	0,15-6,69	FW
	PFNA	<0,08	653	88	<5	LW	<11,2	204	38	0,02-3,63	FW
	PFDA	<0,28	1472	73	<5	LW	<26,7	150	23	0,025-4,76	FW
	PFUnA	<0,01	1356,0	88	<5	LW	<16,2	<16,2	0	0,043-0,084	FW
	PFDoA	<0,01	564	35	<5	LW	<12,1	234	23	0,013-0,027	FW
	PFOS	<0,55	1077	54	0,65-1,68	LW	<48,8	224	27	0,027-9,83	FW
Fragrances	Amyl Salicylate	<0,26	860	73	1,7-6750		<0,26	11075	81		
	Amyl Salicylate	<0,25	463,2	81			<0,25	9717	81		
	Oranger Crystals	<0,17	278,4	62	1,3-190		<0,17	3009	38		
	Hexyl Salicylate	0,38	587,20	100	5,2-3390		500	12332	81		
	Peonile	0,5	1151	100	11-2250		351	6153	65		
	Ambrofix	0,37	279,2	100	4,2-304		758	5322	46		
	Benzyl Salicylate	<0,27	456	62	1,1-2400		<0,27	1780	73		



ACQUA

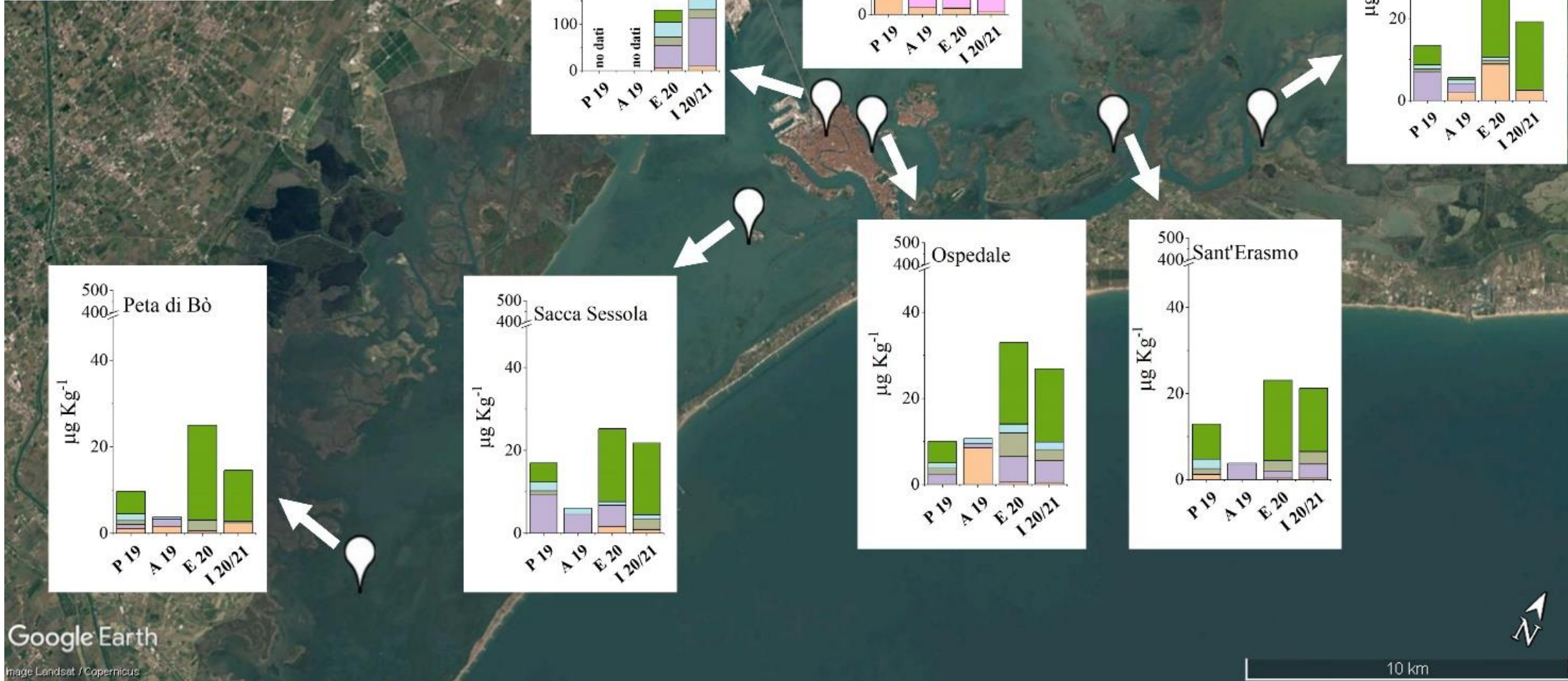


Concentrazioni di vari inquinanti emergenti nelle acque della laguna di Venezia in quattro stagioni (P 19 = primavera 2019; A 19 = autunno 2019; E 20= estate 2020; I 20/21 = inverno 2020/2021).



SEDIMENTO

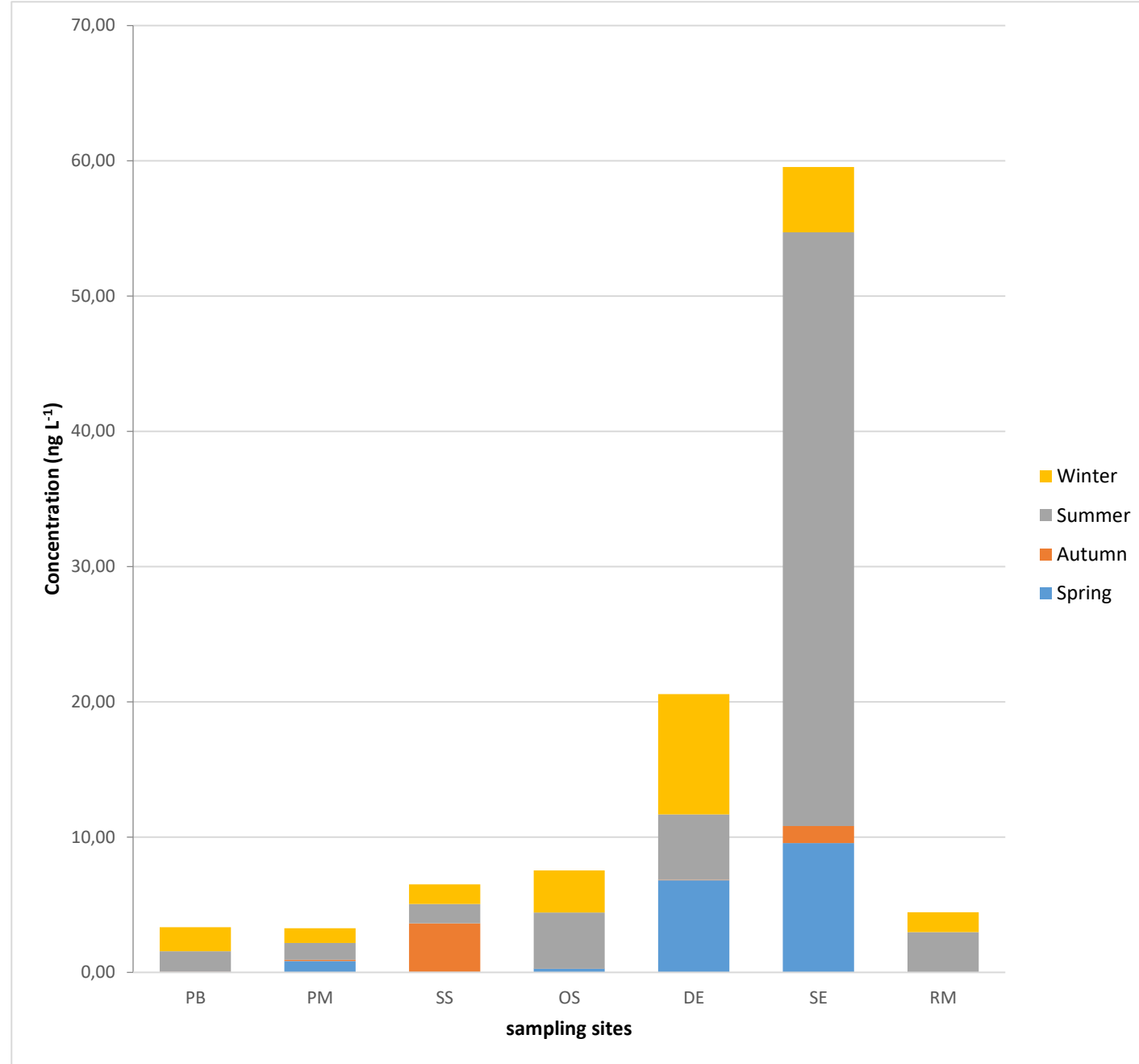
- Fragrances
- PFASs
- Bisphenol A
- Industrial chemicals
- Glyphosate
- Plant Protection Products (PPPs)
- Neonicotinoid insecticides
- Antibiotics
- Diclofenac
- Estrogenic compounds



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 2020/21).

Neonicotinoidi nelle acque (ng/L)

- Two HPLC-MS/MS analytical methods were developed for the determination of Imidacloprid, Clothianidin, Thiacloprid, Thiamethoxam and Acetamiprid in water and sediments.
- In both waters and sediments, the higher total concentrations were registered in spring 2019 and summer 2020 while the lower in autumn 2019 and winter 2020-21. This difference may be due to the seasonal agricultural application of these compounds: these systemic insecticides, are used to protect plants from insect attack.
- The most contaminated sites were S. Erasmo and the Dese River.



Total concentration (in ng L⁻¹) of neonicotinoid insecticides in the waters in the seven sampling sites during the four seasons investigated.

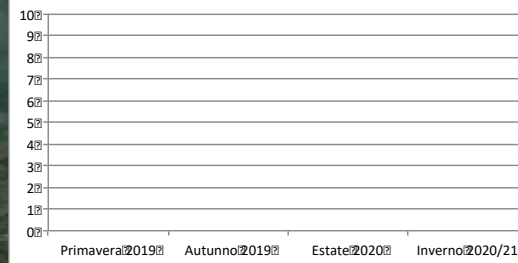


Foce Dese



Mouth of Dese River

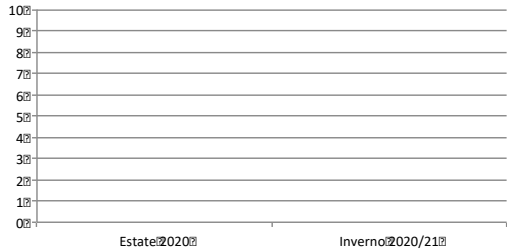
Palude Maggiore



Palude Maggiore

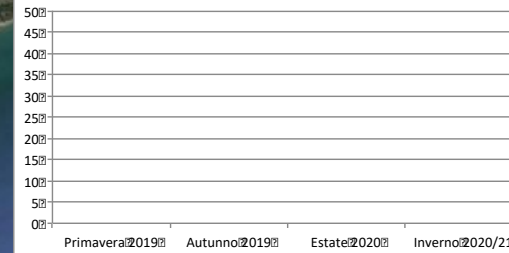
St. Erasmo

Rio Marin



Rio Marino Hospital

Sant'Erasmo

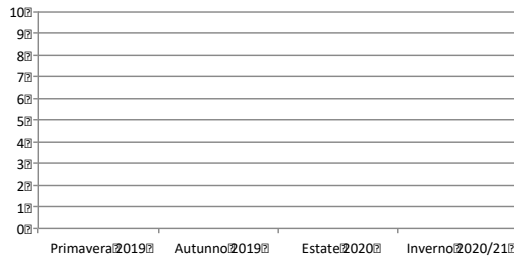


Ospedale



Sacca Sessola

Sacca Sessola



Neonicotinoidi nelle acque (ng/L)

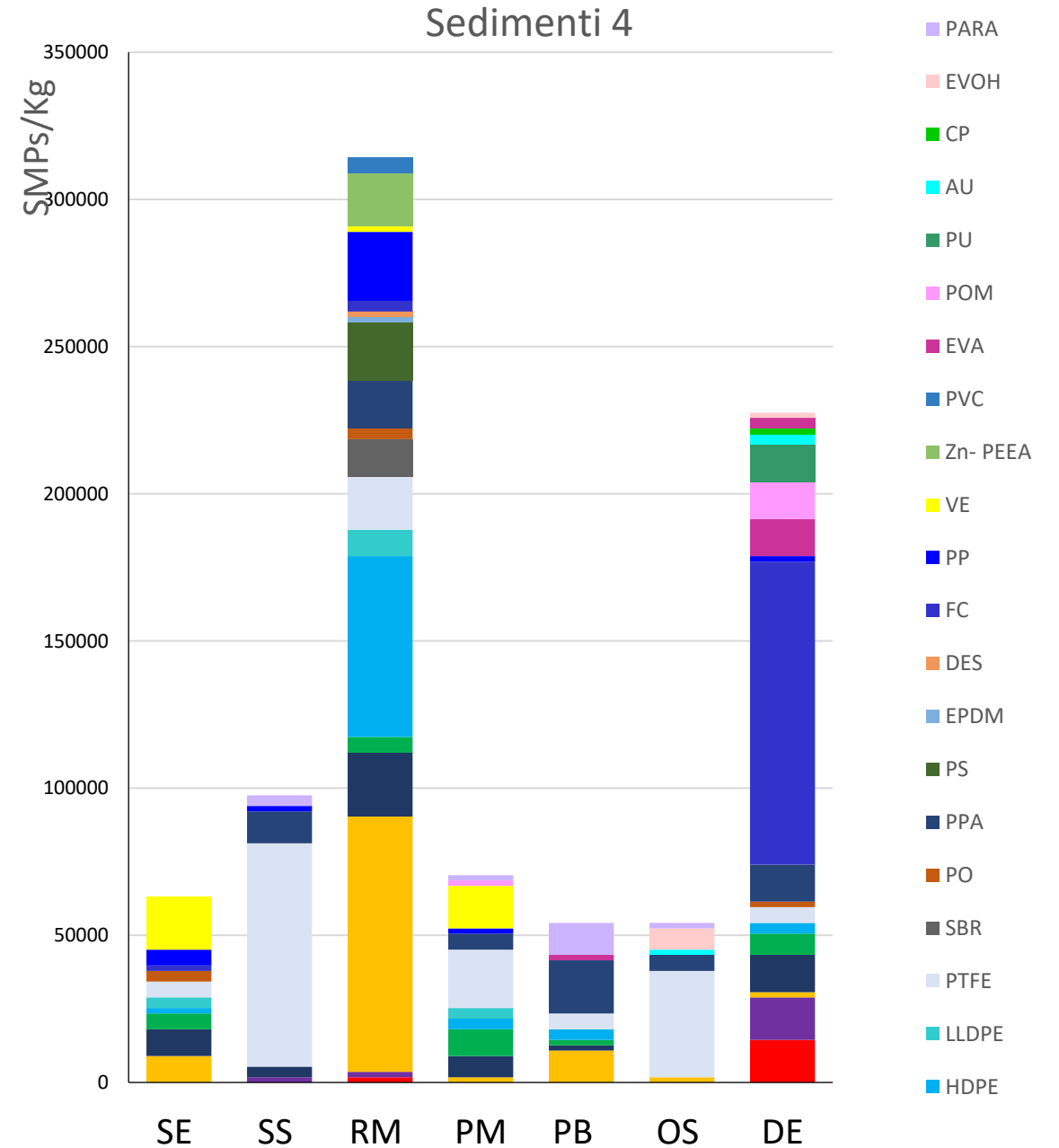
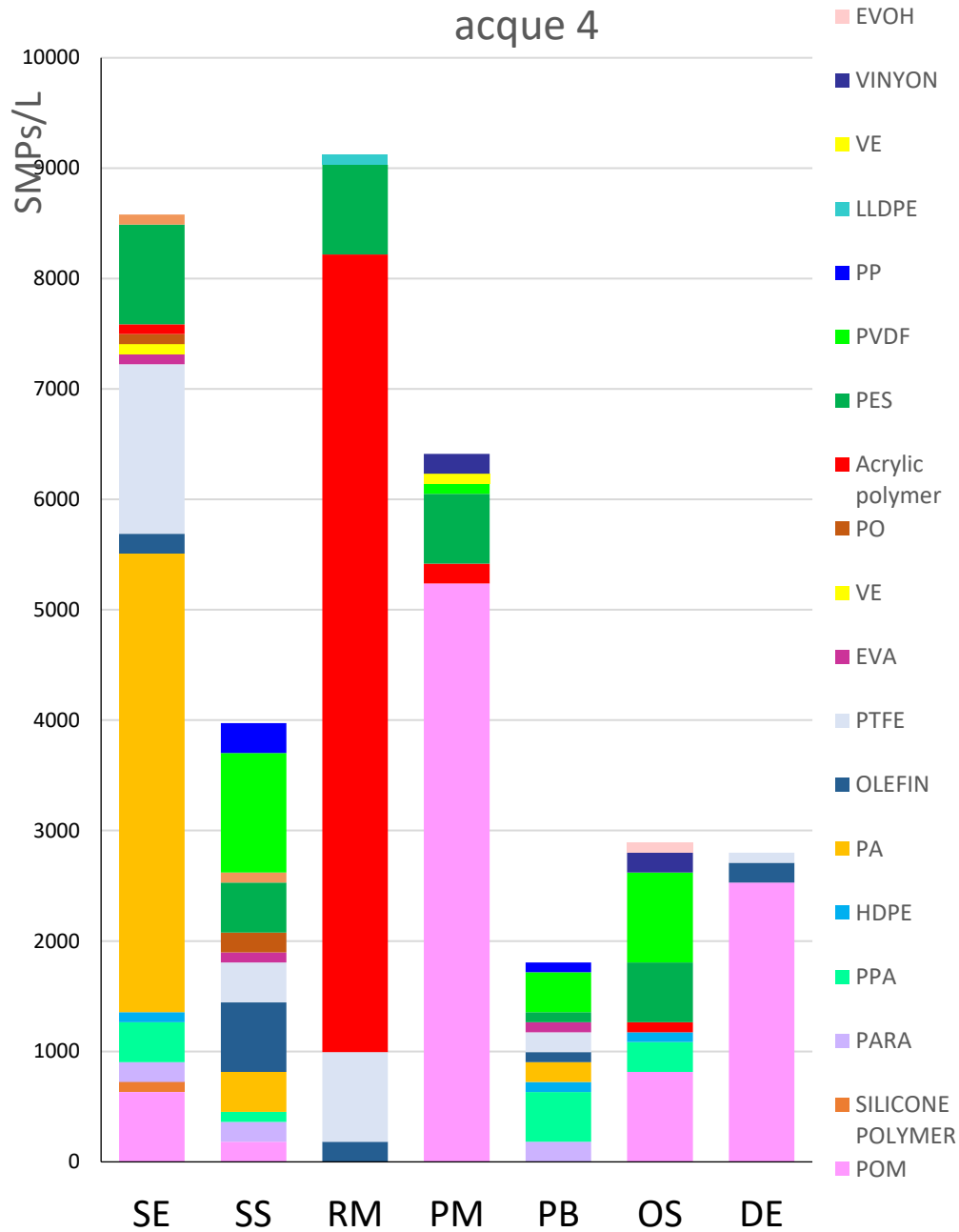
Petta di Bò



Petta di Bò

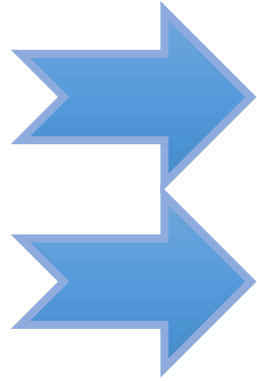
- Acetamiprid
- Thiamethoxam
- Thiacloprid
- Clothianidin
- Imidacloprid

Tra i più abbondanti, sono presenti: il polietilene (PE HD, Alta Densità), i polimeri fluorurati, i polimeri acrilici, la Poliftalammide (PPA), la poliammide 6 (PA 6) e Poliolefina (PO).





WP3: Caratterizzazione degli effetti dei contaminanti emergenti



D2.3-Risultati preliminari delle prime due campagne di campionamento e dei primi test ecotossicologici

M2.3.3.1 Completamento della esposizioni controllate in vongole

Una prima fase di valutazione della tossicità dei contaminanti emergenti (CE) è stata effettuata con il saggio di sviluppo larvale con bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*) ed ha evidenziato una scarsa sensibilità delle prime fasi vitali del mitilo ai CE analizzati, con l'eccezione del triallato.

Come successivo approfondimento, sono stati valutati gli effetti di fragranze e neonicotinoidi sullo sviluppo larvale del copepode *Acartia tonsa*, uno dei principali componenti della comunità zooplanctonica delle lagune nord adriatiche

Risultati test di sviluppo larvale (subcronico) con molluschi bivalvi ($\mu\text{g L}^{-1}$)

		<i>EC</i> ₅₀	<i>NOEC</i>
neonicotinoidi	imidacloprid	> 10,000	1,000
	acetamiprid	> 10,000	10,000
	clotianidin	> 10,000	100
	thiametoxam	> 10,000	1,000
	thiacloprid	> 10,000	100
carbammati	methiocarb	> 10,000	1,000
fragranze	hexyl salicylate	2,421	100
	ambrofix	2,540	1,000
	peonile	2,632	1,000
	benzyl salicylate	2,620	100
	orange crystals	> 10,000	1,000
	amyl salicylate	1,551	100
farmaci e antibiotici	diclofenac	8,900	0.01
	ciprofloxacina	> 10,000	1
	clarithromycin	3,701	1,000
	erythromycin	> 10,000	> 10,000
	amoxicillin	> 10,000	1
erbicidi	oxadiazon	2,734	1,000
	triallate	505	0.1



Test cronico con copepodi (*Acartia tonsa*) su neonicotinoidi

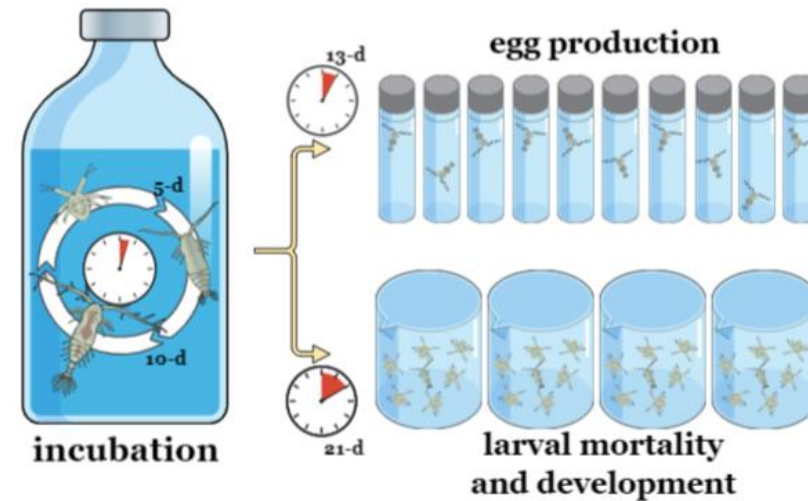
Thiamethoxam

Produzione di uova: nessun effetto significativo

Tasso di schiusa: nessun effetto significativo

Mortalità larvale: nessun effetto significativo

Larval development ratio (LDR): nessun effetto significativo



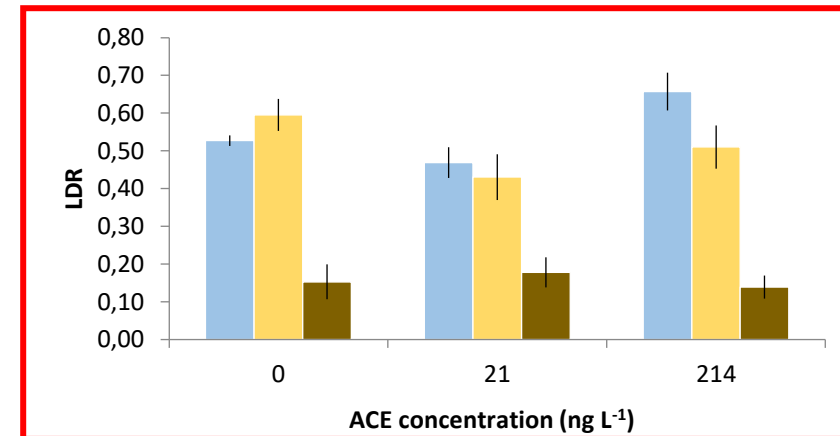
Acetamiprid

Produzione di uova: ridotta produzione in entrambe le colture con ACE rispetto al controllo

Tasso di schiusa: ridotta schiusa rispetto a controllo a 214 ng L⁻¹

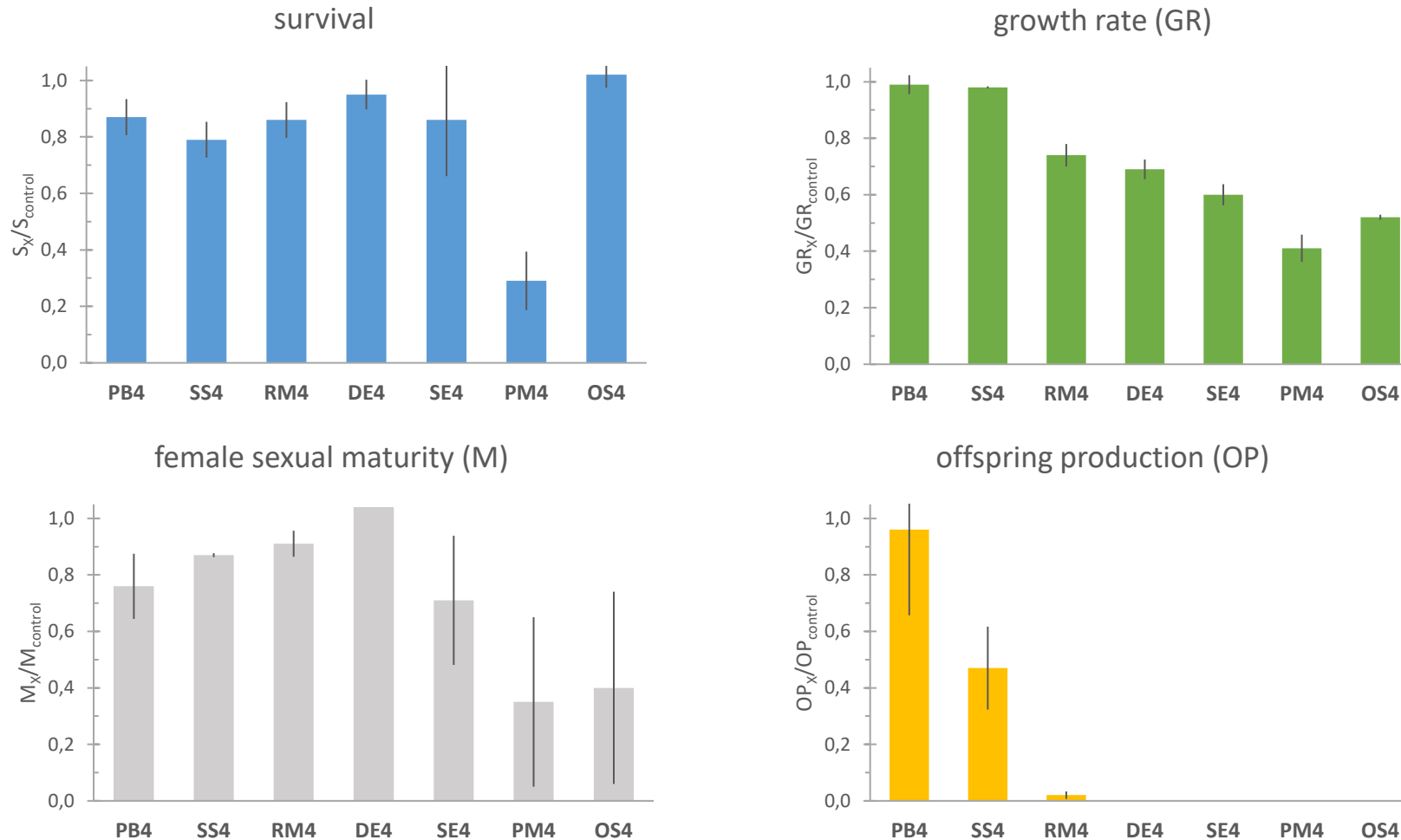
Mortalità larvale: nessun effetto significativo,

Larval development ratio (LDR): significativo ritardo di sviluppo nelle larve nate da uova prodotte dalla coltura mantenuta a 214 ng L⁻¹,





Test cronico con anfipodi (*Monocorophium insidiosum*) su sedimenti naturali



I sedimenti non influiscono significativamente sulla sopravvivenza degli anfipodi (tranne PM4), mentre si evidenziano ritardi nel tasso di crescita (RM, DE, SE, PM e OS), nella maturazione sessuale (PM e OS), e nella riproduzione (SS, RM, DE, SE, PM, OS) mettendo in evidenza l'esistenza di multipli effetti subletali.

Ecotoxicological risk assessment for the herbicide glyphosate and its degradation product ampa: analysis of host and microbiota response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*

Environmental Research 182 (2020) 108984

Contents lists available at ScienceDirect



Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

Mytilus galloprovincialis



Tempo di esposizione
7 – 21 giorni

- 100 µg/l Glyphosate
- 100 µg/l AMPA
- 100 µg/l Glyphosate + 100 µg/l AMPA (MIX)

The effects of glyphosate and AMPA on the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and its microbiota

S. Iori^{a,1}, G. Dalla Rovere^{a,1}, L. Ezzat^b, M. Smits^a, S.S. Ferrareso^a, M. Babbucci^a, M.G. Marin^c, L. Masiero^c, J. Fabrello^c, E. Garro^a, L. Carraro^a, B. Cardazzo^a, T. Patamello^a, V. Matozzo^c, L. Bargelloni^{a,d,1}, M. Milan^{a,d,*1}

Risultati principali

(analisi chimiche, biochimiche, cellulari e molecolari)

- Simili alterazioni in processi biologici chiave per i mitili nei trattamenti con glifosate e AMPA
- Modificazioni del microbiota principalmente in seguito all'esposizione a glifosato. Aumento di patogeni opportunisti in entrambi i trattamenti (*Vibrio spp*) con conseguente attivazione del sistema immunitario dell'ospite
- Modificazioni nelle regolazioni sinaptiche e neurotrasmettitori
- Attivazione di *pathways* molecolari coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici e modificazioni nel metabolismo energetico

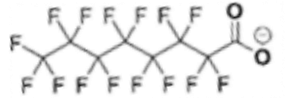
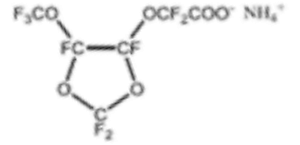
The new PFAS C6O4 and its effects on marine invertebrates: first evidence of transcriptional and microbiota changes in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*

Ruditapes philippinarum



Tempo di esposizione
7 – 21 giorni

- 0.1 µg/l C6O4
Perfluoro([5-methoxy-1,3-dioxolan-4-yl]oxy) acetate
- 1 µg/l C6O4
- 1 µg/l PFOA
Perfluorooctanoic acid



Risultati principali

(analisi chimiche, biochimiche, cellulari e molecolari)

- Minor bioaccumulo di C6O4 rispetto a PFOA. Presenza di C6O4 anche in vongole campionate in Laguna di Venezia
- Simile alterazione della composizione microbica nelle vongole trattate con C6O4 e PFOA
- Alterazione di *pathways* molecolari coinvolte nel sistema immunitario, membrane cellulari, apoptosi, *proteins turnover*, metabolismo degli xenobiotici e sviluppo del sistema nervoso in entrambi i trattamenti
- Possibile neurotossicità del C6O4



Stima dei valori di Predicted Effect Concentration (PEC)

E' stata stimata l'emissione media annuale dei seguenti contaminanti:



Farmaci

Anti-infiammatori non steroidei

- Diclofenac (DIC)

Antibiotici penicillinici

- Amoxicillina (AMO)

Antibiotici chinolonici

- Ciprofloxacina (CIP)

Antibiotici macrolidi

- Eritromicina (ERY)
- Claritromicina (CLA)
- Azitromicina (AZI)

Ormoni

- 17-alfa-etinilestradiolo (EE₂)
- 17-beta-estradiolo (E₂)
- Estrone (E₁)



Fitofarmaci

Pesticidi

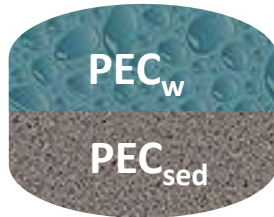
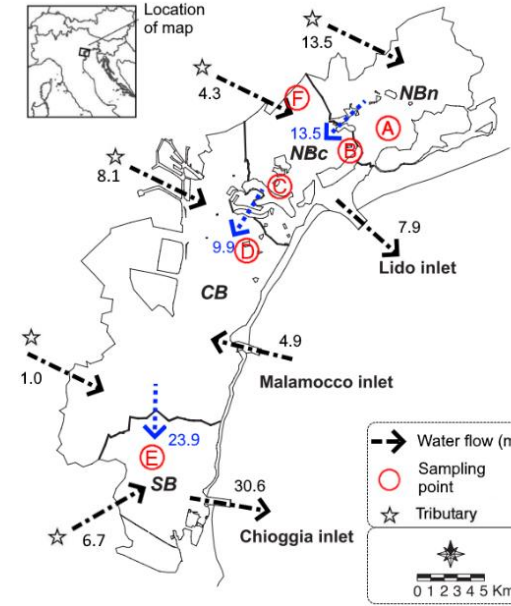
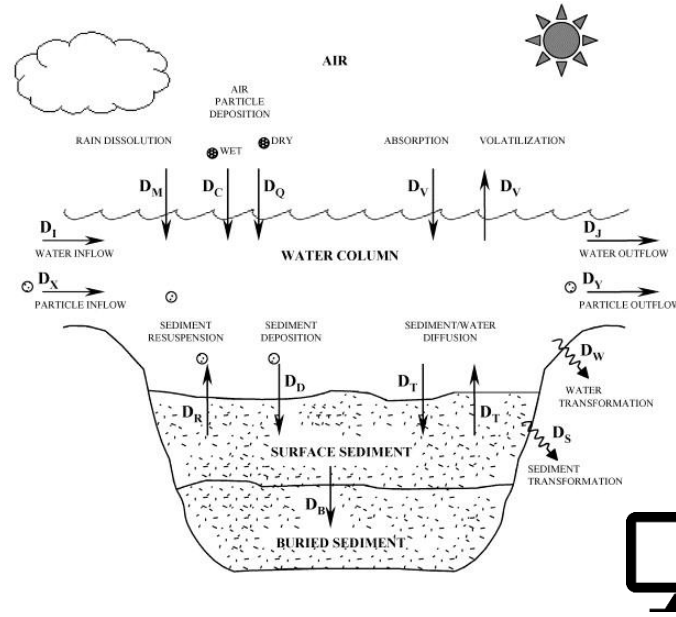
- Metiocarb (MTC)
- Metaflumizone (MTF)

Erbicidi

- Glifosato (GLY)
- Triallato (TRI)
- Oxadiazon (OXA)

Insetticidi Neonicotinoidi

- Acetamiprid (ACE)
- Clothianidin (CLO)
- Imidacloprid (IMI)
- Thiacloprid (TCLO)
- Thiametoxam (TMX)

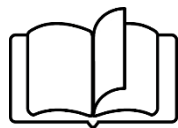


Glifosato è il fitofarmaco emesso in maggiore quantità, seguito da due insetticidi neonicotinoidi. I farmaci più utilizzati sono gli antibiotici, in particolare amoxicillina e claritromicina. Sono state stimate anche elevate emissioni di ormoni da attività di allevamento animale.

Con un **modello multi-compartimentale** di distribuzione e trasporto dei contaminanti sono stati descritti i flussi dei contaminanti emergenti tra i compartimenti ambientali. Sono così state calcolate le concentrazioni in acqua e nei sedimenti (PEC) dei contaminanti emergenti per ognuno dei quattro sottobacini in cui è stata divisa la laguna. I risultati delle quattro campagne di campionamento (conc. in acqua e sedimento) sono stati usati per la calibrazione del modello.

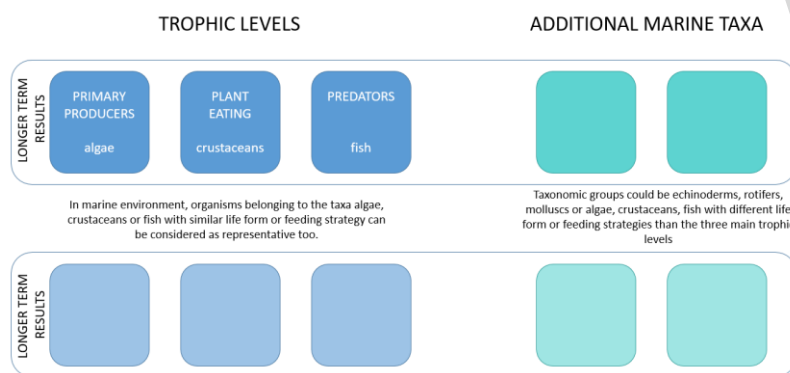


Stima dei valori di Predicted No Effect Concentration (PNEC)



Raccolta dei **dati ecotossicologici** per specie di acque marine e di transizione relativi ai contaminanti emergenti selezionati nella Linea 2.3, a partire da **database internazionali e pubblicazioni peer-review**

Integrazione delle **evidenze sperimentali** ottenute su specie locali *Acartia Tonsa* e *Mytilus galloprovincialis* per antibiotici, PPPs e fragranze nell'ambito del **WP2.3.3**



Valutazione e selezione dei dati in base ad una serie di criteri (regolamento REACH No 1907/2006) (ad es., qualità dello studio, endpoint tossicologico, livello trofico)

PNEC_w

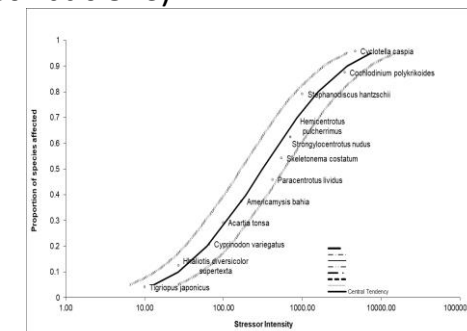
PNEC_{sed}

Derivazione di PNEC per le acque con:

- metodo deterministico (applicazione di **fattori di incertezza**)
- probabilistico* (**Species Sensitivity Distributions**)

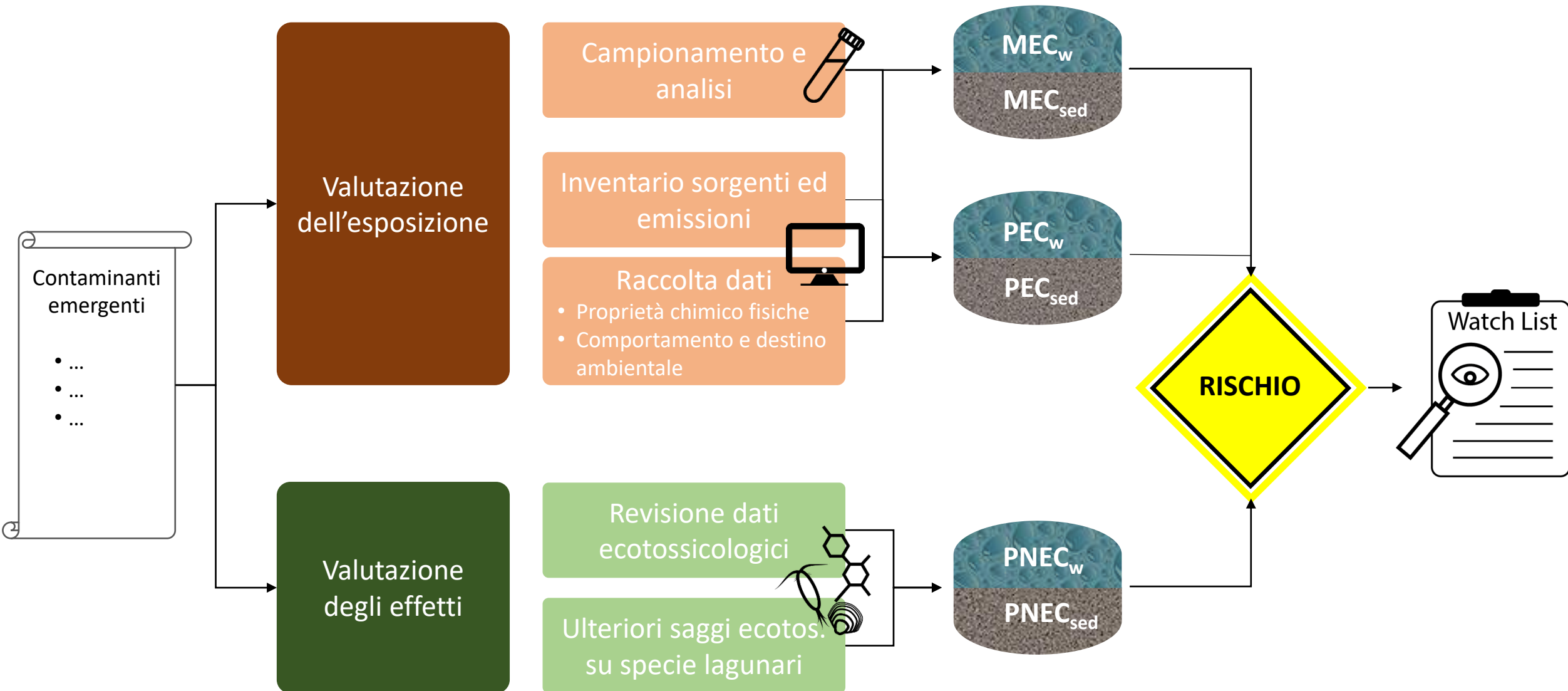
*solo per bisfenolo A

In assenza di dati ecotossicologici, per i **sedimenti** i valori di PNEC sono stati derivati a partire da quelli definiti per le acque basandosi sull'equilibrio di ripartizione (ECHA, 2008)





WP4 Valutazione del rischio associato all'esposizione degli organismi lagunari a contaminanti emergenti





$$\frac{\overline{MEC}}{PNEC} \geq 1$$

SI

NO

$$MQL > PNEC$$

Tutte MEC < MQL

SI

NO

Da segnalare

- PNEC con pochi dati?
- Metodi analitici?

PEC
DISPONIBILE

SI

NO

$$\frac{PEC_{95\%}}{PNEC} \geq 1$$

SI

NO

3 sostanze:

- EE2
- Amoxicillin
- Triallate

Watch list

- $\frac{\overline{MEC}}{PNEC} \geq 1$
- $\frac{PEC_{95}}{PNEC} \geq 1$

5 sostanze:

- Imidacloprid
- Clothianidin
- Thiacloprid
- Acetamiprid
- Ciprofloxacina

Watch list

- $\frac{\overline{MEC}}{PNEC} \geq 1$
- $\frac{PEC_{95}}{PNEC} < 1$

1 sostanza:

- Diclofenac

Watch list

$$\frac{\overline{MEC}}{PNEC} \geq 1$$

6 sostanze:

- Amyl salicylate
- Oranger Crystals
- Hexyl Salicylate
- Peonile
- Ambrofix
- Benzyl Salicylate

Watch list

- $\frac{MEC_{max}}{PNEC} \geq 1$
- $\frac{PEC_{95}}{PNEC} \geq 1$

0 sostanze

PEC
DISPONIBILE

SI

NO

$$\frac{PEC_{95\%}}{PNEC} \geq 1$$

SI

NO

Watch list

- $\frac{MEC_{max}}{PNEC} \geq 1$
- $\frac{PEC_{95}}{PNEC} \geq 1$

0 sostanze

Watch list

- $\frac{MEC_{max}}{PNEC} \geq 1$
- $\frac{PEC_{95}}{PNEC} < 1$

0 sostanze

$$\frac{MEC_{max}}{PNEC} \geq 1$$

SI

NO

PEC
DISPONIBILE

SI

NO

$$\frac{PEC_{95\%}}{PNEC} \geq 1$$

SI

NO

Watch list

$$\frac{MEC_{max}}{PNEC} \geq 1$$

2 sostanze:

- EHMC
- PFOS

Watch list

- $\frac{MEC_{max}}{PNEC} < 1$
- $\frac{PEC_{95}}{PNEC} \geq 1$

0 sostanze

PEC
DISPONIBILE

SI

NO

$$\frac{PEC_{95\%}}{PNEC} \geq 1$$

SI

NO

NO WL

$$\frac{MEC_{max}}{PNEC} < 1$$

2 sostanze:

- Bisphenol A
- PFOA

NO WL

- $\frac{MEC_{max}}{PNEC} < 1$
- $\frac{PEC_{95}}{PNEC} < 1$

10 sostanze:

- E2
- E1
- Erythromycin
- Clarithromycin
- Azithromycin
- Thiametoxan
- Methiocarb
- Oxadiazon
- Metaflumizone
- Glyphosate

* In azzurro le sostanze aggiunte rispetto alla WL europea



Definiti i criteri di inclusione nella WL lagunare riassunti in un flow chart

Watch list laguna VE

14 sostanze:

- Imidacloprid
- Clothianidin
- Thiacloprid
- Acetamiprid
- Ciprofloxacina
- Diclofenac
- EHMC
- PFOS
- Amyl salicylate
- Oranger Crystals
- Hexyl Salicylate
- Peonile
- Ambrofix
- Benzyl Salicylate

NO Watch list laguna VE

12 sostanze:

- E2
- E1
- Erythromycin
- Clarithromycin
- Azithromycin
- Thiametoxan
- Methiocarb
- Oxadiazon
- Metaflumizone
- Glyphosate
- Bisphenol A
- PFOA



3 sostanze:

- EE2
- Amoxicillin
- Triallate