



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**IMPATTO DELL'ESTRAZIONE MINERARIA SU STATO TROFICO E
DIVERSITA' DEI MICROEUCARIOTI NEGLI AMBIENTI MARINI
PROFONDI**

**IMPACT OF MINING ACTIVITIES ON TROPHIC STATE AND
MICROEUKARYOTE DIVERSITY IN DEEP-SEA ECOSYSTEMS**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Gabriele Colombini

Relatore.

Prof. Antonio Dell'Anno

Correlatore:

Dott. Gabriella Luongo

**Sessione Straordinaria Febbraio 2024
Anno Accademico 2022/2023**

Abstract

The increasing demand for raw materials has drawn attention to polymetallic nodules as a resource for precious metals, especially for the presence of rare earth elements. The study area is located in licensed areas by the International Seabed Authority (ISA) for the exploration of polymetallic nodules to Germany (German Area, 4100m) and Belgium (Belgian Area, 4500m) in the Clarion-Clipperton Zone (CCZ). In 2021, a prototype collection system, Patania II, was tested in the German and Belgian Areas. Here, we investigated the impact of the collector on the trophic status and benthic microeukaryotic communities caused by mining activities. Organic matter and microeukaryotic communities in sediment were analyzed during three oceanographic cruises conducted in the 2019, 2021 and 2022. Study areas included an undisturbed Reference Area and a Trial Area where the trial experiment took place. In 2022, 5 stations were sampled at increasing distances from the Trial Area to assess plume redeposition impact. The collector, Patania II, by removing the top sediment layers, reduced the concentrations of phytopigments and biopolymeric carbon and caused food depletion that persisted even after 18 months. Along the plume redeposition gradient, a homogenization of the top 5 cm was observed in the stations closer to the Trial Area, suggesting potential changes in biogeochemical processes and biological recolonization. In the short term, no significant differences were observed in the microeukaryotic communities. However, after 18 months, significant differences were observed in the Trial Area and in the sites adjacent to the Trial Area which were affected by the redeposition of the plume compared to those observed before the mining impact. These new trophic conditions might have allowed the colonization of different communities.

Riassunto

La crescente domanda di materie prime ha portato i noduli polimetallici sotto i riflettori come una delle risorse di metalli più interessanti dal punto di vista industriale, specialmente per quanto riguarda le terre rare in essi contenute.

La Clarion Clipperton Zone (CCZ), collocata nel Pacifico equatoriale, a una profondità compresa tra i 4000 m e i 5500 m, rappresenta il deposito più esteso di noduli polimetallici sul pianeta. Qui, nel 2021, è stato testato un sistema prototipale di raccolta di noduli, Patania II, in due aree diverse, una in concessione alla Germania e l'altra al Belgio. L'obiettivo di questo lavoro è quello di indagare il potenziale impatto, nel breve termine e a distanza di 18

mesi, sullo stato trofico e sulle comunità microeucariotiche bentoniche determinato dalle attività di mining. In particolare, sono state svolte analisi sulla quantità e la composizione della materia organica (in termini di proteine, carboidrati, lipidi e pigmenti) e sulle comunità microeucariotiche nel sedimento. I campionamenti si sono svolti durante tre campagne oceanografiche (la prima nel 2019, poi nel 2021 e l'ultima nel 2022) e hanno interessato, sia per l'area Tedesca che per l'area Belga, una sub-area utilizzata come *baseline* (Reference Area) lontana da disturbi antropici e una sub-area interessata dall'attività di mining (Trial Area). Durante la campagna oceanografica del 2022, inoltre, sono state campionate stazioni a distanza crescente dall'area dell'impatto (*plume redeposition gradient*). Il collettore, rimuovendo i primi centimetri di sedimento ha determinato una diminuzione significativa delle concentrazioni di fitopigmenti e carbonio biopolimerico causando una "*food depletion*" che ha coinvolto i primi 5 cm di sedimento; non si sono inoltre osservati segnali di ripresa nei 18 mesi successivi. L'effetto di Patania II ha coinvolto anche aree adiacenti a quella della Trial Area a seguito della risospensione e rideposizione dei sedimenti. Infatti, nei siti interessati dalla rideposizione della plume, in particolare nella stazione immediatamente al di fuori della Trial Area, non è stata osservata la tipica stratificazione che caratterizza i siti lontani dall'impatto. Questa omogenizzazione dei primi 5cm di sedimento potrebbe determinare potenziali alterazioni nei cicli biogeochimici e influenzare i processi di ricolonizzazione biologica.

L'attività estrattiva non ha determinato effetti significativi nel breve termine sulla composizione della comunità microeucariotica. Le uniche differenze rilevate riguardano alcuni taxa fitoplanctonici (Dinophyceae e Chlorophyceae) rappresentativi del fitodetrito, diminuiti per il rimescolamento meccanico del sedimento. A distanza di 18 mesi, invece, le nuove condizioni trofiche che si sono delineate hanno permesso la colonizzazione di una comunità microeucariotica significativamente diversa rispetto alla comunità osservata prima del passaggio di Patania II. Allo stesso modo, la rideposizione della plume nei siti immediatamente al di fuori della Trial Area ha contribuito alla formazione di una comunità microeucariotica che differisce significativamente dalle comunità nei siti non coinvolti dalle attività di mining. In conclusione, i risultati riportati evidenziano come l'estrazione mineraria in ambienti profondi possa determinare importanti cambiamenti sullo stato trofico del sistema nei primi 5cm di sedimento, e sulle comunità microbiche bentoniche di sedimento

coinvolgendo sia l'area interessata dalle attività del collettore sia i siti attorno ad essa lungo il gradiente di rideposizione dei sedimenti risospesi fino a 500m di distanza.

Sommario

Premessa.....	6
1. Introduzione	7
1.1 Caratteristiche principali degli ambienti marini profondi.....	7
1.2. Ecosistemi profondi come serbatoio di minerali di valenza economica: i noduli polimetallici	9
1.3 La Clarion-Clipperton Fracture Zone (CCZ).....	10
1.4 Problematiche legate all'attività estrattiva.....	13
1.5 Gestione dell'attività estrattiva nei fondali profondi.....	16
2. Obiettivi.....	17
3. Materiali e metodi	17
3.1 Area di studio, disegno di campionamento e raccolta dei campioni	17
3.2 Concentrazione di fitopigmenti.....	19
3.3 Composizione biochimica della materia organica	20
3.3.1 Concentrazione delle proteine.....	20
3.3.2 Concentrazione dei carboidrati	21
3.3.3 Concentrazione dei lipidi	21
3.4 Estrazione e purificazione del DNA microeucariotico	22
3.5 Sequenziamento del DNA microeucariotico.....	23
3.6 Analisi statistica	24
4. Risultati	25
4.1 Composizione biochimica della materia organica nei sedimenti.....	25
4.2 Diversità microeucariotica	39
5. Discussione.....	51
6. Conclusioni.....	57
7. Bibliografia.....	58
8. Materiale Supplementare	72

Premessa

Questo lavoro si inserisce nell'ambito di una serie di studi svolti nell'ambito del progetto di ricerca "MiningImpact" facente parte dell'iniziativa intergovernativa "*Joint Programming Initiative Healthy and Productive Seas and Oceans*" (JPI-Oceans) il cui principale focus scientifico è quello di valutare gli impatti ecologici che potrebbero derivare da attività commerciali di estrazione mineraria condotte negli ambienti marini profondi. In particolare, in questo studio, saranno presentati e discussi i dati ottenuti da tre spedizioni oceanografiche: i) la campagna SO268 (condotta dal 17 febbraio al 27 maggio 2019), ii) la campagna MANGAN21 (dal 4 aprile al 17 maggio 2021), iii) la campagna SO295 (dal 31 Ottobre al 23 Dicembre 2022) condotte nella Clarion- Clipperton Zone (CCZ) nel Pacifico equatoriale. Le operazioni di campionamento che si sono svolte durante le tre campagne oceanografiche hanno coinvolto due aree in concessione per l'esplorazione dei noduli polimetallici, una in concessione alla Germania (qui denominata Area Tedesca) e una in concessione al Belgio (Area Belga), che si trovano rispettivamente a profondità di 4100 m e 4500 m. Durante la prima spedizione oceanografica, nel 2019, sono state condotte indagini volte a caratterizzare sia l'Area Tedesca sia l'Area Belga in termini di risorse trofiche e componenti microeucariotiche bentoniche.

Successivamente, durante la spedizione MANGAN21, si è svolto il primo test pilota per simulare un'attività di *deep-sea mining* su scala industriale utilizzando un pre-prototipo di collettore di noduli su scala industriale (Patania II) progettato dalla "Global Sea Mineral Resources" (GSR) ed è stato valutato l'impatto di tale attività sullo stato trofico del sistema e sulle comunità microeucariotiche bentoniche a distanza di poche ore. Infine, nel 2022, sono stati raccolti dei campioni di sedimento dalle due Aree oggetto dell'attività di mining al fine di valutare l'impatto del collettore sullo stato trofico del sistema e sulle comunità microbiche a distanza di 18 mesi dall'impatto.

1. Introduzione

1.1 Caratteristiche principali degli ambienti marini profondi

L'ambiente marino profondo è il più vasto ecosistema della Terra, ricoprendo più del 65% della superficie terrestre (Sverdrup et al., 1942). È considerato ambiente profondo la superficie oceanica al di sotto della piattaforma continentale, il cui limite è posto a una profondità di circa 200 metri (Thistle, 2003). A questa profondità vengono associate le caratteristiche fisiche e chimiche che determinano la transizione da fauna di acqua superficiale alla fauna degli ambienti profondi (Sanders et al., 1965). Gli ambienti marini profondi sono caratterizzati da condizioni estreme come, ad esempio, un'elevata pressione idrostatica (questa difatti aumenta di 1 atmosfera ogni 10m), temperature al fondo comprese tra i 2 e i 5°C (Mantyla & Reid, 1983), assenza totale di luce e condizioni fortemente oligotrofiche dipendendo l'apporto di materia organica quasi esclusivamente da ciò che precipita dalla superficie (organismi morti e particelle organiche) (Thistle, 2003). La concentrazione di ossigeno è generalmente non limitante fatta eccezione per le *Oxygen minimum zone*, (Thistle, 2003). Nonostante le condizioni estreme che li caratterizzano, si ritiene che i sistemi abissali siano hot-spot di biodiversità (Rex et al., 2006; Wei et al., 2010; Danovaro et al., 2014), in cui la componente microbica, domina in termini di abbondanza e molto spesso di biomassa rispetto alle componenti pluricellulari (Danovaro et al., 2015, Bar-On et al., 2018). I microrganismi bentonici, costituendo circa il 10-30% della biomassa vivente sulla Terra (Corinaldesi et al., 2015) e l'80% della biomassa totale nelle profondità marine (Bar-On et al., 2018), svolgono un ruolo fondamentale nella produzione eterotrofa e chemioautotrofa di carbonio, nella remineralizzazione dei nutrienti e nel trasferimento della materia ed energia ai livelli trofici superiori (Rex et al., 2006, Sogin et al., 2006, Jørgensen & Boetius, 2007, Middelburg & Meysman 2007; Mason et al. 2009; Lauro & Bartlett, 2008, Zinger et al. 2011, Corinaldesi et al., 2015, Danovaro et al., 2014, 2015, 2016). Alcuni fattori determinanti per la distribuzione di abbondanza, biomassa e biodiversità in ambienti profondi sono il flusso di carbonio organico particolato dalla zona fotica verso il fondo e il rapporto carbonio/azoto della materia organica nei sedimenti, che fungono da indicatori della disponibilità e della qualità del cibo (Wedding et al., 2013; Vonnahme et al., 2020). Per le condizioni che caratterizzano questo tipo di ambiente gli organismi che ci vivono sono adattati a condizioni di scarsa disponibilità di cibo (Gillard et al., 2019), poiché solo l'1-3%

della produzione primaria nella zona eufotica raggiunge gli abissi (Gage & Tyler, 1991). Tra i microbi, i procarioti bentonici eterotrofi dominano i processi di degradazione a breve termine della materia organica (Rowe e Deming 1985; Lochte e Turley 1988; Boetius e Lochte 1996; Kanzog et al. 2009; Hoffmann et al. 2017) rispondendo rapidamente all'input di fitodetrito con shift nella struttura della comunità, aumenti della respirazione cellulare e tassi di crescita veloci (Pfannkuche, 1993; Turley & Lochte, 1990; Kanzog et al. 2009; Bienhold et al. 2012; Hoffmann et al. 2017; Sweetman et al., 2019; Nomaki et al., 2021). Per queste ragioni, la comunità scientifica, negli ultimi tre decenni, ha concentrato gli sforzi per approfondire le conoscenze sulle comunità procariotiche. Questo, tuttavia, ha lasciato lacune conoscitive importanti sulle altre componenti microbiche che popolano i fondali oceanici. Ad oggi, informazioni riguardanti l'abbondanza e la diversità degli eucarioti unicellulari scarseggiano e spesso viene trascurata l'interazione complessa tra i procarioti bentonici e i microeucarioti nell'utilizzo delle risorse trofiche. Di conseguenza, la conoscenza riguardo i microeucarioti e il loro contributo alla biodiversità delle profondità marine, nonché al loro coinvolgimento nella dinamica degli ecosistemi delle profondità marine, è nettamente inferiore a quella dei procarioti. Nonostante questi limiti, lo sforzo crescente degli ultimi anni nell'investigarne la variabilità spaziale dei microeucarioti in sedimenti profondi, l'utilizzo di tecniche di sequenziamento all'avanguardia (i.e Next-Generation Sequencing) e di database man mano più dettagliati ha permesso di approfondire le nostre conoscenze sulle comunità microeucariotiche che abitano le profondità marine, rivelando che i microeucarioti sono ampiamente distribuiti nei sedimenti abissali e sono caratterizzati da una straordinaria biodiversità (Filker et al., 2019; Pawlowski et al., 2011; Pernice et al., 2016; Xu et al., 2017; Xu et al., 2018, Zhao et al., 2020; Corinaldesi et al., 2015, Lohan et al., 2017) . I microeucarioti svolgono ruoli diversi negli ecosistemi bentonici (Worden et al., 2015). Infatti, possono essere consumatori di detrito (Raghukumar et al., 2002), batterivori (Sherr & Sherr, 2002, Nagahama et al., 2011), predatori o parassiti di altri eucarioti (Poff et al., 2021), costituendo pertanto un importante collegamento tra i diversi livelli trofici nei sistemi abissali (Worden et al., 2015, Cordier et al., 2022). Inoltre, le comunità sono fortemente influenzate da fattori ambientali, come temperatura e disponibilità di nutrienti (Zhao et al., 2020).

1.2. Ecosistemi profondi come serbatoio di minerali di valenza economica: i noduli polimetallici

Gli ambienti profondi sono sistemi complessi da un punto di vista geomorfologico e della loro eterogeneità spaziale anche a profondità abissali (al di sotto dei 4000 m di profondità; Smith et al., 2008). Alcune piane abissali, in particolare quelle situate nell'Oceano Pacifico, sono caratterizzate dalla presenza di noduli polimetallici. Si stima che a livello globale la loro distribuzione occupi un'area di 38 milioni di km² (Stratmann et al., 2019). I noduli sono concrezioni minerali, di forma sferica, formati da un nucleo di aggregazione intorno al quale precipitano, per poi solidificare in maniera concentrica, i minerali (soprattutto manganese e ferro, ma anche sodio, calcio, stronzio, rame, nichel ecc; Hein et al., 2014). La maggior parte dei noduli ha un diametro compreso tra 5 e 10 cm (Petersen et al., 2016) e si trovano generalmente a profondità tra i 3000 e 6500 m, dove il tasso di sedimentazione è molto basso, permettendo così ai noduli di crescere lentamente (milioni di anni per la crescita di un centimetro) per precipitazione di metalli dalle acque marine, per apporto di metalli provenienti da attività vulcanica e per precipitazione di idrossidi metallici per azione di microrganismi (Lenoble, 2000; Hein et al., 2014).

I noduli polimetallici creano ecosistemi unici, questo perché possono fungere da habitat per diversi organismi (dalla megafauna ai microbi; Amon et al., 2016; Grischenko et al., 2018; Dahlgren et al., 2016; Pape et al., 2021; Gooday et al., 2015; Vanreusel et al., 2016), contribuendo così a creare un habitat eterogeneo e maggiormente ricco in termini di biodiversità del sedimento circostante. È emerso inoltre che le densità della mega e macrofauna (spugne, idrozoi, scifozoi, crostacei, policheti e ascidie), meiofauna, protozoi e microbi è maggiore in sistemi in cui sono presenti i noduli rispetto al sedimento circostante (Mullineaux, 1987; Vanreusel et al., 2016; Veillette et al., 200). Mullineaux (1987) ha evidenziato che diversi organismi eucariotici possono coprire fino al 20% della superficie superiore di un nodulo, vivendo adesi ad esso (Mullineaux, 1987). Da studi condotti da Shulze et al., (2017) è emerso che i noduli polimetallici ospitano diversi tipi di microorganismi distinti sia dai sedimenti circostanti che dall'acqua sovrastante, e ospitano delle comunità microbiche più complesse e stabili nel tempo rispetto alle comunità microbiche analizzate nella colonna d'acqua sovrastante. Diversi studi hanno investigato il ruolo della fauna che popola i noduli rivelando che questa ha un importante ruolo nel ciclo

del carbonio (Orcutt et al., 2020; Atwood et al., 2020) e contribuisce alla rigenerazione dei nutrienti (Levin et al., 2017).

Da un punto di vista puramente antropocentrico, i noduli polimetallici costituiscono una fonte importante (e non rinnovabile) di minerali (Kuhn et al., 2017). Proprio per quest'ultimo motivo, dato l'aumento della domanda globale, nell'ultimo decennio, per elementi strategici come le terre rare (rare-earth elements, REE), l'indio, il germanio e il tungsteno (Kato et al., 2011) e altri elementi ancora, questi ecosistemi stanno attirando sempre di più l'attenzione delle grandi potenze mondiali. Infatti, proprio grazie al loro elevato contenuto di metalli risultano utili per un'ampia varietà di applicazioni *high-tech*, *green-tech*, *emerging-tech* ed energetiche (Hein et al., 2013). È però importante sottolineare che i giacimenti minerari degli oceani profondi non sostituiranno l'estrazione terrestre, ma offriranno un'ulteriore fonte di materie prime per soddisfare la crescente domanda.

Date le caratteristiche biotiche e abiotiche tipiche delle piane abissali caratterizzate dalla presenza dei noduli, si ritiene che gli ecosistemi associati ai noduli polimetallici abbiano tempi di recupero molto lenti (da decenni a secoli) con il rischio che non ci sia mai un recupero totale (Simon-Lledó et al., 2017).

1.3 La Clarion-Clipperton Fracture Zone (CCZ)

L'interesse minerario in acque profonde comprende in particolar modo tre tipi di risorse:

- noduli polimetallici;
- croste di ferromanganese ricche di cobalto;
- solfuri polimetallici.

Ciascun tipo di potenziale prelievo determina un impatto su ecosistemi diversi (Gollner et al. 2017; Jones et al., 2023; Weaver et al., 2019). I noduli polimetallici, in particolare di manganese, saranno probabilmente le prime risorse minerarie oggetto di sfruttamento commerciale e la loro estrazione potrà comportare impatti su centinaia di km² di fondale marino per sito di estrazione all'anno. La presenza di estesi giacimenti di noduli è stata rinvenuta in molte località di acque profonde come il bacino dell'Argentina, il Bacino del Capo, l'Atlantico sudoccidentale, l'Oceano Circum-Antartico e il bacino del Perù, ma il deposito più esteso è stato trovato nella zona di Clarion-Clipperton (CCZ), nel Pacifico

equatoriale (Figura 1). L'esplorazione di pianie abissali con lo scopo di sfruttarne nel prossimo futuro le risorse minerarie è limitata a tre aree oceaniche (Miller et al., 2018): la Clarion-Clipperton Zone (CCZ) nel Pacifico Equatoriale, il bacino centrale dell'Oceano Indiano (Central Indian Ocean Basin, CIOB) e il bacino del Perù nell'Oceano Pacifico. La CCZ è una zona di frattura geologica sottomarina nell'Oceano Pacifico (tra 11° 50' 18.60" N 117° 3' 16.20" O e 14° 2' 7.20" N 130° 5' 31.20" O) con un'estensione di sei milioni di chilometri quadrati tra il Messico e le Hawaii. Più precisamente inizia a nord-est delle Isole Lineari e termina nella Fossa dell'America Centrale.



Figura 1: La zona di Clarion-Clipperton (CCZ), uno dei punti più profondi dell'Oceano Pacifico. Crediti per l'immagine: Horizon (The EU research and innovation magazine)

La zona è situata in acque internazionali (Petersen et al., 2016) ed è pertanto amministrata dall'autorità internazionale per i fondali marini ("*International Seabed Authority*", ISA) che ha il dovere legale di stabilire norme, regolamenti e procedure per regolare l'esplorazione e lo sfruttamento di questi giacimenti impegnandosi a promuovere le migliori tecnologie disponibili ("*Best Available Technology*", BAT) e le migliori pratiche ambientali ("*Best Environmental Practices*", BEP) (Petersen et al., 2016). L'ISA ha rilasciato, a partire dal 2000, licenze per l'esplorazione mineraria in quest'area con: il governo dell'India, Deep Ocean Resources Development Co. Ltd. (Giappone), Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Francia), JSC Yuzhmorgeologiya (Russia), China Ocean Mineral Resources Research and Development Association (Cina), Interoceanmetal Joint Organization e il governo della Repubblica di Corea. Altre licenze sono state rilasciate dopo il 2005: Federal Institute for Geosciences and Natural Resources (Germania), Nauru Ocean Resources Inc. (Nauru), Tonga Offshore Mining Limited (Tonga), Global Sea Mineral

Resources NV (Belgio), UK Seabed Resources Ltd. (UK), Marawa Research and Exploration Ltd. (Kiribati), Ocean Mineral Singapore Pte. Ltd. (Singapore), UK Seabed Resources Ltd.-II (UK), Cook Islands Investment Corporation (Isole Cook), China Minmetals Corporation (Cina) and Beijing Pioneer Hi-Tech Development Corporation (Cina) (<https://www.isa.org.jm/exploration-contracts>). L'ISA ha inoltre istituito 12 aree di particolare interesse ambientale (Areas of Particular Environmental Interest, APEI) coprendo il 24% della CCZ, e aree riservate (Figura 2), istituite ai sensi della Convenzione delle Nazioni Unite sul diritto del mare (*United Nations Convention on the Law of the Sea, UNCLOS*). È particolarmente importante che queste APEI siano rappresentative degli ecosistemi circostanti per preservare intatti le piane abissali caratterizzate dalla presenza dei noduli e permettere una potenziale ricolonizzazione verso le zone limitrofe qualora coinvolte in operazioni di mining (Wedding et al., 2013). Ogni contratto di sfruttamento può avere una superficie massima di 75.000 km². Si stima che il 20-30% dei noduli presenti nell'area indicata nel contratto possano essere estratti nell'arco di 30 anni (durata del contratto indicata nella bozza dei regolamenti di sfruttamento).

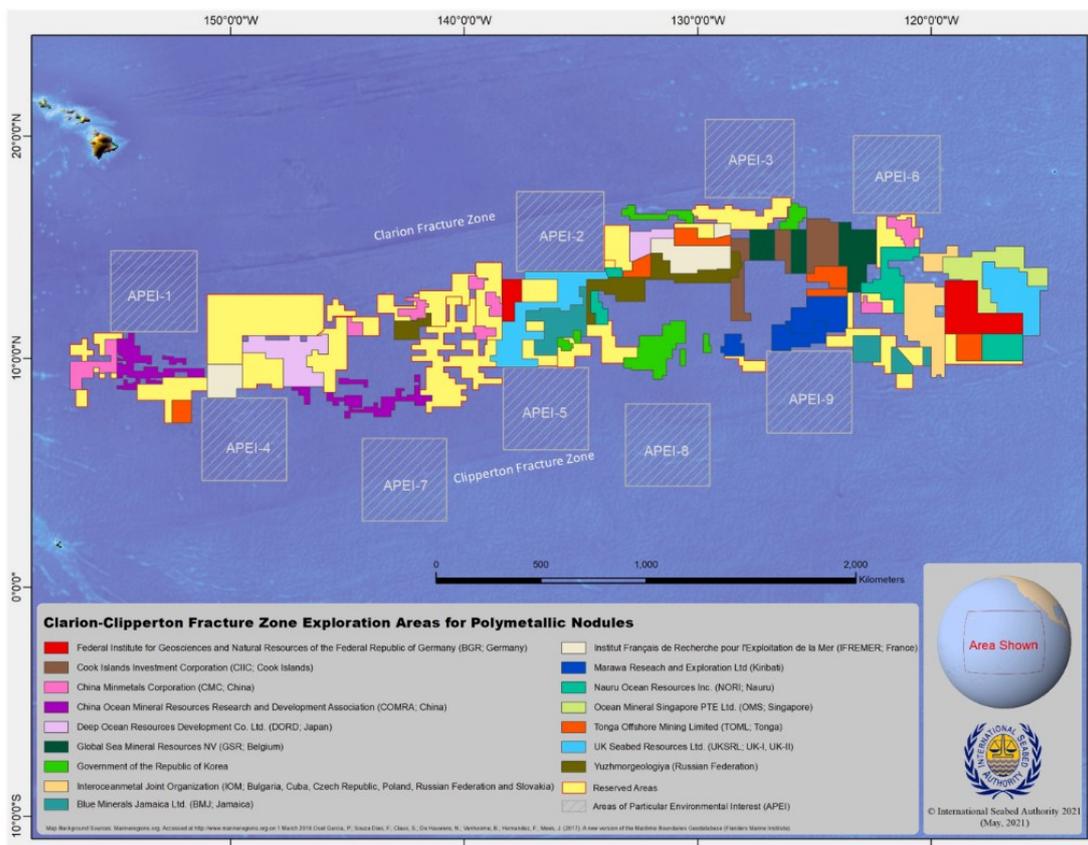


Fig. 2: Aree dei contratti di esplorazione assegnati dall'ISA nella Zona Clarion Clipperton dell'Oceano Pacifico. L'area totale coperta da contratti di esplorazione nella CCZ copre 1,25 milioni di km². Crediti per l'immagine: International Seabed Authority. (<https://isa.org.jm/polymetallic-nodules-exploration-areas-clarion-clipperton-fracturezone>).

Nella CCZ i noduli hanno distribuzione eterogenea e si trovano su fondali principalmente di tipo fangoso. I noduli sono delle dimensioni di una patata (Hein et al., 2013) e sono generalmente composti da: manganese (26-30%), ferro (5-7%), rame (0,98-1%), nichel (1-1,2%), cobalto (0,2%) (Hein et al., 2013). Nonostante la composizione piuttosto costante, la disposizione spaziale è eterogenea e spesso si ritrovano raggruppati in determinate aree. L'abbondanza di noduli nella CCZ varia tra i 15 e i 30 kg m⁻² (espressi come peso umido), secondo la *South Pacific Commission* (SPC), portando quindi a un totale di Mn nei noduli delle CCZ pari a quello presente nelle riserve globali di Mn terrestri (circa 6 miliardi di tonnellate). Invece le tonnellate totali di Ni e Co (rispettivamente 274 milioni di tonnellate e 44 milioni di tonnellate) si stimano essere superiori a quelle delle riserve terrestri. Nella CCZ, la struttura della comunità bentonica è eterogenea e sembra essere influenzata dalla batimetria locale, dalle dimensioni e dalla densità dei noduli e dall'export di carbonio al fondo (flusso di POC), ma sono necessari ulteriori studi per confermare la natura di queste relazioni (Petersen et al., 2016; Brix et al., 2019; Shulze et al., 2017; Amon et al., 2019). Molti taxa nella CCZ sembrano essere distribuiti in aree di soli 200 chilometri quadrati e ciò le rende più vulnerabili alle minacce da attività di estrazione mineraria, soprattutto considerando le dimensioni e la scala degli impatti derivanti da una singola operazione di estrazione dei noduli (Brix et al., 2019, Washburn et al., 2019).

1.4 Problematiche legate all'attività estrattiva

La valutazione degli impatti potenziali delle operazioni minerarie attraverso la "Valutazione di Impatto Ambientale ("VIA") è essenziale per identificare, evitare e minimizzare gli impatti. Ad oggi però, data la scarsa conoscenza di questi ambienti sono state sollevate serie preoccupazioni sui potenziali impatti ambientali legati all'estrazione mineraria (Levin et al., 2020). Nel corso degli anni sono stati effettuati diversi esperimenti *in situ* su piccola scala spaziale atti a valutare l'impatto legato alle attività estrattive sugli ecosistemi bentonici profondi. Ad esempio, nel 1993, il progetto *Benthic Impact Experiment* (BIE) ha utilizzato

un sistema di risospensione dei sedimenti del fondale marino (*Deep-Sea Sediment Resuspension System* – DSSRS), a largo della California, nella CCZ, per valutare gli impatti simulati dell'attività mineraria sul benthos in ambienti profondi (Trueblood et al., 1997). Il DSSRS ha dragato il sedimento del fondale risospingendone circa 4000 m³ formando una nube sopra il fondale marino (Brockett et al., 1994). Gli impatti sono stati valutati un anno dopo, nel 1994 (Brockett et al., 1994; Ozturgut et al., 1997). Altri esperimenti sono stati condotti ad esempio in Giappone nel 1994 (Japan Deep-Sea Impact Experiment, JET), per testare gli effetti della risospensione e del deposito di sedimenti dalle attività estrattive, utilizzando un macchinario bentonico simile al DSSRS, e nella parte orientale della CCZ nel 1995, per valutare l'impatto bentonico, sempre utilizzando lo stesso sistema DSSRS (Kotlinski et al., 1998; Radziejewska et al., 2002). In primo luogo, l'attività estrattiva causa la rimozione dei noduli e della fauna ad essi associata (Oebius et al., 2001; Thiel & Tiefsee-Umweltschutz, 2001), assieme ai primi centimetri di sedimento, i quali essendo a diretto contatto con la colonna d'acqua sono la porzione di sedimento più ricca in nutrienti e, per questo, quella interessata da una maggiore presenza di organismi (Borowsky et al., 2001; Newell et al., 2004). La rimozione dei primi centimetri di sedimento e la compattazione dei sedimenti sottostanti determina una minore disponibilità di habitat e, di conseguenza, una perdita di biodiversità. (Vonnahme et al., 2020; Vanreusel et al., 2016; Kaikkonen et al., 2018; Simon-Lledo et al., 2019). In secondo luogo, l'azione di un collettore di noduli e lo smaltimento dei sedimenti di scarto determinano la formazione di una *plume* di sedimento (sedimento in sospensione) che può diffondersi in colonna d'acqua fino a raggiungere distanze lontane centinaia di chilometri dal sito impattato con effetti sia a breve sia a lungo termine (Aleynik et al., 2017; Gillard et al., 2019), quali ad esempio l'aumento dei solidi sospesi nella colonna d'acqua che può provocare danni ai sistemi respiratori e di filtrazione degli organismi e potenziali danni dovuti a tossicità causata da elevate concentrazioni di metalli (Drazen et al., 2020; Kaikkonen et al., 2018). In sintesi, tra i potenziali e più severi impatti ambientali che derivano dall'attività estrattiva troviamo la perdita di integrità e la rimodellazione dei fondali marini con un impoverimento in termini sia di risorse trofiche (data dalla rimozione dei primi centimetri di sedimento) sia di biodiversità. Su lunga scala temporale, ciò potrebbe determinare importanti cambiamenti nelle interazioni trofiche tra le comunità bentoniche con l'estinzione locale di specie che colonizzano i noduli e un'alterazione dei processi biogeochimici nei sedimenti profondi (Drazen et al., 2020, Levin

et al., 2020; Goineau et al., 2017; Vonnahme et al., 2020; Miller et al., 2018, Haffert et al., 2020; Drazen et al., 2020). Solo pochi studi hanno indagato gli effetti negativi della rimozione dei noduli sulle comunità bentoniche microbiche degli ecosistemi profondi e sul ciclo dei nutrienti (Stratmann et al., 2018; De Jonge et al., 2020; Vonnahme et al., 2020). Tali studi, condotti soprattutto nel Pacifico, in particolare nella Clarion-Clipperton Zone (CCZ) e nel bacino del Perù, attraverso una simulazione su piccola scala di attività estrattive profonde, hanno dimostrato che la rimozione dei noduli determina una riduzione della biodiversità di organismi associati a meio- e macrofauna e l'alterazione delle comunità microbiche che persiste ancora dopo decenni anni dall'impatto (Vonnahme et al., 2020; Vanreusel et al., 2016; Simon-Lledo et al., 2019; Jones et al., 2017). In particolare, a distanza di 26 anni dal disturbo iniziale, aree interessate da attività estrattive mantenevano, rispetto ai siti di riferimento vicini, tassi ridotti di fissazione di CO₂, attività ridotta di enzimi idrolitici extracellulari e abbondanze cellulari microbiche minori (Vonnahme et al., 2020). Ad oggi sappiamo che una dei ruoli chiave delle comunità microbiche all'interno di ecosistemi profondi è quello di remineralizzare la materia organica depositata; pertanto, una riduzione delle comunità microbiche potrebbe avere ripercussioni sulla ciclizzazione del carbonio e sui cicli biogeochimici degli elementi (Vonnahme et al., 2020). Il recupero da parte delle comunità bentoniche di fondo mobile potrebbe richiedere molti anni, a causa dei bassi tassi di sedimentazione che nel tempo andrebbero a ripristinare i primi centimetro di sedimento impattati dall'azione del collettore (Volz et al., 2020), mentre la fauna associata ai noduli potrebbe andar persa definitivamente (Simon-Lledo et al., 2019; Hein et al., 2013). Un limite importante che riguarda gli esperimenti su piccola scala spaziale condotti fino ad oggi riguarda le difficoltà nel prevedere gli effetti dovuti all'impatto che possono provocare estrazioni multiple in concomitanza. Infatti, gli studi condotti fino ad oggi hanno tenuto in considerazione eventi di estrazione singoli senza tener conto degli impatti cumulativi. Agli impatti negativi delle attività estrattive profonde andrebbero poi aggiunti altri impatti antropici non minerari come la pesca, l'inquinamento e i cambiamenti climatici che potrebbero interagire in modo additivo o sinergico con le attività minerarie, alterando la biodiversità e le funzioni ecosistemiche associate (Smith et al., 2020; Levin et al., 2020; Huvenne et al., 2016; Levin et al., 2015).

1.5 Gestione dell'attività estrattiva nei fondali profondi

Quando non si hanno abbastanza informazioni, su un tipo di ambiente e sull'impatto che l'attività antropica potrebbe causare si dovrebbe ricorrere ad un approccio precauzionale che dovrebbe portare a restrizioni più severe e a fissare valori conservativi fino a quando i diversi indicatori dei potenziali impatti saranno meglio caratterizzati (Levin et al., 2016). Esempi di indicatori abiotici di un potenziale impatto sono la concentrazione dei metalli nei sedimenti e nella colonna d'acqua e i livelli di ossigeno e di sedimento in sospensione (Levin et al., 2016). Gli indicatori biotici chiave potrebbero includere misure di abbondanza, biomassa, qualità dell'habitat, connettività della popolazione e densità riproduttiva (Levin et al., 2016). Gli indicatori a livello di comunità e di ecosistema includono variazioni in termini di biodiversità (diversità alfa, beta e gamma), cambiamenti negli assemblaggi delle comunità, declino o perdita di specie dominanti, alterazione dei legami trofici chiave tra le specie, perdite in produzione di biomassa e le variazioni nel consumo di ossigeno, nella remineralizzazione del carbonio e nel ciclo dei nutrienti. L'identificazione e la comprensione di specie indicatrici o di specie surrogate (ad esempio, fragili, vulnerabili o che hanno un alto rischio di estinzione) dovrebbe essere tenuta in debita considerazione (Levin et al., 2016). Tuttavia, le informazioni ecologiche sono così limitate in molte aree destinate all'estrazione mineraria (ad esempio, la CCZ) che l'identificazione di specie indicatrici non è attualmente possibile. Ciò può essere ulteriormente complicato dalla elevata diversità e rarità delle specie (Jones et al., 2021). È inoltre importante comprendere la resilienza di questi ambienti in seguito all'estrazione mineraria. La resilienza viene definita come la capacità di un sistema di mantenere la sua identità complessiva, ovvero la stessa funzione e struttura, di fronte a cambiamenti interni e perturbazioni esterne (Holling, 1973, Walker et al., 2004). La misura della resilienza dipende dall'ottenimento di informazioni sulla struttura e sulle dinamiche dell'ecosistema (densità, biodiversità, tassi di crescita e maturazione, longevità, potenziale di colonizzazione, distribuzioni, modalità di dispersione...), dalla comprensione degli impatti minerari e dalla tolleranza alle attività minerarie (Gollner et al., 2017). Nonostante le poche informazioni sugli ecosistemi profondi, sulla base delle informazioni disponibili in relazione a metodi e strumenti di estrazione, si prevede che la resilienza nelle regioni dei noduli sia molto bassa (Volz et al., 2018; Jones et al., 2017; Hein et al., 2013).

2. Obiettivi

L'obiettivo principale di questo studio è investigare la variabilità spatio-temporale dello stato trofico (in termini di quantità e composizione biochimica della materia organica) e della comunità microeucariotica, in ecosistemi marini profondi, rispetto a cambiamenti potenzialmente indotti dalla attività di mining effettuate tramite un sistema prototipale di raccolta di noduli polimetallici nella CCZ. In particolare, sono state selezionate due aree, una in concessione alla Germania (Area Tedesca) e l'altra al Belgio (Area Belga), in cui, nel 2021, è stato effettuato un test pilota di estrazione mineraria su scala preindustriale. All'interno di ciascuna area è stata identificata una sub-area utilizzata come *baseline* (Reference Area) non interessata da tale attività e una sub-area interessata dall'attività di mining (Trial Area) che ha coinvolto una superficie di 37000 m², per l'area tedesca, e 22000 m² per l'area belga. L'impatto sullo stato trofico e sulle comunità microeucariotiche è stato valutato sia nel breve termine (a poche ore dal test) sia a distanza di circa 18 mesi attraverso una campagna dedicata effettuata nel 2022. Questi dati sono stati anche confrontati con risultati ottenuti durante una prima campagna esplorativa effettuata nel 2019 in cui era già stato valutato lo stato trofico e la diversità microeucariotica della Reference Area e della Trial Area.

Oltre ai potenziali effetti meccanici indotti dal prelievo dei noduli, è stato valutato, grazie ai campioni raccolti nel 2022, il potenziale impatto determinato dalla rideposizione dei sedimenti risospesi durante le attività estrattive ("*plume redeposition impact*") al crescere della distanza dall'area di impatto.

3. Materiali e metodi

3.1 Area di studio, disegno di campionamento e raccolta dei campioni

I campioni di sedimento sono stati raccolti nella Clarion-Clipperton Zone (CCZ) nel Pacifico equatoriale (tra 11° 50' 18.60" N 117° 3' 16.20" W e 14° 2' 7.20" N 130° 5' 31.20" W) in due aree: una in concessione al governo tedesco (Area tedesca, 4100m di profondità) e una in concessione al Belgio (Area belga, 4500m di profondità) per l'esplorazione dei noduli polimetallici. All'interno di ciascuna area si sono identificate due sub-aree: una "Trial Area" per effettuare il test di mining e una Reference Area non coinvolta nelle attività di mining.

Le operazioni di campionamento sono state effettuate durante tre campagne oceanografiche condotte rispettivamente nel 2019 (SO268), nel 2021 (MANGAN21) e nel 2022 (SO295). Durante la prima spedizione, nel 2019, le attività di campionamento hanno coinvolto sia la Trial Area sia la Reference Area dell'Area belga e dell'Area tedesca, entrambe indisturbate. Successivamente, nel 2021, è stato testato per la prima volta su larga scala spaziale un pre-prototipo di collettore di noduli polimetallici (Patania II; Figura 3) messo a punto dalla compagnia DEME-GSR nella Trial Area sia dell'Area tedesca sia dell'Area belga. Il veicolo è controllato fino a una profondità di 4-5 km tramite un cavo ombelicale collegato alla nave di supporto ed è stato dotato di un collettore con quattro teste di raccolta che dirigono un getto d'acqua al di sopra dei noduli, creando così una pressione negativa, sollevando i noduli dal fondale marino. I noduli vengono separati dal sedimento, che viene restituito al fondale marino sotto forma di *plume* attraverso un diffusore situato all'estremità posteriore del veicolo, formando così uno strato di acqua limacciosa e sedimento. I noduli, invece, possono essere stoccati in una benna o depositati sul fondale.

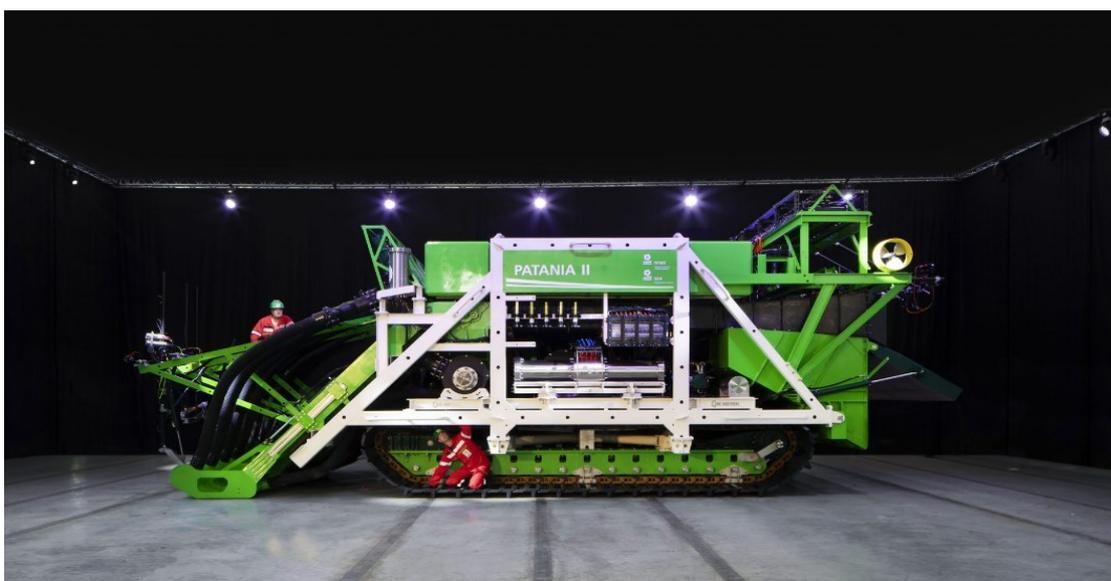


Fig 3: Il pre-prototipo Patania II ([What is Patania II - GSR \(deme-gsr.com\)](https://www.deme-gsr.com)).

Il test ha raccolto noduli polimetallici dal fondale marino per un'area di 23400 m² nell'area tedesca e 31000 m² nell'Area belga operando rispettivamente per 24 e 40 ore nelle due aree. La strategia di campionamento adottata ha interessato la Trial Area prima (Pre-Impact) e poche ore dopo (Short-term Impact) l'impatto del collettore Patania II nell'Area tedesca e belga, e la Reference Area dell'Area tedesca la quale non è stata coinvolta nelle attività di

disturbo. La Reference Area dell'Area belga nel 2021 non è stata campionata a causa di problemi logistici.

Nel 2022, le attività di campionamento sono state ripetute nella Trial Area (“Long-term Impact”), interessata dall'impatto di Patania 18 mesi prima, e nella Reference Area all'interno dell'Area Tedesca e dell'Area Belga. Inoltre, campioni di sedimento sono stati raccolti a distanza di 5 m, 150 m, 220 m, 290 m, e 500 m dalla Trial Area nell'Area tedesca e a distanza di 5 m, 25 m, 75 m, 175 m, 275 m, 600 m nell'Area belga lungo un gradiente di rideposizione del sedimento risospeso dal collettore ("*Plume redeposition gradient*").

Tutti i campioni di sedimento sono stati raccolti mediante calate indipendenti di un multicorer teleguidato (TV-MUC). Le carote di sedimento così ottenute sono poi state suddivise in tre strati: 0-1 cm, 1-3 cm, 3-5 cm e sono stati immediatamente conservati a -20°C per le analisi del contenuto e della composizione della materia organica. Tutte le analisi relative a materia organica sono state eseguite in triplicato. Aliquote prelevate dal primo centimetro di sedimento sono state inoltre conservate a -20°C e processati in laboratorio per le analisi della diversità microeucariotica.

3.2 Concentrazione di fitopigmenti

La concentrazione di pigmenti fotosintetici, utilizzata come indicatore di export di materiale fotosintetico prodotto nelle acque superficiali, è stata determinata secondo MacIntyre, Geider e Miller (1996); Montagna, Coull, Herring e Dudley (1983); Plante e Reys (1986). Per ciascun campione è stato prelevato 1mL da una slurry 1:4 di sedimento e acqua di mare, filtrata 0.2 µL e autoclavata, ed è stato trasferito in una provetta di vetro con 0,1 g di MgCO₃, a cui sono stati poi aggiunti 5 mL di acetone al 90% (vol/vol). I campioni di sedimento, dopo esser stati vortexati, sono stati trattati con ultrasuoni (Branson Sonifier 2200, 60W) tre volte per un minuto e incubati overnight a +4°C al buio. Successivamente i campioni sono stati centrifugati (10 min a 800 x g) e 3ml di sovrantante sono stati analizzati fluorometricamente (lunghezza d'onda di 665 nm) per stimarne il contenuto di clorofilla-a e, dopo acidificazione con 200 µl di HCl 0,1M (Danovaro, 2009), per la stima dei feopigmenti. La somma delle concentrazioni di clorofilla-a e feopigmenti è stata espressa come concentrazione totale di fitopigmenti (Chloroplastic Pigments Equivalent, CPE) (Danovaro, 2009).

3.3 Composizione biochimica della materia organica

La concentrazione di proteine, carboidrati e lipidi è stata misurata spettrofotometricamente (Danovaro, 2009), e la somma delle loro concentrazioni è stata convertita in carbonio equivalente (utilizzando rispettivamente i fattori di conversione 0,49, 0,40 e 0,75 mg C mg⁻¹), che è stato definito come carbonio biopolimerico (BPC) (Danovaro, 2009). La concentrazione di C biopolimerico nel sedimento è stato utilizzato come indicatore della disponibilità di cibo per i consumatori bentonici (cioè la qualità, Pusceddu et al., 2003).

3.3.1 Concentrazione delle proteine

L'estrazione delle proteine dai campioni di sedimento è stata condotta seguendo il metodo di Hartree (1972) adattato da Rice (1982). Questo metodo sfrutta la proprietà delle proteine di reagire con il tartrato rameico e successivamente con il Folin-Ciocalteu, il che consente di ottenere una colorazione blu nella soluzione finale proporzionale al contenuto proteico. Per ciascun campione è stato trasferito 1 mL da una slurry 1:4 di sedimento e acqua di mare, filtrata 0.2 µL e autoclavata. I campioni sono stati poi centrifugati (5 min a 800 x g) ed è stato rimosso il sovrantante. In seguito, è stato aggiunto 1 mL di acqua MilliQ, e le provette sono state sottoposte a vortex (1 min). Le provette sono state poi trattate con ultrasuoni (Branson Sonifier 3510E) tre volte per 1 min con intervalli di 30 secondi. Successivamente, a ciascun campione sono stati aggiunti 0,9 mL di soluzione A (2 g di NaK-tartrato e 100 g di Na₂CO₃ anidro in 500 mL di NaOH 1 M, diluito a 1000 mL con acqua MilliQ; Danovaro et al., 2009) e incubati in un bagnetto caldo (50°C) per 10 minuti. In seguito, sono stati aggiunti 0,1 mL di soluzione B (2 g di NaK-tartrato e 1 g di CuSO₄ in 90 mL di acqua MilliQ e diluito con 10 mL di NaOH 1 M), le provette sono state agitate con un vortex (1 min) e sono state lasciate a temperatura ambiente per 10 min. Infine, sono stati aggiunti 3 mL di soluzione C (1 mL di Folin-Ciocalteu in 15 mL di acqua MilliQ) e le provette sono state agitate con un vortex (1 min) e poste nel bagnetto d'acqua calda (50°C) per 10 minuti. L'ultimo passaggio prevede la centrifugazione dei campioni (15 min a 800 x g). Circa 3 mL di sovrantante sono stati prelevati e analizzati spettrofotometricamente a 650 nm in una cuvetta di vetro ottico. Il contenuto proteico dei campioni è stato ricavato sulla base di una curva di calibrazione preparata utilizzando lo standard di albumina bovina (BSA). La concentrazione di proteine è stata normalizzata al peso secco del sedimento ed è stata

espressa in milligrammi di BSA equivalente per grammo di sedimento secco (Danovaro et al., 2009).

3.3.2 Concentrazione dei carboidrati

La quantificazione dei carboidrati è stata eseguita secondo la procedura di Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith (1956), ottimizzata per il sedimento da Gerchakov & Hatcher (1972). Questo metodo colorimetrico sfrutta la reazione tra gli zuccheri e il fenolo in presenza di acido solforico concentrato. Per ciascun campione è stato trasferito 1 mL da una slurry 1:4 di sedimento e acqua di mare, filtrata 0.2 µL e autoclavata in una provetta di vetro da 15 mL. I campioni sono stati poi centrifugati (5 min a 800 x g) ed è stato rimosso il sovrantante. Le provette sono state quindi poste in stufa (60 °C) per una notte in modo che il sedimento si seccasse. Il peso secco del sedimento è stato calcolato come differenza tra il peso iniziale delle provette vuote e il peso delle provette dopo la disseccazione del sedimento (24h a 60°C). Una volta seccato il sedimento è stato aggiunto 1 mL di acqua MilliQ, e le provette sono state sottoposte a vortex (1 min) e sonicate tre volte (Branson Sonifier 3510E; 1 min con intervalli di 30s). Dopo la sonicazione, in ciascuna provetta è stato aggiunto 1 mL di una soluzione di fenolo distillato al 5%; le provette sono state quindi agitate con un vortex (1 min) e incubate a temperatura ambiente (10 min). Successivamente, sono stati aggiunti 5 mL di H₂SO₄. I campioni sono poi stati centrifugati (30 min a 800 x g) e 3 mL di sovrantante sono stati raccolti e analizzati spettrofotometricamente a 485 e 600 nm con una cuvetta in vetro ottico. Le concentrazioni di carboidrati sono state ottenute mediante curve di calibrazione di soluzioni standard di D (+) glucosio ed espresse in mg per g di peso secco del sedimento.

3.3.3 Concentrazione dei lipidi

La determinazione della concentrazione totale di lipidi nei campioni di sedimento è stata effettuata secondo Bligh & Dyer (1959) e J.B. Marsh & Weinstein (1966). Questo metodo è stato leggermente modificato per essere applicato alla matrice del sedimento (Danovaro et al., 2009). Per ciascun campione è stato trasferito 1 mL da una slurry 1:4 di sedimento e acqua di mare, filtrata 0.2 µL e autoclavata in una provetta di vetro da 15 mL. I campioni

sono stati poi centrifugati (5 min a 800 x g) ed è stato rimosso il sovranatante. Le provette, aggiunto 1 mL di acqua MilliQ, sono state agitate con un vortex (1 min) e sonicate tre volte (Branson Sonifier 3510E; 1 min con intervalli di 30 s). In seguito, sono stati aggiunti 1,25 mL di cloroformio e 2,5 mL di alcol metilico; le provette sono state quindi centrifugate (800x g per 10 min). La frazione idroalcolica del sovrinatante è stata rimossa utilizzando una pipetta Pasteur e posta in provette Pyrex aggiungendo 1,25 mL di cloroformio e 1,25 mL di acqua MilliQ. I tubi sono stati agitati con un vortex per produrre un'emulsione acqua-metanolo-cloroformio e centrifugati a 800 x g per 5 minuti per separare le frazioni idrofobiche e idroalcoliche. Quest'ultima è stata eliminata dalla Pirex e il residuo idrofobico è stato lasciato a evaporare in un bagno caldo asciutto (per 20 min a 100°C). Una volta aggiunti 2 mL di H₂SO₄ a temperatura ambiente, i tubi sono stati posti in un bagno caldo asciutto a 200°C per 15 minuti. Successivamente, ai campioni opportunamente raffreddati, sono stati aggiunti 3 mL di acqua MilliQ e le provette sono state agitate con un vortex (1 min). Il sovrinatante è stato analizzato spettrofotometricamente e l'assorbanza è stata determinata a 375 nm con cuvette di vetro ottico. Ciascun valore di assorbanza è stato confrontato con l'assorbanza del bianco (1mL di cloroformio evaporato, poi trattato come gli altri campioni). La concentrazione totale di lipidi è stata calcolata sulla base delle curve di calibrazione ottenute analizzando soluzioni standard di tripalmitina. La concentrazione totale di lipidi è stata normalizzata al peso secco del sedimento.

3.4 Estrazione e purificazione del DNA microeucariotico

Prima dell'estrazione del DNA totale, 2 g di campioni di sedimento umido sono stati sottoposti a un pretrattamento con tre soluzioni di lavaggio seguendo il protocollo descritto da Danovaro et al. (2009) per aumentare la resa e la purezza del DNA. I campioni di sedimento sono stati sospesi in 5 ml della soluzione di lavaggio 1 (50 mM Tris-HCl; pH 8.3; 200 mM NaCl; 5 mM Na₂EDTA; 0.05% Triton X-100), agitati con un vortex e centrifugati a 6000x g per 2 minuti. Dopo aver eliminato il sovrinatante, il pellet è stato lavato con la soluzione di lavaggio 2 (50 mM Tris-HCl; pH 8.3; 200 mM NaCl; 5 mM Na₂EDTA) e trattato come descritto sopra per ogni lavaggio. Infine, il sedimento è stato sospeso con la soluzione di lavaggio 3 (10 mM Tris-HCl; pH 8.3; 0.1 mM Na₂EDTA). Il DNA totale è stato successivamente estratto da circa 0.5 g di sedimento utilizzando il kit di isolamento del DNA

Powersoil (QIAGEN) seguendo le istruzioni del produttore. La lisi cellulare avviene mediante forza meccanica (tubi con perle forniti dal kit) e reazioni chimiche (soluzione C1 del kit). Il DNA genomico totale viene catturato alla fine del protocollo su una membrana di silice in una eppendorf spin column ed eluito dopo l'aggiunta di un tampone di eluizione (soluzione C6). La quantificazione totale del DNA è stata effettuata 2 volte, sia utilizzando lo spettrofluorimetro NanoDrop 1000 sia utilizzando il fluorometro Qubit. Dopo la quantificazione, sono state effettuate analisi preliminari per valutare l'efficienza di amplificazione del gene 18S RNA attraverso una reazione PCR. Il set di primer TAREuk454FWD1 (CCAGCASCYGCGGTAATTCC) e TAREukREV3mod (ACTTTCGTTCTTGATYRATGA) è stato utilizzato per amplificare la regione V4 del gene 18S RNA (Stoeck et al., 2010). La reazione è stata condotta sul Veriti™ 96-Well Thermal Cycler in un volume finale di 25 µL con 5 µL di tampone di reazione MyTaq 5x, 1.25 µL di primer 515F-Y e 926R (concentrazione finale di 0.5 µM), 0.5 µL di polimerasi myTaq HS DNA (Meridian Bioscience), 13 µL del campione di DNA e 4 µL di acqua priva di nucleasi filtrata attraverso un filtro con porosità di 0.02 µm. Il programma PCR consisteva in una fase di denaturazione iniziale (95°C per 5 min), 10 cicli di temperatura (94°C per 30 sec, 57°C per 45 sec, 72°C per 1 min), 29 cicli di allungamento (94°C per 30 sec, 47°C per 45 sec, 72°C per 1 min), con una denaturazione della polimerasi a 72°C per 10 min alla fine. Dopo l'amplificazione, per visualizzare i frammenti di DNA, è stata eseguita un'elettroforesi utilizzando gel di agarosio (1.5%). Il marker Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific) con 13 frammenti da 100 a 200 bp è stato utilizzato come riferimento.

3.5 Sequenziamento del DNA microeucariotico

Per l'analisi della diversità microeucariotica, la regione V4 del gene 18S rRNA è stata amplificata utilizzando il set di primer TAREuk454FWD1 (CCAGCASCYGCGGTAATTCC) e TAREukREV3mod (ACTTTCGTTCTTGATYRATGA) (Stoeck et al., 2010), e gli ampliconi sono stati sequenziati sulla piattaforma Illumina MiSeq.

Le sequenze accoppiate sono state successivamente analizzate tramite la procedura DADA2 in QIIME2 (Bolyen et al., 2019) per ottenere “Varianti di sequenze degli ampliconi”

("Amplicon Sequence Variant", ASV) biologicamente significative. Le ASV risultanti sono state quindi confrontate con il database PR2 ("Protist Ribosomal Reference") (v5.0.1; Guillou et al., 2013, Del Campo et al., 2018, Vaultot et al., 2021, 2022) per l'affiliazione tassonomica utilizzando il plug-in di inferenza tassonomica basato su VSEARCH all'interno di QIIME2 (Bolyen et al., 2019) dopo aver tagliato le sequenze di riferimento nella regione amplificata dai primer.

Prima della rarefazione della tabella, le sequenze affiliate ai metazoi sono state filtrate dalla tabella delle ASV risultante con il pacchetto microeco (Chi et al., 2021; software RStudio v 4.2.0).

La tabella delle ASV risultante è stata filtrata utilizzando il pacchetto phyloseq (McMurdie e Holmes 2013; software RStudio v 4.2.0) per individuare taxa osservati almeno due volte in almeno il 3% dei campioni.

Gli indici di diversità alfa (ovvero le ASV osservate e l'indice di Shannon) sono stati calcolati tramite il pacchetto microbioma (Lahti et al., 2017) all'interno del software RStudio (v 4.2.0). La beta diversità delle comunità microeucariotiche è stata analizzata all'interno del pacchetto Vegan (Clarke et al., 1993, Warton et al., 2012) utilizzando il software R studio (software 4.2.0).

L'inferenza tassonomica delle ASV è stata effettuata utilizzando il pacchetto phyloseq (McMurdie e Holmes 2013) considerando i taxa che contribuiscono almeno per lo 0,5% all'intero assemblaggio unendo i restanti taxa in un unico gruppo "Altri". Le sequenze microeucariotiche sono state assegnate al livello di phylum e di famiglia (le famiglie sconosciute sono state raggruppate al livello tassonomico più basso conosciuto).

3.6 Analisi statistica

L'analisi permutazionale della varianza (PERMANOVA) sulle componenti della materia organica è stata condotta utilizzando il software PRIMER 6+PERMANOVA per valutare le differenze tra:

- i) Reference Area Tedesca e Reference Area Belga;
- ii) Trial Area prima (pre-) e dopo l'impatto (short-term e long-term impact) all'interno di ciascuna Area;

- iii) Short-term impact (2021) e Long-term impact (2022) all'interno della Trial Area Tedesca e Belga.

Al fine di valutare le differenze significative tra le comunità microeucariotiche osservate tra:

- i) Reference Area Tedesca e Reference Area Belga;
- ii) Trial Area prima (pre-) e dopo l'impatto (short-term e long-term impact) all'interno di ciascuna Area;
- iii) Short-term impact (2021) e Long-term impact (2022) all'interno della Trial Area Tedesca e Belga

l'analisi della varianza (ADONIS2 con 9999 permutazioni) è stata effettuata all'interno del pacchetto Vegan (Clarke et al., 1993, Warton et al., 2012) (software RStudio v 4.2.0) utilizzando la distanza UniFrac normalizzata ponderata (Lozupone & Knight, 2005) come indice di beta-diversità e un albero filogenetico è stato costruito dalla matrice di distanza creata e visualizzata utilizzando il pacchetto phyloseq in R Studio (v 4.2.0).

Le analisi dell'abbondanza differenziale dei microeucarioti sono state eseguite con la procedura ANCOM-BC (Lin et al., 2020, Dixon et al., 2003, Nearing et al., 2021) sulla tabella non rarefatta a livello di ASV per identificare taxa che differiscono in maniera significativa in abbondanza relativa tra Pre-impact e Short-Term, e tra Short-term impact e Long-Term impact.

4. Risultati

4.1 Composizione biochimica della materia organica nei sedimenti

I risultati dell'analisi statistica (PERMANOVA) effettuata al fine di valutare le differenze nelle variabili investigate (fitopigmenti, proteine, carboidrati, lipidi e carbonio biopolimerico) tra le due Aree (Area tedesca vs Area belga), tra i diversi siti campionati (Reference Area, Trial Area Prima dell'impatto e dopo l'impatto) nei diversi anni (2019, 2021, 2022) e tra gli strati di sedimento analizzati in ciascun sito (0-1cm, 1-3cm, 3-5cm) sono riportati nelle Tabelle Supplementari.

La concentrazione di fitopigmenti nei siti non coinvolti dall'azione di Patania II, nell'area tedesca (Reference Area 2019, 2021 e 2022 e Trial Area Pre Impatto) non mostra differenze significative nel tempo oscillando tra 2.3 ± 0.2 $\mu\text{g/g}$ nel Pre Impatto 2021 e 3.5 ± 0.7 $\mu\text{g/g}$ nella

Reference Area 2022 (Fig. 4A). Nel 2021, a seguito della attività di mining nella Trial Area è stata osservata poche ore dopo l'impatto (Short-term impact) una minore concentrazione di fitopigmenti nel primo cm di sedimento rispetto al Pre-impatto (PERMANOVA, $p < 0.001$). A distanza di 18 mesi dall'attività estrattiva, nel 2022, nella Trial Area sottoposta all'esperimento di mining (Long-term Impact) sono state osservate concentrazioni di fitopigmenti più basse rispetto sia al Pre-Impatto (anno 2021) (PERMANOVA, $p < 0.01$) sia alla Reference Area campionata nel medesimo anno (2022) (PERMANOVA, $p < 0.01$), nonostante sia stato riscontrato un aumento nel contenuto in fitopigmenti rispetto ai campioni raccolti poche ore dopo l'impatto (Short-term impact) (PERMANOVA, $p < 0.00$; Fig. 4A). La concentrazione di fitopigmenti lungo il profilo verticale di sedimento (0-1 cm, 1-3 cm, 3-5 cm) mostra nei siti non coinvolti dall'azione di mining (Reference Area e Pre-Impatto) una concentrazione 2 -7 volte maggiore nel primo cm di sedimento rispetto agli strati sottostanti (PERMANOVA, $p < 0.01$). Nella Trial Area subito dopo l'impatto (Short-term impact) si osservano, nel primo cm di sedimento, valori non significativamente differenti rispetto allo strato sottostante (PERMANOVA, $p < 0.01$; Fig. 4C). Nell'Area belga, sono presenti differenze significative nella concentrazione di fitopigmenti sia su scala temporale sia spaziale nei siti non impattati dall'azione di Patania II. Nel 2019, le concentrazioni di fitopigmenti nel primo cm di sedimento mostrano differenze tra Reference Area e Trial Area con la seconda caratterizzata da concentrazioni più basse ($2.0 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ nella Reference Area e $1.0 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ nella Trial Area) (PERMANOVA, $p < 0.001$; Fig. 4B). La Reference Area, distante da qualsiasi sorgente di impatto antropico, mostra nel 2022 una maggiore concentrazione di fitopigmenti nel primo cm rispetto ai valori riportati per il 2019 e 2021 (PERMANOVA, $p < 0.01$; Fig. 4B). In seguito alle attività estrattive effettuate nel 2021, la Trial Area mostra valori di fitopigmenti significativamente più bassi nei primi 5 cm di sedimento (Short-term Impact; PERMANOVA, $p < 0.01$; Fig. 4D) rispetto a quelli osservati prima dell'impatto. A distanza di 18 mesi (Long-term Impact), nel 2022, i sedimenti della Trial Area mostrano concentrazioni più alte rispetto ai valori osservati nel 2021 poche ore dopo l'impatto (Short-term Impact) (PERMANOVA, $p < 0.05$; Fig. 4B; Fig. 4D) seppur comunque più bassi in valore assoluto rispetto al Pre Impatto. Osservando il contenuto di fitopigmenti lungo il gradiente di deposizione della *plume*, a 18 mesi dall'impatto, emergono differenze significative nel primo centimetro di sedimento tra la stazione più distante dalla Trial Area e la stazione che invece ne è immediatamente al di

fuori, sia nell'area tedesca (PERMANOVA, $p < 0.01$) che nell'Area belga (PERMANOVA, $p < 0.05$; Fig. 4E, Fig. 4F).

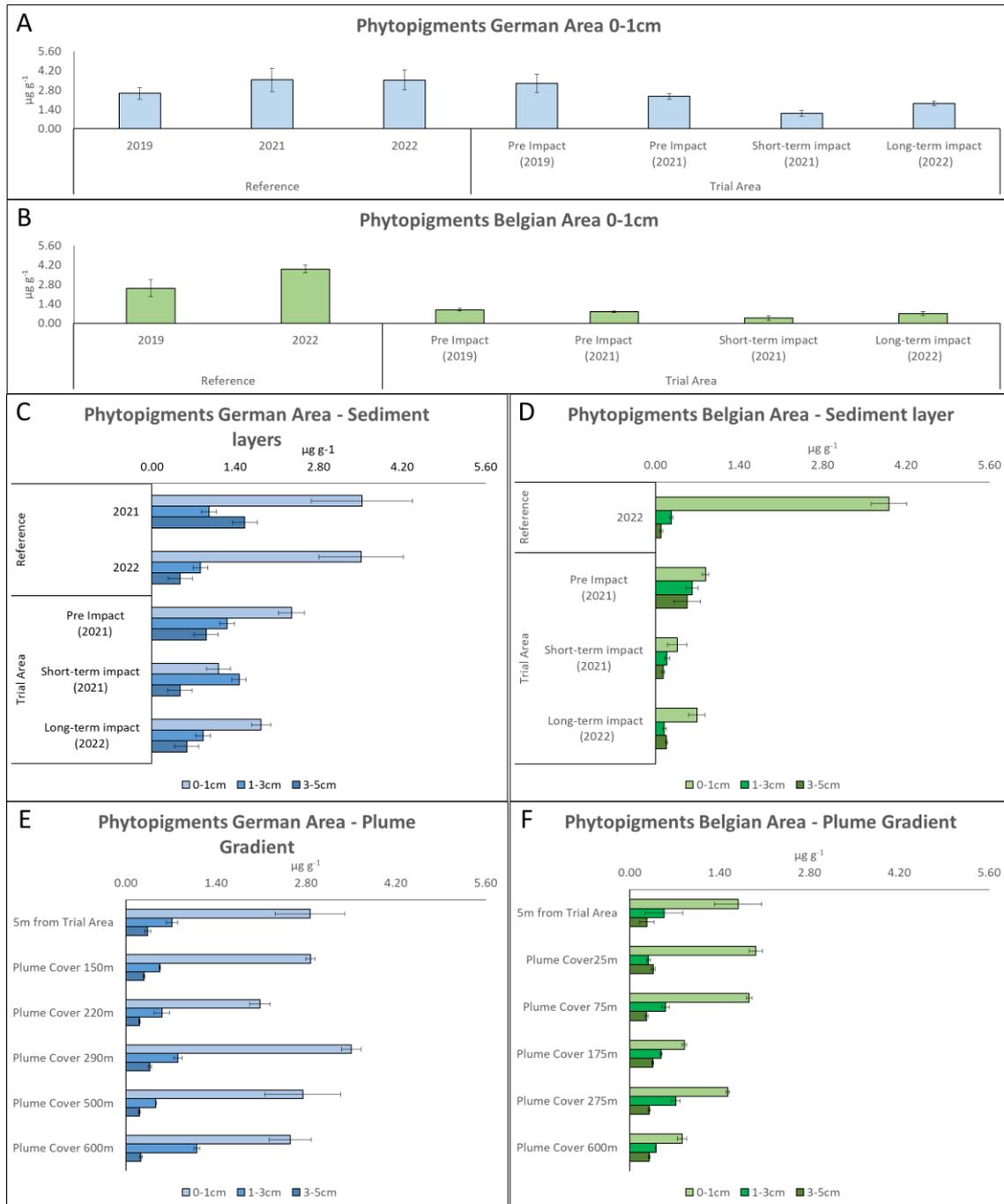


Fig 4. Contenuto di fitopigmenti stimato nel primo centimetro di sedimento nell'Area tedesca (A) e nella Area Belga (B) e lungo il profilo verticale (0-1cm, 1-3cm, 3-5cm) nelle due Aree (C e D) nei siti di Reference (utilizzata come controllo a lungo termine negli anni di campionamento) e nella Trial Area prima (Pre-impatto, anno 2021) e dopo (Post-impatto, anno 2021 e 2022) l'impatto minerario; contenuto di fitopigmenti stimato negli strati 0-1cm, 1-3cm, 3-5cm lungo un gradiente di deposito della *plume*. nell' area Tedesca (E) e Belga (F) nel 2022.

La concentrazione di proteine determinata nella Reference Area dell'area tedesca non mostra differenze significative né tra gli anni (2019 vs 2021 vs 2022) né quando confrontata con i valori del pre-impatto (circa 2.45 ± 0.2 mg/g nel 2019 e 2.66 ± 0.1 nel 2022; Fig. 5A).

Confrontando le concentrazioni di proteine osservate nel primo centimetro di sedimento nella Trial Area prima (Pre-Impact) e poche ore dopo l'impatto di Patania (Short-term Impact) è emersa una significativa diminuzione (PERMANOVA, $p < 0.01$; Fig. 5A). Nella Trial Area anche a distanza di 18 mesi (Long-term Impact) si osservano concentrazioni significativamente più basse sia rispetto alla condizione Pre Impatto (2021) sia alla Reference Area campionata nello stesso anno (2022) che coinvolgono i primi 3 cm di sedimento (PERMANOVA, $p < 0.001$; Fig. 5A; Fig. 5C). L'entità della diminuzione del primo cm della Trial Area (long-term impact) è stata del 38% rispetto al pre-impatto e di un ulteriore 24% rispetto ai campioni raccolti poche ore dopo l'impatto (Fig. 5A).

La concentrazione di proteine determinata nella Reference Area Belga non mostra differenze significative negli anni di campionamento (2019 e 2022). La Trial Area, subito dopo l'impatto, mostra valori più bassi del 38% nel primo centimetro di sedimento rispetto alla concentrazione misurata prima dell'azione di Patania II (Pre-Impact). Valori più bassi sono stati osservati lungo tutto il profilo verticale di sedimento analizzato (strato 0-1cm, 1-3cm e 3-5cm) (PERMANOVA, $p < 0.001$; Fig. 5B, Fig. 5D). A distanza di 18 mesi dall'impatto (Long-term Impact), la concentrazione di proteine non ha mostrato variazioni significative rispetto ai valori rilevati subito dopo l'impatto (Short-term Impact) (Fig. 5A, Fig. 5D). Le concentrazioni di proteine determinate nel primo centimetro della Trial Area (Long-term Impact) sono significativamente diverse rispetto a quelle osservate nelle Reference Area campionate nello stesso periodo (PERMANOVA, $p < 0.001$; Fig. 5A).

Confrontando le concentrazioni di proteine nel primo cm di sedimento (0-1 cm) lungo il gradiente di deposizione della *plume* nell'Area tedesca, è emerso che le concentrazioni sono più alte nel sito posto a maggiore distanza dall'area dell'impatto rispetto a tutti i siti collocati a una distanza inferiore rispetto alla Trial Area (PERMANOVA, $p < 0.001$; Fig. 5E). Lungo il profilo verticale di sedimento, il sito campionato a 600 m dalla Trial Area mostra una progressiva diminuzione della concentrazione proteica con valori più alti nel primo centimetro e più bassi nello strato 3-5 (PERMANOVA, $p < 0.01$). Al contrario man mano che ci si avvicina alla Trial Area non si osservano più differenze significative fra i vari strati di

sedimento analizzati (Fig. 5.E) con il sito posto immediatamente al di fuori della Trial Area che mostra concentrazioni di proteine nei diversi strati di sedimento comprese tra 1.5 ± 0.1 mg/g e 1.6 ± 0.2 mg/g. Analogamente, nell'Area belga, lungo il profilo verticale, non sono state osservate differenze significative nella concentrazione di proteine tra i diversi strati di sedimento nel sito immediatamente al di fuori della Trial Area, con valori compresi tra 1.02 ± 0.1 mg/g e 1.22 ± 0.1 mg/g (Fig. 5F). Il sito più distante dalla Trial Area presenta invece differenze significative tra lo strato 0-1 cm e il 3-5 cm (PERMANOVA $p < 0.05$; Fig. 5F).



Fig 5. Contenuto di proteine stimato nel primo centimetro di sedimento nell'Area tedesca (A) e nella Area Belga (B) e lungo il profilo verticale (0-1cm, 1-3cm, 3-5cm) nelle due Aree (C e D) nei siti di Reference (utilizzata come controllo a lungo termine negli anni di campionamento) e nella Trial Area prima (Pre-impatto, anno 2021) e dopo (Post-impatto, anno 2021 e 2022) l'impatto minerario; contenuto di proteine stimato negli strati 0-1cm, 1-3cm, 3-5cm lungo un gradiente di deposito della *plume*. nell' area Tedesca (E) e Belga (F) nel 2022.

I carboidrati rappresentano la frazione principale del carbonio biopolimerico totale (BPC). Al contrario di quanto osservato per le proteine, i carboidrati nel primo centimetro di sedimento variano significativamente nella Reference Area dell'area tedesca tra il 2019 e il 2021 (PERMANOVA, $p < 0.001$; Fig. 6A); tuttavia valori simili nel contenuto di carboidrati sono stati osservati tra la Reference Area e la Trial Area nel 2021 prima che avvenisse il test di Patania. A seguito dell'attività estrattiva, sono stati registrati valori significativamente più bassi di carboidrati nel primo centimetro di sedimento della Trial Area (PERMANOVA, $p < 0.01$) con valori di 3.7 ± 0.5 mg/g nel pre-impatto, 2.5 ± 0.2 mg/g subito dopo l'impatto (Short-term Impact) e 2.21 ± 0.3 mg/g nel sito campionato a 18 mesi dall'impatto (Long-term Impact). Inoltre, nel 2022 la concentrazione determinata nella Trial Area (Long-term Impact) risulta significativamente minore rispetto ai sedimenti della Reference Area campionata nel 2022 (PERMANOVA, $p < 0.05$; Fig. 6A).

La concentrazione di carboidrati nell'Area belga non mostra differenze significative su scala temporale (2019 vs 2021 vs 2022) e spaziale (Reference Area vs Trial Area Pre-Impact) nei siti non impattati dalle attività di mining (Fig. 6B).

A seguito dell'azione del collettore (i.e. Patania II), è stata osservata una minore concentrazione di carboidrati nel primo centimetro di sedimento nelle aree impattate (Short-term Impact e Long-term Impact) rispetto a quanto osservato prima dell'impatto (Trial Area, Pre Impact) (PERMANOVA, $p < 0.001$). Le concentrazioni di carboidrati, nella Trial Area a 18 mesi dall'impatto (anno 2022), hanno mantenuto valori simili a quelli osservati nel Post-impatto 2021 (Fig. 6B) e mostrano valori del 38% più bassi rispetto alla Reference Area campionata nello stesso periodo (PERMANOVA, $p < 0.001$; Fig. 6B).

Confrontando il contenuto di carboidrati lungo il gradiente di rideposizione della *plume* non emerge un pattern chiaro man mano che ci si allontana dalla Trial Area Tedesca e Belga (Fig. 6E, Fig. 6F).

Le concentrazioni di carboidrati nell'Area Tedesca mostrano valori significativamente più alti nello strato 1-3 cm rispetto allo strato 0-1 cm nella stazione immediatamente al di fuori del sito dell'impatto e nella stazione a 220 m da esso (PERMANOVA, $p < 0.01$; Fig. 6E).

Nel sito a maggiore distanza dall'area impattata (600 m dalla Trial Area), è possibile osservare una progressiva diminuzione lungo il profilo verticale di sedimento nel contenuto di carboidrati con valori più alti nel primo centimetro (2.1 ± 0.7 mg/g) seguito dallo strato 1-3 (1.74 ± 0.1 mg/g) e 3-5cm (1.72 ± 0.1 mg/g) (PERMANOVA $p < 0.01$; Fig. 6E).

A differenza di quanto osservato per l'Area Tedesca, l'Area Belga mantiene un profilo verticale in cui le concentrazioni di carboidrati diminuiscono significativamente dallo strato superficiale (0-1 cm) a quello sottostante (1-3 cm), indipendentemente dalla distanza dal sito d'impatto (PERMANOVA $p < 0.01$; Fig. 6F).

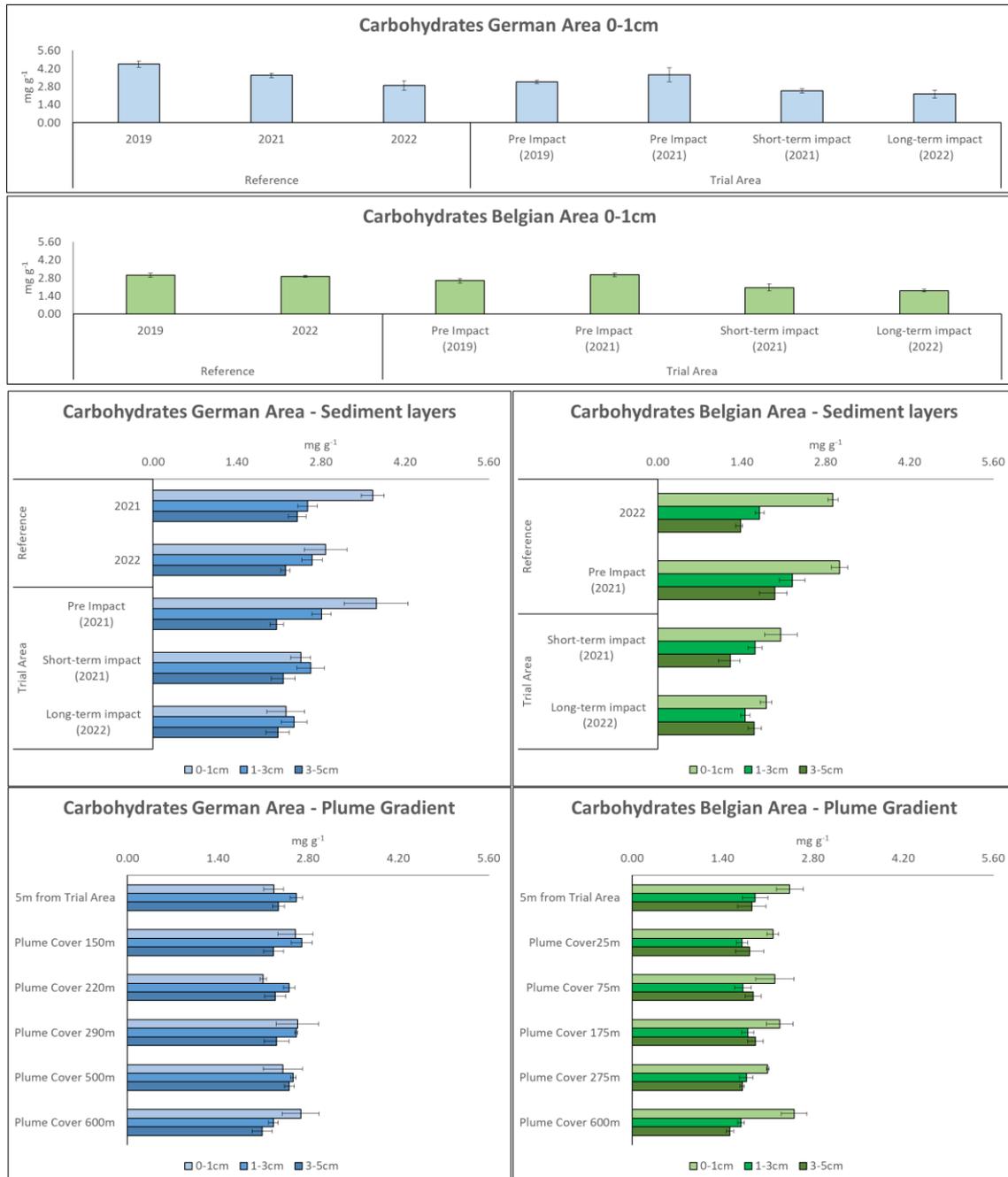


Fig 6. Contenuto di carboidrati stimato nel primo centimetro di sedimento nell'Area tedesca (A) e nella Area Belga (B) e lungo il profilo verticale (0-1cm, 1-3cm, 3-5cm) nelle due Aree (C e D) nei siti di Reference (utilizzata come controllo a lungo termine negli anni di campionamento) e nella Trial Area prima (Pre-impatto, anno 2021) e dopo (Post-impatto,

anno 2021 e 2022) l'impatto minerario; contenuto di carboidrati stimato negli strati 0-1cm, 1-3cm, 3-5cm lungo un gradiente di deposito della *plume*. nell' area Tedesca (E) e Belga (F) nel 2022.

I lipidi rappresentano la componente quantitativamente minore rispetto a proteine e carboidrati. Dalle analisi condotte è emerso che le concentrazioni di lipidi nel primo centimetro di sedimento, sia nell'area Tedesca che Belga sono soggette a un'alta variabilità spaziale e temporale (Fig. 7A; Fig. 7B). Nella Reference Area Tedesca la quantità di lipidi oscilla tra 0.5 ± 0.1 mg/g, nei primi campioni raccolti nel 2019, e 0.3 ± 0.1 mg/g nei campioni del 2022 (PERMANOVA, $p<0.05$; Fig. 7A). In entrambe le aree, in seguito all'attività di Patania, la Trial Area non ha subito variazioni significative nella quantità di lipidi nel primo cm di sedimento (Fig. 7A, Fig. 7B). Nell'area Tedesca anche a distanza di 18 mesi non si osservano differenze significative nella Trial Area rispetto al pre-impatto e al post-impatto (Short-term Impact) (Fig. 7A). Nell'area Belga, invece, la concentrazione lipidica del primo cm di sedimento misurata nella Trial Area, nel 2022 (Long-term Impact) è significativamente inferiore rispetto ai valori osservati prima (Pre-Impact) (PERMANOVA, $p<0.05$) e a poche ore dall'impatto (Short-term Impact) oltre ad essere significativamente più bassa della concentrazione presente nei campioni della Reference Area del 2022 (Fig. 7B).

Differenze significative tra i siti campionati lungo il gradiente di rideposizione della plume sono emerse solo all'interno dell'Area tedesca tra la stazione collocata a 600 m e a quella situata immediatamente al di fuori della Trial Area (PERMANOVA, $p<0.05$; Fig. 7E, Fig. 7F). In tutte le stazioni, inoltre, non si osservano differenze nel contenuto lipidico nei sedimenti tra gli strati analizzati (0-1, 1-3, 3-5cm) (Fig. 7C).

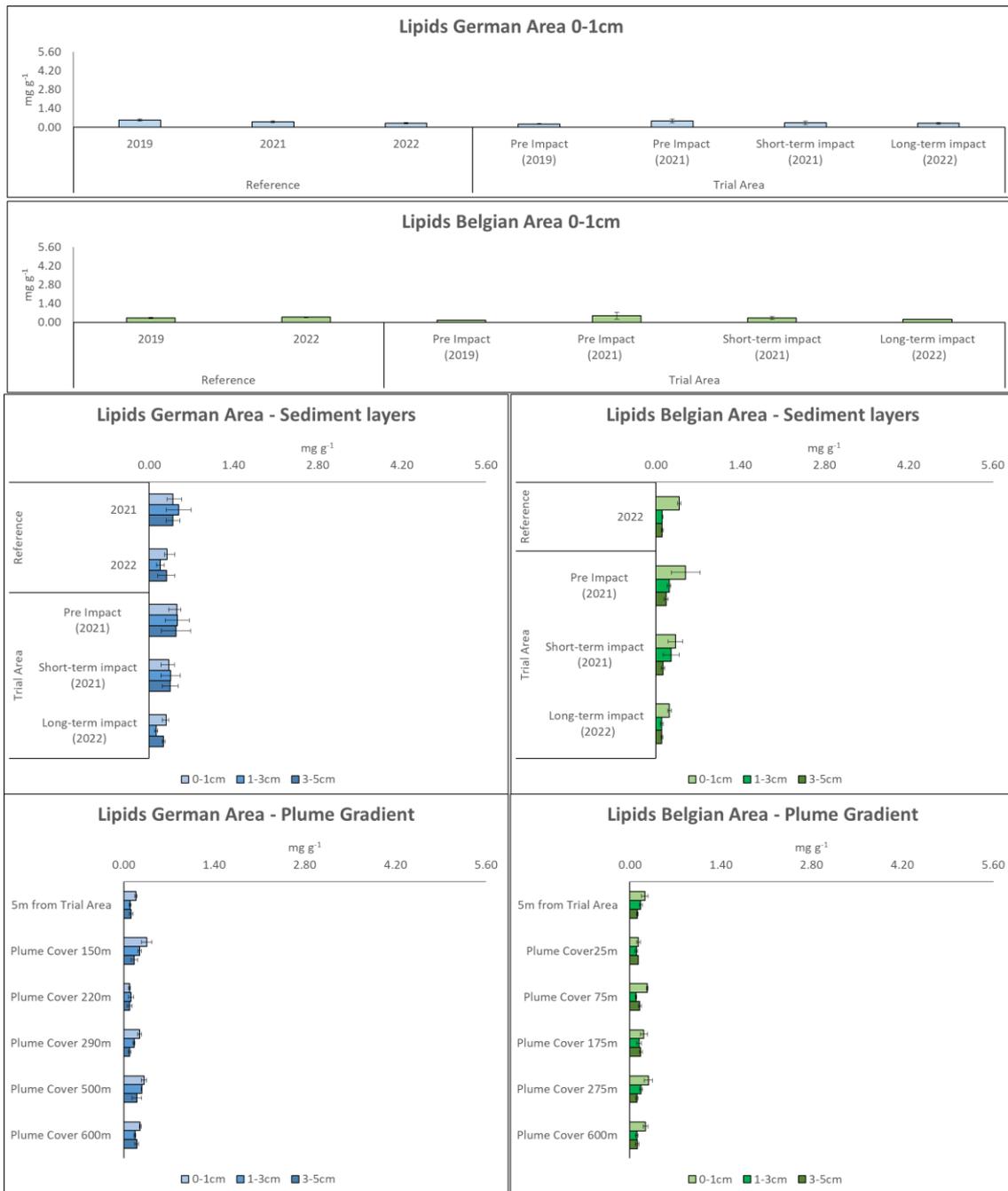


Fig 7. Contenuto di lipidi stimato nel primo centimetro di sedimento nell'Area tedesca (A) e nella Area Belga (B) e lungo il profilo verticale (0-1cm, 1-3cm, 3-5cm) nelle due Aree (C e D) nei siti di Reference (utilizzata come controllo a lungo termine negli anni di campionamento) e nella Trial Area prima (Pre-impatto, anno 2021) e dopo (Post-impatto, anno 2021 e 2022) l'impatto minerario; contenuto di lipidi stimato negli strati 0-1cm, 1-3cm, 3-5cm lungo un gradiente di deposito della *plume*. nell' area Tedesca (E) e Belga (F) nel 2022.

I valori di BPC nel primo cm di sedimento nella Reference Area tedesca oscillano tra 3.2 ± 0.3 mg/g e 2.7 ± 0.2 mg/g nel 2019 e nel 2022, rispettivamente (PERMANOVA, $p < 0.05$), mentre

nella Trial Area tedesca prima dell'impatto osserviamo concentrazioni di BPC che variano da 2.53 ± 0.2 mg/g a 3.0 ± 0.2 mg/g nel 2019 e 2021, rispettivamente (PERMANOVA, $p < 0.05$; Fig. 8A).

Poche ore dopo l'attività di Patania II nell'area tedesca, la concentrazione di BPC nel primo cm di sedimento del sito impattato (Short-term Impact) è più bassa del 35% rispetto ai valori osservati prima dell'impatto (PERMANOVA, $p < 0.001$; Fig. 8A). Concentrazioni significativamente più basse rispetto al Pre-impatto si sono mantenute anche a distanza di 18 mesi nella Trial Area (Long-term Impact) dove si osservano concentrazioni di BPC minori del 46% rispetto al pre-impatto (PERMANOVA, $p < 0.001$; Fig. 8A). Inoltre, i valori di concentrazione di BPC determinati nel primo centimetro di sedimento nella Trial Area 18 mesi dopo l'impatto di Patania II (anno 2022) presentano una concentrazione del 38.7% più bassa rispetto alla Reference campionata quello stesso anno (1.65 ± 0.2 mg/g e 2.7 ± 0.2 mg/g nel Post-Impatto e Reference Area, rispettivamente) (PERMANOVA, $p < 0.01$; Fig. 8A).

Nonostante la diminuzione più evidente si abbia nel primo cm di sedimento, è stata osservata una diminuzione anche nello strato di sedimento sottostante (1-3 cm) che interessa la Trial Area (Long-term Impact) rispetto alla Trial Area pre-impact e post-impact (Short-term Impact) e rispetto alla Reference Area del 2022 (Fig. 8C).

Nell'area belga i valori di BPC oscillano tra 2.2 ± 0.1 mg/g e 2.3 ± 0.1 mg/g nella Reference Area 2019 e 2022 (Fig. 8B). Così come osservato per l'Area tedesca, l'Area belga mostra concentrazioni di BPC nella Trial Area significativamente più basse dopo il test di mining sia nel 2021 (Short-term Impact) sia nel 2022 (Long-term Impact; PERMANOVA, $p < 0.001$) lungo tutto il profilo verticale (0-1 cm, 1-3 cm, 3-5 cm; Fig. 8D).

I siti campionati lungo il gradiente di deposizione della *plume* non hanno mostrato differenze significative nel contenuto di BPC né nell'Area tedesca né nell'Area belga (Fig. 8E; Fig. 8F).

Nell'area tedesca, nelle stazioni comprese tra il sito immediatamente fuori dall'area d'impatto e quella situata a 600 m di distanza, lo strato superficiale (0-1cm) e lo strato sottostante (1-3cm) non presentano differenze significative (Fig. 7D). In tutte le stazioni entro i 500 m la concentrazione di BPC nello strato 1-3 cm è sempre maggiore della concentrazione di BPC presente nello strato superficiale. Al contrario, nella stazione più distante dal sito d'impatto la concentrazione di BPC diminuisce del 17% tra il primo e il secondo strato di sedimento (Fig. 8E). Nell'area belga, invece, tutte le stazioni lungo il

gradiente di rideposizione della *plume* presentano concentrazioni di BPC nello strato 0-1 cm significativamente più alte rispetto a quelle degli strati sottostanti (PERMANOVA, $p < 0.01$; Fig. 8F).

Confrontando i valori del carbonio biopolimerico integrati lungo i primi 5 cm di sedimento si continua a osservare una minor concentrazione di BPC nella Trial Area post impatto (Short-term Impact) e a 18 mesi dall'impatto (Long-term Impact) rispetto alle concentrazioni che caratterizzavano la Trial Area prima dell'attività estrattiva (Pre-Impact). Queste differenze sono evidenti sia nell'area tedesca che nell'area belga (Fig. 9A; Fig. 9C). Invece, le differenze tra i siti lungo il gradiente di rideposizione della *plume* sono più contenute (Fig. 9B; Fig. 9D).

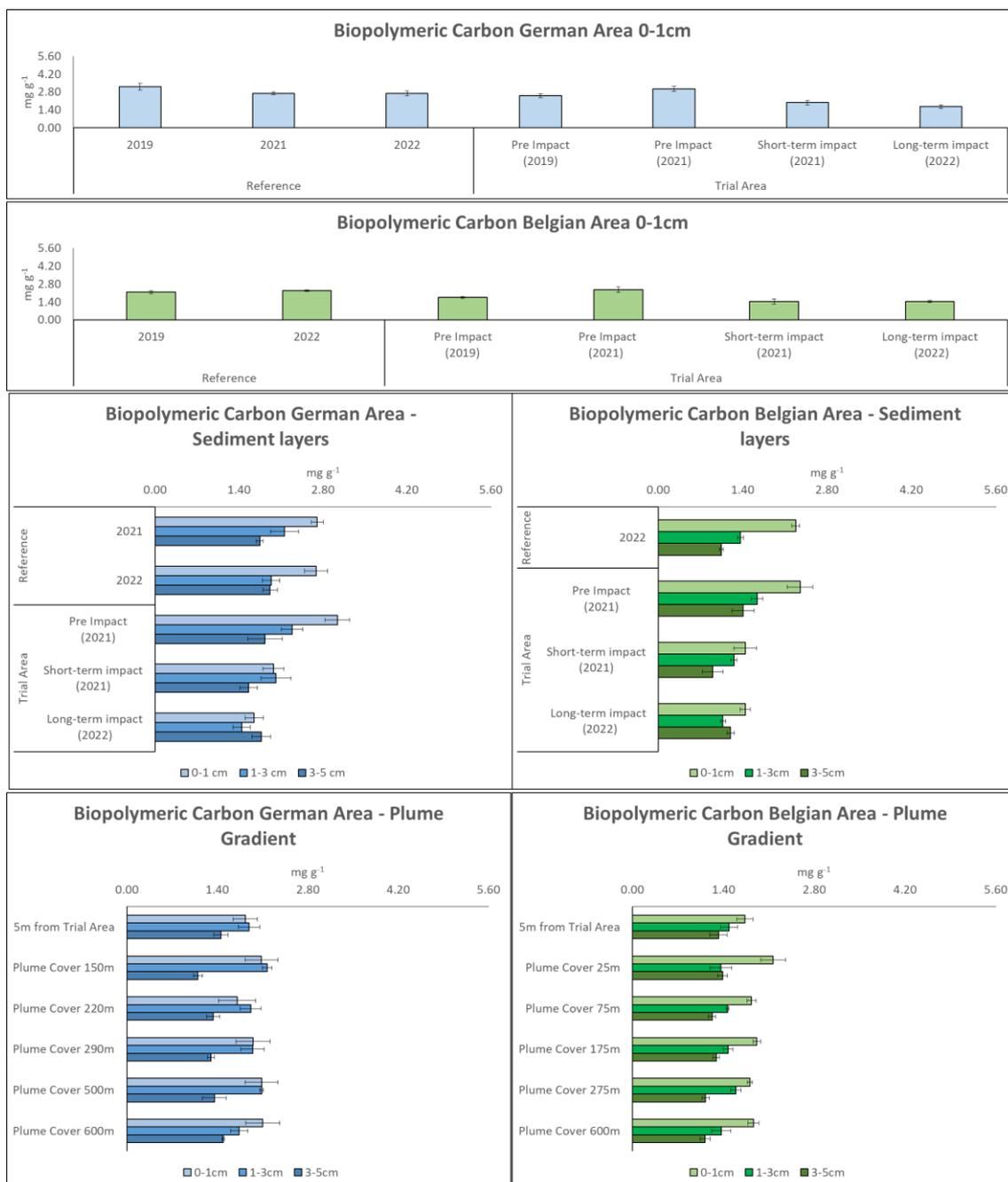


Fig 8. Contenuto di BPC stimato nel primo centimetro di sedimento nell'Area tedesca (A) e nella Area Belga (B) e lungo il profilo verticale (0-1cm, 1-3cm, 3-5cm) nelle due Aree (C e D) nei siti di Reference (utilizzata come controllo a lungo termine negli anni di campionamento) e nella Trial Area prima (Pre-impatto, anno 2021) e dopo (Post-impatto, anno 2021 e 2022) l'impatto minerario; contenuto di BPC stimato negli strati 0-1cm, 1-3cm, 3-5cm lungo un gradiente di deposito della *plume*. nell' area Tedesca (E) e Belga (F) nel 2022.

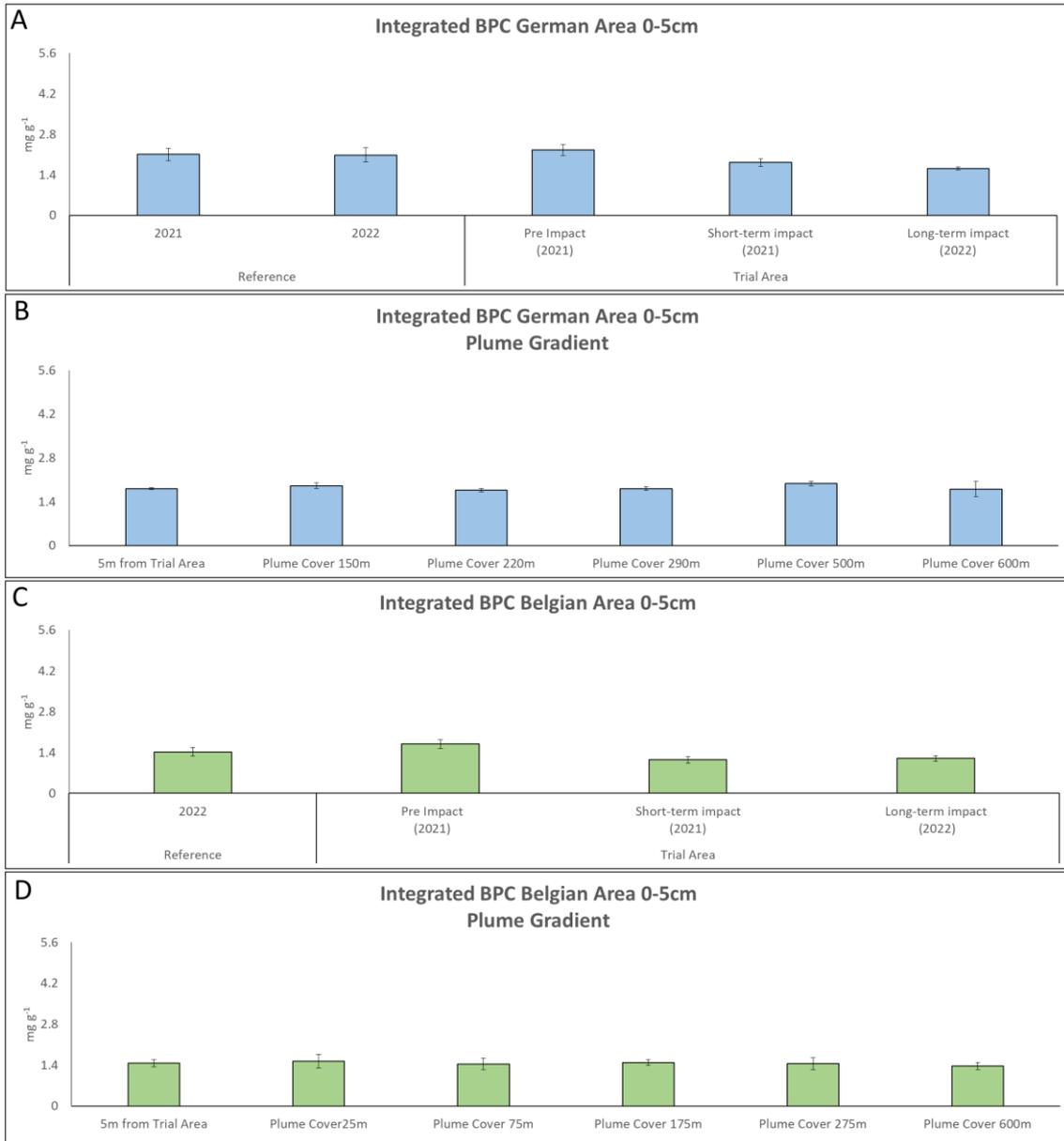


Fig 9. Contenuto integrato di BPC stimato nello strato di sedimenti (0-5 cm) nell'Area tedesca (A) e nella Area Belga (B) nelle due Aree nei siti di Reference (utilizzata come controllo a lungo termine negli anni di campionamento) e nella Trial Area prima (Pre-impatto, anno 2021) e dopo (Post-impatto, anno 2021 e 2022) l'impatto minerario; contenuto integrato di BPC stimato nello strato di sedimenti (0-5 cm) lungo un gradiente di deposito della *plume*. nell' area Tedesca (C) e Belga (D) nel 2022.

4.2 Diversità microeucariotica

Dal sequenziamento degli ampliconi di 18S rDNA sono stati ottenuti complessivamente 10.272.949 ASV microeucariotici, che in seguito a rarefazione, sono stati assegnati a 34 phyla, 69 classi, e 217 famiglie.

Il numero di ASVs mostra differenze significative nelle Reference Area belga e tedesca campionata nei diversi anni (PERMANOVA $p < 0.05$; Fig. 13A; Fig. 14A). Non si osservano invece differenze significative nell'Area tedesca tra il numero di ASVs osservate nella Reference Area e nella Trial Area (Pre- e Post-Impatto) nel 2021 (Fig. 13A). In entrambe le aree, inoltre, non sono emerse differenze significative tra pre- e post-impatto nel 2021 in termini di ASVs mentre ci sono differenze significative se confrontate con la Trial Area 2022 (Long-term Impact) (Fig. 13A; Fig 14A).

I campioni dalle stazioni situate lungo il gradiente di rideposizione della *plume* mostrano differenze significative tra il sito situato a 600 m e i siti più vicini alla Trial Area nell'area tedesca (PERMANOVA $p < 0.05$), mentre non sono presenti differenze significative tra i siti campionati lungo il gradiente di rideposizione del plume nell'area belga (Fig. 13B; Fig. 14B).

I valori dell'indice di Shannon mostrano pattern simili a quelli dell'ASV, per quanto riguarda la Reference Area e la Trial area pre-impatto, con differenze temporali significative sia nell'area tedesca che nell'area belga (Fig. 13C; Fig. 14C) e assenza di differenze significative tra Reference Area e Trial Area nel 2021 (Pre-Impact e Short-Term Impact) (Fig. 13C; Fig. 14C). Sono presenti differenze significative, tra il post-impatto 2022 (Long-term Impact) e la Trial Area pre-impatto e post-impatto (Short-term Impact) per entrambe le aree (Fig. 13C; Fig. 14C).

I valori dell'indice di Shannon determinati nei siti lungo il gradiente di rideposizione della plume non mostrano differenze significative tra loro in nessuna delle due Aree (Fig. 13D; Fig. 14D).

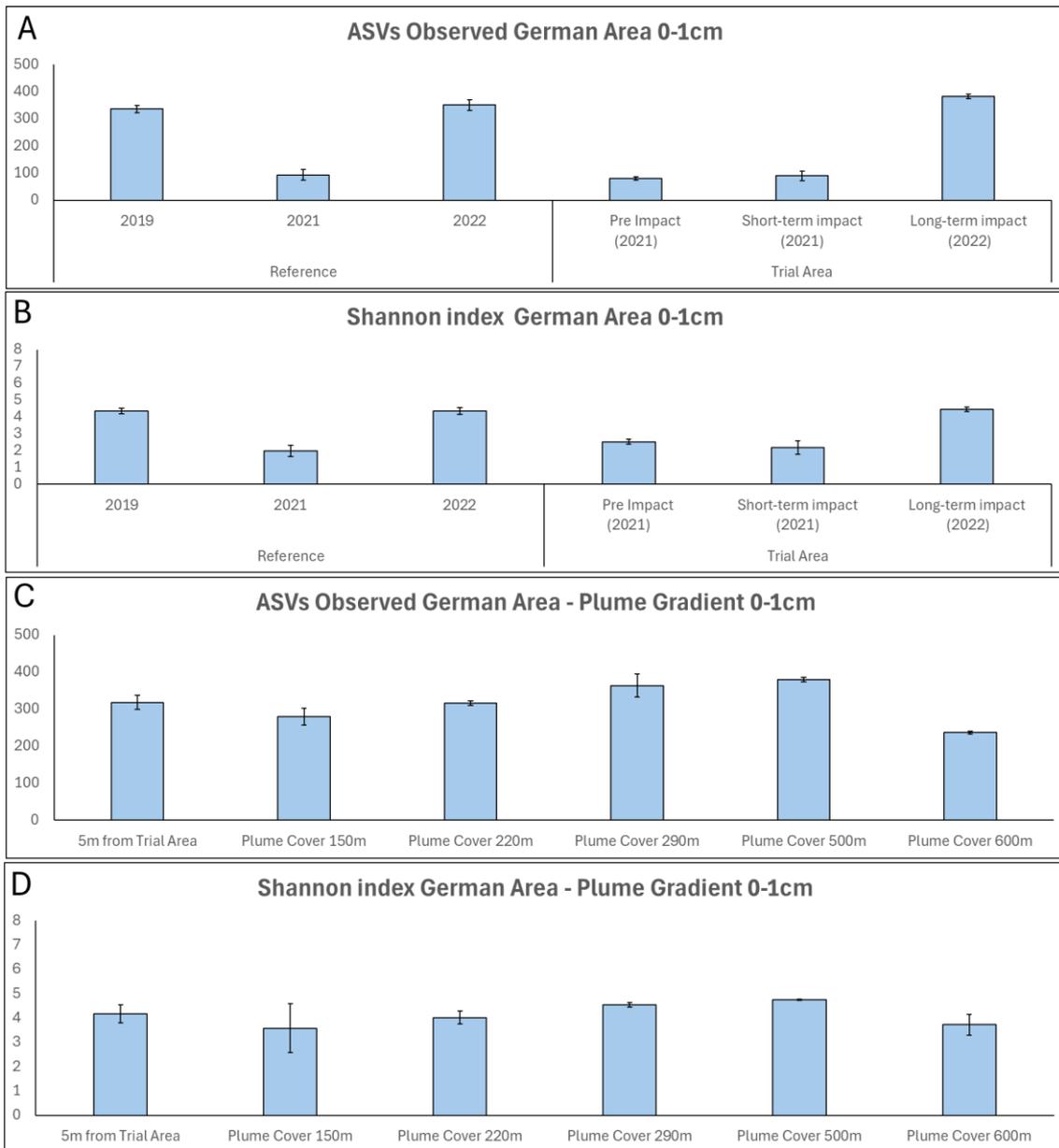


Fig 10. Variazioni spaziali e temporali degli indici di α -diversità dei microeucarioti. Le ASV osservate e l'indice di Shannon nelle stazioni investigate dell'area Tedesca nella Clarion-Clipperton Zone nei tre anni di campionamento (2019, 2021, 2022) nella Reference Area e nella Trial Area (A, C) e nelle stazioni scelte a distanza crescente dall'impatto campionate nel 2022 (B, D).

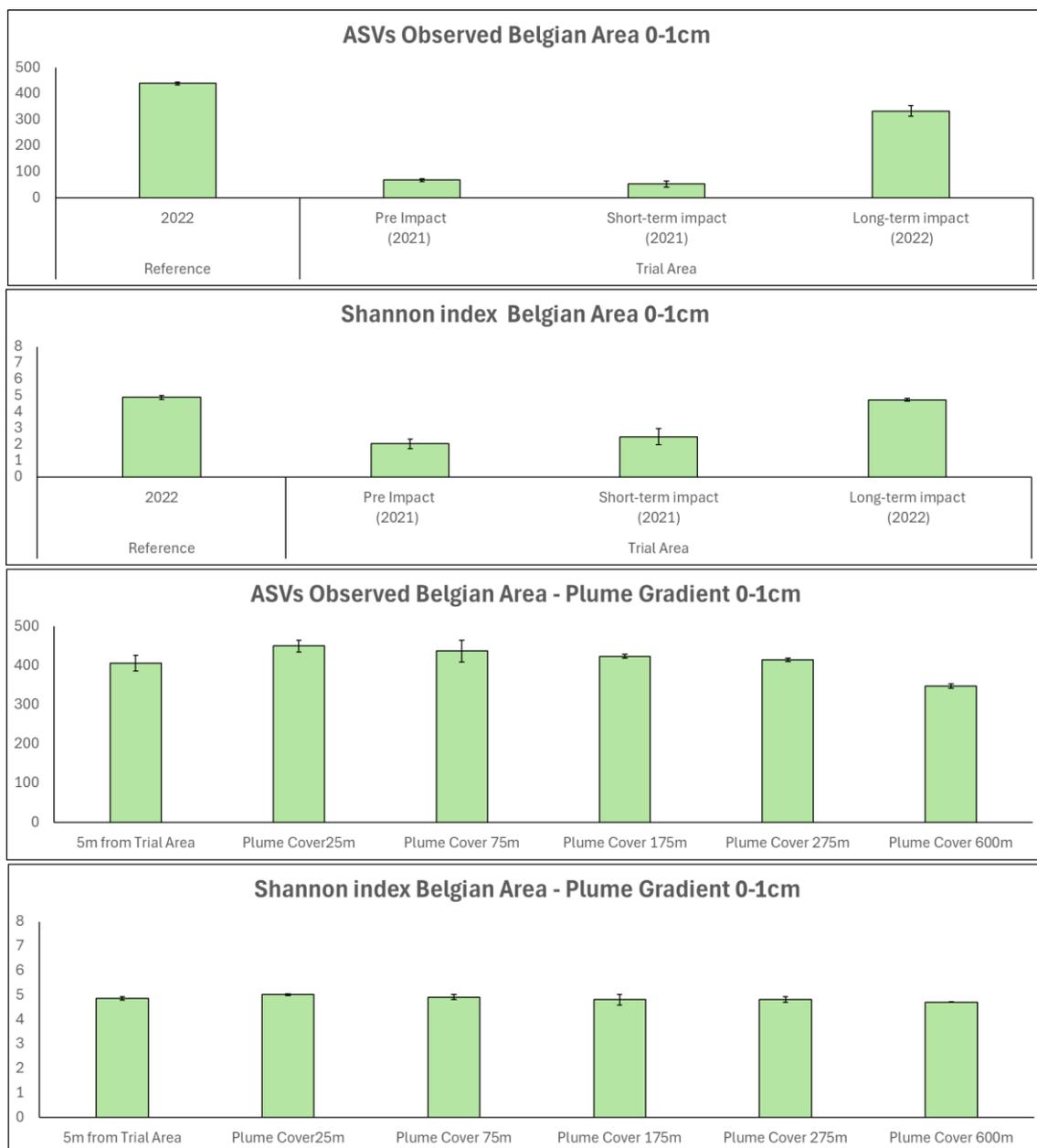


Fig 11. Variazioni spaziali e temporali degli indici di α -diversità dei microeucarioti. Le ASV osservate e l'indice di Shannon nelle stazioni investigate dell'area Belga nella Clarion-Clipperton Zone nella Reference Area e nella Trial Area (A, C) e nelle stazioni scelte a distanza crescente dall'impatto campionate nel 2022 (B, D).

Nell'area Tedesca, per quanto riguarda la composizione delle comunità microeucariotiche a livello di ASVs sono emerse differenze significative tra il 2019, 2021 e 2022 all'interno della Reference Area e tra il 2019 e il 2021 nella Trial Area prima dell'impatto (Pre-Impact) (PERMANOVA, $p < 0.001$). Nel 2021, non sono state osservate differenze significative tra Reference Area e Trial Area prima (Pre-Impact) e dopo (Post Impact, Short-Term

Monitoring) l'impatto di Patania II. Nel 2022, a distanza di 18 mesi dall'attività di Patania, osserviamo delle differenze significative nella composizione tassonomica a livello di ASVs, tra Reference Area e Trial Area (Long-term Impact) (PERMANOVA, $p < 0.01$; Fig. 12A). Inoltre, confrontando le comunità microeucariotiche osservate nella Trial Area subito (Short-term Impact) e a distanza di 18 mesi dall'impatto di Patania II (Long-term Impact) sono emerse differenze significative nella composizione tassonomica (PERMANOVA, $p < 0.01$; Fig. 12A).

Nell'area belga, non sono state osservate differenze significative, tra le comunità microeucariotiche a livello di ASVs, tra la Trial Area prima (Pre-Impact) e subito dopo l'impatto del collettore (Short-term Impact), ma confrontando la Trial Area prima (Pre-Impact) e a poche ore dall'impatto (Short-term Impact) con la Trial Area campionata 18 mesi dopo l'impatto di mining (PERMANOVA, $p < 0.1$; Fig. 13A).

Confrontando i campioni dei siti posti lungo il gradiente di rideposizione della *plume*, nell'area tedesca, è emerso che la stazione collocata a soli 5 metri dal sito dell'impatto mostra una composizione tassonomica significativamente differente rispetto a tutti gli altri siti collocati a distanza maggiore dalla Trial Area (PERMANOVA, $p < 0.1$). Questi ultimi, invece, non mostrano differenze significative tra loro (i.e, 150 m vs 220 m vs 290 m vs 500 m; Fig. 12B). Lungo il gradiente di rideposizione della *plume* all'interno dell'area belga i risultati ottenuti evidenziano differenze significative tra il sito più vicino (5m dalla Trial Area) e il sito più lontano, posto a 600 m dall'area d'impatto (PERMANOVA, $p < 0.1$; Fig. 13B).

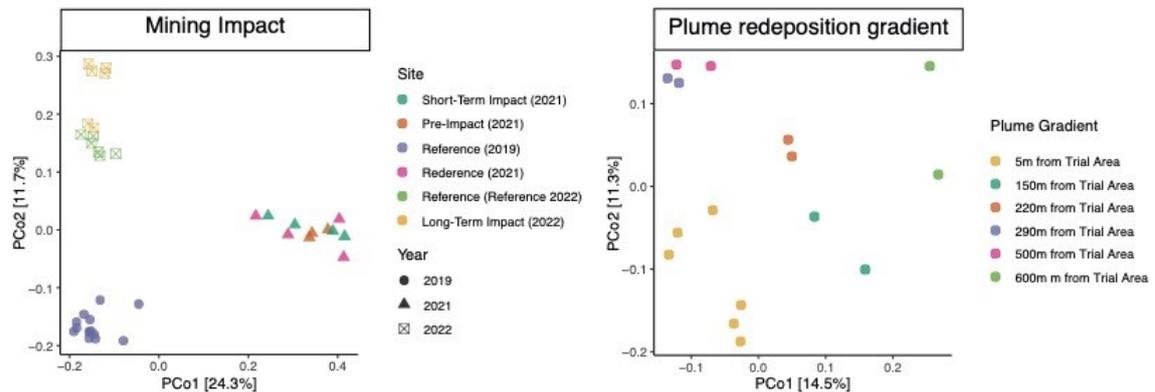


Fig 12. Grafico PCoA che rappresenta le distanze tra campioni all'interno dell'area Tedesca. A) distanza tra i campioni della Reference Area (utilizzata come controllo a lungo termine) raccolti durante le crociere SO268, IP21 e SO295, e i campioni della Trial Area prima (Pre-impatto, crociera IP21) e dopo (Post-impatto, crociere IP21 e SO295) l'impatto minerario. B) Distanza tra i campioni di sedimento campionati lungo il gradiente di deposito della plume durante la crociera SO295 nel 2022.

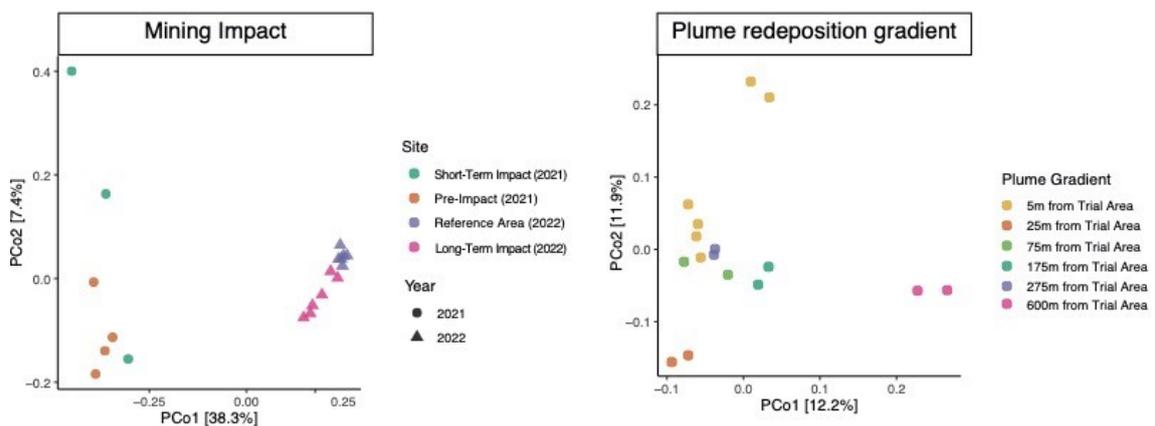


Fig 13. Grafico PCoA che rappresenta le distanze tra campioni all'interno dell'area Belga. A) distanza tra i campioni della Reference Area raccolti durante la crociera SO295, e i campioni della Trial Area prima (Pre-impatto, crociera IP21) e dopo (Post-impatto, crociere IP21 e SO295) l'impatto minerario. B) Distanza tra i campioni di sedimento campionati lungo il gradiente di deposito della plume durante la crociera SO295 nel 2022.

Nel 2019, la Reference Area tedesca è caratterizzata dalla dominanza del phylum Ascomycota, il quale rappresenta il 22.5% di tutte le sequenze microeucariotiche. Del phylum Ascomycota, il 16.9% è rappresentato dai Saccharomycetales.

Fra i taxa maggiormente rappresentati nella Reference Area nel 2019 troviamo membri appartenenti a *Subulatomonas* (5.8% della comunità) e alla famiglia *Parviluciferaceae* (phylum *Dinophyta*; 4.4%) e *Oxytrichidae* (phylum *Ciliophora*; 4.4%) (Fig. 14A).

Nel 2021, i membri dell'ordine dei Saccharomycetales contribuiscono in entrambe le Aree, Tedesca e Belga, a circa il 58% delle comunità microeucariotiche.

In particolare, nella Reference Area Tedesca i Saccharomycetales contribuiscono al 65.9% della comunità, seguiti da membri del taxa Endogenida (phylum Ciliophora) e Dynophyceae i quali contribuiscono a circa il 4% della comunità microeucariotica (Fig. 14A).

Nella Trial Area Tedesca, Saccharomycetales rappresenta il 50.6% prima dell'impatto (Pre-Impatto), il 61.5% a poche ore (Short-term Impact) e il 4.4% a distanza di 18 mesi dall'impatto (Long-term Impact), seguiti dai membri appartenenti alle Dynophyceae (8.6% prima dell'impatto, 4.2% poche ore dopo l'impatto e 4.9% nella Trial Area a 18 mesi dall'impatto) e al gruppo CCW10 (4.2% , 3.2% e 17.7% nella Trial Area prima dell'impatto, a poche ore e a 18 mesi dall'impatto, rispettivamente) (Fig. 14A).

Nell'area belga, le ASVs appartenenti al taxa dei Saccharomycetales contribuiscono sia nella Trial area pre-impatto che post-impatto (short-term impact) a circa il 57% della comunità e al 4.7% nel post-impatto 2022 (long-term impact), seguiti da i membri del gruppo microeucariotico CCW10 (6.3%, 3.2% e 17.7% nella Trial Area prima, a poche ore e a 18 mesi dall'impatto), dagli Strombidiidae (5.8%, 0% e 0.4% nella Trial Area prima, a poche ore e a 18 mesi dall'impatto) e al taxa delle Dinophyceae (3.0%, 3.6% e 3.8% nella Trial Area prima, a poche ore e a 18 mesi dall'impatto) (Fig. 15A).

Confrontando le comunità microeucariotiche bentoniche lungo il gradiente di rideposizione della plume osserviamo che, nell'Area Tedesca, i membri appartenenti ai Saccharomycetales costituiscono un'alta percentuale della comunità microeucariotica (17.2% nel sito distante 5 m dalla Trial Area, 27.4% nel sito distante 150 m, 14.3% nel sito distante 220 m, 8.1% nel sito distante 290 m, 6.1% nel sito distante 500 m e 21.55 nel sito distante 600 m), seguiti dai membri appartenenti al taxa delle Dinophyceae (11.5% a 5 m dalla Trial Area, 5.7% a 150 m, 8.9% a 220 m, 10.1% a 290 m, 6.6% a 500 m e 4.8% a 600 m) (Fig. 15A). Un'altra componente importante che caratterizza la comunità microeucariotica lungo il gradiente di rideposizione del plume sono le Labyrinthulomycetes, presente in tutti i siti in abbondanze relative comprese tra il 3% e il 6% (Fig.14.B). Nel sito a 600 m dalla Trial Area si riscontrano membri del taxa Cryothecomonas, la cui importanza relativa è un pò più alta rispetto a quella degli altri siti (7.8% vs. < 5.9%; Fig. 14B).

Nell'area belga i membri appartenenti al gruppo CCW10 rappresentano il 7.9% delle ASVs nel sito distante 5 m dalla Trial Area, 6.5% a 25 m di distanza dalla Trial Area, 7.7% a 75 m

di distanza dalla Trial Area, 4.3% a 290 m di distanza dalla Trial Area, 6.6% e 4.8% a 500 e a 600 m di distanza dalla Trial Area. Il secondo gruppo più rappresentato lungo il gradiente di rideposizione del plume nell'Area belga è rappresentato dai Protaspidae, i quali rappresentano tra il 5.8% e 8.6% delle ASVs totali seguiti dalle Dinophyceae che rappresentano il 9.1% nella stazione a 5m dalla Trial Area, 13.7% a 150 m, 7.4%, a 220 m, 5.9% a 290 m, 13.1% a 500 m e 11.4 a 600 m (Fig. 15B).

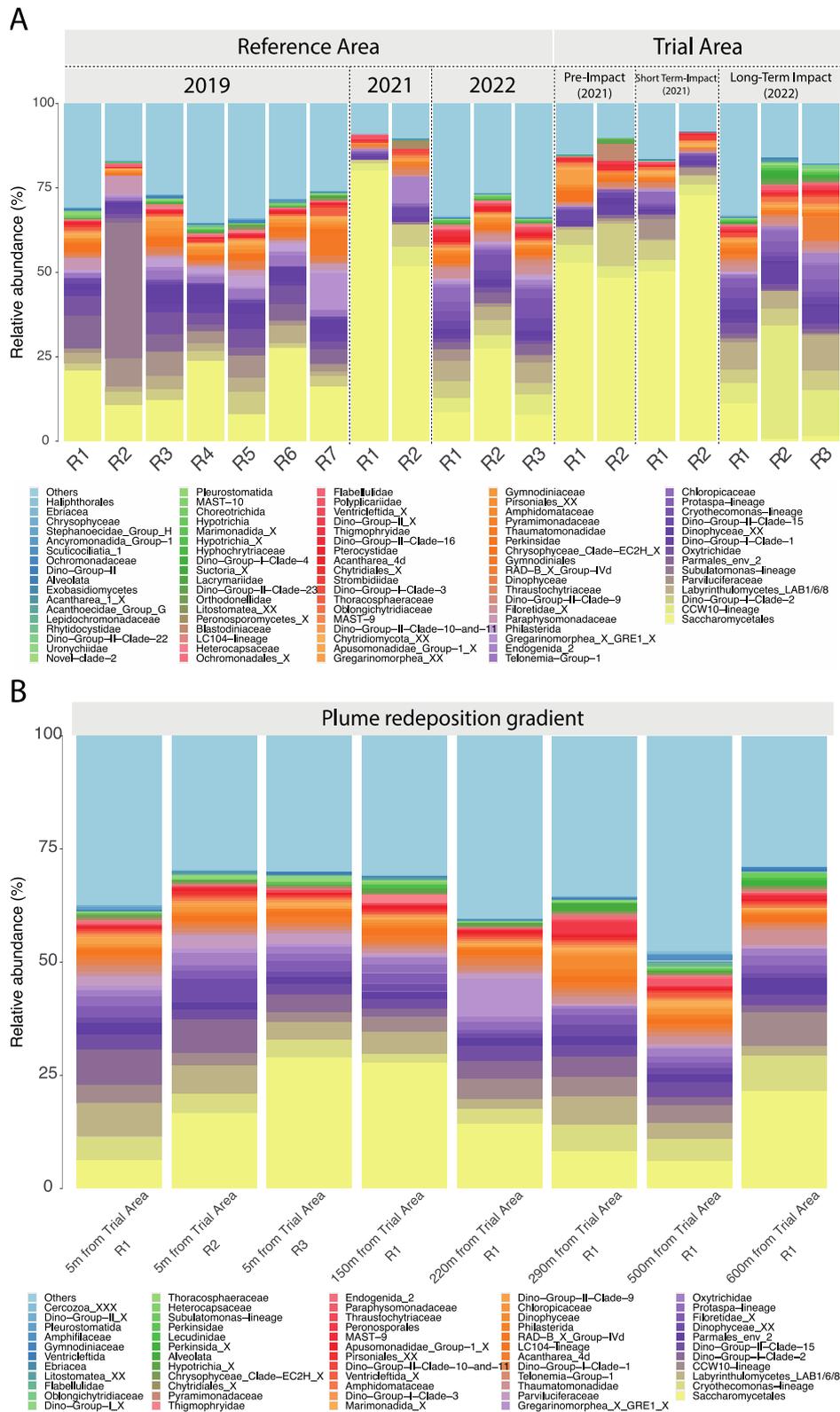


Fig.14. Struttura tassonomica delle comunità microeucariotiche nell'area Tedesca. A) Struttura tassonomica associata ai campioni di sedimento della Reference Area (utilizzata come controllo a lungo termine) raccolti durante le campagne oceanografiche SO268 (2019), IP21 (2021) e SO295 (2022), e della Trial Area prima (Pre-impatto, 2021) e dopo (Post-impatto, Short-term impact nell'anno 2021 e Long Term Impact nell'anno 2022) l'impatto minerario. B) Struttura tassonomica associata ai campioni di sedimento campionati lungo il gradiente di deposito della plume nel 2022. I taxa sono rappresentati a livello di famiglia (le famiglie sconosciute sono raggruppate al livello tassonomico più basso conosciuto).

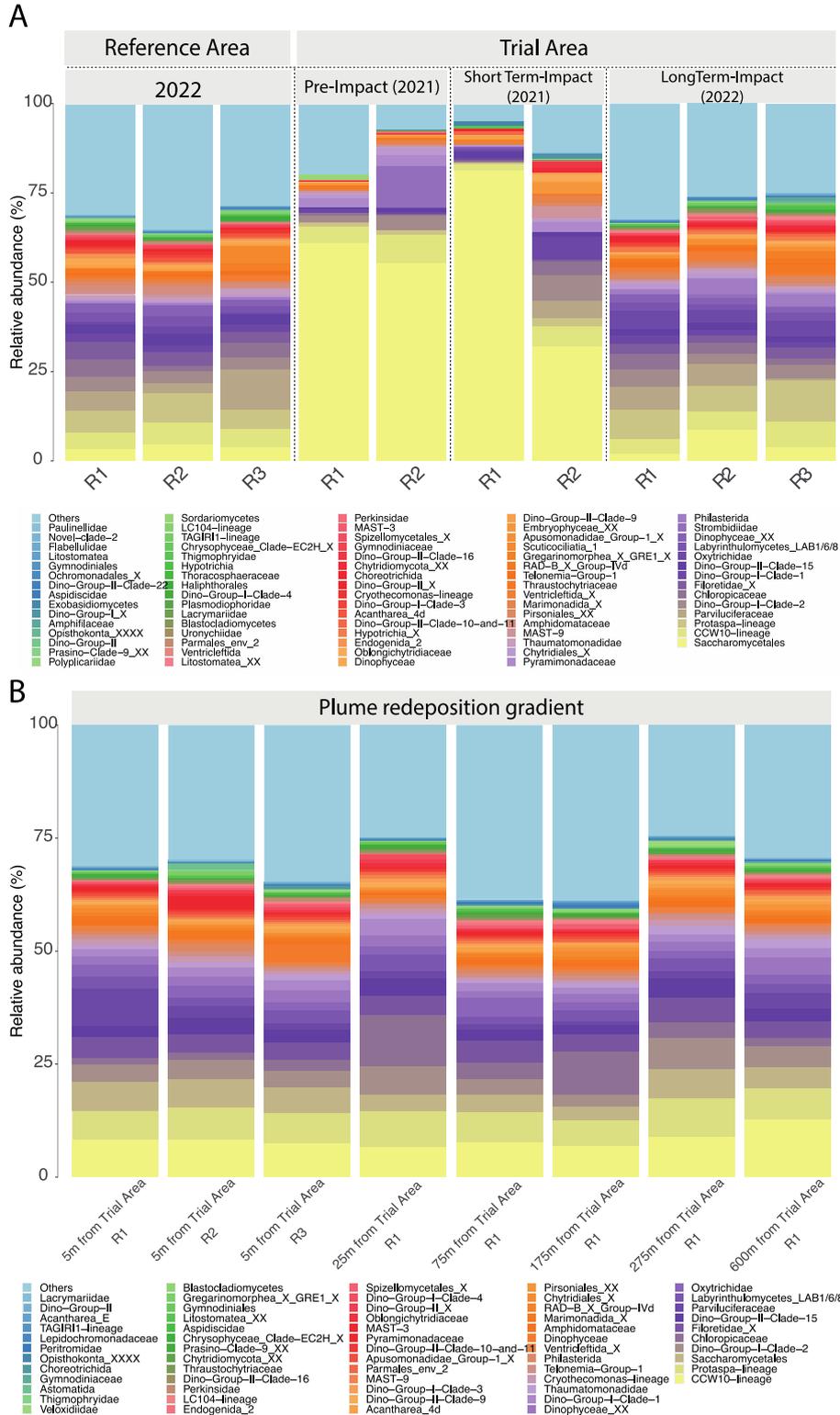


Fig.15. Struttura tassonomica delle comunità microeucariotiche nell'area Belga. A) Struttura tassonomica associata ai campioni di sedimento della Reference Area (utilizzata come controllo a lungo termine) raccolti durante la campagna oceanografica SO295 (2022), e della Trial Area prima (Pre-impatto, 2021) e dopo (Post-impatto, Short-term impact nell'anno 2021 e Long Term Impact nell'anno 2022) l'impatto minerario. B) Struttura tassonomica associata ai campioni

di sedimento campionati lungo il gradiente di deposito della plume nel 2022. I taxa sono rappresentati a livello di famiglia (le famiglie sconosciute sono raggruppate al livello tassonomico più basso conosciuto).

Confrontando le comunità microeucariotiche prima (pre-impact) e immediatamente dopo l'esperimento di mining (short-term impact), le analisi di abbondanza differenziale hanno mostrato differenze significative nelle abbondanze di 8 gruppi microeucariotici nell'area tedesca e 7 gruppi nell'area Belga. Tra i taxa significativamente più abbondanti nei sedimenti pre-impatto rispetto ai sedimenti post-impatto ci sono membri di 2 gruppi appartenenti alle Dinophyceae (Dino-Group-I-Clade 3 e Clade 2), le Chloropicaceae (phylum Chlorophyta) e ASVs affiliati al taxa Exobasidiomycetidae, mentre ASVs affiliate all'interno del taxa Stramenopila sono più rilevanti nei campioni Post-impatto (Fig. 16A). Nell'area belga tra i taxa significativamente più abbondanti nei sedimenti pre-impatto rispetto ai sedimenti post-impatto ritroviamo le Chloropicaceae e ASVs affiliate al gruppo Protaspidae mentre i taxa appartenenti alle Chytridiales e agli Stramenopila sono significativamente più abbondanti nel post-impatto 2021 (Fig. 17A).

Infine, sono state confrontate le comunità microeucariotiche del post-impatto 2021 (Short-term Impact) e del post-impatto 2022 (Long-term Impact). Da questo confronto è emerso che, nell'area tedesca, 36 taxa mostrano differenze significative nei sedimenti campionati a 18 mesi di distanza rispetto a quelli campionati poche ore dopo l'impatto. Nell'area belga invece i taxa che presentano differenze sono 25. Sia nell'area tedesca che nell'area belga, ASVs affiliate a taxa fitoplanctonici, quali le Chlorophyceae e le Dynophyceae, oltre ad altri taxa eterotrofi, quali membri delle Parviluciferaceae, delle Protaspidae e del gruppo CCW10 mostrano una maggiore abbondanza nella Trial Area a 18 mesi dall'impatto di mining (Long-term Impact) (Fig. 16A; Fig. 17A).

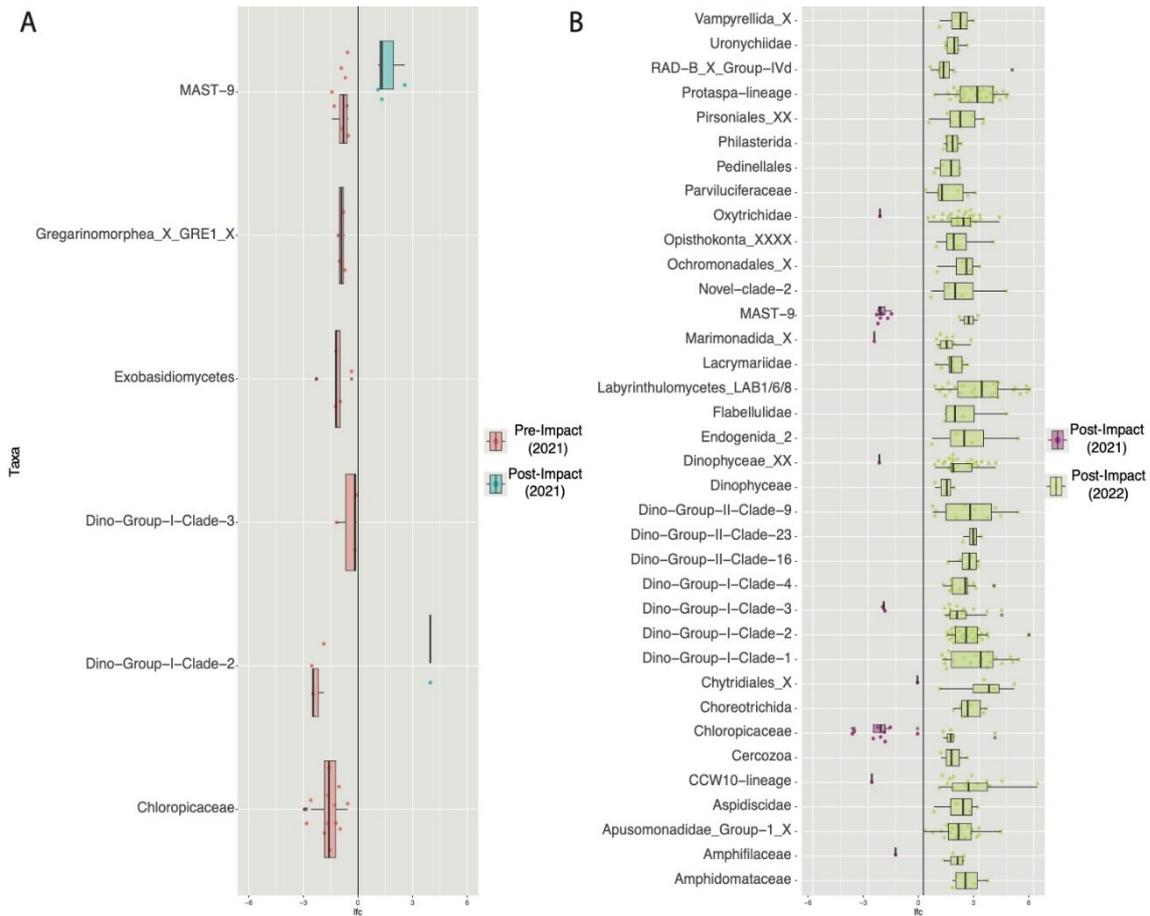


Figura 16. Risultati dell'analisi dell'abbondanza differenziale basata su ANCOM-BC dei taxa microeucariotici nell'Area Tedesca. La forza dell'associazione con i campioni del Pre-Impatto 2021 e Post-Impatto 2021 (A) e Post-Impatto 2021 e Post-Impatto 2022 (B) è stata calcolata come la differenza nelle abbondanze di ASV espresse con una trasformazione logaritmica lungo l'asse x all'interno della Trial Area. Solo le ASVs (punti) con un'associazione significativa (test di Wilcoxon, valore $p < 0,05$) sono mostrati e raggruppati a livello familiare.

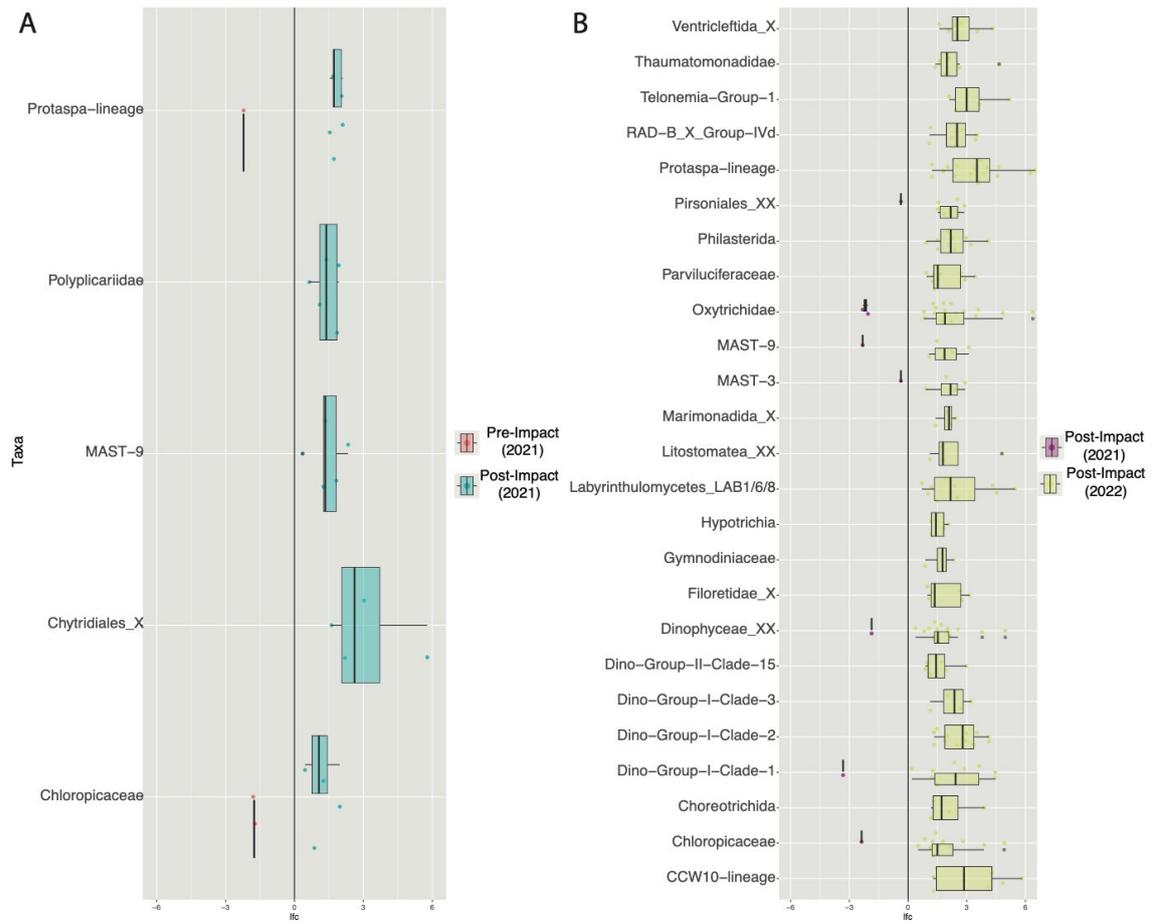


Figura 17. **Risultati dell'analisi dell'abbondanza differenziale basata su ANCOM-BC dei taxa microeucariotici nell'Area Belga.** La forza dell'associazione con i campioni del Pre-Impatto 2021 e Post-Impatto 2022 (A) e Post-Impatto 2021 e Post-Impatto 2022 (B) è stata calcolata come la differenza nelle abbondanze di ASV espresse con una trasformazione logaritmica lungo l'asse x all'interno della Trial Area. Solo le ASVs (punti) con un'associazione significativa (test di Wilcoxon, valore $p < 0,05$) sono mostrati e raggruppati a livello familiare.

5. Discussione

Con il crescere della domanda di metalli, si fa sempre più evidente la necessità di individuare fonti alternative per alcuni minerali essenziali (Kato et al., 2011; Hein et al., 2013). Tra queste fonti, i noduli polimetallici presenti negli ecosistemi marini profondi costituiscono una delle risorse più interessanti dal punto di vista industriale (Kuhn et al., 2017). Numerose sono state le critiche nei confronti dell'idea di sfruttare queste risorse, soprattutto per il grave rischio ambientale che questo rappresenta, date le caratteristiche biotiche e abiotiche che caratterizzano i fondali oceanici (Simon-Lledó et al., 2017; Levin et al., 2020). Nonostante ciò, negli ultimi anni, sono stati sviluppati sistemi prototipali atti ad estrarre risorse minerarie in profondità (Kang et al., 2021). Questi sforzi logistici e di progettazione si sono concretizzati con il test del primo pre-prototipo industriale (Patania II) di un collettore di noduli effettuato nella Clarion Clipperton Zone (CCZ) nel 2021 (Haeckel et al., 2022). Questo test ha rappresentato il primo passo verso lo sfruttamento dei noduli polimetallici come risorsa mineraria senza però tenere in considerazione il potenziale impatto sugli ecosistemi abissali, i quali sono quasi totalmente sconosciuti all'uomo. Dalle osservazioni in situ è emerso che l'impatto causato dal collettore ha avuto conseguenze dirette sull'integrità dei fondali marini (Vink et al., 2021). Infatti, l'attività di Patania II ha causato cambiamenti topografici derivanti dalla rimozione e dalla compattazione dei sedimenti e dalla formazione di una plume con conseguente rideposizione del materiale risospeso (Vink et al., 2021). I primi centimetri di sedimento analizzati dopo l'impatto avevano una struttura, proprietà fisiche e composizione biogeochimica diverse rispetto ai sedimenti superficiali indisturbati (Vink et al., 2021). Inoltre, grazie ai dati ottenuti dall'AUV e dal sonar a scansione laterale e dai dati biogeochimici è stato possibile quantificare lo spessore di sedimento rimosso: Patania II ha rimosso tra i 4 e gli 8 cm di sedimento durante le attività (Vink et al., 2021). L'evidente impatto meccanico al quale i primi 8 cm di sedimento sono stati sottoposti ha generato effetti a cascata sull'intero ecosistema bentonico. In questa tesi è stato analizzato il potenziale impatto determinato dall'attività del prototipo Patania II sullo stato trofico sedimentario e sulla comunità microeucariotica bentonica, in due aree designate all'esplorazione dei noduli polimetallici, una in concessione alla Germania e l'altra al Belgio, nel breve termine (poche ore) e a 18 mesi dall'attività estrattiva.

Studi precedenti riportano che la Clarion-Clipperton Zone (CCZ) è soggetta a differenze spaziali nei flussi di carbonio verso il fondale marino e che l'area tedesca è sottoposta a un

maggior apporto di carbonio rispetto all'Area belga (Lutz et al., 2007). I nostri risultati confermano che le due Aree presentano importanti differenze nel contenuto di materia organica nei sedimenti sia in termini di concentrazione totale di carbonio biopolimerico sia in termini di concentrazioni di proteine, carboidrati e lipidi, con l'area tedesca caratterizzata da condizioni più eutrofiche rispetto all'Area belga.

In seguito all'attività di Patania II, entrambe le Aree mostrano un significativo cambiamento nello stato trofico del sistema bentonico. Osservando come cambiano le concentrazioni di BPC in entrambe le aree investigate, prima e dopo l'impatto delle attività di mining, l'effetto più severo sembra esser presente nel primo centimetro di sedimento (valori più bassi del 35% e 39% subito dopo l'impatto e del 46% e 39% a 18 mesi di distanza rispetto alle concentrazioni stimate prima dell'impatto nell'Area tedesca e belga, rispettivamente), sebbene una diminuzione di carbonio biopolimerico sia stata osservata anche lungo tutto il profilo verticale analizzato (valori più bassi del 23% e 29% subito dopo l'impatto e del 32% e 29% a 18 mesi di distanza nei primi 5 cm rispetto alle concentrazioni stimate prima dell'impatto nell'Area Tedesca e Belga, rispettivamente).

Il carbonio biopolimerico nei sedimenti marini è spesso utilizzato come indicatore della quantità di C organico potenzialmente disponibile per i consumatori eterotrofi bentonici e come tale un utile descrittore dello stato trofico del sistema (Pusceddu et al. 2019). I valori di BPC osservati sia poche ore dopo l'esperimento di mining sia a distanza di 18 mesi, suggeriscono che l'effetto meccanico dovuto all'attività di Patania II abbia causato la rimozione dei depositi superficiali di materia organica, causando una "*food depletion*", ovvero una diminuzione della disponibilità di materia organica per i consumatori, e che tali effetti si siano mantenuti, senza mostrare segnali di ripresa, nel tempo. L'alterazione dello stato trofico del sistema qui osservato si è mostrato analogo a studi che hanno preso in considerazione i danni causati da turbosoffianti, i quali hanno dimostrato che la rimozione dei sedimenti superficiali e la formazione di una *plume* di sedimento causano un'alterazione della composizione biochimica della materia organica (Fiordelmondo et al., 2003). Ad esempio, durante un esperimento a breve termine condotto nella laguna di Goro, nel 2000, è stata osservata una diminuzione del 20% del carbonio biopolimerico nel sedimento a seguito di attività di raccolta meccanica delle vongole (Fiordelmondo et al., 2003).

Tale impatto, già di per sé negativo, potrebbe risultare ancora più grave in ecosistemi, quali gli ambienti profondi, caratterizzati da basse concentrazioni di materia organica disponibile

per le comunità bentoniche e bassi livelli di sedimentazione (Lutz et al., 2007). Sebbene l'effetto delle attività di mining determinate da Patania II sia simile a breve-medio termine nell'area belga e nell'area tedesca, è possibile ipotizzare che nel lungo termine le due aree potrebbero avere dinamiche differenti in termini di recupero delle condizioni trofiche. Infatti, l'Area tedesca essendo soggetta a maggiori input di carbonio organico dalla colonna d'acqua rispetto all'area belga (Lutz et al., 2007) potrebbe avere un recupero più rapido rispetto all'area belga più oligotrofica.

Analizzando le diverse componenti della materia organica nei sedimenti investigati, è possibile osservare che la rimozione dei primi centimetri di sedimento, in seguito all'esperimento di mining, sembra avere un effetto più severo sulla concentrazione di proteine e di fitopigmenti. A poche ore dall'impatto è stata osservata una diminuzione di fitopigmenti pari al 25% nell'area tedesca che riguarda per lo più il primo centimetro di sedimento, e del 70% nell'area belga che invece coinvolge tutto lo strato analizzato (0-5cm). Nel 2022, a 18 mesi dall'impatto le concentrazioni dei fitopigmenti sono più bassi dei valori determinati prima dell'impatto nella Trial Area, sebbene sia possibile osservare un lieve aumento quando confrontati con i valori dei sedimenti campionati a poche ore dall'impatto di Patania. Questo lieve aumento lascerebbe ipotizzare una parziale ripresa nel tempo dell'area impattata. In maniera simile a quanto visto per i pigmenti, la concentrazione di proteine dopo poche ore dall'impatto di Patania II diminuisce del 35% fino a una profondità di 5 cm, e non mostrando segnali di recupero nelle due Aree anche dopo 18 mesi dall'impatto.

Le proteine, oltre a rappresentare una porzione importante del BPC (circa il 39%) rappresentano la componente azotata più importante nei sedimenti e costituiscono, insieme ai fitopigmenti, la frazione labile, ovvero quella più facilmente bio-disponibile per gli organismi bentonici, della materia organica (Horsfall & Wolff 1997; Pusceddu et al. 2019). Da vari studi è emersa una connessione tra la disponibilità di materiale organico fresco e risposte delle comunità microbiche bentoniche in termini di abbondanza, biomassa e metabolismo (Rowe & Deming, 1985; Boetius et al., 20213; Kanzong et al., 2009). Pertanto, la riduzione delle concentrazioni di materiale organico labile a seguito dell'attività di mining, unitamente ai bassi input provenienti dalla colonna d'acqua (Lutz et al., 2006) è attesa avere effetti a lungo termine su processi ecologici chiave in cui sono coinvolti i microrganismi in termini di ciclo del carbonio e rigenerazione dei nutrienti (Vonhamme et al., 2021) e ancora

più a lungo termine per gli organismi della meiofauna e macrofauna (Boetius & Haeckel, 2018).

Durante l'ultima campagna svoltasi nel 2022, oltre al campionamento nella Reference Area e nella Trial Area in ciascun'area di contratto, Tedesca e Belga, sono stati campionati siti scelti a distanza crescente dal sito dell'impatto per valutare, a distanza di un anno, il potenziale effetto dovuto alla risedimentazione della *plume* di sedimento.

L'effetto di Patania II ha coinvolto anche aree adiacenti a quella della Trial Area a seguito della risospensione e rideposizione dei sedimenti.

Le analisi condotte hanno messo in luce che l'effetto più severo, in termini di riduzione di BPC e fitopigmenti, si sia verificato nel sito più prossimale alla Trial Area, sia nell'area tedesca sia nell'area belga, anche se tale diminuzione sia stata osservata in molte delle stazioni presenti lungo il gradiente putativo di rideposizione della *plume*.

Si ipotizza che la rideposizione di questi sedimenti sia stata influenzata dalla diversa granulometria delle diverse componenti sedimentarie e dai complessi processi idrodinamici che coinvolgono le masse d'acqua profonde e il trasporto della *plume* causando un'immediata precipitazione delle componenti più grossolane immediatamente al di fuori della Trial Area (sito a 5m) e una progressiva e irregolare rideposizione della *plume* man mano che ci si allontana (Muñoz-Royo et al., 2022).

Diversi studi hanno evidenziato che la concentrazione delle diverse componenti biochimiche della materia organica negli ecosistemi bentonici profondi diminuisce lungo il profilo verticale dei sedimenti (Danovaro et al., 2001). Questo andamento è confermato nei siti non interessati dalle attività di mining (Reference Area e Trial Area prima dell'impatto di Patania II sia nell'Area belga sia tedesca) e nel sito collocato a 600 m dalla Trial Area tedesca e belga, dove le risorse trofiche diminuiscono dal primo centimetro allo strato 3-5 cm. Al contrario, nei siti campionati tra i 5m e i 500 m dall'area di mining, la concentrazione di proteine, carboidrati e lipidi si mostra omogenea tra i vari strati, in particolare tra lo strato 0-1 e 1-3 cm. Questa perdita della stratificazione è particolarmente evidente lungo il gradiente di rideposizione della *plume* nell'Area tedesca fino a 600 m di distanza dalla Trial Area, dove gli strati 0-1 e 1-3 cm mostrano pressoché le stesse concentrazioni in termini di proteine, carboidrati e BPC.

In sintesi, per quanto concerne il contenuto di materia organica nel sedimento, i risultati qui riportati sottolineano come l'azione di Patania sia responsabile di una diminuzione delle

risorse trofiche nella Trial area tedesca e belga e di una omogenizzazione di almeno i primi 3 cm di sedimento nell'area immediatamente al di fuori della Trial Area, coinvolta nella rideposizione della plume. Nel complesso, alterazioni dello stato trofico all'interno dell'area di mining e nell'area immediatamente circostante potrebbero causare potenziali importanti alterazioni nei cicli biogeochimici e influenzare i processi di ricolonizzazione biologica.

Attraverso tecniche di sequenziamento massivo, sono state identificate le principali componenti microeucariotiche bentoniche così da poter indagare i potenziali effetti determinati dalle attività di mining all'interno delle due aree, tedesca e belga. Le comunità microeucariotiche mostrano differenze temporali significative all'interno di ciascuna Area di contratto (Tedesca e Belga) nei siti non impattati da Patania II, ma non mostrano differenze spaziali tra Reference Area e Trial Area prima del Test di Patania.

Dal confronto dei risultati ottenuti dai sedimenti campionati poche ore dopo l'estrazione mineraria non sono state osservate differenze significative in termini di composizione delle comunità microeucariotiche rispetto alle comunità osservate nella Trial Area Pre-impatto. In particolare, tra le componenti dominanti nei sedimenti profondi campionati nel 2021 troviamo gli Ascomycota ($\pm 56\%$) sia prima sia subito dopo l'impatto. Organismi appartenenti al taxa Ascomycota, con probabile stile di vita lievitoide (Bass et al., 2007; Richards et al., 2012), sono tra le componenti principali delle comunità microeucariotiche in ambienti profondi (Pernice et al., 2015). Ciò confermerebbe che, nel breve tempo intercorso tra campionamento prima e dopo l'impatto nel 2021, la componente dominante della comunità microeucariotica sia rimasta invariata. Si potrebbe ipotizzare che il tempo (12-24 ore) trascorso tra il test di Patania e il campionamento della Trial Area dopo l'impatto sia stato troppo breve per permettere lo stabilirsi di una nuova comunità adattatasi alle nuove condizioni trofiche del sistema.

Osservando più nel dettaglio le diverse componenti microeucariotiche, tra i taxa che cambiano in abbondanza relativa tra pre-impatto e post-impatto 2021 (short-term impact) troviamo soprattutto taxa fitoplanctonici, quali le Dinophyceae che passano dal rappresentare l'8.6% nel pre-impatto al 4.2% della comunità dopo l'impatto nell'Area tedesca. La componente fitoplanctonica osservata nel primo centimetro dei sedimenti prima dell'impatto è il risultato di processi di sedimentazione di organismi provenienti dalla zona fotica (fitodetrito) e rappresenta una impronta genetica dell'input di origine fotosintetico che arriva al fondale marino (Jing et al., 2018). L'attività di Patania, rimuovendo i primi

centimetri del fondale avrebbe così rimosso l'impronta genetica del fitodetrito osservato nei sedimenti indisturbati e le componenti più labili della materia organica (proteine e fitopigmenti) supportando l'ipotesi che nelle prime ore l'impatto generato dal collettore sia principalmente un impatto di tipo meccanico sul sedimento senza che ancora si sia delineata una comunità microeucariotica ben strutturata alle nuove condizioni ambientali.

A distanza di 18 mesi dall'esperimento di mining, è stata osservata una comunità microeucariotica significativamente diversa rispetto a quella osservata sia nel pre-impatto sia a poche ore dall'impatto (Short-Term Impact). Potremmo ipotizzare che le differenze osservate indichino l'instaurarsi di una nuova comunità microbica diversa anche dalla Reference Area nel 2022. Questo dato evidenzia una variabilità spaziale che prima dell'impatto non era presente tra Reference Area e Trial Area e che potrebbe essere dovuta alla formazione, nell'area dell'impatto, di una nuova comunità che ha iniziato a colonizzare lo strato superficiale dopo il rimescolamento meccanico determinato dall'attività di Patania. In entrambe le aree è stato registrato un aumento dei taxa fitoplanctonici (dinophyceae e chloropicaceae) rispetto al post-impatto 2021 che, insieme all'aumento dei fitopigmenti, testimoniano un primo passo verso la ricostituzione di uno strato superficiale caratterizzato, come nello scenario pre-impatto, da materiale labile precipitato direttamente dalla superficie. L'aumento di fitodetrito ha determinato l'aumento, in entrambe le aree, di taxa della famiglia Parviluciferaceae, in quanto parassitoidi di dinoflagellati (Reñé et al., 2017), e dei membri di Labyrinthulomycetes, che spesso abbondano su necromassa alloctona (Raghukumar S., 2002). Questi taxa in quanto saprofagi, svolgono un ruolo importante nella mineralizzazione del detrito di fito- e zooplancton (Raghukumar S., 2002). Inoltre, tra i taxa eterotrofi i Marine Stramenopiles (MAST) insieme al taxa Protaspa, solitamente descritti come striscianti biflagellati, rappresentano due delle principali classi di fagotrofi (Hoppenrath e Leander, 2006) che sono aumentati a distanza di 18 mesi nella Trial Area lasciando ipotizzare l'instaurarsi di una nuova comunità microbica caratterizzata dalla presenza di saprofagi e fagotrofi.

Confrontando poi le comunità microeucariotiche presenti lungo il gradiente di rideposizione della plume, sono emerse comunità differenti, come composizione, tra l'area immediatamente al di fuori dall'area dell'impatto e tutte le altre stazioni nell'area Tedesca e tra l'area più vicina e la più lontana nell'area Belga. L'ipotesi qui formulata è che la componente più grossolana del sedimento sia precipitata rapidamente nelle immediate

vicinanze al sito dell'impatto generando condizioni trofiche e granulometriche differenti da quelle preesistenti in cui nuovi gruppi tassonomici si sarebbero insediati.

6. Conclusioni

Questi risultati nel loro insieme indicano che Patania II determina alterazioni dello stato trofico sia nell'area direttamente interessata all'attività estrattiva sia in aree adiacenti attraverso risospensione e rideposizione della plume da essa generata. In particolare, l'area di mining presenta una riduzione della disponibilità alimentare per i consumatori bentonici, mentre quelle adiacenti presentano una minore variabilità delle concentrazioni lungo il profilo verticale dei sedimenti, ovvero una sorta di omogenizzazione. Nonostante tali cambiamenti nello stato trofico del sistema, la componente microeucariotica non mostra, su breve scala temporale, delle differenze significative nella composizione di comunità, mentre invece a distanza di oltre un anno si osservano variazioni significative sia nell'area direttamente coinvolta dall'azione del collettore sia nei siti immediatamente al di fuori coinvolti dalla rideposizione della plume.

7. Bibliografia

1. Aleynik, D., Inall, M. E., Dale, A., & Vink, A. (2017). Impact of remotely generated eddies on plume dispersion at abyssal mining sites in the Pacific. *Scientific Reports*, 7(1), 16959.
2. Amon, D. J., Ziegler, A. F., Dahlgren, T. G., Glover, A. G., Goineau, A., Gooday, A. J., ... & Smith, C. R. (2016). Insights into the abundance and diversity of abyssal megafauna in a polymetallic-nodule region in the eastern Clarion-Clipperton Zone. *Scientific Reports*, 6(1), 30492.
3. Atwood, T. B., Witt, A., Mayorga, J., Hammill, E., & Sala, E. (2020). Global patterns in marine sediment carbon stocks. *Frontiers in Marine Science*, 7, 165.
4. Bass, D., Howe, A., Brown, N., Barton, H., Demidova, M., Michelle, H., ... & Richards, T. A. (2007). Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1629), 3069-3077.
5. Bienhold, C., Boetius, A., & Ramette, A. (2012). The energy–diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments. *The ISME journal*, 6(4), 724-732.
6. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
7. Boetius, A., Albrecht, S., Bakker, K., Bienhold, C., Felden, J., Fernández-Méndez, M., ... & RV Polarstern ARK27-3-Shipboard Science Party. (2013). Export of algal biomass from the melting Arctic Sea ice. *Science*, 339(6126), 1430-1432.
8. Boetius, A., & Haeckel, M. (2018). Mind the seafloor. *Science*, 359(6371), 34-36.
9. Boetius, A., & Lochte, K. (1996). Effect of organic enrichments on hydrolytic potentials and growth of bacteria in deep-sea sediments. *Marine Ecology Progress Series*, 140, 239-250.
10. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.

11. Borowski, C. (2001). Physically disturbed deep-sea macrofauna in the Peru Basin, southeast Pacific, revisited 7 years after the experimental impact. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 48(17-18), 3809-3839.
12. Brix, S., Osborn, K. J., Kaiser, S., Truskey, S. B., Schnurr, S. M., Brenke, N., ... & Martinez Arbizu, P. (2020). Adult life strategy affects distribution patterns in abyssal isopods—implications for conservation in Pacific nodule areas. *Biogeosciences*, 17(23), 6163-6184.
13. Brockett, T., & Richards, C. Z. (1994). Deepsea Mining Simulator for Environmental Impact Studies:'Benthic Disturber'Designed to Assist Multinational Team Assess Impact of Ocean Nodule Mining. *Sea Technology*, 35(8), 77-82.
14. Brown, A., Hauton, C., Stratmann, T., Sweetman, A., Van Oevelen, D., & Jones, D. O. (2018). Metabolic rates are significantly lower in abyssal Holothuroidea than in shallow-water Holothuroidea. *Royal Society Open Science*, 5(5), 172162.
15. Camenen, B., & van Bang, D. P. (2011). Modelling the settling of suspended sediments for concentrations close to the gelling concentration. *Continental Shelf Research*, 31(10), S106-S116.
- Corinaldesi, C. (2015). New perspectives in benthic deep-sea microbial ecology. *Frontiers in Marine Science*, 2, 17.
16. Chen, T., Chen, X., Zhang, S., Zhu, J., Tang, B., Wang, A., ... & Zhao, W. (2021). The genome sequence archive family: toward explosive data growth and diverse data types. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 19(4), 578-583.
17. Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian journal of ecology*, 18(1), 117-143.
18. Cordier, T., Angeles, I. B., Henry, N., Lejzerowicz, F., Berney, C., Morard, R., ... & Pawlowski, J. (2022). Patterns of eukaryotic diversity from the surface to the deep-ocean sediment. *Science Advances*, 8(5), eabj9309.
19. Dahlgren, T. G., Wiklund, H., Rabone, M., Amon, D. J., Ikebe, C., Watling, L., ... & Glover, A. G. (2016). Abyssal fauna of the UK-1 polymetallic nodule exploration area, Clarion-Clipperton Zone, central Pacific Ocean: Cnidaria. *Biodiversity Data Journal*, (4).
20. Danovaro, R. (Ed.). (2009). *Methods for the study of deep-sea sediments, their functioning and biodiversity*. CRC press.

21. Danovaro, R., Corinaldesi, C., Rastelli, E., & Anno, A. D. (2015). Towards a better quantitative assessment of the relevance of deep-sea viruses, Bacteria and Archaea in the functioning of the ocean seafloor. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(1), 81-90.
22. Danovaro, R., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Rastelli, E., Cavicchioli, R., Krupovic, M., ... & Prangishvili, D. (2016). Virus-mediated archaeal hecatomb in the deep seafloor. *Science Advances*, 2(10), e1600492.
23. Danovaro, R., Dell'Anno, A., & Fabiano, M. (2001). Bioavailability of organic matter in the sediments of the Porcupine Abyssal Plain, northeastern Atlantic. *Marine Ecology Progress Series*, 220, 25-32.
24. Danovaro, R., Gambi, C., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Fraschetti, S., Vanreusel, A., ... & Gooday, A. J. (2008). Exponential decline of deep-sea ecosystem functioning linked to benthic biodiversity loss. *Current Biology*, 18(1), 1-8.
25. Danovaro, R., Snelgrove, P. V., & Tyler, P. (2014). Challenging the paradigms of deep-sea ecology. *Trends in ecology & evolution*, 29(8), 465-475.
26. Del Campo, J., Kolisko, M., Boscaro, V., Santoferrara, L. F., Nenarokov, S., Massana, R., ... & Wegener Parfrey, L. (2018). EukRef: Phylogenetic curation of ribosomal RNA to enhance understanding of eukaryotic diversity and distribution. *PLoS Biology*, 16(9), e2005849.
27. Dell'Anno, A., & Danovaro, R. (2005). Extracellular DNA plays a key role in deep-sea ecosystem functioning. *Science*, 309(5744), 2179-2179.
28. Distr, C. (2015). Report of the Chair of the Legal and Technical Commission on the work of the Commission during the twenty-first session of the International Seabed Authority I. Introduction.
29. Distr, C. (2019). Draft regulations on exploitation of mineral resources in the Area.
30. Drazen, J. C., Smith, C. R., Gjerde, K. M., Haddock, S. H., Carter, G. S., Choy, C. A., ... & Yamamoto, H. (2020). Midwater ecosystems must be considered when evaluating environmental risks of deep-sea mining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(30), 17455-17460.
31. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

32. Durden, J. M., Lallier, L. E., Murphy, K., Jaeckel, A., Gjerde, K., & Jones, D. O. (2018). Environmental Impact Assessment process for deep-sea mining in 'the Area'. *Marine Policy*, *87*, 194-202.
33. Filker, S., Kühner, S., Heckwolf, M., Dierking, J., & Stoeck, T. (2019). A fundamental difference between macrobiota and microbial eukaryotes: protistan plankton has a species maximum in the freshwater-marine transition zone of the Baltic Sea. *Environmental Microbiology*, *21*(2), 603-617.
34. Fiordelmondo, C., Manini, E., Gambi, C., & Pusceddu, A. (2003). Short-term impact of clam harvesting on sediment chemistry, benthic microbes and meiofauna in the Goro lagoon (Italy). *Chemistry and Ecology*, *19*(2-3), 173-187.
35. Gage, J. D., & Tyler, P. A. (1991). *Deep-sea biology: a natural history of organisms at the deep-sea floor*. Cambridge University Press.
36. Gerchakov, S. M., & Hatcher, P. G. (1972). Improved technique for analysis of carbohydrates in sediments 1. *Limnology and Oceanography*, *17*(6), 938-943.
37. Gillard, B., Chatzievangelou, D., Thomsen, L., & Ullrich, M. S. (2019). Heavy-metal-resistant microorganisms in deep-sea sediments disturbed by mining activity: An application toward the development of experimental in vitro systems. *Frontiers in Marine Science*, *6*, 462.
38. Gillard, B., Purkiani, K., Chatzievangelou, D., Vink, A., Iversen, M. H., & Thomsen, L. (2019). Physical and hydrodynamic properties of deep sea mining-generated, abyssal sediment plumes in the Clarion Clipperton Fracture Zone (eastern-central Pacific). *Elem Sci Anth*, *7*, 5.
39. Glover, A. G., & Smith, C. R. (2003). The deep-sea floor ecosystem: current status and prospects of anthropogenic change by the year 2025. *Environmental Conservation*, *30*(3), 219-241.
40. Goineau, A., & Gooday, A. J. (2017). Novel benthic foraminifera are abundant and diverse in an area of the abyssal equatorial Pacific licensed for polymetallic nodule exploration. *Scientific Reports*, *7*(1), 45288.
41. Gollner, S., Kaiser, S., Menzel, L., Jones, D. O., Brown, A., Mestre, N. C., ... & Arbizu, P. M. (2017). Resilience of benthic deep-sea fauna to mining activities. *Marine Environmental Research*, *129*, 76-101.

42. Gooday, A. J., Goineau, A., & Voltski, I. (2015). Abyssal foraminifera attached to polymetallic nodules from the eastern Clarion Clipperton Fracture Zone: a preliminary description and comparison with North Atlantic dropstone assemblages. *Marine Biodiversity*, 45, 391-412.
43. Gounot, A. M. (1994). Microbial oxidation and reduction of manganese: consequences in groundwater and applications. *FEMS Microbiology reviews*, 14(4), 339-349.
44. Grischenko, A. V., Gordon, D. P., & Melnik, V. P. (2018). Bryozoa (Cyclostomata and Ctenostomata) from polymetallic nodules in the Russian exploration area, Clarion-Clipperton Fracture Zone, eastern Pacific Ocean-taxon novelty and implications of mining. *Zootaxa*, 4484(1), 1-91.
45. Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., ... & Christen, R. (2012). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic acids research*, 41(D1), D597-D604.
46. Haffert, L., Haeckel, M., de Stigter, H., & Janssen, F. (2020). Assessing the temporal scale of deep-sea mining impacts on sediment biogeochemistry. *Biogeosciences*, 17(10), 2767-2789.
47. Hein, J. R., Mizell, K., Koschinsky, A., & Conrad, T. A. (2013). Deep-ocean mineral deposits as a source of critical metals for high-and green-technology applications: Comparison with land-based resources. *Ore Geology Reviews*, 51, 1-14.
48. Hein, J. R., & Koschinsky, A. (2014). Deep-ocean ferromanganese crusts and nodules.
49. Hoffmann, K., Hassenrück, C., Salman-Carvalho, V., Holtappels, M., & Bienhold, C. (2017). Response of bacterial communities to different detritus compositions in Arctic deep-sea sediments. *Frontiers in microbiology*, 8, 266.
50. Holling, C. S. (1973). Resilience and stability of ecological systems. *Annual review of ecology and systematics*, 4(1), 1-23.
51. Hoppenrath, M., & Leander, B. S. (2006). Dinoflagellate, Euglenid, or Cercomonad? The ultrastructure and molecular phylogenetic position of *Protaspis grandis* n. sp. *Journal of eukaryotic Microbiology*, 53(5), 327-342.

52. Horsfall, I. M., & Wolff, G. A. (1997). Hydrolysable amino acids in sediments from the Porcupine Abyssal Plain, northeast Atlantic Ocean. *Organic geochemistry*, 26(5-6), 311-320.
53. Huvenne, V. A. I., Bett, B. J., Masson, D. G., Le Bas, T. P., & Wheeler, A. J. (2016). Effectiveness of a deep-sea cold-water coral Marine Protected Area, following eight years of fisheries closure. *Biological Conservation*, 200, 60-69.
54. Jing, H., Zhang, Y., Li, Y., Zhu, W., & Liu, H. (2018). Spatial variability of picoeukaryotic communities in the Mariana Trench. *Scientific reports*, 8(1), 15357.
55. Jones, D., Amon, D., & Chapman, A. (2020). *Deep-sea mining: processes and impacts*. Oxford University Press.
56. Jones, D. O., Amon, D. J., & Chapman, A. S. (2018). Mining deep-ocean mineral deposits: what are the ecological risks?. *Elements: An International Magazine of Mineralogy, Geochemistry, and Petrology*, 14(5), 325-330.
57. Jones, D. O., Kaiser, S., Sweetman, A. K., Smith, C. R., Menot, L., Vink, A., ... & Clark, M. R. (2017). Biological responses to disturbance from simulated deep-sea polymetallic nodule mining. *PLoS One*, 12(2), e0171750.
58. Jones, D. O., Simon-Lledó, E., Amon, D. J., Bett, B. J., Caille, C., Clement, L., ... & Huvenne, V. A. (2021). Environment, ecology, and potential effectiveness of an area protected from deep-sea mining (Clarion Clipperton Zone, abyssal Pacific). *Progress in Oceanography*, 197, 102653.
59. Jørgensen, B. B., & Boetius, A. (2007). Feast and famine—microbial life in the deep-sea bed. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 770-781.
60. Kaikkonen, L., Venesjärvi, R., Nygård, H., & Kuikka, S. (2018). Assessing the impacts of seabed mineral extraction in the deep sea and coastal marine environments: Current methods and recommendations for environmental risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 1183-1197.
61. Kang, Y., & Liu, S. (2021). The development history and latest progress of deep-sea polymetallic nodule mining technology. *Minerals*, 11(10), 1132.
62. Kanzog, C., Ramette, A., Quéric, N. V., & Klages, M. (2009). Response of benthic microbial communities to chitin enrichment: an in situ study in the deep Arctic Ocean. *Polar Biology*, 32, 105-112.

63. Kato, Y., Fujinaga, K., Nakamura, K., Takaya, Y., Kitamura, K., Ohta, J., ... & Iwamori, H. (2011). Deep-sea mud in the Pacific Ocean as a potential resource for rare-earth elements. *Nature geoscience*, 4(8), 535-539.
64. Kersten, O., Smith, C. R., & Vetter, E. W. (2017). Abyssal near-bottom dispersal stages of benthic invertebrates in the Clarion-Clipperton polymetallic nodule province. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 127, 31-40.
65. Kim, S., Cho, S. G., Lee, M., Kim, J., Lee, T. H., Park, S., ... & Chi, S. B. (2019). Reliability-based design optimization of a pick-up device of a manganese nodule pilot mining robot using the Coandă effect. *Journal of Mechanical Science and Technology*, 33, 3665-3672.
66. Kotlinski, R., & Stoyanova, V. (1998, May). Physical, Chemical, And Geological Changes of Marine Environment Caused By the Benthic Impact Experiment At the 10M BIE Site. In *ISOPE International Ocean and Polar Engineering Conference* (pp. ISOPE-I). ISOPE.
67. Kuhn, T., Wegorzewski, A., Rühlemann, C., & Vink, A. (2017). Composition, formation, and occurrence of polymetallic nodules. Deep-sea mining: Resource potential, technical and environmental considerations, 23-63.
68. Lahti, L., Shetty, S., Blake, T., & Salojarvi, J. (2017). Tools for microbiome analysis in R. *Version*, 1(5), 28.
69. Lauro, F. M., & Bartlett, D. H. (2008). Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats. *Extremophiles*, 12, 15-25.
70. Le, J. T., Levin, L. A., & Carson, R. T. (2017). Incorporating ecosystem services into environmental management of deep-seabed mining. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 137, 486-503.
71. Lenoble JP (2000) Polymetallic nodules. International Seabed Authority, Kingston (1/10/00)
72. Levin, L. A., Amon, D. J., & Lily, H. (2020). Challenges to the sustainability of deep-seabed mining. *Nature Sustainability*, 3(10), 784-794.
73. Levin, L. A., & Le Bris, N. (2015). The deep ocean under climate change. *Science*, 350(6262), 766-768.

74. Levin, L. A., Mengerink, K., Gjerde, K. M., Rowden, A. A., Van Dover, C. L., Clark, M. R., ... & Brider, J. (2016). Defining “serious harm” to the marine environment in the context of deep-seabed mining. *Marine Policy*, *74*, 245-259.
75. Levin, L. A., Wei, C. L., Dunn, D. C., Amon, D. J., Ashford, O. S., Cheung, W. W., ... & Yasuhara, M. (2020). Climate change considerations are fundamental to management of deep-sea resource extraction. *Global Change Biology*, *26*(9), 4664-4678.
76. Li, J., Dong, C., Lai, Q., Wang, G., & Shao, Z. (2022). Frequent Occurrence and Metabolic Versatility of Marinifilaceae Bacteria as Key Players in Organic Matter Mineralization in Global Deep Seas. *Msystems*, *7*(6), e00864-22.
77. Lin, T. H., Chen, C., Watanabe, H. K., Kawagucci, S., Yamamoto, H., & Akamatsu, T. (2019). Using soundscapes to assess deep-sea benthic ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution*, *34*(12), 1066-1069.
78. Lisi, I., Di Risio, M., De Girolamo, P., & Gabellini, M. (2016). Engineering tools for the estimation of dredging-induced sediment resuspension and coastal environmental management. *Applied Studies of Coastal and Marine Environment*, 55-83.
79. Lohan, K. M. P., Fleischer, R. C., Torchin, M. E., & Ruiz, G. M. (2017). Protistan biogeography: A snapshot across a major shipping corridor spanning two oceans. *Protist*, *168*(2), 183-196.
80. Lochte, K., & Turley, C. M. (1988). Bacteria and cyanobacteria associated with phytodetritus in the deep sea. *Nature*, *333*(6168), 67-69.
81. Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, *71*(12), 8228-8235.
82. Lutz, M. J., Caldeira, K., Dunbar, R. B., & Behrenfeld, M. J. (2007). Seasonal rhythms of net primary production and particulate organic carbon flux to depth describe the efficiency of biological pump in the global ocean. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, *112*(C10).
83. MacIntyre, H. L., Geider, R. J., & Miller, D. C. (1996). Microphytobenthos: the ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries*, *19*, 186-201.

84. Mantyla, A. W., & Reid, J. L. (1983). Abyssal characteristics of the World Ocean waters. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 30(8), 805-833.
85. Marsh, J. B., & Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of lipid research*, 7(4), 574-576.
86. Marsh, L., Huvenne, V. A., & Jones, D. O. (2018). Geomorphological evidence of large vertebrates interacting with the seafloor at abyssal depths in a region designated for deep-sea mining. *Royal Society open science*, 5(8), 180286.
87. Mason, O. U., Meo-Savoie, D., Carol, A., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Fisk, M. R., & Giovannoni, S. J. (2009). Prokaryotic diversity, distribution, and insights into their role in biogeochemical cycling in marine basalts. *The ISME Journal*, 3(2), 231-242.
88. McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217.
89. Mewes, K., Mogollón, J. M., Picard, A., Rühlemann, C., Kuhn, T., Nöthen, K., & Kasten, S. (2014). Impact of depositional and biogeochemical processes on small scale variations in nodule abundance in the Clarion-Clipperton Fracture Zone. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 91, 125-141.
90. Middelburg, J. J., & Meysman, F. J. (2007). Burial at sea. *Science*, 316(5829), 1294-1295.
91. Miller, K. A., Thompson, K. F., Johnston, P., & Santillo, D. (2018). An overview of seabed mining including the current state of development, environmental impacts, and knowledge gaps. *Frontiers in Marine Science*, 4, 418.
92. Montagna, P. A., Coull, B. C., Herring, T. L., & Dudley, B. W. (1983). The relationship between abundances of meiofauna and their suspected microbial food (diatoms and bacteria). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 17(4), 381-394.
93. Mullineaux, L. S. (1987). Organisms living on manganese nodules and crusts: distribution and abundance at three North Pacific sites. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 34(2), 165-184.
94. Nagahama, T., Takahashi, E., Nagano, Y., Abdel-Wahab, M. A., & Miyazaki, M. (2011). Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane cold-seep sediments. *Environmental Microbiology*, 13(8), 2359-2370.

95. Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M., MacDonald, J., Desai, D., Allward, N., ... & Langille, M. G. (2021). Microbiome differential abundance methods produce disturbingly different results across 38 datasets. *BioRxiv*, 2021-05.
96. Newell, R. C., Seiderer, L. J., Simpson, N. M., & Robinson, J. E. (2004). Impacts of marine aggregate dredging on benthic macrofauna off the south coast of the United Kingdom. *Journal of Coastal Research*, 20(1), 115-125.
97. Nomaki, H., Rastelli, E., Ogawa, N. O., Matsui, Y., Tsuchiya, M., Manea, E., ... & Amaro, T. (2021). In situ experimental evidences for responses of abyssal benthic biota to shifts in phytodetritus compositions linked to global climate change. *Global Change Biology*, 27(23), 6139-6155.
98. Oebius, H. U., Becker, H. J., Rolinski, S., & Jankowski, J. A. (2001). Parametrization and evaluation of marine environmental impacts produced by deep-sea manganese nodule mining. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 48(17-18), 3453-3467.
99. Orcutt, B. N., Bradley, J. A., Brazelton, W. J., Estes, E. R., Goordial, J. M., Huber, J. A., ... & Pachiadaki, M. (2020). Impacts of deep-sea mining on microbial ecosystem services. *Limnology and Oceanography*, 65(7), 1489-1510.
100. Ozturgut, E., Trueblood, D. D., & Lawless, J. (1997). An overview of the United States' benthic impact experiment. In *Proceedings of International Symposium on Environmental Studies for Deep-Sea Mining* (Vol. 23).
101. Pape, E., Bezerra, T. N., Gheerardyn, H., Buydens, M., Kieswetter, A., & Vanreusel, A. (2021). Potential impacts of polymetallic nodule removal on deep-sea meiofauna. *Scientific Reports*, 11(1), 19996.
102. Pawlowski, J., Christen, R., Lecroq, B., Bachar, D., Shahbazkia, H. R., Amaral-Zettler, L., & Guillou, L. (2011). Eukaryotic richness in the abyss: insights from pyrotag sequencing. *PLoS One*, 6(4), e18169.
103. Pernice, M. C., Giner, C. R., Logares, R., Perera-Bel, J., Acinas, S. G., Duarte, C. M., ... & Massana, R. (2016). Large variability of bathypelagic microbial eukaryotic communities across the world's oceans. *The ISME journal*, 10(4), 945-958.
104. Petersen, S., Krätschell, A., Augustin, N., Jamieson, J., Hein, J. R., & Hannington, M. D. (2016). News from the seabed—Geological characteristics and resource potential of deep-sea mineral resources. *Marine Policy*, 70, 175-187.

105. Plante, R., Plante-Cuny, M. R., & Reys, J. P. (1986). Photosynthetic pigments of sandy sediments on the north Mediterranean coast: their spatial distribution and its effect on sampling strategies. *Marine Ecology Progress Series*, 133-141.
106. Poff, K. E., Leu, A. O., Eppley, J. M., Karl, D. M., & DeLong, E. F. (2021). Microbial dynamics of elevated carbon flux in the open ocean's abyss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(4), e2018269118.
107. Pfannkuche, O. (1993). Benthic response to the sedimentation of particulate organic matter at the BIOTRANS station, 47 N, 20 W. *Deep Sea Research Part II: topical studies in oceanography*, 40(1-2), 135-149.
108. Pusceddu, A., Dell'Anno, A., Fabiano, M., & Danovaro, R. (2009). Quantity and bioavailability of sediment organic matter as signatures of benthic trophic status. *Marine Ecology Progress Series*, 375, 41-52.
109. Radziejewska, T. (2002). Responses of deep-sea meiobenthic communities to sediment disturbance simulating effects of polymetallic nodule mining. *International Review of Hydrobiology: A Journal Covering all Aspects of Limnology and Marine Biology*, 87(4), 457-477.
110. Raghukumar, S. (2002). Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *European journal of protistology*, 38(2), 127-145.
111. Reñé, A., Alacid, E., Ferrera, I., & Garcés, E. (2017). Evolutionary trends of perkinsozoa (Alveolata) characters based on observations of two new genera of parasitoids of dinoflagellates, *Dinovorax* gen. nov. and *Snorkelia* gen. nov. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1594.
112. Rex, M. A., Etter, R. J., Morris, J. S., Crouse, J., McClain, C. R., Johnson, N. A., ... & Avery, R. (2006). Global bathymetric patterns of standing stock and body size in the deep-sea benthos. *Marine Ecology Progress Series*, 317, 1-8.
113. Richards, T. A., Jones, M. D., Leonard, G., & Bass, D. (2012). Marine fungi: their ecology and molecular diversity. *Annual review of marine science*, 4, 495-522.
114. Rowe, G. T., & Deming, J. W. (1985). The role of bacteria in the turnover of organic carbon in deep-sea sediments. *Journal of Marine Research*, 43(4), 925-950.

115. Salani, F. S., Arndt, H., Hausmann, K., Nitsche, F., & Scheckenbach, F. (2012). Analysis of the community structure of abyssal kinetoplastids revealed similar communities at larger spatial scales. *The ISME Journal*, 6(4), 713-723.
116. Sanders, H. L., Hessler, R. R., & Hampson, G. R. (1965, December). An introduction to the study of deep-sea benthic faunal assemblages along the Gay Head-Bermuda transect. In *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* (Vol. 12, No. 6, pp. 845-867). Elsevier.
117. Scheckenbach, F., Hausmann, K., Wylezich, C., Weitere, M., & Arndt, H. (2010). Large-scale patterns in biodiversity of microbial eukaryotes from the abyssal sea floor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 115-120.
118. Sherr, E. B., & Sherr, B. F. (2002). Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 293-308.
119. Shulse, C. N., Maillot, B., Smith, C. R., & Church, M. J. (2017). Polymetallic nodules, sediments, and deep waters in the equatorial North Pacific exhibit highly diverse and distinct bacterial, archaeal, and microeukaryotic communities. *MicrobiologyOpen*, 6(2), e00428.
120. Simon-Lledó, E., Bett, B. J., Huvenne, V. A., Köser, K., Schoening, T., Greinert, J., & Jones, D. O. (2019). Biological effects 26 years after simulated deep-sea mining. *Scientific reports*, 9(1), 8040.
121. Smith, C. R., De Leo, F. C., Bernardino, A. F., Sweetman, A. K., & Arbizu, P. M. (2008). Abyssal food limitation, ecosystem structure and climate change. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(9), 518-528.
122. Smith, C. R., Tunnicliffe, V., Colaço, A., Drazen, J. C., Gollner, S., Levin, L. A., ... & Amon, D. J. (2020). Deep-sea misconceptions cause underestimation of seabed-mining impacts. *Trends in Ecology & Evolution*, 35(10), 853-857.
123. Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., ... & Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12115-12120.
124. Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M. D., Breiner, H. W., & Richards, T. A. (2010). Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing

- reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular ecology*, 19, 21-31.
125. Stratmann, T., Lins, L., Purser, A., Marcon, Y., Rodrigues, C. F., Ravara, A., ... & Van Oevelen, D. (2018). Abyssal plain faunal carbon flows remain depressed 26 years after a simulated deep-sea mining disturbance. *Biogeosciences*, 15(13), 4131-4145.
 126. Stratmann, T., Soetaert, K., Kersken, D., & van Oevelen, D. (2021). Polymetallic nodules are essential for food-web integrity of a prospective deep-seabed mining area in Pacific abyssal plains. *Scientific Reports*, 11(1), 12238.
 127. Sverdrup, H. U., Johnson, M. W., & Fleming, R. H. (1942). *The Oceans* Prentice-Hall. Inc., Englewood Cliffs, NJ.
 128. Sweetman, A. K., Smith, C. R., Shulse, C. N., Maillot, B., Lindh, M., Church, M. J., ... & Gooday, A. J. (2019). Key role of bacteria in the short-term cycling of carbon at the abyssal seafloor in a low particulate organic carbon flux region of the eastern Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography*, 64(2), 694-713.
 129. Thistle, D. (2003). The deep-sea floor: an overview. *Ecosystems of the deep oceans*, 5.
 130. Trueblood, D. D., & Ozturgut, E. (1997, May). The benthic impact experiment: A study of the ecological impacts of deep seabed mining on abyssal benthic communities. In *ISOPE International Ocean and Polar Engineering Conference* (pp. ISOPE-I). ISOPE.
 131. Turley, C. M., & Lochte, K. (1990). Microbial response to the input of fresh detritus to the deep-sea bed. *Global and Planetary Change*, 3(1-2), 3-23.
 132. Vanreusel, A., Hilario, A., Ribeiro, P. A., Menot, L., & Arbizu, P. M. (2016). Threatened by mining, polymetallic nodules are required to preserve abyssal epifauna. *Scientific reports*, 6(1), 26808.
 133. Veillette, J., Sarrazin, J., Gooday, A. J., Galéron, J., Caprais, J. C., Vangriesheim, A., ... & Juniper, S. K. (2007). Ferromanganese nodule fauna in the Tropical North Pacific Ocean: Species richness, faunal cover and spatial distribution. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 54(11), 1912-1935.
 134. Vaultot, D., Geisen, S., Mahé, F., & Bass, D. (2022). pr2-primers: An 18S rRNA primer database for protists. *Molecular Ecology Resources*, 22(1), 168-179.

135. Vaultot, D., Sim, C. W. H., Ong, D., Teo, B., Biwer, C., Jamy, M., & Lopes dos Santos, A. (2022). metaPR2: A database of eukaryotic 18S rRNA metabarcodes with an emphasis on protists. *Molecular Ecology Resources*, 22(8), 3188-3201.
136. Vink, A. (2022) MANGAN 2021 Cruise Report: Independent scientific monitoring of two collector tests in the BGR and GSR contract areas for the exploration of polymetallic nodules in the equatorial NE Pacific. BGR, Hannover, Germany, 363 p.
137. Volz, J. B., Haffert, L., Haeckel, M., Koschinsky, A., & Kasten, S. (2020). Impact of small-scale disturbances on geochemical conditions, biogeochemical processes and element fluxes in surface sediments of the eastern Clarion–Clipperton Zone, Pacific Ocean. *Biogeosciences*, 17(4), 1113-1131.
138. Volz, J. B., Mogollón, J. M., Geibert, W., Arbizu, P. M., Koschinsky, A., & Kasten, S. (2018). Natural spatial variability of depositional conditions, biogeochemical processes and element fluxes in sediments of the eastern Clarion-Clipperton Zone, Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 140, 159-172.
139. Vonnahme, T. R., Molari, M., Janssen, F., Wenzhöfer, F., Haeckel, M., Titschack, J., & Boetius, A. (2020). Effects of a deep-sea mining experiment on seafloor microbial communities and functions after 26 years. *Science Advances*, 6(18), eaaz5922.
140. Zhao, F., Wang, C., Xu, K., Huang, P., & Zhou, T. (2020). Diversity and connectivity of microeukaryote communities across multiple habitats from intertidal zone to deep-sea floor in the Western Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 165, 103395.
141. Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., Huse, S. M., Welch, D. B. M., ... & Ramette, A. (2011). Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PloS one*, 6(9), e24570.
142. Xu, D., Li, R., Hu, C., Sun, P., Jiao, N., & Warren, A. (2017). Microbial eukaryote diversity and activity in the water column of the South China Sea based on DNA and RNA high throughput sequencing. *Frontiers in microbiology*, 8, 1121.
143. Xu, Z., Wang, M., Wu, W., Li, Y., Liu, Q., Han, Y., ... & Liu, H. (2018). Vertical distribution of microbial eukaryotes from surface to the hadal zone of the Mariana Trench. *Frontiers in microbiology*, 9, 2023.

144. Walker, B., Holling, C. S., Carpenter, S. R., & Kinzig, A. (2004). Resilience, adaptability and transformability in social–ecological systems. *Ecology and society*, 9(2).
145. Warton, D. I., Wright, S. T., & Wang, Y. (2012). Distance-based multivariate analyses confound location and dispersion effects. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(1), 89-101.
146. Washburn, T. W., Turner, P. J., Durden, J. M., Jones, D. O., Weaver, P., & Van Dover, C. L. (2019). Ecological risk assessment for deep-sea mining. *Ocean & coastal management*, 176, 24-39.
147. Weaver, P. P., & Billett, D. (2019). Environmental impacts of nodule, crust and sulphide mining: an overview. *Environmental issues of deep-sea mining: Impacts, consequences and policy perspectives*, 27-62.
148. Wedding, L. M., Friedlander, A. M., Kittinger, J. N., Watling, L., Gaines, S. D., Bennett, M., ... & Smith, C. R. (2013). From principles to practice: a spatial approach to systematic conservation planning in the deep sea. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1773), 20131684.
149. Wei, C. L., Rowe, G. T., Escobar-Briones, E., Boetius, A., Soltwedel, T., Caley, M. J., ... & Narayanaswamy, B. E. (2010). Global patterns and predictions of seafloor biomass using random forests. *PloS one*, 5(12), e15323.
150. Worden, A. Z., Follows, M. J., Giovannoni, S. J., Wilken, S., Zimmerman, A. E., & Keeling, P. J. (2015). Rethinking the marine carbon cycle: factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science*, 347(6223), 1257594.

8. Materiale Supplementare

Tabella 1. Risultati dell’analisi statistica (PERMANOVA) per andare a valutare le differenze della variabile proteine tra l’Area Tedesca e l’Area Belga (Ar), tra i siti campionati all’interno di ciascuna Area nei diversi anni (YS) e tra gli strati di sedimento analizzati (Ia). df = degrees of freedom; MS = mean square; Pseudo-F = F statistics after permutations; P(MC) = probability level after Monte Carlo simulations

	Source	df	MS	Pseudo-F	P(MC)
Proteins	Ar	1	5198,6	195,55	0,0001

	Ys(Ar)	23	283	10,645	0,0001
	La(Ar)	4	1188,7	44,715	0,0001
	Ye(Ar)xLa(Ar)	38	125,17	47,081	0,0001
	Res	338	26,585		

Tabella 2. Risultati test pair-wise (PERMANOVA) per valutare le differenze della variabile proteine tra i siti all'interno di ciascuna area nei diversi anni. Sono riportati solo i valori $p < 0.05$. P(MC): livello di probabilità dopo le simulazioni di Monte Carlo

Level	Contrast	t	P(MC)
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2021Post impact	25,904	0,0164
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Post impact	4,96	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Thick Cover	26,729	0,012
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Post impact	25,796	0,0187
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Post impact	49,502	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Thick Cover	25,443	0,0192
German Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2021Post impact	39,359	0,0037
German Area (0-1cm)	2021Reference vs 2021Post impact	23,337	0,0428
German Area (0-1cm)	2021Reference vs 2022Reference	52,254	0,0001
German Area (0-1cm)	2021Post impact vs 2022Post impact	21,929	0,0482
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Post impact	89,466	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Thick Cover	69,714	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_150m	74,181	0,0002
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_220m	66,732	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_290m	71,762	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_500m	57,536	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Post impact vs 2022Thick Cover	30,479	0,0082
German Area (0-1cm)	2022Post impact vs 2022Plume Cover_500m	28,692	0,0154
German Area (0-1cm)	2022Post impact vs 2022Reference_SE	46,448	0,001
German Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Reference_SE	34,113	0,0058
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_150m vs 2022Reference_SE	38,936	0,0164
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_220m vs 2022Plume Cover_290m	0,13525	0,9046
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_220m vs 2022Reference_SE	33,781	0,0273
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_290m vs 2022Reference_SE	37,157	0,0223
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_500m vs 2022Reference_SE	28,777	0,0433

Level	Contrast	t	P(MC)
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2021Post impact	37,091	0,0016
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Post impact	23,616	0,0283
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Plume Cover_25m	35,115	0,0017
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Pre Impact	26519	0,0175
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Post impact	36821	0,002
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Reference	46378	0,0003
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_25m	74,026	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_175m	38,396	0,0024
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_275m	23,716	0,0362
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2021Post impact	44842	0,0011
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Post impact	29,333	0,0095
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Plume Cover_25m	35,757	0,008
Belgian Area (0-1cm)	2021Post impact vs 2022Plume Cover_25m	76,325	0,0002

Belgian Area (0-1cm)	2021Post impact vs 2022Plume Cover_75m	35,397	0,009
Belgian Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Plume Cover_25m	4,212	0,0016
Belgian Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Plume Cover_175m	22,811	0,0452
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_25m vs 2022Plume Cover_75m	38,778	0,0171
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_25m vs 2022Plume Cover_175m	37,721	0,0181
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_25m vs 2022Plume Cover_275m	54,815	0,0046
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_25m vs 2022Plume Cover_600m	6,324	0,004
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_175m vs 2022Plume Cover_600m	3,78	0,0171

Tabella 3. Risultati test pair-wise (PERMANOVA) per valutare le differenze sulla variabile proteine tra gli strati analizzati all'interno dei diversi siti campionati. In ciascuna Area Sono riportati solo i valori $p < 0.05$. P(MC): livello di probabilità dopo le simulazioni di Monte Carlo.

Area	Level	Contrast	t	P(MC)
German Area	Reference (2021)	0-1cm vs 3-5cm	6,535	0,0002
German Area	Reference (2021)	1-3cm vs 3-5cm	34,524	0,0057
German Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 1-3cm	39,821	0,0026
German Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	53,657	0,0005
German Area	Pre Impact (2021)	1-3cm vs 3-5cm	30,535	0,0128
German Area	Post Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	36,667	0,0041
German Area	Post Impact (2021)	1-3cm vs 3-5cm	32,278	0,0073
German Area	Reference (2022)	0-1cm vs 1-3cm	11,123	0,0001
German Area	Reference (2022)	0-1cm vs 3-5cm	92,093	0,0001
German Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 1-3cm	22,876	0,0342
German Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 3-5cm	29,761	0,0079
German Area	Post Impact (2022)	1-3cm vs 3-5cm	5,716	0,0001
German Area	Plume Cover 150m	0-1cm vs 3-5cm	35,629	0,0218
German Area	Plume Cover 150m	1-3cm vs 3-5cm	12,096	0,0002
German Area	Plume Cover 220m	1-3cm vs 3-5cm	33,022	0,0304
German Area	Plume Cover 500m	1-3cm vs 3-5cm	41,099	0,0145
German Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 1-3cm	61,157	0,0035
German Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 3-5cm	76,309	0,0013
Belgian Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 1-3cm	26,088	0,024
Belgian Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	23,546	0,0443
Belgian Area	Reference (2022)	0-1cm vs 1-3cm	47,464	0,0003
Belgian Area	Reference (2022)	0-1cm vs 3-5cm	59,397	0,0001
Belgian Area	Reference (2022)	1-3cm vs 3-5cm	29,282	0,0094
Belgian Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 1-3cm	28,207	0,0127
Belgian Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 3-5cm	34,867	0,0027
Belgian Area	Thick Cover	1-3cm vs 3-5cm	23,023	0,0341
Belgian Area	Plume Cover 25m	0-1cm vs 1-3cm	50,093	0,005
Belgian Area	Plume Cover 25m	0-1cm vs 3-5cm	70,949	0,0019
Belgian Area	Plume Cover 75m	0-1cm vs 3-5cm	59,796	0,0032
Belgian Area	Plume Cover 75m	1-3cm vs 3-5cm	15,279	0,0001
Belgian Area	Plume Cover 175m	0-1cm vs 1-3cm	39,187	0,0193
Belgian Area	Plume Cover 175m	0-1cm vs 3-5cm	12,821	0,0004
Belgian Area	Plume Cover 175m	1-3cm vs 3-5cm	81,243	0,0008
Belgian Area	Plume Cover 275m	0-1cm vs 3-5cm	72,445	0,0021
Belgian Area	Plume Cover 275m	1-3cm vs 3-5cm	7,704	0,0014
Belgian Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 3-5cm	35,293	0,0232

Tabella 4. Risultati dell'analisi statistica (PERMANOVA) per andare a valutare le differenze della variabile carboidrati tra l'Area Tedesca e l'Area Belga (Ar), tra i siti campionati all'interno di ciascuna Area nei diversi anni (YS) e tra gli strati di sedimento analizzati (la). df = degrees of freedom; MS = mean square; Pseudo-F = F statistics after permutations; P(MC) = probability level after Monte Carlo simulations.

	Source	df	MS	Pseudo-F	P(MC)
carbohydrates	Ar	1	4052,5	429,71	0,0001
	Ye(Ar)	23	237,28	25,16	0,0001
	La(Ar)	4	542	57,471	0,0001
	Ye(Ar)xLa(Ar)	38	37849	40,133	0,0001
	Res	338	94,309		

Tabella 5. Risultati test pair-wise (PERMANOVA) per valutare le differenze della variabile carboidrati tra i siti all'interno di ciascuna area nei diversi anni. Sono riportati solo i valori $p < 0.05$. P(MC): livello di probabilità dopo le simulazioni di Monte Carlo.

Level	Contrast	t	P(MC)
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2019Pre Impact	81615	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2021Pre Impact	27456	0,0125
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2021Reference	35,255	0,0022
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2021Post impact	10,326	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Reference	81,786	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Post impact	95658	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Thick Cover	12,84	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Reference_SE	62535	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Reference	38698	0,0011
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Post impact	6,674	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Reference	25,223	0,0201
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Post impact	48,209	0,0002
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Thick Cover	79,215	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_150m	3,803	0,0025
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_220m	89,303	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_290m	34,104	0,0054
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_500m	5005	0,0003
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Reference_SE	31845	0,0068
German Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2021Post impact	41,935	0,0013
German Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Reference	28,054	0,0149
German Area (0-1cm)	2021Reference vs 2021Post impact	87,886	0,0001
German Area (0-1cm)	2021Reference vs 2022Reference	38,994	0,0019
German Area (0-1cm)	2021Reference vs 2022Reference_SE	51,941	0,0016
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Post impact	24,135	0,028
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Thick Cover	30,282	0,0101
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_220m	28,006	0,0216
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_150m vs 2022Plume Cover_220m	33572	0,0307
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_220m vs 2022Plume Cover_290m	30005	0,0384
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_220m vs 2022Reference_SE	37,825	0,0179

Level	Contrast	t	P(MC)
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2019Pre Impact	23479	0,0239
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2021Post impact	57,604	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Post impact	10,053	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Thick Cover	38058	0,0006
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Plume Cover_25m	39,439	0,0004
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Pre Impact	2268	0,037
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Post impact	4003	0,0012
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Post impact	8,196	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_25m	29,501	0,0107
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_75m	25,427	0,0247
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_175m	21,995	0,0484
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_275m	35,187	0,0046
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2021Post impact	50054	0,0005
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Post impact	10,7	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Thick Cover	33,799	0,0046
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Plume Cover_25m	69,663	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_75m	34,793	0,0059
Belgian Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_275m	4,694	0,0009
Belgian Area (0-1cm)	2022Post impact vs 2022Plume Cover_600m	51,344	0,0005
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_275m vs 2022Plume Cover_600m	3.79E+04	0,0175

Tabella 6. Risultati test pair-wise (PERMANOVA) per valutare le differenze sulla variabile carboidrati tra gli strati analizzati all'interno dei diversi siti campionati. In ciascuna Area Sono riportati solo i valori $p < 0.05$. P(MC): livello di probabilità dopo le simulazioni di Monte Carlo

Area	Level	Contrast	t	P(MC)
German Area	Reference (2021)	0-1cm vs 1-3cm	27,379	0,0247
German Area	Reference (2021)	0-1cm vs 3-5cm	59,512	0,0003
German Area	Reference (2021)	1-3cm vs 3-5cm	67,277	0,0002
German Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 1-3cm	74,363	0,0002
German Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	89,427	0,0001
German Area	Post Impact (2021)	1-3cm vs 3-5cm	25,311	0,0301
German Area	Reference (2022)	0-1cm vs 3-5cm	39,931	0,001
German Area	Reference (2022)	1-3cm vs 3-5cm	53,686	0,0001
German Area	Thick Cover	0-1cm vs 1-3cm	34321	0,005
German Area	Thick Cover	1-3cm vs 3-5cm	45,504	0,0004
German Area	Plume Cover 150m	1-3cm vs 3-5cm	33,449	0,0283
German Area	Plume Cover 220m	0-1cm vs 1-3cm	70236	0,0022
German Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 3-5cm	33,168	0,0295
Belgian Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 1-3cm	45,515	0,0009
Belgian Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	54,057	0,0003
Belgian Area	Post Impact (2021)	0-1cm vs 1-3cm	26708	0,0232
Belgian Area	Post Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	44,239	0,0014
Belgian Area	Post Impact (2021)	1-3cm vs 3-5cm	29,494	0,0142
Belgian Area	Reference (2022)	0-1cm vs 1-3cm	11,501	0,0001
Belgian Area	Reference (2022)	0-1cm vs 3-5cm	11,252	0,0001
Belgian Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 1-3cm	47,241	0,0003
Belgian Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 3-5cm	5,665	0,0001
Belgian Area	Thick Cover	0-1cm vs 1-3cm	33408	0,0038
Belgian Area	Thick Cover	0-1cm vs 3-5cm	33,787	0,003
Belgian Area	Plume Cover 25m	0-1cm vs 1-3cm	65,939	0,0021

Belgian Area	Plume Cover 25m	0-1cm vs 3-5cm	24,908	0,0645
Belgian Area	Plume Cover 75m	0-1cm vs 1-3cm	2.85E+04	0,0447
Belgian Area	Plume Cover 175m	0-1cm vs 1-3cm	39,936	0,0171
Belgian Area	Plume Cover 175m	0-1cm vs 3-5cm	28,132	0,0491
Belgian Area	Plume Cover 275m	0-1cm vs 1-3cm	4988	0,009
Belgian Area	Plume Cover 275m	0-1cm vs 3-5cm	15,977	0,0001
Belgian Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 1-3cm	7914	0,0016
Belgian Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 3-5cm	9,898	0,0002
Belgian Area	Plume Cover 600m	1-3cm vs 3-5cm	38,421	0,0199

Tabella 7. Risultati dell'analisi statistica (PERMANOVA) per andare a valutare le differenze della variabile lipidi tra l'Area Tedesca e l'Area Belga (Ar), tra i siti campionati all'interno di ciascuna Area nei diversi anni (YS) e tra gli strati di sedimento analizzati (Ia). df = degrees of freedom; MS = mean square; Pseudo-F = F statistics after permutations; P(MC) = probability level after Monte Carlo simulations.

	Source	df	MS	Pseudo-F	P(MC)
Lipids	Ar	1	5615	52981	0,0001
	Ye(Ar)	23	992,17	93,617	0,0001
	La(Ar)	4	2399	22,636	0,0001
	Ye(Ar)xLa(Ar)	38	197,25	18,612	0,0007
	Res	338	105,98		

Tabella 8. Risultati test pair-wise (PERMANOVA) per valutare le differenze della variabile lipidi tra i siti all'interno di ciascuna area nei diversi anni. Sono riportati solo i valori $p < 0.05$. P(MC): livello di probabilità dopo le simulazioni di Monte Carlo.

Level	Contrast	t	P(MC)
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2019Pre Impact	24153	0,017
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Reference	2,19	0,0313
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Post impact	22142	0,0306
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Thick Cover	37,564	0,0009
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Thick Cover	33,568	0,0026
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_220m	5,847	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Thick Cover	39,007	0,0015
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_220m	72,978	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Post impact vs 2022Plume Cover_220m	37,125	0,0042
German Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Plume Cover_150m	5.29E+04	0,0004
German Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Plume Cover_220m	72444	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Plume Cover_500m	47,142	0,0012
German Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Reference_SE	29,888	0,0129
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_150m vs 2022Plume Cover_220m	90501	0,0003
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_220m vs 2022Plume Cover_290m	98818	0,0003
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_220m vs 2022Plume Cover_500m	11454	0,0003
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_220m vs 2022Reference_SE	13,875	0,0002

Level	Contrast	t	P(MC)
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2019Pre Impact	32877	0,0017
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Plume Cover_25m	2,909	0,006

Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Pre Impact	40887	0,0005
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Post impact	23831	0,0295
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Reference	77635	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_25m	2,995	0,0079
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_75m	3,454	0,0046
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_275m	33,685	0,0046
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Post impact	28,173	0,0122
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Thick Cover	24,899	0,0252
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Plume Cover_25m	29,339	0,0142
Belgian Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_75m	24,063	0,0375
Belgian Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Plume Cover_25m	24,733	0,0284
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_25m vs 2022Plume Cover_75m	53,696	0,0044
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_25m vs 2022Plume Cover_275m	40,566	0,0126
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_25m vs 2022Plume Cover_600m	37,317	0,0197

Tabella 9. Risultati test pair-wise (PERMANOVA) per valutare le differenze sulla variabile lipidi tra gli strati analizzati all'interno dei diversi siti campionati. In ciascuna Area Sono riportati solo i valori $p < 0.05$. P(MC): livello di probabilità dopo le simulazioni di Monte Carlo.

Area	Level	Contrast	t	P(MC)
German Area	Reference (2022)	0-1cm vs 1-3cm	26,838	0,0151
German Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 1-3cm	4,379	0,0004
German Area	Post Impact (2022)	1-3cm vs 3-5cm	67,515	0,0001
German Area	Thick Cover	0-1cm vs 1-3cm	60162	0,0001
German Area	Thick Cover	0-1cm vs 3-5cm	45,279	0,0006
German Area	Plume Cover 150m	0-1cm vs 3-5cm	3,656	0,0182
German Area	Plume Cover 290m	0-1cm vs 1-3cm	4.23E+03	0,0136
German Area	Plume Cover 290m	0-1cm vs 3-5cm	75,211	0,0015
German Area	Plume Cover 290m	1-3cm vs 3-5cm	48,555	0,007
German Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 1-3cm	62,184	0,0041
German Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 3-5cm	28,292	0,045
Belgian Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 1-3cm	2,409	0,0338
Belgian Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	32,105	0,0066
Belgian Area	Post Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	35,148	0,0043
Belgian Area	Reference (2022)	0-1cm vs 1-3cm	13,719	0,0001
Belgian Area	Reference (2022)	0-1cm vs 3-5cm	10,469	0,0001
Belgian Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 1-3cm	58,584	0,0001
Belgian Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 3-5cm	7,33	0,0001
Belgian Area	Thick Cover	0-1cm vs 1-3cm	22226	0,0401
Belgian Area	Thick Cover	0-1cm vs 3-5cm	5,266	0,0001
Belgian Area	Thick Cover	1-3cm vs 3-5cm	4,43	0,0007
Belgian Area	Plume Cover 75m	0-1cm vs 1-3cm	1.10E+04	0,0005
Belgian Area	Plume Cover 75m	0-1cm vs 3-5cm	73,221	0,0016
Belgian Area	Plume Cover 75m	1-3cm vs 3-5cm	39,163	0,0186
Belgian Area	Plume Cover 275m	0-1cm vs 1-3cm	30812	0,0354
Belgian Area	Plume Cover 275m	0-1cm vs 3-5cm	59,931	0,0031
Belgian Area	Plume Cover 275m	1-3cm vs 3-5cm	40,474	0,0125
Belgian Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 1-3cm	55136	0,0048
Belgian Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 3-5cm	47,467	0,0084

Tabella 10. Risultati dell'analisi statistica (PERMANOVA) per andare a valutare le differenze della variabile BPC tra l'Area Tedesca e l'Area Belga (Ar), tra i siti campionati all'interno di ciascuna Area nei diversi anni (YS) e tra gli strati di sedimento analizzati (la). df = degrees of freedom; MS = mean square; Pseudo-F = F statistics after permutations; P(MC) = probability level after Monte Carlo simulations.

	Source	df	MS	Pseudo-F	P(MC)
Proteins	Ar	1	4540,8	442,02	0,0001
	Ye(Ar)	23	208,32	20,278	0,0001
	La(Ar)	4	832,03	80,993	0,0001
	Ye(Ar)xLa(Ar)	38	40197	39,129	0,0001
	Res	338	10,273		

Tabella 11. Risultati test pair-wise (PERMANOVA) per valutare le differenze della variabile BPC tra i siti all'interno di ciascuna area nei diversi anni. Sono riportati solo i valori $p < 0.05$. P(MC): livello di probabilità dopo le simulazioni di Monte Carlo.

Level	Contrast	t	P(MC)
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2019Pre Impact	29455	0,0062
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2021Post impact	51,899	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Reference	23,891	0,0259
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Post impact	79641	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Thick Cover	72,609	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Reference_SE	3014	0,0071
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Pre Impact	25477	0,0212
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Post impact	38,627	0,0016
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Post impact	6,456	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Thick Cover	60,254	0,0001
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_150m	22,359	0,0451
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_220m	43,941	0,0012
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_290m	29,206	0,0125
German Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_500m	21946	0,0434
German Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2021Reference	26,052	0,0268
German Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2021Post impact	70,846	0,0002
German Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Reference	25,283	0,0235
German Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Reference_SE	27524	0,0301
German Area (0-1cm)	2021Reference vs 2021Post impact	61,357	0,0003
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Post impact	70,328	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Thick Cover	7,621	0,0001
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_150m	31,564	0,0108
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_220m	57,897	0,0006
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_290m	39,547	0,0025
German Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_500m	30,379	0,0107
German Area (0-1cm)	2022Post impact vs 2022Plume Cover_150m	24,556	0,0315
German Area (0-1cm)	2022Post impact vs 2022Plume Cover_500m	24,043	0,0376
German Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Plume Cover_150m	2.57E+04	0,03
German Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Plume Cover_500m	23,911	0,0394
German Area (0-1cm)	2022Plume Cover_150m vs 2022Plume Cover_220m	33761	0,0284

Level	Contrast	t	P(MC)
-------	----------	---	-------

Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2019Pre Impact	35845	0,0014
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2021Post impact	57,814	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Post impact	70,225	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2019Reference vs 2022Thick Cover	37776	0,0008
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Pre Impact	43951	0,001
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2021Post impact	36874	0,0016
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Reference	52744	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Post impact	44,503	0,0002
Belgian Area (0-1cm)	2019Pre Impact vs 2022Plume Cover_25m	28,873	0,0112
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2021Post impact	52096	0,0003
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Post impact	64,055	0,0001
Belgian Area (0-1cm)	2021Pre Impact vs 2022Thick Cover	38,426	0,0017
Belgian Area (0-1cm)	2021Post impact vs 2022Thick Cover	21517	0,0461
Belgian Area (0-1cm)	2021Post impact vs 2022Plume Cover_25m	3,697	0,0069
Belgian Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_75m	36,628	0,0049
Belgian Area (0-1cm)	2022Reference vs 2022Plume Cover_275m	38,935	0,0039
Belgian Area (0-1cm)	2022Post impact vs 2022Plume Cover_600m	30,321	0,0121
Belgian Area (0-1cm)	2022Thick Cover vs 2022Plume Cover_25m	24,521	0,0352
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_25m vs 2022Plume Cover_75m	30,411	0,0401
Belgian Area (0-1cm)	2022Plume Cover_25m vs 2022Plume Cover_275m	3,421	0,0251

Tabella 12. Risultati test pair-wise (PERMANOVA) per valutare le differenze sulla variabile BPC tra gli strati analizzati all'interno dei diversi siti campionati. In ciascuna Area Sono riportati solo i valori $p < 0.05$. P(MC): livello di probabilità dopo le simulazioni di Monte Carlo.

Area	Level	Contrast	t	P(MC)
German Area	Reference (2021)	0-1cm vs 1-3cm	47,571	0,0006
German Area	Reference (2021)	0-1cm vs 3-5cm	59,547	0,0004
German Area	Reference (2021)	1-3cm vs 3-5cm	26,793	0,0223
German Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 1-3cm	30,104	0,013
German Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	15,402	0,0001
German Area	Pre Impact (2021)	1-3cm vs 3-5cm	27,488	0,0232
German Area	Post Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	29,346	0,0146
German Area	Post Impact (2021)	1-3cm vs 3-5cm	27,675	0,0206
German Area	Reference (2022)	0-1cm vs 1-3cm	58,902	0,0001
German Area	Reference (2022)	0-1cm vs 3-5cm	65,676	0,0001
German Area	Post Impact (2022)	1-3cm vs 3-5cm	32,225	0,0052
German Area	Thick Cover	1-3cm vs 3-5cm	23,013	0,0375
German Area	Plume Cover 150m	0-1cm vs 3-5cm	63,761	0,0033
German Area	Plume Cover 150m	1-3cm vs 3-5cm	12,384	0,0004
German Area	Plume Cover 220m	1-3cm vs 3-5cm	44,723	0,0102
German Area	Plume Cover 290m	0-1cm vs 3-5cm	33,619	0,025
German Area	Plume Cover 290m	1-3cm vs 3-5cm	47,069	0,0091
Belgian Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 1-3cm	53,208	0,0003
Belgian Area	Pre Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	53,969	0,0002
Belgian Area	Post Impact (2021)	0-1cm vs 3-5cm	35,777	0,0046
Belgian Area	Post Impact (2021)	1-3cm vs 3-5cm	30,889	0,0123
Belgian Area	Reference (2022)	0-1cm vs 1-3cm	13,494	0,0001
Belgian Area	Reference (2022)	0-1cm vs 3-5cm	14,808	0,0001
Belgian Area	Reference (2022)	1-3cm vs 3-5cm	37,619	0,0016
Belgian Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 1-3cm	54,033	0,0001
Belgian Area	Post Impact (2022)	0-1cm vs 3-5cm	60,732	0,0001
Belgian Area	Thick Cover	0-1cm vs 1-3cm	21347	0,0483

Belgian Area	Thick Cover	0-1cm vs 3-5cm	35,023	0,0029
Belgian Area	Plume Cover 25m	0-1cm vs 1-3cm	54,877	0,0061
Belgian Area	Plume Cover 25m	0-1cm vs 3-5cm	74,525	0,0016
Belgian Area	Plume Cover 75m	0-1cm vs 1-3cm	9.21E+04	0,0006
Belgian Area	Plume Cover 75m	0-1cm vs 3-5cm	11,689	0,0006
Belgian Area	Plume Cover 75m	1-3cm vs 3-5cm	63,572	0,0029
Belgian Area	Plume Cover 175m	0-1cm vs 1-3cm	82,558	0,0016
Belgian Area	Plume Cover 175m	0-1cm vs 3-5cm	14,16	0,0003
Belgian Area	Plume Cover 175m	1-3cm vs 3-5cm	36,728	0,0216
Belgian Area	Plume Cover 275m	0-1cm vs 1-3cm	41008	0,0154
Belgian Area	Plume Cover 275m	0-1cm vs 3-5cm	15,213	0,0003
Belgian Area	Plume Cover 275m	1-3cm vs 3-5cm	84,639	0,0009
Belgian Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 1-3cm	46589	0,0112
Belgian Area	Plume Cover 600m	0-1cm vs 3-5cm	10,35	0,0008