

SOMMARIO

1. OBIETTIVI DEL LAVORO.....	5
2.INTRODUZIONE	6
2.1 LA LAGUNA DI MARANO	6
2.2 IL SEDIMENTO	7
2.2.1 Caratteristiche generali	8
2.2.2 Il sedimento quale oggetto di monitoraggio.....	9
2.2.3 Comportamento dei metalli in ambienti acquatici	10
2.2.4 Sedimenti costieri e metalli	13
2.3 LA RUDITAPES PHILIPPINARUM COME RISORSA ALIEUTICA LAGUNARE	14
2.3.1 La venericoltura nel nordest Adriatico.....	15
2.3.2 Acclimatazione della specie	15
2.3.3 Aree idonee all'allevamento	17
2.3.4 Venericoltura in Laguna di Marano.....	19
2.4 LA RUDITAPES PHILIPPINARUM COME ORGANISMO MODELLO	20
2.4.1 Tassonomia	20
2.4.2 Descrizione generale.....	20
2.4.3 La conchiglia	20
2.4.4 La nutrizione	21
2.4.5 La digestione	22
2.4.6 Il Sistema circolatorio	24
2.4.7 Il Sistema nervoso	24
2.4.8 La riproduzione	24
2.4.9 L'Ecologia della specie	25
2.5 IL BIOACCUMULO.....	25
2.6 I BIOMARKERS IN AMBIENTI DI TRANSIZIONE	27

2.6.1 Le metallotioneine	28
2.7 STRUMENTI DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER LA TRACCIABILITÀ DELLA FILIERA ALIMENTARE	30
3. MATERIALI E METODI	34
3.1 DISEGNO SPERIMENTALE.....	34
3.2 MATERIALI E REAGENTI	35
3.2.1 Estrazione di metalli e metalloidi da campioni di sedimento e organismi mediante digestore a microonde	36
3.2.2 Digestione materiali certificati	37
3.3 ANALISI SUI SEDIMENTI	37
3.3.1 Analisi granulometrica	37
3.3.2 Contenuto totale di metalli e metalloidi	37
3.3.3 La speciazione geochimica	39
3.4 ANALISI SUGLI ORGANISMI	40
3.4.1 Contenuto totale di metalli	41
3.4.2 Quantificazione di METALLOTIONEINE (MT).....	41
3.4.3 Misura degli indici di condizione (condition index CI).....	43
3.5 METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI METALLI IN SEDIMENTI E ORGANISMI	44
3.6 ANALISI GENETICHE	46
3.6.1 Estrazione e purificazione del DNA genomico	46
3.6.2 Amplificazione tramite PCR	47
3.6.3 Analisi di sequenziamento diretto del gene mitocondriale 16S.....	47
3.6.4 Analisi di loci microsatelliti	47
3.7 ANALISI STATISTICHE SUI DATI AMBIENTALI E FILOGENETICI.....	48
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	50
4.1 GRANULOMETRIA E CARATTERISTICHE GEOCHIMICHE DEL SEDIMENTO.....	50
4.2 CONTROLLO QUALITÀ DEL DATO ANALITICO.....	53
4.3 CONTENUTO DI METALLI NEL SEDIMENTO.....	54

4.4 SPECIAZIONE GEOCHIMICA.....	55
4.4.1 Arsenico	55
4.4.2 Cadmio	57
4.4.3 Cromo	58
4.4.4 Rame	59
4.4.5 Ferro	60
4.4.6 Mercurio	61
4.4.7 Nichel	63
4.4.8 Piombo	64
4.4.9 Zinco	65
4.4.10 Confronto tra i due siti sulla base della speciazione geochimica	66
4.5 ANALISI DI STATISTICA MULTIVARIATA SUI DATI GEOCHIMICI	67
4.5.1 Cluster analysis	67
4.5.2 Analisi delle componenti principali (PCA)	68
4.6 INDICI DI CONDIZIONE	71
4.7 BIOACCUMULO	72
4.7.1 Effetti della depurazione dell'organismo ai fini della carica inquinante inorganica	73
4.8 ANALISI DI STATISTICA MULTIVARIATA SUI DATI FISILOGICI	79
4.8.1 Cluster analysis	79
4.8.2 Analisi delle componenti principali (PCA)	81
4.9 FATTORI DI BIOACCUMULO	83
4.10 COMPARTIMENTAZIONE DEI METALLI NEI TESSUTI	86
4.11 LIMITI NORMATIVI PER LA CONCENTRAZIONE DI METALLI NEI TESSUTI DI MOLLUSCHI	87
4.12 METALLOTIONEINE	88
4.13 ANALISI GENETICHE	90
4.13.1 Estrazione e purificazione di DNA genomico	90
4.13.2 Analisi di sequenziamento diretto del 16SrDNA	90

4.13.3 Analisi di loci microsatelliti	97
5. CONCLUSIONI	105
BIBLIOGRAFIA	107
RINGRAZIAMENTI	121
APPENDICE A	122
APPENDICE B	125
APPENDICE C.....	132

1. OBIETTIVI DEL LAVORO

(e suo inquadramento nell'attività di ricerca del gruppo)

La globalizzazione dei mercati e lo sfruttamento delle risorse naturali ha aperto nuovi scenari per il comparto produttivo agroalimentare. La sicurezza dei prodotti alimentari, la tutela dei consumatori, lo sviluppo di biotecnologie avanzate in grado di fornire nuovi strumenti di supporto per migliorare la qualità dei prodotti sono diventati, con il regolamento CE n.104/2000 e successi integrazioni, obiettivi strategici per i paesi dell'Unione Europea. È quindi fondamentale per la competitività dei prodotti alimentari in generale, e di quelli ittici in particolare, che essi vengano identificati ed esaminati in ogni fase della filiera, dalla raccolta sino al commercio e alla vendita.

Nell'ambito di questo scenario nell'anno 2009 è stato avviato un progetto multidisciplinare di lungo respiro che ha come obiettivo, attraverso un approccio integrato di varie attività di studio specifiche e dettagliate la definizione della qualità e dell'idoneità ambientale dei siti di allevamento della vongola verace *Ruditapes philippinarum* nell'Alto Adriatico, dello stato di salute e della sicurezza alimentare degli organismi allevati e dei loro profili genetici su base geografica, al fine di garantire la salubrità del prodotto e la sua origine.

Il progetto è coordinato dal Prof. Emanuele Argese responsabile del laboratorio di ecologia applicata e biotecnologie ambientali del Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi, Università Ca' Foscari di Venezia, ed è condotto in stretta collaborazione con altri gruppo nella stessa università (Prof. Giampiero Ravagnan, Adriano Sfriso, Bruno Pavoni) e di altre università italiane (Prof. Francesco Nonnis Marzano responsabile del laboratorio di Zoologia Molecolare, Dipartimento di Bioscienza dell'Università di Parma, e Dott.ssa Livia Lucentini, responsabile del laboratorio di Biodiversità animale e Biotecnologie naturalistiche, Dipartimento di Biologia cellulare e Ambientale dell'Università degli studi di Perugia).

Il progetto è stato supportato da due assegni di ricerca, di cui un assegno FSE finanziato dalla Regione Veneto e un assegno finanziato dal Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi, da una borsa di dottorato messa a disposizione dal GRAL e da tre tesi di laurea, due triennali e una magistrale, attività tutte sviluppate in stretto coordinamento tra di loro.

Nello specifico l'attività svolta nella tesi di laurea magistrale di seguito riportata è stato sviluppata in stretto coordinamento con l'attività della laureanda Marta Cristoforetti titolare della tesi di laurea triennale "Biodisponibilità e bioaccumulo di metalli pesanti nelle matrici di interesse ai fini della valutazione della qualità ambientale e sicurezza alimentare della venericoltura nell'Alto Adriatico." e del Dott. Gianluca Baccarani titolare della tesi di dottorato "Identificazione e validazione di marcatori molecolari, fisiologici ed ambientali per la gestione delle risorse aliutiche lagunari".

In particolare, l'attività svolta nel corso di questa tesi magistrale ha riguardato la valutazione della qualità e idoneità ambientale di due siti di allevamento della vongola verace filippina *Ruditapes philippinarum* situati nella Laguna di Marano e della salubrità e sicurezza alimentare degli organismi in esso allevati, in relazione ai livelli di presenza di importanti metalli pesanti e metalloidi e altrettanto importanti parametri ambientali nel sedimento quali granulometria, pH e potenziale redox sia nel sedimento che negli organismi valutati sulla base della loro specifica biodisponibilità e capacità di bioaccumulo.

Inoltre, è stato quantificato un biomarker d'elezione (metallotioneine) ed è stata effettuata una analisi filogenetica sulla base dell'analisi del DNA mitocondriale e di marcatori nucleari (microsatelliti).

Per il presente lavoro è stato fondamentale l'apporto operativo e professionale del Dr. Aurelio Zentilin cui vanno sentiti ringraziamenti per la disponibilità dimostrata.

2.INTRODUZIONE

Le zone estuarine e lagunari di tutto il nostro pianeta sono caratterizzate dallo stesso dualismo: rappresentano ecosistemi tra i più produttivi al mondo, ma sono enormemente impattati dalle attività umane. Infatti, le zone intertidali sono entità ecologiche effimere, soggette a un grande dinamismo e una grande variabilità oltre ad essere habitat che sostengono un gran numero di specie di volatili e fungono da zone di rifornimento alimentare e da *nursery* per numerose specie di pesci e crostacei (MEA, 2005).

Inoltre, le lagune sono ecosistemi complessi, localizzati all'interfaccia tra la terra e il mare e sono interessate da maree e altri numerosi fenomeni idrodinamici che comportano una complessa circolazione non solo di masse d'acqua, ma anche della fase insolubile di particolato e di sedimento che viene così ad essere continuamente risospesa. Oltretutto, le significative variazioni di temperatura e di fotoperiodo, la elevata produttività, la biodiversità e la vulnerabilità rispetto alle pressioni antropiche, comportano la necessità di monitorare con attenzione lo stato di salute ambientale di tali siti al fine di gestire e preservare ecosistemi così delicati (Caruso et al., 2009; Guerra et al., 2010).

Le peculiarità e l'estremo dinamismo di questo ambiente ne fanno la sede di una quota più che considerevole di biodiversità animale e vegetale che è oggetto di protezione e tutela da parte di una lunga serie di normative europee già in vigore e sono argomento di dibattito continuo da parte della Commissione Europea che ne fa oggetto di interi assi di progettazione nell'ambito di obiettivi comunitari a breve e lunga scadenza (Horizon 2020, framework programme).

2.1 LA LAGUNA DI MARANO

"...la laguna, come tutti i mari, è un grande lavacro d'acqua e d'aria che cancella le consuete distinzioni fra il pulito e lo sporco" (C. Magris)

Le lagune di Grado e Marano rappresentano uno dei più importanti ambienti di transizione tra gli ecosistemi costieri del nord Adriatico. Nonostante le pressioni antropiche che vengono esercitate su questo ambiente costiero causate dalla presenza di numerose aree urbanizzate e industriali, la laguna rappresenta uno degli ambienti umidi meglio conservati di tutto il Mediterraneo.

Nello specifico, la laguna di Marano è situata nel nord est dell'Adriatico e fa parte del comprensorio lagunare friulano, che, con il settore di Grado, rappresenta la formazione lagunare più settentrionale del Mediterraneo. È situata in provincia di Udine e si estende dalla foce del fiume Tagliamento alla bocca a mare di Porto Buso; è divisa dalla laguna di Grado dalla foce del fiume AUSA Corno e dall'omonimo canale navigabile, la cui corrente a mare in concomitanza con la bassa marea può raggiungere i 4/5 nodi. È un ambiente ricchissimo di acqua dolce per l'apporto dei fiumi di risorgiva della Bassa Pianura Friulana, tra cui in particolare lo Stella, il Cormor, il Turgnano, lo Zellina, l'Ausa e il Corno.

La laguna di Marano comprende tre bacini: di Lignano (51,06 km²), di S. Andrea (22,21 km²) e di Buso (20 km² circa, per metà appartenente alla Laguna di Grado); ad essi corrispondono altrettante bocche lagunari (o porti), conosciute con lo stesso nome, che li uniscono al mare. La laguna è protetta dal mare aperto da un cordone di banchi sabbiosi e di isole, tra cui l'isola di S. Andrea e quella di Martignano, conosciuta anche come Isola delle Conchiglie.

Molte delle specie vegetali e animali presenti nella laguna sono definibili dal punto di vista ecologico come "euriterme ed eurialine", in grado cioè di vivere in un habitat dove sono frequenti

notevoli sbalzi di temperatura e di salinità. La vegetazione comprende specie sia arboree che erbacee, sia annue che perenni (I.S.I.S. "Bonaldo Stringher", Udine 2012).

Inoltre, la laguna comprende alcuni siti ospitanti la migrazione di importanti esemplari di fauna selvatica, i quali sono stati presentati alla Convenzione di Ramsar del 1971 dichiarandoli ufficialmente "siti protetti". In seguito, dopo l'implementazione della Direttiva Habitat (92/43/EEC) concernente la salvaguardia della biodiversità, l'intero bacino lagunare è stato inserito nella rete "Natura 2000" come sito di importanza Comunitaria (Direttiva 92/43/CEE) e, per questo, beneficia a tutt'oggi di un contributo pubblico per la sua tutela (Covelli, 2012).

La zona costiera è sede di un importante sviluppo antropico il quale, in molti casi, ha comportato l'alterazione sia delle acque dolci che delle acque salate in termini di carico di nutrienti, tasso di sedimentazione e di input di sostanze inquinanti.

Infatti, questo ambiente ha subito delle evidenti trasformazioni dal punto di vista morfologico che sono andate di pari passo con il deterioramento dei sedimenti (Fontolan et al., 2012). Oltretutto, le lagune di Marano e Grado sono state storicamente interessate da importanti eventi di contaminazione di metalli pesanti, dibenzodiossine policlorate (PCDDs), furani (PCDFs), idrocarburi policiclici aromatici (PAHs), e composti organici del mercurio legati ai processi industriali del polo chimico di Torviscosa, il più importante sito industriale della Regione (Ramieri et al., 2011).

Inoltre, l'esistenza di strascichi contaminati provenienti dalle miniere dell'Idrija (Slovenia) e il conseguente trasporto attraverso le acque di scolo che confluiscono nel fiume Isonzo, hanno costituito la prima fonte di contaminazione (soprattutto di mercurio) nel nord Adriatico che è rimasta tale per almeno 500 anni. Questo ha comportato che il golfo di Trieste e l'adiacente laguna di Grado e Marano siano diventate due delle aree marine più contaminate del mondo. Il più importante contributo di contaminazione è stato causato dal funzionamento di un impianto Cloro-Soda che si trova all'interno del bacino idrogeografico scolante della laguna (Acquavita, et al., 2012).

Tali eventi di contaminazione hanno coinvolto suoli, acque di falda e ovviamente sedimenti fluviali e, ovviamente, acque e sedimento lagunari. Tra i contaminanti, il mercurio è stato protagonista degli episodi di inquinamento più conosciuti e analizzati, tanto che la Laguna di Grado e Marano è stata inserita nel novero dei S.I.N. (D.P.C.M. 3/05/2002) proprio a causa dei massivi sversamenti di reflui contaminati da mercurio provenienti dall'ex area Caffaro, ma soprattutto dalle acque di dilavamento delle ex miniere dell'Idrija che sono una fonte di contaminazione costante per quanto riguarda questo metallo.

In realtà, pur essendo - ed essendo stato - importante focalizzare l'attenzione sulla contaminazione derivante dal mercurio, di sicuro storicamente quella più eclatante, si è perso di vista il monitoraggio preciso e puntuale di altri metalli e metalloidi, per i quali ancora non è mai stata fatta una investigazione esaustiva. Infatti, la determinazione del contenuto dei vari contaminanti nel sedimento oltre ad essere un'informazione di fondamentale importanza per la gestione del sito, in particolare quando interessato da attività di venericoltura, può anche consentire una caratterizzazione approfondita dello stesso finalizzata alla programmazione di eventuali interventi di bonifica.

2.2 IL SEDIMENTO

Gli ecosistemi estuarini e lagunari dell'Alto Adriatico, in quanto ambienti di transizione tra terra e mare, sono soggetti a una continua evoluzione morfologica sotto l'azione contrapposta delle correnti e delle onde del mare e degli apporti di acque dolci e di sedimenti provenienti dall'entroterra, che tendono rispettivamente a trasformarli in braccia di mare o a provocarne il progressivo interrimento. Solo il mantenimento di una condizione di equilibrio dinamico tra queste opposte tendenze ne permette la conservazione (Castellani & Barbanti, 2010).

La matrice più importante dal punto di vista delle alterazioni che storicamente hanno interessato il sito è il sedimento lagunare sede di un costante e complesso equilibrio tra le componenti biotiche e abiotiche tipiche di un ecosistema costiero, nonché - come è ben noto - punto primo di raccolta/stoccaggio degli inquinanti da tutte le altre matrici: per questo è fondamentale investigare in modo approfondito le sue caratteristiche.

2.2.1 Caratteristiche generali

Come è intuibile, il sedimento marino, fluviale o lacustre, altro non è che un suolo in condizioni di saturazione di acqua. In alcuni casi, come nel mare o nelle lagune, il sedimento, periodicamente, può rimanere allo scoperto per brevi o lunghi periodi di tempo. In tal caso alle reazioni tipiche dell'ambiente acquatico possono aggiungersi quelle della fotochimica diretta od indiretta.

Uno dei maggiori problemi che si riscontrano nei sedimenti è l'alterazione dei cicli biogeochimici degli elementi naturali; infatti, il sedimento è un vero e proprio reattore chimico in cui si realizzano processi chimico-ambientali ed interazioni principalmente col comparto acqua, ad esso sovrastante, che funge da tramite necessario per il passaggio di composti chimici (dai nutrienti agli inquinanti, più o meno tossici) al biota (elemento del comparto biosfera, trasversale alle matrici).

Inoltre, a livello dell'interfaccia acqua/sedimento si creano equilibri dinamici che giocano un ruolo determinante negli scambi tra i vari comparti, nella messa in gioco di concentrazioni più o meno elevate, nella capacità più o meno marcata del sedimento di fungere da *sink* (raccolgitore, ovvero eliminatore) per un certo composto quando le caratteristiche chimico-fisiche sono compatibili, ma così pure, nel caso opposto, di fungere da comparto di minimo, ma continuativo, passaggio. A livello dell'interfaccia con il comparto acqua, il sedimento si trova sotto forma di uno strato composto di acqua e di particelle molto ricche in materia organica.

I delicati equilibri chimici che si instaurano tra sostanze aventi un coefficiente di ripartizione favorevole all'adsorbimento nel sedimento (e che quindi difficilmente in linea teorica vengono rilasciate ad una soluzione acquosa) mostrano proprio a questo livello tutta la loro dinamicità; l'equilibrio dinamico (*steady states*), in quanto tale, può, infatti, continuamente spostare la/e relazione/i anche nella direzione meno probabile per continuo ricambio della colonna d'acqua, o per movimenti improvvisi e alteranti la matrice del sedimento, o per la semplice bioperturbazione ad opera di animali detritivori o fossori o scavatori.

Inoltre, il sedimento tende a compattarsi a mano a mano che si scende in profondità con una *riduzione* in contenuto d'acqua che può arrivare al 50 % entro poche decine di centimetri dipendendo dalla granulometria e dal tipo di litologia proprio del sedimento oltre che dal contenuto in materia organica (acidi umici, acidi fulvici ed umina). Questo fenomeno è importante, dal punto di vista ecotossicologico in quanto, in linea generale, si può affermare che *tanto più il sedimento risulta compattato e meno ricco in umidità tanto più lenta (ancorché non impossibile) sarà la mobilità delle sostanze in esso contenute e tanto più lento e difficile (sfavorito) sarà quindi il rilascio alla colonna d'acqua.*

A seconda delle condizioni della colonna d'acqua sovrastante, il sedimento dello strato più in superficie, può trovarsi in differenti condizioni di *ossigenazione* che ne determinano differenti caratteristiche, sia nel rapporto con fattori abiotici (ad esempio precipitazione di metalli da parte di solfuri o di ossidi di ferro e/o manganese), che nel rapporto con fattori biotici (ad esempio la prevalenza di una comunità batterica rispetto ad un'altra) e quindi capacità di adattamento e detossificazione differenti (disponibilità di vie degradative diversificate per i composti organici).

L'ossigeno disciolto nelle acque può presentare ampie fluttuazioni andando da condizioni di sovrasaturazione, in concomitanza con l'attività fotosintetica delle alghe, a condizioni di ipossia o addirittura di anossia quando l'attività batterica sottragga ossigeno durante i processi di demolizione della sostanza organica. Nel caso sia povero di ossigeno, fenomeno non raro quando non sussiste ricambio d'acqua o esso non sia sufficiente a controbilanciare forti eventi di eutrofizzazione con carichi di BOD elevati, raggiungendo talvolta condizioni di vera e propria anossia, il sedimento viene detto anaerobico o anossico (ipossico lo stadio intermedio) e la determinazione del potenziale redox mostra chiaramente valori negativi (Perin, 2004; Paesanti e Pellizzato, 2000).

Inoltre, è importante considerare che laddove vi sia la presenza di una grande quantità di detrito vegetale dovuto allo sviluppo algale (fenomeni di eutrofizzazione) oppure nelle zone stesse di coltivazione della vongola, in presenza di una certa densità di individui, si possono verificare anossie particolarmente gravi soprattutto d'estate e durante la notte, quando l'attività fotosintetica dei vegetali e/o la respirazione degli organismi non riossigena più le acque. In questi casi l'instaurarsi di condizioni anaerobiche favorisce l'attività di batteri che rilasciano nell'acqua prodotti tossici del loro metabolismo, quali ammoniaca e idrogeno solforato, che hanno una forte influenza sui processi geochimici che sul comparto biota.

2.2.2 Il sedimento quale oggetto di monitoraggio

I sedimenti marini sono i siti di stoccaggio maggioritari per le sostanze inquinanti rilasciate da numerose attività antropiche particolarmente impattanti. Tuttavia, grazie ai fenomeni di adsorbimento superficiale al sedimento è possibile che si realizzi una riduzione della tossicità potenziale per gli organismi acquatici (Eggleton and Thomas, 2004).

In particolare, è da tenere in considerazione che i sedimenti delle zone costiere fungono da serbatoi per i metalli che derivano sia da fonti naturali che da fonti antropiche. La frazione granulometrica fine mostra una particolare attitudine all'accumulo di metalli derivanti da deposizione atmosferica, erosione dei suoli, apporto delle acque di dilavamento del bacino scolante e in generale, dai diversi tipi di scarichi in mare (Covelli et al., 2011). Per questo, i sedimenti delle aree lagunari sono tra i maggiori depositi di sostanze tossiche prodotte dalle attività industriali.

La frazione granulometrica fine, proprio perché considerata un "assorbente" naturale è in grado di contribuire alla riduzione del rischio di tossicità per gli organismi acquatici. Ma d'altro canto, in coincidenza degli eventi di risospensione così importanti per il riciclo del particolato, dei nutrienti e degli inquinanti ad esso associati, avviene la rimessa in circolo anche degli stessi contaminanti, che tornano a partecipare alle dinamiche presenti all'interfaccia tra sedimento superficiale e colonna d'acqua (Covelli, 2012).

È infatti da sottolineare che il processo all'interfaccia di un solido, l'**adsorbimento**, è un fenomeno che va ben oltre il semplice "contatto" tra fasi.

L'**adsorbimento** è un processo complesso che implica l'interazione di legami di idrogeno, legami di Van der Waals, polarizzazione e sistemi combinati; ciò spiega quanto alle volte la matrice adsorbente sia efficace nel "captare" la molecola organica e quanto sia difficile desassorbire il composto una volta che lo si voglia riutilizzare (Perin, 2004).

I processi di **adsorbimento** rappresentano un passaggio fondamentale della *storia* ambientale di un pollente emesso in un sistema acquicolo. Infatti, il passaggio da una fase dispersa nel solvente acqua ad una di integrazione con una matrice solida modifica grandemente la reattività del composto stesso nei riguardi di processi degradativi ed ossidativi (es.: fotolisi, biodegradazione batterica).

L'adsorbimento della molecola su una struttura solida, ad esempio, implica una certa schermatura della molecola alla luce incidente come pure se la molecola è adsorbita, deve desassorbirsi per passare nella cellula batterica ai fini di iniziare il processo di biodegradazione. Il processo di adsorbimento è, normalmente, assai complicato e formato da più interazioni alcune delle quali assolutamente generali e valide per ogni tipo di composto, altre, invece, specifiche. Tra queste

ultime, ad esempio, sono da ricordare le reazioni conseguenti alla ionizzazione del composto, la presenza nel composti stesso di gruppi funzionali in grado di reagire chimicamente con la matrice ecc. (Perin, 2004).

2.2.3 Comportamento dei metalli in ambienti acquatici

I metalli pesanti (e si noti che, per comodità, si include in tale contesto anche il metalloide As nella dicitura metalli) vengono veicolati da fiumi, canali e precipitazioni atmosferiche sotto forma disciolta, colloidale e in associazione al materiale sospeso. La maggior parte dei metalli presenti negli ambienti d'acqua dolce viene trasportata in associazione alle particelle a granulometria fine e alla materia organica, che sono molto efficienti nel catturare i metalli disciolti (Aston e Chester, 1976; Forstner e Wittman, 1981; De Groot et al., 1976; Windom et al., 1989).

Il sedimento, come si è già detto, si comporta come sito di accumulo e nello stesso tempo come sorgente di metalli pesanti a causa del loro continuo e lento rilascio nella colonna d'acqua sovrastante, favorito da variazioni delle condizioni ambientali e da processi biologici. I metalli presenti nel sedimento, inoltre, possono essere in parte assimilati da organismi bentonici detritivori, entrando così nella catena alimentare (De Groot et al., 1976; Salomons, 1985).

Il destino dei metalli che arrivano in una laguna è influenzato da una serie di processi che ne alterano la distribuzione tra fase disciolta e fase sospesa. Ad esempio, nelle zone estuarine, a ridosso della terraferma, il mescolamento tra acque dolci e salate provoca un brusco cambiamento delle condizioni chimico- fisiche della colonna d'acqua e, di conseguenza, anche la modificazione dello stato chimico ed aggregativo dei metalli. In particolare, le variazioni di salinità, pH, temperatura e condizioni ossido-riduttive innescano una serie di processi che possono causare una rimozione anche consistente dei metalli pesanti dalla fase disciolta ed un conseguente loro accumulo nel sedimento (Salomons, 1985).

Questi elementi sono caratterizzati da alta persistenza e, quindi, tendono ad accumularsi raggiungendo in alcuni casi livelli di concentrazione talmente elevati da creare seri problemi alle comunità di organismi presenti (De Pol, 2009).

Molti elementi, infatti, a causa delle loro caratteristiche e specialmente quando presenti in forma di composti organometallici, esercitano un'azione tossica sugli organismi legandosi a proteine ed acidi nucleici, modificando la permeabilità delle membrane cellulari e subcellulari ma anche il metabolismo di neuromodulatori e ormoni, con conseguente influenza sui fenomeni omeostatici, o, ancora, espletando la loro tossicità a livello mitocondriale (Argese et al., 1998; AA. VV., 1992; Zatta et al., 1992).

Si precisa che con la dicitura "metabolismo dei metalli" si intende il destino subito dai metalli stessi, vale a dire la somma totale dei processi costruttivi e distruttivi riguardanti le forme chimiche dei diversi metalli, che possono avvenire nelle cellule, nei tessuti, negli organi o nell'ambiente attraverso l'azione biologica sia animale che vegetale (AA. VV., 1992). Lo studio del "metabolismo dei metalli" è essenziale per comprenderne il comportamento ed il destino ambientale, la biodisponibilità, la bioaccessibilità e gli eventuali processi di detossificazione cui tali elementi possono essere sottoposti nell'ambiente naturale.

Studi biochimici e tossicologici hanno mostrato che, per gli organismi viventi, la forma chimica di uno specifico elemento è importante quanto la sua quantità ed è perciò necessario conoscerla per avere informazioni sull'impatto di uno specifico elemento sull'ambiente (Losso, 2004).

Alcuni elementi sono considerati essenziali per gli organismi viventi essendo stato verificato un loro ruolo funzionale. Questi elementi sono tradizionalmente i principali costituenti minerali degli organismi: Na, Mg, K, Ca, etc., ed elementi presenti in tracce come Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo, a cui possono essere aggiunti, almeno per alcuni gruppi di organismi e per funzioni particolari, I, V, Si, Sn, Se, As, F, Cr, Ni. Il loro eccesso così come la loro carenza comporta serie conseguenze sugli organismi viventi, mentre per elementi non essenziali si osservano solo effetti dannosi. In particolare, i metalli

sono presenti in tutti i comparti marini ed i percorsi ambientali di questi elementi sono di grande importanza in relazione alla loro tossicità nei confronti di flora e fauna acquatiche. Le numerose variabili ambientali in gioco influenzano fortemente i cicli biogeochimici degli elementi nell'ambiente (De Pol, 2009).

Di conseguenza, la biodisponibilità di un metallo è strettamente legata alla particolare forma chimica in cui esso viene a trovarsi in relazione al tipo di organismo considerato. In tale contesto si inserisce l'importanza della speciazione chimica di un elemento (ad esempio forme organiche ed inorganiche) in matrici ambientali diverse (acqua, biota, sedimento) al fine di una corretta valutazione dell'impatto ambientale dovuto alla presenza di metalli nell'ambiente marino. Comunemente i composti organometallici presentano una tossicità maggiore rispetto ai corrispondenti composti inorganici; mercurio, piombo o stagno, ad esempio, obbediscono a questa regola generale, mentre l'arsenico rappresenta un'eccezione in quanto la maggior parte dei composti organici dell'arsenico è meno tossica delle specie inorganiche. La tossicità delle specie organometalliche varia anche in funzione dell'organismo monitorato.

La speciazione degli elementi nelle diverse matrici, inoltre, può fornire informazioni importanti per la comprensione dei loro cicli biogeochimici, dei meccanismi di detossificazione e del differente bioaccumulo che riguarda specie chimiche diverse in relazione al tipo di organismo.

Quindi, appare chiaro come la determinazione delle concentrazioni totali di un metallo nell'acqua, nel sedimento o nel biota, senza l'individuazione delle specie chimiche predominanti, non possa costituire un elemento sufficiente per poter esprimere valutazioni sui possibili effetti sugli organismi, né sulle dinamiche dei metalli nell'ambiente considerato.

Nel novero dei principali processi nei quali sono coinvolti i metalli in relazione ai sedimenti marini è importante ricordare:

- rilascio, da parte del particolato, dei metalli adsorbiti; il de-adsorbimento è favorito dall'aumento della concentrazione ionica;
- precipitazione di sostanze organiche, come acidi umici e fulvici, e di conseguenza dei metalli ad esse associati, a causa dell'aumento di salinità;
- precipitazione dei metalli disciolti sotto forma di ossidi ed idrossidi amorfi (soprattutto per quanto riguarda Fe e Mn) a causa dell'aumento di pH;
- precipitazione, in condizioni fortemente riducenti, dei metalli disciolti come solfuri insolubili;
- cattura dei metalli disciolti per adsorbimento e/o coprecipitazione da parte delle fasi solide già presenti o formatesi *in situ*, come materiale detritico, ossidi di Fe e Mn, materia organica, solfuri insolubili, carbonati ecc. (Burton, 1976; Forstner e Wittman, 1981; Gambrell et al., 1980; De Groot et al., 1976; Jean e Bancroft, 1986; Luther et al., 1980; Salomons, 1985).

Per di più, a seconda delle caratteristiche granulometriche, il particolato che raggiunge l'ambiente estuarino ha un diverso destino. Le particelle più grandi mantengono la loro dimensione individuale e quindi il loro comportamento deposizionale dipende solo da fattori idrodinamici e gravitazionali. Le particelle di dimensioni minori, al contrario, sono influenzate da una serie di processi, quali coagulazione e flocculazione, che modificano la distribuzione dimensionale del sospeso e quindi il suo percorso deposizionale (Aston e Chester, 1976; Burton, 1976).

Le particelle presentano in genere carica negativa derivante da legami incompleti o da lacune reticolari che si verificano in seguito a sostituzioni di cationi del reticolo con altri di valenza minore. In acqua dolce il particolato può essere presente in forma colloidale a causa delle repulsioni tra cariche negative. Passando in acque a maggior tenore salino, le forze repulsive si riducono a causa dell'aumento della concentrazione ionica. Ne consegue una destabilizzazione della sospensione colloidale ed una tendenza del particolato ad aggregarsi e flocculare, depositandosi sul fondo. Il materiale organico e gli ossidi/idrossidi di Fe e Mn possono partecipare in modo diretto alla

formazione di flocculi con le particelle argillose, depositandosi sotto forma di film sugli aggregati appena formati, contribuendo così a stabilizzarli (Aston e Chester, 1976; Burton, 1976).

Gli aggregati di particelle fini rimangono in sospensione più o meno a lungo, tendendo comunque a sedimentare ed accumularsi nelle zone a basso fondale con scarsa idrodinamica. Poiché i metalli pesanti di origine antropica sono trasportati principalmente assieme alle particelle di piccole dimensioni, le aree di deposizione delle particelle fini rappresentano le zone di maggior accumulo dei metalli pesanti.

Tuttavia, a voler approfondire i fenomeni idrodinamici che insistono in tali siti è fondamentale considerare che una laguna è per definizione un ambiente estremamente dinamico e in continua evoluzione e coinvolto in numerosi episodi di risospensione, durante i quali si verifica la movimentazione del sedimento e dei nutrienti ad esso associati, cui consegue l'inter-scambio di inquinanti tra sedimento e colonna d'acqua. (Bloesch, 1995).

In effetti, sono numerose gli eventi naturali che si risolvono nella movimentazione più o meno accentuata del fondale marino, come le correnti mareali, i movimenti ondosi, le tempeste, le mareggiate e le interazioni tra le correnti marine (Sanford et al., 1991; Arfi et al., 1993), cui si aggiungono le attività antropiche come i dragaggi, il moto ondoso creato dal passaggio delle imbarcazioni, le attività di pesca (Schoellhamer, 1996; Lewis et al., 2001) e molte altre. Il sedimento, dunque, diviene vera e propria fonte secondaria di inquinamento e, per questo, fonte di pressioni ambientali.

Nello specifico di questo lavoro di tesi, le tecniche di raccolta della specie *Ruditapes philippinarum* sono una costante fonte di rimobilizzazione più o meno significativa del sedimento, per varie che siano. Esse infatti, si diversificano a seconda sia delle caratteristiche geografiche della zona di coltivazione che della specifica struttura socio-economica delle popolazioni residenti. Si va infatti dalla semplice raccolta manuale con rasca, a piedi o da imbarcazione, praticata diffusamente nelle lagune veneto-friulane e sacche del Delta del Po, fino ai più moderni sistemi meccanici (draghe e macchine da raccolta). La pesca con draga idraulica o turbosoffiante, per altro vietata in quanto distruttiva dell'ambiente bentonico lagunare, è stata e viene ancora oggi impropriamente esercitata sui banchi naturali di *Ruditapes philippinarum* in laguna di Venezia (Paesanti P., Pellizzato M., 2000).

2.2.4 Sedimenti costieri e metalli

I metalli pesanti si trovano distribuiti fra i vari componenti del sedimento secondo forme associative che si differenziano per l'intensità e per il tipo di legame metallo- matrice. Ciascuna di queste forme presenta una diversa possibilità di rilascio verso l'ambiente acquatico.

I metalli disciolti nelle acque interstiziali e quelli legati alla superficie delle fasi solide, mediante adsorbimento fisico o mediante processi di scambio cationico, sono immediatamente disponibili per flora e fauna acquatica. Questi metalli costituiscono la frazione direttamente scambiabile del metallo totale presente nel sedimento.

Al contrario, i metalli presenti come impurezze all'interno della struttura reticolare dei minerali detritici provenienti dalla degradazione delle rocce non sono disponibili o, più precisamente, possono passare in soluzione solo entro tempi su scala geologica, in seguito all'erosione del minerale. Questi metalli costituiscono la frazione naturale o residuale.

Tra questi estremi di disponibilità esistono vari tipi di forme chimiche in cui i metalli sono potenzialmente disponibili, potendo essere solubilizzati in seguito a variazioni delle condizioni chimico-fisiche dell'ambiente in cui è presente il sedimento, come ad esempio cambiamenti di salinità, pH e condizioni redox (Gambrell et al., 1980; Tessier et al., 1979).

In questo contesto, le procedure di speciazione geochimica, che consentono di determinare la ripartizione dei metalli tra le diverse fasi geochimiche che compongono il sedimento, possono fornire informazioni importanti riguardo alla possibilità di rilascio dei metalli nella colonna d'acqua, alla loro origine e soprattutto alla loro biodisponibilità. Queste procedure prevedono l'estrazione in successione dei metalli associati a ciascuna fase, il contenuto totale di ciascun metallo risulta quindi ripartito in diverse frazioni, che sono generalmente indicate (Jung, 2010) come frazione scambiabile, frazione associata ai carbonati, frazione associata a ossidi/idrossidi di Fe e Mn, frazione associata a materia organica e solfuri, frazione residuale.

La maggior parte del metallo di origine antropica è presente sotto forme potenzialmente disponibili e si trova principalmente in associazione a carbonati, ossidi/idrossidi di Fe e Mn, materia organica e solfuri (Forstner e Wittman, 1981). La frazione di metallo associata a queste fasi, sommata alla frazione scambiabile, costituisce la frazione non residuale del metallo totale presente nel sedimento.

È importante sottolineare che la disponibilità al rilascio dei metalli, oltre a dipendere dalla particolare forma chimica in cui essi si trovano nel sedimento, è anche influenzata dalla struttura più o meno cristallina dei relativi componenti mineralogici (soprattutto per quanto riguarda la frazione degli ossidi-idrossidi di Fe e Mn) e dalla presenza più o meno accentuata di particelle costituite da aggregati di fasi mineralogiche diverse (De Pol, 2009).

Si configura così, per quanto riguarda il rilascio dei metalli accumulatisi nel sedimento, una situazione dinamica in continua evoluzione, dovuta al periodico cambiamento nella ripartizione dei metalli tra le diverse fasi geochimiche e fra queste e l'ambiente che le circonda, in seguito alle variazioni delle condizioni ambientali, che possono abbastanza agevolmente mutarne l'equilibrio chimico.

I sedimenti di aree eutrofizzate, ma anche delle aree di coltivazione della *Ruditapes philippinarum*, sono particolarmente ricchi di materia organica, con prevalenza di condizioni ridotte già dai primi centimetri al di sotto dell'interfaccia deposizionale (Zonta et al., 1995).

La materia organica nei sedimenti è costituita per la maggior parte da sostanze umiche, che presentano molti gruppi funzionali contenenti ossigeno, soprattutto di tipo carbossilico ed ossidrilico. Attraverso tali gruppi la materia organica interagisce con gli ioni metallici, formando complessi diversi per composizione e stabilità (Forstner e Wittman, 1981); la particolare affinità del Rame per gli acidi umici, ad esempio, si deve ricondurre alla sua capacità di formare complessi chelati estremamente stabili (Kerndorff e Schnitzer, 1980).

La disponibilità dei metalli presenti nei sedimenti può essere notevolmente influenzata, inoltre, da un effetto di "schermatura" esercitato da materiale organico presente come ricoprimento

sulla superficie di altre fasi importanti a cui i metalli sono associati. L'azione di ossidazione batterica da parte dei microrganismi presenti sul fondale, che porta alla distruzione della materia organica, può causare il rilascio dei metalli ad essa legati; può inoltre ridurre l'effetto di "schermo", permettendo la rimobilizzazione dei metalli pesanti associati alle fasi mineralogiche sottostanti.

È allora evidente che tutti i processi che comportano il trasferimento dei metalli dalla fase disciolta al sedimento non sono definitivi, poiché il cambiamento delle condizioni ambientali può comportare la redistribuzione dei metalli tra le varie fasi geochimiche e quindi variane la disponibilità (De Pol, 2009).

La speciazione geochimica dei metalli fornisce pertanto il mezzo più idoneo per valutare il rischio tossicologico reale che i sedimenti pongono all'ambiente per la loro capacità di riciclare i metalli, rimettendoli a disposizione della flora e della fauna acquatica. È sicuramente una tecnica lunga e complessa, con dei notevoli limiti intrinseci, ma che rimane comunque per gran parte degli ecotossicologi un utilissimo strumento per avere un primo quadro della potenziale biodisponibilità dei metalli pesanti di un sedimento inquinato.

2.3 LA *RUDITAPES PHILIPPINARUM* COME RISORSA ALIEUTICA LAGUNARE

Quasi fino alla fine del 1800, le caratteristiche biogeografiche del Mediterraneo erano il risultato dell'equilibrio tra una componente "endemica", formatasi alla fine del Terziario e variamente rappresentata nei diversi gruppi vegetali e animali (ed es. *Posidonia oceanica*, *Corallium rubrum*, ...) e una componente "atlanto-mediterranea" pressoché stabile nel corso del Quaternario (ad es. *Pecten jacobaeus*, *Cardium tuberculatum*, ...). L'assetto era completato da limitati apporti "boreo-atlantici" e "senegalesi" verificatisi ad ondate successive attraverso Gibilterra nel corso dei periodi glaciali ed interglaciali, rispettivamente (Pérès & Picard, 1964). Queste componenti e piccole rappresentanze "cosmopolite" e "circumtropicali" hanno connotato la biogeografia del Mediterraneo fino al XIX secolo. Questo assetto originario, conservatosi per migliaia di anni, è andato via via alterandosi a partire dalla fine del 1800 con l'apertura del Canale di Suez (1869) e quindi con lo stabilirsi di altre forme di scambio intercontinentale quali la maricoltura e l'acquariologia soprattutto (Zentilin, 2008).

Le influenze indopacifiche attraverso Suez non sono state avvertite immediatamente ma via via che si attenuava la barriera alina rappresentata dai Laghi Amari, le "specie lessepsiane" hanno incrementato i loro passaggi e nel 1978 si pensava che la componente indopacifica introdotta per questa via assommasse a circa 200 specie (Dov Por, 1978).

L'aumentato deficit idrico del Mediterraneo, conseguente all'attuale fase climatica, ha inoltre incrementato l'ingresso di specie atlantiche temperate calde che si insediano soprattutto lungo le coste meridionali del bacino.

In riferimento all'arrivo ed alla diffusione di specie alloctone utilizzate per pratiche di acquacoltura o di ripopolamento, Leppakoski et al. (2002) individuano 69 specie esotiche introdotte in Europa dalla fine del XIX secolo: 28 molluschi bivalvi, 27 pesci, 10 alghe, 3 gasteropodi e una pianta da fiori. Due di queste, la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e l'ostrica giapponese (*Crassostrea gigas*), figurano attualmente tra le principali specie acquicole europee. Secondo stime recenti, l'ostrica giapponese rappresenta oggi l'80% della produzione mondiale di ostriche.

L'introduzione della specie *Ruditapes philippinarum* nelle lagune del nord Adriatico ha giocato un ruolo chiave nel contesto delle risorse ittiche della zona. La *Ruditapes philippinarum* è caratterizzata da un rapido tasso di accrescimento e di diffusione, tanto che ha presto colonizzato la laguna e gli estuari della regione veneziana, crescendo principalmente nelle zone più interne interessate dagli input antropici. Tali aree dispongono di una notevole quantità di nutrienti, sostanza organica, fitoplankton, microfitobenthos (Facca et al., 2002; Sfriso et al., 2003, 2005) che favoriscono la crescita della vongola, ma costituiscono anche delle fonti secondarie di

contaminazione e inquinamento soprattutto per quel che riguarda alcuni metalli e matalloidi (Donazzolo et al., 1984; Marcomini et al., 1997; Bellucci et al., 2002; Bernardello et al., 2006).

2.3.1 La venericoltura nel nordest Adriatico

Con il termine “venericoltura” si intende l’allevamento di Molluschi appartenenti alla famiglia dei Veneridi (Rafinesque, 1815), un taxon di Bivalvi la cui conchiglia può avere una dimensione variabile tra 4 e 100 mm e che si può trovare in tutti i mari del mondo; essa include 500 specie, molte delle quali hanno un’importanza commerciale per via della loro dominanza all’interno delle comunità bentoniche. I Molluschi appartenenti a questa famiglia generalmente vivono infossati in habitat fangoso-sabbiosi, ma possono colonizzare un’ampia varietà di ambienti (barriere coralline, lagune, paludi di mangrovie, piane intertidali, baie, estuari, mare profondo (Harte, 1998). Questa famiglia è attualmente suddivisa in 12 sottofamiglie, secondo la classificazione su base morfologica originariamente proposta da Keen (1969).

La produzione mondiale di Veneridi da acquacoltura sfiora ormai i 3 milioni di tonnellate/anno, dovuti principalmente alla coltivazione della vongola verace filippina *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), che da sola rappresenta il 20% del mercato globale dei Molluschi eduli (Edwards, 2005).

La Cina, con oltre 1.5 milioni/tonnellate/anno, è il Paese che ha la più grande produzione (Guo et al., 1999), mentre l’Italia occupa il secondo posto con circa 50000 tonnellate/anno (Turolla, 2008). In ambito europeo il 90% della produzione viene effettuata in Italia, per il 6–8% in Spagna (4000 tonnellate/anno) e per il 2% in Francia (1000 tonnellate/anno) (Turolla, 2008).

La produzione italiana è concentrata nelle lagune dell’Alto Adriatico ed è sostenuta quasi esclusivamente dall’allevamento della vongola verace filippina introdotta volontariamente nel 1983: i giovani di *R. philippinarum*, in ragione di 200.000 esemplari, sono stati importati dall’Inghilterra e seminati nella Laguna di Venezia, vicino a Chioggia (Breber, 1985; Zentilin et al., 2007). La verace europea *Tapes decussatus* (Linnaeus, 1758), endemica di tutto l’areale del nord Adriatico, oggi raramente viene coltivata, ma è raccolta su banchi naturali, soprattutto in Sardegna, per i quali sono applicate delle restrizioni finalizzate alla gestione della risorsa (Turolla, 2008).

Tra tutte le aree in cui è stata sperimentata l’introduzione della verace filippina, gli ambienti dove si registrano le produttività più elevate sono le lagune salmastre ad elevata trofia. La quasi totalità della produzione italiana di veraci viene coltivata nelle lagune dell’Alto Adriatico. Nelle lagune del Delta del Po le produzioni derivano per almeno il 90% da pratiche di allevamento, a Marano per il 65–70%; percentuale che si riduce a meno del 50% nella Laguna di Venezia (Turolla, 2008).

2.3.2 Acclimatazione della specie

L’introduzione della specie *Tapes philippinarum* in Italia è avvenuta nel marzo 1983 in Laguna di Venezia, nell’ambito delle ricerche intraprese nel settore della molluschicoltura dal Consorzio per lo Sviluppo della Pesca e dell’Acquacoltura del Veneto (Co.S.P.A.V.).

Il consorzio era stato istituito nel 1977 da sei enti pubblici e gestiva a Chioggia (Ve) un proprio Centro di Ricerca che forniva attività informativa e promozionale a vari livelli in favore degli operatori del settore.

Inizialmente le attività di sperimentazione erano rivolte all’avvio della coltivazione della vongola verace autoctona (*Tapes decussatus*) e rientravano all’interno di un progetto promosso dal Ministero dell’Agricoltura e delle Foreste (Legge n. 984/77) che miravano a realizzare in Laguna di Venezia degli allevamenti sperimentali di ostriche (*Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*) e vongole veraci (*Tapes decussatus*) per il rilancio e la diversificazione della molluschicoltura nazionale.

Nella fase iniziale del progetto l'obiettivo era quello di allestire degli impianti pilota per l'allevamento delle principali specie di molluschi lamellibranchi eduli di interesse commerciale e quindi primariamente si è cercato di ottenere il "seme" attraverso la collocazione in alcune zone strategiche di opportuni collettori per raccogliere il prodotto naturalmente disponibile.

La sperimentazione con la vongola verace autoctona si è rivelata piuttosto problematica, poiché i banchi naturali presenti in Laguna, già alla fine degli anni settanta avevano subito una sensibile riduzione sia per l'eccessivo sforzo di pesca a cui venivano sottoposti, sia per il progressivo deterioramento della qualità dell'ambiente lagunare. Inoltre, non era stato possibile predisporre, come per le altre specie studiate, dei collettori efficienti per la raccolta di seme e quindi per due anni consecutivi era stato impossibile ottenere un lotto omogeneo, condizione questa indispensabile per allestire un modulo di allevamento sperimentale.

Si è ricorsi dunque all'acquisto di un quantitativo da un'altra area geografica giunto nel maggio del 1982 dal Golfo di Napoli, che aveva permesso l'avvio contemporaneo di due prove di allevamento, rispettivamente in contenitori in sospensione e sul fondale lagunare. A fronte di tale sforzo in termini sperimentali e di input produttivi, i risultati non sono stati corrispondenti alle aspettative anche per la mancanza di un metodo di pesca pratico ed efficace in grado di raccogliere il prodotto senza alterare le caratteristiche del fondale.

Così nel 1983, grazie ai frequenti contatti intrattenuti a livello internazionale dal Centro Ricerche ed alla consultazione della bibliografia specializzata, si veniva a conoscenza dei risultati positivi ottenuti in altri Paesi allevando una vongola (*Ruditapes philippinarum*) molto simile a quella autoctona. La specie in questione, originaria delle coste asiatiche, era stata introdotta lungo le coste americane (1930-1940) ed era quindi successivamente giunta nel Nord Europa alla fine degli anni '70.

I vantaggi dati dalla specie erano vari e di grande importanza fra cui la possibilità di iniziare l'allevamento con seme omogeneo (prodotto su vasta scala da laboratori specializzati -*schioditoi*- in condizioni controllate) e la conseguente accresciuta garanzia in termini sanitari e produttivi.

Nel marzo 1983 la specie *Tapes philippinarum* è stata così per la prima volta introdotta in Italia nella laguna di Venezia (Bacino Sud) e posta ad acclimatarsi in una zona a basso fondale nei pressi del Porto di Chioggia, tra i Canali Perognola e Poco Pesse. Sono stati importati 3 kg di seme (circa 200,000 esemplari di 3 mm di lunghezza) ottenuti per riproduzione controllata in uno schioditoio inglese. Vista la rapida e buona acclimatazione della specie già nel 1984 venne fatta una nuova importazione dal medesimo schioditoio inglese per un totale di circa 500,000 individui.

I promettenti risultati ottenuti da queste prime prove di allevamento e l'interesse dimostrato da più parti per questa nuova zoocoltura, determinarono già nel 1985 il diffondersi di semine (nell'ordine di vari milioni di individui) in molte aree costiere (lagune, sacche, valli) del Veneto. A causa delle ingenti quantità di seme ordinate dai vari operatori (specialmente italiani e spagnoli), gli schioditoi che pure realizzavano su scala industriale la riproduzione di questa specie di vongola si sono trovati impreparati a produrre le partite richieste, causando non trascurabili contrattempi e difficoltà.

Nel 1986 le zone di semina e produzione si estendevano ulteriormente, fino a comprendere la maggior parte delle lagune alto-adriatiche: Marano, Venezia, Caleri ed il Delta del Po (Sacca degli Scardovari, Goro, ecc...); altre iniziative di ricerca e/o commerciali venivano attivate in altre lagune, stagni, laghi ed aree costiere della nostra Penisola.

Introdotta a fini di allevamento e/o diffusasi naturalmente, la *Tapes philippinarum* è ad oggi presente in un vastissimo areale e sin dalla sua prima comparsa sui mercati nazionali questa specie è stata accolta positivamente sia dagli operatori del settore che dai consumatori. Spuntando gli stessi prezzi di mercato della vongola verace nazionale, il suo allevamento rappresenta oggi una importante realtà economica e sociale per molte comunità dedite alle attività di pesca e acquacoltura (Paesanti, ESAV 1990).

2.3.3 Aree idonee all'allevamento

Trattandosi di specie fossorie, le zone individuate come ottimali per l'allevamento hanno precise caratteristiche: si tratta di aree pianeggianti o con una pendenza del fondale uniforme e poco accentuata (2-5 cm ogni 10 m), in modo da ottenere una distribuzione omogenea degli esemplari da porre a coltura. Tuttavia, le vongole veraci sopportano piuttosto bene le variazioni anche notevoli dei parametri chimici e fisici delle acque, quali la temperatura, la salinità, la percentuale di ossigeno disciolto, la torbidità, ecc., che sono tipiche degli ambienti lagunari o comunque prossimi alle foci di fiumi (aree estuarine). I migliori siti di allevamento sono generalmente localizzati al riparo dal forte moto ondoso e dai venti dominanti che possono destabilizzare il substrato nel quale le vongole vivono. Nella zona è però importante la presenza di una leggera corrente costante che permetta un salubre ricambio dell'acqua e l'apporto di nuovo alimento. Le vongole veraci si adattano ad una certa varietà di substrati, ma, per poter proporre un allevamento su scala economicamente redditizia, le zone lagunari in cui abitualmente vive e viene pescato questo mollusco devono possedere due caratteristiche principali:

1. emergere periodicamente durante la bassa marea. In queste condizioni, l'individuazione e la raccolta dei bivalvi, che come è noto vivono infossati nel sedimento, risultano facilitate;
2. Il sedimento dovrebbe essere costituito da tre componenti: fango, sabbia e detrito organogeno grossolano. Si trovano facilmente in letteratura (Paesanti, Pellizzato, 2000) le percentuali delle tre componenti principali geologiche - sabbia, silt e argilla - che corrisponderebbero, all'optimum di matrice di crescita per tale Mollusco Bivalve; in realtà, esistono poi altri numerosi fattori (e.g. La quantità di acidi umici e fulvici, o l'idrodinamismo specifico dell'orto di coltivazione) che possono concorrere in maniera cospicua alla formazione ed alla dimensione del banco stesso.

Inoltre, aree con sedimento troppo compatto, o al contempo, con sedimento eccessivamente soffice, sono quindi considerate inadatte all'allevamento; in alcuni casi bisogna bonificarle apportando delle modifiche al sedimento stesso, dissodandolo nel primo caso, od aggiungendo frammenti di conchiglie o sabbia grossolana nel secondo. Nelle zone adibite ad allevamento non devono essere presenti fonti inquinanti di alcun genere (scarichi industriali, fognari, urbani, agricoli), ed è necessario essere lontani da aree dove avvengono fioriture di fitoplancton tossico.

Il fondale deve essere mantenuto sgombro da vegetazione, soprattutto da macroalghe presenti in tutti i periodi dell'anno, soprattutto in primavera-estate.

I principali fattori da analizzare che influiscono sulla crescita e sulla sopravvivenza delle vongole sono:

1. **temperatura dell'acqua:** ha un'influenza diretta sulla crescita e in alcuni casi sulla sopravvivenza della specie; l'area costiera e le lagune Nord adriatiche presentano andamenti termici idonei per intraprendere gli allevamenti (Paesanti & Pellizzato, 2000);
2. **salinità, ossigeno disciolto, pH:** ciascuno di questi parametri dell'acqua determina in modo fondamentale la crescita e la sopravvivenza della specie: infatti, se tali variabili non si mantengono per un tempo sufficientemente lungo entro valori ottimali, oppure se superano troppo facilmente i valori critici di tolleranza della specie, determinano un giudizio sfavorevole sull'opportunità di usare l'area come sito di venericoltura. Nell'area costiera nelle lagune Nord adriatiche, data la presenza di numerosi fiumi, esiste il rischio che "lame di acqua dolce" si

stabiliscano anche per diversi giorni nelle zone di allevamento; nella stagione estiva esistono anche rischi di mancanza o forte riduzione dell'ossigeno disciolto (Paesanti & Pellizzato, 2000).

3. **disponibilità di alimento:** come indicatore generico per questo parametro viene utilizzata la disponibilità di clorofilla, correlata in maniera significativa con i tassi di accrescimento delle vongole (Paesanti & Pellizzato, 2000);
4. **altezza delle onde:** può avere effetti sulla crescita e sulla sopravvivenza degli esemplari in quanto l'eccessivo movimento della struttura di allevamento può causare l'interruzione dell'alimentazione; nel caso di molluschicoltura su fondale, realizzata con un battente idrico di -0,5/-3,5 m (come è il caso delle aree di ingrasso di *R. philippinarum* in Nord Adriatico), le onde superiori al metro possono provocare eccessive concentrazioni con accumuli di vongole o il trasporto e la perdita degli esemplari più leggeri ("seme") (Paesanti & Pellizzato, 2000);
5. **tempo di permanenza fuori dall'acqua in rapporto alla marea:** si tratta di valutare il periodo di tempo massimo che gli esemplari allevati possono sostenere esposti all'aria; da osservazioni condotte nel corso di numerose sperimentazioni nelle lagune dell'Alto Adriatico, si può indicativamente affermare che si ottengono risultati zootecnici accettabili, anche se non ottimali, in zone con periodi di esposizione all'aria anche di 3-4 ore al giorno (Paesanti & Pellizzato, 2000);
6. **sedimenti in sospensione o torbidità dell'acqua:** La concentrazione dei solidi sospesi, e quindi la torbidità, è un parametro caratterizzato da elevata variabilità temporale in funzione delle condizioni meteo-oceanografiche a breve termine (correnti, onde, vento) e fortemente controllato da perturbazioni anche strettamente locali (ad esempio il passaggio di imbarcazioni). L'idoneità di un sito sarà piuttosto ridotta nelle zone dove persistono elevati livelli di materiale particellato inorganico in sospensione, quali ad esempio le aree più interne delle sacche e delle lagune (Paesanti & Pellizzato, 2000);
7. **velocità della corrente:** con riferimento al normale flusso di marea, una velocità di corrente troppo bassa non permette una circolazione adeguata, con conseguente deficit di O₂ e nutrienti, mentre un flusso troppo alto può causare instabilità nell'area intertidale (Paesanti & Pellizzato, 2000).
8. **malattie, competitori, predatori:** l'assenza di malattie, predatori e/o competitori è ovviamente ritenuta un requisito ottimale; la presenza o la frequenza di uno o di tutti e tre può essere tollerata o mitigata da azioni di gestione dell'allevamento; l'abbondanza e quindi il raggiungimento di livelli critici di malattie, predatori e competitori ha un effetto diretto sulla sopravvivenza della specie allevata. Nelle zone vocate di produzione dell'Alto Adriatico non sussistono reali rischi di organismi competitori e predatori, grazie anche alla elevata pressione di pesca; lo stesso vale per le patologie (Castellani & Barbanti, 2010). In realtà, la *Ruditapes philippinarum* ha cominciato a soppiantare il principale competitore presente nelle lagune del nordest Adriatico, l'autoctona *Tapes decussatus*, che occupa una nicchia ecologica situata nello strato di sedimento appena inferiore rispetto alla filippina e che oltretutto è caratterizzata da esigenze ambientali più stringenti nonché da un tasso di accrescimento inferiore: ciò non le consente di svilupparsi e diffondersi e dati questi presupposti la sua coltivazione risulta svantaggiosa anche in termini economici;

2.3.4 Venericoltura in Laguna di Marano

Nell'alto Adriatico ed in particolare nel Golfo di Trieste l'allevamento dei molluschi è una attività praticata da lungo tempo, anche in virtù della presenza di banchi naturali di Molluschi eduli sfruttati a fini commerciali. Questa cultura molluschicola ha portato all'insediamento degli ormai famosi parchi di mitili ("pedocere") lungo la costa triestina ed in epoche diverse, ad alcuni tentativi di allevamento delle due specie di ostrica (*Ostrea gigas* L. e *Crassostrea gigas* Thunberg) in alcune aree sia lagunari che di mare aperto. Infine, alla metà degli anni ottanta, è stato avviato un programma per l'allevamento della vongola verace filippina (*Ruditapes philippinarum*, Adams e Reeve, 1852). Anche in questo caso la sperimentazione è partita da basi preesistenti: infatti la raccolta di vongole veraci della specie europea (*Tapes decussatus*, L.) per il consumo familiare o per il commercio locale è nota e praticata nelle Lagune di Grado e Marano da tempi remoti. Precisamente, a partire dal 29 aprile 1986 si è verificata sperimentalmente la possibilità di procedere all'allevamento della vongola verace. A tale scopo è stata costituita l'*Azienda Speciale della Camera di Commercio di Udine per lo sviluppo dell'Acquacoltura nella laguna di Marano* (A.S.A.L.M.). Questa azienda è stata strutturata in modo tale che venissero interessate tutte le realtà regionali, da quelle politico amministrative (C.C.I.A.A. E Provincia di Udine, Comune di Marano Lagunare), a quelle scientifiche (Laboratorio di Ittiopatologia, di Basaldella-Udine e Laboratorio di Biologia Marina di Aurisina-Trieste), a quelle imprenditoriali (Cooperativa Pescatori "S. Vito" di Marano Lagunare). L'A.S.A.L.M. ha permesso di acquisire una tecnologia già sperimentata in altre realtà e di trasferirla, attraverso modifiche, al sito in questione. In laguna di Marano, l'allevamento viene effettuato partendo da seme di taglia T³ (4-5 mm di lunghezza) proveniente o da centri di riproduzione esteri, o da seme prodotto in avannotterie locali o da stock di semi misti prodotti nel nord dell'Adriatico (Zentilin, ESAV 1990).

Il sistema messo a punto prevede due fasi distinte:

1. **fase di preingrasso** nella quale le vongole di taglia T³ vengono poste in cassette in legno (dimensioni 1 m x 0,5 m) la cui faccia superiore ed inferiore è chiusa da una rete in materiale plastico con maglia di lato variabile da 2 a 4 mm, sospese nell'acqua su strutture in legno. Le vongole vengono tenute nelle cassette sospese fino al raggiungimento della taglia T⁶-T⁸ (10-12 mm di lunghezza), allorquando, per esigenze biologiche, la specie deve essere seminata sul fondo (fase di ingrasso). Dopo differenti prove è stato dimostrato che, in questa fase, la densità di semina che meglio garantisce buoni accrescimenti ed economicità nella gestione dell'impianto di preingrasso è di 10,000 esemplari/m² (Zentilin, ESAV 1990).
2. **fase di ingrasso**: questa fase inizia con la preparazione preventiva dei fondali di semina. Questi vengono approntati bonificandoli da eventuali banchi naturali di ostriche portoghesi (*Crassostrea gigas*) ed eseguendo una pacciamatura che consiste nello stendere un film plastico nero per circa 7 giorni. Tale pratica ha principalmente lo scopo di rendere il terreno uniforme, eliminando la presenza di un crostaceo fossorio (*Upogepia* sp.) che ha creato non poche difficoltà in questa fase dell'allevamento. Completata la fase preparatoria si procede alla semina (Zentilin, ESAV 1990). L'operazione consiste nel seminare a spaglio le vongole sopra tali fondali durante i periodi di bassa marea, quando il parco rimane allo scoperto. Ultimata la semina, l'area interessata viene ricoperta con una rete di materiale plastico al fine di proteggere il seme da predatori quali granchi (*Carcinus aestuarii*, il Nardo) e uccelli, nonché di evitare eventuali fenomeni di trasporto passivo.

Il letto di semina che è stato valutato maggiormente efficiente ospita 200 esemplari/m².

Con l'applicazione e la messa a punto di tale approccio sperimentale si è giunti a stabilire le tecniche colturali da adottare specificatamente in Laguna di Marano, individuando le curve di accrescimento e le perdite nei vari cicli di allevamento. Dai dati raccolti si evince che il periodo

migliore per la semina è quello primaverile, in quanto l'intero ciclo di allevamento risulta essere più breve di circa 4-6 mesi rispetto a quello autunnale, mentre le perdite totali, calcolate in base alla mortalità rilevata ed alla percentuale di ricattura, si attestano al 30% (da 0 a 10% nella fase di preingrasso, da 10% a 20% in quella di ingrasso) (Zentilin, ESAV 1990).

La raccolta degli esemplari adulti poi, viene effettuata un anno dopo la semina, e la gestione degli orti è effettuata a rotazione: dopo la semina trascorre un anno di crescita, poi viene effettuata la raccolta e poi l'orto viene tenuto "a riposo" per un intero anno prima della nuova semina.

La produzione annuale ottenuta in Laguna di Marano contribuisce a quella nazionale (che insiste in tutto in Nord Adriatico) che ammonta a circa 50.000 t all'anno (Zentilin, 2007).

2.4 LA *RUDITAPES PHILIPPINARUM* COME ORGANISMO MODELLO

(ESAV, 1990)

2.4.1 Tassonomia

La collocazione attualmente attribuita alla specie *Ruditapes philippinarum* viene definita dal prospetto qui di seguito riportato:

Classe: **BIVALVA** (Linné, 1758)

Sottoclasse: **HETERODONTA** (Neumayr, 1884)

Ordine: **VENEROIDA** (H. & A. Adams, 1815)

Superfamiglia: **VENEROIDEA** (Rafinesque, 1815)

Famiglia: **VENERIDAE** (Rafinesque, 1815)

2.4.2 Descrizione generale

I Bivalvi sono Molluschi caratterizzati dalla costante presenza di una conchiglia composta da due valve distinte ed incernierate tra loro mediante legamenti ed incastri. Le valve si aprono e richiudono grazie all'azione di robusti muscoli dorsali detti muscoli adduttori. Il corpo e il piede dei Bivalvi è per lo più compresso lateralmente. Il *piede*, privo della suola strisciante tipica dei Gasteropodi, si dilata per effetto della pressione sanguigna ed assume frequentemente (nei Veneridi sempre) la forma di una scure atta allo scavo dei substrati sabbiosi o fangosi: perciò i Bivalvi sono anche detti "Pelecipodi". La *cavità palleale*, che circonda il corpo del Mollusco, è delimitata esternamente da due lembi di *mantello* (o *pallio*) che formano le *valve*. Nei Bivalvi le *branchie* sono molto sviluppate ed hanno struttura lamellare: di qui il termine "Lamellibranchi" pure usato per designarli. Le *branchie*, oltre ad assolvere alla funzione di organo respiratorio, sono generalmente adibite alla raccolta del cibo mediante il filtraggio dell'acqua. Ai due estremi dell'animale si aprono la *bocca* e l'*ano*, e la porzione posteriore dell'intestino attraversa il pericardio ed il ventricolo. Questi Molluschi non possiedono un capo differenziato. I sessi sono prevalentemente separati; non mancano tuttavia le forme ermafrodite.

2.4.3 La conchiglia

La conchiglia dei Bivalvi, analogamente a quella degli altri molluschi, viene edificata dal mantello ed è essenzialmente composta da carbonato di calcio (CaCO₃): l'animale preleva gli ioni calcio dall'ambiente esterno (l'acqua marina nel caso dei Bivalvi marini) e li convoglia per via sanguigna al mantello e quindi al liquido extrapalleale presente tra mantello e conchiglia. Ivi ha luogo la formazione del carbonato di calcio che viene inglobato da una scleroproteina chiamata

conchiolina, matrice proteica secreta anch'essa dal mantello nello spazio extrapalleale. La natura chimica e la conformazione della conchiolina, per sua natura destinata a sclerificarsi, è determinata dalla composizione del liquido extrapalleale e ciò avviene anche per il tasso di crescita dei cristalli di CaCO_3 . Il carbonato di calcio può cristallizzare in varie forme, due delle quali (calcite e aragonite) sono riscontrabili in gran parte dei molluschi forniti di conchiglia. La disposizione dei suddetti sistemi di cristallizzazione può essere schematizzata in uno spaccato trasversale di conchiglia bivalve.

Figura 1.4 schema di una conchiglia di bivalve vista dal lato interno ed esterno

Lo strato superficiale, o esterno, è costituito dal periostraco che ricopre tutta la conchiglia di natura proteica.

La struttura prismatica forma, soprattutto nei Bivalvi, lo strato intermedio ed è costituita da prismi di calcite (raramente aragonite) orientati perpendicolarmente alla superficie conchigliare. La struttura a lamelle incrociate (la più frequente nei Bivalvi marini) è quasi sempre composta da aragonite, pur essendo presenti negli Ostreidi strutture fogliari a lamelle di calcite.

La struttura madreperlacea ha sede, se presente, nello strato conchigliare più interno: è composta da lamelle di aragonite parallele alla superficie interna della conchiglia ed è sempre assente nei Bivalvi della sottoclasse Eterodonta.

I caratteri conchigliari sono spesso essenziali ai fini della tassonomia specifica e sovraspecifica dei Molluschi. Nei Bivalvi, oltre alla forma ed ornamentazione della superficie esterna, possono essere determinanti le caratteristiche relative alla posizione (esterna od interna) del legamento; la morfologia, il numero e la disposizione dei denti (raramente assenti) situati nella cerniera; il numero e la disposizione delle impronte muscolari; il tracciato delle linee e delle impronte palleali visibili all'interno della conchiglia.

La superficie esterna può essere convessa, come nella maggioranza dei Bivalvi (inclusi i Veneridi), o piana. Nella faccia esterna si notano striature concentriche, dette "strie di accrescimento", e in molti casi strie o solchi radiali. Il punto in cui hanno origine le strie di accrescimento è detto "umbone". Nell'area umbonale è in genere riconoscibile la conchiglia embrionale.

2.4.4 La nutrizione

Tutti i Bivalvi si nutrono di particelle sospese nell'acqua o depositate nel fondale (*microfagia*) tale materiale è costituito principalmente da alghe unicellulari (fitoplancton), ma anche da microorganismi animali vivi o morti.

La microfagia richiede l'ingestione di grandi volumi di acqua per poterne ricavare il necessario nutrimento: i movimenti ciliari delle branchie di questi formidabili filtratori riescono a generare nell'acqua circostante correnti che la fanno entrare all'interno (cavità del mantello). Le particelle rimangono imprigionate dalle secrezioni mucose che poi, grazie al battito ciliare, vengono avviate alla regione cefalica. Qui i palpi labiali operano una cernita del materiale convogliato: le particelle più grosse, o quelle indesiderate, vengono scartate e rigettate all'esterno come agglutinati di particelle e muco (**pseudo-feci**) per mezzo delle contrazioni del sifone esalante. Soltanto nei Bivalvi primitivi le branchie hanno funzione esclusivamente respiratoria e le particelle alimentari vengono accumulate assieme al sedimento nella cavità del mantello, da cui vengono periodicamente espulse. Una delle caratteristiche morfologiche più importanti dei Lamellibranchi, soprattutto delle sottoclassi

Pteriomorpha ed Eterodonta, è rappresentata dal grande sviluppo delle branchie che, protette dalla conchiglia, sono situate nella cavità palleale ai due lati del piede. In questi Bivalvi l'apparato branchiale è composto da due paia di branchie lamellari (o tre, di cui una rudimentale) situate ai lati della massa viscerale. Le due branchie, costituite da filamenti di epitelio, sono ripiegate su se stesse a forma di W. I margini liberi delle lamelle (quello più esterno e più interno di ciascuna branchia) si uniscono dorsalmente al mantello ed al piede, così che dalla cavità palleale si viene a separare una camera soprabbranchiale dalla quale si origina il sifone esalante.

Il movimento delle ciglia vibratili, di cui l'epitelio palleale e branchiale è riccamente provvisto, provoca delle correnti che permettono l'aspirazione dell'acqua tramite il sifone inalante, il suo passaggio attraverso i pori delle lamine e quindi la sua espulsione a mezzo del sifone esalante. Il muco che ricopre branchie e mantello dell'animale trattiene le piccole particelle presenti nell'acqua, che vengono poi trasportate dal movimento ciliare ai palpi labiali. L'azione selettiva delle ciglia dei palpi labiali permette alle particelle dotate di valore nutritivo di passare nella bocca, mentre le particelle inorganiche (sabbia e detriti vari) vengono avviate verso il sifone esalante e quindi espulse.

Il volume di acqua che attraversa la cavità del mantello di un singolo animale è sorprendentemente grande (un organismo in buona salute e buone condizioni ambientali può filtrare fino a 50L/die). Va detto, tuttavia, che la corrente d'acqua è utilizzata pure per la respirazione, anche se gli scambi di ossigeno e di anidride carbonica avvengono prevalentemente attraverso il mantello. Il meccanismo ciliare è attivo finché l'animale rimane immerso nell'acqua. Quando l'animale rimane allo scoperto in occasione delle basse maree o infossato nel sedimento (anche 10-12 cm), le valve si chiudono e l'anidride carbonica si accumula nella cavità del mantello. La conseguente diminuzione del pH deprime l'attività ciliare fino a sopprimerla. Non appena l'animale si trova nuovamente immerso nell'acqua le ciglia riacquistano la loro motilità.

2.4.5 La digestione

Il metabolismo delle sostanze avviene principalmente nelle cellule epatiche ed, in minore misura, in altre sedi come reni, tratto gastro-intestinale, cute e plasma. Il fegato o l'epatopancreas si trovano infatti in una posizione strategica per drenare i composti tossici dall'organismo, una volta che essi siano stati assorbiti lungo il tratto gastrointestinale.

La digestione è prevalentemente di tipo endocellulare. L'apertura boccale è seguita da un breve esofago (intestino anteriore) che porta direttamente allo stomaco. Questo è un largo sacco circondato da una grossa ghiandola digestiva che è l'organo principale della digestione endocellulare. Le cellule di quest'organo inglobano il materiale minuto finemente suddiviso che arriva dallo stomaco e lo digeriscono mediante i loro enzimi endocellulari. L'intestino decorre nel piede, dove descrive una o più circonvoluzioni, per poi attraversare il pericardio e terminare, come intestino retto, nella cavità posteriore del mantello.

Una caratteristica importante dell'intestino dei Bivalvi è la presenza di un diverticolo ciliato le cui cellule secernono uno stilo cristallino di natura proteica. Le ciglia del diverticolo fanno ruotare lo stilo e lo spingono contro una struttura dello stomaco chiamata "scudo gastrico". La parte superiore dello stilo ruotando contro lo scudo gastrico, si consuma e il materiale disciolto si mescola con il contenuto dello stomaco. La funzione dello stilo consiste nel liberare enzimi per la digestione dei glucidi. Stante la sua presenza si può affermare che il processo digestivo nei Bivalvi è anche di tipo esocellulare, almeno per quanto riguarda i glucidi; dal canto suo la digestione dei protidi e dei lipidi è endocellulare ed ha luogo nella ghiandola digestiva. Ivi è presente un numero elevatissimo di leucociti che, fuoriuscendo dall'organo, penetrano nello stomaco dove fagocitano alghe unicellulari ed altro materiale particellato, trasportandoli poi, a fini alimentari, nei vari tessuti del corpo.

Dal punto di vista strettamente fisiologico, gli alti livelli di metalli in tracce presenti nei Molluschi marini si spiegano se si vanno a considerare i tre meccanismi di escrezione e detossificazione principali di questi organismi:

1. **chelazione grazie a ligandi specifici:** esistono infatti meccanismi di trasformazione chimica che riducono la disponibilità intracellulare di ioni metallici: ad esempio possono essere inclusi in strutture proteiche complesse a formare complessi di chelazione (metallotioneine) (Dallinger, 1995);
2. **compartimentazione intracellulare all'interno di lisosomi:** questi organelli intracellulari funzionano come il sistema digestivo della cellula, e quindi accumulano dal citoplasma prodotti di scarto cellulare che non possono essere degradati, tra cui ioni metallici (Dallinger, 1995);
3. **formazione di precipitati insolubili,** ovvero la formazione dei cosiddetti "granuli" cioè depositi inorganici circondati da membrana (Taylor, 1995).

2.4.6 Il Sistema circolatorio

Nei Bivalvi il cuore, contenuto nel pericardio, è costituito da due atri e da un ventricolo. La circolazione del sangue (incolore nei Veneridi) è aperta. L'aorta, che si origina dal ventricolo, si allarga (bulbo arterioso) e quindi si divide in due rami principali: l'arteria palleale, che va ad irrorare il mantello, e l'arteria viscerale, che sostiene la circolazione epatica e gastrointestinale. Sono presenti altresì abbondanti ramificazioni destinate a tutti gli organi, le quali sfociano nei seni venosi situati nella porzione superficiale del corpo, in particolare nel mantello. Quest'ultimo è l'organo respiratorio più importante in quanto, essendo permeabile ai gas disciolti nell'acqua, permette il passaggio per diffusione dell'ossigeno disciolto dal mezzo idrico al liquido circolante.

Prima di ritornare al cuore la maggior parte del sangue viene filtrata dal rene, che ne trattiene i cataboliti. Soltanto una parte del sangue che esce da quest'organo escretore entra nella circolazione delle branchie. Questa è costituita essenzialmente da una vena longitudinale da cui si diparte un vaso per ogni branchia, e da una arteria longitudinale che convoglia il sangue in un altro grosso vaso (vena longitudinale del rene), dal quale ritorna agli atri.

2.4.7 Il Sistema nervoso

Oltre a non possedere un capo differenziato e a presentare totale mancanza di occhi (per regressione evolutiva), tutti i Bivalvi hanno un sistema nervoso piuttosto ridotto. Nella parte anteriore dell'animale sono presenti due gangli cerebroidi, spesso fusi con un paio di gangli pleurali, costituenti un anello periesofageo. Da questo anello nervoso si dipartono i cordoni nervosi che vanno ad innervare anche il piede (coppia di gangli pedali) ed i visceri (coppia di gangli viscerali risultanti dalla fusione dei gangli propriamente detti con i gangli parietali).

2.4.8 La riproduzione

Conoscere il ciclo vitale di questi organismi è, senza alcun dubbio, fondamentale per comprendere quelle che sono le problematiche connesse allo sovrasfruttamento della risorsa e al fenomeno della pesca abusiva, ovvero a regolamentare nel modo più proficuo e sostenibile la loro raccolta, salvaguardando il delicato (e già ampiamente provato) ecosistema in cui vengono fatti crescere. I Molluschi, in generale, e i Bivalvi, in particolare, si riproducono sessualmente, sono dioici, e gli individui possono avere una sola gonade o un paio di gonadi che si sviluppano con i nefridi in piccoli spazi celomatici associati alla cavità pericardica. I Bivalvi sono privi di organi copulatori e liberano nubi di spermatozoi e uova nell'acqua circostante dove avviene la fecondazione esterna; la produzione e la liberazione dei gameti sono molto spesso sincronizzate con la temperatura dell'acqua, le variazioni di marea e i fotoperiodi stagionali. Lo sviluppo embrionale avviene per segmentazione spirale: una larva planctonica detta trocofora si sviluppa dalla gastrula e dalla trocofora si sviluppa a sua volta una larva detta veliger (Figura 6), dotata di piede, mantello, conchiglia e organo natatorio bilobato detto velo. I veliger sono planctonici e si alimentano delle riserve di vitello o per filtrazione attraverso il velo; alla fine scendono sul fondo, perdono il velo e si sviluppano diventando adulti (Mitchell et al., 1991).

2.4.9 L'Ecologia della specie

I Molluschi Bivalvi sono efficienti scavatori. Le valve penetrano facilmente nel fango molle o nella sabbia mentre il piede ventrale scava verso il basso. Il piede viene spinto nel substrato dalla contrazione dei muscoli protrattori pedali; con il piede esteso nel substrato i muscoli adduttori si contraggono avvicinando le valve, espellendo l'acqua dalla cavità del mantello e aumentando l'afflusso di emolinfa al piede: l'acqua espulsa mobilizza la sabbia attorno all'animale e l'estremità del piede si dilata per il maggior afflusso di emolinfa. I muscoli retrattori pedali si contraggono facendo penetrare le valve nella sabbia dietro al piede, che essendosi dilatato agisce da "ancora" (Mitchell et al., 1991).

Molti bivalvi di interesse commerciale, in particolare quelle specie che vivono in ambienti marini e di transizione rispondono ai principali requisiti che un indicatore deve avere per essere utilizzato nelle attività di monitoraggio, come ampia diffusione, rilevanza ecologica, facilità di reperimento, sensibilità, disponibilità di gameti e facilità di essere sottoposti a test di breve durata (Calabrese, 1984; Thain, 1991).

Inoltre, i Bivalvi sono organismi tipicamente eurieci con alta tolleranza alle fluttuazioni ambientali e perciò meglio sfruttabili per studi sulla valutazione della qualità ambientale rispetto agli organismi stenoeici con bassa tolleranza (His et al, 1999).

Va sottolineato come in questo contesto, la specie *Ruditapes philippinarum* giochi un ruolo ecologicamente fondamentale nell'ambiente comportandosi come "deposit feeders", provvedendo alla rimozione di particolato organico, in competizione per il cibo con la comunità microbica del sedimento (Volpi Ghirardini, 2012).

2.5 IL BIOACCUMULO

Il bioaccumulo è il generico termine che indica il fenomeno risultante dall'assunzione di composti chimici (*uptake*) da parte di un organismo (acquatico, secondo la definizione classica originaria) in seguito ad avvenuta esposizione (*exposure*) sia attraverso l'acqua (processo chiamato *bioconcentrazione*) sia attraverso il cibo (Manente, 2000).

Da un punto di vista ecotossicologico, l'identificazione e la caratterizzazione di un pericolo che può derivare da tale fenomeno, consistono nella determinazione qualitativa e quantitativa degli effetti potenziali di una sostanza sulla popolazione o sull'ecosistema esposto e degli effetti osservati, attraverso il calcolo della relazione "dose-risposta" ovvero dei livelli di esposizione cui corrispondono risposte biologiche specifiche (Volpi Ghirardini, 2012).

L'identificazione e caratterizzazione del pericolo si basano su studi sperimentali dai quali si ricavano parametri di tossicità acuta e a lungo termine.

Il pericolo di una sostanza ne rappresenta dunque un aspetto caratteristico e specifico ed esprime una potenzialità, vale a dire la possibilità di una sostanza di esercitare effetti tossici a carico di un organismo esposto. Per cogliere appieno il concetto di "potenzialità" è sufficiente considerare che in assenza di esposizione anche il rischio di una sostanza estremamente pericolosa può essere considerato pressoché nullo.

Di conseguenza, uno degli approcci scientificamente validi è quello *retrospettivo* che si basa sull'impiego di analisi chimiche finalizzate all'identificazione dei contaminanti e alla valutazione del livello di inquinamento (*monitoraggio chimico*) e di individuazione di indicatori biologici (*monitoraggio biologico*) per i quali è riconosciuto ampiamente a livello internazionale da molto tempo e ora anche a livello legislativo nazionale il ruolo fondamentale nella valutazione della qualità ambientale e dei suoi cambiamenti (WFD 2000/60 e leggi nazionali) (Volpi Ghirardini, 2012).

Tuttavia, in molti casi nella letteratura scientifica si riscontra ancora una certa confusione per quanto riguarda la terminologia che riguarda il bioaccumulo di contaminanti e i termini bioaccumulo e bioconcentrazione sono talvolta impiegati in sinonimia. In realtà, i processi responsabili della concentrazione delle sostanze contaminanti negli organismi sono diversi e una distinzione è necessaria tra i processi di **bioconcentrazione**, **bioaccumulo** e **biomagnificazione** (Volpi Ghirardini, 2012).

Gli organismi acquatici infatti, possono concentrare i contaminanti presenti nell'ambiente attraverso questi tre processi principali: la bioconcentrazione, il bioaccumulo e la biomagnificazione dei quali esistono definizioni accreditate e condivise a livello internazionale (US EPA, 2000a e b). Se ne riporta di seguito una breve disamina.

Bioconcentrazione: processo attraverso il quale un organismo assume e concentra un contaminante direttamente dal medium ambientale (essenzialmente l'acqua). E' il risultato dell'assunzione (*uptake*), distribuzione interna, trasformazione/metabolizzazione, accumulo/stoccaggio e restituzione all'ambiente (escrezione) della sostanza.

La quantificazione della bioconcentrazione si effettua mediante la stima del *Fattore di bioconcentrazione* (BCF, *Bioconcentration factor*) che è dato dal rapporto tra la concentrazione del contaminante nei tessuti dell'organismo ($\mu\text{g/g}$ di peso secco) e la concentrazione del contaminante nel mezzo ($\mu\text{g/g}$).

Generalmente per predire il grado di bioconcentrazione potenziale per un composto organico si fa riferimento al coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua che fornisce una misura del grado di idrofobicità di una sostanza, ovvero la sua affinità per i lipidi. L'uso di tale coefficiente di ripartizione nel predire la possibile bioconcentrazione risulta però corretto solo in un certo range di valori; infatti per sostanze altamente lipofile, con un valore di Kow superiore a 106, la relazione tra Kow e BCF non è confermata. Inoltre sostanze con un Kow superiore a 1013 non vengono accumulate in alcun modo (Opperhuizen, 1991; Phillips, 1993);

Oltre al processo di ripartizione tra fase acquosa e non acquosa, la bioconcentrazione dei composti organici è fortemente influenzata dalla loro stereochimica. A titolo di esempio si possono ricordare i PCB e la loro diversa capacità di essere trasportati attraverso le membrane cellulari, maggiore per le molecole planari rispetto a quelle non planari.

Bioaccumulo: processo attraverso il quale un organismo assume e concentra un contaminante sia direttamente dal medium ambientale (bioconcentrazione) sia indirettamente attraverso l'alimento.

Entrando in gioco l'alimento, assumono un ruolo fondamentale nel contribuire a questo processo il ruolo trofico della specie e la sua ecofisiologia, aspetti che influenzano la bioaccessibilità del contaminante.

Pertanto il bioaccumulo di metalli pesanti dipende sia dalle strategie selezionate nella specie sia dalla loro biodisponibilità nel comparto abiotico (Luoma, 1983). Il bioaccumulo di microinquinanti organici è invece influenzato prevalentemente dalle caratteristiche chimico fisiche del composto (solubilità, coefficiente n-ottanolo/acqua, ingombro sterico, peso molecolare, etc) cui si aggiungono la sua biodisponibilità nel comparto abiotico (dove tende a legarsi prevalentemente al carbonio organico) e il contenuto in lipidi dei tessuti animali (Landrum e Robbin, 1990).

Si stima mediante il *Fattore di bioaccumulo* (BAF, *Bioaccumulation factor*) che è il rapporto tra la concentrazione del contaminante nei tessuti ($\mu\text{g/g}$ di peso secco) e la concentrazione dello stesso nel mezzo (acqua, sedimento, alimento) ($\mu\text{g/g}$).

Il BAF è molto importante perché tiene conto della biodisponibilità per il sistema in esame e delle differenti vie di esposizione. Come per il BCF, anche per il BAF è necessario specificare la forma in cui è presente il contaminante e se il mezzo ambientale è rappresentato dall'acqua o dal sedimento. Come il BCF è anch'esso rappresentato spesso in forma logaritmica.

Biomagnificazione: è un caso particolare di bioaccumulo in cui è dominante l'assunzione attraverso il cibo. Porta ad un aumento della concentrazione del contaminante passando da un livello al livello superiore lungo la rete trofica.

È complesso studiare la biomagnificazione dato che è molto difficile discriminare l'accumulo diretto dal mezzo abiotico dall'accumulo indiretto attraverso il cibo e la rete trofica. Inoltre, non è del tutto fondata l'assunzione che alte concentrazioni di contaminanti rilevate agli alti livelli trofici riflettano solo processi di biomagnificazione. L'aumento delle concentrazioni di contaminanti organici di solito riscontrabile al crescere del livello trofico può anche essere dovuto semplicemente alla diversa concentrazione di lipidi (che generalmente cresce all'aumentare del livello trofico) o ai differenti tassi di escrezione, che per gli inquinanti idrofobici è inversamente proporzionale alla massa corporea (Gray, 2002).

2.6 I BIOMARKERS IN AMBIENTI DI TRANSIZIONE

Vista l'importanza ecologica di siti come quelli lagunari, è opinione comune che il biomonitoraggio in ambiente marino giochi un ruolo vitale nel determinare strategie ed azioni mirate ad identificare, valutare, controllare e ridurre problemi ambientali, nonché assicurare che gli ecosistemi siano efficacemente protetti (Wells, 1999).

Recentemente, sono stati definiti tre gruppi di bioindicatori (Fränzle, 2006):

- a) *test organisms*, usati in saggi di biotossicità che prevedono l'esposizione deliberata dell'animale a contaminanti o materiale contaminato (Hahn, 2002); in un ambiente acquatico, la specie è generalmente esposta in un sistema controllato ad un campione ambientale contenente un insieme di inquinanti a concentrazione ignota, al fine di verificarne i possibili effetti tossici (Volpi Ghirardini & Pellegrini, 2001);
- b) *indicatori di reazione*, che rispondono in maniera relativamente veloce e con una reazione osservabile o misurabile a stress chimici o fisici; questi indicatori sono generalmente noti come *biomarkers*, ovvero variazioni biochimiche, fisiologiche o comportamentali misurabili in un tessuto, fluido biologico o intero organismo (individuo o popolazione) causati dalla presenza di uno o più contaminanti (Depledge & Fossi, 1994);
- c) *indicatori di accumulo*, che devono possedere una forte resistenza di base che gli permetta di accumulare sostanze potenzialmente tossiche senza subire danni per un certo periodo di tempo, dipendente dal rapporto tra assorbimento ed escrezione (Fränzle, 2006).

Nello specifico, il ruolo dei biomarkers è quello di fornire risposte molecolari, biochimiche, fisiologiche, isto- citopatologiche a livello di organismo, popolazione o comunità al fine di:

- identificare l'esposizione a determinati agenti chimici;
- ottenere informazioni sui cambiamenti spazio-temporali nelle concentrazioni dei contaminanti;
- stimare la qualità ambientale o il verificarsi di effetti negativi (Au, 2004).

È difficile suddividere e classificare i biomarkers, dal momento che utilizzano parametri diversi. Sono generalmente riconosciuti biomarkers *di esposizione* e biomarkers *di effetto* (Hahn, 2002).

I primi sono risposte biologiche legate all'induzione o all'inibizione di specifici enzimi connessi alla biotrasformazione e alla detossificazione da contaminanti: dal momento che sono segnali di esposizione precoce a livello cellulare o molecolare, non danno informazioni sui reali effetti

tossicologici sugli organismi e sono usati per monitorare fonti dirette di contaminazione o per caratterizzare siti sottoposti ad una contaminazione ignota.

I biomarkers di effetto sono legati ad espressioni patologiche a diversi livelli di organizzazione biologica; le risposte non possono essere correlate ad uno specifico contaminante (Schlenk, 1999; Lam & Gray, 2003; Broeg et al., 2005). Occorre segnalare, però, che alcuni Autori sostengono che questi biomarkers siano molto “soggettivi”, ovvero legati a processi meccanicistici che causano una forte variabilità inter individuale tra differenti comparti (assorbimento, bioattivazione e detossificazione) (CNR, 1987; Barrett et al., 1997; Schlenk, 1999).

In genere, i biomarkers vengono usati secondo tre possibili modalità:

- *biomonitoraggio passivo*, ovvero confrontando la risposta del biomarker tra un sito contaminato e un sito di riferimento;
- *biomonitoraggio attivo*, che prevede il trapianto di specie sentinella nell’area di studio per un tempo specifico sufficiente a indurre una risposta dal biomarker;
- *saggi di laboratorio*, dove specie sentinella sono esposte a contaminanti in condizioni controllate.

Gli approcci 1 e 2 sono generalmente utilizzati per le valutazioni ambientali, mentre l’approccio 3 è usato per indagare su specifiche relazioni di causa ed effetto.

I principali vantaggi dell’utilizzo di biomarkers sono legati al fatto che essi tengono in considerazione il destino ambientale, la biodisponibilità e le interazioni tra i contaminanti e la matrice biotica nell’ambiente, inoltre forniscono una stima integrata nel tempo e nello spazio dei livelli di contaminazione ambientale e mettono in relazione esposizione ed effetti nocivi dei contaminanti connettendo gli effetti biologici alle conseguenze ambientali (Wu et al., 2005).

Al contrario, i principali svantaggi riguardano la necessità di avere una approfondita conoscenza sulla storia vitale della specie scelta, la sua autoecologia e la sua fisiologia. Per di più non si possono applicare a tutti gli organismi, né a tutti i contaminanti e molte sono le risposte che possono essere dovute a fattori naturali (variazioni di temperatura, stato ormonale, età, sesso, stagione) o a fattori di stress per via delle attività di campionamento. Le risposte poi, possono essere influenzate da fenomeni di adattamento o di selezione della popolazione laddove peraltro la variabilità inter-individuale è spesso alta.

Per molti biomarker, la relazione tra risposte ed effetti reali è ancora sconosciuta e, inoltre, la loro applicazione è limitata dalla disponibilità di organismi e/o specie ed è sempre necessario confrontare le risposte dei siti indagati con siti di riferimento. Infine, è richiesta una notevole esperienza per l’applicazione e l’interpretazione delle risposte di un biomarker e mancano protocolli standardizzati e comunemente accettati anche perché la loro capacità discriminante può essere ridotta da numerose variabili ambientali (McDonald et al., 1997; Schlenk, 1999; Leonzio et al., 2003).

2.6.1 Le metallotioneine

Le metallotioneine (MT) sono metallo-proteine caratterizzate da una bassa massa molecolare (circa 6000-7000 Da nei Mammiferi), dalla presenza di un’elevata percentuale di residui di cisteina (uno su tre) e dalla completa assenza di amminoacidi aromatici nella sequenza primaria (Stillman, 1995).

La loro capacità di legare metalli quali Cu(I) e Zn(II) in uno o più domini raggruppati, rende queste proteine particolarmente interessanti: sono infatti utilizzate come biomarkers di elezione per lo studio della contaminazione da metalli pesanti, presenti anche in tracce ma capaci di scalzare chimicamente i metalli fisiologici di elezione, in particolare in ambiente acquatico. Inoltre, è stata

dimostrata la loro ampia diffusione: proteine di questo tipo sono state isolate e descritte in tutti e tre i Regni dei viventi, dimostrandosi ubiquitarie.

Dal punto di vista strutturale, tutte le MT sono caratterizzate dalla formazione di gruppi metallo- tiolati tramite i residui tiolati delle cisteine terminali e/o a ponte nella catena peptidica; la struttura terziaria di queste proteine si determina sulla base di come la catena peptidica si avvolge attorno a questi "cluster" (Dallinger, 1995). La struttura primaria di queste proteine è stata determinata solo in poche specie di Invertebrati e comunque è molto variabile. Studi condotti su *Mytilus edulis* hanno permesso di identificare due isoforme principali (approssimativamente di 10 e 20 KDa) chiamate MT-10 e MT-20; sono state anche purificate cinque forme dimeriche e quattro forme monomeriche delle quali è stata determinata la struttura amminoacidica completa, ma non è chiaro se queste varianti rappresentino isoforme o alloforme di MT-10 e MT-20 (Frazier et al., 1985; MacKay et al., 1993). Alcuni Autori hanno investigato la (potenziale) diversa espressione genica delle due isoforme MT-10 e MT-20 in *Mytilus edulis*. I livelli di MT-mRNA in animali non esposti ad inquinamento suggerisce che il livello basale di MT-10 sia più alto rispetto a MT-20 (in effetti non è stato rilevato alcun livello basale di MT-20) (Lemoine & Laulier, 2003). Sempre gli stessi Autori ipotizzano che vi siano due pool interattivi di MT e che MT-20 sia quello influenzato da cambiamenti transitori nella concentrazione di metallo nel citosol dovuta a fluttuazioni ambientali, mentre MT-10 sia coinvolto nei normali processi di regolazione dei metalli. Altri Autori hanno analizzato l'informazione genomica sulle MT in due specie della famiglia Mytilidae, raccolte in ambienti molto diversi (zona costiera e zona idrotermale), scoprendo che i Mytilidae hanno almeno 3 geni "small" o "intron-free" per le MT, che potrebbero permettere una rapida trascrizione in risposta all'esposizione a metalli (Leignel et al., 2005).

Pur essendo proteine ridondanti da un punto di vista genetico, la concentrazione di queste proteine può essere aumentata per induzione grazie a vari agenti (Dallinger, 1995):

- sali di metalli, in alcuni casi il metallo inducente si legherà alla proteina, in altri verrà sintetizzata la proteina contenente rame o zinco;
- crescita, stato riproduttivo, difesa, fattori di stress, effetti digiuno, solventi organici, steroidi, mostrano tutti proprietà inducenti nei confronti di MT contenenti zinco o rame in Mammiferi, Pesci, Crostacei, Piante.

La presenza di MT nell'organismo dipende anche dalla degradazione che avviene attraverso il sistema lisosomiale, e in effetti il ricambio di MT rappresenta un esempio di adattamento cellulare a condizioni fisiologiche ed ambientali alterate. Gli stimoli intrinseci ed estrinseci possono agire a diversi livelli del metabolismo delle MT. Il passaggio meglio studiato e compreso è quello legato al controllo trascrizionale di sintesi di MT-mRNA in organismi esposti a metalli pesanti: in studi condotti su varie specie di Molluschi Bivalvi, è stato dimostrato come a seguito di un aumento dei livelli intracellulari di metalli, ci sia una rapida attivazione della trascrizione di MT-mRNA, che porta alla sintesi di MT che a loro volta chelano gli ioni metallici in eccesso. Le MT giocano un'importante funzione di "salvataggio", come donatori di metalli essenziali a strutture prima compromesse dal legame con metalli tossici. Gli effetti tossici dei metalli pesanti sono dovuti al danneggiamento e/o alla riduzione delle normali funzioni biochimiche e fisiologiche che non sempre sono rilevabili. MT e MT-mRNA sono considerati validi indicatori di una prima esposizione a metalli pesanti (Roesijadi, 1996). Dai dati disponibili, può essere assunto inoltre che la contaminazione ambientale da Cd è associata all'induzione di MT (Howard & Nickless, 1975; Carpenè, 1993; Roesijadi, 1994; Bordin et al., 1997; Viarengo et al., 1997; Hamza-Chaffai et al., 1999; Lemoine & Laulier, 2003; Leignel et al., 2005; Leignel & Lauriel, 2006; Ladhar-Chaabouni et al., 2009).

Le MT sono state scoperte facendo studi sui metallo-enzimi contenenti zinco come cofattore enzimatico: lo zinco è infatti un componente di molte proteine funzionali e come tale è coinvolto in

quasi ogni aspetto del metabolismo. Esso è un componente di quasi 300 enzimi ed è essenziale per le loro funzioni, tra le quali troviamo la sintesi e la degradazione di tutti i maggiori metaboliti. Si pensa che almeno 200 proteine leganti il DNA contengano zinco, essenziale alla loro funzione: oltre all'azione catalitica e di espressione genica, lo zinco infatti stabilizza la struttura di proteine ed acidi nucleici, conserva l'integrità degli organelli subcellulari, partecipa ai processi di trasporto e gioca un ruolo importante anche nei fenomeni virali e immunologici e dunque ci possono essere conseguenze cliniche sia per la sua mancanza che per la sua presenza eccessiva all'interno della cellula (Stillman, 1995).

Studi condotti su pazienti umani affetti dalla malattia di Wilson, hanno messo in evidenza una correlazione tra la concentrazione nei tessuti (e dunque la tossicità) di metalli pesanti quali Cd(II), Cu (I), Hg(II), e la presenza di MT: ciò ha fatto ipotizzare che le MT giochino un ruolo fondamentale nella detossificazione e regolazione dell'omeostasi dei metalli (Stillman, 1995).

Tuttavia, il numero significativo di altri stimoli di induzione e la larga presenza di MT negli organismi viventi suggerisce che questo non sia l'unico o il principale ruolo fisiologico di queste proteine: in effetti, dal momento che esistono diverse isoforme di MT, è logico pensare che esse abbiano anche diverse funzioni biologiche (Stillman, 1995).

È vero, infatti, che le MT sono caratterizzate da una grande inducibilità in risposta ad elevate concentrazioni di metalli pesanti *in vivo*, ma anche ad una grande varietà di metaboliti quali glucorticoidi, glucagone, catecolamine, progesterone, estrogeni, etanolo, interferone, ormoni della crescita...

Si può perciò ipotizzare che le MT abbiano almeno due ruoli biologici principali (Dallinger, 1995):

- detossificazione da cadmio ed altri metalli pesanti.
- regolazione del metabolismo di rame e zinco; in particolare le MT agirebbero da riserva di zinco per apoenzimi "freschi" di sintesi.

In questo senso, alcuni Autori hanno suggerito che le MT servano a procurare metallo dove e quando serve nell'organismo, per qualsiasi ruolo: dunque le MT rappresenterebbero una fonte di stoccaggio e consegna per zinco ed altri metalli essenziali (Stillman, 1995).

Il ruolo detossificante attribuito a queste proteine per via della loro capacità di legare anche cadmio e mercurio secondo molti Autori non sarebbe la loro funzione primaria, ma piuttosto derivata secondariamente data la similarità tra cadmio e zinco: non bisogna dimenticare che il comportamento delle MT è determinato dalla chimica del gruppo tiolato. Inoltre, per certi organismi è stata dimostrata la nefrotossicità delle Cd-MT, ovvero in assenza di un'escrezione biliare o urinaria, le MT possono offrire una protezione solo a breve termine dall'intossicazione da metalli pesanti (Dallinger, 1995).

2.7 STRUMENTI DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER LA TRACCIABILITÀ DELLA FILIERA ALIMENTARE

Da almeno un decennio, la sicurezza dei prodotti alimentari, ed in particolare di quelli legati al settore ittico, è di prioritaria importanza per la Comunità Europea (norma CE n° 2065/2001) che prevede un'appropriata etichettatura e tracciabilità dei prodotti ittici. Risulta quindi fondamentale che tali prodotti vengano identificati ed esaminati in ogni fase della filiera, dalla raccolta sino al commercio ed alla vendita (Asaro, 2004). Le frodi alimentari, inoltre, risultano in aumento, causando diffidenza nei consumatori, sempre più attenti al consumo di prodotti sicuri e di buona qualità. Ciò è particolarmente vero soprattutto per quanto riguarda la molluschicoltura, per le ragioni sin qui ampiamente descritte.

Si rende quindi necessario lo sviluppo e la messa a punto di nuovi strumenti tecnologici nella produzione, nella lavorazione e nella distribuzione dei prodotti ittici al fine di certificarne l'origine e l'autenticità (Marko et al., 2004). Tra le diverse metodologie utili all'identificazione di prodotti ittici

ed alimentari, le tecniche di genetica molecolare riscontrano un notevole interesse ed un sempre maggior utilizzo (Lockely & Bardsley, 2000). Infatti, l'informazione contenuta nel codice genetico (DNA) è in grado di distinguere un individuo da un altro, può essere estrapolata da qualsiasi organismo, ed il risultato è altamente affidabile. Quindi, ciò permetterebbe, potenzialmente, di ottenere informazioni chiare sull'origine e l'identità di qualunque prodotto.

Le tecniche molecolari più recenti, basate sull'analisi del DNA quali AFLP, RFLP, microsatelliti, e DNA barcoding dei geni mitocondriali, possono avere un ampio *range* di applicazioni e fornire informazioni utili sulla qualità, tracciabilità, sicurezza e autenticità dei prodotti alimentari (Chiesa et al., 2009). I diversi marcatori vengono scelti in base al tipo di indagine richiesta (identificazione della specie o dell'area geografica), al numero di campioni da analizzare, al tipo di campione ed al suo stato di conservazione (Nonnis Marzano, 2005).

Tali tecniche di genetica molecolare sono basate sull'utilizzo della PCR o reazione a catena della polimerasi, *Polymerase Chain Reaction*, ideata da Kary Mullis nel 1983. Oggi è la tecnica di replicazione del DNA più utilizzata, di fondamentale importanza per la biologia molecolare moderna. La chimica della PCR dipende dalle caratteristiche peculiari di complementarità delle basi costituenti la molecola del DNA. Sequenze di DNA di varia lunghezza possono essere amplificate efficacemente in laboratorio utilizzando la reazione di PCR. Il DNA amplificato è costituito da copie multiple della sequenza del template, ottenuto ricostruendo in provetta le condizioni chimiche necessarie per realizzare una sintesi di DNA. La PCR è suddivisa in tre fasi fondamentali:

- Fase di **Denaturazione** delle molecole di DNA nella quale i due filamenti complementari che costituiscono l'acido desossiribonucleico, DNA si separano (*denaturano*) ad una temperatura maggiore di 90 °C (94-96 °C), in modo da formare singole catene di basi azotate (Adenina, Timina, Guanina e Citosina). A tale temperatura infatti si scindono i legami a idrogeno posti tra le coppie di basi che sono differentemente appaiate.
- Fase di **Annealing** o di Ibridazione. Il primer (o innesco) si unisce (ibrida) ad una regione complementare del DNA. La Temperatura di Annealing è compresa fra i 45-55 °C. Un primer oligonucleotidico è una breve sequenza di basi (circa 15-30 basi) che in particolari condizioni ibrida una regione bersaglio del DNA a singolo filamento.
- Fase di **Polimerizzazione**. La sintesi della nuova catena procede dall'estremità 3' libero del primer, attraverso l'attività di specifiche DNA polimerasi termoresistenti in grado di sintetizzare il filamento del DNA ad una temperatura di 72 °C.

A partire da tale metodologia, sono stati sviluppati numerosi marcatori molecolari del DNA utili allo studio della genetica animale. I primi studi basati sulla tecnica della PCR, furono indirizzati all'analisi dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP). Si tratta di un tipo di variazione genetica che influenza la lunghezza dei frammenti di DNA prodotti quando la sequenza considerata viene digerita con enzimi di restrizione. La tecnica degli RFLP è semplice e poco costosa, e permette di caratterizzare specie, sottospecie e popolazioni diverse, identificati da singoli polimorfismi puntiformi (SNP- *Single Nucleotide Polymorphisms*) (Patarnello et al., 1994; Lucentini et al., 2007; Nonnis Marzano et al., 2003). Tuttavia, è una tecnica non particolarmente informativa poiché limitata a pochi frammenti di restrizione.

Gli AFLP o polimorfismi dei frammenti di restrizione amplificati, sono marcatori genomici altamente polimorfici, nei quali la tecnica di restrizione del DNA viene applicata sull'intero genoma cellulare. Tali marcatori sono stati utilizzati con successo per l'analisi e lo studio del genoma animale (Chiesa et al., 2011a; Fortes et al., 2008; Lucentini et al., 2011; Papa et al., 2003; Papa et al., 2005, Razzoli et al., 2003) e per identificare le specie ittiche di interesse commerciale (Maldini et al., 2006). In particolare, è stato sviluppato un database contenente i profili genetici delle principali specie di molluschi, pesci e crostacei con lo scopo di identificare la specie di origine dei prodotti commercializzati (Maldini et al., 2006).

All'interno di questo vasto panorama, si collocano i marcatori microsatelliti (SSR- *Simple Sequence Repeats*), particolari regioni genomiche, di lunghezza variabile, costituite da una specifica sequenza, altamente ripetuta. Tali regioni hanno un tasso di mutazione (inserzione/delezione del motivo ripetuto) molto più elevato rispetto al normale, e sono quindi caratterizzate da polimorfismo genetico elevato. Tali marcatori vengono utilizzati preferenzialmente negli studi di genetica di popolazioni animali e vegetali (Sønstebo et al., 2008; Karhu et al., 2006) poiché particolarmente informativi a livello intraspecifico. Infine, negli ultimi anni è stata proposta come metodologia di elezione nelle indagini di tassonomia forense (Dawnay et al., 2007) la tecnica cosiddetta del "DNA barcoding" o "codice a barre della vita". In generale, essa si basa sulla designazione di un frammento di DNA mitocondriale, il gene citocromo c ossidasi I (*COI*), citocromo b (*Cyt b*), 16S rDNA, che agisce come un "codice a barre" per identificare e classificare tutta la vita animale. Il DNA mitocondriale presenta diversi vantaggi quali l'evoluzione rapida rispetto al DNA nucleare, le piccole dimensioni, la presenza di numerose copie nella cellula animale, e l'assenza di grandi segmenti non codificanti (introni). Inoltre, il DNA mitocondriale mostra notevoli variazioni inter- e intra-specifiche nella sequenza dei nucleotidi, anche se l'entità della variazione nell'ambito di una specie è minore di quella tra specie diverse, il che rende l'analisi di sequenza di questo genoma idoneo per l'identificazione di differenti organismi (Mackie et al., 1999).

Il DNA barcoding è stato usato con successo per identificare gruppi specifici di Pesci o Crostacei di interesse conservazionistico e commerciale (Scalici et al., 2009; Nonnis Marzano et al., 2009) come il tonno (Terol et al., 2002), i pesci piatti (Espineira et al., 2008) le acciughe (Jérôme et al., 2008) e gli Elasmobranchi (Barbuto et al., 2010).

Di recente un'indagine condotta attraverso DNA barcoding su una grande varietà di prodotti ittici sfilettati scambiati sui mercati commerciali italiani, ha dimostrato un'elevata percentuale (32%) di frodi relative alla specie dichiarata in etichetta (Filonzi et al., 2010), sia dal punto di vista economico che nutrizionale.

Tuttavia, è importante rilevare che fra tutte le metodologie esistenti e informative per quanto riguarda la tracciabilità di specie e prodotti alimentari, le applicazioni ad oggi praticate, quasi tutte sono ad uso esclusivamente sperimentale, mentre a livello commerciale il loro utilizzo rimane marginale, con conseguente assenza di controlli capillari a tutela del consumatore (Nonnis Marzano, 2005).

In questa tesi, nell'ambito di un approccio integrato per la gestione della risorsa alieutica e la messa a punto di uno specifico percorso di tracciabilità della filiera della vongola verace filippina nell'Alto Adriatico, verranno integrati i risultati di quella che è stata la prima indagine di genetica molecolare condotta su popolazioni di *R. philippinarum* provenienti da aree produttive europee (Chiesa et al., 2011; Chiesa et al., 2012 a,b; Baccarani, 2012). Uno dei principali obiettivi di questa ricerca ha infatti previsto l'utilizzo di marcatori molecolari altamente polimorfici già individuati in letteratura (Chiesa et al., 2011; Chiesa et al., 2012 a,b; Baccarani, 2012), in grado di valutare eventuali differenze intraspecifiche tra le due popolazioni di *R. philippinarum* della laguna di Marano, confrontante con le popolazioni già analizzate in precedenza appartenenti alla Laguna di Venezia e al delta del Po, oltre che ad un'altra area produttiva europea (Galizia, Spagna). L'individuazione e la determinazione di questi marcatori ha consentito di valutare i livelli di variabilità genetica presenti nelle vongole allevate nella Laguna di Marano, e le eventuali differenze a livello popolazionistico rispetto ad altre aree produttive.

Di per sé, la variabilità genetica dipende da vari fattori, quali la distanza geografica tra le popolazioni, i livelli di flusso genico e da fenomeni casuali quali isolamento riproduttivo e deriva genica. Inoltre, il reclutamento non naturale e la semina di novellame legato alle attività di acquacoltura possono influenzare notevolmente la struttura genetica delle diverse popolazioni, con conseguente alterazione delle differenze biogeografiche: la materia prima (novellame) deve quindi possedere costantemente ed inequivocabilmente le stesse caratteristiche genetiche del prodotto finale per assicurarne la completa tracciabilità, e tali caratteristiche non devono essere modificate

utilizzando materiale da semina differente nei vari cicli produttivi. L'eventuale identificazione di differenze a livello geografico permetterebbe il riconoscimento dei diversi stock di allevamento e consentirebbe di identificare l'area di provenienza delle vongole.

Per raggiungere tale obiettivo, si è scelto di adottare un approccio molecolare integrato (che utilizza cioè marcatori differenti) potenzialmente più utile per analizzare nel dettaglio le relazioni complesse tra specie/sottospecie e popolazioni, rispetto alla più tradizionale analisi di un singolo *locus* genico (Galtier et al., 2009). Ricostruire la storia di una popolazione o di una specie a partire da un singolo *locus* può portare ad interpretazioni fuorvianti ed incomplete (Freeland, 2005).

Nel presente studio, è stata quindi effettuata un'analisi di genetica di popolazione attraverso l'analisi di DNA nucleare e mitocondriale, combinando l'utilità del sequenziamento del gene mitocondriale *16S rDNA*, già utilizzato con successo per i molluschi Bivalvi (Canapa et al., 2003; Kappner & Bieler, 2006; Mikkelsen et al., 2006) con l'analisi di loci microsatelliti altamente polimorfici, efficaci per valutare la diversità genetica dei Bivalvi (Sobolewska et al., 2001; Presa et al., 2002; Astanei et al., 2005; Sobolewska & Beaumont, 2005; Li et al., 2006; Yasuda et al., 2007; Gosling et al., 2008; An et al., 2009).

La corretta identificazione dei profili genetici degli stock allevati in base alla loro distribuzione geografica, ottenuti attraverso analisi del DNA mitocondriale e nucleare, è fondamentale per la messa a punto del cosiddetto "passaporto molecolare", che coniugato alle informazioni relative alla qualità ambientale dei siti di allevamento, dovrebbe costituire la base per il riconoscimento del prodotto locale, la certificazione della qualità e dell'autenticità del prodotto, la prevenzione delle frodi, la tracciabilità e rintracciabilità dei prodotti alimentari.

3. MATERIALI E METODI

3.1 DISEGNO SPERIMENTALE

Il piano di campionamento è stato progettato sulla base delle informazioni reperite sulle condizioni ambientali del sito: sono state prese in considerazione le condizioni di accrescimento degli organismi, le condizioni meteo-climatiche relative alla laguna di Marano (Zentilin, com. pers.) e anche la documentazione scientifica reperita che illustra, per numerosi siti di campionamento della zona, dati ambientali storici dettagliati (Covelli et al., 2011).

Le operazioni di campionamento dei sedimenti sono state effettuate il 7 maggio 2012 grazie alla collaborazione del dott. Aurelio Zentilin (Cooperativa pescatori *ALMAR* Marano Lagunare) mediante un'imbarcazione a motore, un campionatore a tubo a pressione manuale (carotatore) in plexiglass artigianale e un set di contenitori in HDPE per lo stoccaggio e la conservazione dei campioni.

Le stazioni campionate si trovano entrambe nella zona occidentale della laguna di Marano e sono già state oggetto di una campagna di campionamento precedente (Covelli et al., 2011) all'interno della quale sono state denominate **M1** e **M2** (che corrispondono relativamente alle stazioni **15 Udine Tapo** e **16 Udine Acque**, denominazioni usate nel presente lavoro, v. Tabella 3.1).

3.1 laguna di Marano con contrassegnati i siti di campionamento

16 UDINE ACQUE (M2)	COORDINATE GPS
Orto in uso da più di quattro anni, pezzatura vongole: maggiore di 15 grammi, il sito dispone di dati pregressi a nome M2 (progetto MIRACLE, Covelli et al. 2011)	<i>N 045° 42,508'</i>
	<i>E 013° 06,363'</i>
	N 45° 42' 30" E 13° 06' 21"
	N 45.708467 E 13.10605

15 UDINE TAPO	COORDINATE GPS
Orto in uso da 3 anni, pezzatura delle vongole è di circa 8 grammi. Il sito dispone di dati pregressi a nome M1 (progetto MIRACLE, Covelli et al. 2011)	<i>N 045° 42,343'</i>
	<i>E 013° 08,032'</i>
	N 45° 42' 20" E 13° 08' 01"
	N 45.705717 E 13.133867

Tabella 3.1 indicazioni specifiche sui due siti di campionamento: informazioni date dalla cooperativa ALMAR e coordinate GPS convertite nelle tre scale possibili

Le operazioni di prelievo del sedimento (come pure dei campioni di organismi) sono state svolte a motore spento, per evitare eventi di risospensione e soprattutto ridurre al minimo il rischio di contaminazione dei sedimenti (e delle acque interstiziali) causato dai fumi di scarico derivanti dalla combustione del carburante. In più, i prelievi di sedimento sono stati tutti effettuati mantenendo l'imbarcazione controcorrente, di modo che gli strascichi di carburante non potessero, verosimilmente, generare una contaminazione secondaria.

Gli strumenti scelti e utilizzati per tutte le operazioni di campionamento sono costituiti da materiale plastico e pertanto, non sono fonte di contaminazione per quanto riguarda gli analiti sui quali è concentrato lo studio.

Sono stati raccolti **tre campioni** di sedimento superficiale (primi 10-12 cm) per ciascun sito oggetto di studio (per un totale di sei campioni) e ciascun campione è il frutto della omogenizzazione *in situ* di tre differenti carote di sedimento prelevate in punti vicini a barca ferma per un totale di 500 ml di volume per campione. I campioni sono stati posti in contenitori in HDPE e conservati a -20°C per preservarne le caratteristiche fisico-chimiche in attesa delle successive analisi chimiche e granulometriche. Durante le operazioni di campionamento sono state annotate tutte le informazioni interessanti e potenzialmente necessarie alla successiva valutazione dei dati, come ad esempio il colore del sedimento, o la presenza di esemplari di altri organismi come policheti o altri molluschi.

Per quanto riguarda i campioni di organismi, questi sono stati prelevati in due momenti diversi: i campioni in seguito sottoposti a depurazione controllata in impianto industriale sono stati prelevati circa 70 ore prima dei non spurgati che invece sono stati raccolti poche ore prima rispetto ai sedimenti. I risultati delle analisi sui campioni spurgati e non spurgati sono stati utilizzati per valutare gli effetti dello spurgo sul contenuto di metalli nei tessuti dell'organismo. Lo spurgo è stato condotto per 69 ore per i campioni del sito 16 Udine acque e per 68 ore per il sito 15 Udine Tapo.

Da tali campioni sono stati creati tre stock di organismi spurgati e tre stock di organismi non spurgati per ciascun sito: uno stock di entrambi i tipi di organismi è stato utilizzato per le analisi delle metallotioneine (congelato a -20°C per preservare l'integrità delle proteine), un'altro stock di entrambi gli organismi è stato destinato alle analisi di bioaccumulo (congelato a -20°C per evitare l'alterazione dei tessuti) e infine, uno di soli organismi spurgati destinato alle analisi genetiche (conservato in **etanolo assoluto** a -20°C per prevenire la degradazione del DNA).

Al fine di ottenere un prodotto che fosse il più possibile simile a quello immesso sul mercato ittico, lo spurgo è stato ottenuto sottoponendo una parte dei campioni di vongola a depurazione controllata in apposito impianto industriale (IT 551 CDM di Almar Soc. coop agricola s.r.l.) utilizzando un protocollo di depurazione certificato.

Tale protocollo, prevede il trattamento delle vongole in apposite vasche (*bins*) con acqua filtrata e sterilizzata in celle di depurazione per un tempo congruo all'abbattimento della carica batterica (i test di depurazione sono fatti su *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*).

3.2 MATERIALI E REAGENTI

Nella preparazione dei campioni per l'analisi degli elementi in tracce e per tutte le operazioni routinarie di laboratorio (lavaggi, diluizioni) e dove non altrimenti specificato è stata utilizzata "acqua Milli-Q", acqua deionizzata col sistema Milli-Ro/Milli-Q (Millipore, Milano, Italia).

Tutte le soluzioni estraenti adoperate sono state preparate utilizzando reagenti di grado analitico della ditta Titolchimica disciolti in H₂O Milli-Q e reagenti del tipo Suprapur della ditta Romil.

I contenitori utilizzati per lo stoccaggio, la conservazione e l'estrazione dei campioni e delle soluzioni, sono in vetro Pyrex, polietilene e teflon e prima dell'uso sono stati preventivamente trattati secondo una procedura già descritta in letteratura (Batley & Gardner, 1977). Il protocollo prevede l'immersione dei contenitori in una soluzione di HNO₃ 0.1M per 48 ore, il loro lavaggio con H₂O Milli-Q, e la loro conservazione in sacchetti di plastica fino al momento dell'uso.

Per i prelievi di aliquote di soluzioni sono state utilizzate pipette in vetro; nel caso di volumi ridotti sono state utilizzate micro pipette Gilson (20-200 ul) e HT (10-100 ul e 100-1000 ul).

Le soluzioni standard utilizzate per la determinazione dei metalli pesanti in spettroscopia di assorbimento atomico (AAS) sono state preparate da soluzioni madre di standard ionici di concentrazione 1000 mg/l della ditta Merck; le soluzioni standard utilizzate per la determinazione multielementare mediante ICP-MS sono state preparate da soluzioni madre di standard multielementari di concentrazione 1000 mg/l fornite dalla Perkin-Elmer e dalla Romil.

Tutti gli standard e le soluzioni diluite contenenti i metalli estratti sono stati preparati in HNO₃ 0.1M, per mantenere un ambiente acido ed evitare la precipitazione dei metalli disciolti.

Per la preparazione del modificatore di matrice, usato per migliorare la determinazione di Pb e Cd con il fornello di grafite, sono stati utilizzati Mg(NO₃)₂ 6H₂O allo 0.2%.

Le misure di pH sono state eseguite con pHmetro digitale della Orion Research MOD 501.

3.2.1 Estrazione di metalli e metalloidi da campioni di sedimento e organismi mediante digestore a microonde

Per l'estrazione totale di metalli contenuti nei sedimenti e nelle matrici biologiche è stato utilizzato un digestore a microonde (Argese et al., 2005). Il digestore utilizzato è il modello MDS-2000 (CEM), che è munito di sistemi di controllo e monitoraggio continuo di temperatura e pressione (programmabili fino ad un massimo di 200°C per la temperatura e 200 psi per la pressione) e consente la regolazione della potenza erogata secondo valori percentuali (fino ad una potenza massima di 630 W) e l'esecuzione dei programmi impostati in più *steps*, fino ad un massimo di cinque.

Le microonde sono radiazioni non ionizzanti che causano migrazione di ioni e rotazioni di dipoli senza però cambiare la struttura molecolare (Kingston & Jessie, 1988). Il riscaldamento provocato dalle microonde è dovuto all'assorbimento diretto dell'energia da parte del campione.

I meccanismi di trasmissione dell'energia a microonde sono:

- Conduzione ionica: è data dalla migrazione degli ioni attraverso il campo elettromagnetico applicato; tutti gli ioni in soluzione contribuiscono al processo di conduzione, ma la frazione di corrente trasportata da ogni specie dipende dalla propria mobilità e concentrazione nel mezzo.
- Rotazione di dipolo: consiste nell'allineamento, indotto dal campo elettrico, di molecole che possiedono momenti di dipolo indotti o permanenti; quando l'intensità del campo diminuisce, si ripristina il disordine indotto termicamente.

Il contributo di questi due meccanismi di riscaldamento dipende dalla mobilità e dalla concentrazione degli ioni del campione e nelle applicazioni pratiche del riscaldamento a microonde i due meccanismi hanno generalmente luogo contemporaneamente. Inoltre, il riscaldamento a microonde, contrariamente a quello per conduzione, interessa simultaneamente tutta la soluzione, ma non il contenitore che viene costruito in materiale trasparente alle microonde. Di seguito sono riportati i vantaggi che l'utilizzo del digestore consente:

- Riduzione dei tempi di digestione.
- Raggiungimento di temperature e pressioni più elevate, evitando nel contempo perdite per evaporazione e riducendo la probabilità di contaminazioni dall'esterno in quanto si usano contenitori chiusi.
- Controllo più preciso dei parametri di reazione, quali temperatura e pressione, che possono essere monitorati in continuo durante lo svolgimento della reazione; ciò migliora sensibilmente la riproducibilità delle procedure.
- Raggiungimento dei parametri prefissati in tempi minori rispetto ai metodi classici.
- Possibilità di trattare fino a dodici campioni contemporaneamente.

- Trattamento dei campioni in maggior sicurezza poiché si utilizzano contenitori ermeticamente chiusi.

Le digestioni vengono eseguite ponendo il campione in speciali contenitori in teflon, rappresentati schematicamente nella figura 3.2.

3.2.2 Digestione materiali certificati

Come materiali certificati di riferimento sono stati utilizzati (NRCC)-DORM-2 (muscolo di pesceccane liofilizzato) della National Research Council of Canada, MESS-3 (sedimento marino liofilizzato) anch'esso di proprietà della della National Research Council of Canada PACS-2 (sedimento marino liofilizzato) e (NIST)-SRM 2976 (mitili liofilizzati) della National Institute of Standards and Technology.

3.3 ANALISI SUI SEDIMENTI

Allo scopo di investigare in maniera approfondita lo stato di qualità ambientale dei sedimenti nelle aree di coltivazione della vongola verace filippina in Laguna di Marano, la mineralizzazione completa e l'utilizzo della speciazione geochimica si rivelano due strumenti fondamentali per comprendere quali e quanti metalli e metalloidi siano presenti e se siano o meno biodisponibili.

3.3.1 Analisi granulometrica

Le indagini granulometriche sono state condotte utilizzando una aliquota di sedimento precedentemente liofilizzato e polverizzato con mortaio di ciascun campione dal peso noto che è stato sottoposto a successive setacciature a umido utilizzando setacci con maglia a 63 μm prima e a 1 mm poi per determinare la frazione fine (argilloso-limosa, inferiore a 63 μm) e distinguerla da quella sabbiosa (maggiore di 63 μm). Il campione di sedimento, dopo essere stato setacciato in presenza di un flusso d'acqua, è stato essiccato in stufa a 110°C prima di essere sottoposto a pesatura e successiva setacciatura a umido (Sfriso et al., 2005; Sfriso et al., 2003).

Le informazioni ricavate dall'analisi granulometrica sono necessarie soprattutto per l'importanza che la componente argillosa riveste nel condizionare importanti variabili ambientali legate ai contaminanti e alla sopravvivenza stessa degli organismi target.

Infatti, la componente fine influenza lo stato di aerazione/ossigenazione dei sedimenti: il peso percentuale di questa frazione è una variabile determinante per la presenza stessa di metalli e metalloidi in un particolare stato di ossidazione (e biodisponibilità) in certe condizioni di pH e potenziale redox, viste le particolari interazioni chimiche (es. fenomeno dell'adsorbimento) che tale frazione granulometrica è in grado di stabilire con questi elementi chimici (Eggleton & Thomas, 2004).

Inoltre, la massiccia presenza della componente fine nei siti di coltivazione della vongola verace filippina può ridurre la massima densità di semina raggiungibile per gli organismi, poiché diventa molto serio il rischio dell'instaurarsi di condizioni anossiche che possono impedire la sopravvivenza degli organismi. Tuttavia, la vongola verace filippina è una specie fortemente euriecia (è nel novero delle 10 specie invasive più diffuse al mondo), quindi anche a fronte di una distribuzione granulometrica piuttosto distante dall'optimum, non si riscontra una così significativa compromissione della sua sopravvivenza.

3.3.2 Contenuto totale di metalli e metalloidi

Le analisi chimiche condotte sui sedimenti sono state focalizzate sull'inquinamento inorganico da metalli. In particolare, l'analisi ha riguardato 9 elementi: 8 metalli pesanti (Cr, Ni, Cu, Cd, Pb, Fe, Zn, Hg) e un metalloide (As).

Le carote di sedimento sono state prelevate nei siti di interesse a Maggio 2012 e sono state successivamente congelate, liofilizzate e omogeneizzate per poter procedere alla digestione acida in microonde.

A tale scopo, sono stati pesati circa 0.1 g di campione di sedimento liofilizzato ed omogeneizzato e si è seguito il protocollo che ha previsto:

1. Aggiunta di 5 ml di acqua Milli-Q;
2. Aggiunta di 3 ml di acqua regia (costituita da HNO_3 e HCl in rapporto 1:3);
3. Aggiunta di 1.5 ml di HF (48%) allo scopo di sciogliere i silicati;
4. Prima digestione in microonde per circa 1 h a $T_{\text{max}}=180^\circ\text{C}$, $P_{\text{max}}=140$ psi e potenza pari al 100%;
5. Aggiunta di 7 ml di una soluzione satura di H_3BO_3 allo scopo di neutralizzare l'acido fluoridrico che non ha reagito;
6. Secondo ciclo di digestione in microonde, alle stesse condizioni del precedente.

La soluzione finale (limpida e senza residui) è stata filtrata con filtri di acetato di cellulosa di diametro $0.45\ \mu\text{m}$ e portata a volume noto (50 ml) Le soluzioni così ottenute sono state conservate a 4°C in contenitori di polietilene siglati fino al momento dell'analisi effettuata in spettroscopia di assorbimento atomico (AAS) o ICP-MS. Per la determinazione dell'As si è reso necessario condurre una diversa digestione acida, dal momento che la procedura standard che prevede l'utilizzo di acqua regia, HF e H_3BO_3 altera la concentrazione di As (H_3BO_3 contiene tracce di As) e può interferire con la riduzione di As^{5+} ad As^{3+} . Tale digestione prevede:

1. prelievo di un'aliquota di 0.15 g di sedimento liofilizzato e omogenato;
2. aggiunta di 4 ml di H_2O Milli-Q;
3. aggiunta di 2 ml di H_2SO_4 (98%);
4. aggiunta di 2 ml di H_2O_2 ;
5. digestione in microonde in 2 step successivi:
 - 5 minuti a $P_{\text{max}}=120$ psi e $T_{\text{max}}=120^\circ\text{C}$ con potenza pari al 50%;
 - 30 minuti a $P_{\text{max}}=140$ psi e $T_{\text{max}}=170^\circ\text{C}$ con potenza pari al 100%;
6. Centrifugazione, prelievo del surnatante e filtrazione a $0,45\ \mu\text{m}$ con lavaggio del filtro con acqua Milli-Q;
7. raggiungimento del volume finale di 25 ml.

La quantificazione di As e Hg nel sedimento è stata effettuata mediante tecnica VGA-77. L'As viene quantificato sotto forma di arsina AsH_3 , quindi prima di procedere all'analisi è necessario ridurre il campione ottenuto dalla digestione. La riduzione consiste di due steps successivi:

1. preriduzione di As(V) a As(III) mediante aggiunta alla soluzione digerita e acidificata con HCl 1M, di KI all'1% e acido ascorbico 0.5%;
2. successiva riduzione di As(III) ad AsH_3 in un separatore gas-liquido applicato allo strumento di misura nel quale vengono direttamente mescolate la soluzione di As(III)/ HCl 1M, la soluzione riducente NaBH_4 0.6%/NaOH e la soluzione acida HCl 6M. Nella miscela risultante viene

gorgogliato un flusso di Ar che strappa l'AsH₃ formatosi nella cella di quarzo posta lungo il cammino ottico dello strumento, dove l'As viene analizzato e quantificato.

Per l'analisi di Hg, elemento volatile, è stata utilizzata la tecnica a vapori freddi. La soluzione ottenuta dalla digestione acida del campione contenente Hg²⁺ e una soluzione contenente SnCl₂ (25% w/v) in HCl (20% v/v) vengono convogliate in una serpentina mediante pompa peristaltica, dove Hg²⁺ viene ridotto a mercurio metallico. La miscela ottenuta viene inviata in un separatore liquido-vapore dove viene gorgogliato un flusso di Ar che strappa i vapori di Hg nella cella di quarzo posta lungo il cammino ottico dello strumento dove l'elemento viene analizzato e quantificato.

I valori di concentrazione dei metalli letti dagli strumenti sono stati rapportati al peso di sedimento secco e al volume di soluzione utilizzati nella digestione; la concentrazione finale è stata espressa in mg/kg o µg/kg di sedimento.

3.3.3 La speciazione geochimica

La procedura di estrazioni sequenziali utilizzata per la speciazione geochimica è costituita da sei steps generali, ed è illustrata in figura 3.3.

Va sottolineato che si tratta di una procedura estremamente complessa e costosa (sei estrazioni sequenziali con reagenti diversi per ogni replica di ogni campione) che inevitabilmente comporta un certo grado di imprecisione e irriproducibilità nei risultati.

Tale procedura è basata su quella proposta da Tessier nel 1979 (Tessier et al., 1979), modificata ed ottimizzata al fine di renderla più precisa e selettiva.

L'estrazione della prima fase viene eseguita su un'aliquota di circa 1.4 g di sedimento liofilizzato, setacciato a 2 mm ed omogeneizzato in polvere fine. Ciascuna estrazione successiva viene eseguita sul residuo della precedente.

Al termine di ogni estrazione, il surnatante viene separato mediante centrifugazione e filtrazione. Il residuo viene lavato prima con la stessa soluzione estraente, quindi più volte con acqua deionizzata Milli-Q, e separato dal surnatante dopo ogni lavaggio. I surnatanti vengono riuniti in un'unica soluzione, acidificati quando necessario e portati a volume. Le soluzioni così ottenute vengono conservate a 4 °C in contenitori di polietilene fino al momento dell'analisi.

Le analisi sono state effettuate in triplicato per ogni campione prelevato, mediante spettroscopia ad assorbimento atomico con lo strumento Spectra 250 Plus Varian, sia nella configurazione con bruciatore ad aria/acetilene, che nella configurazione con fornello di grafite.

La 1° fase (*frazione scambiabile*) comprende i metalli adsorbiti sul suolo fisicamente o mediante processi di scambio cationico. La soluzione estraente utilizzata è CH₃COONH₄ 1 M a pH=7. Il campione viene trattato con 20 ml di tale soluzione, agitato per 2 ore e quindi trattato come sopra descritto.

La 2° fase (*frazione legata a carbonati*) comprende i metalli associati ai carbonati più labili nel suolo, e la sua stabilità è funzione del pH. La soluzione estraente è CH₃COONH₄ 1 M a pH~4.8. Il residuo proveniente dalla prima estrazione viene trattato con 30 ml di soluzione, agitato per 6 ore e trattato come sopra descritto.

L'estrazione della 3° fase (*frazione legata a ossidi/idrossidi di Fe e Mn*) è stata suddivisa in due step, utilizzando soluzioni estraenti con potere riducente crescente.

A. *Frazione più labile*: la soluzione estraente è NH₂OH•HCl 0.04 M in CH₃COOH al 25% e consente di solubilizzare principalmente gli ossidi di manganese, più facilmente riducibili. Un'aliquota di

campione di circa 1.4 g viene trattato con 30 ml di questa soluzione in digestore a microonde per 30 min a $T_{\max}=100^{\circ}\text{C}$, $P_{\max}=50$ psi e potenza del digestore pari al 100%. L'estratto è poi trattato come descritto in precedenza.

B. *Frazione mediamente labile*: il residuo viene trattato con 50 ml di una soluzione di acido ossalico 0.2 M a pH 3, in grado di solubilizzare gli ossidi di ferro amorfi o con basso grado di cristallinità. L'estrazione viene condotta in digestore a microonde per 3 ore a $T_{\max}=100^{\circ}\text{C}$, $P_{\max}=50$ psi e potenza del digestore pari al 100%, quindi il campione viene trattato come descritto sopra.

La 4° Fase rappresenta la *frazione legata a solfuri e materia organica*; anche la stabilità di questa fase è legata alle condizioni ossidoriduttive: in condizioni ossidanti, infatti la materia organica può essere degradata ed i solfuri ossidati, rilasciando così i metalli. La soluzione estraente è costituita da H_2O_2 al 6% a pH=8. Il residuo proveniente dalla terza estrazione è trattato con 15 ml della soluzione in digestore a microonde secondo un programma in tre *step*:

- a) 10 min a $T_{\max}=40^{\circ}\text{C}$, $P_{\max}=30$ psi, potenza 40%
- b) 10 min a $T_{\max}=60^{\circ}\text{C}$, $P_{\max}=30$ psi, potenza 40%
- c) 60 min a $T_{\max}=80^{\circ}\text{C}$, $P_{\max}=50$ psi, potenza 40%

Al termine vengono aggiunti 15 ml di H_2O_2 al 6% a pH=2 e viene effettuata una seconda digestione secondo il seguente programma:

- a) 10 min a $T_{\max}=40^{\circ}\text{C}$, $P_{\max}=30$ psi, potenza 40%
- b) 10 min a $T_{\max}=60^{\circ}\text{C}$, $P_{\max}=30$ psi, potenza 40%
- c) 30 min a $T_{\max}=80^{\circ}\text{C}$, $P_{\max}=50$ psi, potenza 40%

Al termine della digestione vengono aggiunti 10 ml di $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 3.2 M in HNO_3 al 69% diluito 1:5, si pone in agitazione per 15 min, e quindi si tratta come descritto in precedenza.

La 5° Fase (*frazione residuale*), comprende i metalli inclusi nella struttura reticolare dei minerali presenti nel sedimento, che non vengono rilasciati in condizioni normali. La soluzione estraente è composta da acqua regia (HCl e HNO_3 in rapporto 3:1) e HF. Il residuo proveniente dalla quarta estrazione viene seccato; l'estrazione è condotta su un'aliquota di 0.1 g, che viene trattata con 9 ml di acqua regia e 4.5 ml di acido fluoridrico in digestore a microonde per 1h a $T_{\max}=180^{\circ}\text{C}$, $P_{\max}=140$ psi e potenza pari al 100%. Al termine di questa digestione vengono aggiunti 5 ml di una soluzione satura di H_3BO_3 , allo scopo di neutralizzare l'acido fluoridrico non reagito. Viene quindi eseguito un altro ciclo di 1 h, alle stesse condizioni del precedente. Infine la soluzione ottenuta viene portata direttamente a volume, essendo generalmente il campione completamente solubilizzato.

Nel caso dell'As, dovendo leggere i campioni all'AAS, per questa fase è necessario procedere ad una digestione utilizzando H_2SO_4 e H_2O_2 , in maniera analoga a quanto effettuato per la lettura delle concentrazioni totali.

3.4 ANALISI SUGLI ORGANISMI

3.4.1 Contenuto totale di metalli

Per effettuare la mineralizzazione completa dei campioni di *Ruditapes philippinarum*, è stata utilizzata la procedura messa a punto nel laboratorio di riferimento e presente in Baccarani 2012.

I metalli analizzati e le stazioni sono le stesse sulle quali si sono condotte le analisi sui sedimenti.

In questo caso, sono state analizzate 3 repliche per ogni stazione, e ogni replica è stata ottenuta da un pool di 6 organismi sia di organismi spurgati che non spurgati per quanto riguarda il sito 16 Udine acque e di 10 organismi sia di organismi spurgati che non spurgati per il sito 15 Udine Tapo tutti pretrattati mediante congelamento a -20°C, distinguendo tra un pool che ha subito scarnificazione, liofilizzazione e omogenizzazione manuale di tutti tessuti molli (*soft tissue*, ST), e un pool che ha subito scarnificazione e successiva dissezione della ghiandola digestiva (epatopancreas, EP) separata dal resto dei tessuti (ST-EP) mediante bisturi che, una volta separati hanno subito liofilizzazione e omogenizzazione manuale.

Si sono ottenute così 3 repliche per i pool di ST, ST-EP, EP di organismi spurgati e non spurgati per entrambi i siti per un totale di 18 campioni.

Per la determinazione del contenuto di metalli totali, è stata utilizzata la metodica di estrazione acida e digestione in microonde. In questo caso, tale metodica prevede le seguenti fasi, a partire da un'aliquota di campione liofilizzato ed omogenizzato:

- prelievo di 0.15-0.25 g di campione;
- aggiunta di 4 ml di acqua Milli-Q;
- aggiunta di 8 ml di HNO₃ concentrato (75%, 15,5 M);
- aggiunta di 4 ml di H₂O₂ al 30%;
- digestione in microonde per circa 40 min a T_{max}=170 °C e P_{max}=160 psi e potenza pari al 90%;
- portato a volume (50 ml) con acqua Milli-Q

I campioni così ottenuti, dopo un filtraggio con una membrana di acetato di cellulosa a maglie di diametro di 0.45 µm, sono stati analizzati mediante spettrometria di massa con sorgente al plasma di Argon accoppiato induttivamente (ICP-MS).

I valori di concentrazione restituiti dallo strumento sono stati rapportati al peso secco del substrato organico e al volume di soluzione utilizzato nella digestione e la concentrazione finale è stata espressa in mg/kg; sono stati calcolati i valori medi e le deviazioni standard per ogni stazione.

3.4.2 Quantificazione di METALLOTIONEINE (MT).

Per la determinazione delle metallotioneine, è stato utilizzato un protocollo messo a punto nel laboratorio di ricerca che ha ospitato il progetto (Manente, 2001). La metodologia utilizzata nel presente studio è basata sulla valutazione, attraverso una determinazione spettrofotometrica, del contenuto di gruppi sulfidrilici (-SH) presenti in queste proteine. Il metodo consiste di una serie di centrifugazioni successive e nella precipitazione (utilizzando etanolo e cloroformio) della componente citosolica del tessuto, al fine di ottenere una frazione di MT parzialmente purificata. La concentrazione delle MT nel campione viene poi quantificata attraverso la valutazione del contenuto di gruppi -SH mediante misura spettrofotometrica utilizzando il reattivo di Ellman (o DTNB: acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico). È noto, infatti, che le MT sono caratterizzate da un contenuto di cisteine estremamente elevato rispetto ad altre proteine eventualmente presenti nell'estratto, e quindi la determinazione basata sul rilevamento dei gruppi -SH permette una valutazione selettiva di queste proteine. La reazione tra il DTNB e i gruppi -SH delle proteine produce un certo quantitativo

stechiometrico di TNB (tionitrobenzoato), un composto giallognolo con massima assorbanza a $\lambda_{Abs}=412$ nm

Questa procedura è stata sperimentata con successo su specie del genere *Mytilus* e *Crassostrea* ed è stata necessaria la sua rielaborazione per poterla applicare anche su *Ruditapes philippinarum*.

La metodica prevede le seguenti fasi (Viarengo et al., 1997):

1. sezionare la ghiandola digestiva di un pool di almeno 10 organismi, per ottenere un campione di almeno 1 g di matrice, che va mantenuta a circa 4 °C;
2. porre le ghiandole su carta da filtro da 3 mm, eliminando le parti grasse in eccesso;
3. trasferire le ghiandole in provette a fondo tondo da 15 ml; le provette vanno tenute in ghiaccio ad ogni *step*;
4. aggiungere ad ogni campione 3 volumi di una soluzione composta da un buffer omogeneizzante (costituito da Saccarosio 0.5 M + Tris 20 mM a pH 8.6), β - mercaptoetanololo, fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) e leupeptina;
5. omogeneizzare con un *potter* elettrico;
6. centrifugare la soluzione omogenea così ottenuta a 30000xg per 20 min, la centrifuga deve essere mantenuta a 4 °C;
7. recuperare tutto il surnatante e trasferirlo in nuove provette; vortexare per alcuni secondi;
8. precipitare le proteine ad alto PM presenti nella soluzione, aggiungendo 1.05 ml di Etanolo assoluto mantenuto a -20 °C e 80 μ l di Cloroformio; vortexare per qualche secondo;
9. centrifugare a 6000xg per 10 min, con T=4 °C;
10. recuperare il surnatante (2-4 ml);
11. aggiungere 40 μ l di HCl 37%, 10 μ l di una soluzione di RNA (1 mg/10 μ l) e 3 volumi di Etanolo mantenuto a -20 °C;
12. conservare i campioni a -20 °C per almeno 1 h;
13. centrifugare a 6000xg per 10 min.; eliminare il surnatante e mantenere il pellet;
14. risospendere il pellet con Etanolo, Cloroformio e buffer omogeneizzante, in rapporto rispettivamente, 87:1:12 in volume;
15. centrifugare per 10 min. a 6000xg e rimuovere il surnatante;
16. asciugare completamente il pellet con N₂ gas;
17. risospendere il pellet con 150 μ l di una soluzione 0.25 M NaCl e 150 μ l di una soluzione composta da HCl 1 N ed Acido Etilendiamminotetraacetico (EDTA) 4 mM;
18. preparare la soluzione stock di Glutazione (GSH) e il Reattivo di Ellman (Acido Ditionitrobenzoico o DTNB);
19. preparare almeno 3 standard con il GSH ed un bianco;
20. aggiungere ad ogni campione 150 μ l di soluzione 0.25 M NaCl, 150 μ l della soluzione di HCl 1 N ed EDTA 4 mM;

21. appena prima della lettura dei campioni allo strumento, sciogliere 0.43 mM di DTNB in un buffer fosfato contenente NaCl 2 M; riporre al buio a temperatura ambiente;
22. aggiungere a bianco, standard e campioni 4.2 ml della soluzione di DTNB;
23. centrifugare i campioni a 3000xg per 5 min;
24. leggere il valore di ABS a 412 nm usando uno spettrofotometro UV e utilizzando il GSH ridotto come standard.

Fondamentale è la preparazione della curva di taratura dello strumento utilizzando una soluzione di Glutazione (GSH): si preparano così una serie di standard in base alla concentrazione della soluzione madre e si costruisce una curva di taratura in cui l'ABS a 412 nm del GSH è una funzione lineare della sua concentrazione espressa in nmol/ml.

Determinando matematicamente il coefficiente di estinzione ϵ per il GSH e tenendo presente le caratteristiche molecolari delle MT nelle *Ruditapes* (ovvero il loro PM ed il numero di cisteine (Unger *et al.*, 1991; Simes *et al.*, 2003), applicando la seguente formula è possibile quantificare il contenuto di MT nel campione, espresso in ng/g di peso umido di tessuto:

$$[MT] = ((Abs^{MT}_{412}/\epsilon_{GSH})/21)*7328)*4.5*4$$

Dove 21 rappresenta il numero di cisteine delle MT di Molluschi Bivalvi, 7328 è il loro PM (Unger *et al.*, 1991; Simes *et al.*, 2003); 4.5 è il volume finale di soluzione ottenuta e 4 è il fattore di diluizione iniziale.

Queste analisi sono state condotte presso il laboratorio Torre Hammon dell'*European Center for Living Technology* (ECLT) diretto dalla Prof.ssa Irene Poli con la collaborazione del dottor Davide De Lucrezia presso il Parco Scientifico e Tecnologico VEGA di Venezia.

3.4.3 Misura degli indici di condizione (condition index CI)

Altri importanti parametri utili per verificare lo stato di salute di Molluschi Bivalvi eduli (e di conseguenza quello dei siti produttivi) sono gli indici di condizione o *condition index*: esistono numerosi indici che possono essere calcolati, ma, in generale, si tratta di valori numerici che, prendendo in considerazione i diversi parametri biometrici degli organismi, permettono di analizzare cambiamenti fisiologici sia nelle popolazioni naturali (Walne 1970; Gabbott & Walker 1971; Gee *et al.* 1977) che in quelle allevate (Gabbot & Stephenson 1974; Bayne & Thompson 1970).

In effetti, l'uso di parametri fisiologici è già stato promosso (Moles & Hale, 2003) quale utile strumento in grado di coadiuvare la valutazione integrata di dati chimici sull'ambiente e per valutare lo stato di salute degli habitat dei molluschi.

In questo studio si è scelto di utilizzare alcuni indici di condizione, tra cui quello che verrà di qui definito come C.I. proposto inizialmente da Lobel *et al.*, 1991 e successivamente ripreso da Lares & Orians (1997). Numerosi studi (Lobel *et al.*, 1991; Fisher, 1983; Amiard-Triquet *et al.*, 1986; Borchardt *et al.*, 1988) hanno infatti dimostrato che tale indice è strettamente correlato alle variazioni delle concentrazioni di metalli in molte specie del genere *Mytilus*, in particolare *M. edulis* (Boscolo *et al.*, 2003). Si è proceduto quindi a verificare se tale indice possa fornire informazioni utili in questo senso anche nel caso specifico di *R. philippinarum*.

Tale indice è calcolato come rapporto percentuale del peso secco dell'organismo rispetto al suo volume.

$$C.I. = [d.w. / L1 \cdot L2 \cdot L3] \cdot 100$$

dove: d.w. (mg), esprime il peso dei tessuti secchi; L1 (cm), esprime la lunghezza della vongola; L2 (cm), esprime la larghezza della vongola; L3 (cm) esprime lo spessore della vongola

Operativamente sono state registrate con un calibro le tre dimensioni delle singole vongole (lunghezza, larghezza e spessore, figura 3.4) e sono state pesate, con una bilancia analitica di precisione, le parti molli *in toto*, la sola ghiandola digestiva e le sole parti molli. Il peso secco di ciascuna componente (d.w.) è stato stimato sulla base della percentuale media di perdita di umidità dei tessuti e della ghiandola.

3.5 METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI METALLI IN SEDIMENTI E ORGANISMI

Le analisi sul contenuto di metalli nelle diverse matrici considerate (sedimento ed organismi) sono state eseguite utilizzando diverse procedure tecniche, principalmente ICP-MS e AAS, e quando disponibile AFS.

Per quanto riguarda le analisi in spettroscopia di assorbimento atomico (AAS), lo strumento utilizzato è lo Spectra 250 Plus Varian (Figura 3.5). È uno strumento a doppio raggio, con correttore di fondo a sorgente continua (lampada a deuterio), ricerca automatica della lunghezza d'onda ottimale e consente di montare fino a quattro lampade a catodo cavo su una torretta mobile, posizionabile tramite software. Può essere utilizzato nella configurazione con bruciatore ad aria/acetilene, per la determinazione degli elementi a concentrazione maggiore, oppure nella configurazione con fornello di grafite (modello GTA-96 della Varian), per gli elementi a concentrazione più bassa. L'analisi con fornello di grafite è agevolata dalla possibilità di montare un auto campionatore a piatto rotante con gestione automatica programmabile fino a 50 campioni; i tubi utilizzati sono in grafite pirolitica.

Per il mercurio e per l'arsenico invece sono stati utilizzati i metodi dei vapori freddi (CV-AAS) e kit ad idruri. I campioni vengono aspirati tramite l'apposito strumento assieme ad un riducente e ad un acido (SnCl_2 al 25% in HCl al 20% per Hg e NaBH_4 e HCl 6M per As), arrivate alla camera di miscelazione le 3 soluzioni vengono a contatto, l'elemento considerato viene completamente ridotto formando rispettivamente mercurio metallico e arsina volatile che, attraversando un separatore gas-liquido, vengono strappati da un flusso di azoto (gas carrier) e convogliati nella cella di quarzo posta lungo il cammino ottico dello strumento.

Per quanto riguarda l'analisi dell'arsenico, è necessario operare una pre-riduzione dell'elemento per ottenere As^{3+} , lasciando reagire il campione per un'ora con una soluzione di ioduro di potassio e acido ascorbico in acido cloridrico (KI + ac. ascorbico in HCl).

Figura 3.5 Spectra AA-250 Plus Varian

Lo strumento fornisce risposte direttamente in concentrazione grazie all'utilizzo di curve di calibrazione ottenute sia tramite il metodo delle concentrazioni standard, sia tramite quello delle aggiunte standard; il confronto tra i due metodi ha mostrato una maggiore affidabilità per i risultati ottenuti con il secondo metodo.

Per le analisi in spettrometria di massa con sorgente al plasma di argon accoppiato induttivamente (ICP-MS), lo strumento utilizzato è l'Elan 6100 della Perkin-Elmer (Figura 3.6).

Figura 3.6 ICP-MS Elan 6100 Perkin Elmer

Questo strumento utilizza una torcia al plasma di Argon accoppiato induttivamente come sorgente di ioni, un quadrupolo come filtro di massa ed un rivelatore a moltiplicatore di elettroni "Channeltron" (CEM). Il campione viene introdotto per mezzo di una pompa peristaltica attraverso un nebulizzatore di tipo "cross flow" ed una camera di nebulizzazione di Scott. Gli ioni prodotti all'interno del plasma passano, attraverso due coni con orifizi del diametro di circa 1 mm, in una zona di pre-vuoto per poi raggiungere la zona di vuoto in cui lavora il quadrupolo (circa 10^{-5} mbar); qui gli ioni vengono fatti passare prima attraverso una lente di focalizzazione elettrostatica, poi vengono separati dal quadrupolo in base al rapporto massa/carica ed inviati al rivelatore.

L'analisi in ICP-MS è una tecnica molto delicata per le varie interferenze che può presentare, che possono essere così distinte:

- Interferenze **spettroscopiche**, a loro volta distinguibili in vari sottogruppi:
 - a) Interferenze isobariche, dovute alla sovrapposizione di isotopi di elementi diversi dall'elemento di interesse aventi lo stesso numero di massa; è possibile applicare delle correzioni per questo tipo di interferenze, calcolate dal software dello strumento per mezzo di equazioni basate su isotopi non interferiti degli elementi e sull'abbondanza naturale degli stessi. Tuttavia tali equazioni di correzione possono introdurre un errore nella misura e dunque queste interferenze non sono completamente eliminabili.
 - b) Formazione di specie poliatomiche, per le quali risulta molto importante la scelta dei reagenti da utilizzare per la preparazione dei campioni. Anche in questo caso, lo strumento utilizza delle equazioni di correzione ai valori di intensità ottenuti, che però possono introdurre errori dovuti al fatto che i picchi prodotti dai gas poliatomici risultano essere notevolmente più larghi e meno stabili rispetto a quelli prodotti dagli analiti.
 - c) Formazione di ossidi refrattari, dovuta al fatto che la soluzione acquosa introdotta può causare una riduzione della temperatura del plasma; l'energia è infatti utilizzata per dissociare le molecole d'acqua, producendo cambiamenti all'equilibrio del plasma. Per questo tipo di interferenze è possibile apportare delle correzioni a parametri quali il flusso di gas nella torcia: riducendo il flusso si riduce la percentuale di ossidi.
 - d) Formazione di ioni a doppia carica, a causa delle elevate temperature raggiunte dal plasma e del tempo di residenza troppo lungo degli ioni nel plasma. È possibile apportare delle correzioni a parametri quali il flusso del gas nella torcia, ma tali variazioni contrastano con quelle necessarie a ridurre la quantità di ossidi.
- Interferenze **non spettroscopiche**, o **effetto matrice**: sono una delle maggiori limitazioni nelle analisi all'ICP-MS; matrici molto complesse possono ridurre notevolmente l'intensità del segnale dei vari ioni, in particolar modo soluzioni saline con tenori di solidi disciolti superiori all'1%.

Lo strumento fornisce risposte direttamente in concentrazione, grazie all'utilizzo di curve di calibrazione ottenute con standard multi elementari tramite il metodo delle soluzioni standard. Per

cercare di valutare e ridurre le interferenze spettroscopiche sono state confrontate le concentrazioni calcolate dallo strumento per più isotopi dello stesso elemento.

3.6 ANALISI GENETICHE

Complessivamente sono stati analizzati 40 individui adulti e spurgati di *Ruditapes philippinarum* raccolti nelle stazioni identificate per le analisi ambientali in Laguna di Marano al fine di individuare eventuali caratteristiche genetiche specifiche a livello geografico. Tutti gli individui analizzati provengono dalla biobanca di campioni raccolti a maggio 2012.

Tutti gli individui sono stati caratterizzati attraverso il sequenziamento del gene mitocondriale *16S* ed attraverso l'analisi di sette loci microsatelliti, utilizzando come *out-groups* per la ricostruzione filogenetica attraverso l'analisi dell'mtDNA, alcuni campioni della specie nativa e congenerica *Ruditapes decussatus* raccolti in laguna di Venezia, altri raccolti in stazioni di campionamento nel Delta del Po e altri provenienti da un'altra area di produzione a livello europeo, la Spagna (Galizia, la Coruna), inoltre, i dati raccolti sulle popolazioni della Laguna di Marano, sono stati confrontati anche con altri campioni di altre specie di molluschi bivalvi appartenenti alla stessa famiglia e/o superfamiglia e/o ordine: al fine di effettuare confronti su scala biogeografica più ampia.

Tutti i campioni di vongola verace filippina destinati alle analisi genetiche sono stati conservati a - 20°C in etanolo assoluto, per prevenire la degradazione del DNA.

Le analisi genetiche e le successive analisi statistiche sono state svolte in collaborazione con il Prof. Francesco Nonnis Marzano presso il Laboratorio di Zoologia Biochimica e Molecolare del Dipartimento di Bioscienze (Università di Parma) e con la Dott.ssa Livia Lucentini, Laboratorio di Biodiversità Animale e Biotecnologie Naturalistiche, Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale (Università degli Studi di Perugia).

3.6.1 Estrazione e purificazione del DNA genomico

La prima fase delle analisi ha previsto l'estrazione e la purificazione del DNA genomico, attraverso l'utilizzo di protocolli specifici. Nella specie *Ruditapes philippinarum* è stata dimostrata la "Doubly Uniparental Inheritance" (DUI) (Passamonti & Scali, 2001; Passamonti et al., 2003; Cao et al., 2004; Passamonti, 2007). Infatti, gli organismi di sesso maschile posseggono mitocondri di origine materna nei tessuti somatici (es. muscolo) detti F-Type e mitocondri di origine paterna nelle gonadi (M-type) che possono differire fino al 20-30% della sequenza del DNA; le femmine invece posseggono solo mitocondri di origine materna (F-Type) (Passamonti et al., 2003).

Dal momento che senza un'analisi approfondita risulta difficile distinguere tra individui maschili e femminili, l'estrazione del DNA genomico è avvenuta attraverso il prelievo di tessuto dal mantello e dal piede, per analizzare sequenze mitocondriali omologhe (F-Type) (Plazzi & Passamonti 2010; Plazzi et al., 2011). In questi ultimi tessuti, infatti, la presenza di genoma mitocondriale maschile è piuttosto trascurabile (Garrido Ramos et al., 1998). Prima di procedere alla lisi cellulare, i frammenti di tessuto prelevati sono stati lavati con acqua deionizzata e buffer Tris HCl + EDTA (TE) per eliminare eventuali contaminanti presenti nel sedimento.

Il DNA genomico è stato estratto attraverso l'utilizzo del kit specifico "Wizard genomic DNA Purification kit" (Promega). La qualità e la concentrazione del DNA genomico estratto sono state valutate attraverso corsa elettroforetica sul gel d'agarosio all'1% in buffer Tris + Acido Acetico + EDTA (o buffer TAE) 1×, attraverso confronto con marcatore di peso molecolare ed analisi spettrofotometrica a 260–280 nm.

Il DNA genomico estratto e purificato di buona qualità, si presenta nel gel di elettroforesi come un'unica banda di elevato peso molecolare. Nel caso in cui il campione subisca un parziale

riscaldamento in seguito alla cattura, o venga sottoposto più volte a congelamenti e scongelamenti, risulterà degradato.

3.6.2 Amplificazione tramite PCR

Per quanto riguarda l'analisi di DNA mitocondriale, è stato scelto un marcatore mitocondriale informativo ed efficiente sulla base di prove effettuate in precedenza nel laboratorio di analisi e che sia indicativo per la descrizione della variabilità genetica della famiglia Veneridae (Canapa et al., 2003).

Per l'amplificazione di un frammento del gene 16S sono stati utilizzati i primers specifici:

16SarALT (5' GCCTGTTTATCAAAAACATSG 3')

16SbrALT (5'CCGGTCTGAACTCAGATCATGT 3') (Mikkelsen et al., 2006)

che amplificano circa 600 paia di basi (bp). Il termociclature utilizzato è il modello PeqSTAR 96 Universal (Euroclone Cellbio) a 96 pozzetti.

Le condizioni di PCR sono le seguenti (Chiesa et al., 2010; Chiesa et al., 2011b, Chiesa et al., 2012a,b): Volume finale di reazione pari a 50 ml contenente:

- ✓ 1 U di GoTaq Polymerase (Promega);
- ✓ Mg²⁺ 1.5 mM;
- ✓ dNTPs 0.2 mM;
- ✓ 10 pmol di ciascun primer.

I cicli di Touch-down PCR sono stati così impostati (Chiesa et al., 2010; Chiesa et al., 2011b, Chiesa et al., 2012a,b): 2 cicli di 15s a 94 °C, 15 s a 52–48–46 °C, e 30 s a 70 °C; 30 cicli di 15 s a 94 °C, 15 s a 50 °C, e 30 s a 70 °C, in seguito a denaturazione iniziale di 1 min a 94 °C ed estensione finale a 70 °C per 10 min.

3.6.3 Analisi di sequenziamento diretto del gene mitocondriale 16S

I prodotti di PCR sono stati quindi purificati tramite eluizione dal gel d'agarosio al 2.5% o da PCR liquida, quindi precipitati con 3 volumi di Etanolo al 100%, e sottoposti a lavaggio in Etanolo al 70%. Il sequenziamento diretto dei frammenti così ottenuti è stato effettuato mediante utilizzo del kit CEQ™ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter), ed analisi di elettroforesi capillare su gel di acrilamide tramite il sequenziatore automatico per acidi nucleici "CEQ™ 8000 DNA Analysis System" (Beckman Coulter), con 5 pmol di ciascun primer *forward* (FW) o *reverse* (RV).

La lettura analitica delle sequenze ottenute dall'elettroforesi capillare su gel di acrilamide è stata effettuata mediante il "Sequencing module" del software "CEQ 8000". Gli elettroferogrammi sono stati analizzati successivamente utilizzando il programma Sequencher 4.7. Le sequenze nucleotidiche derivanti dalla rielaborazione degli elettroferogrammi sono state esaminate con i programmi BLAST e FASTA per la ricerca di omologie nelle banche genomiche, e successivamente con il software ClustalX (Thompson et al., 1997), per il riallineamento multiplo manuale delle sequenze e la rimozione dei *gaps*.

3.6.4 Analisi di loci microsatelliti

Accanto all'analisi delle sequenze mitocondriali *16S rDNA*, è stato scelto di analizzare anche marcatori nucleari altamente polimorfici quali i loci microsatelliti, dei quali è stato ampiamente dimostrato il grande potenziale nel determinare la diversità genetica dei Molluschi Bivalvi (Astanei et al. 2005; Li et al. 2006; Gosling et al. 2008; Presa et al. 2002; Soboleska et al. 2001; Soboleska & Beaumont 2005; Yasuda et al. 2007; An et al. 2009).

Per descrivere la variabilità genetica di *Ruditapes philippinarum* sono stati identificati sette loci altamente polimorfici: *Asari 16*, *Asari 23*, *Asari 24*, *Asari 54* descritti da Yasuda et al. (2007), e *Ktp5*, *Ktp8*, *Ktp22* descritti da An et al. (2009). Tali loci microsatelliti sono stati scelti a seconda dei diversi livelli di variabilità descritta per ciascuno di essi. Le condizioni di PCR utilizzate sono quelle descritte da Chiesa et al. (2011b). In un volume finale di 20 µl sono stati addizionati

- 10 ng di DNA templato,
- 2.0 mM Mg²⁺,
- 0.2 mM di dNTPs,
- 5 pmol di ciascun primer (*forward* primer marcato a fluorescenza 5'CY5),
- 0.2 U *Taq* polimerasi.

Le condizioni di PCR utilizzate sono le seguenti:

10 min a 94°C, 38 cicli di: 30 s a 94°C, 30 s a 55°C (per ciascuna coppia di primers è stata utilizzata una temperatura di annealing specifica), 1 min a 72 °C estensione finale di 5 min a 72 °C (Chiesa et al., 2010; Chiesa et al., 2011b).

Per ciascuna coppia di primers, le condizioni di PCR sono state ottimizzate attraverso incrementi progressivi di 1 °C della temperatura di annealing.

I prodotti amplificati così ottenuti sono stati analizzati attraverso corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2.5%, quindi una quota dell'amplificato pari a 0.8 µl e 0.25 µl di standard di peso molecolare (CEQ DNA Size standard- 400 Beckman-Coulter, Fullerton, CA) sono stati addizionati a 40 µl of formammide deionizzata (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). I campioni così preparati sono stati quindi analizzati nel dettaglio attraverso elettroforesi capillare su gel di acrilamide mediante il sequenziatore automatico "CEQTM 8000 DNA Analysis System" (Beckman Coulter). I dati analizzati sono stati quindi importati sul software Genographer (Vers.1.6.0, Benham J.J., Montana State University 2001) per l'identificazione degli alleli ed il confronto con il marcatore di peso molecolare standard.

3.7 ANALISI STATISTICHE SUI DATI AMBIENTALI E FILOGENETICI

Per quanto riguarda le analisi chimiche e biologiche su organismi e sedimenti, i valori medi di concentrazione per ogni stazione sono stati visualizzati graficamente tramite tabelle e istogrammi utilizzando il programma Numbers (iWork '09).

Inoltre, per le analisi di statistica multivariata è stato utilizzato il software STATISTICA (Stat Soft Inc. data analysis software system), versione 8.0.

L'analisi di Minimum Spanning Network (MSN) sulle sequenze del gene *16S* è stata effettuata attraverso il software TCS 1.21., con una soglia di confidenza del 95%. L'identificazione dei siti informativi, la traslazione delle sequenze nucleotidiche, l'analisi pairwise delle distanze genetiche, la composizione delle basi azotate, il rapporto transizioni/transversioni, il Tajima's Neutrality Test (Tajima, 1989) sono stati valutati attraverso il software MEGA5.

Le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi di *R. philippinarum* e di *R. decussatus* e degli altri outgroups sono state stimate applicando il metodo di distanza e massima verosimiglianza implementati in MEGA5.

I modelli ed i parametri dell'evoluzione del DNA sono stati selezionati utilizzando il Hierarchical Likelihood Ratio Tests (hLRTs) in jMODELTEST.

L'albero filogenetico di Maximum Likelihood (ML) è stato basato sul modello di Tamura e Nei con 1000 repliche di bootstrap.

Le stesse analisi statistiche e filogenetiche sono state effettuate separatamente sulle sole sequenze dei campioni di *R. philippinarum*.

Per verificare il drop-out allelico e la presenza di alleli nulli all'analisi dei loci microsatelliti, è stata condotta un'analisi con micro-checker 2.2.3 su campione globale (nessuna suddivisione in popolazioni), che permette una stima della frequenza degli alleli nulli a ciascun locus (Van Oosterhout et al, 2004).

La distribuzione delle frequenze alleliche per ogni locus microsatellite, la percentuale di eterozigosi attesa (H_E) e osservata (H_o), le stime dei valori F_{st} (Peakall et al., 1995) e delle distanze di Nei (Nei, 1978) per ogni popolazione e per ogni locus sono state ottenute utilizzando il software GenAlEx 6.4.1 (Peakall e Smouse, 2006).

L'analisi Fattoriale delle Corrispondenze (FCA) per i loci microsatelliti è stata condotta attraverso il software Genetix (Belkhir et al., 1996-2002).

Inoltre, per le analisi di Structure, è stato utilizzato il software Structure 2.0

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 GRANULOMETRIA E CARATTERISTICHE GEOCHIMICHE DEL SEDIMENTO

Di seguito sono riportati i valori di granulometria, di pH e potenziale Redox per i tre prelievi di sedimento effettuati in ciascun sito.

SITO	pH	Eh	> 1mm (sabbia grossolana)	> 1 mm %	1mm ÷ 63 µm	1mm ÷ 63 µm %	< 63 µm	< 63 µm %
A1	7,31	-237	0,33	0,4	21,38	26,55	58,82	73,04
A2	7,51	-180	1,12	1,1	40,41	41,02	56,99	57,85
A3	7,45	-188	0,26	0,3	21,98	22,69	74,64	77,04
B1	7,60	-114	1,34	1,3	67,31	67,35	31,29	31,31
B2	7,52	-129,7	0,29	0,3	68,38	68,23	31,55	31,48
B3	7,46	-155,7	0,76	0,8	66,27	65,88	33,56	33,36

Tab. 4.1 Dati relativi a pH, Eh e distribuzione granulometrica dei sedimenti dei siti A (16 UD acque) e B (15 UD Tapo).

Il dato più importante da sottolineare è il potenziale redox che per entrambi i siti è piuttosto negativo, per il sito 16 UD acque già nei primi 10 cm di sedimento, si arriva addirittura a valori medi di Eh di -237mV nei primi 10 cm di sedimento, un potenziale caratteristico di ambienti fortemente anossici che si instaura rapidamente nell'acqua di porosità quando il consumo di ossigeno, proveniente dall'acqua sovrastante, avviene più velocemente del suo afflusso al sistema. Si instaurano così condizioni di anaerobiosi via via crescenti che partendo dallo strato più profondo della carota di sedimento, possono estendersi fino allo strato più superficiale a stretto contatto con l'acqua sovrastante. In queste condizioni, prevalgono nel sedimento batteri NO_3^- riduttori, Mn(IV)-riduttori, Fe(II)-riduttori, SO_3^- riduttori e metanogeni che competono tra loro per le fonti di carbonio disponibili. I microorganismi sono in grado di seguire percorsi respiratori degradativi differenti che utilizzano come accettori di elettroni in ordine di preferenza e di resa energetica: i nitrati, il Mn^{4+} , il Fe^{3+} , i solfati e il CO_2 . Di seguito sono riportate le reazioni generali di conversione della sostanza organica in differenti ambienti redox e la sequenza di utilizzo degli accettori di elettroni (tabella 4.1bis) con i relativi prodotti metabolici (ARPAV, 2006).

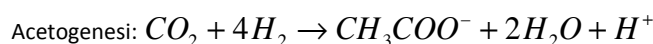
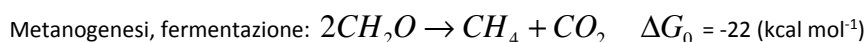
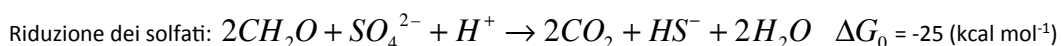
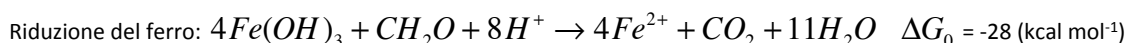
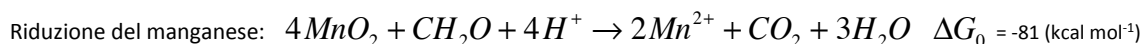
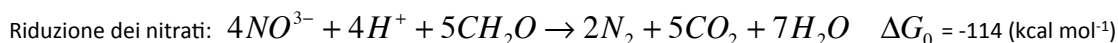
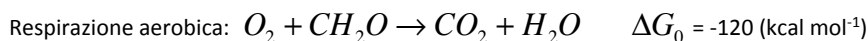



Tabella 4.1bis sequenza dell'utilizzo degli accettori di elettroni (Azadpour-Keeley et al., 1999)

	MICROORGANISMI	ACCETTORI DI ELETTRONI	POTENZIALE REDOX Eh A pH=7 E T= 25°C (mV)	PRODOTTI METABOLICI ULTIMI
<p>Engeticamente più favorevole</p>  <p>Meno favorevole</p>	Strettamente aerobici	O ₂	+820	H ₂ O, CO ₂
	NO ₃ ⁻ riduttori facoltativi	O ₂ , NO ₃ ⁻	+740	H ₂ O, CO ₂ , NO ₂ , N ₂
	Mn(IV) riduttori	Mn (IV)	+520	Mn(II)
	Fe(III) riduttori	Fe(III)	-50	Fe(II)
	SO ₄ ²⁻ riduttori	SO ₄ ²⁻	-220	H ₂ O, H ₂ S
	metanigeni	CO ₂	-240	H ₂ O, CH ₄

È evidente che queste condizioni estremamente ridotte si riflettono inevitabilmente sulla forma chimica alla quale si trovano i metalli nel sedimento determinando la loro ripartizione tra le fasi geochemiche presenti e influenzandone la loro mobilità, biodisponibilità e bioaccumulo nella componente biotica (vongole).

Ad esempio, le condizioni redox presenti nei sedimenti della laguna di Marano sono tali da destabilizzare la terza fase e portare alla graduale solubilizzazione degli ossidi/idrossidi di ferro e manganese, almeno di quelli più labili, attraverso la riduzione di Mn⁴⁺ e Fe³⁺ insolubili, a Mn²⁺ e Fe²⁺ solubili. Contemporaneamente passano in soluzione tutti i metalli associati alla frazione solubilizzata della terza fase ed è utile ricordare che gli ossidi/idrossidi di ferro e manganese costituiscono per molti metalli la forma associativa preferenziale. Il destino dei metalli mobilizzati nell'acqua di porosità dipende da una serie di fattori legati direttamente tra loro alle caratteristiche chimiche e a quelle biogeochemiche della matrice. Ad esempio possono:

- interagire con l'acido solfidrico prodotto dai solfato riduttori per dare solfuri insolubili incrementando i metalli e metalloidi della quarta fase;
- interagire col biossido di carbonio prodotto dai processi degradativi e precipitare sotto forma di carbonati incrementando la seconda fase;
- trasferirsi per adsorbimento sulle fasi solide già presenti e/o coprecipitare con le fasi solide appena formatesi in situ.
- trasferirsi dalla matrice abiotica (acqua) a quella biotica accumulandosi nelle vongole.

Si instaurano, quindi processi dinamici che portano al graduale trasferimento di contaminanti presenti nelle fasi instabili alle fasi stabili e/o al loro trasferimento e accumulo nella componente biotica.

La granulometria (Figura 4.1) è in accordo coi dati di letteratura (Acquavita et al., 2012), anche se con la setacciatura a umido non si è in grado di distinguere la frazione argillosa da quella limosa. In ogni caso, la frazione fine riveste in entrambi i siti un ruolo significativo anche le diverse frazioni dimensionali nelle aree di allevamento sono presenti in percentuali differenti e quasi invertite.

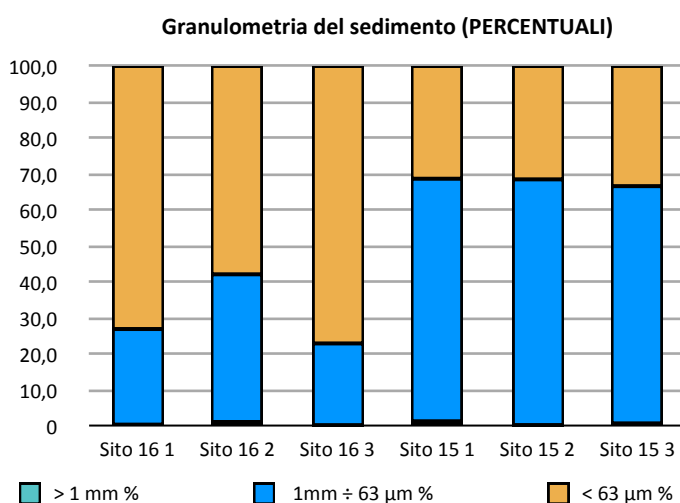


Figura 4.1 Distribuzione granulometrica misurata con setacciatura a umido per ciascun prelievo fatto nei due siti oggetto di studio.

La variabilità granulometrica tra le due aree studiate evidenziata dai risultati ottenuti è legata a locali fenomeni ambientali di idrodinamica e di variabilità intrinseca ad un sistema dinamico come quello della laguna. Infatti, è da ricordare che il sito 15 UD tapo, si trova più a sud dell'altro sito, è molto vicino alle bocche a mare (e lontananza dalle foci di fiumi e canali), ed è interessato da un'idrodinamica particolarmente vivace (Ferrarin et al., 2010) quindi presenta un sedimento granulometricamente più spostato verso la componente grossolana.

Inoltre, i tre prelievi sono stati fatti nello stesso orto di coltivazione della *R. philippinarum*, ma a una certa distanza l'uno dall'altro. Questo consente di arricchire la conoscenza di informazioni caratteristiche dell'orto anche relative alla sua omogeneità non assoluta rispetto a variabili come la granulometria (più per il primo sito che per il secondo), importante ai fini della valutazione della qualità del sito per la coltivazione della specie *R. philippinarum*.

Da questi primi dati si può intuire che i meccanismi maggiormente responsabili dell'accumulo e della ripartizione tra le varie fasi geochimiche dei metalli pesanti nel sedimento della Laguna di Marano sono differenti da quelli rilevati per la laguna di Venezia e per il Delta del Po caratterizzati da maggiore ossigenazione e prevalente presenza della frazione grossolana (sabbia). Da questa osservazione, si può capire come mai i dati rilevati per la laguna di Marano siano piuttosto diversi da quelli già misurati per la laguna di Venezia (Baccarani, 2012).

Inoltre, la percentuale di frazione fine così importante soprattutto per il sito 16 UD acque dà ragione di un potenziale redox così negativo. I processi prima descritti, infatti, sono tanto più intensi quanto più alta è la percentuale della frazione limo-argillosa nel sedimento; essa subisce infatti, una maggiore compattazione che rallenta ulteriormente gli scambi gassosi tra l'acqua superficiale e quella di porosità, portando a condizioni molto più ridotte che accelerano i processi appena delineati.

Quindi, l'acquisizione di questi dati e le considerazioni effettuate, consentono di fare delle previsioni sulle principali specie metalliche presenti e sui principali processi responsabili del loro comportamento e destino nell'ambiente.

4.2 CONTROLLO QUALITÀ DEL DATO ANALITICO

Le analisi di estrazione totale e speciazione geochimica effettuate sui sedimenti comportano l'utilizzo di procedure spesso complesse. Infatti, il numero elevato di soluzioni estraenti a diversa composizione chimica e la contemporanea presenza di numerosi analiti in concentrazioni estremamente differenti (dai $\mu\text{g/L}$ ai mg/L) hanno richiesto l'ottimizzazione e il continuo e puntuale controllo dell'efficacia delle procedure di estrazione e delle analisi strumentali.

L'accuratezza e la precisione delle procedure utilizzate per la determinazione del metallo totale nel sedimento sono state stimate sottoponendo ad analisi il materiale di riferimento certificato, PACS-2 e MESS-3, i quali sono stati sottoposti simultaneamente e in tre repliche allo stesso trattamento degli altri campioni e sono stati posti sottoposti alle stesse analisi. A seguito di queste, i valori di concentrazione riscontrati sono stati confrontati con i valori di riferimento certificati.

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 4.2 e 4.3, i valori di concentrazione riportati sono stati ottenuti mediante ICP-MS (per As, Cd, Cr, Cu, Ni e Zn) e AAS (Fe e Hg).

PACS - 2	Conc. Certificate mg/kg	Conc. Determinate mg/kg
As	26,2 ± 2,6	25,9 ± 0,2
Cd	2,11 ± 0,15	2,28 ± 0,53
Cr	90,7 ± 4,6	91,2 ± 1,4
Cu	310 ± 12	319 ± 36
Hg	3,04 ± 0,20	4,00 ± 0,50
Ni	39,5 ± 2,3	38,5 ± 2,3
Pb	183 ± 8	177 ± 25
Zn	364 ± 23	377 ± 49

MESS - 3	Conc. Certificate mg/kg	Conc. Determinate mg/kg
As	21,2 ± 1,1	20,6 ± 4
Cd	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,06
Cr	105 ± 4	134 ± 5
Cu	33,9 ± 1,6	35,2 ± 1,2
Ni	46,9 ± 2,2	48,3 ± 5,8
Pb	21,1 ± 0,7	21,4 ± 0,7
Zn	159 ± 8	159 ± 7

Tabelle 4.2 e 4.3 Confronto tra valori di concentrazione certificati e valori di concentrazione ottenuti da digestione totale e analisi mediante ICP-MS e AAS.

Allo stesso modo, per validare le procedure di digestione degli organismi e l'affidabilità delle analisi dei metalli, sono stati simultaneamente analizzati i campioni di DORM-2 e NIST (già descritti nel capitolo 3) di cui vengono di seguito (tabelle 4.4 e 4.5) riportati i valori di concentrazione riscontrati a confronto con i valori certificati in mg/kg d.w. Anche in questo caso le analisi sono state svolte mediante ICP-MS e AAS.

DORM	Conc. Certificate mg/kg	Conc. Determinate mg/kg
As	18,0 ± 1,1	15,7 ± 1,54
Cd	0,043 ± 0,008	0,045 ± 0,004
Cu	2,34 ± 0,16	2,19 ± 0,31
Fe	142 ± 10	149 ± 23
Pb	0,065 ± 0,007	0,07 ± 0,01
Zn	25,6 ± 2,3	21,2 ± 2,68

NIST	Conc. Certificate mg/kg	Conc. Determinate mg/kg
As	13,3 ± 1,8	13,5 ± 0,5
Cd	0,82 ± 0,16	0,76 ± 0,01
Cu	4,02 ± 0,33	4,53 ± 0,14
Hg	0,061 ± 0,004	0,061 ± 0,011
Pb	1,19 ± 0,18	1,13 ± 0,05
Zn	137 ± 13	127 ± 2

Tabelle 4.4 e 4.5 Confronto tra valori di concentrazione certificati e valori di concentrazione ottenuti da digestione totale e analisi mediante ICP-MS e AAS.

Risulta evidente come i valori misurati siano, per la maggior parte dei metalli, in accordo con i valori certificati sia per i campioni di sedimento che per i campioni di organismi. Si riscontrano valori discordanti per Fe e Zn negli organismi, e per Pb e Cr nei sedimenti che presentano concentrazioni leggermente al di fuori dell'intervallo certificato pur non discostandosi eccessivamente.

La complessità della procedura di speciazione geochimica e della matrice stessa dei campioni, il numero elevato di soluzioni estraenti a diversa composizione chimica e la contemporanea presenza di numerosi analiti in concentrazioni differenti hanno richiesto un continuo e puntuale controllo della performance della procedura di estrazione e delle analisi strumentali.

Non essendo disponibile un campione certificato per validare la procedura di speciazione geochimica, la qualità dei risultati ottenuti è stata valutata tramite il confronto tra la somma della concentrazione di ciascun metallo nelle varie fasi di speciazione rispetto alla concentrazione rilevata tramite digestione totale dei campioni di sedimento. La precisione e accuratezza ottenute per i campioni di sedimento si sono dimostrati entro limiti più che buoni per tutti gli elementi e per tutte le estrazioni, tranne che per il mercurio, ma di tale fenomeno è data ragione nei paragrafi seguenti.

4.3 CONTENUTO DI METALLI NEL SEDIMENTO

I dati relativi al contenuto totale di metalli nei sedimenti oggetto di studio sono riportati in figure 4.2-10 e in APPENDICE A. A partire da questi dati è stato possibile effettuare un confronto tra i due siti che presentano un pattern di concentrazione omogeneo per alcuni metalli e dissimile per altri.

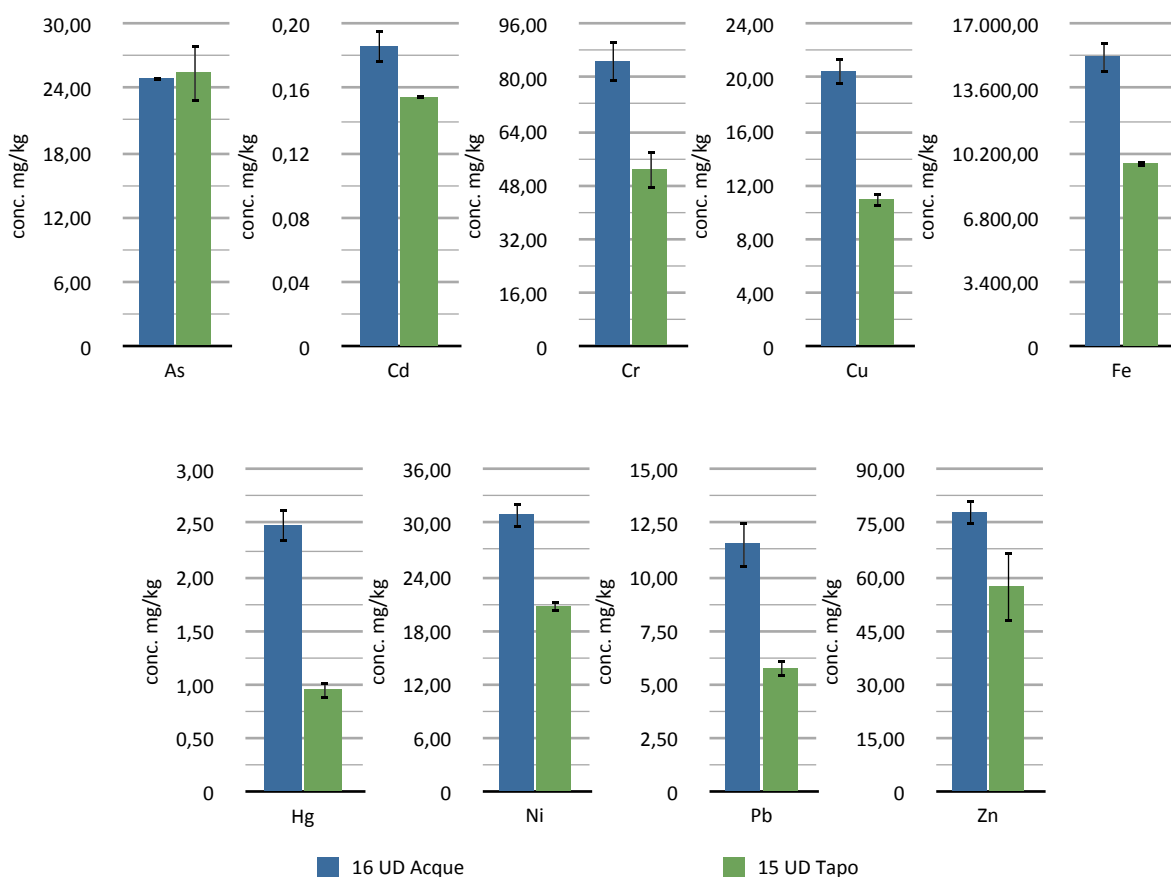


Figure 4.2,3,4,5,6,7,8,9,10 Confronto tra i due siti in termini di concentrazione totale dei diversi metalli e metalloidi analizzati.

Come è visibile dalle figure 4.2-10, il sito 16 UD acque riporta le concentrazioni maggiori per tutti i metalli analizzati al di fuori dell'Arsenico, per il quale il confronto tra i due siti mostra due valori di concentrazione (calcolata come media tra i tre prelievi) molto vicine. Tuttavia, anche per il Cadmio le concentrazioni rilevate sono piuttosto simili: si tratta di valori piuttosto bassi per entrambi i siti.

I livelli di contaminazione più elevati per il sito 16 UD acque vanno da un 25% in più dello Zinco, fino al 50% in più di Piombo e Rame, fino al 63% del Mercurio, e possono essere preliminarmente interpretati alla luce dei dati misurati per quanto riguarda la granulometria.

Infatti, come è noto (Jung, 2010), i metalli tendono a concentrarsi maggiormente nella frazione fine con la quale si instaurano legami di varia forza, ma comunque meno labili di quanto non accada con la frazione grossolana. Oltre alla granulometria, l'idrodinamica è una variabile sicuramente importante per interpretare i dati ottenuti alla luce delle possibili fonti di inquinamento e dalla loro localizzazione in Laguna di Marano. In effetti, sono presenti in letteratura (Ferrarin, 2010) modelli idrodinamici della laguna che mostrano l'andamento delle correnti e dei flussi mareali e, grazie a questi, è possibile affermare che nella ricostruzione modellistica, i due siti si trovano in condizioni idrodinamiche diverse. Il sito 15 UD tapo infatti, si trova vicino alla bocca a mare di Lignano ed è interessato da un continuo ricambio di acque a velocità media piuttosto sostenuta a differenza dell'altro sito che invece è situato in una zona più interna della laguna, in condizioni più statiche. Questo è un fattore importante da considerare, ma solo alla luce di un'analisi approfondita della forma chimica alla quale sono presenti i contaminanti considerati.

4.4 SPECIAZIONE GEOCHIMICA

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti attraverso la procedura della speciazione geochimica e per ciascun metallo vengono riportati i valori di concentrazione riscontrati nelle diverse fasi, il valore di concentrazione totale dell'elemento ricavato dalla somma delle fasi e quello ottenuto sperimentalmente dalla completa solubilizzazione di un'aliquota di campione di sedimento mediante digestione acida. È importante rilevare che gli unici dati presenti in letteratura per la laguna di Marano sono relativi alle concentrazioni di mercurio nei sedimenti (Covelli, 2011; Acquavita, 2012) e alle concentrazioni nei semi di *R. philippinarum*, nell'organismo spurgato e nel particolato sospeso per quanto riguarda As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Ni, V, Zn, Fe e Hg (Sfriso et al., 2008).

4.4.1 Arsenico

Tabella 4.6 Valori di concentrazione di As riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w; è riportata anche la somma delle fasi e la resa della procedura di speciazione, calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di As nei sedimenti.

As	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	Residuale	somma fasi	Totale	Resa
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	conc. mg/kg	%
16 UD Acque	0,37	2,46	3,27	2,81	1,91	18,33	29,15	24,73	117,86
	0,29	1,60	2,90	2,89	1,33	24,22	33,24	24,90	133,51
	0,28	1,43	3,06	3,20	1,65	21,28	30,90	25,06	123,28
15 UD Tapo	10,66	1,59	1,98	0,80	0,84	12,72	28,59	25,46	112,30
	12,00	1,52	2,05	0,92	1,25	9,16	26,89	28,14	95,58
	11,73	1,44	1,94	0,82	1,02	8,28	25,24	22,78	110,82

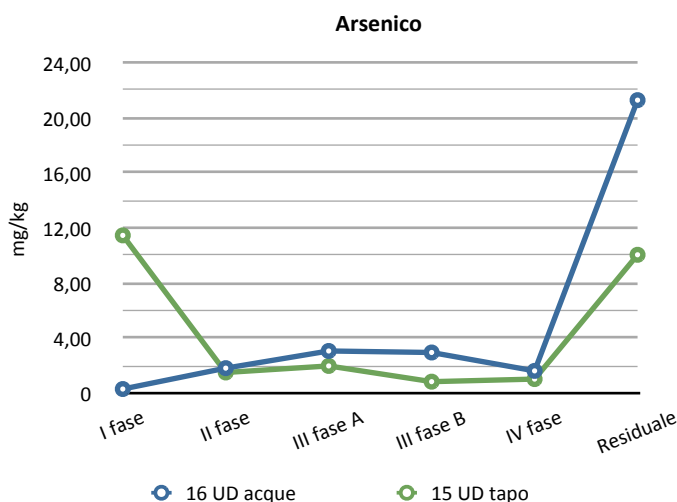


Figura 4.10 Valori medi di concentrazione di As riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.

A partire dalla lettura sinottica dei dati in tabella 4.6 e del grafico riportato in figura 4.10 è possibile riscontrare un pattern di distribuzione dell'Arsenico differente tra i due siti. In effetti, se dalla seconda alla quarta fase la distribuzione rimane comparabile, pur variando le concentrazioni in termini di valore assoluto, è evidente la presenza di una quota maggioritaria di questo elemento estratto tramite la prima fase per il sito 15 UD tapo, mentre per il sito 16 la cosa non si verifica.

Questo comporta una quota maggiore di arsenico **biodisponibile** per il sito 15 UD tapo. L'Arsenico è un metalloide chimicamente omologo del fosforo (in soluzione è presente come ione arseniato) che di solito si associa preferibilmente agli ossidi e idrossidi Fe e Mn che possono avere un differente grado di cristallinità a seconda del tempo trascorso dalla loro formazione (a parità delle altre condizioni chimico-fisiche).

La sensibilità alle condizioni redox dipende quindi, dal grado di cristallizzazione dell'ossido o idrossido e per questo le condizioni sempre più ridotte realizzate nella terza fase A e B sarebbero in grado di portare il metalloide in soluzione.

In questo caso, invece, le condizioni redox ambientali già di per sé ridotte comportano la presenza di Arsenico in prima fase per il sito 15 che probabilmente si trova in equilibrio nell'acqua interstiziale e probabilmente proviene da fonti antropiche di recente immissione.

Nel caso del sito 16 invece, ve n'è una certa quota in terza fase A, una quota analoga in terza fase B e una quota più consistente in fase residuale, legato quindi a sali minerali particolarmente resistenti che non si sciolgono nemmeno in condizioni di acidità o in condizioni redox particolarmente ridotte e si tratta probabilmente di precipitati associati al Cromo IV. In ogni caso, nessuna di queste probabili forme chimiche può considerarsi **biodisponibile** per l'organismo target considerato.

4.4.2 Cadmio

Tabella 4.7 Valori di concentrazione di Cd riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.; è riportata anche la somma delle fasi e la resa della procedura di speciazione, calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Cd nei sedimenti.

Cd	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	Residuale	somma fasi	Totale	Resa
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
16 UD Acque	0,00	0,10	0,01	0,01	0,00	0,04	0,17	0,18	92,64
	0,01	0,09	0,01	0,00	0,00	0,06	0,17	0,20	85,63
	0,00	0,08	0,01	0,01	0,00	0,05	0,15	0,18	80,43
15 UD Tapo	0,00	0,07	0,01	0,01	0,00	0,03	0,12	0,16	75,59
	0,00	0,07	0,01	0,01	0,00	0,02	0,11	0,15	70,04
	0,00	0,06	0,01	0,01	0,00	0,02	0,10	0,16	63,59

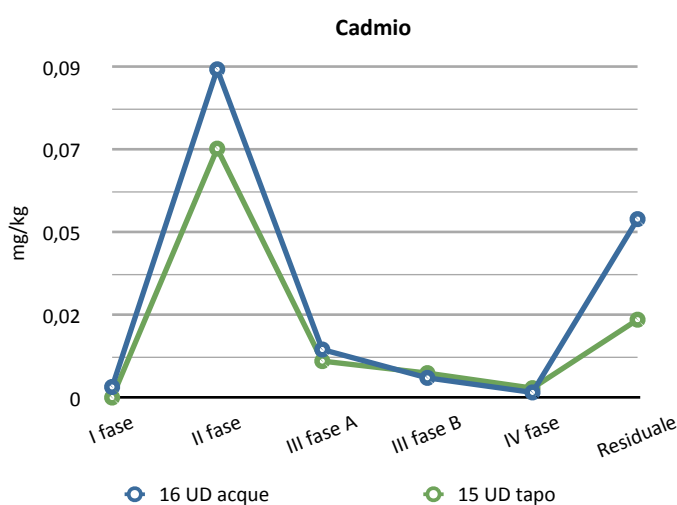


Figura 4.11 valori medi di concentrazione di Cd riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.

Le concentrazioni rilevate di Cadmio sono riportate in tabella 4.7 e sono visualizzate come media dei tre prelievi in figura 4.11. Si tratta di concentrazioni piuttosto basse e vicine ai limiti di detenzione dell'ICP-MS, per questo non è possibile apprezzare una resa ottimale della speciazione.

In ogni caso, l'andamento di distribuzione nelle varie fasi si mantiene omogeneo per i due siti con concentrazioni maggiori per il sito 16 UD la cui granulometria abbondante in frazione fine sicuramente è un sito di stoccaggio preferenziale per molti contaminanti inorganici che difficilmente verrebbero dilavati o mobilizzati se si trovassero in condizioni ossidate.

Ma a queste condizioni redox, il Cadmio si trova probabilmente legato ai carbonati, quindi precipita e si accumula in questa forma, vista la scarsa idrodinamica del sito si può supporre che rimanga tale e, quindi, da considerarsi biodisponibile per l'organismo target.

4.4.3 Cromo

Tabella 4.8 Valori di concentrazione di Cr riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w; è riportata anche la somma delle fasi e la resa della procedura di speciazione, calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Cr nei sedimenti.

Cr	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	Residuale	somma fasi	Totale	Resa
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
16 UD Acque	5,11	11,44	0,00	11,03	0,00	55,77	83,36	86,02	96,90
	5,56	10,76	0,00	9,04	0,00	47,57	72,93	90,13	80,91
	5,70	10,22	0,00	8,55	0,00	51,67	76,14	78,19	97,38
15 UD Tapo	8,09	12,00	0,00	6,18	0,00	21,03	47,30	56,12	84,29
	8,58	11,78	0,00	6,15	0,00	20,29	46,80	55,89	83,74
	8,32	11,00	0,00	5,65	0,00	16,82	41,78	46,07	90,69

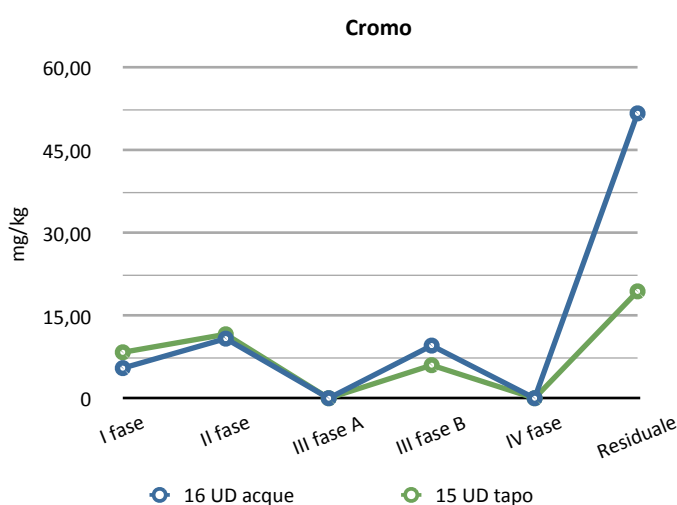


Figura 4.12 Valori medi di concentrazione di Cr riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.

Le concentrazioni di Cromo riportate in tabella 4.8 e in figura 4.12, evidenziano che anche per questo elemento il pattern di distribuzione si ripropone analogo per i due siti, ma, anche in questo caso, i valori assoluti di concentrazioni sono maggiori per il sito 16, che anche per il Cromo risulta caratterizzato da un quantitativo presente maggiore.

In generale, i metalli presenti nelle acque dolci derivanti dal bacino scolante, sono in condizioni di pH sub-acidi e sono disciolti o adsorbiti sul particolato o, ancora, in forma colloidale (sottoforma di ossidi e idrossidi di Fe e Mn). Ma una volta a contatto con l'ambiente marino, l'aumento della forza ionica comporta la destabilizzazione dei colloidali dovuta alla presenza di ioni che ne schermano le cariche (basti pensare alla struttura di acidi umici e fulvici) portando così alla formazione di aggregati sempre più grandi che precipitando adsorbono altri metalli presenti in soluzione ampliando sempre più le dimensioni degli aggregati. La sostanza organica può ricoprirli con un film e immobilizzare i vari metalli nelle diverse forme chimiche in cui si trovano presenti all'interno dell'aggregato.

Venendo alle specificità del Cromo, tale elemento in ambiente marino è di preferenza legato ad ossidi e idrossidi di Fe e Mn e quindi, dovrebbe essere presente in terza fase A e/o in terza fase B (Baccarani, 2012). Quello che si osserva invece, è uno spostamento verso la prima e la seconda fase. Ciò è dovuto alle condizioni redox rilevate nei due siti, infatti, il Fe^{3+} e il Mn^{3+} caratteristici di ossidi e idrossidi, ad un livello così negativo di Eh si riducono e passano a Fe^{2+} e Mn^{2+} . Diventano così solubili

e liberano i metalli ad essi legati che vengono rinvenuti in prima fase sotto forma biodisponibile oppure associati ai carbonati in seconda fase.

4.4.4 Rame

Tabella 4.9 Valori di concentrazione di Cu riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w; è riportata anche la somma delle fasi e la resa della procedura di speciazione, calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Cu nei sedimenti.

Cu	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	Residuale	somma fasi	Totale	Resa
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
16 UD Acque	0,40	9,39	0,53	1,05	7,63	6,62	25,62	19,29	132,82
	0,44	6,71	0,67	1,07	6,97	8,09	23,95	21,25	112,69
	0,34	2,84	0,62	0,93	8,98	7,36	21,08	20,94	100,63
15 UD Tapo	0,19	2,26	0,09	0,82	3,76	4,59	11,71	11,41	102,63
	0,87	1,01	0,06	0,63	3,65	3,26	9,48	11,00	86,16
	0,17	0,98	0,09	0,86	3,29	3,64	9,03	10,36	87,18

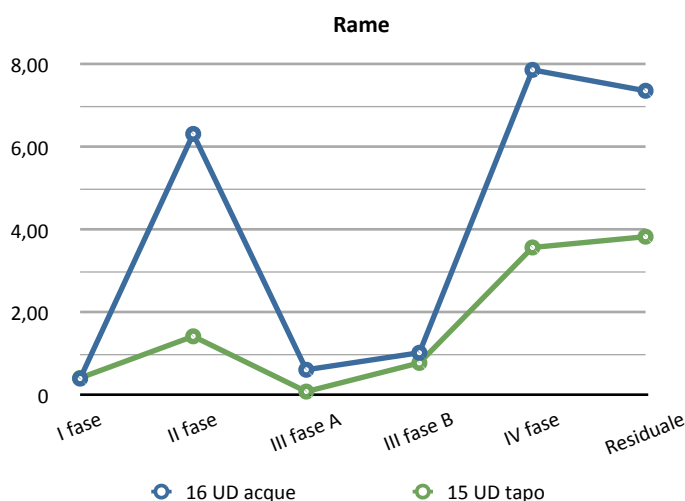


Figura 4.13 Valori medi di concentrazione di Cu riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.

Anche in questo caso, la distribuzione nella varie fasi per il Rame è sovrapponibile per i due siti, ma con un evidente concentrazione maggiore per il sito 16 UD acque.

Il Rame è di per sé un elemento distribuito in natura in modo variegato e complesso nei vari comparti ambientali; è mineralogicamente importante per i legami che può formare con i silicati, ma è altrettanto importante nel comparto organico per la sua grande affinità verso la sostanza organica essendo fortemente chelato dai gruppi funzionali presenti in acidi umici e fulvici.

In ambiente anossico, si instaura un metabolismo anaerobico che comporta la degradazione della sostanza organica da parte della comunità batterica presente e che porta alla formazione di CO₂, H₂S, CH₄, e alla liberazione dello ione nell'acqua interstiziale. Tale ione, interagendo con i gas formati, si ridistribuisce tra le altre fasi incrementando la sua concentrazione nella seconda fase o rientrando nella quarta fase sotto forma di CuS.

4.4.5 Ferro

Tabella 4.10 Valori di concentrazione di Fe riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w; è riportata anche la somma delle fasi e la resa della procedura di speciazione, calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Fe nei sedimenti.

Fe	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	Residuale	somma fasi	Totale	Resa
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
16 UD Acque	0,00	1.171,43	1.400,00	4.271,43	2.071,43	4.666,97	13.581,26	14.420,22	94,18
	0,00	1.200,00	1.542,86	4.857,14	828,57	6.013,92	14.442,49	15.380,81	93,90
	0,00	1.285,71	1.700,00	4.642,86	1.185,71	5.340,45	14.154,73	16.100,00	87,92
15 UD Tapo	0,00	1.000,00	857,14	4.228,57	700,00	2.554,37	9.340,08	9.561,75	97,68
	0,00	1.028,57	885,71	4.571,43	1.085,71	2.110,54	9.681,96	9.592,45	100,93
	0,00	1.085,71	828,57	4.257,14	571,43	2.447,07	9.189,93	9.930,14	92,55

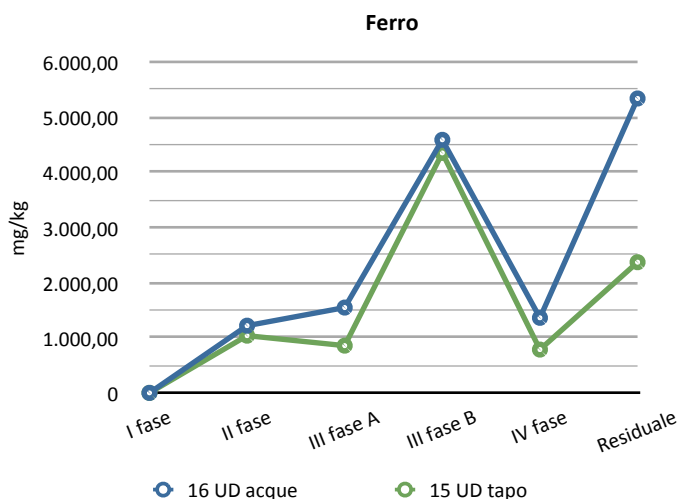


Figura 4.14 Valori medi di concentrazione di Fe riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.

Come visibile dalla tabella 4.10 e dalla figura 4.14, la distribuzione del Ferro nelle varie fasi geochimiche si mantiene costante nei due siti, ma si riscontra una concentrazione maggiore per il sito 16 UD acque dovuta soprattutto alla fase residuale.

Confrontando questa ripartizione con quella rilevata per la laguna di Venezia e per il Delta del Po, si dimostra che nei campioni della Laguna di Marano, a causa del potenziale redox negativo (già nei primi cm di sedimento superficiale) si ha la destabilizzazione della terza fase con conseguente più equilibrata distribuzione dell'elemento tra le diverse fasi. Ciò spiega il significativo incremento di Fe nella seconda, nella quarta fase e nella fase residuale e contemporaneamente al decremento di Fe nelle terze fasi.

Lo stesso fenomeno si osserva nella ripartizione di As, Cr, Cu e Pb: quando si confrontano le ripartizioni geochimiche ottenute con i sedimenti della Laguna di Marano con quelli della Laguna di Venezia e del Delta del Po si osserva un diverso andamento dovuto alle particolari condizioni redox dei sedimenti di Marano. Tale potenziale porta alla destabilizzazione di alcune fasi geochimiche e porta ad una trasformazione delle specie chimiche presenti con conseguente loro ridistribuzione alle fasi geochimiche che sono stabili in quelle determinate condizioni.

4.4.6 Mercurio

All'interno del progetto "MIRACLE" (*Mercury Interdisciplinary Research for Appropriate Clam farming in a Lagoon Environment*) è stata investigata ampiamente la distribuzione spaziale del mercurio e le sue relazioni con il metilmercurio (MeHg) e per farlo, sono stati analizzati la materia organica presente, e molti parametri geochimici riguardanti i sedimenti superficiali.

Si è ormai appreso che il durevole e predominante impatto dato dalla presenza di materiale particolato comprendente cinabro (HgS) è stato più volte verificato attraverso indagini geochimiche effettuate su carotaggio di sedimento. Si è inoltre osservato come il mercurio sia primariamente associato al particolato fine (<63 µm) derivante dal trasporto e dalla dispersione degli apporti fluviali che costituiscono un input continuo grazie anche alle continue azioni erosive provocate dai flussi mareali.

Le indagini, hanno evidenziato che la presenza di solfuri di mercurio nella frazione sabbiosa dei sedimenti si verifica soprattutto per i sedimenti della zona orientale della laguna di Grado e Marano, mentre la distribuzione del MeHg non sembra essere distribuita prevalentemente in alcune zone piuttosto che in altre. Le maggiori concentrazioni di MeHg non sono correlate direttamente con la presenza negli stessi sedimenti di grosse concentrazioni di Hg totale, a riprova del fatto che la presenza in una certa concentrazione del metallo non è un fattore limitante alla formazione di MeHg, tali evidenze suggeriscono che fattori di maggiore rilievo sono quelli ambientali e/o legati alla speciazione del metallo stesso (Covelli, 2012).

I valori di concentrazione di Hg totale, ottenute dalla completa digestione dei sei campioni di sedimento prelevati nei due orti di coltivazione della Laguna di Marano, sono superiori ai valori in genere rilevati negli orti di coltivazione della laguna di Venezia e del Delta del Po (Baccarani, 2012).

Il particolare, il sito 16 UD acque presenta valori di concentrazione di Hg 2,5 volte maggiori rispetto al sito 15 UD tapo. In entrambi i siti, la distribuzione del mercurio appare omogenea con concentrazioni totali che ricalcano in maniera coerente i dati presenti in letteratura per il mercurio totale nei due siti (Acquavita et al., 2012). Meno omogenei sono i risultati ottenuti nella speciazione geochimica.

Tabella 4.11 valori di concentrazione di Hg riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w; è riportata anche la somma delle fasi e la resa della procedura di speciazione, calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Hg nei sedimenti.

Hg	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	Residuale	somma fasi	Totale	Resa
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
16 UD Acque	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	1,12	1,17	2,64	44,50
	0,00	0,00	0,00	0,01	0,05	1,10	1,16	2,46	47,21
	0,00	0,00	0,00	0,01	0,05	1,89	1,94	2,33	83,44
15 UD Tapo	0,00	0,00	0,00	0,16	0,04	0,51	0,71	0,86	82,74
	0,00	0,00	0,00	0,17	0,07	0,61	0,85	1,02	82,78
	0,00	0,00	0,00	0,16	0,01	0,45	0,62	0,97	63,38

In particolare, i risultati della speciazione geochimica dimostrano che il mercurio presente nel sedimento è quasi totalmente associato alla frazione residuale, analogamente a quanto verificato per le aree di coltivazione della Laguna di Venezia e del Delta del Po (Baccarani, 2012). Inoltre, le prime tre fasi non contengono quantità rilevanti di Hg, mentre relativamente piccole quantità sono presenti nella terza fase B e nella quarta fase. Alcune discrepanze sono evidenziate dal confronto tra la somma delle concentrazioni rilevate nelle singole fasi e la concentrazione totale ottenuta dalla digestione completa del sedimento, utilizzato per valutare la resa della speciazione geochimica.

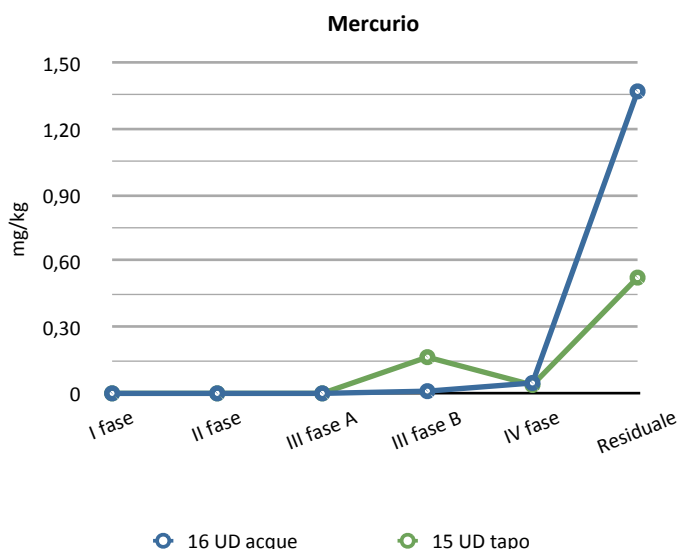


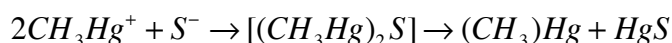
Figura 4.15 valori medi di concentrazione di Hg riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.

All'interno dello stesso orto di coltivazione, alcuni campioni hanno dato rese sufficientemente in linea con quelle degli altri metalli anche considerando la complessità del protocollo di speciazione. Al contrario, altri campioni danno rese inferiori, anche del 50% come se durante le estrazioni fosse andato persa una parte di Hg oppure che una parte non si sia solubilizzata.

Per la comprensione di questi risultati, è utile approfondire il comportamento, le trasformazioni e il destino che le varie specie chimiche di Hg presenti nell'ambiente possono subire.

A seconda della condizioni biogeochimiche presenti nel sedimento, il mercurio può presentarsi sotto varie forme chimiche.

In particolare, nelle condizioni biogeochimiche dei sedimenti della Laguna di Marano (pH 7,5 e condizioni fortemente anaerobiche) il mercurio immesso nell'ambiente può dare origine a diverse specie derivate. In ambiente aerobico, può presentarsi sotto forma di mercurio ionico (Hg^{2+}) e metilmercurio (CH_3Hg^+), dimetilmercurio ($(CH_3)_2Hg$) e come mercurio metallico elementare (Hg^0). In sedimenti anossici, Hg^{2+} interagisce con l'idrogeno solforato, H_2S , prodotto dai batteri solfato-riduttori, dando istantaneamente origine al metacinnabro, una forma molto stabile del mercurio. La stessa reazione avviene anche con il metilmercurio:



Quindi, in condizioni anaerobiotiche e in presenza di grandi quantità di H_2S , le specie stabili presenti nel sedimento sono prevalentemente HgS e $(CH_3)_2Hg$ che rapidamente volatilizza.

Per poter dare una risposta alle discrepanze rilevate nella speciazione diventa indispensabile effettuare la speciazione chimica del mercurio nel sedimento per individuare le specie chimiche prevalenti nelle varie condizioni. Tale problema verrà affrontato in un futuro studio specifico.

4.4.7 Nichel

Tabella 4.12 Valori di concentrazione di Ni riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w; è riportata anche la somma delle fasi e la resa della procedura di speciazione, calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Ni nei sedimenti.

Ni	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	Residuale	somma fasi	Totale	Resa
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
16 UD Acque	0,89	5,19	3,24	6,44	3,56	9,80	29,12	29,29	99,41
	0,75	5,00	2,95	5,66	3,54	10,72	28,61	31,74	90,12
	0,72	4,80	2,92	5,56	3,72	10,26	27,98	31,80	88,00
15 UD Tapo	0,94	5,63	3,18	3,89	2,54	3,53	19,71	21,50	91,67
	0,94	5,56	3,44	4,18	2,32	2,90	19,35	20,43	94,72
	0,92	5,05	3,26	3,54	1,94	2,67	17,37	20,32	85,46

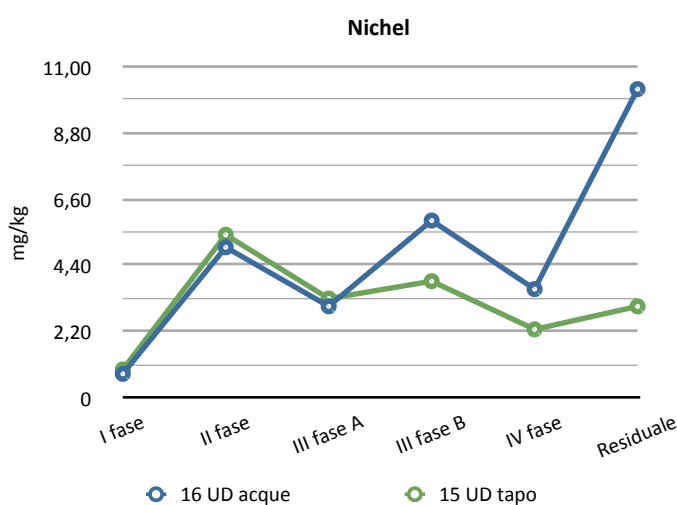


Figura 4.16 Valori medi di concentrazione di Ni riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.

Per la distribuzione nelle varie fasi geochimiche del Nichel, valgono le considerazioni fatte per i metalli associati prevalentemente a ossidi e idrossidi di Fe e Mn. Alle condizioni redox dei siti presi in considerazione, il Ferro e il Manganese si riducono consentendo la solubilizzazione dei metalli ad essi associati. Ecco perché è possibile trovare Nichel in seconda fase oltre che in terza fase A, in terza fase B e in residuale. Anche per questo metallo, le concentrazioni maggiori si riscontrano per il sito 16 UD acque.

4.4.8 Piombo

Tabella 4.13 Valori di concentrazione di Pb riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.; è riportata anche la somma delle fasi e la resa della procedura di speciazione, calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Pb nei sedimenti.

Pb	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	Residuale	somma fasi	Totale	Resa
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
16 UD Acque	0,13	6,62	1,51	0,31	0,27	2,50	11,34	10,80	105,02
	0,10	5,73	1,43	0,33	0,22	3,05	10,86	12,81	84,76
	0,09	5,38	1,52	0,34	0,26	2,78	10,36	11,02	94,04
15 UD Tapo	0,25	2,78	0,47	0,20	0,23	2,06	5,98	6,23	96,01
	0,15	2,60	0,42	0,20	0,25	1,69	5,30	5,55	95,49
	0,13	2,41	0,46	0,18	0,19	1,77	5,14	5,48	93,82

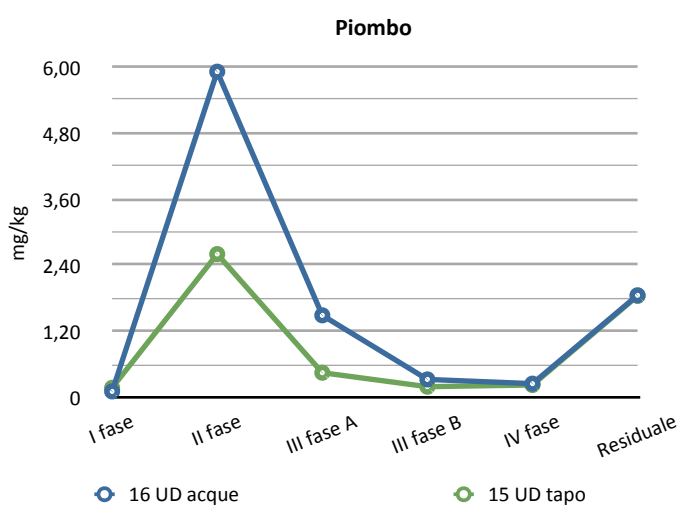


Figura 4.17 vValori medi di concentrazione di Pb riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.

Come è possibile rilevare dall'osservazione della tabella 4.13 e dalla figura 4.17 vi è una certa riproducibilità per quanto riguarda l'andamento della distribuzione delle concentrazioni di Piombo nelle diverse fasi geochimiche con particolare accento per quanto riguarda la seconda fase che per entrambi i siti è caratterizzata dalle concentrazioni maggiori del metallo. Anche in questo caso è possibile notare che il maggior quantitativo è riscontrabile nel sito 16.

Il Piombo, è solitamente legato agli ossidi e idrossidi di Fe e Mn più labili che a causa delle particolari condizioni redox vengono solubilizzati. Si può quindi supporre, che il Piombo, di per sé poco solubile, possa legarsi a carbonati e bicarbonati e tenda a precipitare, in questa forma chimica è possibile portarlo in soluzione già in seconda fase.

La quota evidenziata dalle prime fasi della geospeciazione è potenzialmente biodisponibile e quindi potenzialmente bioaccumulabile.

4.4.9 Zinco

Tabella 4.14 Valori di concentrazione di Zn riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w; è riportata anche la somma delle fasi e la resa della procedura di speciazione, calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Zn nei sedimenti.

Zn	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	Residuale	somma fasi	Totale	Resa
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
16 UD Acque	5,13	13,56	12,64	20,56	15,79	10,45	78,14	74,09	105,46
	4,77	10,74	12,30	21,49	15,63	18,41	83,34	81,08	102,79
	4,60	9,80	12,43	18,74	15,69	14,43	75,70	78,99	95,82
15 UD Tapo	7,29	7,74	9,77	14,48	14,15	4,81	58,24	56,01	103,98
	8,95	7,09	9,30	13,20	11,33	1,37	51,23	48,36	105,93
	8,53	6,34	8,81	12,13	10,11	3,09	49,01	68,08	71,99

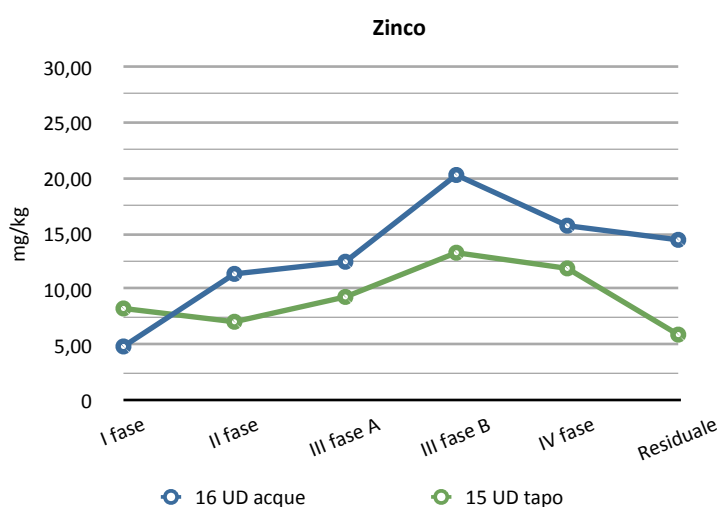


Figura 4.18 Valori medi di concentrazione di Zn riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg d.w.

Lo Zinco è un metallo praticamente ubiquitario, in effetti, ne troviamo un certo quantitativo in tutte le fasi della speciazione geochimica. La distribuzione della sua concentrazione è, anche in questo caso, sovrapponibile tra i due siti, anche se il sito 16 si mantiene quello tra i due portatore del contenuto maggiore fuorché per la prima fase dove il sito 15 mostra di avere le concentrazioni maggiori.

Lo Zinco e il Cadmio sono associati perché omologhi chimicamente, ma si differenziano nel metabolismo che l'organismo target mette in atto per ciascuno di essi, per l'approfondimento si rimanda al capitolo 4.7 (bioaccumulo).

4.4.10 Confronto tra i due siti sulla base della speciazione geochimica

Attraverso la figura 4.19 è possibile confrontare i due siti per quanto riguarda il pattern di distribuzione degli elementi al fine di comprendere in maniera olistica quali siano le condizioni di contaminazione del sedimento a livello percentuale e per quanto riguarda il livello di biodisponibilità dei vari metalli e metalloidi.

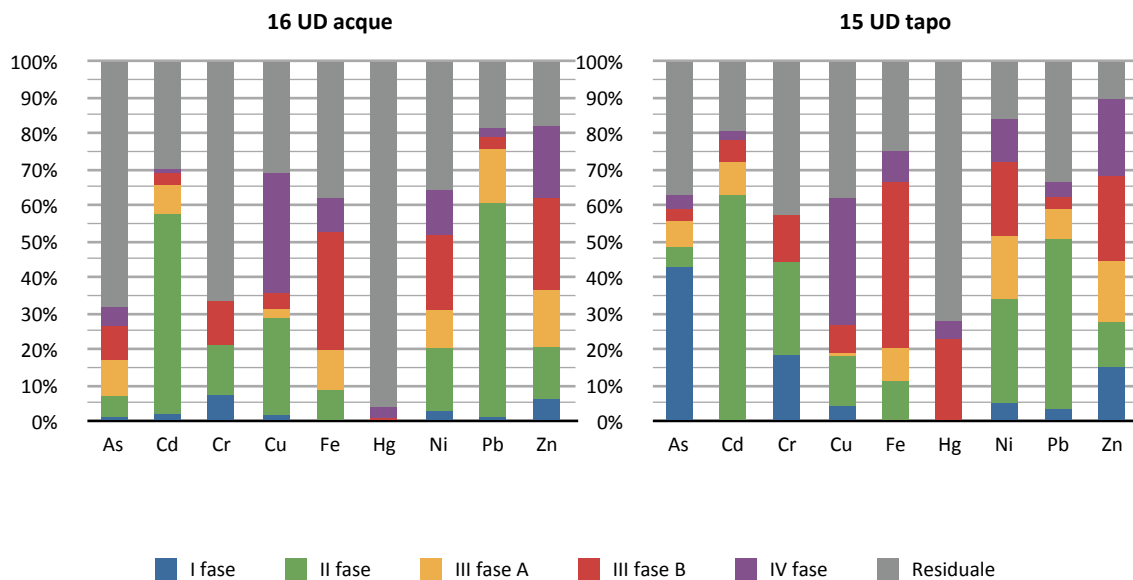


Figura 4.19 Valori medi di concentrazione di tutti i metalli riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in percentuale.

Ad esempio, si può notare come per l'Arsenico i due siti siano in condizioni abbastanza differenziate con una quota oltre il 40% presente in prima fase per il sito 15 UD, mentre invece questo sia praticamente assente in prima fase nel sito 16 UD.

Oppure si può notare anche la diversa situazione nei due siti per quanto riguarda il Mercurio che nel sito 16 UD è presente quasi unicamente in residuale, mentre per il sito 15 se ne può riscontrare una percentuale attorno al 25% in terza fase B.

Anche per il Piombo possiamo notare come nel sito 15 UD ve ne sia una certa percentuale (8%) in prima fase, cose che non si verifica per il sito 16 UD; entrambi i siti, d'altra parte, sono caratterizzati da una seconda fase che pesa per il 55-60%.

Per gli altri metalli, la distribuzione percentuale è piuttosto riproducibile fra i due siti, pur variando in percentuale la quota di metallo potenzialmente biodisponibile rispetto al totale.

4.5 ANALISI DI STATISTICA MULTIVARIATA SUI DATI GEOCHIMICI

Per ottenere un maggiore approfondimento nell'analisi dei risultati ottenuti, si è proceduto con l'analisi statistica multivariata. Attraverso una analisi cluster prima e mediante l'analisi delle componenti principali poi, si è cercato di riconoscere eventuali relazioni tra le variabili e i campioni nell'impossibilità di effettuare delle analisi di correlazione disponendo soltanto di due siti di campionamento con tre prelievi ciascuno.

4.5.1 Cluster analysis

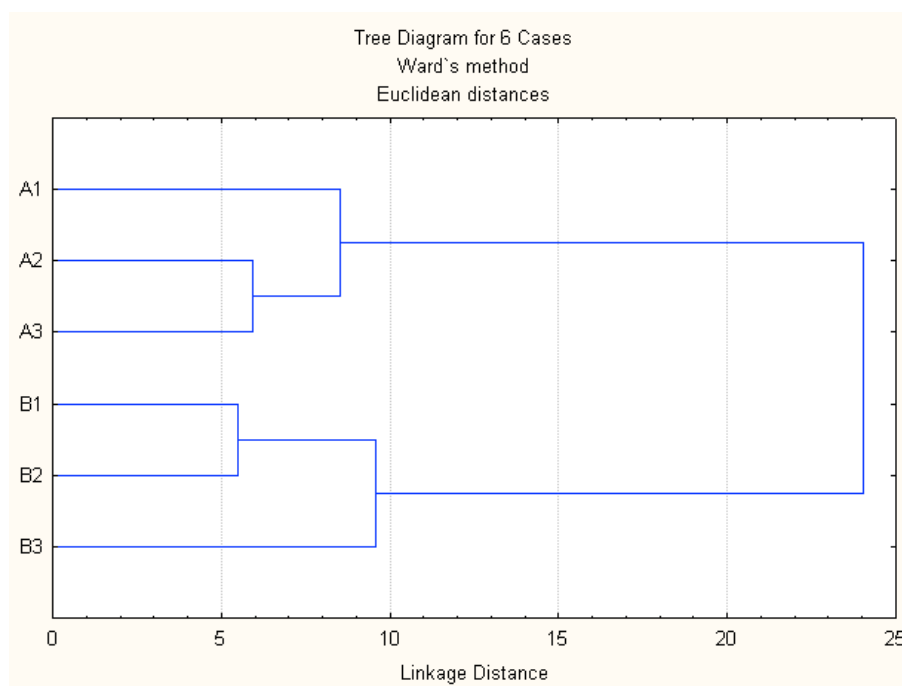


Figura 4.20 Cluster analysis eseguita in R-mode sulla matrice dei dati geochimici normalizzata attraverso un algoritmo di ranchizzazione.

Attraverso l'analisi cluster presentata in figura 4.20, è possibile osservare come i campioni relativi agli stessi siti si uniscano prima fra loro e si distinguano da quelli dell'altro sito. Tale informazione può sembrare scontata poiché corrispondente alle attese. Tuttavia, è importante sottolineare che tale configurazione che è il risultato dell'analisi di tutti i dati relativi alle concentrazioni dei metalli e metalloidi nelle varie fasi della geospeciazione. Esiste quindi, un potere discriminante esercitato da questi dati sui campioni importante da tenere in considerazione.

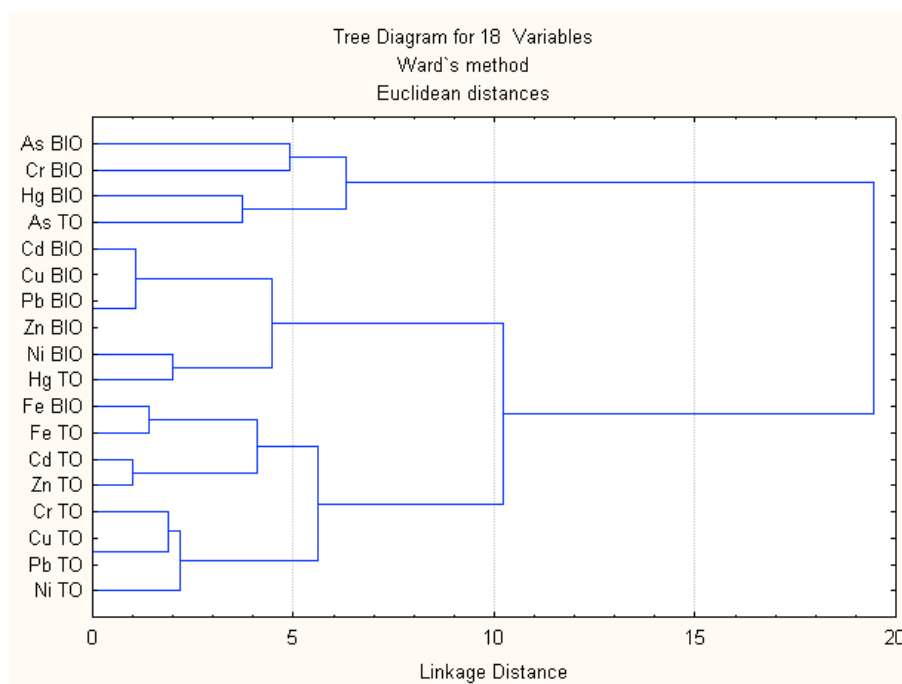


Figura 4.21 Cluster analysis eseguita in Q-mode sulla matrice dei dati geochimici normalizzata attraverso un algoritmo di ranchizzazione.

L'analisi cluster eseguita in Q-mode, poi, evidenzia come si raggruppano le variabili tra loro considerando il contenuto totale (indicato con "TO") per ciascun metallo e il contenuto potenzialmente biodisponibile (v. paragrafo 4.5 "fattore di bioaccumulo") indicata con "BIO".

Si evidenzia un pattern abbastanza variegato dove è possibile riconoscere che le variabili legate all'As (As BIO e As TO) insieme a Cr BIO e Hg BIO si separano dalle altre e vi si uniscono ad una certa distanza. Questa informazione può far supporre per l'Arsenico una variabilità differenziata rispetto a quella degli altri metalli e delle dinamiche chimiche autonome.

Non c'è una netta separazione fra il gruppo di variabili BIO e TO, tuttavia, fatta eccezione per il Fe BIO e l'As TO si può comunque apprezzare una certa separazione tra le variabili di concentrazione totale e biodisponibile.

Questo, mette in luce il diverso comportamento dei vari elementi rispetto agli stimoli chimici dati dalla speciazione che è in grado di far luce sull'effettiva biodisponibilità dei contaminanti presi in esame, al netto di una certa quota di incertezza dovuta alla complessità stessa della procedura.

4.5.2 Analisi delle componenti principali (PCA)

Sugli stessi dati, è stata svolta anche l'analisi delle componenti principali, al fine di comprendere in che modo le variabili potessero tra loro avere delle relazioni statistiche spiegate dagli autovalori e se i campioni presi in esame potessero essere distinti e rispetto a quali variabili.

A partire dallo scree plot visibile in figura 4.14 è stato possibile valutare quali fattori fossero maggiormente rilevanti per spiegare la maggior quota di variabilità possibile. Il primo fattore spiega il 67,28% della variabilità e il secondo il 16,93%: complessivamente l'84,21%. È stato quindi deciso di prendere in considerazione i primi due anche perché tutte le variabili vi compaiono con un peso significativo (maggiore di 0,70).

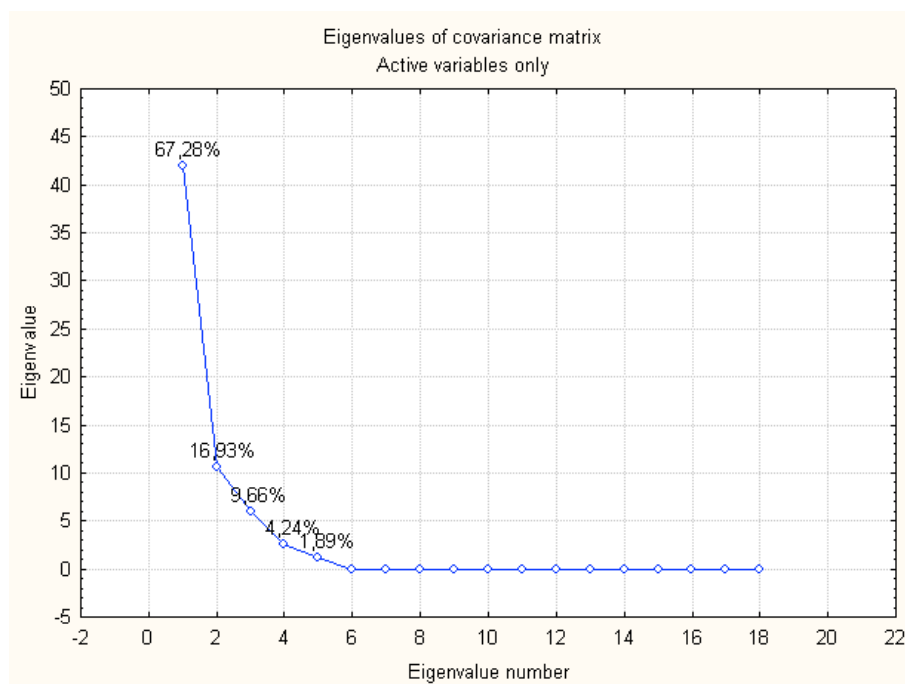


Figura 4.22 Scree plot relativo all'analisi delle componenti principali eseguita sulla matrice dei dati geochimici normalizzata attraverso un algoritmo di ranchizzazione.

In figura 4.22 è possibile visualizzare il loading plot che tiene in considerazione il primo e il secondo fattore. Da qui è possibile notare come il primo fattore abbia valenza significativa nel separare un gruppo consistente di variabili con valori di loading negativi rispetto a delle variabili che non hanno praticamente peso in prima componente (Hg BIO e Cr BIO) e all'As BIO che è l'unica variabile ad avere un valore di loading positivo e che pesa molto (0,91) in prima componente.

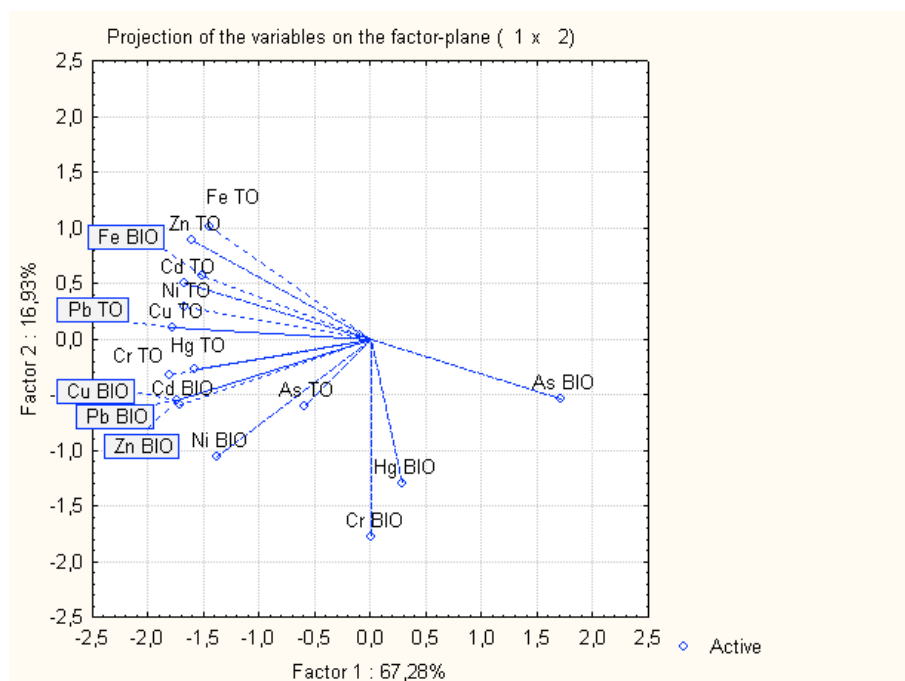


Figura 4.23 Loading plot (primo e secondo fattore) relativo all'analisi delle componenti principali eseguita sulla matrice dei dati geochimici.

I campioni, quindi, a partire dalla prima componente principale vengono segregati tra quelli a maggior concentrazione della maggior parte dei metalli (quadranti terzo e quarto, gruppo A 1,2,3) e quelli a maggior contenuto di arsenico biodisponibile e minor contenuto degli altri metalli (gruppo B 1,2,3).

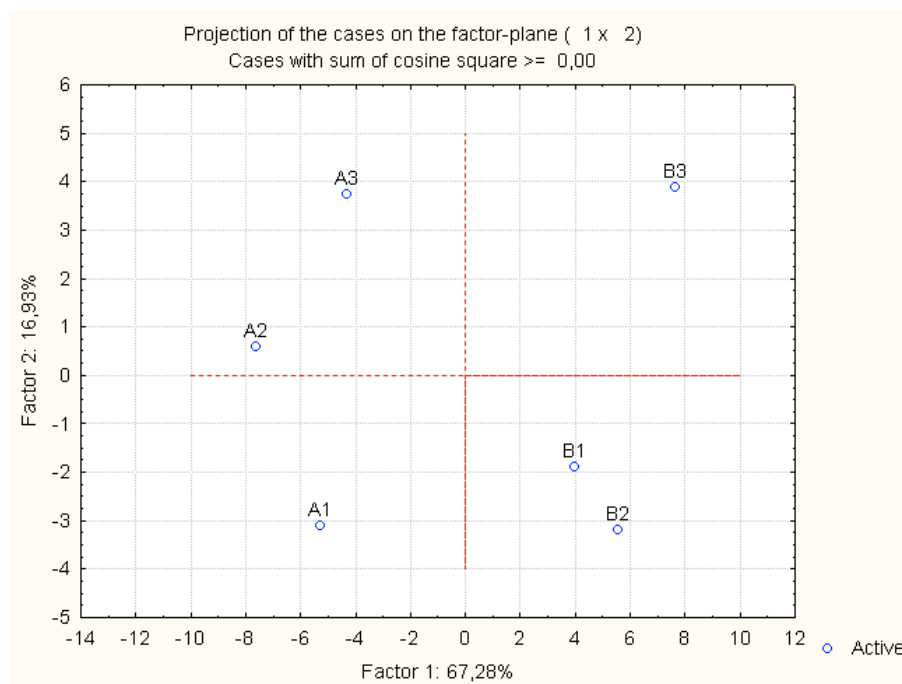


Figura 4.24 Analisi delle componenti principali eseguita sulla matrice dei dati geochimici.

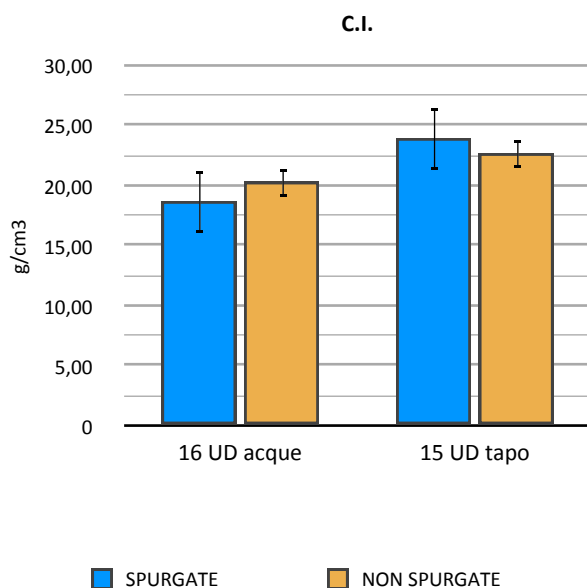
La seconda componente principale invece, fa una distinzione sulla base del contenuto totale di metalli (variabili che pesano quasi tutte positivamente in seconda componente -fatta eccezione ancora una volta per il Hg totale che però ha un peso irrisorio-) e sul contenuto biodisponibile (variabili che pesano quasi tutte negativamente in seconda componente, fatta eccezione per il Fe BIO -come accadeva nella cluster- che ha comunque un basso peso).

Vengono così distinti i campioni che hanno maggiore contenuto totale di metalli rispetto a quelli che, invece, ne hanno un maggiore contenuto biodisponibile. Tale informazione è quasi più significativa per le deduzioni che si possono fare sulle variabili, poiché i campioni stessi sono troppo pochi per poter fare dei ragionamenti su scala spazio temporale a partire da questi soli dati. Sarà necessario coadiuvare la comprensione con l'analisi dei dati fisiologici che sintetizzano nello spazio e nel tempo le condizioni ambientali consentendo una comprensione maggiore delle condizioni ambientali presenti nei due siti.

È comunque interessante rilevare come vi sia una certa separazione tra le variabili di concentrazione biodisponibile e la concentrazione totale: questa conferma data dalla statistica consente di considerare la speciazione un buono strumento per individuare con una certa significatività la quota biodisponibile del contenuto di metalli nella matrice analizzata.

4.6 INDICI DI CONDIZIONE

Il C.I. è un parametro largamente utilizzato nei programmi di monitoraggio ambientale, dal momento che integra risposte fisiologiche allo stress con cambiamenti nella crescita somatica; oltre ad indicare la qualità commerciale di una popolazione di Bivalvi può essere usato anche per confrontare la salute relativa di organismi di popolazioni vicine (Sasikumar & Krishnakumar, 2010).



4.26 Istogrammi illustranti i valori di indici di condizione espressi in g/cm³

Nelle Figura 4.26 sono riportati gli istogrammi che mettono in evidenza l'andamento medio di questo parametro per tutte le stazioni considerate, confrontando i dati relativi al sito 16 UD acque con quelli del sito 15 UD tapo; in particolare, la figura mostra il grafico relativo al CI calcolato considerando i tessuti degli organismi sia spurgati che non spurgati. La situazione che si presenta è inversa per i due siti tra organismi spurgati e non spurgati, in particolare gli organismi spurgati del sito 16 hanno valori più bassi di indici di condizione rispetto agli organismi non spurgati, mentre per il sito 15 si verifica il contrario. La variazione poco significativa degli indici di condizione tra organismi spurgati e non spurgati, consente di rilevare una condizione fisiologica di rapporto di peso su volume che non denota particolari criticità risolte dalla depurazione, inoltre, va ricordato che lo spurgo, durante il quale non viene somministrato nutrimento, può rappresentare una condizione di ulteriore stress per l'organismo.

In generale si può dire che il sito 15 abbia complessivamente i valori più elevati di C.I. e che le condizioni di salute degli organismi siano quindi migliori rispetto all'altro sito, che risulta effettivamente caratterizzato dalle concentrazioni maggiori di contaminanti inorganici.

Da un rapido confronto con i dati rilevati per la laguna di Venezia e in aree di coltivazione del Delta del Po, si può dire che, in generale, questi valori sono in media più bassi (18 e 20 g/cm³), ma talvolta sovrapponibili a valori calcolati per organismi provenienti dalle zone meridionali della Laguna veneta.

4.7 BIOACCUMULO

La valutazione della qualità dei sedimenti è una tematica molto complessa. Molti sono gli approcci attraverso i quali è possibile ottenere delle informazioni sullo stato della contaminazione e sui possibili effetti per il biota: l'analisi chimica fornisce le concentrazioni dei contaminanti ricercati nel sedimento o nelle matrici ad esso associate, ma non fornisce risposte sugli effetti per gli organismi; i test di tossicità forniscono una risposta integrata degli effetti, ma essendo condotti in laboratorio, è difficile interpretarne il reale significato ecologico; le analisi di bioaccumulo danno informazioni sulla presenza di inquinanti non rilevabili nelle matrici abiotiche, sulla biodisponibilità e sul possibile trasferimento del contaminante nella catena alimentare; le condizioni della comunità bentonica forniscono una stima ed il rischio legato alla contaminazione dei sedimenti ma sono potenzialmente influenzate da altri fattori come il disturbo fisico o l'ipossia.

Ogni approccio utilizzato presenta quindi dei vantaggi e dei limiti. È impensabile utilizzare simultaneamente tutti gli approcci; è consigliato l'impiego contemporaneo di almeno due delle metodologie per arrivare ad una valutazione integrata dei sedimenti (Volpi Ghirardini, 2012).

Volendo approfondire l'interazione esistente tra metalli e organismi, è evidente che vi è una intima associazione tra ioni ed enzimi in molti processi metabolici tra cui l'attivazione dei substrati, le reazioni di ossidoriduzione, e la protezione delle cellule dai prodotti tossici. In particolare nei Molluschi, tra gli elementi necessari in traccia sono stati oggetto di studio e risultano pertanto ben conosciuti parecchi metalloenzimi, (ad es. Cu in citocromo ossidasi; Mo in aldeide ossidasi) in cui i metalli svolgono sia il ruolo di co-fattori enzimatici quindi facenti parte integrante della molecola, sia quali metalli attivanti non associati strutturalmente alla parte proteica (enzimi metallo-attivati; *ad es Ca nella amilasi, Zn nella anidrase carbonica*). Nei molluschi si conoscono molto bene anche le funzioni metallo-dipendenti svolte dai pigmenti respiratori: dall'emoglobina contenente Fe nel sangue dei Lamellibranchi, all'emocianina contenente Cu nel sangue dei Gasteropodi. Inoltre, i citocromi della catena respiratoria funzionanti a Fe e Cu permettono nei Molluschi, come in altri organismi, di trasportare gli elettroni all'ossigeno molecolare da ridurre ad acqua. Reazione questa di estrema pericolosità per la cellula, che ne controlla i composti intermedi (superossido, perossido e ione idrossilico) proprio da metalloenzimi come la superossido dismutasi (Cu, Zn e Mn), la perossidasi (Fe) e la catalasi (Fe).

Vi è però un grosso paradosso correlato con la biochimica degli ioni metallici. Molti metalli sono, infatti, disponibili solamente in tracce: il Co ha un contenuto medio in mare di appena $8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; il Fe pur essendo abbondante e comune sulla superficie terrestre non è altrettanto disponibile essendo il suo prodotto di solubilità in acqua di mare (come idrossido ferrico, $\text{Fe}(\text{OH})_3$) di appena 10^{-38} M . A questo si aggiunga che vi sono effettive difficoltà da parte di un organismo, e il Molluschi non si discostano, di eseguire assorbimento (*uptake*) e trasporto del metallo all'interno dell'organismo stesso. Si sono perciò evoluti dei sistemi di stoccaggio che assicurano all'organismo di non esserne mai in deficit. Parallelamente, la reattività di questi ioni ha portato allo sviluppo di sistemi di detossificazione altrettanto comuni.

Pertanto, **Na, K, Mg, Ca, Mo, Fe, Cu, Co, Zn** sono ritenuti metalli essenziali per tutti gli organismi viventi poichè sono in effetti presenti in tutti i tessuti in concentrazioni abbastanza costanti, sono capaci di indurre anomalie fisiologiche se vengono a mancare all'organismo e sono però capaci di riparare a tali anomalie una volta reintrodotti. Tuttavia la loro concentrazione è sempre molto bassa, in traccia per l'appunto poichè la presenza di una quantità elevata rispetto al necessario potrebbe infatti indurre effetti tossici non solo di per se stessa, ma anche perché il metallo essendo prevalente potrebbe spiazzare (chimicamente) altri ioni, causandone una ridistribuzione ed inficiandone di conseguenza la funzione (Manente, 2001).

4.7.1 Effetti della depurazione dell'organismo ai fini della carica inquinante inorganica

L'operazione di spurgo degli organismi è una prassi che avviene in impianti certificati al fine di garantire la salubrità del pescato dal punto di vista microbiologico (controlli a valle del trattamento su *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*) e contemporaneamente, rimuovendo il sedimento dall'interno dell'organismo, ne migliora anche le caratteristiche organolettiche.

Dal punto di vista ambientale ed ecotossicologico, è interessante valutare come lo spurgo, o meglio la depurazione degli organismi intervenga nell'abbattimento della carica inquinante inorganica e come ciò avvenga in modo differenziale a seconda che si prendano in considerazione i tessuti extraghiandolari o l'epatopancreas.

Infatti, grazie al confronto tra organismi spurgati e non spurgati, è possibile comprendere quale sia la concentrazione di contaminante presente all'interno dell'organismo, ma anche verificare la variazione di tale concentrazione una volta che il sedimento presente nell'organismo prima dello spurgo sia per gran parte eliminato.

Questo confronto consente anche di comprendere se e come le operazioni di spurgo, condotte con acque marine provenienti dagli stessi siti di coltivazione, possano influire sulla concentrazione dei contaminanti stessi nei tessuti.

Ecco perché si è proceduto con un confronto delle concentrazioni dei vari metalli prima e dopo lo spurgo.

Di seguito si riportano i dati relativi alle concentrazioni dei vari metalli e metalloidi analizzati relativamente al loro contenuto totale nell'organismo (ST), al loro contenuto nell'epatopancreas (EP) e nei tessuti residui alla dissezione di tale organo (ST-EP).

Tab. 4.15 Contenuto di metalli e metalloidi nei campioni di organismo non spurgato sito 16 UD acque (d.w.).

16 UD acque (NON spurgate)	As (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Hg (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
<i>tessuti totali</i>	17,08	0,40	4,77	7,37	1561,06	1,84	11,48	1,31	71,69
<i>epatopancreas</i>	23,32	0,44	3,50	28,20	871,52	2,51	10,89	0,87	90,81
<i>tessuti residui</i>	16,11	0,38	5,06	5,69	1802,35	1,91	11,80	0,98	72,13

Tab. 4.16 Contenuto di metalli e metalloidi nei campioni di organismo spurgato sito 16 UD acque (d.w.).

16 UD acque (spurgate)	As (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Hg (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
<i>tessuti totali</i>	12,72	0,28	2,42	6,94	278,88	1,02	7,68	0,26	80,14
<i>epatopancreas</i>	25,18	0,76	3,04	19,74	612,57	1,86	12,05	1,45	95,27
<i>tessuti residui</i>	15,45	0,31	2,90	5,33	336,54	1,21	9,44	0,25	69,43

Tab. 4.17 Contenuto di metalli e metalloidi nei campioni di organismo non spurgato sito 15 UD tapo (d.w.).

15 UD tapo (NON spurgate)	As (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Hg (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
<i>tessuti totali</i>	18,27	0,14	4,15	6,72	1.086,25	0,92	8,64	0,91	58,73
<i>epatopancreas</i>	27,05	0,11	3,25	22,56	429,11	1,61	9,6	0,44	74,91
<i>tessuti residui</i>	17,23	0,15	3,89	4,69	997,11	0,9	9,17	0,64	55,22

Tab. 4.18 Contenuto di metalli e metalloidi nei campioni di organismo spurgato sito 15 UD tapo (d.w.).

15 UD tapo (spurgate)	As (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe(mg/kg)	Hg (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
<i>tessuti totali</i>	21,83	0,18	2,56	6,72	257,48	0,88	9,81	0,26	72,45
<i>epatopancreas</i>	34,87	0,17	2,89	21,12	409,47	1,08	11,38	0,78	97,41
<i>tessuti residui</i>	21,87	0,18	2,62	5,36	236,49	0,92	8,61	0,24	71,72

È evidente come lo spurgo, portando all'eliminazione del contenuto di sedimenti e particolato all'interno del lume digerente dell'organismo, comporti allo stesso tempo una riduzione di concentrazione della maggior parte dei metalli a questo legati. Ciononostante, si assiste ad un evento a prima vista anomalo: in molti casi si è registrato, infatti, un aumento del contenuto negli organismi spurgati rispetto a quelli non spurgati.

Inoltre, risulta altrettanto chiaro come il comportamento dell'epatopancreas sia differente rispetto a quello del resto dei tessuti per molti elementi tra quelli considerati.

Ad esempio, le concentrazioni nei tessuti di **Piombo** e di **Ferro** subiscono un abbattimento decisamente significativo (rispettivamente dell' 80% e del 82% per il sito 16 e del 70% e del 76% per il sito 15), ma per quanto riguarda l'epatopancreas, la riduzione del piombo non si verifica, anzi, il metallo si concentra e il suo contenuto incrementa del 40% nel sito 16 e del 60% nel sito 15 (figure 4.25 e 4.26).

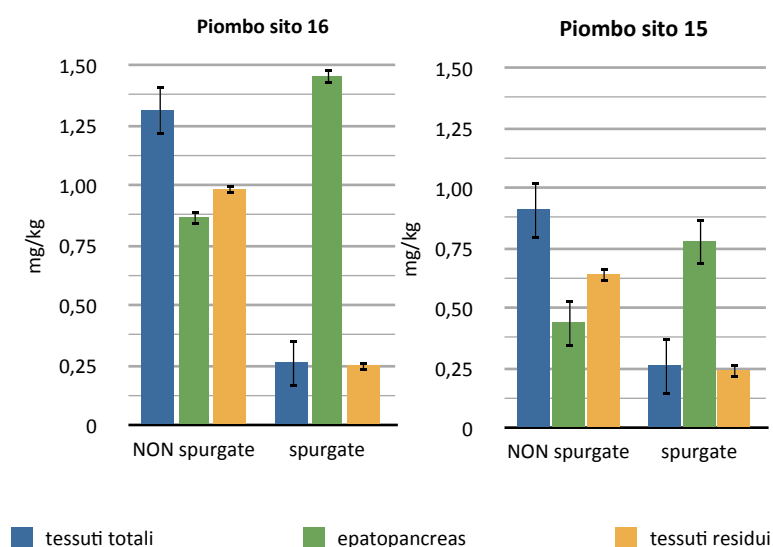


Figura 4.25 e 4.26 Concentrazioni di Piombo prima e dopo lo spurgo per i siti 16 e 15.

Per il Ferro (figure 4.27 e 4.28) invece, il contenuto dell'epatopancreas subisce una riduzione del 30% nel sito 16 e appena del 5% nel sito 15.

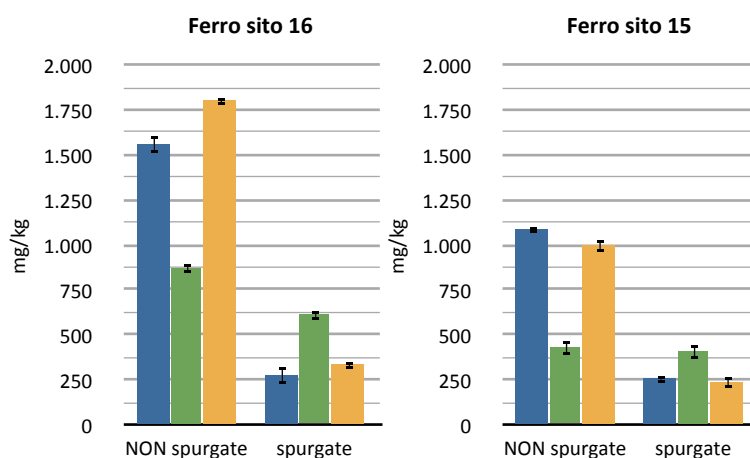


Figura 4.27 e 4.28 Concentrazioni di Ferro prima e dopo lo spurgo per i siti 16 e 15.

Le concentrazioni epatopancretiche di **Nichel** hanno un comportamento analogo, anche se in questo caso si tratta di variazioni meno significative. Invece, le concentrazioni del metallo nei tessuti si riducono dopo lo spurgo per il sito 16, mentre aumentano per il sito 15.

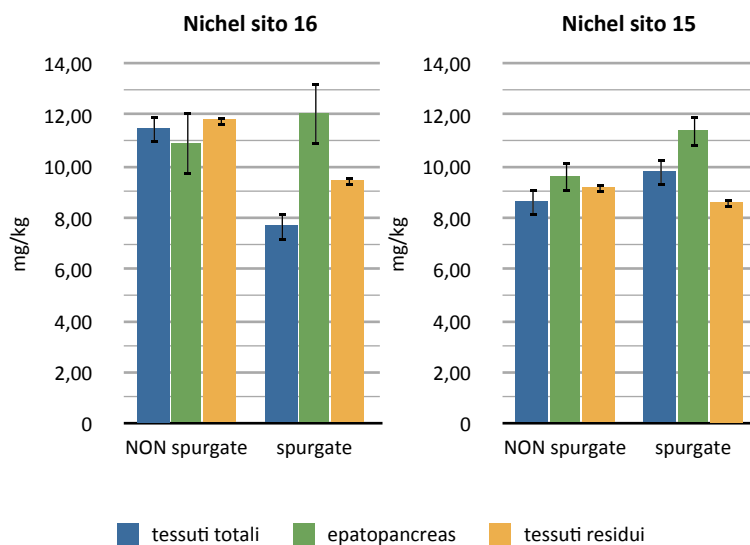


Figura 4.29 e 4.30 Concentrazioni di Nichel prima e dopo lo spurgo per i siti 16 e 15.

Il comportamento del **Rame** prima e dopo lo spurgo è analogo in entrambi i siti, infatti la sua concentrazione nei tessuti subisce una lieve riduzione, mentre per quanto riguarda il contenuto nell'epatopancreas, sebbene una certa riduzione sia riscontrabile, troviamo una concentrazione molto più elevata che nel resto dei tessuti (si veda il paragrafo 4.7 per le specifiche sul fattore di bioaccumulo).

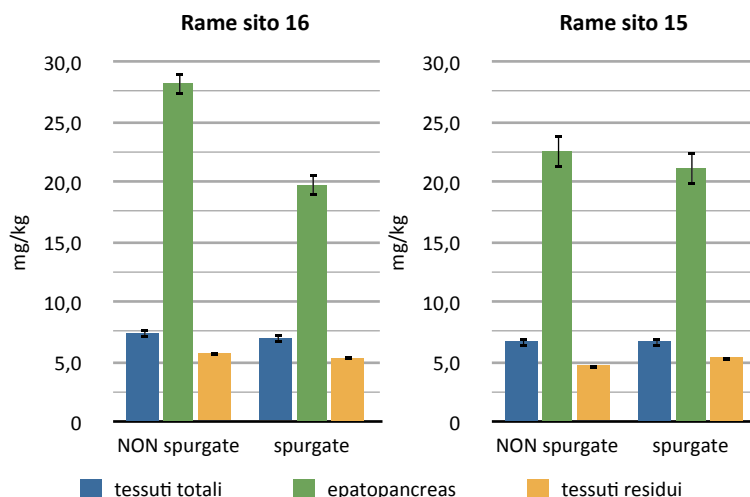


Figura 4.31 e 4.32 Concentrazioni di Rame prima e dopo lo spurgo per i siti 16 e 15.

Il Rame, del resto, essendo un metallo fisiologico, è presente nell'organismo ed è evidentemente stoccato per la maggior parte all'interno dell'epatopancreas che ne preserva una certa quantità sempre disponibile all'organismo al fine di garantirne la sopravvivenza e il fitness.

Per l'**Arsenico** si può osservare un effetto della depurazione abbastanza differente per i due siti e, in particolare, si può notare come la riduzione della concentrazione che interessa gli organismi del sito 16 non si riscontri invece nel sito 15 dove si verifica invece una concentrazione maggiore dopo lo spurgo. Per quanto riguarda l'epatopancreas, invece, per entrambi i siti si osserva una concentrazione maggiore dopo lo spurgo anche se il divario è più significativo per il sito 15.

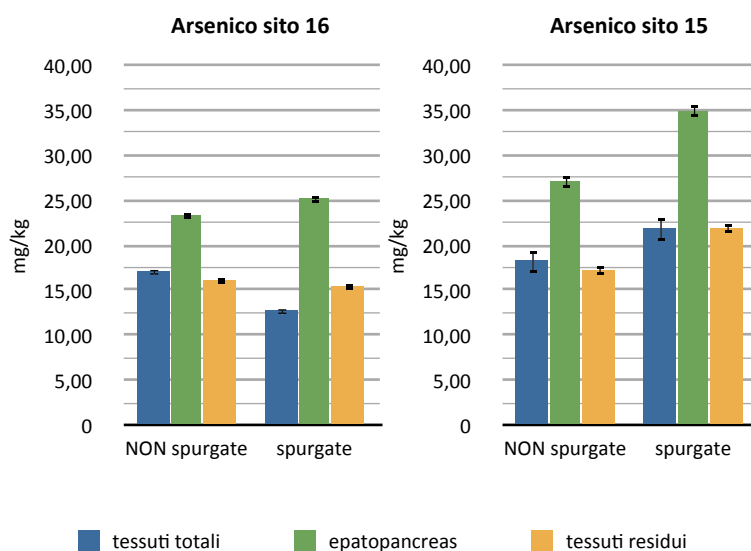


Figura 4.33 e 4.34 Concentrazioni di Arsenico prima e dopo lo spurgo per i siti 16 e 15.

Gli andamenti di concentrazione di **Zinco** tra organismo spurgato e non spurgato sono analoghi nei due siti, in entrambi i casi, infatti, si verifica un incremento della concentrazione dopo lo spurgo anche se in maniera più accentuata per il sito 15, sia per quanto riguarda i tessuti in generale che l'epatopancreas.

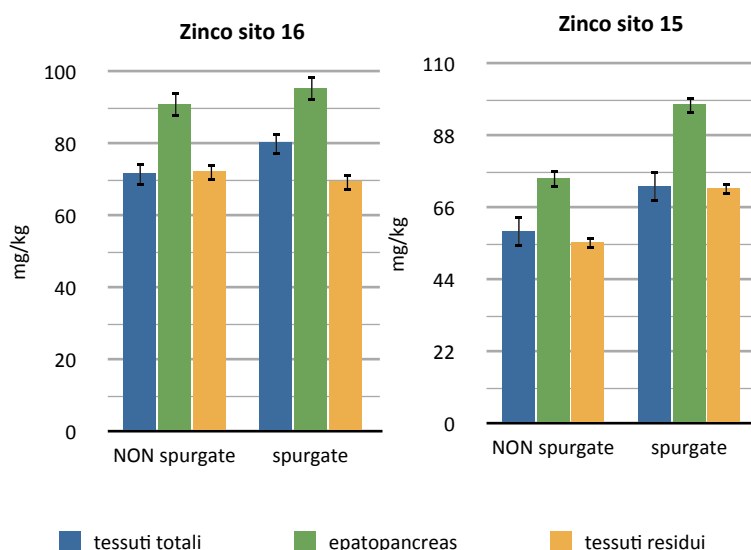


Figura 4.35 e 4.36 Concentrazioni di Zinco prima e dopo lo spurgo per i siti 16 e 15.

Il confronto tra i due siti per quanto riguarda gli effetti dello spurgo sulle concentrazioni di **Cadmio** mostra un andamento ben differenziato. Anzitutto è rilevante sottolineare come la concentrazione di questo metallo negli organismi sia nettamente inferiore per il sito 15 dove troviamo delle concentrazioni appena apprezzabili dagli strumenti di analisi, mentre il sito 16 è caratterizzato da concentrazioni superiori di tre volte per le non spurgate e di una volta e mezza per le spurgate. Se poi si confrontano le concentrazioni rilevate negli epatopancreas, si può riscontrare una concentrazione di addirittura il 35% superiore negli organismi spurgati del sito 15 rispetto ai non spurgati.

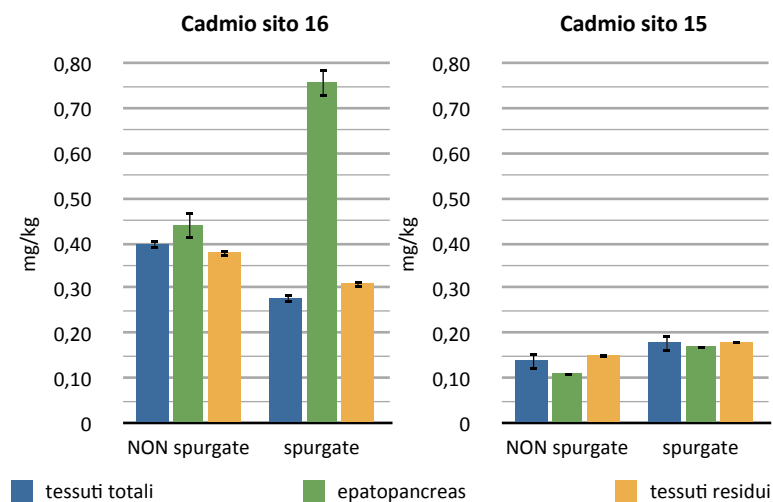


Figura 4.37 e 4.38 Concentrazioni di Cadmio prima e dopo lo spurgo per i siti 16 e 15.

Anche l'andamento delle concentrazioni di **Cromo** nei due siti prima e dopo lo spurgo risulta analogo: si ha una riduzione di concentrazione sia per i tessuti che per l'epatopancreas anche se in maniera più lieve per quest'ultimo che comunque mantiene concentrazioni minori rispetto ai tessuti, mentre leggermente maggiori dopo lo spurgo.

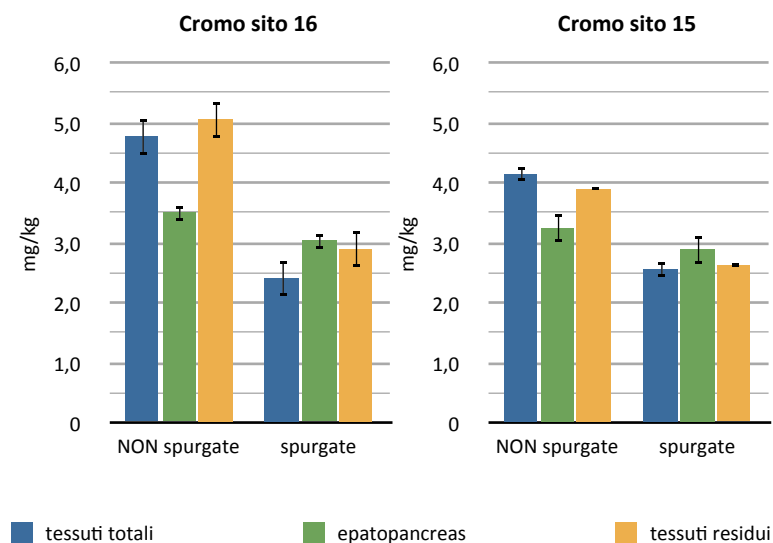


Figura 4.39 e 4.40 Concentrazioni di Cromo prima e dopo lo spurgo per i siti 16 e 15.

Il **mercurio** è presente in concentrazione circa doppia nel sito 16 rispetto al sito 15 sia nei tessuti che nell'epatopancreas degli organismi spurgati e non spurgati. È da notare come costantemente nell'epatopancreas sia sempre presente una concentrazione che nel resto dei tessuti e come lo spurgo intervenga in maniera comunque significativa per entrambi i compartimenti.

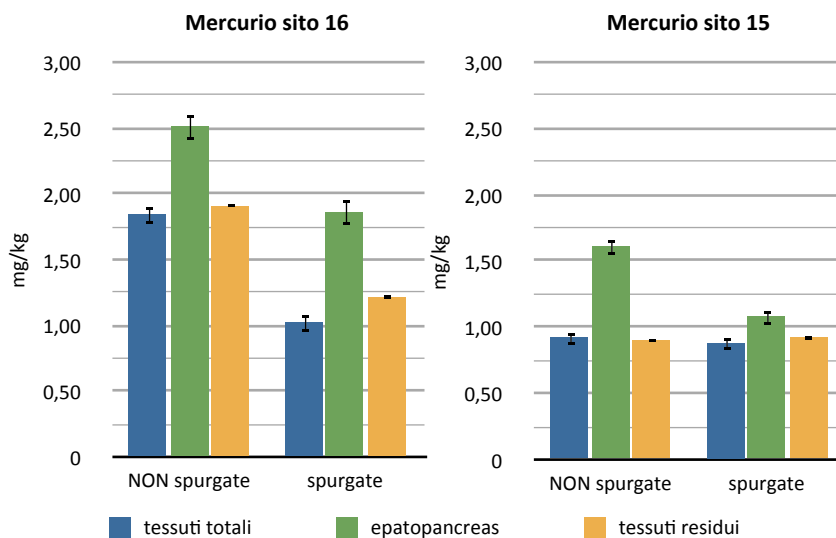


Figura 4.41 e 4.42 Concentrazioni di Mercurio prima e dopo lo spurgo per i siti 16 e 15.

A questo punto è interessante sottolineare che, a prescindere dal valore assoluto di concentrazione di ciascun metallo, il pattern di distribuzione si mantiene costante, si registra cioè lo stesso andamento di aumento o diminuzione percentuale prima e dopo lo spurgo (eccezion fatta per l'Arsenico dei tessuti totali che varia nei due siti). Si può notare, dunque, come il comportamento fisiologico della *R. philippinarum* sia mantenuto costante per i vari metalli e che non vi siano effetti eclatanti dovuti al differente grado di contaminazione; l'organismo *Ruditapes philippinarum* risponde sempre allo stesso modo alla presenza dei vari metalli: sarebbe interessante alla luce di questi risultati indagare e dettagliare in maniera effettivamente più specifica la tossicocinetica e la tossicodinamica di ognuno di tali metalli considerati, essendo la risposta dell'organismo così ripetuta.

Preme, d'altra parte, mettere in luce che per quanto riguarda i tessuti totali il contenuto di metallo (al di là di singoli casi, ovvero Zn per entrambi i siti, As e Cd solamente per il sito 15 UD tapo) tende in generale a diminuire, evidenziando quindi un effetto benefico della fase depurativa che va ben al di là della - pur importante - diminuzione della carica batterica.

Allo stesso tempo, però, risulta altrettanto interessante l'andamento del contenuto di metallo nell'epatopancreas: salta agli occhi, infatti, come dopo il trattamento di depurazione la quantità di metallo riscontrata (tranne che per il Fe nel sito 16 UD acque, e per Cr e Hg) sia sempre in aumento. Tale particolare fenomeno è fisiologicamente riconducibile ad un recente *uptake* di metallo, che proprio nell'epatopancreas trova il suo primario processamento, ovvero durante le prime fasi della detossificazione, esso potrebbe essere imputabile proprio alla dinamica specifica della fase depurativa.

Gli organismi, infatti, vengono immessi in grandi vasche con ricircolo di acqua pulita dal punto di vista microbiologico, ma che probabilmente via via che passa il tempo di contatto si deteriora chimicamente per apporto dello stesso contenuto stomacale espulso e rimesso in soluzione.

Quindi, soprattutto per Piombo e Arsenico è opportuno verificare dai dati sulla speciazione se effettivamente si riscontri una quota significativa di metallo rilevato nelle prime fasi.

In effetti, per il Piombo si ha quota biodisponibile corrispondente all'80% per il sito 16 UD acque e il 60% per il sito 15 UD tapo, e anche per il Cadmio se ne ha una quota corrispondente al 70% per il sito 16 UD acque e all'80% nel sito 15 UD tapo. Per l'Arsenico, la situazione dei due siti è differenziata: il sito 16 UD acque non mostra una significativa quota di metallo biodisponibile (30%), ma il sito 15 UD tapo invece ne ha ben il 60%.

Oltretutto, va ricordato che lo spurgo avviene tramite acque che vengono prelevate nelle zone di coltivazione, quindi gli organismi durante lo spurgo potrebbero essere sottoposti ad un esposizione ai metalli diversa rispetto a quelle del sito di origine, sia qualitativamente che quantitativamente.

Inoltre, è stato documentato una diminuzione di peso degli organismi in seguito ai trattamenti di preparazione alla commercializzazione del 10,42%, mentre quelle in prima e quinta giornata di commercializzazione sono 0,89 e 6,05%. La perdita media totale di peso delle due fasi è dopo un giorno dell'11,27% e dopo 5 giorni del 15,43% (Ioseffini, 1997).

Per altri metalli, invece, la distribuzione del contaminante nell'organismo risulta più egualmente distribuita come avviene, ad esempio, per il Nichel e il Cromo per i quali non si riscontra una particolare differenza nei valori di concentrazione. Tali metalli sono stati ormai metabolizzati e non costituiscono più un pericolo per l'organismo.

In realtà, però, per comprendere meglio le dinamiche di *uptake* che intercorrono tra sedimento e organismo, è necessario valutare il fattore di bioaccumulo, che riesce a fare sintesi del rapporto che intercorre tra metallo presente nella matrice ambientale e reale capacità dell'organismo di prelevarlo da essa e stoccarlo nell'organismo (v. paragrafo 4.7).

4.8 ANALISI DI STATISTICA MULTIVARIATA SUI DATI FISIOLGICI

4.8.1 Cluster analysis

L'analisi statistica multivariata svolta sui dati fisiologici (concentrazione nei *soft tissue*, nell'*epatopancreas* e nei tessuti residui) consente anzitutto di fare delle considerazioni ancora più specifiche riguardo lo spurgo.

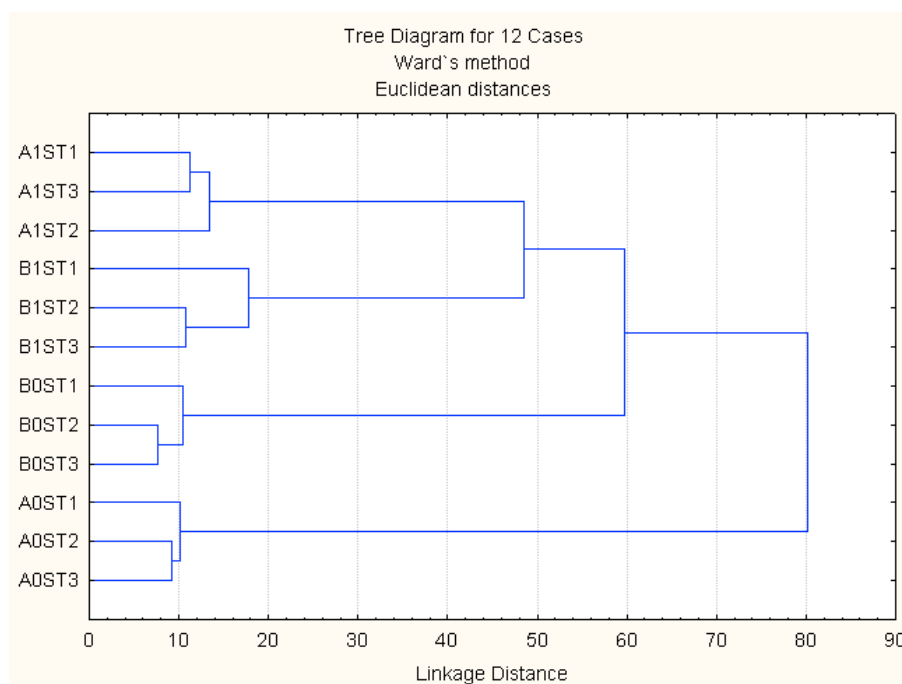


Figura 4.43 Cluster analysis eseguita in R-mode sulla matrice dei dati biologici normalizzata attraverso un algoritmo di ranchizzazione.

Infatti, come è visibile in figura 4.43, i campioni più simili tra loro sono quelli della serie A1 e B1, cioè i campioni spurgati del sito 16 (A1ST1-2-3) e del sito 15 (B1ST1-2-3), a dimostrare come, una volta eliminati i fattori di “rumore” dovuti alla presenza di sedimento all’interno dei tessuti dell’animale, la fisiologia comune e le strategie metaboliche messe in atto dall’organismo avvicinano i campioni nonostante siano provenienti da due siti abbastanza differenti quanto a concentrazione dei vari elementi.

Ancor più interessante è notare come i campioni che prima si avvicinano a questi siano quelli non spurgati del sito 15 (B0ST1-2-3), si può così avere conferma di quanto rilevato finora, si tratta infatti, del sito meno contaminato in termini di concentrazioni assolute sia relative all’organismo sia relative al sedimento, è anche il sito caratterizzato da una prevalenza sabbiosa, frazione granulometrica meno predisposta all’adsorbimento e allo stoccaggio di inquinanti.

Al contrario, il sito 16 essendo a prevalenza argilloso-limoso, è maggiormente implicato nelle dinamiche di adsorbimento e stoccaggio di inquinanti: infatti i campioni non spurgati provenienti da questo sito (A0ST1-2-3) si legano per ultimi a tutti gli altri. In effetti, è da sottolineare a priori, che la specie analizzata, è dotata di un apparato ciliare che impedisce al sedimento di dimensioni maggiori di entrare ed essere processato, quindi si avrà in generale una minore possibilità di entrare a contatto con la frazione fine che in questo caso risulta meno presente.

Questo consente, ancora una volta, di riscontrare il ruolo di specie “sentinella” svolto dalla *R. philippinarum* che si dimostra in grado di integrare le variazioni ambientali nello spazio e nel tempo e di fornire informazioni sulle condizioni ambientali del sito con maggiore completezza che l’analisi delle singole matrici ambientali.

Inoltre, attraverso l’analisi cluster svolta in Q-mode, è possibile rilevare come le variabili si distribuiscono e riscontrare quali di esse hanno un andamento analogo tra loro.

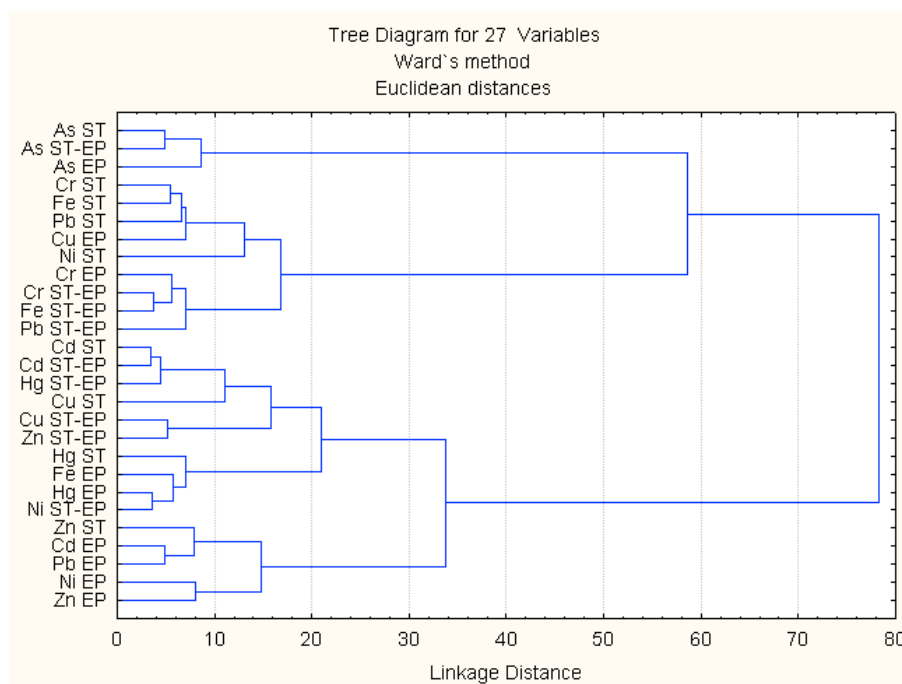


Figura 4.44 Cluster analysis eseguita in Q-mode sulla matrice dei dati biologici normalizzata attraverso un algoritmo di ranchizzazione.

Dall'immagine 4.44 si può notare come le variabili relative all'Arsenico (As ST, As ST-EP e As EP) si isolino rispetto alle altre e siano piuttosto distanti rispetto alle altre variabili nel dendrogramma. Per nessuna delle altre variabili legate alle concentrazioni dei vari metalli nell'organismo è possibile notare una tale analogia intraspecifica e una tale distanza interspecifica. Di qui, possiamo rilevare che probabilmente il comportamento dell'Arsenico all'interno dell'organismo segue una dinamica specifica e dissimile rispetto agli altri metalli, comportamento che sarebbe molto interessante dettagliare più nello specifico, al fine di comprenderne al meglio la tossicodinamica.

4.8.2 Analisi delle componenti principali (PCA)

Le considerazioni sui dati di bioaccumulo a partire dalle analisi cluster (R-mode e Q-mode) sono confermate anche dall'analisi delle componenti principali (PCA) svolta sugli stessi dati.

In particolare, vengono estratti 3 fattori il primo dei quali spiega il 47,82% della variabilità, il secondo spiega il 28,51%, il terzo il 12,09% come riportato nello *scree plot* (figura 4.45).

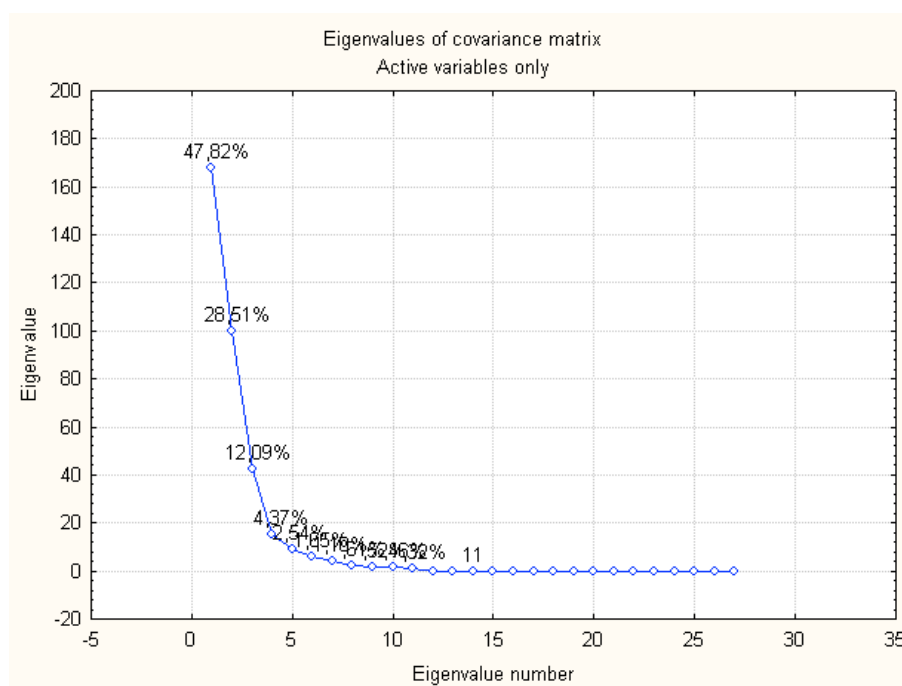


Figura 4.45 Scree plot relativo all'analisi delle componenti principali eseguita sulla matrice dei dati biologici normalizzata attraverso un algoritmo di ranchizzazione.

Ad una attenta analisi dei *factor loadings* (figura 4.46) è possibile notare come prendendo in considerazione questi primi tre fattori tutte le variabili vengono prese in considerazione con un peso superiore a $\pm 0,6$. Ma analizzando i grafici relativi alla prima o alla seconda variabile rispetto alla terza è possibile notare come la terza variabile dia soltanto un'informazione quantitativa, del tipo "c'è/non c'è" e quindi non è stata presa in considerazione.

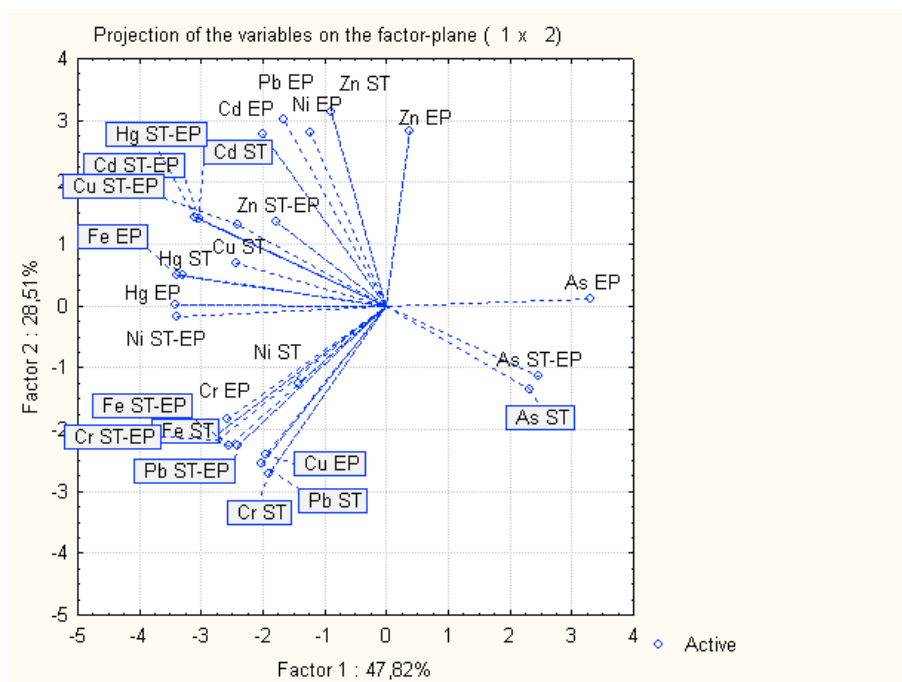


Figura 4.46 Loading plot (primo e secondo fattore) relativo all'analisi delle componenti principali eseguita sulla matrice dei dati biologici.

Ancora una volta si può notare dal loading plot come le variabili As EP, As ST-EP, As ST siano isolate rispetto alle altre, infatti, sono le uniche ad avere valori di loading positivi in prima componente che risulta quindi dare un'informazione quali-quantitativa: per l'As identifica i campioni che ne riportano concentrazioni elevate da quelli che invece non ne contengono molto, mentre per gli altri metalli l'informazione è di tipo quantitativo, i campioni nei quadranti terzo e quarto della PCA (figura 4.47) quadrante del hanno in generale maggiori concentrazioni di tutti i restanti metalli mentre quelli nel primo e secondo ne contengono minori quantitativi.

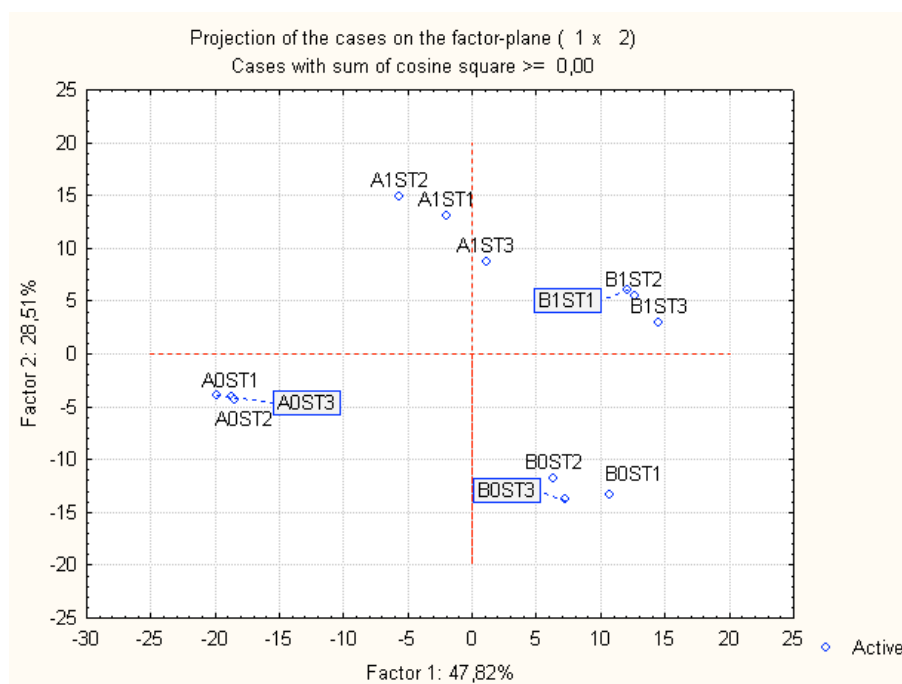


Figura 4.47 Analisi delle componenti principali eseguita sulla matrice dei dati biologici.

Infatti, i campioni si distinguono sia tra quelli depurati e non depurati, sia per sito e il gruppo A0 (sito 16 non spurgati) contiene i campioni più ricchi per concentrazione di metalli; i due gruppi più vicini tra loro sono quelli dei gruppi A1 e B1 come già verificato con l'analisi cluster (R-mode). Il gruppo B1 è quello che riporta le maggiori concentrazioni di As il quale si rivela essere un metallo "guida" nella interpretazione statistica dei dati biologici e che effettivamente possiede un metabolismo molto diverso rispetto a tutti gli altri metalli.

In effetti, già a partire dalla speciazione geochimica si è potuto rilevare come l'Arsenico presente nel sito 15 sia per la maggior parte in forma biodisponibile e addirittura ve ne sia una cospicua percentuale (oltre il 40% rispetto al contenuto totale) in forma immediatamente biodisponibile (adsorbito fisicamente al sedimento o adsorbito per capacità di scambio cationico o solubile nell'acqua interstiziale) cosa che non si verifica per il sito 16. Inoltre, considerando che l'acqua di spurgo viene prelevata direttamente nei siti di coltivazione e ricircolata in impianto di depurazione (previa sterilizzazione) si può ipotizzare un effetto di ulteriore *uptake* e concentrazione nell'organismo (si vedano le considerazioni precedentemente fatte al paragrafo 4.7).

4.9 FATTORI DI BIOACCUMULO

Nel considerare i dati relativi al bioaccumulo è importante sottolineare che il valore di tali parametri è uno strumento essenziale per poter descrivere la relazione che intercorre tra un valore MEDIO di concentrazione nel sedimento e un valore MEDIO di concentrazione nell'organismo.

E lo è ancora di più in questo caso, perché non essendo stato fatto il campionamento degli organismi tramite un dispositivo GPS, non è possibile avere garanzia della esatta sovrapposizione tra prelievo di sedimento e effettivo sito di crescita dell'organismo, pur trattandosi del medesimo orto di coltivazione. Infatti, le condizioni ambientali, specie in un ambiente così dinamico come quello lagunare, sono soggette a complessi equilibri dove la variabilità è sempre molto accentuata, sia nel tempo che nello spazio.

A questo punto, è importante ricordare che l'assunzione di un dato tossico può variare molto a seconda della particolare fisiologia dell'organismo target, dalla sua morfologia, dalle sue proprie abitudini alimentari e comportamentali, così come all'interno della stessa specie rispetto allo status di crescita, al periodo riproduttivo, all'età, al sesso, alla taglia (Manente, 2001).

Ciò determina che non esiste un valore assoluto di bioaccumulo di una sostanza in un organismo: il così detto fattore di bioaccumulo (bioaccumulation factor, BFA) è sì un valore numerico che esprime il rapporto tra il residuo chimico tissutale riscontrabile in un organismo e la sua concentrazione presente nella fase ambientale esterna allo stesso, ma è assolutamente valido relativamente ad un solo tipo di organismo poiché da esso dipenderà l'equilibrio dinamico tra *uptake* e rilascio del dato composto una volta che esso si sia stabilizzato nella matrice esogena (Manente, 2000).

Quindi, il fattore di bioaccumulo è un dato di fondamentale importanza al fine di comprendere quali siano le reali dinamiche di *uptake* che coinvolgono l'organismo rispetto alla concentrazione totale di metallo presente nella matrice considerata.

Tuttavia, nell'ambito di questa tesi di laurea, si è scelto di ampliare le prospettive rispetto al concezione tradizionale di BAF, per effettuare un'indagine sul rapporto tra la concentrazione di metallo nei ST e il contenuto di metallo nelle fasi immediatamente biodisponibili e potenzialmente biodisponibili. Tale rapporto è stato denominato "coefficiente di biodisponibilità" e mette in luce aspetti interessanti (nonché limiti intrinseci) diversi rispetto al BAF tradizionale e dipendenti da quelle che vengono individuate qui "fasi biodisponibili".

Ovviamente, si tratta di un valore legato alla specie e al sito e soprattutto è un dato limitato al momento in cui è stato fatto il prelievo di sedimento e quindi legato a condizioni puntuali di potenziale redox, pH e ossigeno disciolto e delle molte altre variabili ambientali.

Quindi, è stato scelto di calcolare tale fattore in riferimento sia ai tessuti totali che al solo epatopancreas e sia rispetto al contenuto totale di metallo nei sedimenti, sia rispetto al relativo contenuto biodisponibile (tabella 4.19).

[conc. metallo nei ST/conc. metallo totale nei sedimenti]

[conc. metallo nei ST/conc. metallo nelle fasi biodisponibili]

16 UD acque	Coefficiente di biodisponibilità ST	BAF ST	Coefficiente di biodisponibilità EP	BAF EP
As	6,2141	0,5108	12,3035	1,0113
Cd	2,5064	1,4591	6,8373	3,9803
Cr	0,0936	0,0275	0,1177	0,0346
Cu	0,6847	0,3384	1,9485	0,9631
Hg	-	0,4146	-	0,7561
Fe	0,0379	0,0182	0,0833	0,0400
Ni	0,5222	0,2482	0,8189	0,3892
Pb	0,0335	0,0227	0,1858	0,1260
Zn	1,6379	1,0266	1,9472	1,2205
15 UD tapo	Coefficiente di biodisponibilità ST	BAF ST	Coefficiente di biodisponibilità EP	BAF EP
As	1,3803	0,5792	2,2042	0,9249
Cd	2,1169	1,1895	2,0452	1,1492
Cr	0,0987	0,0485	0,1117	0,0549
Cu	2,5089	0,6157	7,8822	1,9344
Hg	-	0,9362	-	1,1489
Fe	0,0412	0,0266	0,0655	0,0422
Ni	0,7263	0,4728	0,8422	0,5483
Pb	0,0771	0,0457	0,2284	0,1355
Zn	1,9129	1,2604	2,5717	1,6946

Tabella 4.19 Valori di BAF e coefficiente di biodisponibilità calcolati come concentrazione rilevata nei tessuti e nell'epatopancreas prelevati da organismi spurgati in rapporto alla concentrazione totale e come concentrazione nei tessuti e nell'epatopancreas rispetto alla concentrazione biodisponibile nel sedimento.

Anzitutto, è importante rilevare che i due dati danno informazioni diverse: vanno valutati separatamente per ciò che sono in grado di mettere in luce e per l'opportunità che offrono di avere un quadro più completo per la valutazione del fenomeno del bioaccumulo.

Se il BAF tradizionale consente di fare delle valutazioni rispetto al livello globale di contaminazione del sedimento, il coefficiente di biodisponibilità dà l'idea di quale sia la capacità dell'organismo di assumere dall'ambiente il metallo presente in forma effettivamente biodisponibile e resasi bioaccessibile in quel particolare momento a prescindere dal contenuto totale ed evidenzia così caratteri fisiologici altrimenti difficili da rilevare.

Per il **Cadmio** e lo **Zinco** si riscontra un valore di coefficiente di biodisponibilità che per i tessuti ha valori piuttosto significativi che non vengono messi così in luce dal BAF, ma è per il coefficiente di biodisponibilità legato alle concentrazioni rilevate nell'epatopancreas che si riscontrano valori notevoli rispettivamente 6,83 e 1,94 per il sito 16 UD acque e 2,04 e 2,57 per il sito 15 UD tapo.

Per i metalli come il **Piombo** e il **Ferro**, il coefficiente di biodisponibilità calcolato sulle fasi biodisponibili non aggiunge informazioni significative poiché si mantiene entro valori simili rispetto al BAF ed è paragonabile rispetto ai dati rilevati per la laguna di Venezia (Baccarani, 2012).

Per il **Cromo** valgono le stesse considerazioni e i valori riscontrati sono sovrapponibili a quelli calcolati per i campioni della laguna di Venezia e dal Delta del Po (Baccarani, 2012).

È interessante sottolineare come il coefficiente di biodisponibilità del **Rame**, sia caratterizzato da valori abbastanza elevati nei tessuti, ma soprattutto nell'epatopancreas, raggiungendo valori anche di 7,88 per il sito 15. Questo dimostra che a prescindere dalla concentrazione presente nel sedimento, essendo il Rame (come anche lo Zinco) un metallo fisiologico, l'uptake non ne dipenda strettamente, ma risponda più che altro al raggiungimento del fitness dell'organismo prelevando dall'esterno la quota necessaria e rimanendo stoccato quasi unicamente nell'epatopancreas come già visto nel paragrafo precedente (in concentrazioni che peraltro sono poco sensibili allo spurgo).

Infine, per quanto riguarda il **Nichel**, i valori riscontrati grazie al coefficiente di biodisponibilità, sono maggiori rispetto a quelli del BAF che sono comunque in linea con quanto rilevato per campioni prelevati dalla laguna di Venezia e dal Delta del Po (Baccarani, 2012).

Per quanto riguarda l'**Arsenico**, il BAF ammonta a 0,5 per entrambi i siti, ma la speciazione geochimica consente di individuare una concentrazione di metallo biodisponibile molto diversa (nel sito 15 si trova molto Arsenico in prima fase), questo si riflette nel coefficiente di bioaccumulo: 6,21 per il sito 16 UD acque e 1,38 per il sito 15 UD tapo.

Se poi si prende in considerazione il solo epatopancreas, il BAF corrisponde a 1,01 e a 0,92 per i due siti, mentre il coefficiente di bioaccumulo, mette in luce ancora una volta la differenza tra i due siti con valori di 12,3 per il sito 16 e di 2,02 per il sito 15.

Rispetto a questi dati, è complesso fare delle valutazioni, poiché si tratta di un metabolismo complesso e non del tutto investigato. In particolare, è noto (Argese et al., 2009) che l'As assunto sotto forma di As inorganico, all'interno, ad esempio, di microalghe viene organicato e accumulato prevalentemente sotto forma di arsenozucchero (dove nei ribosili l'As sostituisce il Fosforo). L'organismo poi, lo assume e lo trasforma in arsenobetaina, un composto non più tossico.

In realtà, per il sito 15 UD tapo, vista la grossa quantità di As biodisponibile, vanno probabilmente analizzate anche altre dinamiche di *uptake* per cui sarà necessario un ulteriore approfondimento.

Infatti, l'informazione data dal coefficiente di biodisponibilità non va assolutizzata: la fisiologia dell'organismo, come già visto in precedenza, ha la meglio sulla quota di contaminazione del sito e si mantiene pressoché sovrapponibile per i due siti. Inoltre, l'organismo è in grado di "storicizzare" l'informazione ambientale e quindi aiuta a prescindere dall'informazione puntuale nel tempo e nello spazio fornita dalle analisi sul sedimento.

Tuttavia, dall'analisi complessiva di tali risultati, si può aver conferma che i Molluschi Bivalvi possono e devono essere usati sia come indicatori di effetto che di esposizione, rispondendo bene alla necessità di misurare il bioaccumulo e gli effetti biologici entro lo stesso organismo nello stesso arco di tempo espositivo (Salazar M.H., 1997).

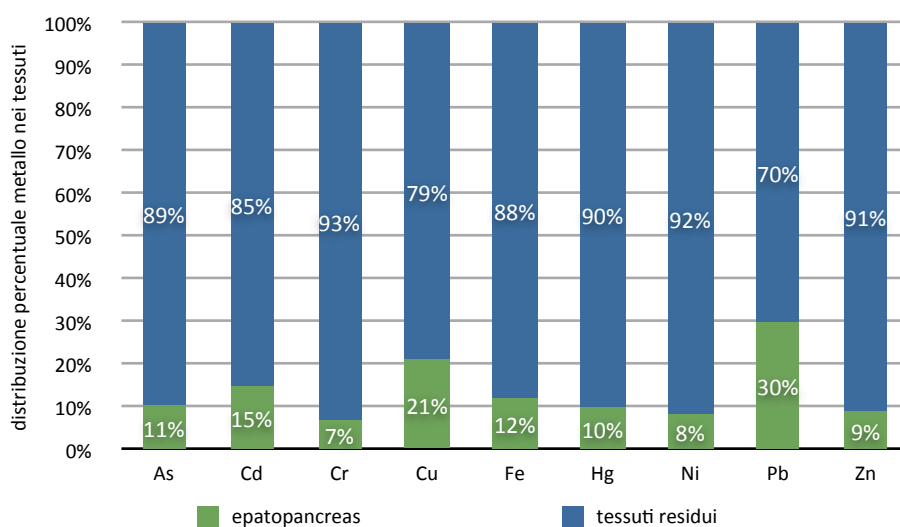
4.10 COMPARTIMENTAZIONE DEI METALLI NEI TESSUTI

Si è ritenuto opportuno procedere, a questo punto, ad un particolare trattamento dei dati riguardanti gli organismi, al fine di evidenziare al meglio i valori di bioaccumulo ottenuti. Come si può osservare nei grafici in figura 4.48 e 4.49, si è proceduto ad un tentativo di normalizzazione dei singoli valori ottenuti per epatopancreas e tessuti residui rispetto ai vari metalli.

$$\frac{[(\text{concentrazione ST-EP}) * (\text{peso ST-EP} / \text{peso ST})]}{[(\text{concentrazione EP}) * (\text{peso EP} / \text{peso ST})]}$$

$$\frac{[(\text{concentrazione EP}) * (\text{peso EP} / \text{peso ST})]}{[(\text{concentrazione ST-EP}) * (\text{peso ST-EP} / \text{peso ST})]}$$

16 UD acque spurgate: compartimentazione (d.w./d.w.) metallo tra epatopancreas e resto dei tessuti (percentuale)



15 UD acque spurgate: compartimentazione (d.w./d.w.) metallo tra epatopancreas e resto dei tessuti (percentuale)

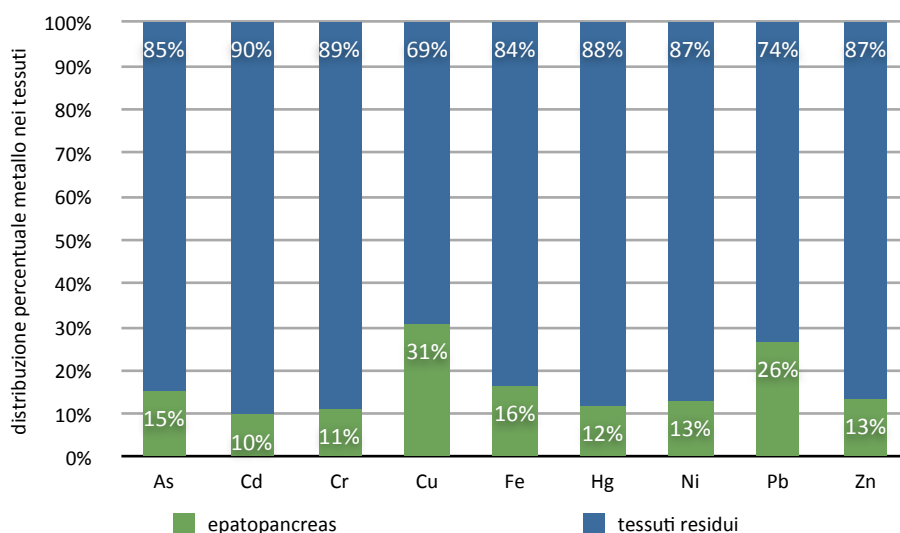


Figure 4.48 e 4.49 Compartimentazione percentuale dei metalli tra tessuti e ghiandola epatopancreatica calcolata tramite normalizzazione sulla relativo rapporto in peso secco di epatopancreas e tessuti extraghiandolari.

Da questa normalizzazione dei dati rispetto al rapporto in peso dell'epatopancreas e dei tessuti extraghiandolari sul peso totale dell'organismo è possibile apprezzare la compartimentazione dei metalli nei tessuti. Già a partire dal confronto tra i due siti è possibile notare come l'andamento di distribuzione si mantenga pressoché costante per tutti i metalli, a conferma ulteriore del fatto che

la fisiologia dell'organismo si mantiene il fattore fondamentale (al di là del livello di contaminazione presente nel sedimento) nel governare i processi di uptake dell'organismo.

In particolare risulta evidente che alcune metalli sono compartimentati preferibilmente nell'epatopancreas: il Rame e il Piombo, ad esempio sono stoccati per il 20-30% all'interno della ghiandola (che in peso secco conta per il 7% sul totale). Inoltre anche Zinco, Cadmio e Arsenico sono presenti in una buona percentuale nella ghiandola epatopancreatica. Nuovamente, si conferma l'evidenza già riscontrata precedentemente di poter indagare sui fenomeni che sottendono al processamento di tali metalli nell'organismo Bivalve: come si può notare, infatti, il comportamento del singolo metallo in quanto a presenza/passaggio all'epatopancreas rimane pressoché uguale per tutti gli animali trattati e indipendente - come trend - dal sito di raccolta, pur essendosi rivelati i due orti molto differenti dal punto di vista geochimico.

4.11 LIMITI NORMATIVI PER LA CONCENTRAZIONE DI METALLI NEI TESSUTI DI MOLLUSCHI

Per quanto concerne riferimenti normativi relativi a contenuti di metalli pesanti ammissibili negli organismi, in questo contesto si fa riferimento alla norma europea: il regolamento n.1881/2006 della Commissione stabilisce i tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti, quali il Pb (1.5 mg/kg w.w.), il Hg (0.5 mg/kg w.w.) e il Cd (1.0 mg/kg w.w.). Questi tre metalli, insieme all'As, sono oggetto di attenzione e monitoraggio da parte degli Enti Governativi che vigilano sulla sicurezza degli alimenti: l'EFSA (*European Food Safety Authority*) offre assistenza e consulenza scientifica ai gestori del rischio sulla base di valutazioni del rischio e la Commissione europea e gli Stati membri dell'UE prendono decisioni di tipo normativo, come la definizione dei tenori massimi di metalli nei prodotti alimentari sulla base di queste valutazioni. L'EFSA è stata incaricata dalla Commissione Europea di fornire valutazioni del rischio su Cd, Hg, Pb e As nei prodotti alimentari.

In seguito, nel 2004, il gruppo CONTAM ha adottato un parere sul mercurio e il metilmercurio, (EFSA Journal, 2004), visto che quest'ultimo è il principale composto del mercurio presente nei prodotti a base di pesce e di frutti di mare. Il parere esaminava il contributo di diversi alimenti all'esposizione umana totale e i rischi per i gruppi vulnerabili, in particolare per le donne in gravidanza e per i bambini. Il gruppo ha concluso che è stata dimostrata la tossicità del metilmercurio già a bassi livelli di esposizione e quindi l'esposizione a questo composto deve essere minimizzata.

In questo caso, risulta che la concentrazione di Hg riscontrata negli organismi oggetto di questo studio è ancora inferiore al valore massimo stabilito dall'EFSA, ma la pericolosità di questo elemento non è da sottovalutare, soprattutto in aree costiere dove il consumo medio di prodotti ittici è considerevole, soprattutto se si considera che il Hg è un elemento biopersistente che non risente di valori soglia (Regolamento CE No 1907/2006).

In tabella 4.20 sono riportati i valori medi di concentrazione dei metalli considerati nei tessuti *in toto* degli organismi, espressi in mg/kg di peso umido (*wet weight, w.w.*).

La concentrazione in peso umido è stata stimata sulla base di prove effettuate sui tessuti degli organismi per determinare la perdita percentuale di umidità.

Visto che i limiti normativi si riferiscono al peso umido degli organismi, e tenuta presente sulla base delle prove effettuate una perdita percentuale media di umidità dei tessuti di *R. philippinarum* di circa 86% per il sito 16 e oltre il 90% per il sito 15, si può affermare che i campioni analizzati sono al di sotto dei valori soglia proposti dalla Commissione Europea per Pb, Hg e Cd.

Tabella 4.20 Valori di concentrazione dei diversi metalli e metalloidi nei tessuti calcolati sul peso umido (ottenuto tenendo conto della quota di umidità rilevata per gli organismi dei due siti) valori soglia: Pb 1,5 mg/kg w.w., Hg 0,5 mg/kg w.w., Cd 1,0 mg/kg w.w. (CEE n° 1881/2006)

	As (mg/kg) w.w.	Cd (mg/kg) w.w.	Cr (mg/kg) w.w.
SITI	Spurg.	Spurg.	Spurg.
15 UD tapo	0,87	0,007	0,10
16 UD acque	1,78	0,04	0,34
	Cu (mg/kg) w.w.	Fe (mg/kg) w.w.	Hg (mg/kg) w.w.
15 UD tapo	0,27	10,3	0,04
16 UD acque	0,97	39,0	0,14
	Ni (mg/kg)w.w.	Pb (mg/kg) w.w.	Zn (mg/kg) w.w.
15 UD tapo	0,39	0,01	2,90
16 UD acque	1,08	0,04	11,2

4.12 METALLOTIONEINE

Negli organismi acquatici le MT sono state identificate non solo nella ghiandola digestiva (Viarengo et al., 1984; Olafson et al., 1979 a,b) ma anche nelle branchie (Roesijadi & Klerks, 1989; Viarengo et al., 1980; Nolan & Duke 1983; Engel et al., 1985; Mouneyrac et al., 1998). La scelta del tessuto nel quale andare a quantificare queste proteine riveste una notevole importanza ai fini degli studi ambientali; quei tessuti degli organismi direttamente coinvolti nell'assimilazione, immagazzinamento ed escrezione di metalli, chiaramente hanno la più alta capacità di sintetizzare MT. Da qui la scelta di considerare la concentrazione di MT nella sola ghiandola digestiva e non nei tessuti *in toto*.

La figura 4.41 illustra la concentrazione di MT misurata tramite determinazione spettrofotometrica sui campioni di organismi spurgati e non spurgati relativi ai siti di interesse.

Le concentrazioni riscontrate sugli organismi spurgati relativi a entrambi i siti non si discostano molto fra loro assestandosi su valori attorno a 0,08 mgMT/g w.w. Valori che risultano essere più bassi rispetto a quelli misurati per organismi della laguna di Venezia che hanno concentrazioni che arrivano addirittura a 0,6 mgMT/g w.w (dati da Baccarani, 2012).

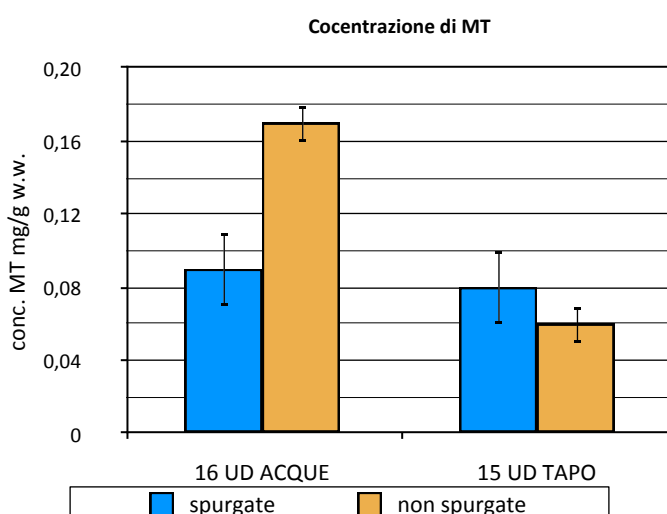


Figura 4.50 Concentrazioni di Metallothioneine misurate per gli organismi spurgati e non spurgati per i siti 16 e 15.

In realtà, il dato più interessante da rilevare è quello che riguarda il confronto tra le concentrazioni di MT degli organismi spurgati e non spurgati del sito 16 UD acque (figura 4.50). In effetti, gli organismi non spurgati hanno una concentrazione piuttosto alta rispetto ai corrispondenti campioni non spurgati. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che gli individui considerati non fanno parte del medesimo pool: gli organismi spurgati sono stati prelevati 3 giorni prima degli spurgati nello stesso orto di coltivazione, ma non nello stesso momento rispetto agli altri.

Tuttavia, si può comunque rilevare che, in effetti, il sito 16 risulta essere quello con il maggiore grado di contaminazione di metalli e metalloidi e che quindi, la produzione di MT nell'organismo che si trova a contatto con una certa quantità di sedimento contaminato presente all'interno del lume digerente, sia portato ad una produzione maggioritaria di tali proteine. Inoltre, essendo tali organismi di taglia maggiore rispetto agli altri (valutazione fatta a fine crescita - 12 mesi-) potrebbero essere soggetti a un livello maggiore di stress da digiuno e da raccolta e quindi siano portati a produrre una maggiore quantità di MT. Ovviamente, per saperlo, sarebbe necessario procedere ad un'estrazione di MT specifiche per Zn e Cu.

Per il sito 15 UD tapo invece, non si rileva una differenza simile tra organismi spurgati e non spurgati in termini di concentrazione e questo dato è in linea con quanto già rilevato per i campioni analizzati provenienti dalla laguna di Venezia e dal delta del Po (dati da Baccarani, 2012).

È importante tenere in considerazione un aspetto temporale: è infatti possibile che non si siano registrate oscillazioni significative nella concentrazione di MT per via del cosiddetto fenomeno di downregulation, ovvero un assestamento verso il basso nel livello di concentrazione dovuto alla troppa stimolazione a cui è sottoposto l'organismo; registrato il picco iniziale corrispondente al fenomeno acuto, si verifica una diminuzione della concentrazione secondo un sistema a feedback negativo (Manente, 2003). Tutto ciò rende molto difficile anche riuscire a determinare un valore di concentrazione basale di queste proteine.

Oltretutto, è necessario sottolineare che il ruolo biologico delle metallotioneine è ancora oggetto di dibattito pur conoscendone ormai buona parte degli aspetti biochimici (Manente, 2001).

Alcuni autori (Engel D.W. & Brouwer M., 1989) hanno postulato l'esistenza di due distinti pool intracellulari di MT presenti nel citosol. Uno che viene definito pool indotto, formato perciò ad esempio da Cd-MT, risponderebbe alle fluttuazioni ambientali dei metalli in tracce; l'altro, detto pool costitutivo, raggrupparebbe in primo luogo le Zn-MT e le Cu-MT, coinvolte nei normali processi regolatori in cui è necessaria la presenza di metalli. Finora purtroppo non è stato possibile capire se simili o differenti isoforme di MT (di cui si conosce bene l'esistenza ma non bene la funzione) possano adempiere a uno o più ruoli (Manente, 2001).

Di conseguenza, i risultati di quantificazione delle MT possono essere molto utili, ma solo se integrati da studi di bioaccumulo e speciazione geochimica dei metalli pesanti, e (dove possibile) da studi finalizzati alla valutazione delle variazioni nell'espressione genica delle MT al variare di fattori biologici ed ambientali (Milan et al., 2011).

4.13 ANALISI GENETICHE

4.13.1 Estrazione e purificazione di DNA genomico

Il DNA genomico estratto dai 40 campioni analizzati è risultato generalmente di buona qualità, sia all'analisi spettrofotometrica che elettroforetica.

Nella Figura 4.51 è riportata l'immagine relativa alla corsa elettroforetica di alcuni campioni di DNA genomico estratto.

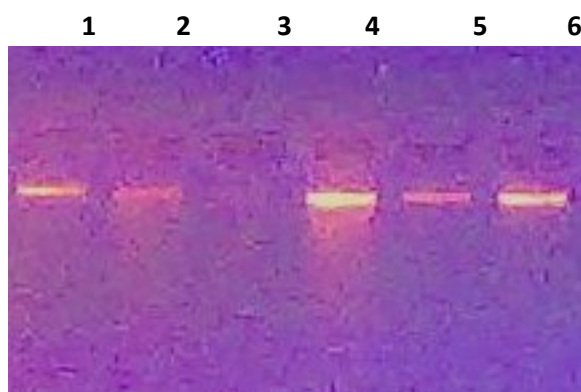


Figura 4.51 Immagine di elettroforesi su gel d'agarosio all'1% visibile ai raggi ultravioletti. Il DNA genomico estratto dai tessuti di *Ruditapes philippinarum* si presenta di elevato peso molecolare e di buona qualità in 5 campioni su 6 (1,2,4,5,6) (Foto S. Chiesa).

A partire dai campioni di DNA genomico estratto di buona qualità, è stata effettuato il sequenziamento diretto di un frammento del gene mitocondriale 16SrDNA e l'analisi dei sette loci microsatelliti scelti.

4.13.2 Analisi di sequenziamento diretto del 16SrDNA

Attraverso l'utilizzo dei primers specifici *16SarALT/16SbrALT* è stato possibile ottenere un amplificato di circa 600 bp per molti dei campioni analizzati, di buona qualità e concentrazione.

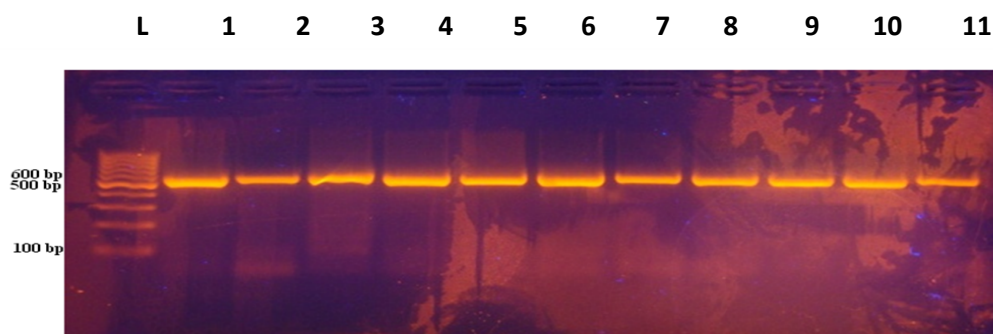


Fig. 4.52 Esempio di amplificato (circa 600 bp) ottenuto dal gene 16S. L = ladder, o marcatore di peso molecolare e di concentrazione (100-1000bp), 1-11 = campioni di *Ruditapes philippinarum* (Foto S. Chiesa).

L'analisi di sequenziamento diretto è stata condotta sul prodotto purificato della prima PCR di amplificazione: il prodotto purificato si presentava per la maggior parte dei campioni di buona qualità e concentrazione.

Le sequenze nucleotidiche grezze (Raw Data) sono state ottenute tramite il Sequenziatore automatico per acidi nucleici “Ceq 8000” (Beckman Coulter) ed analizzate tramite il “Sequencing module” del CEQ 8000, ottenendo gli elettroferogrammi e le successioni nucleotidiche da impiegare negli altri software bioinformatici (figura 4.3).



Figura 4.53 - Elettroferogramma e sequenza delle basi azotate di un frammento del gene 16S, ogni colore corrisponde ad una specifica base azotata.

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state quindi inserite all’interno dei database biologici (BLAST e FASTA) per definirne l’omologia e identificarne la reale specie di appartenenza.

Ciò consente di verificare l’identità specifica delle sequenze nucleotidiche ottenute, e di escludere la presenza di DNA mitocondriale maschile dovuto a contaminazioni tra i tessuti ed interferenze causate dal fenomeno della DUI (Doubly Uniparental Inheritance).

In questo caso, tutte le sequenze ottenute risultano omologhe alle sequenze 16SrDNA F-type depositate in banca dati. Pertanto, tutte le sequenze utilizzate per le successive analisi statistiche risultano tra di loro omogenee.

Successivamente, le stesse regioni di mtDNA sono state confrontate mediante allineamenti multipli ottenuti con ClustalX (Fig. 4.54), che permette la rimozione dei gaps; tramite il software Sequencer le sequenze allineate sono state ricontrollate singolarmente attraverso la verifica degli elettroferogrammi.

Le estremità 5’-3’ sono state tagliate per eliminare dal dataset le aree nelle quali il sequenziamento delle basi non risultava affidabile.

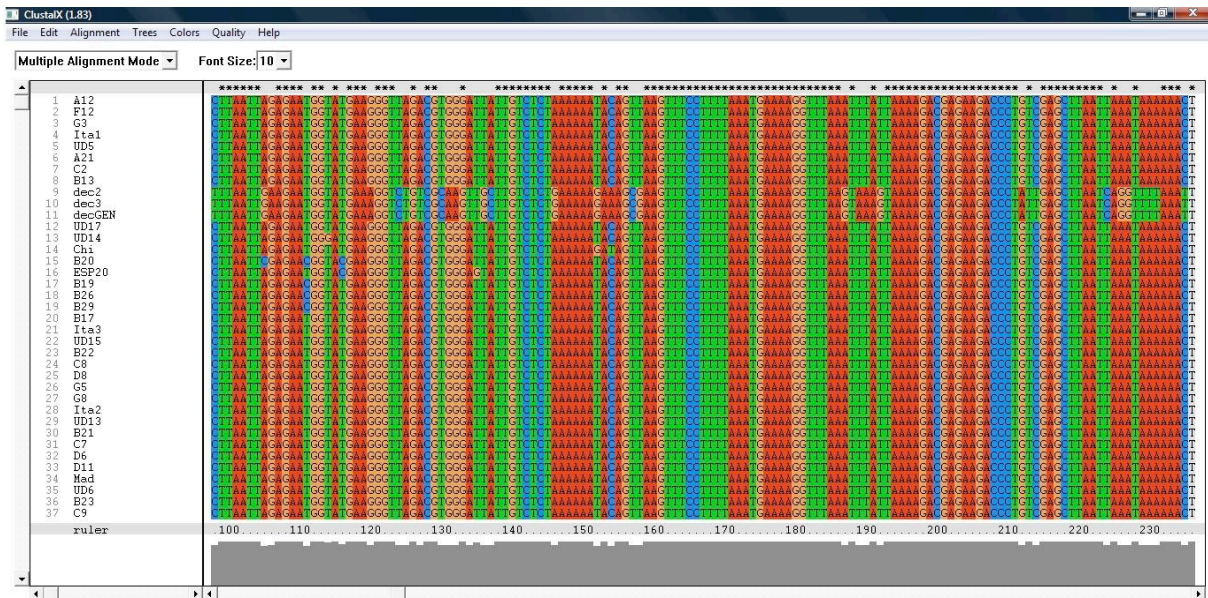


Figura 4.54 - Esempio di grafico relativo a circa 100 bp dell'allineamento multiple delle sequenze di 16S di *Ruditapes philippinarum*, *R. decussatus*, *R. variegata*, *R. bruguierei*, *Glaucumone rugosa* e *Corbicula fluminea* attraverso il software ClustalX.

In riferimento alle analisi sul DNA mitocondriale, le 36 sequenze ottenute in questa tesi di laurea sono state incluse nell'allineamento finale che comprende anche sequenze ottenute dai campioni della biobanca allestita, ed analizzati durante lo svolgimento di un ampio progetto di ricerca (si veda Chiesa et al., 2011b; Baccarani, 2012; Chiesa et al., 2012a,b). Esse provengono sia da siti dell'Alto Adriatico quali la laguna di Venezia (Busa, Palude del Monte, Fusina), sia dal Delta del Po (Laguna di Scardovari, Caleri, Levante) sia da aree produttive spagnole (La Coruna, Galizia). Inoltre, il dataset finale comprende anche le sequenze di riferimento di *R. philippinarum* e *R. decussatus* scaricate dalla banca dati GenBank (Accession Numbers: AF484294; AF484296; AM085107; DQ356383, AJ417847), e di altri outgroups utili per la ricostruzione filogenetica di questo *taxon*, quali *Ruditapes variegata* (A.N. JN248567), *Ruditapes bruguierei* (A.N. DQ184727), che appartengono alla stessa famiglia (Veneridae); *Glaucumone rugosa* (A.N. DQ184754), appartenente alla stessa superfamiglia Veneroidea, ma non alla stessa famiglia (Glaucumonidae) e *Corbicula fluminea* (A.N. AF038999) appartenente ad una differente superfamiglia (Corbiculoidea), ma allo stesso ordine Veneroida. Tali specie sono state scelte perchè recentemente utilizzate per la filogenesi molecolare della famiglia dei Veneridae (Chen et al., 2011).

Il dataset finale è quindi costituito da 124 sequenze corrispondenti a 407 paia basi. Tutte le successive analisi statistiche e filogenetiche sono state svolte a partire da tali sequenze.

Dall'allineamento delle sequenze di *Ruditapes philippinarum* e *Ruditapes decussatus*, sono state identificate 124 mutazioni puntiformi. Considerando solo le sequenze di *Ruditapes philippinarum*, sono state identificate 11 mutazioni puntiformi alle posizioni 23, 35, 41, 46, 65, 82, 84, 263, 378, 379, 393. Di queste, sette mutazioni sono trasversioni e quattro transizioni (C-T). Tuttavia, considerando solo le popolazioni italiane (Marano, Venezia, delta del Po) il numero di mutazioni si riduce a sei.

Di seguito vengono riportati i risultati del test di Tajima (Tabella 4.20bis), eseguito in varie combinazioni di sequenze. Il test indica che per ogni combinazione proposta il valore di D è sempre negativo. Ciò sottolinea chiaramente uno spostamento dalle condizioni di neutralità, dovuto soprattutto alla presenza di molti aplotipi rari e poco frequenti, caratterizzati da pochissimi o da un unico esemplare.

E' molto interessante notare come il valore meno negativo si osservi all'analisi dei soli campioni italiani (Marano, Venezia, Delta del Po), che presentano una distribuzione della diversità nucleotidica più equilibrata, più vicina alla neutralità.

	<i>m</i>	<i>S</i>	<i>p_s</i>	Θ	π	<i>D</i>
<i>Ruditapes philippinarum</i> + <i>R. decussatus</i>	119	124	0,280543	0,052417	0,017506	-2,172286
<i>Ruditapes philippinarum</i>	115	11	0,024887	0,004680	0,000893	-2,070742
<i>Ruditapes philippinarum</i> (solo campioni italiani)	104	6	0.013575	0.002602	0.000555	-1.756265
<i>Ruditapes philippinarum</i> (senza campioni Spagna)	105	8	0.018100	0.003463	0.000636	-1.965497
<i>Ruditapes philippinarum</i> (senza sequenze Genbank)	112	9	0.020362	0.003848	0.000835	-1.921954

Tab. 4.20bis Riassunto dei risultati del test di Tajima: numero di sequenze (*m*), numero di siti polimorfici (*S*), $p_s = S/m$, $\Theta = p_s/a1$, π = diversità nucleotidica e valore del Tajima test (*D*).

L'analisi di Minimum Spanning Network (al 95% di confidenza) ha identificato complessivamente 5 aplogruppi: il network 1 corrisponde all'aplogruppo della *Ruditapes decussatus* (con tre aplotipi distinti Rdhap1,2,3); il network 2 corrisponde all'aplogruppo della *R. philippinarum* (con 11 aplotipi distinti, Rphap1-11); il network 3 alla *Glaucomone rugosa*, il 4 alla *Corbicula fluminea* ed il quinto alla *R. variegata e bruguieri* (2 aplotipi).

Complessivamente, sono stati individuati 18 aplotipi, dei quali 3 aplotipi per le sequenze di *R. decussatus* e 11 aplotipi per quelle di *R. philippinarum* (Baccarani, 2012, Chiesa et al., 2012a,b). (Figura 4.55).

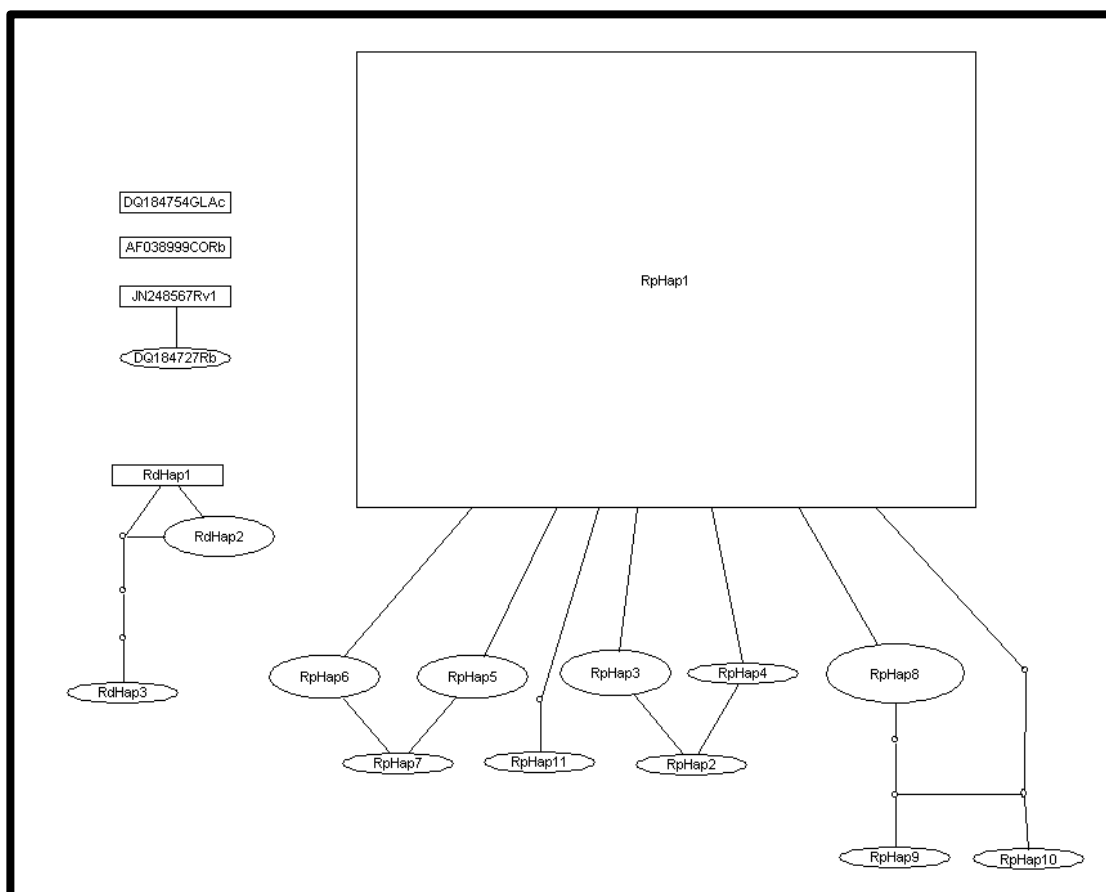


Fig. 4.55- Minimum Spanning Network delle sequenze di 16S rDNA ottenuto con il software TCS. I quadrati indicano gli aplotipi più rappresentativi di ciascun aplogruppo. La dimensione è proporzionale alla rappresentativa numerica di ogni aplotipo.

Tra gli aplotipi della *R. philippinarum*, il più frequente è l'aplotipo Rp hap1 (0.2181).

L'aplogruppo H2 di *R. decussatus* include 3 aplotipi: Rd hap1 (frequenza = 0.444), Rd hap2 (frequenza = 0.444), e Rd hap3 (frequenza = 0.111).

La frequenza dei diversi aplotipi è visibile in tabella 4.21.

Tabella 4.21 aplotipi identificati tramite analisi con TCS e relativo peso in termini di frequenza.

APLOTIPO	FREQUENZA (PESO) APLOTIPO
Rdhap 1	0,444
Rdhap 2	0,444
Rdhap 3	0,111
Rphap1	0,218
Rphap2	0,109
Rphap3	0,109
Rphap4	0,109
Rphap5	0,109
Rphap6	0,109
Rphap7	0,109
Rphap8	0,072
Rphap9	0,018
Rphap10	0,018
Rphap11	0,018
DQ184754GLAc	1
AF038999CORb	1
JN248567Rv1	0,5
DQ184727Rb	0,5

I campioni oggetto delle analisi di questa tesi (popolazioni di UD 15 tapo e UD 16 acque) presentano solo l'**aplotipo 1** che è anche il più frequente.

Infine, l'albero filogenetico costruito secondo l'approccio di Maximum Likelihood (Figura 4.56) riflette i cinque aplogruppi individuati attraverso l'analisi di Minimum Spanning Network, e i valori del bootstrapp risultano significativi su 1000 repliche effettuate.

Inoltre, la presenza degli outgroup caratterizzati da differenti rapporti evolutivi, consente di evidenziare la vicinanza filogenetica della *R. variegata* (JN248567) e *R. bruguieri* (DQ184727) alla specie *R. philippinarum*, rispetto ad esempio alla specie *R. decussatus*, nativa delle lagune costiere dell'Alto Adriatico.

Nonostante la distanza evolutiva tra le due specie, è stata recentemente dimostrata la presenza di ibridi tra la vongola verace autoctona e la verace filippina, nelle aree ove quest'ultima è stata introdotta (Hurtado et al., 2011).

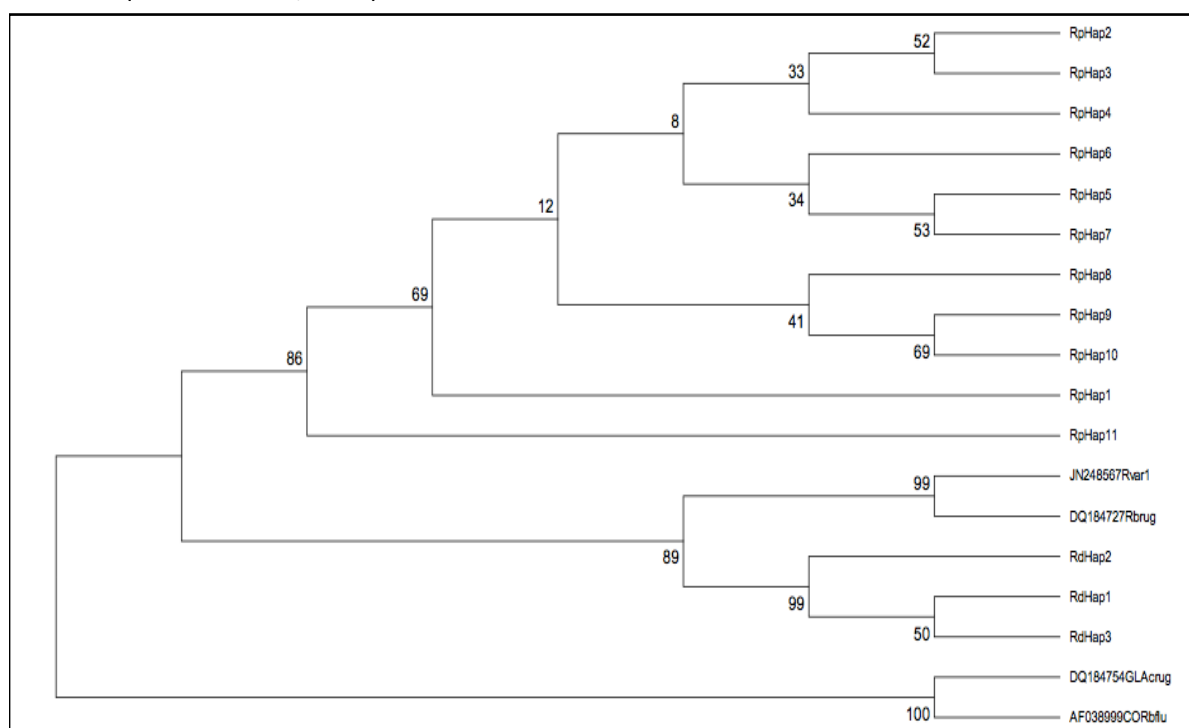


Figura 4.56 Albero filogenetico di Maximum Likelihood.

Dall'osservazione dell'albero filogenetico, è inoltre possibile dedurre alcune considerazioni sui rapporti filogenetici all'interno della specie *R. philippinarum*. L'aplotipo Rp hap11 non è mai stato rinvenuto nei campioni europei sin qui analizzati, ed è caratteristico di una sequenza scaricata dalla banca dati GenBank, ottenuta a partire da esemplari di origine cinese. Tale aplotipo si presenta in posizione basale nell'albero, e potrebbe quindi rappresentare l'aplotipo caratteristico delle popolazioni dell'areale primario di distribuzione di *R. philippinarum*.

L'aplotipo Rp hap1 presenta una posizione ravvicinata con l'aplotipo Rp hap11, suggerendo che tale aplotipo sia quello più simile all'aplotipo originariamente introdotto dalla Cina. Infatti, l'aplotipo Rp hap1 è quello più comune e diffuso in tutte le popolazioni analizzate. E' presente infatti in tutti i campioni analizzati in questa tesi, provenienti dalla Laguna di Marano, nonché da quelli della Laguna

di Venezia, dal Delta del Po e dalla Costa Galiziana della Spagna (Baccarani, 2012; Chiesa et al., 2012a,b).

A partire da tale aplotipo, sarebbero quindi derivati tutti gli altri aplotipi osservati, con specifiche differenze a livello geografico.

Considerando l'insieme dei dati forniti dal test di Tajima, dall'analisi MSN, e dall'albero filogenetico, e conoscendo la storia della vongola verace filippina nelle lagune costiere dell'Alto Adriatico, si può quindi ipotizzare che a partire da una prima introduzione effettuata con un numero limitato di campioni, probabilmente caratterizzati dall'aplotipo Rp hap1, si siano verificati successivi eventi introduttivi, e che le mutazioni osservate a carico del frammento del gene *16S* qui analizzato, non possano essere considerate mutazioni spontanee. La presenza di un elevato numero di aplotipi in una ristretta area geografica sottolinea l'avvenuto inserimento di stock differenti.

Per quanto riguarda nello specifico i campioni della laguna di Marano analizzati in questo lavoro di tesi, i dati ottenuti dal sequenziamento diretto di un frammento del gene *16S* indicano una stretta somiglianza genetica tra le due popolazioni, entrambe caratterizzate dallo stesso aplotipo.

Pur consapevoli che il marcatore analizzato ha un basso potere di risoluzione in genetica di popolazione, ma risulta utile a livello biogeografico, i risultati sin qui ottenuti tramite sequenziamento del gene *16S* indicano un marcato livello di differenziamento molecolare e una evidente struttura biogeografica tra le diverse popolazioni di *Ruditapes philippinarum* sinora analizzate. Tali risultati suggeriscono "effetti del fondatore" multipli, generati dall'inserimento di diversi stock produttivi provenienti da aree distinte. In particolare, i dati evidenziano il manifestarsi di un aplotipo comune (Rp hap1) ai campioni del Nord Adriatico e ai campioni provenienti dalla Spagna, probabilmente in conseguenza di una introduzione con materiale da semina di origine comune, e di aplotipi differenti derivanti dall'introduzione successiva di diversi stock. Il differenziamento genetico rilevato tramite le analisi sull'mtDNA delle popolazioni investigate favorisce l'ipotesi del cosiddetto "effetto del fondatore" e di eventi introduttivi multipli (Chiesa et al., 2011). Tale ipotesi è anche supportata dalle testimonianze che riportano introduzioni successive (Turolla, 2008), a seguito della prima introduzione documentata da Breber (1985) e Pellizzato et al. (1989). Tali immissioni sono avvenute con novellame proveniente da schiuditoi della Gran Bretagna, Spagna e Stati Uniti, ove la specie *R. philippinarum* era stata in precedenza introdotta (Turolla, 2008).

E' noto in letteratura (Roman e Darling 2007) che le introduzioni di specie alloctone siano in maggioranza effettuate o a partire da popolazioni diverse, o da un pool di individui geneticamente differenti costituito artificialmente. Queste ipotesi potrebbero essere entrambe veritiere per quanto riguarda la vongola verace filippina introdotta nelle lagune costiere dell'Alto Adriatico.

L'analisi dell'mtDNA ha dimostrato il manifestarsi di introduzioni multiple anche in altre specie di molluschi bivalvi, come ad esempio nel mitilo *Mytella charruana*, dove le popolazioni introdotte presentano diversità genetica superiore a quelle naturali, a causa dell'introduzione di pool di individui provenienti da popolazioni differenti (Gillis et al., 2009). Studi recenti hanno dimostrato che fenomeni di introduzione multipli possono essere individuati dalla presenza di linee mitocondriali differenti, geograficamente separate nell'areale primario di distribuzione (Kolbe et al., 2007; Taylor e Keller, 2007).

In un recente lavoro condotto da Mao et al. (2011) attraverso il sequenziamento diretto di un frammento di circa 600bp del gene mitocondriale *COI*, sono stati identificati 74 aplotipi diversi analizzando 19 popolazioni di *R. philippinarum* distribuite all'interno dell'areale primario della specie (Cina e Giappone).

Tali popolazioni presentano elevati livelli di differenziamento genetico, un elevato numero di polimorfismi all'interno della sequenza del gene *COI* (73), e possono essere raggruppate in tre linee

mitocondriali distinte, nettamente separate a livello geografico, come risultato di eventi paleogeografici avvenuti nel Pacifico nordoccidentale durante l'abbassamento dei livelli dell'oceano nel Pleistocene (Mao *et al.* 2011).

Tali risultati indicano quindi che anche le popolazioni primarie di *R. philippinarum* presentano elevata diversità genetica, e che tali differenze possono quindi mantenersi ed accentuarsi nelle popolazioni introdotte, a seguito delle manipolazioni effettuate dall'uomo.

4.13.3 Analisi di loci microsatelliti

Per quanto riguarda l'analisi dei loci microsatelliti, attraverso l'utilizzo dei primers specifici e delle specifiche condizioni di PCR, è stato possibile ottenere da ciascun locus amplificati di differente peso molecolare, di buona qualità e concentrazione (figura 4.57).

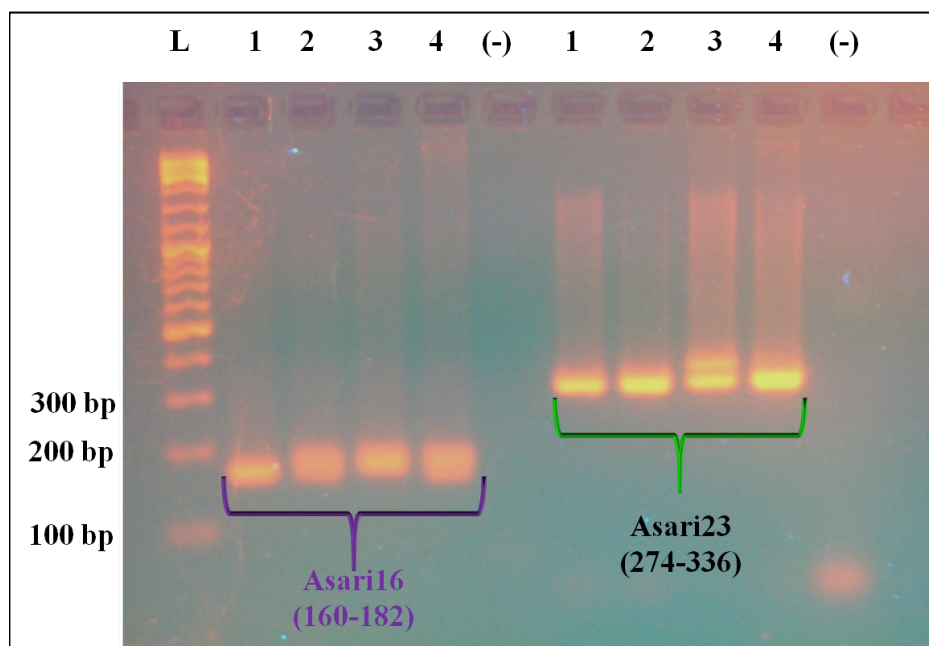


Figura 4.57 Esempio di amplificati dei loci microsatelliti *Asari16* ed *Asari23*. L = ladder, o marcatore di peso molecolare e di concentrazione (100-10000bp), 1-4 = campioni di *Ruditapes philippinarum*, (-) = controllo negativo (Foto S. Chiesa). Si distinguono i campioni omo- ed eterozigoti a ciascun locus.

Successivamente, l'analisi tramite elettroforesi capillare, e la visualizzazione tramite Genographer attraverso confronti multipli tra i diversi individui, hanno permesso di identificare con elevata precisione le differenti varianti alleliche a ciascun locus per ciascun campione (Figure 4.58; 4.59).

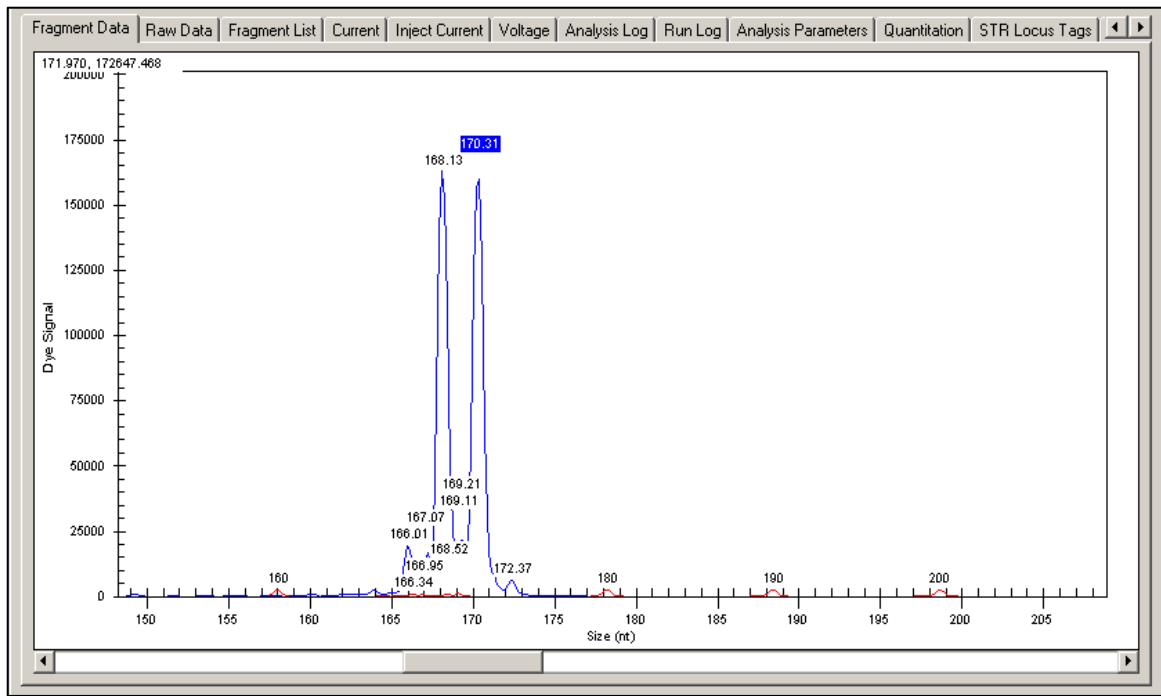


Figura 4.58: Profilo elettroforetico capillare di un campione eterozigote al locus *Asari16*. Sono visibili i due picchi elettroforetici distinti (168-170 bp). In ascissa la dimensione dei frammenti, in ordinata l'intensità del segnale di fluorescenza.

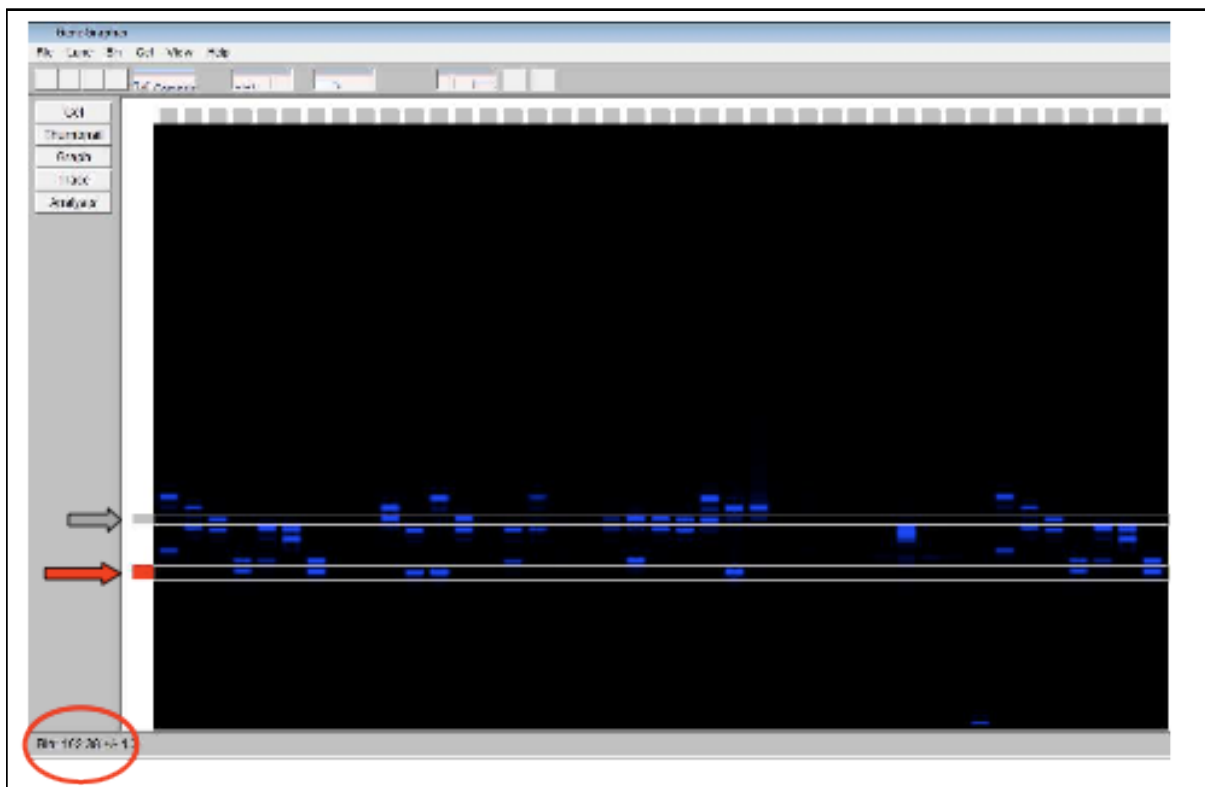


Figura 4.59: Gel virtuale ottenuto con Software Genographer per il locus *Asari16*: ciascuna colonna rappresenta un singolo campione, ciascuna riga contiene i frammenti della stessa dimensione. In particolare, i frammenti evidenziati nella riga in basso (freccia rossa) hanno un peso molecolare di 162 bp, (corrispondenti all'allele 162), la riga in alto (freccia grigia) rappresenta il valore di 172 bp (allele 172).

In alcuni campioni analizzati nel corso di questa tesi di Laurea, non è stato possibile ottenere l'amplificato specifico di alcuni loci, anche dopo ripetuti tentativi; dagli stessi campioni è stato comunque possibile ottenere i prodotti di PCR per altri loci. Ciò favorisce l'ipotesi che le mancate amplificazioni non siano ad attribuire alla scarsa concentrazione e/o qualità del DNA genomico estratto, quanto piuttosto alla diversa efficienza dei primers.

In particolare, al locus *Asari 16* solo il 3% dei campioni analizzati non ha amplificato, mentre negli altri loci tale valore è pari al 13% al locus *Ktp8*, al 26% al locus *Asari23*, al 53% al locus *Asari24*, sino a raggiungere quasi il 70% al locus *Ktp22*, 80% al locus *Ktp5* e 90% al locus *Asari54*.

Tale fenomeno è da attribuire presumibilmente alla presenza dei cosiddetti "alleli nulli", come frequentemente osservato in altre specie di molluschi bivalvi.

Hedgecock et al. (2004) nel bivalve marino *C. gigas*, hanno descritto una percentuale pari al 51% di mancate amplificazioni su 96 loci analizzati. Anche McGoldrick et al. (2000) hanno descritto nella stessa specie una percentuale pari al 67% su 24 loci genotipizzati.

I campioni analizzati in questo lavoro di tesi sono stati inclusi in un dataset più ampio come descritto in precedenza (si veda Chiesa et al., 2011b; Baccarani, 2012; Chiesa et al., 2012a,b), per le successive analisi statistiche.

Innanzitutto, per verificare l'ipotesi degli alleli nulli, è stato effettuato il test di drop-out allelico che ha fornito i seguenti risultati: tutti i loci analizzati, ad eccezione del locus *Asari16*, potrebbero avere alleli nulli in almeno una popolazione, con conseguente rischio di alterazione dell'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Per quanto riguarda il numero di alleli complessivamente identificati a ciascun locus, tale valore è pari a 11 per il locus *Asari16*, 10 per *Asari23*, 8 per *Asari24*, 7 per *Asari54*, 16 per *Ktp5*, 8 per *Ktp8*, 15 per *Ktp22*, per un totale di 75 alleli individuati. Di questi, ben 22 risultano alleli privati, cioè presenti in una sola popolazione.

Tali valori sono conformi a quanto descritto in letteratura (Yasuda et al., 2007; An et al., 2009).

Inoltre, al locus *Asari16*, è stato osservato l'allele 182, mai descritto in precedenza; al locus *Asari23*, sono stati descritti per la prima volta gli alleli 328 e 336; al locus *Asari24* è stato identificato l'allele 164; al locus *Ktp5* sono stati identificati due nuovi alleli 206, 214 e 216; infine, al locus *Ktp22* sono stati identificati quattro nuovi alleli: 220, 223, 262, 265. Il numero di campioni analizzati, gli alleli e le frequenze alleliche per ciascuna popolazione e ciascun locus sono mostrati nelle tabelle in APPENDICE C con particolare riferimento alle popolazioni analizzate in questo lavoro di tesi.

Ad un'attenta analisi delle frequenze alleliche (APPENDICE C I-II-III-IV-V), in particolare, nelle due popolazioni della laguna di Marano analizzate in questa tesi, sono stati individuati 6 alleli privati, 4 nella popolazione UD 15 tapo e 2 nella popolazione UD 16 acque, ai loci *Asari16*, *Asari23*, *Asari24* e *Ktp5*.

La presenza complessiva di un elevato numero di alleli privati nelle popolazioni indagate supporta l'ipotesi di eventi di introduzione successivi: l'elevata diversità genetica delle popolazioni introdotte può essere infatti dovuta a differenti fattori, quali introduzioni multiple (Kolbe et al., 2004), oppure ad una singola introduzione di un elevato numero di individui provenienti da popolazioni differenti (Yue et al., 2010). Tuttavia, non si può escludere anche una intrinseca ipervariabilità dei loci microsatelliti analizzati (Chiesa et al., 2011).

Inoltre, il numero relativamente limitato dei campioni analizzati potrebbe influenzare il numero elevato di alleli privati osservati nelle popolazioni delle lagune costiere dell'Alto Adriatico (Marano, Venezia, delta del Po) e della Galizia, come descritto in precedenza per altri bivalvi (Astanev et al., 2005).

L'ipotesi che tali popolazioni abbiano accumulato un elevato numero di mutazioni nel breve lasso di tempo trascorso dalla loro introduzione risulta improbabile (Astanei et al., 2005).

Per quanto riguarda i valori percentuali dell'eterozigosi attesa (H_e), nell'insieme essa differisce tra i 7 loci analizzati, variando tra un valore minimo dello 0% all'83% (si veda APPENDICE C - VI). Nello specifico delle popolazioni analizzate in questa tesi, invece, il valore di H_e varia dallo 0 all'84% (valore massimo osservato al locus *Ktp22*, popolazione UD 16 acque), come riportato in tabella 4.5.

I valori di eterozigosi osservata (H_o) complessivi variano invece tra lo 0 e l'87% (figura 4.60 e si veda APPENDICE C - VI), mentre nei campioni della laguna di Marano variano dallo 0 all'80% (locus *Ktp8*).

I valori di eterozigosi osservata riscontrati sono generalmente comparabili con quelli descritti in letteratura, anche se nei campioni europei i valori si presentano generalmente inferiori (Yasuda et al., 2007; An et al., 2009). Tuttavia va sottolineato come, specialmente nei campioni analizzati in questo lavoro di tesi, i valori risultino di molto inferiori alla media, ad eccezione del locus *Ktp8*.

Tabella 4.60 - Eterozigosi attesa ed osservata nelle popolazioni della laguna di Marano analizzate in questa tesi, per ciascun locus e ciascuna popolazione. Pop = popolazione N = numero di campioni, H_o = eterozigosi osservata, H_e = eterozigosi attesa.

Popolazione	locus	N	H_o	H_e
UD 16 acque	<i>Asari16</i>	13	0,692	0,775
	<i>Asari23</i>	9	0,222	0,364
	<i>Asari24</i>	1	0	0
	<i>Asari54</i>	1	0	0
	<i>Ktp5</i>	6	0,333	0,806
	<i>Ktp8</i>	11	0,636	0,616
	<i>Ktp22</i>	9	0,222	0,846
	UD 15 tapo	<i>Asari16</i>	16	0,688
<i>Asari23</i>		13	0,308	0,66
<i>Asari24</i>		13	0,154	0,722
<i>Asari54</i>		1	0	0
<i>Ktp5</i>		0	0	0
<i>Ktp8</i>		15	0,8	0,651
<i>Ktp22</i>		0	0	0

Esistono in letteratura molti lavori che descrivono il deficit di eterozigosi nei bivalvi (Bierne et al., 1998; McGoldrick et al., 2000; Hedgecock et al., 2004; Wilson et al., 1999; Arias-Pérez et al., 2012; Marín et al., 2012; Wang et al., 2012), anche se tale fenomeno è stato osservato con maggiore frequenza nelle specie invasive quali *D. polymorpha* (Astanei et al., 2005) e *Procambarus clarkii* (Yue et al., 2010). Molti fattori quali l'inincrocio, l'effetto Wahlund, la selezione e la presenza di alleli nulli possono essere responsabili del deficit di eterozigosi osservata (Freeland, 2005).

Per quanto riguarda l'inincrocio, nelle specie a sessi separati esso può verificarsi in caso di accoppiamento tra consanguinei, con conseguente riduzione dell'eterozigosi (Astanei et al., 2005). In generale, la vongola verace filippina è una specie caratterizzata da elevata fecondità, fecondazione esterna, ed una estesa fase larvale, pertanto l'incrocio all'interno delle singole popolazioni sembra un evento piuttosto improbabile (Chiesa et al., 2011).

Tuttavia, il reclutamento del novellame nelle aree utilizzate per le concessioni di allevamento è quasi esclusivamente di origine naturale, e concentrato in limitate aree geografiche (Porto

Marghera, Delta del Po) ove maggiore è la presenza delle larve. Pertanto, le popolazioni analizzate potrebbero risentire di tale fenomeno.

L'effetto Wahlund si osserva quando un campione contiene un insieme di individui provenienti da due o più popolazioni che differiscono per le frequenze alleliche ad un determinato locus (Astanei et al., 2005): in questo caso specifico, tale condizione non può essere del tutto esclusa dal momento che diversi lotti di novellame potrebbero essere stati seminati all'interno di un'unica area in concessione.

La selezione è un altro possibile fenomeno coinvolto nella riduzione dell'eterozigosi; tuttavia, i loci microsatelliti sono generalmente marcatori neutri, non soggetti a selezione naturale. Inoltre, non sono stati riscontrati effetti di linkage in nessuno dei loci analizzati.

Tuttavia, alla luce dei dati sin qui analizzati, è possibile ipotizzare che la causa più probabile del deficit di eterozigosi sin qui osservato sia da imputare alla presenza di alleli nulli.

La presenza di alleli nulli è uno dei problemi più comuni nell'analisi dei loci microsatelliti, e tale fenomeno può determinare il deficit di eterozigoti (Brookfield, 1996; Hoarau et al., 2002; Chapuis & Estoup, 2007; Brownlow et al., 2008; Lemer et al., 2011). In particolare, come osservato dal test di drop-out allelico, i sette loci microsatelliti analizzati presentano alleli nulli in almeno una popolazione, ad eccezione del locus *Asari16*. Pertanto, la presenza di alleli nulli, ovvero non amplificati a causa di mutazioni puntiformi presenti nella sequenza di annealing dei primers, rappresenta una delle ipotesi più plausibili per spiegare il deficit di eterozigosi osservato.

Questo fenomeno risulta piuttosto frequente nell'analisi dei loci microsatelliti, ma in alcuni gruppi, quali gli invertebrati marini, si presenta con maggior frequenza (Hare et al. 1996; Hedgecock et al. 2004), e specialmente nei bivalvi (Li et al. 2003; Astanei et al. 2005), a causa della elevata diversità genetica intraspecifica. E' interessante notare come, generalmente, in questo *taxon* le popolazioni si presentino con densità elevata e generazioni molto brevi (Chapuis & Estoup, 2007).

Per risolvere il problema degli alleli nulli, e migliorare quindi le prestazioni della PCR a ciascun locus analizzato, sarebbe opportuno in futuro mettere a punto di nuovi primers più specifici, in grado di amplificare anche i campioni sin qui mancanti. Di recente, tale approccio si è rivelato risolutivo nell'analisi dei loci microsatelliti in altre specie di molluschi bivalvi (Lemer et al., 2011).

Il deficit di eterozigosi sin qui osservato ha evidenti conseguenze anche sull'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Infatti, analizzando nell'insieme tutti i dati dei loci microsatelliti sin qui ottenuti (si veda APPENDICE C - VII), e nello specifico i dati raccolti in questa tesi (Tabella 4.22) una deviazione statisticamente significativa dall'equilibrio di HW è stata osservata ai loci *Asari23*, *Asari24*, *Ktp5*, *Ktp8*, *Ktp22*.

Tabella 4.22 Risultati del test di Hardy-Weinberg per le due popolazioni analizzate in questo lavoro di tesi. Pop = popolazione; Locus, ChiSq = χ^2 , prob = probabilità, Signif = significatività statistica. ns= non significativo, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
UD 16 acque	Asari16	21	26,751	0,179	ns
UD 16 acque	Asari23	3	3,327	0,344	ns
UD 16 acque	Asari24	Monomorfico			
UD 16 acque	Asari54	Monomorfico			
UD 16 acque	Ktp5	21	36,000	0,022	*
UD 16 acque	Ktp8	6	2,035	0,916	ns
UD 16 acque	Ktp22	21	41,000	0,006	**
UD 15 tapo	Asari16	21	27,556	0,153	ns
UD 15 tapo	Asari23	15	31,601	0,007	**
UD 15 tapo	Asari24	15	55,250	0,000	***
UD 15 tapo	Asari54	Monomorfico			
UD 15 tapo	Ktp5	Monomorfico			
UD 15 tapo	Ktp8	10	8,776	0,553	ns
UD 15 tapo	Ktp22	Monomorfico			

Per quanto riguarda invece il valore di Fst (tabella 4.23) calcolato per confronti a coppie tra tutte le popolazioni del dataset, esso ha un valore compreso tra 0,170 e 0,388. In accordo con Hartl e Clark (1997), i valori di Fst possono essere interpretati in modo differente: se Fst è inferiore a 0,05 il differenziamento è basso (blu in tabella), se oscilla fra 0,05 e 0,15 il differenziamento fra le due popolazioni è moderato (nero), se l'oscillazione è fra 0,15 e 0,25 è elevato (verde), se invece è superiore a 0,25 molto elevato (rosso).

Il differenziamento genetico osservato tra le popolazioni di *R. philippinarum* analizzate risulta di grado differente, anche in relazione alla distanza geografica. La maggior parte della diversità genetica è quindi imputabile sia alla variabilità tra le singole popolazioni, sia tra popolazioni diverse. E' possibile osservare infatti, come le distanze genetiche tra le popolazioni della laguna di Venezia risultino molto basse, mentre le due popolazioni della laguna di Marano analizzate in questo lavoro di tesi, presentino valori di differenziamento genetico molto elevati rispetto alle altre popolazioni dell'Alto Adriatico presenti nel dataset. Risultano infatti più simili ai campioni provenienti dalla Spagna (ESPANA).

Tabella 4.23 valori di Fst per confronti a coppie.

Busa	Palude del Monte	Fusina	Levante	Caleri	Scardovari	ESPANA	UD 16 acque	UD15 tapo	
0.000									Busa
0.095	0.000								Palude del Monte
0.097	0.037	0.000							Fusina
0.096	0.039	0.056	0.000						Levante
0.148	0.067	0.091	0.066	0.000					Caleri
0.142	0.064	0.076	0.081	0.077	0.000				Scardovari
0.136	0.071	0.070	0.082	0.096	0.073	0.000			ESPANA
0.268	0.170	0.206	0.193	0.214	0.202	0.165	0.000		UD 16 acque
0.386	0.267	0.278	0.307	0.307	0.255	0.228	0.388	0.000	UD 15 tapo

Tali risultati sono anche confermati dai valori delle distanze genetiche di Nei, calcolate a coppie per tutte le popolazioni (tabella 4.24), ed espresse come similarità. I valori sono compresi in un intervallo tra 0 ed 1, ove 0 sta ad indicare una similarità genetica nulla, mentre 1 indica una elevata somiglianza.

Tabella 4.24 Valori delle similarità di Nei, per confronti a coppie tra le popolazioni.

	Busa	Palude del Monte	Fusina	Levante	Caleri	Scardovari	ESPANA	UD 16 acque	UD 15 tapo
Busa	1,000								
Palude del Monte	0,795	1,000							
Fusina	0,823	0,944	1,000						
Levante	0,817	0,944	0,901	1,000					
Caleri	0,654	0,831	0,729	0,883	1,000				
Scardovari	0,629	0,793	0,757	0,780	0,783	1,000			
ESPANA	0,663	0,745	0,792	0,770	0,682	0,738	1,000		
UD 16 acque	0,366	0,557	0,397	0,548	0,460	0,364	0,532	1,000	
UD 15 tapo	0,261	0,379	0,374	0,335	0,291	0,444	0,533	0,260	1,000

Anche in questo caso, si può osservare come le popolazioni della laguna di Venezia, ed in generale dell'Alto Adriatico, presentino tra loro elevati valori di similarità. Fanno eccezione, ancora una volta, le popolazioni della laguna di Marano, che presentano valori di similarità maggiori con i campioni provenienti dalla Spagna.

L'analisi condotta con il software Structure ha permesso di identificare 4 gruppi di genotipi omogenei tra tutti i campioni del dataset (Figura 4.61). La curva logaritmica di probabilità si stabilizza con $k = 4$, ovvero quando si considerino 4 gruppi distinti di genotipi omogenei come più probabili.

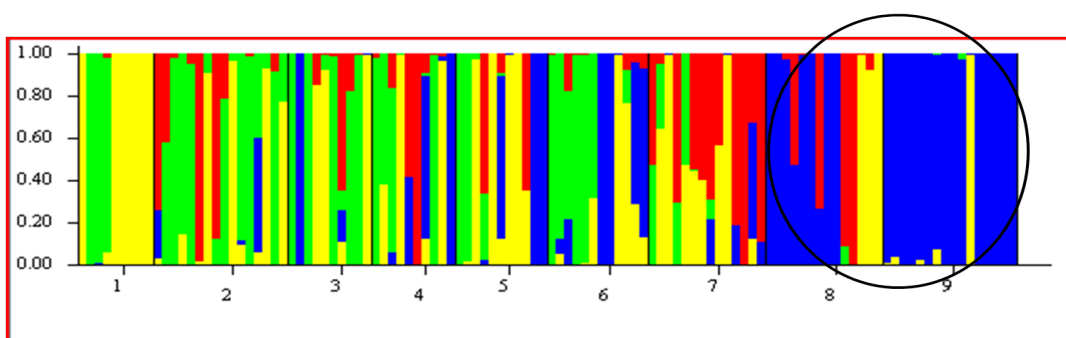


Figura 4.61 Risultati dell'analisi di Structure con $K = 4$.

Come si osserva dalla figura, le popolazioni italiane e spagnole sono fortemente introgresse tra di loro (popolazioni da 1 a 7), mentre le ultime due popolazioni 8 e 9, che corrispondono rispettivamente a UD 16 acque e UD 15 tapo risultano piuttosto differenziate, e caratterizzate da un genotipo poco comune nelle altre popolazioni dell'Alto Adriatico e della Spagna (colore blu).

Infine, l'analisi fattoriale delle corrispondenze (FCA), condotta con il software Genetix, ha confermato quanto sin qui osservato.

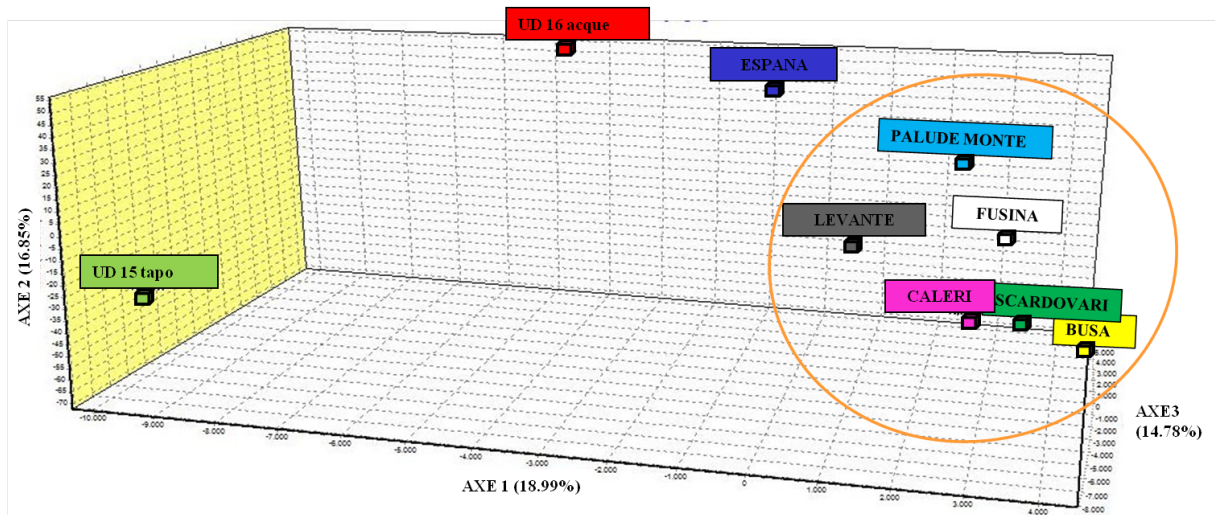


Figura 4.62 Risultati dell'analisi di Genetix.

I tre assi spiegano complessivamente il 51% della varianza, suggerendo un basso livello di differenziamento tra le popolazioni della laguna di Venezia e del Delta del Po, ma un differenziamento più marcato con le popolazioni della Spagna, e soprattutto con quelle della laguna di Marano, analizzate in questo lavoro di tesi (in particolare la popolazione UD 15 tapo risulta molto differenziata).

Complessivamente, quindi, i valori di F_{st} , la similarità di Nei, l'analisi di Structure, l'analisi FCA, indicano tutti un moderato livello di differenziamento genetico tra le popolazioni analizzate, a seconda delle aree indagate. La variabilità genetica osservata può essere considerata alla luce della storia della vongola verace filippina: i risultati ottenuti supportano l'ipotesi di introduzioni multiple e successive da differenti aree di produzione, avvenute in tempi recenti nelle diverse aree investigate. Questo modello potrebbe spiegare sia la diversità genetica osservata (introduzione di stock composti da individui differenti), sia la variabilità all'interno delle popolazioni (come risultato casuale delle introduzioni biologiche) (Barbaresi et al., 2003), non sempre in relazione con l'effettiva distanza geografica.

Studi recenti relativi alla variabilità genetica di altre specie invasive di molluschi bivalvi indicano che i livelli di diversità genetica non diminuiscono in seguito all'introduzione in nuovi ambienti [e.g. *Potamocorbula amurensis* (Duda, 1994), *Perna perna* (Holland, 2001), *Dreissena polymorpha* (Astanev et al., 2005; May et al., 2006), *Dreissena rostriformis bugensis* (Therriault et al., 2005)], anche se un'analisi condotta con marcatori AFLP sulle popolazioni naturali di vongola verace filippina indicano livelli di variabilità maggiori (Liu et al. 2007). Tale studio, tuttavia, è stato condotto attraverso l'analisi di marcatori AFLP, generalmente più polimorfici dei loci microsatelliti. È necessario ricordare che nel caso specifico, la diversità genetica della vongola verace filippina nell'Alto Adriatico è fortemente influenzata dalle attività antropiche, sia per quanto riguarda l'origine del novellame, che per quanto concerne la loro dispersione.

Infine, è doveroso sottolineare come la presenza di alleli nulli e la frequenza delle mancate amplificazioni possano aver influenzato il dataset e, conseguentemente, le successive analisi statistiche.

Pertanto, i risultati sin qui ottenuti dovranno essere confermati attraverso l'analisi di ulteriori campioni, in particolare dalla Laguna di Marano, e da ulteriori marcatori altamente polimorfici.

5. CONCLUSIONI

A conclusione del lavoro di tesi, dall'analisi della complessità dei dati reperiti e dalle elaborazioni effettuate è possibile trarre alcune importanti conclusioni, ferma restando la necessità di approfondire maggiormente i molti aspetti che caratterizzano le matrici ambientali considerate, soggette a un equilibrio dinamico e sottoposte alla pressione di numerose variabili ambientali importanti da monitorare.

È infatti, necessario che l'approccio integrato utilizzato porti ad una sintesi, ad una lettura sinottica e olistica della realtà che consenta di avere un quadro preliminare, ma completo del sistema analizzato.

Quindi, a partire dalle analisi geochimiche, è stato possibile rilevare che si tratta di una Laguna caratterizzata dalla presenza di condizioni ossido-riduttive del tutto particolari che portano molti dei metalli analizzati ad essere presenti in forma immediatamente biodisponibile e potenzialmente biodisponibile.

I due siti, comunque, si differenziano anzitutto per la diversa granulometria che, conseguentemente, sia per concentrazione di metalli che per speciazione degli stessi.

Tuttavia, nessuno dei due siti mostra livelli di concentrazione totale di metalli elevata, ma dalla speciazione è facilmente rilevabile che una percentuale considerevole di questi si trova in forma biodisponibile e che, quindi, è importante monitorarne in modo costante l'andamento di concentrazione e soprattutto effettuare dei test sugli organismi.

Gli esemplari di *R. philippinarum* analizzati per entrambi i siti, hanno mostrato caratteristiche morfologiche molto diverse soprattutto rispetto alla taglia raggiunta a massima crescita dipendente probabilmente dalla granulometria del sedimento, così diversa per i due siti. Ciò conferma che la specie in esame è fortemente euriecia e per questo, ben adattata il Laguna di Marano, pur in condizioni così diverse tra loro e geo-chimicamente particolari.

Al di là di ciò, è stato possibile rilevare come tale organismo sia molto efficiente quale specie "sentinella". Infatti, a partire dalle analisi del contenuto di metalli nei tessuti di organismi spurgati e non spurgati, si è potuto notare come, una volta "pulito" l'organismo dalla presenza di sedimento nei tessuti, la sua fisiologia rimanga il fattore dominante al di là della disponibilità di metalli nel sedimento. Le dinamiche e le cinetiche di *uptake* restano costanti al netto delle diverse condizioni di contaminazione che interessano i siti analizzati.

Ciò conferma ancora una volta come l'uso di tali organismi consenta, con una certa affidabilità, di fare delle considerazioni rispetto alle condizioni ambientali di un sito di interesse, potendo giovare di un'informazione "storicizzata" e non più puntuale, come si avrebbe analizzando la sola matrice ambientale. In più, si è potuto sperimentare un coefficiente di biodisponibilità, che letto insieme al tradizionale Fattore di Bioaccumulo (BAF), consente di avere una sintesi più chiara rispetto alle reali capacità di bioaccumulo dell'organismo, pur restando queste, considerazioni legate alle condizioni di campionamento locali e puntuali. Si è potuto così evidenziare come a fianco alla fisiologia dell'organismo e alla presenza in quantità importanti di metallo in forma biodisponibile, sia necessario mettere in luce anche la effettiva *bioaccessibilità* di tali contaminanti e la geospeciazione, si rivela uno strumento molto utile, pur limitato dalla sua complessità operativa.

È importante sottolineare, che le conseguenze delle dinamiche di depurazione, o spurgo, vanno approfondite, poiché la perdita di peso registrata sugli organismi e l'utilizzo di acque provenienti dagli stessi siti di coltivazione possono essere due fattori che sinergicamente concorrono alla concentrazione invece che alla diluizione della carica inquinante inorganica presente negli organismi stessi, portando ad un risultato sicuramente non favorevole all'aumento di salubrità del prodotto.

Tuttavia, le analisi sugli organismi mostrano che per i metalli per i quali ci siano dei limiti di concentrazione documentati da una normativa vigente, i valori osservati sono tutti ampiamente sotto le soglie indicate. Ma per la maggior parte dei metalli non esiste un limite di concentrazione per i

Molluschi Bivalvi e questo è sicuramente un limite per la valutazione della sicurezza alimentare di tali organismi.

Ma al fine di approfondire gli aspetti di sicurezza e tracciabilità alimentare della specie, è stato fondamentale avvalersi del contributo degli strumenti propri della genetica molecolare che con analisi relativamente semplici e rapide hanno consentito di ricostruire un quadro filogenetico relativo alla specie in rapporto a campioni di organismi già analizzati e presenti nel database del progetto e comprendere sempre meglio i caratteri molecolari distintivi della specie.

Le analisi genetiche condotte in questo lavoro di tesi, e basate su un approccio molecolare integrato (sequenziamento di un frammento del gene mitocondriale *16S* e genotipizzazione di sette loci microsatelliti) hanno fornito per la prima volta informazioni sulla struttura genetica delle popolazioni di vongola verace filippina nell'area della Laguna di Marano, e più in generale, di alcune tra le maggiori aree produttive europee (Laguna di Venezia, Delta del Po, Galizia).

L'Italia rappresenta il secondo produttore mondiale di *R. philippinarum*, e la specie è stata a lungo oggetto di studi di tipo socio- economico, ecologico e fisiologico. Tuttavia, un aspetto importante quale quello della genetica molecolare è stato a lungo ignorato, con gravi conseguenze.

L'approccio basato sulla genetica molecolare è infatti indispensabile per valutare la struttura delle popolazioni di specie invasive, per determinarne la variabilità, ricostruirne la storia e l'origine geografica, predire scenari futuri di espansione e futuri impatti sulle specie native che con esse vengono in contatto. Inoltre, essa è fondamentale per gestire in modo consapevole le risorse alieutiche, sottoposte al prelievo da pesca ed alla costante manipolazione per le attività di acquacoltura.

Dai dati sin qui raccolti ed elaborati, emerge innanzi tutto che le tecnologie basate sullo studio del DNA risultano particolarmente utili e valide per descrivere la variabilità genetica della vongola verace filippina, e che esse rappresentano una metodologia innovativa e dalle elevate potenzialità nell'ambito produttivo dei molluschi bivalvi, soprattutto nell'Alto Adriatico.

È stato possibile stabilire come le popolazioni analizzate in Laguna di Marano, di Venezia, nel delta del Po ed in Galizia siano state oggetto di introduzioni multiple, con "effetti del fondatore" successivi, come suggerito dall'analisi degli aplotipi mitocondriali, che risultano molto numerosi e presentano una chiara struttura biogeografica. La successiva dispersione delle larve, con conseguente flusso genico tra le varie popolazioni introdotte, ha poi ridotto la diversità genetica a livello nucleare, come si evince dall'analisi dei loci microsatelliti, che mostrano invece un moderato livello di differenziamento tra le popolazioni analizzate, in particolare tra quelle dell'Alto Adriatico.

Tuttavia, l'analisi dei loci microsatelliti ha anche evidenziato una netta distinzione delle popolazioni della Laguna di Marano, che presentano dei genotipi specifici, poco condivisi dalle altre popolazioni.

Sarà necessario nel futuro aumentare il numero di campioni e di loci analizzati per confermare tali differenze, ma i risultati sin qui ottenuti sono molto incoraggianti. Essi suggeriscono la possibilità di tipizzare e riconoscere le vongole veraci filippine in base alla loro origine geografica, garantendo la sicurezza del prodotto e scongiurando l'immissione sul mercato di vongole di "frodo", provenienti da aree soggette a vincoli ambientali e divieto di pesca.

Inoltre, le analisi genetiche sin qui messe a punto potranno essere utilizzate per verificare l'eventuale presenza di ibridi tra la specie nativa *R. decussatus*, e la specie commerciale *R. philippinarum*, fenomeno sinora mai indagato nelle aree produttive dell'Alto Adriatico, ma da non trascurare ai fini della qualità del prodotto e della conservazione della biodiversità delle aree lagunari.

BIBLIOGRAFIA

A.A.VV., 1992. Metal metabolism in Aquatic Environments. (Langston W.J. and M.J. Bebianno Eds), Chapman and Hall, London.

Acquavita, A., et al., Mercury in the sediments of the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea): Sources, distribution and speciation, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (2012), doi:10.1016/j.ecss.2012.02.012

Acquavita, A., et al., The effects of resuspension on the fate of Hg in contaminated sediments (Marano and Grado Lagoon, Italy): Short-term simulation experiments, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (2012), doi:10.1016/j.ecss.2011.12.012

Altobelli A., Ortolan I., Il sistema informativo geografico della laguna di Grado e Marano come strumento di gestione integrata. Dipartimento di Biologia, Università di Trieste. Interreg III B CADSES "TWReferenceNet, Management and sustainable development of protected transitional water".

Amiard-Triquet C., Berthet B., Metdyer C., Amiard J.-C. (1986). Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. II Experimental study. *Marine Biology* 92: 7-13.

An H.S., Kim E.M., Park J.Y. (2009). Isolation and characterization of microsatellite markers for the clam *Ruditapes philippinarum* and cross-species amplification with the clam *Ruditapes variegata*. *Conservation Genetics* 10: 1821–1823.

Arfi, R., Guiral, D., Bouvy, M., 1993. Wind induced resuspension in a shallow tropical lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 36, 587e604.

Argese E., Bettiol C., Bertini S., Rigo C., Gobbo L., Colombari S., Frangipane G., Tagliapietra D., Volpi Ghirardini A., Ghetti P.F. (2005). An investigation on heavy metal and arsenic contamination in the Venice lagoon: a speciation approach. *Scientific Research and Safeguarding of Venice*. Vol. III Corila Research Program 2003 results, Ed. P. Campostrini, Corila, Venezia, pp. 239–244.

Argese E., Bettiol C., Volpi Ghirardini A., Fasolo M., Giurin G., Ghetti P. F., 1998. Comparison of in vitro submitochondrial particle and microtx assays for determining the toxicity of organotin compounds. *Environmental toxicology and Chemistry* 17.1005-1012.

Arias-Pérez A. Fernández-Tajes J. Gaspar M. B. Méndez J. (2012). Isolation of Microsatellite Markers and Analysis of Genetic Diversity Among East Atlantic Populations of the Sword Razor Shell *Ensis siliqua*: A Tool for Population Management *Biochem Genet* 50:397–415.

Astanev I., Gosling E., Wilson J., Powell E. (2005). Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Molecular Ecology* 14: 1655–1666.

Aston S.R. and Chester R., 1976. Estuarine sedimentary processes. In *Estuarine Chemistry* 37-52, (Burton J.D. and Liss P.S. eds.), Academic Press London.

Au D.W.T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* 48: 817–34

- Baccarani G. (2012) Identificazione e validazione di marcatori molecolari, fisiologici ed ambientali per la gestione delle risorse alieutiche lagunari. Dipartimento di Scienze Ambientali. Venice, Italy, Ca' Foscari. PhD.
- Barbaresi S., Fani R., Gherardi F., Mengoni A., Souty Grosset C. (2003). Genetic variability in European populations of an invasive American crayfish: preliminary results. *Biological Invasions* 5: 269–274.
- Barbuto M., Galimberti A., Ferri E., Labra M., Malandra R., Galli P., et al. (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International* 43: 376–381.
- Barrett J.C., Vainio H., Peakall D., Goldstein B.D. (1997). 12th meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspectives* 105 (Suppl. 4): 699–737.
- Batley G.E., Gardner D. (1977). SAMPLING AND STORAGE OF NATURAL WATERS FOR TRACE METAL ANALYSIS *Water Research* Vol. 11, pp. 745 to 756. Pergamon Press 1977. Printed in Great Britain..
- Bayne B.L., Thompson R.J. (1970). Some physiological consequences of keeping *Mytilus edulis* in Bellucci, L.G., Frignani, M., Paolucci, D., Ravelli, M., 2002. Distribution of metals in sediments of the Venice lagoon: the role of the industrial area. *Science of the Total Environment* 295, 35–49.
- Bellucci, L.G., Frignani, M., Raccanelli, S., Carraro, C., 2000. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in surficial sediments of the Venice lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin* 40, 65–76.
- Benoit, J.M., Gilmour, C.C., Heyes, A., Mason, R.P., Miller, C.L., 2003. Geochemical and biological controls over methylmercury production and degradation in aquatic ecosystems. In: *Biogeochemistry of Environmentally Important Trace Elements*. ACS Symposium Series, vol. 835, pp. 262e297.
- Bernardello, M., Secco, T., Pellizzato, F., Chinellato, M., Sfriso, A., Pavoni, B., 2006. The changing state of contamination in the lagoon of Venice. Part 2: heavy metals. *Chemosphere* 64, 1334–1345.
- Bierne N., Launey S., Naciri Graven Y., Bonhomme F. (1998). Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* 148: 1893–1906.
- Bochert R. & Zettler M.L. Long-Term Exposure of Several Marine Benthic Animals to Static Magnetic Fields *Bioelectromagnetics* 25:498-502 (2004)
- Bloesch, J., 1995. Mechanisms, measurement and importance of sediment resuspension in lakes. *Marine Freshwaters Research* 46, 295e304.
- Bloom Nicolas S. Parker Jennifer L., Preservation and storage techniques for low-level aqueous mercury speciation *Science of the Total Environment* 337 (2005) 253–263
- Borchardt T., Burchert S., Hablitzel H., Karbe L., Zeitner R. (1988). Trace metal concentrations in mussels: comparison between estuarine, coastal and offshore regions in the southeastern North Sea from 1983 to 1986. *Marine Ecology* 42: 17-31.
- Bordin G., McCourt J., Cordeiro Raposo F., Rodriguez A.R. (1997) Metallothionein-like metalloprotein in the Baltic clam *Macoma balthica*: seasonal variations and induction upon metal exposure. *Marine Biology* 129: 453-463.

Boscò R., Cornello M., Giovanardi O. (2003). Condition Index and air survival time to compare three kinds of Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) farming systems. *Aquaculture International* 11: 243-254

Broeg K., Westernhagen H.V., Zander S., Körting W., Koehler A. (2005). The “bioeffect assessment index” (BAI). A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin* 50: 495–503.

Brookfield I.F.Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5: 453–455.

Brownlow RJ, Dawson DA, Horsburgh GJ, Bell JJ, Fish JD. (2008). A method for genotype validation and primer assessment in heterozygote deficient species, as demonstrated in the prosobranch mollusc *Hydrobia ulvae*. *BMC Genet.* 9:1471–2156.

Burton J.D., 1976. Basic properties and processes in estuarine chemistry. In *Estuarine Chemistry*, (Burton J.D. and Liss P.S. Eds.), Academic Press, London.

Calabrese A. 1984. Ecotoxicological testing with marine molluscs. In “Ecotoxicological testing for the marine environment”. E Jaspers and C. Clauss, eds., vol 1 pp. 455-477. State University of Ghent and Institute of Marine Scientific Research, Bredene, Belgium.

Canapa A., Schiaparelli S., Marota I., Barucca M. (2003). Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia). *Marine Biology* 142: 1125–1130.

Cao L., Kenchington E., Zouros E. (2004). Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics* 166: 883–894.

Cardellicchio N. et al., 2002. *Environmental Pollution* 116 (2002) 265-271.

Caruso, G., Leonardi, M., Monticelli, L.S., Decembrini, F., Azzaro, F., Crisafi, E., Zappalà, G., Bergamasco, A., 2010. Assessment of the ecological status of transitional waters in Sicily (Italy): first characterisation and classification according to a multiparametric approach. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1682e1690.

CEM Corporation. (1994). *Microwave Sample Preparation System Operation Manual*

Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Mol. Biol. Evol.*24(3):621–631.

Chen et al. Molecular phylogeny of venus clams (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) with emphasis on the systematic position of taxa along the coast of mainland China *Zool. Scr.* 40 (3), 260-271 (2011).

Chiesa S., Manente S., Nonnis Marzano F, et al. 2012a. Chemical, Biochemical and Molecular Markers To Assess Safety and Traceability Of Clam Products In Northern Adriatic Lagoons. *Proceedings of the ECSA 50 “Estuarine, Coastal and Shelf Science”, Venice, Italy, June 3-7th.*

Chiesa S., Francesco Nonnis Marzano, Livia Lucentini, Gianluca Baccarani, Giampietro Ravagnan, Emanuele Argese, 2012b. Genetic diversity of introduced manila clam *Ruditapes philippinarum* in

- Northern Adriatic lagoons and Galicia. Proceedings of the AQUA 2012 “Global Aquaculture-Securing our future”. Prague, Czech Republic September 1-5th.
- Chiesa S., Nonnis Marzano F., Bordignon G., De Lucrezia D., Poli I., Argese E. (2009). Molecular Identification of Italian Commercial Shellfish Species. Proceedings of the 12th ICRS International Conference on Shellfish Restoration – Healthy Coastal Environments For Successful Shellfish Restoration. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, September 15- 18th.
- Chiesa S., Nonnis Marzano F., Minervini G., Bordignon G., Baccarani G., De Lucrezia D., Poli I., Ravagnan G., Argese E. (2010). Population genetics of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Northern Adriatic Sea based on mitochondrial and microsatellite markers. Proceedings of the EAS 2010 “European Aquaculture Society” Conference. Porto, Portugal, 6-8th October.
- Chiesa S., Nonnis Marzano F., Minervini G., De Lucrezia D., Baccarani G., Bordignon G., Poli I., Ravagnan G., Argese E. (2011b). The invasive manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in Northern Adriatic Sea: population genetics assessed by an integrated molecular approach. *Fisheries Research* 110: 259-267.
- CNR (1987). Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives* 74: 3-9.
- Covelli, S., et al., Historical flux of mercury associated with mining and industrial sources in the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea), *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (2012), doi: 10.1016/j.ecss.2011.12.038
- Covelli, S., The MIRACLE Hg Project: An integrated approach to understanding biogeochemical cycling of mercury and its relationship with lagoon clam farming, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2012.08.011>
- Critto, A., Marcomini, A., 2001. *Rischio ecologico e inquinamento chimico lagunare*. Cafoscarina, Venezia, 162 pp.
- Cullen WR, Reimer KJ. Arsenic speciation by coupling high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius' J Anal Chem* 1994; 348:205-10.
- Dallinger R. (1995). Mechanisms of metal incorporation into cells. *Cellular Biology in Environmental Toxicology*, pp. 135-154.
- Dawnay N., Ogden R., McEwing R., Carvalho G. R., Thorpe R. S. (2007). Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173: 1–6.
- De Groot A .J., Salomons W. and Allersma E., 1976. Processes affecting heavy metals in estuarine sediments. In *Estuarine Chemistry*, (Burton J.D. and Liss P.S. Eds.), Academic Press, London.
- De Pol, R. “Inquinamento da metalli pesanti in relazione ai processi metabolici: importanza dei metodi di speciazione”. Tesi di dottorato in Scienze Ambientali, XXII ciclo, Università Ca’ Foscari, Venezia 2009.
- Depledge M., Fossi M.C. (1994). The role of biomarker in environmental assessment: invertebrates. *Ecotoxicology* 3: 173–179.

- Devlin, 2006 E.W. Devlin, Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos, *Ecotoxicology* 15 (2006), pp. 97–110.
- Donazzolo, R., Orio, A.A., Pavoni, B., Perin, G., 1984. Heavy metals in sediments of the Venice lagoon. *Oceanologica Acta* 7, 25–32.
- Duda T.F.Jr. (1994). Genetic population structure of the recently introduced Asian clam, *Potamocorbula amurensis*, in San Francisco Bay. *Marine Biology* 119: 235–241.
- Edmonds JS, Francesconi KA. Arsenic metabolism in aquatic ecosystems. In: Langston WJ, Bebianno MJ, editors. *Metal metabolism in aquatic environments*. London: Chapman and Hall; 1992. P. 159-83.
- Edwards E. (2005). World shellfish production keeps growing. *Fish Farming International* 32 (1): p. 38.
- Eggleton, J., Thomas, K.V., 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment International* 30, 973e980.
- Engel D.W., Brouwer M., Thurberg F.P. (1985). Comparison of metal metabolism and metal-binding proteins in the blue crab and the American lobster. In: Vernberg F.J., Thurberg F.O., Calabrese, A., Vernberg, W. (Eds.), *Marine Pollution and Physiology Recent Advances*. University of South Carolina Press, Columbia, SC, pp. 229–245.
- ESAV (1990). *Tapes philippinarum Biologia e Sperimentazione*. Ente di Sviluppo Agricolo Regione Veneto, 299 pp.
- Espineira M., Nerea González-Lavín N., Vieites J. M., Santaclara F. (2008). Development of a method for the genetic identification of flatfish species on the basis of mitochondrial DNA sequences. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 8954–8961.
- Filonzi L., Chiesa S., Vaghi M., Nonnis Marzano F. (2010). Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International* 43: 1383–1388.
- Facca, C., Sfriso, A., Socal, G., 2002a. Temporal and spatial distribution of diatoms in the surface sediment of the central part of the Venice lagoon. *Botanica Marina* 45, 170–183.
- Facca, C., Sfriso, A., Socal, G., 2002b. Changes in abundance and composition of phytoplankton and microphytobenthos due to increased sediment fluxes in the Venice lagoon, Italy. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 54, 773–792.
- Ferrarin C., Umgiesser G., Bajo M., Bellafiore D., De Pascalis F., Ghezzi M., Matassi G., Scroccaro I. Hydraulic zonation of the lagoons of Marano and Grado, Italy. A modelling approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* vol. 87, 561-572.
- Fisher H. (1983). Shell weight as an independent variable in relation to cadmium content of molluscs. *Marine Ecology Progress Series* 12: 59-75.
- Fontolan, G., Pillon, S., Bezzi, A., Villalta, R., Lipizer, M., Triches, A., D'Aietti, A. Human impact and the historical transformation of saltmarshes in the Marano and Grado Lagoon, northern Adriatic Sea. Early diagenetic processes and remobilization of mercury at the sediment-water interface in Covelli, 2012.

- Förstner U. e Wittman G.T.W., 1981. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. (2nd Edition), Springer Verlag.
- Fossi Tankoua O., Amiard-Triquet C., Denis F., Minier C., Mouneyrac C., Berthet B. (2012) Physiological status and intersex in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* from thirteen estuaries in northwest France. *Environmental Pollution* 167 (2012) 70-77.
- Fortes G.G, Nonnis Marzano F., Bouza C., Martinez P., Ajmone-Marsan P., Gandolfi G. (2008). Application of AFLP markers to assess molecular polymorphisms in gynogenetic haploid embryos of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture Research* 39: 41-49.
- Fränze O. (2006). Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecological Indicators* 6: 114–36.
- Frazier J.M., George S.G. (1983). Cadmium kinetics in oysters a comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Marine Biology* 76: 55-61.
- Freeland J.R. (2005). *Molecular Ecology*. John Wiley and Sons, England. 388 pp.
- G.Perin, dispense di lezione, corso di ecotossicologia Facoltà di Scienze Matematico, Fisiche, Naturali. Univesità Ca' Foscari Venezia, 2004
- Gabbot P.A., Stephenson R.R. (1974). A note on the relationship between the dry weight condition index and the glycogen content of adult oysters (*Ostrea edulis* L) kept in the laboratory. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 35: 359–361.
- Gabbott P.A., Walker A.J.M. (1971). Changes in the condition index and biochemical content of adult oysters (*Ostrea edulis* L.) maintained under hatchery conditions. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 34: 99–106.
- Galtier N., Nabholz B., Glemin S., Hurst G.D.D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18: 4541–4550.
- Gambrell R.P., Khalid R.A. and Patrick W.H.Jr., 1980. Chemical availability of Mercury, Lead and Zinc in Mobile Bay sediment suspensions as affected by pH and oxidation- reduction conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 14: 431-436.
- Gambrell R.P., Khalid R.A. and Patrick W.H.Jr., 1980. Chemical availability of Mercury, Lead and Zinc in Mobile Bay sediment suspensions as affected by pH and oxidation- reduction conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 14: 431-436.
- Garrido Ramos M.S., Stewart D.T., Sutherland B.W., Zouros E. (1998). The distribution of male transmitted and female transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* 41: 818–824.
- Gee J.M., Maddock L., Davey J.T. (1977). The relationship between infestation by *Mytilicola intestinalis*, Steuer (Copepoda, Cyclopoidea) and the condition index of *Mytilus edulis* in South West England. *J. Cons. int. Explor. Mer.* 37: 300–308.

Geiszinger A, Goessler W, Francesconi K. Biotransformation of arsenate to the tetramethylarsonium ion in the marine polychaetes *Nereis diversicolor* and *Nereis virens*. *Environ Sci Technol* 2002;36:2905-10

Gillis N.K., Walters L.J., Fernandes F.C., Hoffman E.A. (2009). Higher genetic diversity in introduced than in native populations of the mussel *Mytella charruana*: evidence of population admixture at introduction sites. *Diversity and Distributions* 15: 784–795.

Gosling E., Astaneh I., Was A. (2008). Genetic variability in Irish populations of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: discordant estimates of population differentiation from allozymes and microsatellites. *Freshwater Biology* 53: 1303–1315.

Gray J., 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin* 45: 46-52.

Guerra, R., Pasteris, A., Ponti, M., 2009. Impacts of maintenance channel dredging in a northern Adriatic coastal lagoon. I: effects on sediment properties, contamination and toxicity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85, 134e142.

Hahn M.E. (2002). Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *Science of the Total Environment* 28: 49–69.

Hamza-Chaffai. A., Amiard J.C., Cosson R.P. (1999). Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non-linear model using Box-Cox transformation. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 123: 153–163.

Hare M.P., Karl S.A., Avise J.C. (1996). Anonymous nuclear DNA markers in the American oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. *Mol Biol Evol.* 13:334–345.

Hedgecock D., Li G., Hubert S., Bucklin K., Ribes V. (2004). Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 23: 379–385.

Holland B.S. (2001). Invasion without a bottleneck: microsatellite variation in natural and invasive populations of the brown mussel *Perna perna* (L). *Marine Biotechnology* 3: 407–415.

Howard A.G., Nickless G. (1975). Protein binding of cadmium, zinc, and copper in environmentally insulated limpets *Patella vulgata*. *Journal of Chromatography* 104: 457-459.

Hurtado, N.S., Pérez-García, C., Morán, P., Pasantes, J.J., 2011. Genetic and cytological evidence of hybridization between native *Ruditapes decussatus* and introduced *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) in NW Spain. *Aquaculture* 311, 123–128.

Iosseffini M., Orecchio F. Relazione tecnica sulla perdita di peso e sulla mortalità in alcune specie di molluschi eduli lamellibranchi. *Il pesce*, nr. 2, 1997.

I.S.I.S. “Bonaldo Stringher” La Laguna di Marano, Edizioni della Laguna 157 pp, Udine 2012

Jean G.E. and Bancroft G.M., 1986. Heavy metal adsorption by sulphide mineral surfaces. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 50: 1455-1463.

- Jérôme M., Martinsohn J. T., Ortega D., Carreau P., Verrez-Bagnis V., Mouchel O. (2008). Toward fish and seafood traceability: Anchovy species determination in fish products by molecular markers and support through a public domain database. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 3460–3469.
- Jung H.-S., Yun S.-T., Choi B.-Y., Kim H.-K., Jung M., Kim S.-O., Kim K.-H. Geochimical studies on the contamination and dispersion of trace metals in intertidal sediments around a military air weapons shooting range. *Journal of Soil and Sediments*, vol. 10, number 6 (2010) 1142-1158, DOI: 10.1007/s11368-010-0248-9
- Kappner I., Bieler R. (2006). Phylogeny of Venus clams (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 317–331.
- Karhu A., Vogl C., Moran G. F., Bell J. C., Savolainen O. (2006). Analysis of microsatellite variation in *Pinus radiata* reveals effects of genetic drift but no recent bottlenecks. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 167–175.
- Kingston H.M., Jessie L.B. (1988) Introduction to microwave sample preparation. ACS Professional Reference Book
- Kolbe J.J., Glor R.E., Schettino L.R.G., Lara A.D., Larson A., Losos J.B. (2007). Multiple sources, admixture, and genetic variation in introduced *Anolis* lizard populations. *Conservation Biology* 21: 1612–1625.
- Kolbe K.J., Glor R.E., Schettino L.R., Lara A.C., Larson A., Losos J.B. (2004). Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* 431: 177–181.
- Ladhar-Chaabouni R., Mokdad-Gargouri R., Denis F., Hamza-Chaffai A. (2009). Cloning and characterization of cDNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the Mediterranean bivalves: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma glaucum*. *Molecular Biology Report* 36:1007–1014.
- Lam P.K.S., Gray J.S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* 46: 182–186.
- Landrum P.F. & Robbin J.A. 1990. Bioavailability of sediment-associated Contaminants to benthic Invertebrates in Sediments. In: Chemistry and toxicity of in place pollutants. Ed. Baudo, R., Giesy J.P. e H. Muntau, SETAC publ. pp 238-263.
- Lares M.L., Orians K.J. (1997). Natural Cd and Pb variations in *Mytilus californianus* during the upwelling season. *Science of the Total Environment* 197: 177-195.
- Leignel V., Hardvillier Y., Laulier M. (2005) Small metallothionein MT-10 genes in coastal and hydrothermal Mussels. *Marine Biotechnology* 7: 236-244.
- Leignel V., Laulier M. (2006) Isolation and characterisation of *Mytilus edulis* metallothionein genes. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 142: 12-18.

- Lemer S., Rochel E., Planes S. (2011). Correction Method for Null Alleles in Species with Variable Microsatellite Flanking Regions, A Case Study of the Black-Lipped Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Heredity* 102(2):243–246.
- Lemoine S., Laulier M. (2003). Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Marine Pollution Bulletin* 46: 1450–1455.
- Leonzio C., Fossi M.C., Marsili L., Casini S. (2003). Indagini ecotossicologiche sugli organismi del benthos. *Biologia Marina Mediterranea* suppl: 549–76
- Li G., Hubert S., Bucklin K., Ribes V., Hedgecock D. (2003). Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol Ecol Notes* 3:228–232.
- Li Q., Yu H., Yu R. (2006). Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture* 259: 95–102.
- Liu X., Bao Z., Hu J., Wang S., Zhan A., Liu H., Fang J., Wang R. (2007). AFLP analysis revealed differences in genetic diversity of four natural populations of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in China. *Acta Oceanologica Sinica* 26: 150–158.
- Lobel P.B., Bajdik C.D., Belkhole S.P., Jackson S.E., Longerich H.P. (1991). Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition shell shape and chronological age. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21: 409-414.
- Lockely A. K., Bardsley R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology* 11: 67–77.
- Losso C., Arizzi Novelli A., Picone M., Marchetto D., Pessa G., Molinaroli E., Ghetti P.F., Volpi Ghirardini A. Evaluation of surficial sediment toxicity and sediment physico-chemical characteristics of representative sites in the Lagoon of Venice (Italy). *Journal of Marine Systems* Volume 51, Issues 1–4, November 2004, Pages 281–292
- Lucentini L., Puletti M.E., Ricciolini C., Gigliarelli L., Fontaneto D., et al. (2011) Molecular and Phenotypic Evidence of a New Species of Genus *Esox* (Esocidae, Esociformes, Actinopterygii): The Southern Pike, *Esox flaviae*. *PLoS ONE* 6 (12): e25218.
- Lucentini L., Vercillo F., Palomba A., Panara F., Ragni B. (2007). A PCR-RFLP method on faecal samples to distinguish *Martes martes*, *Martes foina*, *Mustela putorius* and *Vulpes vulpes* *Conservation Genetics* 8: 757-759.
- Luther G. W. III, Meyerson A. L., Krajewski J. J. and Hires R., 1980. Metal sulfides in estuarine sediments. *J. Sediment. Petrol.*, 50: 1117-1120.
- Mackay E.A., Overnell J., Dunbar B., Davidson I., Hunziker P.E., Kagi J.H.R., Fothergill J.E. (1993). Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *European Journal of Biochemistry* 218: 183–194.
- Mackie I.M., S.E. Pryde, C. Gonzales-Sotelo, I. Medina, R. Perez-Martin, J. Quinteiro, M. Rey- Mendez, H. Rehbein. (1999). Challenges in the identification of canned fish. *Trends Food Science and Technology* 10: 9-14.

- Maldini M., Nonnis Marzano F., González Fortes G., Papa R., Gandolfi G. (2006). Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture* 261: 487–494.
- Manente S. (2003). Trasferimento di inquinanti tossici da sedimenti a Molluschi in ambiente di transizione. Dipartimento di Scienze Ambientali. Venice, Italy, Ca' Foscari. PhD.
- Marcomini, A., Zanette, M., D'Andrea, F., Della Sala, S., 1997. Dioxin, Environment and Health. Arsenale Editrice, Venezia, 102 pp. (in Italian).
- Marko P. B., Lee S. C., Rice A. M., Gramling J. M., Fitzhenry T. M., McAlister J. S., et al. (2004). Mislabelling of a depleted reef fish. *Nature* 430: 309–310.
- Marín A., Fujimoto T., Arai K. (2012). Isolation and characterization of 12 microsatellite loci in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* and cross-species amplification in other scallop species (family Pectinidae). *Conservation Genet Resour* 4:179–182.
- May G.E., Gelembiuk G.W., Panov V.E., Orlova M.I., Lee C.E. (2006). Molecular ecology of zebra mussel invasions. *Molecular Ecology* 15: 1021–1031.
- McDonald D.A., Matta M.B., Field L.J., Cairncross C., Munn M.D. (1997). The coastal resource coordinator's bioassessment manual. Report N HAZMAT 93-1 (revises). Seattle (WA). National Oceanic and Atmospheric Administration. 147 pp.+appendices.
- McGoldrick D., Hedgecock D., English L.J., Baoprasertkul P., Ward R.D. (2000). The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research* 19: 779–788.
- MEA (Millennium Ecosystem Assessment), 2005. Ecosystem and human well-being: Synthesis. Island press, Washington DC. World Resources Institute.
- Mikkelsen P.M., Bieler R., Kappner I., Rawlings T. (2006). Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society of London* 148: 439–521.
- Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L., Amyot, M., 1998. The chemical cycle and bio-accumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, 543e566.
- Mouneyrac C., Amiard J.C., Amiard-Triquet C. (1998). Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. *Marine Ecology Progress Series* 162: 125–135.
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nolan C.V., Duke E.J. (1983). Cadmium accumulation and toxicity in *Mytilus edulis*: Involvement of metallothioneins and heavy-molecular weight proteins. *Aquatic Toxicology* 4: 153–163.
- Nonnis Marzano F., Scalici M., Chiesa S., Gherardi F., Piccinini A., Gibertini G. (2009). The first record of the marbled crayfish adds further threats to fresh waters in Italy. *Aquatic Invasions* 4 (2): 401-404.

- Nonnis Marzano F. (2005). Innovazione e imprese: la genetica molecolare al servizio dell'industria alimentare. *Innovare* 4: 76-77.
- Olafson R. W., Kearns A., Sim R. G. (1979a). Heavy metal induction of metallothionein synthesis in the hepatopancreas of the crab *Scylla serrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 62B: 417-424
- Olafson R. W., Sim R. G., Boto K. G. (1979b). Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 62B: 407-416
- Opperhuizen A. 1991. Bioaccumulation and Biomagnification: is a distinction necessary? In: *Bioaccumulation in aquatic systems*, Nagel R. and R. Loskill (Eds), VCH, Germany, pp. 67-80.
- Orban E., Di Lena G., Navigato T., Casini I., Marzetti A., Caproni R., (2002) Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry* 77 (2002) 57-65
- Paesanti P., Pellizzato M. (2000). *Ruditapes philippinarum*, Manuale della vongola verace d'allevamento. *Veneto Agricoltura* 73 pp.
- Papa R., Nonnis Marzano F., Rossi V., Gandolfi G. (2003). Genetic diversity and adaptability of two species of Mugilidae (Teleostei: Perciformes) of the Po river delta coastal lagoons. *Oceanologica Acta* 26: 121-128.
- Papa R., Troggio M., Ajmone-Marsan P., Nonnis Marzano F. (2005). An improved protocol for the production of AFLP markers in complex genomes by means of capillary electrophoresis. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122: 62-68.
- Passamonti M. (2007). An unusual case of gender associated mitochondrial DNA heteroplasmy: the mytilid *Musculista senhousia* (Mollusca Bivalvia). *Proceedings of Second Congress of Italian Evolutionary Biologists (First Congress of the Italian Society for Evolutionary Biology)*, Florence, Italy, 4-7 September 2006. *BMC Evolutionary Biology* 7 (Suppl. 2): S7.
- Passamonti M., Boore J.L., Scali V. (2003). Molecular evolution and recombination in Gender associated mitochondrial DNAs of the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Genetics* 164: 603-611.
- Passamonti M., Scali V. (2001). Gender associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Current Genetics* 39: 117-124.
- Patarnello T., Bargelloni L., Caldara F., Colombo L. (1994). Cytochrome b and 16S rRNA sequence variation in the *Salmo trutta* (Salmonidae, Teleostei) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 69-74.
- Peakall R., et al. (1995). Evolutionary implications of allozyme and RAPD Variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology* 4: 135-147.
- Peakall R., Smouse P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Phillips D.J.H., 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments – a review, *Environmental Pollution*, 13, 281-317.

Plazzi F., Ceregato A., Taviani M., Passamonti M. (2011). A Molecular Phylogeny of Bivalve Mollusks: Ancient Radiations and Divergences as Revealed by Mitochondrial Genes. *PLoS ONE* 6(11): e27147.

Plazzi F., Passamonti M. (2010). Towards a molecular phylogeny of mollusks: bivalves' early evolution as revealed by mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 641–657.

Presa P., Pérez M., Diz A.P. (2002). Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp.). *Conservation Genetics* 3: 441–443.

Ramieri, E., Barbanti, A., Picone, M., Menchini, G., Bressan, E., Dal Forno, E., 2011. Integrated plan for the sustainable management of the lagoon of Marano and Grado. *Littoral* 2010 05008 (2011). <http://dx.doi.org/10.1051/litt/201105008>.

Razzoli M., Papa R., Valsecchi P., Nonnis Marzano F. (2003). AFLP to assess genetic variation in laboratory gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Heredity* 94 (6): 507-511.

Roesijadi G. (1994) Behaviour of MT-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. *Marine Environmental Research* 38: 147-168.

Roesijadi G. (1996). Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 113 (2): 117–123.

Roesijadi G., Klerks P. (1989). A kinetic analysis of Cd-binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *Journal of Experimental Zoology* 251: 112.

Salomons W., 1985. Sediments and water quality. *Environ. Technol. Lett.*, 6: 315-326.

Sanford, L.P., Panagiotou, W., Halka, J.P., 1991. Tidal resuspension of sediments in northern Chesapeake Bay. *Marine Geology* 97, 87e103.

Scalici M., Chiesa S., Gherardi F., Ruffini M., Gibertini G., Nonnis Marzano F. (2009). The new threat to Italian inland waters from the alien crayfish “gang”: the Australian *Cherax destructor* Clark, 1936. *Hydrobiologia* 632: 341-345.

Schlenk D. (1999). Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin* 39: 48–53.

Schoellhamer, 1996; Lewis et al., 2001

Sfriso A., Facca C., Ceoldo S., Silvestri S., Ghetti P.F. (2003). Role of macroalgal biomass and clam fishing on spatial and temporal changes in N and P sedimentary pools in the central part of the Venice lagoon. *Oceanologica acta* 26 (2003) 3-13.

Sfriso A., Facca C., Marcomini A. (2005). Sedimentation rates and erosion processes in the lagoon of Venice. *Environmental international* 31 (2005) 983-992

Simes D.C., Bebianno M.J., Moura J.J.G. (2003). Isolation and characterization of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology* 63: 307–318.

- Sobolewska H., Beaumont A.R. (2005). Genetic variation at microsatellite loci in northern populations of the European flat oyster (*Ostrea edulis*). *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.* 85: 955–960.
- Sobolewska H., Beaumont A.R., Hamilton A. (2001). Dinucleotide microsatellites isolated from the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Molecular Ecology Resources* 1: 79–80.
- Sønstebø J. H., Borgstrom R., Heun M. (2008). Genetic structure in alpine brown trout *Salmo trutta* L. shows that indirect stocking affects native lake populations. *Journal of Fish Biology* 72: 1990–2001.
- Stillman M.J. (1995). *Coordination Chemistry Reviews* 144: 461–511.
- Taylor D.R., Keller S.R. (2007). Historical range expansion determines the phylogenetic diversity introduced during contemporary species invasion. *Evolution* 61: 334–345.
- Tessier A., Campbell P. G. C. and Bisson M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.*, 51: 844–851.
- Tessier A., Campbell P.G.C. (1987). Partitioning of trace metals in sediments: relationship with bioavailability. *Hydrobiologia* 149: 43–52.
- Terol J., Mascarell R., Fernandez-Pedrosa V., Perez-Alonso M. (2002). Statistical validation of the identification of tuna species: Bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50: 963–969.
- Thain J.E. 1991. Biological effects of contaminants: oyster (*Crassostrea gigas*) embryo bioassay. *Tecnics in Marine Enviromental Sciences, ICES* 11: 1.12.
- Therriault T.W., Orlova M.I., Docker M.F., MacIsaac H.J., Heath D.D. (2005). Invasion genetics of a freshwater mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in eastern Europe: high gene flow and multiple introductions. *Heredity* 95: 16–23.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.
- Turolla E. (2008). La venericoltura in Italia. In: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO.
- Unger M.E., Chen T.T., Murphy C.M., Vestling M.M., Fenselau C., Roesijadi G. (1991). Primary structure of molluscan metallothionein deduced from PCR-amplified cDNA and mass spectrometry of purified proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1074: 371–377.
- US EPA, 2000a. Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assesement. Status and needs. EPA-823-R-00-001.
- US EPA, 2000b. Appendix to bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment: status and needs chemical-specific summary tables. EPA-823-R-00-002.

- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Derek P. ., Wills M., Shipley P. (2004). MICRO- CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Viarengo A., Pertica M., Mancinelli G., Zanicchi G., Bouquegneau J.M., Orunesu M. (1984). Biochemical characterization of copper thioneins isolated from the tissues of mussels exposed to the metal. *Molecular Physiology* 5: 41–52.
- Viarengo A., Pertica M., Mancinelli G., Zanicchi G., Orunesu M. (1980). Rapid induction of copper-binding proteins in the gills of metal exposed mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology* 67C: 215-218.
- Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. (1997). A simple spectrophotometric method for MT evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research* 44: 69-84.
- Volpi Ghirardini A, Pellegrini D. (2001). Toxicity bioassays in water and sediment quality assessment of marine and transitional environments: suggestions for the choice, set up, evaluation and application of methods. *Biologia Marina Mediterranea* 8(2): 1-16.
- Volpi Ghirardini, dispense di lezione corso di ecotossicologia Facoltà di Scienze Matematico, Fisiche, Naturali. Università Ca' Foscari Venezia, 2012.
- Walne P.R. (1970). The seasonal variation of meat and glycogen content of seven populations of oyster *Ostrea edulis* L. and a review of the literature. *Fish. Invest. Ser. II Mar. Fish. G.B. Minist Agric. Fish. Food* 26. 35 pp.
- Wang J.X., Xu T.J., Wei L., Meng F.X. and Wang R.X. (2012) Characterization of nine novel microsatellite loci for the Venus clam (*Cyclina sinensis*). *Genet. Mol. Res.* 10 (2): 379-382.
- Windom H. L., Schropp S. J., Calder F. D., Ryan J. D., Smith R. G. Jr., Burney L. C., Lewis F. G and Rawlinson C. H., 1989. Natural trace metal concentrations in estuarine and coastal marine sediments of the southeastern United States. *Environ. Sci. Technol.*, 23: 314-320.
- Yasuda N., Nagai S., Yamaguchi S., Lian C.L., Hamaguchi M. (2007). Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Molecular Ecology Research* 7: 43–45.
- Yue G.H., Li J., Bai Z., Wang C.M., Feng F. (2010). Genetic diversity and population structure of the invasive alien red swamp crayfish. *Biological Invasions* 12: 2697–2706.
- Zatta P., Gobbo S., Rocco P., Perazzolo M. and M. Favarato, 1992 Evaluation of heavy metal pollution in the Venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. *Sci. Total Environ.*, 119: 29-41.
- Zentilin A., Orel G. e Zambon R. L'introduzione in Europa di *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1852), la vongola verace filippina. *Saggio professionale* 2007-04-05.
- Zonta R., Argese E., Costa F. and Zaggia L., 1995. Useful trace parameters to investigate the environmental conditions in areas of the Venice Lagoon. *Wetlands Ecology*, 3: 139- 147.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei sentitamente ringraziare tutte le persone che in questi impegnativi mesi di lavoro sono state vicine, ciascuna a modo suo e ciascuna dando instancabilmente un apporto fondamentale per la buona riuscita di questo lavoro: il prof. Emanuele Argese, la Sign. Lorena Gobbo, la Dr. Sabrina Manente, la Dr. Stefania Chiesa e la Dr. Fabiola Minello.

Ringrazio con affetto le mie compagne di strada (e di sventure!) Marta Cristoforetti e Alessandra Zuin per avermi regalato prima che molto sostegno professionale anche la loro amicizia che più di tante altre cose rende il cammino gioioso e sopportabile, anche nei momenti difficili!

La mia gratitudine va anche e soprattutto alla mia famiglia e ai miei nonni per avermi sostenuta e guidata in questi anni di sacrifici e soddisfazioni condivisi nella semplicità e nella vita (frenetica) della nostra casa.

Ringrazio con tutto il cuore Francesco e i miei cari amici, per la vicinanza costante e per le attenzioni sincere e premurose di cui ho goduto, per non essermi mai sentita sola sulla mia strada.

APPENDICE A

APPENDICE B

APPENDICE C