



Università
Ca' Foscari
Venezia

Dottorato di ricerca in Scienze Ambientali
Scuola di dottorato in Scienze e Tecnologie
Ciclo XXIV
(A.A. 2011 - 2012)

***Identificazione e validazione di marcatori molecolari, fisiologici
ed ambientali per la gestione delle risorse alieutiche lagunari***

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI AFFERENZA: BIO/07
Tesi di dottorato di Gianluca Baccarani, matricola 955658

Coordinatore del Dottorato

Prof. Bruno Pavoni

Tutore del dottorando

Prof. Emanuele Argese

Co-tutore del dottorando

Dr. Sabrina Manente

Dr. Stefania Chiesa

Dr. Davide De Lucrezia

Alla mia Famiglia, nucleo della mia Vita, senza la quale nulla di tutto questo sarebbe stato possibile...

...e al mio "Equipaggio", una famiglia sui generis di cui sono orgoglioso di fare parte...

*I've known a wind so cold and seen the darkest days
But now the winds I feel, are only winds of change
I've been through the fire and I've been through the rain
But I'll be fine*

Rod Stewart
"Faith of the Heart"

Chiunque è in grado di sviluppare le proprie potenzialità, ciò che noi siamo può anche essere predeterminato, ma il cammino che seguiamo è sempre frutto delle nostre scelte...

Non dovremmo mai permettere alle nostre paure o alle aspettative che riponiamo negli altri di porre limiti al nostro destino...

Il destino non si può cambiare ma lo si può sfidare, ogni uomo nasce come molti uomini e muore come uno solo...

"N.C.I.S." Episodio 7x07
"Endgame"

Indice Generale

1. Introduzione.....	1
1.1 Lo Stato dell'Arte della Venericoltura nel Nord Est	1
1.2 Biologia ed Ecologia di <i>R. philippinarum</i> come organismo modello.....	6
1.3 Aree idonee all'Allevamento: caratteristiche di base	11
1.4 Potenziali cause dell'Inquinamento Inorganico.....	14
1.4.1 Laguna di Venezia	14
1.4.2 Delta del Po	17
1.5 Distribuzione dei metalli nei sedimenti: biodisponibilità, bioaccessibilità, bioaccumulo.....	19
1.6 Bioindicatori in Ambienti di Transizione.....	26
1.6.1 Metallotioneine.....	29
1.7 Genetica molecolare e tracciabilità della filiera	33
1.8 Obiettivi e scopo del lavoro.....	38
2. Aree di Studio.....	39
2.1. Definizione e caratterizzazione delle Stazioni in Laguna di Venezia	39
2.2 Definizione e caratterizzazione delle Stazioni sul Delta del Po	44
3. Materiali e Metodi	49
3.1 Raccolta dei campioni	49
3.2 Materiali e reagenti.....	53
3.3 Estrazione dei metalli in campioni di sedimento ed organismi mediante digestore a microonde	54
3.4 Analisi sui sedimenti	57
3.4.1 Indagine granulometrica	57
3.4.2 Contenuto totale di metalli	58
3.4.3 Speciazione geochimica	60
3.5 Analisi sugli organismi.....	65
3.5.1 Contenuto totale di metalli	65
3.5.2 Quantificazione delle metallotioneine	65
3.5.3 Fattore di bioaccumulo (BAF).....	69

3.5.4 Condition Index (CI)	69
3.6 Metodi analitici utilizzati per l'analisi dei metalli nei campioni di sedimento e organismi	72
3.7 Controllo e ottimizzazione della performance delle procedure di estrazione e delle analisi strumentali dei metalli pesanti e metalloidi testati	76
3.8. Analisi statistiche sui dati ambientali	78
3.9 Analisi genetiche	79
3.9.1 Estrazione e purificazione del DNA genomico.	80
3.9.2. Amplificazione tramite PCR	82
3.9.3. Analisi di sequenziamento diretto del gene mitocondriale <i>16S</i>	82
3.9.4. Analisi di loci microsatelliti	83
3.9.5. Analisi statistiche e filogenetiche dei dati di genetica molecolare	84
4. Risultati e Discussione	87
4.1 Indagine granulometrica	88
4.2 Contenuto totale di metalli nei sedimenti	91
4.3 Contenuto di metalli negli organismi	101
4.4 Speciazione geochimica	119
Arsenico.....	119
Cromo	124
Nichel	128
Rame.....	132
Zinco.....	136
Cadmio	140
Piombo.....	144
Ferro	148
Mercurio	152
4.5 Fattore di bioaccumulo	153
4.6 Metallotioneine.....	155
4.7 Condition Index (CI)	160
4.9 Analisi Genetiche	163

4.9.1. Estrazione e purificazione del DNA genomico	163
4.9.2. Analisi del gene mitocondriale <i>16S</i>	163
4.9.3. Analisi di loci microsatelliti	175
5. Conclusioni.....	193
6. Bibliografia.....	201
6.1 Siti Internet di interesse.....	220
7. Produzione Scientifica del Candidato.....	221
7.1 Partecipazione a Congressi Internazionali.....	221
7.2 Partecipazione a Congressi Nazionali	221
7.3 Abstract brevi	221
7.4 Extended abstracts	222
7.5 Pubblicazioni originali su riviste con I.F.....	222
Ringraziamenti	223
Estratto per riassunto della tesi di dottorato	225

1. Introduzione

1.1 Lo Stato dell'Arte della Venericoltura nel Nord Est

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) (Figura 1).



Figura 1 – Esempari di *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850).

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 200000 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), 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).

A seguito dell'introduzione a scopo sperimentale di *R. philippinarum* in Laguna di Venezia, avvenuta all'inizio degli anni ottanta (Cesari & Pellizzato, 1985; Pellizzato & Mattei, 1986), nel giro di pochi anni si è avuta la formazione in Laguna di banchi naturali di questo bivalve adatti per essere sfruttati commercialmente; diversamente da quanto è accaduto nelle sacche del Delta del Po, in Laguna di Venezia la specie *R. philippinarum* si è diffusa più lentamente, colonizzando però più ampi areali in modo pressoché indisturbato. Solo negli anni seguenti (1990–91) è iniziata un'attività di raccolta sistematica e di pesca massiva ad opera di pescatori professionisti e neo-vongolari, fino a raggiungere una dimensione assolutamente inaspettata (Rossi *et al.*, 2000). Rispetto alla specie autoctona, la specie introdotta si è dimostrata maggiormente resistente alle variazioni di temperatura e salinità, in grado di adattarsi ad una maggiore varietà di substrati, e aspetto molto importante, dotata di un tasso di crescita ben più elevato (Breber, 2002).

Nel giro di pochi anni dunque, *R. philippinarum* è diventata la più importante specie sfruttata nella Laguna, con un picco di produzione stimato alla fine degli anni 90 di oltre 40000 tonnellate/anno (Pellizzato & Da Ros, 2005).

Tutte le tecniche impiegate per la raccolta a fini commerciali di questo mollusco sono concepite in modo da penetrare nel sedimento fino ad una profondità di almeno 10-15 centimetri. Si va quindi dalla raccolta manuale con rastrello, la cosiddetta "rasca", trainato a piedi oppure manovrato da un'imbarcazione, fino all'utilizzo di diversi sistemi meccanizzati di raccolta (draga idraulica, vibrante, rusca) (Pellizzato & Giorgiutti, 1997; Pellizzato *et al.*, 2006a) (Figura 2). La draga vibrante è stata inizialmente introdotta in Laguna in via sperimentale allo scopo di valutarne gli

effetti sia in termini di rese di pesca che del suo impatto sul comparto bentonico (ICRAM, 1995). Attualmente, la pesca con la rusca è estremamente diffusa in tutta la Laguna ed è stato stimato che siano circa 600-800 le imbarcazioni, ognuna con un equipaggio di 2 o 3 persone, che impiegano questo metodo di pesca per la raccolta delle vongole (Provincia di Venezia, 2000; Boatto & Pellizzato, 2005).

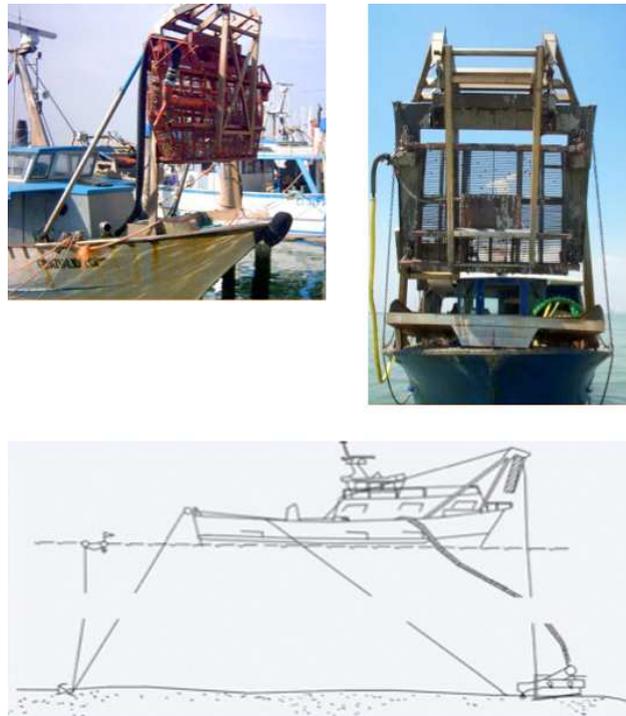


Figura 2 – Esempi di imbarcazioni e draghe meccaniche utilizzate per la pesca della vongola.

Questo sfruttamento indiscriminato ha provocato nel tempo seri danni al sensibile ecosistema lagunare veneziano, e ha condotto ad un diffuso abusivismo con conseguenti rischi sanitari. Ancora oggi lo stato di “disordine” è tale che non è possibile risalire ai dati effettivi di produzione derivanti dall’attività di pesca e acquacoltura delle veraci in Laguna di Venezia (Turolla, 2008).

La transizione da uno stato di pesca incontrollata ad un sistema basato sulla cultura e sulla conoscenza, e quindi sul corretto impiego di processi di acquacoltura sostenibili, se da un lato ha avuto successo nel ridurre la produzione di *R. philippinarum*, dall’altro si è rivelato più complesso del previsto e non può considerarsi completato (Pellizzato & Da Ros, 2005).

L’attuale gestione della risorsa vongola verace in Laguna di Venezia prevede attività coordinate di allevamento e di pesca gestita da effettuarsi in aree apposite date in concessione dal Magistrato alle Acque di Venezia ad un ente gestore unico, la Società G.R.A.L. (Gestione Risorse Alieutiche Lagunari) sotto forma di concessioni demaniali o di permessi esclusivi di pesca (anche se esistono impianti collocati in proprietà private). Gli allevatori sono organizzati in cooperative composte da

un minimo di 3–4 fino a oltre 500 soci, i quali svolgono generalmente altre attività associate al settore pesca e acquacoltura. Si stima che in Italia la venericoltura conti almeno 4000–5000 addetti e che il volume d'affari alla produzione sia di 200 milioni di euro (Turolla, 2008).

Nel periodo 2006-2008 la Provincia di Venezia, in seguito ad una verifica effettuata dal G.R.A.L. sulle aree in concessione per valutare la compatibilità con i vincoli sanitari (D.G.R. della Regione Veneto n. 2432 del 01/08/2006) e ambientali, e la loro idoneità per le attività di venericoltura, è stata in grado di rimodellare e ridurre le aree date in concessione ai pescatori (G.R.A.L., 2006, 2009; Provincia di Venezia, 2009). Questo al fine di ridurre i rischi per la salute legati agli inquinanti industriali e allo scarico di rifiuti urbani, e minimizzare gli impatti ambientali dovuti al dragaggio dei fondali, quali ad esempio la perdita di sedimento (Molinaroli *et al.*, 2007), l'aumento della torbidità delle acque e la movimentazione di nutrienti e inquinanti (Pranovi *et al.*, 2004; Sfriso *et al.*, 2005), in un'ottica conservazionistica di protezione degli habitat e massimizzazione della produzione per ridurre lo sforzo di pesca nello spazio e nel tempo (Vincenzi *et al.*, 2011).

I circa 3500 ha in concessione al G.R.A.L. nel 2005 sono stati ridotti a circa 3241 ettari nel febbraio 2007, e un ulteriore rimodellamento, che è ancora in corso, dovrebbe determinare l'evoluzione del settore nei prossimi anni (G.R.A.L., 2009).

Allo stesso tempo, l'ente gestore ha sviluppato e posto in attuazione un piano di gestione della risorsa vongola in cui sono state delineate le seguenti azioni principali (G.R.A.L., 2006, 2009):

- ✓ *gestione razionale del seme selvatico*, indispensabile per garantire nel tempo le produzioni;
- ✓ *controllo della filiera produttiva*, al fine di garantire la qualità e salubrità del prodotto, a tutela del consumatore;
- ✓ *riduzione degli effetti della raccolta delle vongole*, per contenere i fattori e/o i processi che aggravano le condizioni ambientali della laguna;
- ✓ *contenimento* delle superfici lagunari dedicate alla venericoltura e del numero di operatori;
- ✓ *verifica dei livelli produttivi delle aree in concessione*, sulla base della capacità portante dell'ambiente e dei quantitativi seminati, ed *accertamento della sostenibilità* delle pratiche di venericoltura;
- ✓ *riduzione del fenomeno dell'abusivismo e diffusione di comportamenti virtuosi* all'interno della categoria, con un forte impegno verso la repressione di condotte illecite e soprattutto un *impegno formativo* rivolto ad ampliare le conoscenze degli operatori del settore.

Tra il 2010 e il 2011 la Regione Veneto (ai sensi della L.R. 15/2007) ha finanziato il primo step del Progetto VE.LA, il cui obiettivo generale è quello di allestire un sistema coordinato di interventi strutturali atti a promuovere la capacità portante della Laguna di Venezia come *nursery* dell'Alto Adriatico, nonché a stimolare la diversificazione delle attività di pesca e a promuovere nuove forme di acquacoltura sostenibile attraverso la sperimentazione di modalità innovative di prelievo della risorsa vongola verace.

1.2 Biologia ed Ecologia di *R. philippinarum* come organismo modello

Le vongole *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) come del resto tutti i Molluschi Bivalvi, sono caratterizzate da una conchiglia formata da due valve distinte e incernierate tra loro mediante legamenti ed incastrici (denti cardine). Le valve si chiudono grazie all'azione di robusti muscoli adduttori (Paesanti & Pellizzato, 2000) (Figura 3).

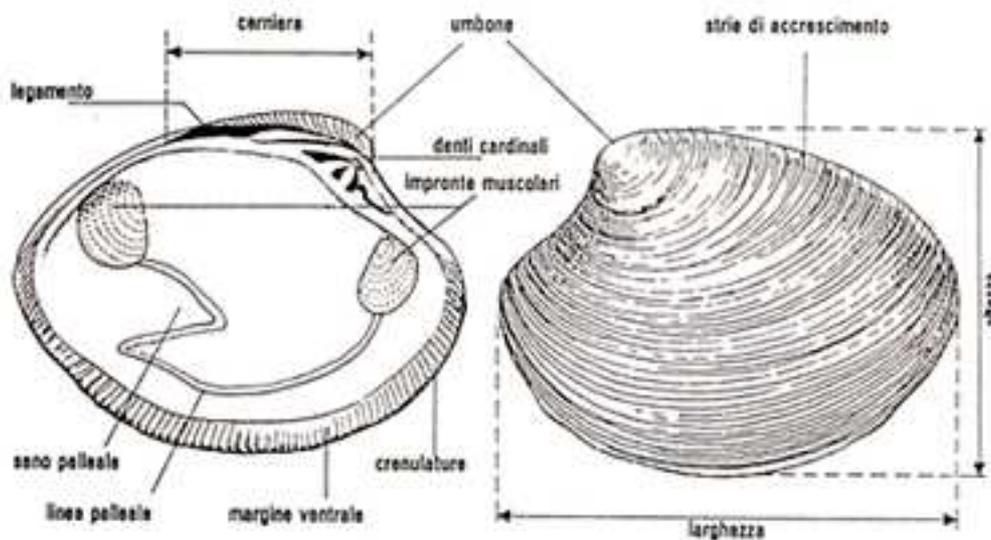


Figura 3 – Schema di una conchiglia di Bivalve vista dal lato interno (a sinistra) ed esterno (a destra) (da E.S.A.V., 1990, modificato).

Il corpo ha uno sviluppo orizzontale ed è avvolto esternamente da due lembi di tessuto denominati mantello (o “pallio”) preposti anche alla formazione della conchiglia; nel corpo, che è privo di testa ma dispone di una bocca in una estremità e di un ano in quella opposta, si possono distinguere il piede (dilatabile a seconda della più o meno elevata pressione sanguigna) e le branchie, notevolmente sviluppate e dotate di una struttura lamellare, da cui deriva la denominazione di Lamellibranchi, comunemente utilizzata per questa specie di molluschi (Paesanti & Pellizzato, 2000) (Figura 4).

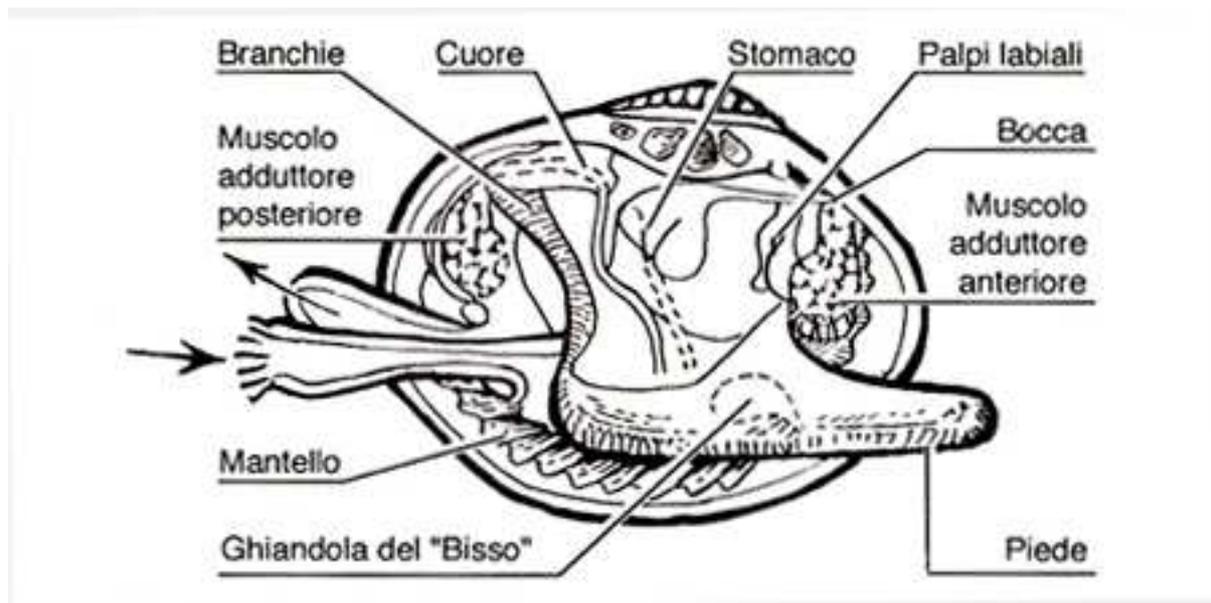


Figura 4 – Rappresentazione schematica di *R. philippinarum* dopo la rimozione della branchia superiore (da Paesanti & Pellizzato, 2000, modificato)

L'acqua marina fornisce il carbonato di calcio (CaCO_3) di cui è prevalentemente composta la conchiglia delle vongole. Il sistema circolatorio fa affluire questa sostanza al mantello, i cui tessuti esterni provvedono ad inglobare in una secrezione del mantello stesso la conchiolina, una proteina che solidificandosi dà origine allo strato esterno della conchiglia, detto periostraco. Lo strato prismatico interno è invece formato da cristalli di calcite dovuti all'accumularsi di carbonato di calcio sotto il periostraco. Le particolari caratteristiche della conchiglia sono spesso indispensabili per identificare le varie specie di molluschi bivalvi; nel caso di *R. philippinarum* sono ben visibili le strie concentriche di accrescimento a forma di solco, il cui punto di origine viene denominato umbone (Paesanti & Pellizzato, 2000).

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). Il substrato in cui vivono questi organismi prevalentemente sessili, assume quindi una notevole importanza nell'ambito di un'indagine ecotossicologica: l'optimum di crescita per *Ruditapes philippinarum* prevede una percentuale di silt e argilla tra il 10% e il 25% e una percentuale di sabbia tra il 50% e il 68% (Paesanti & Pellizzato, 2000) (Figura 5).

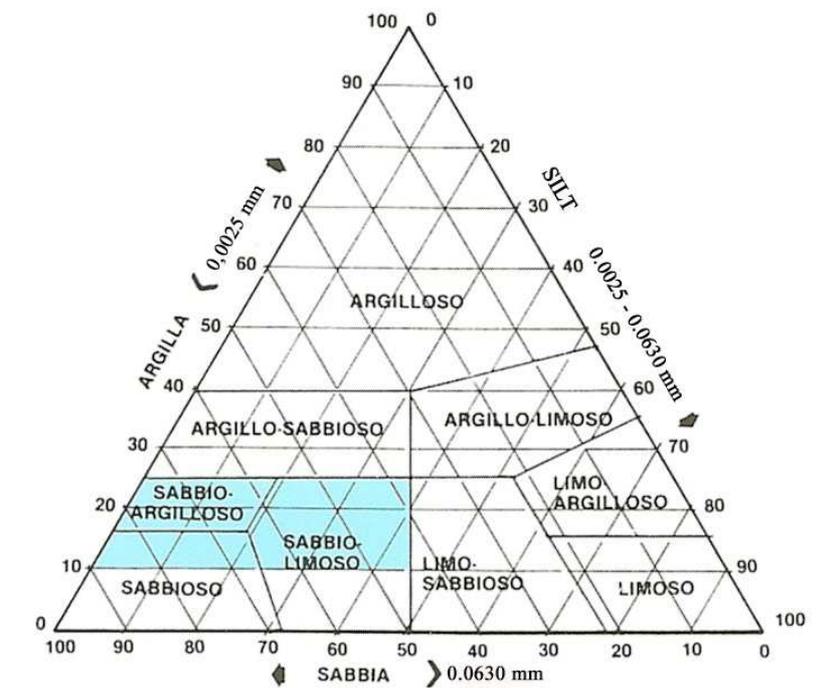


Figura 5 – Il grafico mostra la granulometria ottimale di un substrato per la crescita di *R. philippinarum* (da Paesanti & Pellizzato, 2000, modificato). Sono indicati i valori limiti delle classi granulometriche considerate secondo lo schema internazionale ISO 14688-1.

Per quanto riguarda le abitudini alimentari, i Molluschi Bivalvi sono organismi filtratori: le loro branchie formano un grande setaccio alimentare ciliato rivestito di muco. L'acqua fatta affluire attraverso il sifone inalante passa tra i filamenti branchiali dove le particelle in sospensione vengono catturate nel muco o dalle ciglia. Il cibo così catturato viene avvolto da secrezioni mucose e sospinto dalle ciglia delle branchie fino alla regione cefalica, dove i palpi, una sorta di appendice dell'apparato boccale, selezionano il materiale scartando ed espellendo, grazie anche alle contrazioni del sifone esalante, le parti più voluminose o indesiderate (pseudofeci) costituite da agglutinati e muco. Le branchie hanno ovviamente anche una funzione di scambio gassoso, ma essendo organi di alimentazione, sono più grandi e hanno una maggiore area di superficie riferita al volume del corpo, rispetto alla maggior parte degli altri Molluschi (Mitchell *et al.*, 1991). Il cibo catturato dall'apparato boccale attraversa l'esofago giungendo nello stomaco, che è un largo sacco circondato dalla ghiandola digestiva, organo principale della digestione endocellulare. Qui le alghe unicellulari ed altro materiale particellato viene digerito e trasportato nei vari tessuti (Paesanti & Pellizzato, 2000).

Dal punto di vista strettamente fisiologico, gli alti livelli di metalli in tracce presenti in Molluschi marini si spiegano se si vanno a considerare i 3 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 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).

Conoscere il ciclo vitale di questi organismi è, infine, fondamentale per comprendere quelle che sono le problematiche connesse al 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) (Figura 7).

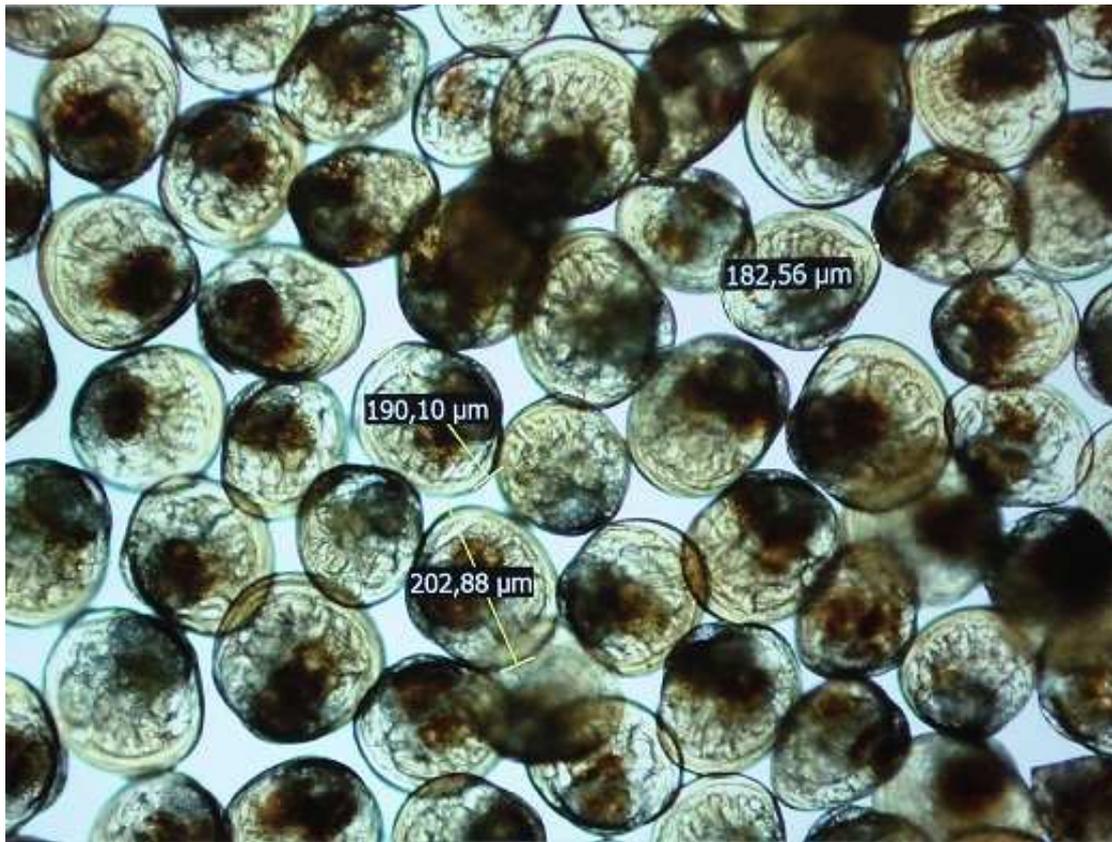


Figura 6 – Fotografia digitale al microscopio ottico di larve veliger nelle ultime fasi di maturazione; sono messe in evidenza alcune dimensioni (foto per gentile concessione di VenetoAgricoltura).

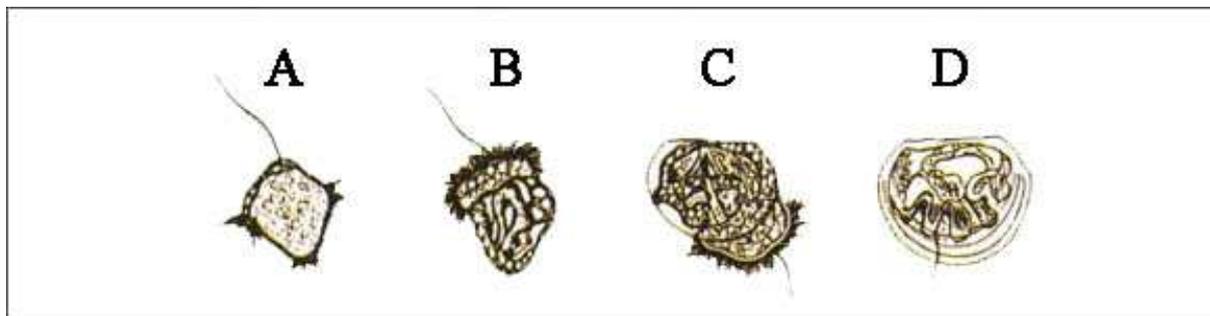


Figura 7 – Sviluppo delle forme embrionali di un Bivalve, a partire dallo stadio planctonico di trocofora (A) alla larva finale già dotata di conchiglia (D). L'organo natatorio ciliato (velo) è mostrato in B e le prime fasi di formazione delle valve della conchiglia in C. Le uova fertilizzate raggiungono uno sviluppo larvale completo (D) in un tempo variabile tra i 2 e i 4 giorni (da <http://www.fao.org>, modificato).

1.3 Aree idonee all'Allevamento: caratteristiche di base

I migliori siti di allevamento per la vongola verace filippina sono localizzati al riparo dal forte moto ondoso e dai venti dominanti che possono destabilizzare generalmente 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; il sedimento più propizio risulta essere un misto di sabbia, limo e granuli che da un lato permetta una buona ossigenazione del fondale, dall'altro sia sufficientemente soffice da permettere l'affossamento degli animali e abbastanza compatto da sostenere il peso di un uomo (Paesanti & Pellizzato, 2000).

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) (Breber, 2002).

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. *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). La produzione primaria nella laguna veneta è drasticamente diminuita, portando a significative diminuzioni di macrofite, fitoplancton e sostanza organica; le concentrazioni di nutrienti nelle acque e nei sedimenti superficiali mostrano una continua diminuzione riducendo la disponibilità di nutrimento per la macrofauna; contemporaneamente il sedimento fine risospeso è aumentato da 5 a 16 volte, aumentando lo sforzo di filtrazione dei Bivalvi (Castellani & Barbanti, 2010).
3. *Qualità del sedimento*: essendo organismi fossori e filtratori, in grado di accumulare contaminanti, è molto importante che l'area di allevamento sia caratterizzata da un sedimento non contaminato e che da un punto di vista granulometrico presenti un rapporto ottimale tra componente fine e componente sabbiosa: la prima infatti ha effetti diretti sulla capacità di trattenere inquinanti, mentre la seconda influisce sul tenore di ossigeno disciolto e sulla capacità di movimento e nutrizione degli organismi stessi (Castellani & Barbanti, 2010).

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*: 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 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), così come descritto al punto 5.
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).

9. *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).

In Figura 8 sono riportate schematicamente le principali esigenze biologiche di *R. philippinarum*: per i diversi parametri mesologici sono indicati i limiti vitali e gli intervalli ottimali per realizzare l'allevamento.

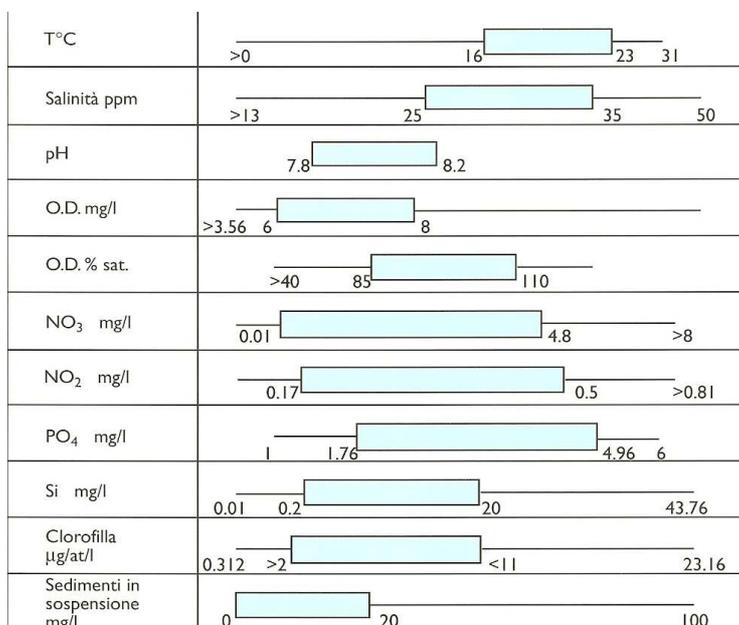


Figura 8 – Parametri mesologici ottimali per l'allevamento di *R. philippinarum* (da Paesanti & Pellizzato, 2000, modificato)

1.4 Potenziali cause dell’Inquinamento Inorganico

1.4.1 Laguna di Venezia

La Laguna di Venezia si presenta come un ecosistema eterogeneo e complesso, morfologicamente suddivisibile in sub-aree fra loro interagenti e caratterizzate da condizioni idrodinamiche e idrologiche diverse, che rispondono in modo differenziato alle condizioni di stress causate dall’inquinamento.

Le zone che risentono maggiormente degli effetti dovuti all’attività antropica sono le aree a basso fondale situate nei pressi della terraferma, che ricevono sostanze inquinanti dai corpi idrici del territorio di gronda e da insediamenti industriali, e in cui l’influenza della marea è minore (Zonta *et al.*, 1995b). Un caso particolare è poi costituito dai canali del centro storico della città di Venezia, che risentono in maniera pesante degli effetti della pressione antropica.

Area fortemente antropizzata e inserita in un contesto economicamente molto produttivo, la Laguna di Venezia è soggetta a carichi inquinanti provenienti da fonti diffuse e puntuali. Il contributo dei fiumi del bacino scolante, gli apporti diretti dalla zona industriale di Porto Marghera, il centro storico di Venezia, la presenza di siti a elevata contaminazione (suoli e sedimenti inquinati da materiali di varia origine, scaricati in passato), le deposizioni atmosferiche costituiscono le fonti di contaminazione più rilevanti. In ragione di tutto ciò, la Laguna è oggi caratterizzata dalla presenza di sostanze inquinanti nelle acque, nei sedimenti e negli organismi viventi, prodotte da attività umane passate e presenti (Castellani & Barbanti, 2010).

Le principali fonti di inquinamento sono sia antropiche (industria, agricoltura, zootecnia, pesca, traffico nautico) sia naturali (precipitazioni, vento, energia solare, marea). Il traffico e la pesca sono fattori che, incidendo sulla risospensione del sedimento, possono accelerare i fenomeni di rilascio dei contaminanti dai sedimenti del fondo verso la colonna d’acqua e comunque favorire il trasferimento dei contaminanti agli organismi e lungo la rete trofica; anche le precipitazioni e il vento, influenzando sulle portate fluviali possono avere un ruolo molto importante nel modulare il trasferimento degli inquinanti in Laguna (CNR, 2001; Zonta *et al.*, 2005a).

Le relazioni di scambio tra le matrici ambientali identificano le vie attraverso le quali la contaminazione viene trasferita tra il sedimento, l’acqua e gli organismi. Le concentrazioni in acqua e nel sedimento sono collegate tra loro da una relazione reciproca di scambio all’interfaccia: essa determina di conseguenza la concentrazione dei contaminanti negli organismi. Tale interazione non è nè semplice nè lineare poiché numerosi fattori al contorno (periodo dell’anno, stato riproduttivo, stato di salute) intervengono su di essa.

La contaminazione dell'ecosistema determina in ultima analisi il rischio ecologico per le componenti animali e vegetali della Laguna e il rischio per la salute umana, soprattutto in relazione al consumo alimentare dei prodotti della pesca.

Entrando più nello specifico, rispetto ai carichi massimi di metalli stabiliti per la Laguna di Venezia (D.M. 9/2/99) particolare rilevanza assumono l'arsenico, il cadmio, il piombo e il mercurio, per i quali è fatto espressamente divieto di scarico secondo il D.M. 23/4/99, e quindi il relativo carico massimo in Laguna dovrebbe essere teoricamente nullo. Relativamente agli altri metalli invece non si osservano superamenti del carico massimo ammissibile (CMA). Per la maggior parte dei metalli, la fonte predominante risulta l'apporto fluviale dal bacino scolante, per il mercurio prevale invece il contributo della zona industriale di Porto Marghera, significativo anche per nichel e zinco; l'atmosfera contribuisce in modo determinante soprattutto per cadmio ma anche per piombo e zinco (Castellani & Barbanti, 2010).

La distribuzione spaziale della contaminazione delle varie matrici ambientali non è uniforme, ma almeno per alcuni parametri, si osservano caratteristiche interessanti sia lungo la direttrice nord-sud sia lungo la direttrice est-ovest. Per ciò che riguarda i metalli, le concentrazioni nei sedimenti superficiali (0-20 cm) di cadmio, rame, piombo, zinco e mercurio, riflettono in modo evidente l'influenza delle sorgenti di contaminazione industriale oggi attive così come conservano memoria delle sorgenti di contaminazione storica della Laguna, legate in particolare al sito industriale di Porto Marghera. Le concentrazioni più alte si riscontrano mediamente nel sottobacino centro-nord, a cui segue poi il bacino centrale, e tendono a diminuire procedendo in direzione del mare. Per il nichel, il cromo e in parte per l'arsenico, non si ritrova nel sedimento un'analoga distribuzione di contaminazione: la concentrazione di questi metalli e metalloidi dipende piuttosto da caratteristiche naturali del sedimento, quali la granulometria e la composizione mineralogica; nichel e cromo presentano arricchimenti nella Laguna meridionale, mentre per l'arsenico è più evidente l'esistenza di un gradiente decrescente dalla gronda lagunare verso il mare, piuttosto che una distinzione tra sottobacini lagunari (Castellani & Barbanti, 2010) (Figura 9).

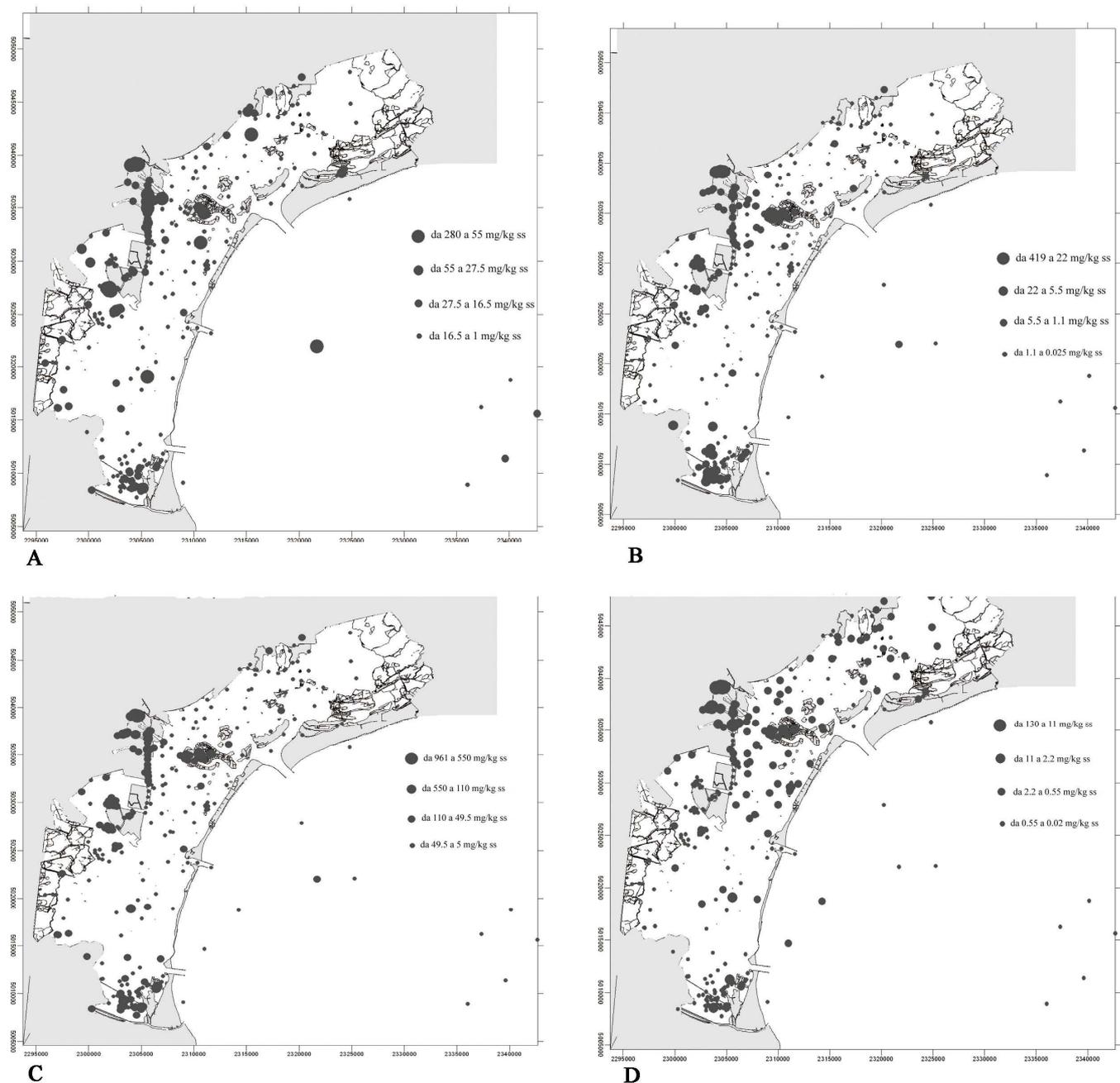


Figura 9 – Mappe di distribuzione spaziale degli inquinanti As (A), Cd (B), Pb (C), Hg (D) nei sedimenti dei bacini della Laguna di Venezia (da Progetto di mappatura dell'inquinamento dei fondali lagunari, MAV-CVN 1999, modificato).

La biodisponibilità degli inquinanti e la possibilità che questi vengano bioaccumulati nei tessuti degli organismi lagunari in concentrazioni ritenute tossiche, possono determinare il verificarsi di situazioni di rischio per la salute umana (Castellani & Bocci, 2010). Risulta perciò evidente la necessità di adottare una serie di risposte adeguate al problema, risposte che si dovrebbero tradurre in:

- ✓ adozione di tecniche agricole e zootecniche eco-compatibili

- ✓ razionalizzazione dei processi e prevenzione dei rischi
- ✓ risanamento dei siti inquinati
- ✓ regolazione e controllo della pesca di *R. philippinarum*
- ✓ regolazione e controllo del traffico acqueo
- ✓ adeguamento dei sistemi di trattamento dei reflui
- ✓ estromissione degli scarichi dalla Laguna
- ✓ monitoraggio del carico in ingresso in Laguna
- ✓ monitoraggio integrato chimico-biologico-ecotossicologico
- ✓ monitoraggio istituzionale per il controllo delle acque destinate alla vita dei molluschi
- ✓ valutazione e monitoraggio della qualità dell'habitat.
- ✓ controllo dei prodotti della pesca destinati al consumo umano.

1.4.2 Delta del Po

L'ecosistema del Delta del Po presenta considerevoli problemi di contaminazione da metalli pesanti, soprattutto in relazione alla sua prossimità alla foce del fiume Po che trasporta verso il mare un'ingente quantità di acque di scarico domestico ed industriale; inoltre la presenza della centrale termoelettrica ENEL nella zona di Porto Tolle (una delle più grandi d'Italia) può aver contribuito in maniera significativa a definire lo stato di salute generale dell'area. Non bisogna dimenticare che in Italia gran parte dell'energia elettrica è prodotta dalla combustione di olii carburanti, che generalmente hanno diversa origine e composizione, ma contengono sempre determinati metalli, che a combustione avvenuta possono venire rilasciati nell'ambiente sotto forma di ossidi o solfuri (Tagliati *et al.*, 2003).

Va tuttavia tenuta in considerazione anche la storia geologica dell'area: la pianura attraversata dal fiume Po è l'espressione superficiale di un bacino sedimentario molto profondo, delimitato dalle Alpi a nord e dagli Appennini a sud, testimone di una storia deposizionale e di un'evoluzione tettonica complesse (Amorosi & Sammartino, 2007). Data la notevole quantità di informazioni geologiche disponibili relativamente a quest'area, la pianura del Po rappresenta un eccellente sito

per verificare l'influenza che litologia del bacino e dinamiche deposizionali possono avere sulla distribuzione dei metalli pesanti.

In questo senso, lavori del passato (Amorosi *et al.*, 2002; Vignati *et al.*, 2003) hanno gettato luce sul background geochimico di questa zona. In particolare, i valori di concentrazione geochimica basale (Darnley, 1997) hanno dimostrato di possedere un'alta variabilità locale e regionale, in accordo con cambiamenti non solo nella geologia di base (Salminen & Tarvainen, 1997) ma anche nella granulometria e nell'ambiente deposizionale (Ruiz, 2001). Questi stessi studi, hanno confermato che i livelli di Cr e Ni nei sedimenti del fiume Po sono più alti rispetto alla maggior parte delle linee guida di qualità pubblicate in letteratura.

Il rischio che questi metalli presenti nell'ambiente in concentrazioni elevate possano entrare nella catena alimentare e bioaccumularsi negli organismi, è sempre alto, soprattutto se si considera che in quest'area sono molto diffuse, oltre all'allevamento di Molluschi Bivalvi, anche numerose attività agricole. Anche nel caso del Delta del Po, dunque, la necessità di trovare risposte adeguate a queste problematiche è palese, soprattutto per quanto riguarda non solo un adeguamento dei sistemi di trattamento dei reflui e l'estromissione degli scarichi diretti sul fiume, ma anche il controllo dei prodotti della pesca e dell'allevamento destinati al consumo umano.

1.5 Distribuzione dei metalli nei sedimenti: biodisponibilità, bioaccessibilità, bioaccumulo

Lo studio della contaminazione da metalli pesanti nei sedimenti riveste un ruolo molto importante ai fini della valutazione dell'impatto che queste sostanze possono avere sull'ambiente acquatico e sugli organismi che lo popolano. Infatti, una serie di processi chimico-fisici e biologici fa sì che la maggior parte dei metalli introdotti nell'ambiente acquatico risulti associata ai sedimenti di fondo. Le concentrazioni di metalli rilevate in questa matrice superano quindi di diversi ordini di grandezza le concentrazioni presenti nell'acqua (Tessier & Campbell, 1987).

La Laguna di Venezia ed il Delta del Po sono complessi sistemi acquatici di transizione tra terraferma e Mare Adriatico. Essi ricevono sostanze inquinanti da varie sorgenti puntiformi ed estese: fra queste particolarmente importante è il cronico sversato dai corpi idrici del territorio di gronda. Queste sostanze, una volta veicolate nelle acque marine, subiscono trasformazioni chimico-fisiche ed aggregative ed entrano in un diverso schema di circolazione idrica. Durante questa fase, e a seconda delle condizioni idrologiche e idrodinamiche che si verificano nelle diverse sub-aree, si possono formare sui fondali zone di accumulo di inquinanti (nutrienti, metalli pesanti, ecc.) che costituiscono un rischio per l'ecosistema (De Groot *et al.*, 1976; Salomons, 1985).

In particolare, i metalli pesanti sono trasportati da fiumi e canali sotto due forme principali: quelli disciolti in soluzione e quelli associati al materiale sospeso, sia organico che inorganico. In genere, la maggior parte dei metalli presenti negli ambienti di acqua dolce è trasportata in associazione con il materiale in sospensione, in particolare con le particelle a granulometria fine e la materia organica, che sono eccellenti "scavengers" dei metalli disciolti. Il destino dei metalli che arrivano nelle aree di transizione è influenzato da una serie di processi che ne alterano la distribuzione tra la fase disciolta e quella sospesa. Infatti nelle zone estuarine, a ridosso della terraferma, avviene il mescolamento fra acque dolci e salate, con un brusco cambiamento delle condizioni chimico-fisiche della colonna d'acqua che si traduce in modificazioni dello stato chimico ed aggregativo dei metalli. In particolare il cambiamento di salinità, pH, temperatura, condizioni ossido-riduttive e la circolazione idrica dettata dalla marea, innescano una serie di processi chimici e fisici che possono portare ad una rimozione più o meno consistente dei metalli pesanti dalla fase disciolta ed a un loro accumulo nel sedimento. Le interazioni che avvengono principalmente implicano i seguenti processi (Leppard, 1983; Bernhard *et al.*, 1986; Landner, 1987; Patterson & Passino, 1987; Batley, 1989; Allen *et al.*, 1989):

1. rilascio da parte del particolato dei metalli adsorbiti nella soluzione mediante deadsorbimento favorito dall'aumento della concentrazione ionica;
2. precipitazione dei metalli disciolti sotto forma di ossidi e idrossidi amorfi insolubili a causa dell'aumento di pH (questo processo riguarda particolarmente Fe e Mn);
3. precipitazione di sostanze organiche (tipo acidi umici e fulvici) e, quindi, dei metalli ad esse associati a causa dell'aumento della salinità;
4. precipitazione, sotto condizioni fortemente riducenti, dei metalli disciolti come solfuri insolubili;
5. cattura dei metalli disciolti sulle fasi solide presenti (queste fasi comprendono il minerale detritico, le fasi autigeniche formate per precipitazione di componenti disciolti e il materiale organico derivante da processi che si svolgono sia dentro che fuori l'estuario);
6. deposizione sui fondali dei metalli solubili per adsorbimento e/o coprecipitazione con gli ossidi di Fe e Mn colloidali, con la materia organica e con i solfuri insolubili.

Il destino del particolato che raggiunge l'ambiente estuarino dipende essenzialmente dalle sue caratteristiche granulometriche: il comportamento delle particelle di dimensioni più piccole, fino a diametri inferiori al micron, viene generalmente influenzato da una serie di processi (coagulazione, flocculazione) che modificano la distribuzione dimensionale del sospeso e quindi il suo percorso deposizionale (Chester & Voutsinou, 1981).

È evidente come le procedure analitiche che prevedono la disgregazione completa del sedimento, e la successiva quantificazione del contenuto totale di metalli pesanti, da sole non siano in grado di fornire informazioni precise sul potenziale impatto dell'inquinamento da metalli; molto vantaggiose a questo scopo sono sia le procedure che permettono una quantificazione complessiva della frazione non residuale, sia le tecniche basate su estrazioni sequenziali selettive dei metalli, attraverso le quali viene determinata la loro ripartizione tra le diverse fasi geochimiche.

Il materiale organico e gli ossidi/idrossidi di Fe e Mn, oltre a partecipare direttamente alla formazione dei flocculi con particelle argillose, depositandosi sotto forma di film sugli aggregati appena formati, contribuiscono a stabilizzarli (Gambrell *et al.*, 1980; Tessier *et al.*, 1979). Gli aggregati di particelle fini che si vengono a formare rimangono in sospensione più o meno a lungo, tendendo comunque a sedimentare ed accumularsi nelle zone a basso fondale a causa della scarsa dinamica. Siccome i metalli pesanti di origine antropica sono trasportati associati alle particelle di

piccole dimensioni, le zone di deposizione delle particelle fini possono diventare zone di accumulo di metalli pesanti. Le aree maggiormente soggette al fenomeno di accumulo sono le velme e le paludi caratterizzate da scarsa vivacità dei moti di corrente, e le aree estuarine a basso fondale, che sono le zone di primo impatto dei carichi inquinanti veicolati da fiumi e canali. Una volta raggiunto il fondale, i metalli pesanti possono subire ulteriori cambiamenti della forma chimica e fisica in seguito a processi di diagenesi, all'attività bentonica e batterica presente nel fondale e alle caratteristiche intrinseche del sedimento che ne risulta.

I metalli si trovano quindi distribuiti tra i vari componenti del sedimento con forme associative che dipendono strettamente dalla affinità geochimica, dalla loro origine e dal loro destino dopo la deposizione. A seconda dell'intensità dei legami metallo-sedimento ciascuna di queste forme presenta una diversa biodisponibilità verso l'ambiente.

I metalli disciolti nelle acque interstiziali e quelli legati alla superficie delle fasi solide mediante adsorbimento fisico o mediante processi di scambio cationico, sono realmente disponibili per la flora e la fauna acquatica. Questi metalli costituiscono la frazione direttamente scambiabile del metallo totale presente nel sedimento (Forstner & Wittman, 1981). Al contrario, i metalli legati come impurezze all'interno della struttura reticolare dei minerali detritici e secondari provenienti dalla degradazione delle rocce non sono disponibili. Essi possono passare in soluzione solo in seguito all'erosione del minerale con tempi su scala geologica. Questi metalli costituiscono la frazione naturale o residuale. Nei sedimenti poco contaminati, questa frazione coincide praticamente con il metallo totale presente.

Tra questi estremi di disponibilità esistono vari tipi di forme chimiche che contengono il metallo potenzialmente biodisponibile, potendo esso essere solubilizzato in seguito ad alterazione chimico-fisica dell'ambiente in cui si trova il sedimento (principalmente cambiamenti di pH, di salinità e di condizioni redox). La maggior parte del metallo di origine antropica è presente sotto tali forme potenzialmente disponibili, che essenzialmente sono:

- a. frazione metallica legata ai carbonati;
- b. frazione metallica associata agli ossidi/idrossidi di Fe e Mn;
- c. metalli associati alla materia organica e solfuri insolubili.

Sommando queste frazioni e la frazione scambiabile si ottiene la frazione antropica (frazione non residuale) del metallo totale presente nel sedimento.

La frazione tossicologicamente interessante è fortemente influenzata dalle variazioni del potenziale redox; questo parametro ambientale cambia continuamente, e può passare da valori positivi a valori negativi (in condizioni anossiche). Esso dipende fortemente dalla concentrazione di ossigeno, parametro chiave nell'ecologia delle lagune ed in particolare delle aree di allevamento delle vongole, il quale varia non solo al variare degli altri parametri fisici e chimici, in primo luogo la temperatura, ma anche in risposta all'attività fotosintetica dei produttori ed alla respirazione dell'intera comunità ecologica. L'ossigeno è maggiormente disciolto nell'acqua tanto più questa è fredda e tanto meno questa presenta soluti disciolti. Inoltre l'azione dei venti e del movimento ondoso nonché quella meccanica dovuta alla pesca con strumenti idraulici, aumenta notevolmente il tenore d'ossigeno presente nell'acqua lagunare. È relativamente frequente che nei periodi più caldi, per l'eccessivo accumulo di sostanza organica in decomposizione e dell'alta temperatura, l'ossigeno disciolto si riduca fino a scomparire, prima nei sedimenti e successivamente nell'intera colonna d'acqua. Questo fenomeno viene indicato con il termine di “crisi distrofica” che culmina nella maggiore attività dei batteri anaerobi del fondo, i quali liberano grandi quantità di solfuro d'idrogeno, ammoniaca e metano che sono tossici per la comunità aerobia. Questa situazione può compromettere gravemente l'allevamento dei molluschi (ARPAV, 2006). In questi casi il sedimento è ridotto e permette il passaggio in soluzione di questi ossidi e dei contaminanti ad essi associati.

Bisogna tener presente, infine, che la biodisponibilità dei metalli, oltre a dipendere dalla particolare forma chimica in cui essi compaiono nel sedimento, è anche influenzata dalla struttura più o meno cristallina dei relativi componenti mineralogici e dalla presenza più o meno accentuata di particelle costituite da aggregati di fasi mineralogiche diverse.

Altro importante fattore di cui tenere conto risiede nel fatto che i sedimenti di aree eutrofizzate, come ad esempio alcune zone della Laguna di Venezia, sono particolarmente ricchi di materia organica, con prevalenza di condizioni ridotte già dai primi centimetri al di sotto dell'interfaccia deposizionale (Zonta *et al.*, 1995b) (Figura 10).

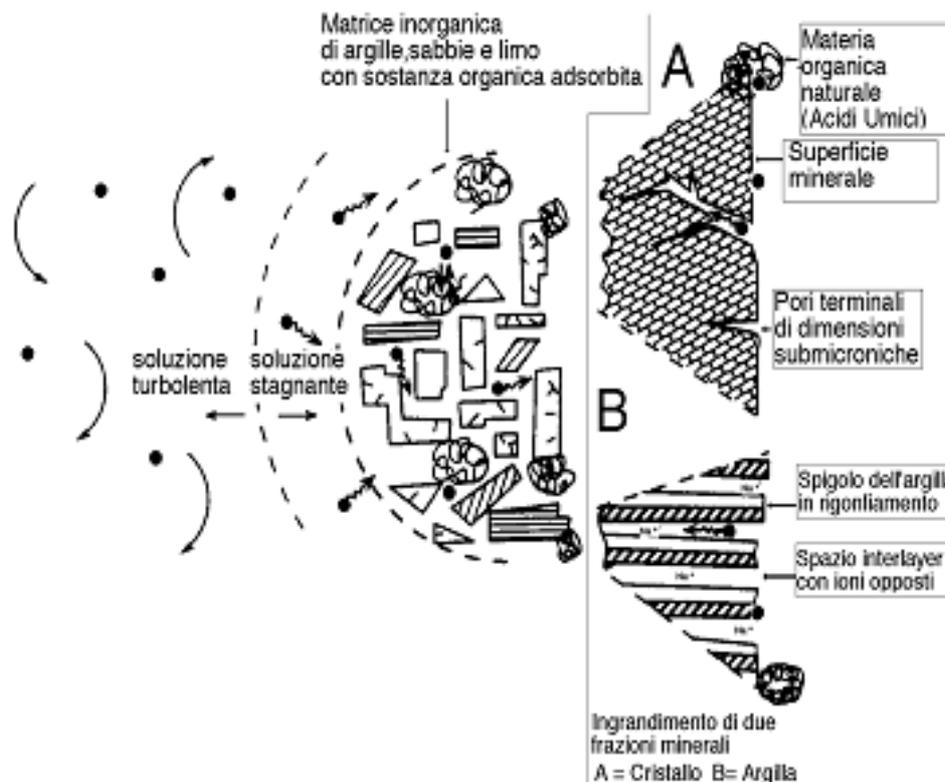


Figura 10 – Processi di adsorbimento di sostanza organica su matrice inorganica (particolari) (da Perin, 2004).

La disponibilità dei metalli presenti nei sedimenti, ma soprattutto la loro bioaccessibilità, può essere notevolmente influenzata da un effetto di schermo esercitato da materiale organico presente come rivestimento sulla superficie di altre fasi importanti a cui i metalli sono associati. Gli effetti sulla bioaccessibilità sono variabili perché i complessi che si formano possono essere sia solubili che insolubili; in particolare i complessi che si formano con le sostanze di più basso peso molecolare (acidi fulvici) sono solubili e tendono ad aumentare il contenuto di metalli nella soluzione del terreno. Al contrario gli acidi umici di più elevato peso molecolare formano complessi molto stabili con i metalli sottraendoli a tutti i processi ambientali e riducendone la biodisponibilità in relazione alla forza dei legami che si formano nelle reazioni di complessazione. I gruppi funzionali fenolici carbossilici ed amminici sono essenziali nel trattenimento dei metalli da parte delle sostanze umiche e l'aumento di questi gruppi funzionali durante il processo di umificazione aumenta la stabilità dei complessi nel tempo riducendo la biodisponibilità dei metalli (Perin, 2004).

Si ribadisce però che, a fronte di tali evidenze, la risospensione di origine naturale (vento, correnti, cambi di marea, bioperturbazione (Figura 11) e le azioni dell'uomo di disturbo del piano sedimentario quali la pesca, il traffico acquatico o la movimentazione del sedimento per interventi di dragaggio o recupero morfologico, costituiscano fattori che fortemente aumentano la probabilità di rimobilizzazione dei contaminanti, creando un continuo disequilibrio chimico con conseguente

potenziale aumento del possibile rilascio verso l'acqua di sostanze tossiche (Castellani & Barbanti, 2010).

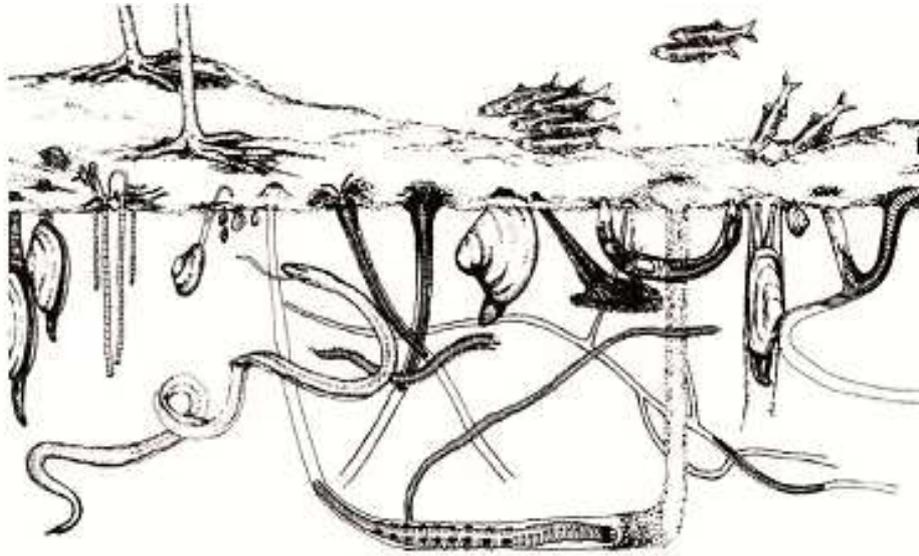


Figura 11 – Bioturbazione dei sedimenti (da Perin, 2004).

Il trasferimento della contaminazione dalle matrici abiotiche (sedimento, acque, particolato) agli organismi lagunari e il conseguente bioaccumulo nei tessuti biologici sono processi tutt'altro che semplici, combinazione non lineare di molteplici fattori di tipo chimico, fisico e biologico. Dei fattori chimici si è già ampiamente discusso. I fattori fisici sono legati al rapporto tra velocità di rimescolamento dello strato superficiale per turbolenza e/o bioturbazione e la velocità di sedimentazione. I fattori biologici sono legati alla struttura della rete trofica, alle caratteristiche di ogni specie e di ogni individuo e dipendono non solo dalla modalità di assunzione dei contaminanti ma anche dalla capacità di trasformarli, accumularli ed espellerli (metabolismo, detossificazione) (Castellani & Barbanti, 2010).

Il ruolo delle analisi di speciazione e bioaccumulo è quello di fornire informazioni sulla reale biodisponibilità e trasferibilità dei metalli pesanti all'interno della matrice biotica. La bioaccumulazione di metalli, in particolare, è specie specifica e dipende da:

- ✓ processi evolutivi seguiti dalle specie in questione in relazione al loro bisogno fisiologico di metalli per la regolazione del metabolismo, così che sono selezionati meccanismi di detossificazione per mantenere una concentrazione interna di metalli ottimale (frazione bioattiva) (Phyllips & Rainbow, 1989);
- ✓ biodisponibilità di inquinanti nel comparto abiotico (Luoma, 1989).

Le procedure di estrazioni sequenziali mediante l'uso di soluzioni selettive a forza chimica crescente forniscono informazioni dettagliate sulle varie forme chimiche presenti e sull'origine, la mobilizzazione e il trasporto dei metalli.

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. Tale tecnica è tuttavia caratterizzata da una procedura lunga e complessa che, se non adeguatamente ottimizzata, può facilmente portare a risultati poco attendibili. Inoltre, la speciazione geochimica completa, richiedendo un notevole impiego di tempo, mezzi e personale può essere utilizzata per studi implicanti un limitato numero di campioni.

1.6 Bioindicatori in Ambienti di Transizione

Poiché gli ambienti costieri e di transizione sono tra gli ecosistemi marini più produttivi del mondo e sono continuamente sottoposti ad elevate pressioni antropiche, è molto importante che la contaminazione ambientale e il suo significato biologico ed ecologico vengano adeguatamente e pienamente considerate (Chapman & Wang, 2001). Tra gli ecosistemi di transizione, quello lagunare generalmente è composto da una così grande varietà di habitat differenti, da giustificare la sua conservazione. Il rilevamento di contaminanti tramite analisi chimiche di tipo classico (ad esempio il contenuto totale) non significa necessariamente che questi siano biodisponibili, e analogamente, la loro biodisponibilità non implica un loro effetto su organismi, popolazioni o comunità (Losso & Volpi Ghirardini, 2010). 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).

Questi tre approcci sono stati applicati in Laguna di Venezia sin dagli anni ottanta, e date le sue caratteristiche, questo ambiente può considerarsi ideale per testare l'andamento di bio-metodi di monitoraggio (Losso & Volpi Ghirardini, 2010).

Il ruolo dei biomarkers è quello di utilizzare risposte molecolari, biochimiche, fisiologiche, istocitopatologiche 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 (Losso & Volpi Ghirardini, 2010).

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:

- 1) biomonitoraggio passivo, ovvero confrontando la risposta del biomarker tra un sito contaminato e un sito di riferimento;
- 2) biomonitoraggio attivo, che prevede il trapianto di specie sentinella nell'area di studio per un tempo specifico sufficiente a indurre una risposta dal biomarker;
- 3) 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 (Wu *et al.*, 2005):

- a) tengono in considerazione il destino ambientale, la biodisponibilità e le interazioni tra i contaminanti e la matrice biotica nell'ambiente;
- b) forniscono una stima integrata nel tempo dei livelli di contaminazione ambientale;
- c) mettono in relazione esposizione ed effetti nocivi dei contaminanti
- d) connettono gli effetti biologici alle conseguenze ambientali.

Al contrario, i principali svantaggi sono (McDonald *et al.*, 1997; Schlenk, 1999; Leonzio *et al.*, 2003):

- a) necessità di avere una approfondita conoscenza sulla storia vitale della specie scelta, la sua auto-ecologia e la sua fisiologia;
- b) non si possono applicare a tutti gli organismi nè a tutti i contaminanti;
- c) molte risposte possono essere dovute a fattori naturali (variazioni di temperatura, stato ormonale, età, sesso, stagione) o a fattori di stress per via dell'attività di campionamento;
- d) le risposte possono essere influenzate da fenomeni di adattamento o di selezione della popolazione;
- e) la variabilità inter-individuale è generalmente alta;
- f) per molti biomarkers, la relazione tra risposte ed effetti reali è ancora sconosciuta;
- g) la loro applicazione può essere limitata dalla disponibilità di organismi e/o specie;
- h) è sempre necessario confrontare le risposte dei siti indagati con siti di riferimento;
- i) è richiesta una notevole esperienza per l'applicazione e l'interpretazione delle risposte di un biomarker;
- j) mancano protocolli standardizzati e comunemente accettati;
- k) la capacità discriminante può essere ridotta da numerose variabili ambientali.

Oggetto di questo studio è stata l'estrazione e la quantificazione del contenuto di metallotioneine (MT) presenti nelle ghiandole digestive (epatopancreas) degli organismi, essendo tali proteine biomarkers specifici per l'inquinamento ed il bioaccumulo di metalli pesanti.

1.6.1 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 e dalla completa assenza di amminoacidi aromatici nella sequenza primaria (Stillman, 1995) (Figura 12).

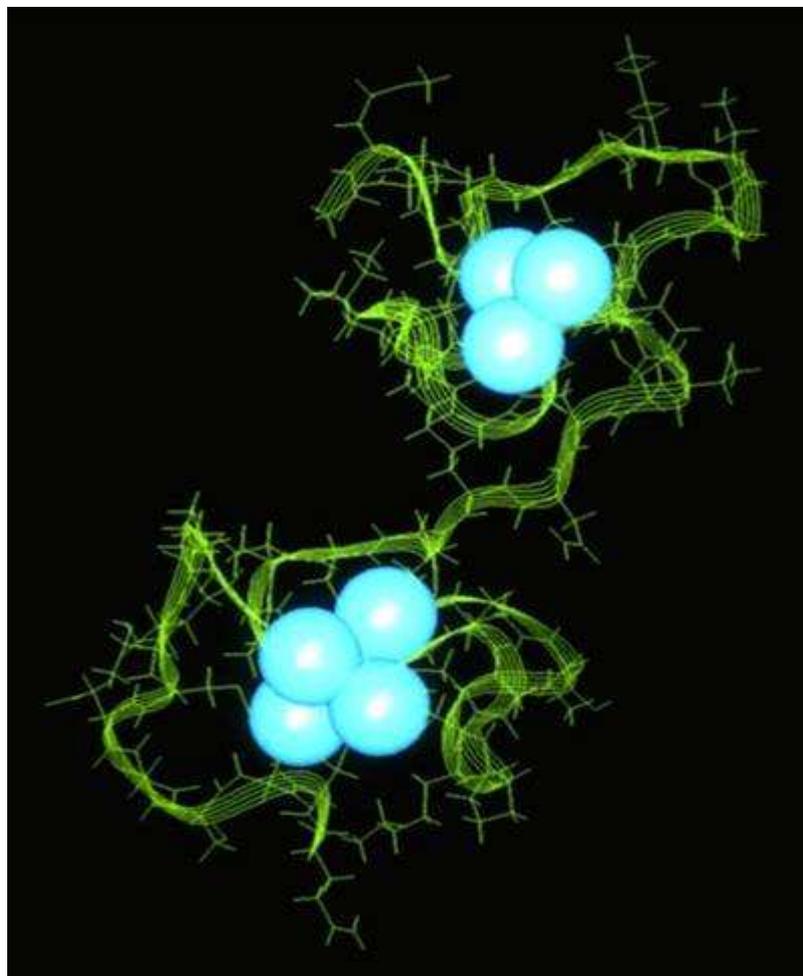


Figura 12 – Esempio di struttura tridimensionale di una metallotioneina (da Manente, 2003).

La loro capacità di legare per lo più metalli quali Cd(II), 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 in tracce in ambiente acquatico. Inoltre, è stata dimostrata la loro ampia diffusione: proteine di questo tipo sono state isolate e descritte in Funghi, Lieviti, Piante, Molluschi, Crostacei e Mammiferi.

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 MT10 e MT20 (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).

In molti casi quindi 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: lo zinco è infatti un componente di molte proteine 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...

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).

1.7 Genetica molecolare e tracciabilità della filiera

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, come si evince dalla Legge Comunitaria CE n° 2065/2001, che prevede un'appropriata etichettatura e tracciabilità dei prodotti ittici. Risulta quindi fondamentale che i prodotti ittici 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 o DNA è in grado di distinguere un individuo da un altro, può essere estrapolata da qualsiasi organismo, ed il risultato è altamente affidabile. Ciò permette quindi 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 (Saiki *et al.*, 1988). 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 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 differenzialmente 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).

I marcatori microsatelliti (SSR- *Simple Sequence Repeats*) sono 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 (Fig. 13). 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).

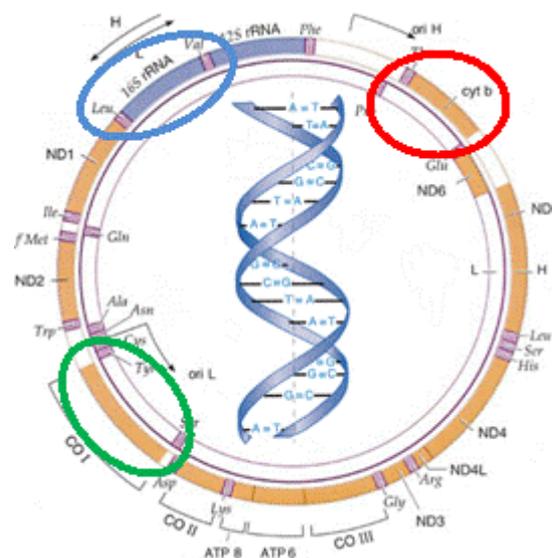


Figura 13 - Struttura circolare del genoma mitocondriale; sono evidenziati i geni utilizzati nella tecnica di “DNA barcoding”.

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.

È inoltre importante segnalare che le metodologie sin qui esposte per la tracciabilità di specie e prodotti alimentari, vengono ad oggi applicate quasi esclusivamente a livello sperimentale, mentre a livello commerciale il loro utilizzo rimane marginale (Nonnis Marzano, 2005), 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 presentati i risultati di quella che è – a tutti gli effetti – la prima indagine di genetica molecolare condotta su popolazioni di *R. philippinarum* del Mar Mediterraneo. Uno dei principali obiettivi di questa ricerca ha infatti previsto la determinazione di marcatori molecolari altamente polimorfici in grado di valutare eventuali differenze intraspecifiche tra le diverse popolazioni di *R. philippinarum* in Laguna di Venezia e nell'Alto Adriatico. L'individuazione e la determinazione di questi marcatori consente di valutare i livelli di variabilità genetica presenti nelle vongole allevate nella Laguna di Venezia, e le eventuali differenze a livello popolazionistico rispetto ad altre aree produttive.

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.

1.8 Obiettivi e scopo del lavoro

Il presente progetto si inserisce nell'ambito di un approccio integrato e multidisciplinare volto all'identificazione e validazione di marcatori molecolari, fisiologici ed ambientali per ottimizzare la gestione della risorsa alieutica *Ruditapes philippinarum*: il controllo della qualità e dell'integrità dei siti di produzione, in particolare dal punto di vista dell'inquinamento inorganico da metalli pesanti e metalloidi, riveste una fondamentale importanza al fine di migliorare la gestione della risorsa e mitigare gli impatti sull'ecosistema, in un'ottica di sostenibilità socio-economica ed ambientale. Il continuo prelievo e l'indiscriminato sfruttamento, l'incontrollato inquinamento e quello che negli anni è stato riversato in laguna dall'area industriale di porto Marghera hanno minato in profondità il delicato equilibrio di questo ecosistema e ciò si riflette anche in una flessione della produttività e quindi dell'economia in prima istanza dei paesi rivieraschi (ma, conseguentemente, di tutti gli altri).

Ulteriore obiettivo di questo studio è stato la valutazione della diversità genetica delle vongole nell'area del Nord Adriatico, in un'ottica di tracciabilità di filiera: la sicurezza alimentare ha come fondamenta i processi di tracciabilità, rintracciabilità e gestione e controllo della filiera relativa al prodotto alimentare, che a loro volta richiedono un'accurata analisi della relazione tra il sito di produzione, i processi produttivi ed il prodotto finale lavorato. I primi risultati di un'indagine di questo tipo rappresentano dati utili per poter selezionare le vongole sulla base della loro origine geografica attraverso l'analisi del DNA (creare cioè un "passaporto molecolare").

2. Aree di Studio

2.1. Definizione e caratterizzazione delle Stazioni in Laguna di Venezia

Venezia e la sua laguna costituiscono un complesso sistema di interesse sia storico che artistico ed ambientale, che attualmente sta attraversando una delicata fase, alla ricerca di un equilibrio tra i bisogni dell'uomo da un lato e la necessità di ripristino e conservazione dell'ambiente dall'altro (www.corila.it).

La Laguna di Venezia è uno dei più ampi ecosistemi di transizione del Mediterraneo (Figura 14), che copre un'area di circa 550 Km².



Figura 14 – Veduta aerea della Laguna di Venezia

Tre bocche di porto la collegano con il Mar Adriatico, suddividendola così in tre bacini principali: la laguna Nord (collegata tramite la bocca di porto di Lido) che, grazie alle sue caratteristiche morfologiche, può essere ulteriormente suddivisa in due sotto-bacini, così che da un punto di vista idrodinamico l'intera Laguna è generalmente rappresentata come suddivisa in 4 bacini: Nord (Treporti, 150 km²), centro-Nord (Lido, 100 km²), Centrale (Malamocco, 170 km²) e Sud (Chioggia, 130 km²) (Tagliapietra & Volpi Ghirardini, 2006). La Laguna è caratterizzata da un'alta macro- e microvariabilità e da dinamiche “multisfaccettate” che includono ambienti estuarini e

marini, paludi e aree fortemente antropizzate come la città di Venezia e la zona industriale di Porto Marghera (Ravera, 2000).

Attualmente, in Laguna si contano circa 22000 ettari di aree *teoricamente* disponibili per la molluschicoltura, ubicate soprattutto nella parte Nord, nella parte Centrale e nella zona di Chioggia; di questo totale meno del 10% è attualmente in concessione (circa 1800 ettari), e l'Ente G.R.A.L. (Gestione Risorse Alieutiche Lagunari) ha avviato una richiesta al Magistrato alle Acque di Venezia per ottenere ulteriori aree, per un totale di circa 345 ettari (Figura 15). La scelta delle aree per la Ricerca ha dunque una fondamentale importanza, e nel condurre tale scelta sono stati considerati molti fattori, tra i quali: idrodinamismo, temperatura, salinità, tipo di substrato ottimale (silt-sabbioso), apporto di nutrienti, periodo di riproduzione (tra Maggio e Ottobre), eventuale presenza di nicchie di *Ruditapes decussatus*.

Grazie alla collaborazione con operatori del settore e del G.R.A.L., nel corso del 2009 sono state inizialmente definite una serie di aree di interesse caratterizzate da uno o più “appezzamenti” (unità produttive) per l'allevamento, e successivamente all'interno di queste micro-aree sono state identificate le stazioni di campionamento, scelte in base alla loro distanza geografica e alle caratteristiche ambientali, per poter confrontare unità produttive, cioè appezzamenti diversi.

In Figura 15 è riportata la mappa delle aree attualmente in concessione in Laguna Centro-Nord e nel Bacino di Chioggia; in Tabella 1 è riportato l'elenco completo delle stazioni di campionamento. Ogni stazione è identificata in modo univoco dalle rispettive coordinate GPS.

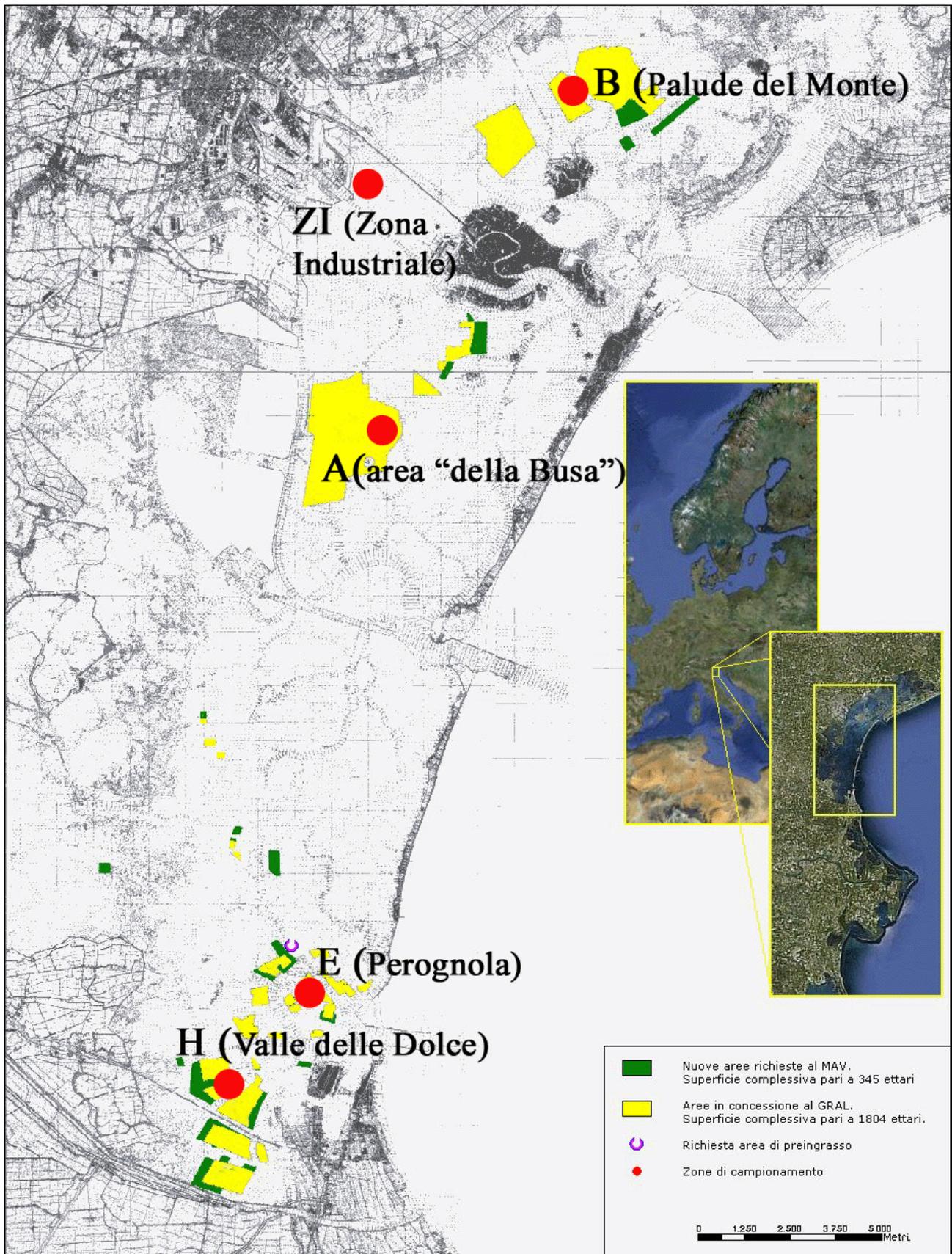


Figura 15 – Mappa delle unità produttive in concessione al G.R.A.L. con indicazione delle nuove aree richieste al M.A.V. ed ubicazione delle stazioni di campionamento del presente studio (fonte: www.gral.it, modificata)

Tabella 1 – Elenco delle stazioni di campionamento in laguna di Venezia, comprensivo di denominazione e coordinate GPS

STAZIONE	ID	GPS
Zona “della Busa” (Lag. Centrale)	A	45° 23’ 33’’ N 12° 16’ 66’’ E
Palude di Monte (Lag. Nord)	B	45° 28’ 23’’ N 12° 22’ 66’’ E
Canale della Perognola (Lag. Sud)	E	45° 14’ 56’’ N 12° 16’ 15’’ E
Valle delle Dolce (Lag. Sud)	H	45° 13’ 24’’ N 12° 14’ 02’’ E
Zona Industriale (Lag. centro-Nord)	ZI	45° 26’ 54’’ N 12° 17’ 02’’ E

I siti di campionamento scelti coprono i bacini principali in cui è suddivisa la Laguna, e presentano perciò determinate caratteristiche idrologiche che rispecchiano la macro-area in cui sono inseriti.

Come controllo è stato raccolto anche un campione di sedimento nell’area della Zona Industriale di Porto Marghera.

Per quanto riguarda i parametri idrologici ed ambientali, si può stimare che:

- ✓ La temperatura media stagionale nelle aree di campionamento oscilla tra 5-6 °C in inverno e più di 22 °C in estate (i valori ottimali per l’allevamento variano tra 16 e 23 °C) (Guerzoni & Tagliapietra, 2006)
- ✓ La classificazione granulometrica è passata nell’ultimo decennio da una prevalenza argillo-siltosa ad un misto di sabbia e silt; la tendenza alla diminuzione della componente pelitica è stata probabilmente causata da fenomeni erosivi e dall’attività di pesca di *R. philippinarum* (Guerzoni & Tagliapietra, 2006).
- ✓ Il pH oscilla tra 7 e 8.5 unità e la salinità presenta una forte variabilità interannuale, attestandosi mediamente tra il 25 e il 35 ‰ (Guerzoni & Tagliapietra, 2006).
- ✓ I livelli di torbidità, misurati come quantità di solidi sospesi in mg/l, variano tra 12 mg/l (in Laguna Sud) e più di 26 mg/l in Laguna centro-Nord (MAV, 2010).
- ✓ Il carico di nutrienti presenta una situazione di forte variabilità stagionale: il parametro N-NO_x mostra valori oscillanti tra i 1900 µg/l (in primavera) e i 3100 µg/l (nella stagione

calda); il parametro P-PO₄ varia tra i 45 e i 65 µg/l; infine, il parametro Chl-a oscilla tra i 30 e i 50 µg/l (MAV, 2010).

✓ La percentuale di saturazione dell'O₂ è generalmente molto alta (> 80%) (MAV, 2010).

2.2 Definizione e caratterizzazione delle Stazioni sul Delta del Po

Per ottenere dati di confronto, sono stati effettuati campionamenti anche nell'area del Delta del Po, in particolare nelle lagune di Caleri e Marinetta (entrambe situate nella parte più settentrionale del delta del Po veneto, nel territorio del comune di Rosolina) e nella Sacca Scardovari (in provincia di Rovigo).

Tali campionamenti sono stati possibili grazie alla collaborazione con il presidente della Cooperativa Pescatori Levante, dottor Marco Milia.

In Tabella 2 è riportato l'elenco delle stazioni campionate sul Delta del Po, comprensivo di coordinate GPS.

Tabella 2 – Elenco delle stazioni di campionamento sul delta del Po, comprensivo di identificativo e coordinate GPS

STAZIONE	ID	GPS
Laguna di Marinetta	MR	45° 02' 31'' N 12° 22' 36'' E
Laguna di Caleri	VL	45° 05' 27'' N 12° 19' 29'' E
Sacca degli Scardovari	SC	44° 51' 45'' N 12° 25' 10'' E

La Laguna di Caleri presenta una superficie di circa 1150 ha ed una profondità media di circa 2 metri, è collegata al mare attraverso una bocca dell'ampiezza di circa 150 metri denominata Porto di Caleri, che separa l'isola di Albarella dal litorale di Rosolina Mare, mentre nella parte più meridionale si collega alla Laguna di Marinetta attraverso il varco Pozzatini.

La Laguna di Marinetta presenta una superficie di circa 350 ha ed una profondità media compresa tra 1.5 e 2 metri. Comunica con il mare attraverso la foce del Po di Levante, che separa l'isola di Albarella, a nord, dallo Scanno Cavallari.

Entrambe queste lagune si caratterizzano per ampi scambi con il mare attraverso le bocche di porto, che rendono più marinizzate le porzioni più orientali, mentre le zone più distanti dalle bocche possono presentare difficoltà nel ricambio idrico, favorendo fenomeni distrofici con conseguenti insorgenze di ipo/anossie.

Per quanto riguarda gli apporti di acqua dolce la Laguna di Caleri risente maggiormente dell'influenza del fiume Adige, mentre nella laguna di Marinetta si immette direttamente il Po di Levante. In Figura 16 è riportata la localizzazione delle stazioni sopramenzionate.

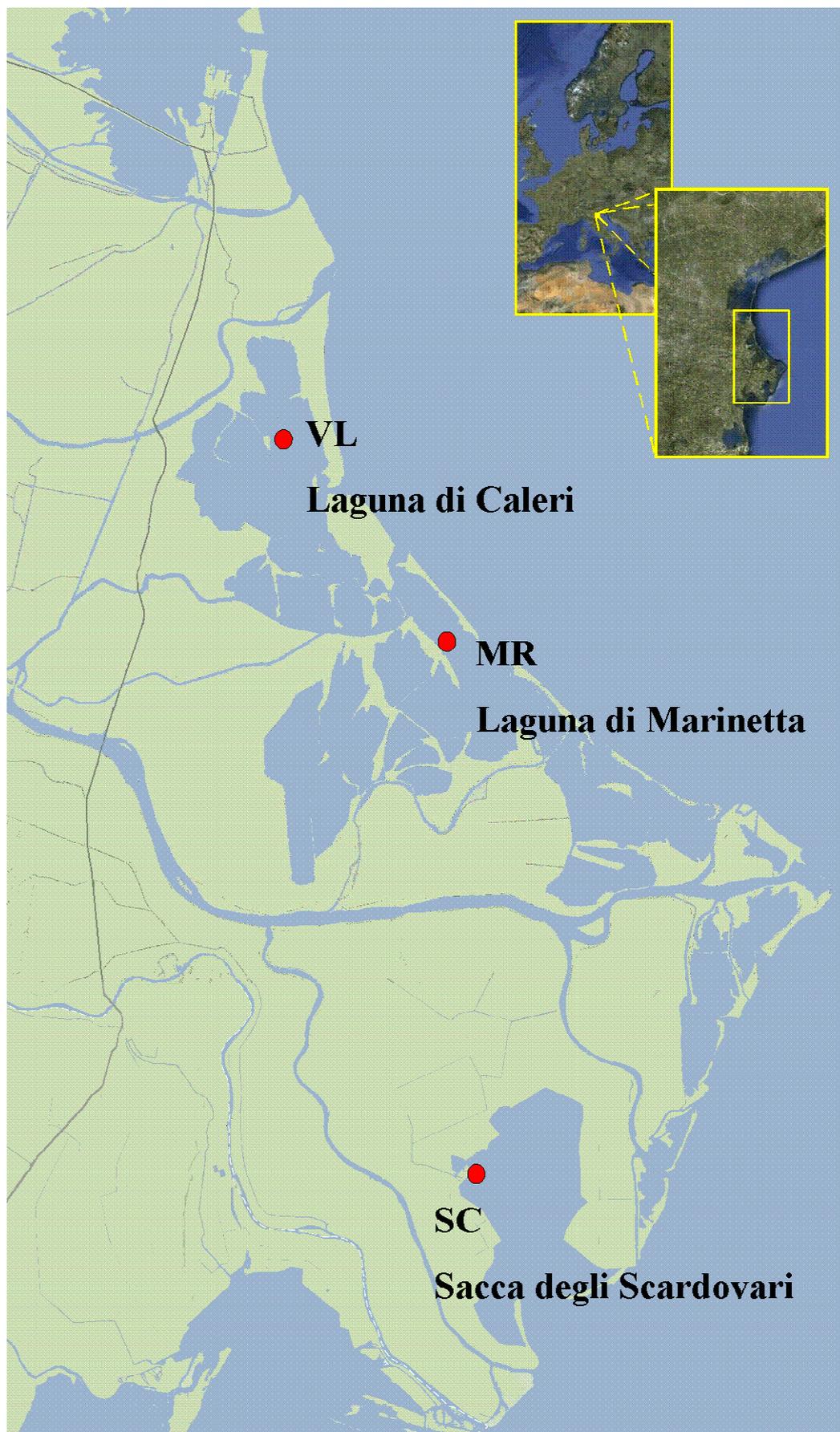


Figura 16 – Localizzazione delle aree di campionamento sul Delta del Po (fonte: google maps, modificata).

In Laguna di Caleri le zone adibite a venericoltura sono situate nella parte più vivificata e dove risulta migliore il ricambio idrico, in prossimità quindi della bocca di porto e dei principali canali adduttori. In questa zona erano presenti, fino a poco tempo fa, insediamenti per la mitilicoltura del tipo a pali fissi, ora abbandonati a favore del più remunerativo allevamento della vongola filippina. In Laguna di Marinetta gli insediamenti di venericoltura sono posti nella porzione più settentrionale, compresa tra lo sbocco del Po di Levante e la bocca di porto.

Per quanto riguarda i parametri idrologici, la salinità presenta una forte variabilità, con valori che mediamente per entrambe le lagune oscillano tra il 7‰ e il 24‰. La temperatura invece oscilla tra i 4°C-4.5°C nella stagione più fredda e i 25.5°C- 26.5°C durante l'estate. Il pH si mantiene relativamente costante, con i valori che rientrano all'interno dell'intervallo compreso tra pH 7.8 e 8.6. In Laguna di Caleri il valore più basso registrato di ossigeno disciolto è di 3.8 mg/l e 46% di saturazione, mentre in Laguna di Marinetta è di 4.6 mg/l e 60% di saturazione (ARPAV, 2006).

La Sacca di Scardovari ha una superficie totale di 3200 ha ed una profondità media di 1.5 m; è situata nell'area meridionale del delta del Po, fra i rami del Po di Tolle a Nord-Est e del Po di Gnocca a Sud-Ovest. Dal punto di vista morfologico è una profonda insenatura nella parte meridionale del delta facente parte di un esteso complesso di lagune salmastre formatosi in seguito al continuo rimodellamento della linea di costa dovuto all'evoluzione morfologica del Delta. La formazione della Sacca risale al 1840 circa e fu causata dall'avanzamento verso il mare dei due rami del delta del Po che attualmente la abbracciano. La Sacca di Scardovari comunica con il mare attraverso una bocca artificiale ricavata con i recenti lavori di vivificazione situata sullo scanno litoraneo vicino alla foce del ramo del Po di Tolle, ed un'altra più ampia bocca orientata a Sud-Est. Tale bocca è in parte sbarrata da una serie di banchi sabbiosi (scanni) parzialmente sommersi, che delimitano un canale centrale di maggiore scorrimento del flusso di marea che presenta una maggiore profondità (circa 4 metri). Gli scanni sono formati da sabbie con dimensione media di 2.53 mm. I fondali della sacca, costituiti in prevalenza da argille (fianco orientale) ed argille siltose (fianco occidentale), rimangono sempre coperti dall'acqua anche in corrispondenza dei minimi di marea. Policheti serpulidi formano nel fondo sacca densi aggregati dello spessore di 25-30 cm, che incrostano in pratica tutte le pareti verticali dei massi.

Gli apporti fluviali sono particolarmente importanti soprattutto in regime di piena del fiume Po. La porzione più meridionale della sacca risente sia degli apporti fluviali che del flusso di marea mentre la parte settentrionale del bacino presenta caratteristiche più marcatamente lagunari con un ricambio idrico minore e a volte assente. La Sacca di Scardovari riceve anche acque dolci derivanti dall'irrigazione agricola. Sono presenti e funzionanti infatti due idrovore: una situata nella parte Sud-Est

della laguna è denominata “Paltanara” ed una localizzata nella parte settentrionale della laguna detta “Scotta”.

L'evoluzione orografica dei fondali incide sulla salinità: con il passare del tempo si ha infatti una riduzione della profondità dei canali interni alle lagune ed i fondali tendono naturalmente ad uniformarsi; in tal modo le aree più interne saranno maggiormente influenzate dagli agenti atmosferici e risentiranno in misura sempre minore dell'effetto della marea (ARPAV, 2006).

La temperatura delle acque è estremamente variabile, perché segue da vicino le variazioni della temperatura atmosferica. Generalmente, rispetto alle acque marine, quelle lagunari sono molto più fredde in inverno e più calde in estate. Infatti, la temperatura presenta grandissime escursioni con valori che possono oscillare tra i 3-4°C nel periodo invernale, sino a superare i 30°C nel periodo estivo (ARPAV, 2006).

3. Materiali e Metodi

3.1 Raccolta dei campioni

Una prima campagna di campionamento è stata effettuata tra Giugno e Luglio 2009: per ogni stazione, tramite la collaborazione con i pescatori locali, sono stati raccolti circa 150 campioni di taglia commerciale di *R. philippinarum*, necessari per le analisi genetiche e conservati in appositi contenitori siglati contenenti Etanolo assoluto a -20 °C per prevenire la degradazione del DNA; oltre agli individui necessari per le analisi di genetica molecolare sono stati prelevati altri 100 esemplari che sono stati conservati in barattoli siglati a -20 °C fino al momento delle analisi biochimiche ed ecotossicologiche in laboratorio (Figura 17).



Figura 17 – Fase di raccolta e smistamento degli organismi per le analisi ecologiche e genetiche

In ogni stazione è stato inoltre campionato anche il sedimento superficiale per mezzo di un campionatore a tubo a pressione manuale (carotatore) del diametro di 50 mm, e nelle zone di maggior profondità tramite l'utilizzo di una benna. Per evitare un'eccessiva risospensione del sedimento, il motore della barca utilizzata per la spedizione (generalmente caratterizzata da un pescaggio piuttosto basso per poter raggiungere anche zone di bassa marea) è stato mantenuto spento per la durata del carotaggio/bennata, così come il prelievo degli organismi, effettuato solo successivamente al prelievo del sedimento: in ogni area sono stati raccolti 3 campioni di sedimento superficiale (circa 250 ml in volume); a sua volta ogni campione è stato ottenuto omogeneizzando *in situ* 3 carote/bennate raccolte in punti relativamente vicini tra loro, e lasciando che la barca venisse trascinata alla deriva a motore spento tra un campione e il successivo nella medesima area (Figura 18).



Figura 18 – Utilizzo del carotatore per il prelievo del sedimento superficiale

I campioni sono stati posti in contenitori di polietilene siglati e conservati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per le successive analisi ambientali (chimiche e granulometriche). Sono state anche annotate tutte le eventuali anomalie presenti nelle immediate vicinanze dell'area di campionamento, ad esempio la presenza di draghe o altre imbarcazioni di passaggio che con la loro azione meccanica avrebbero potuto influenzare il corretto prelievo.

Verso la fine del terzo anno di Dottorato, sulla base dei risultati ottenuti dal primo campionamento e al fine di completare e aggiornare le informazioni ottenute, è stata condotta un'ulteriore e più mirata campagna di campionamento; sono stati nuovamente raccolti campioni di organismi e sedimento secondo le stesse modalità descritte in precedenza. Tuttavia in questo caso una parte degli organismi (circa 100 per ogni stazione) è stata sottoposta a depurazione controllata in impianto industriale in modo da poter analizzare un prodotto che fosse il più possibile simile a quello immesso sul mercato ittico, e soprattutto per poter operare un confronto con il prodotto “fresco” appena pescato.

Le vongole raccolte non sono state sottoposte ad una “lavorazione” in senso stretto, in quanto il prodotto non è stato modificato nella sua integrità, ma semplicemente sottoposto alla sola depurazione. Per queste operazioni generalmente vengono utilizzate le seguenti strutture: vasche di depurazione, celle di refrigerazione a $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ per il prodotto depurato, un locale con l'impianto di trattamento dell'acqua da impiegare per la depurazione (filtrazione e disinfezione), una cella di

refrigerazione o di congelamento. I sacchi contenenti le vongole vengono scaricati presso il centro di depurazione, vengono aperti ed il contenuto versato in apposite ceste in caso di depurazione orizzontale, (Figura 19) oppure in cestoni più grandi (*bins*), in caso di depurazione verticale. Le ceste, tramite paranco vengono immerse in vasche orizzontali, mentre i *bins* vengono portati in zona depurazione ed eventualmente sovrapposti in caso di impianto a più piani in serie. Il prodotto così posizionato è rimasto a contatto con l'acqua per 48 ore (secondo quanto indicato da Zhu *et al.*, 1999) e quindi è stato rimosso per le fasi successive. Per una buona depurazione, è bene che l'acqua non superi i 15 °C, valore ideale per l'attività metabolica del mollusco.

L'impianto scelto per la depurazione dei campioni dal Delta del Po è gestito dalla società "L'Acquaviva srl" con sede in provincia di Rovigo; i campioni della Laguna di Venezia sono stati spurgati invece presso l'impianto del Consorzio Allevatori Molluschi (C.A.M.) di Chioggia, in provincia di Venezia.



Figura 19 – Vasca di depurazione svuotata, sono visibili le cassette di organismi

La seconda campagna di campionamento di sedimento ha riguardato solo cinque delle sette aree campionate nel 2009 (non sono state campionate le aree E e ZI in quanto il sito E aveva dimostrato caratteristiche simili al sito H, mentre la Zona Industriale era stata campionata allo scopo di avere un confronto con un'area fortemente contaminata) alle quali è stata aggiunta l'area SC (Scardovari) non presa in considerazione nel primo campionamento. Solo per i campioni di sedimento, data la

complessità della procedura di speciazione geochimica che richiede un notevole impiego di tempo, mezzi e personale, e con lo scopo di limitare il numero di campioni da analizzare, si è deciso di effettuare le analisi su campioni medi ottenuti unendo le tre repliche campionate in ogni sito, mescolate ed omogeneizzate con estrema cura. Bisogna ricordare che tale indagine è stata programmata ai fini di un rapido controllo di eventuali variazioni significative nel tempo, sia nei livelli di concentrazione dei metalli totali, sia nella loro ripartizione tra le varie fasi geochimiche.

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 Carlo Erba disciolti in H₂O Milli-Q e reagenti del tipo Suprapur della ditta Merck.

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 tecniche ICP-OES e 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 fornetto 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.

3.3 Estrazione dei metalli in campioni di sedimento ed 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) (Figura 20) che è munito di sistemi di controllo e monitoraggio continuo di temperatura e pressione (programmabile 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 di programmi impostati in più *steps*, fino ad un massimo di cinque.

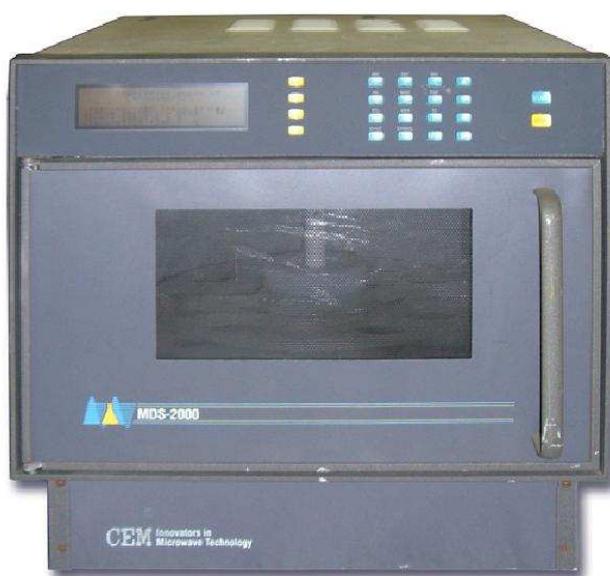


Figura 20 – Digestore a microonde modello CEM MDS-2000

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. Quanto riportato finora mette in luce 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 in Figura 21.

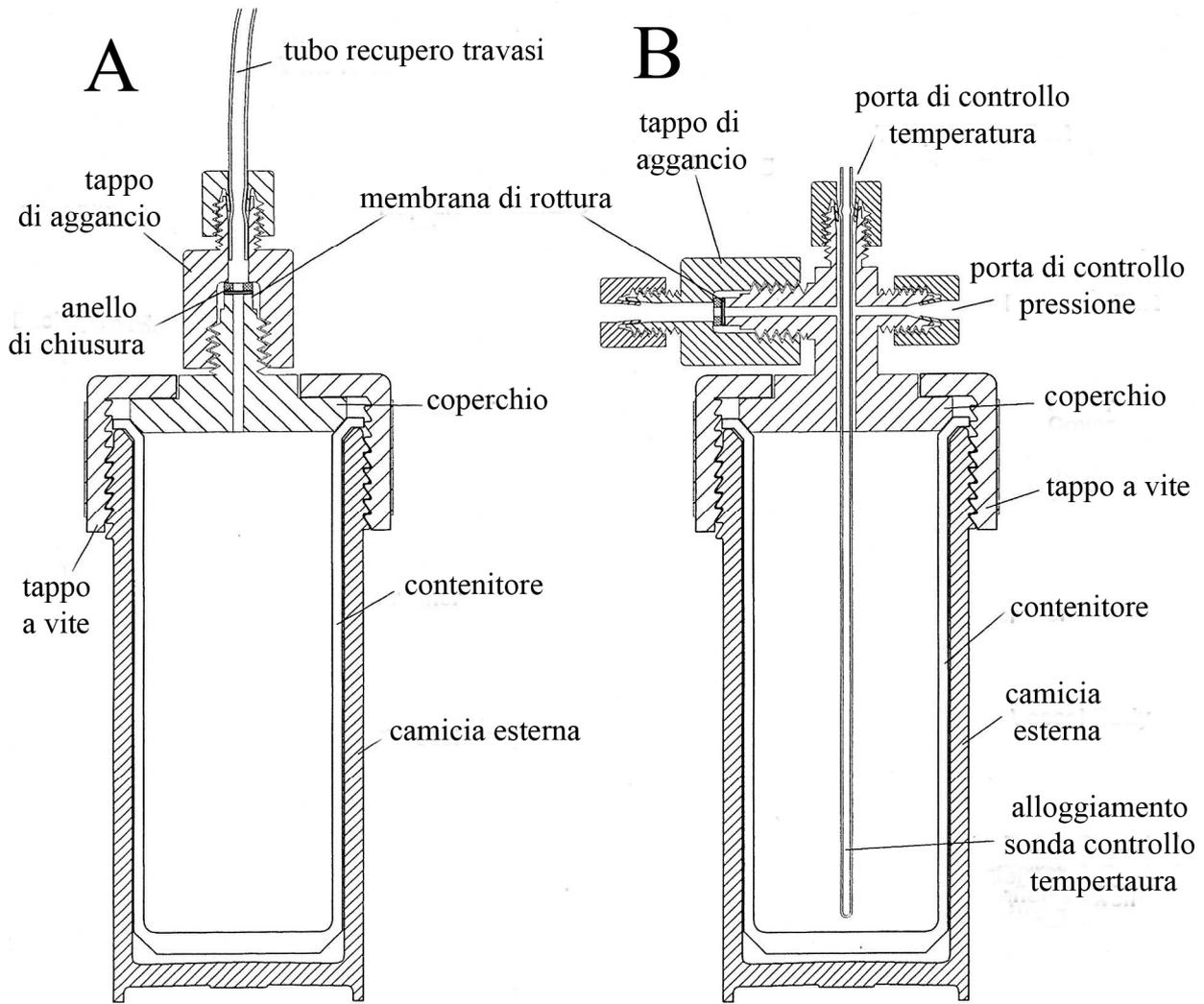


Figura 21 – Rappresentazione schematica dei contenitori in teflon per il digestore a microonde MDS-2000 (CEM); A) contenitore normale; B) contenitore di controllo (fonte: CEM MDS-2000 Operation Manual, 1994, modificata)

3.4 Analisi sui sedimenti

Volendo verificare l' idoneità di appropriate aree lagunari per le attività di semina/preingrasso/ingrasso/raccolta di organismi Bivalvi eduli, risulta estremamente importante verificare la qualità di suddette aree partendo proprio dallo studio del sedimento ad esse associato. In questo contesto risultano necessarie quindi non solo la determinazione della granulometria del substrato e la quantificazione degli inquinanti ivi presenti, ma anche la valutazione della loro potenziale biodisponibilità che, in particolare per metalli pesanti e metalloidi, corrisponde alla frazione di metallo totale che può essere effettivamente assorbito e bioaccumulato nel biota, quantificabile tramite tecniche di geospeciazione.

3.4.1 Indagine granulometrica

Su di un sub-campione di circa 20 g di sedimento di ogni stazione è stata condotta l' analisi granulometrica per determinare le percentuali di sabbia, silt e argilla, al fine di verificare se la tessitura del sedimento in questione rientrasse negli intervalli ottimali e/o necessari per la crescita e lo sviluppo di *Ruditapes philipinarum*. La ricerca bibliografica indica che la composizione granulometrica più propizia per un allevamento è, come già stato detto, un misto di sabbia e silt, a prevalenza sabbiosa (Paesanti & Pellizzato, 2000).

Le 3 carote prelevate in ogni sito di campionamento sono state polverizzate separatamente con un mortaio; in seguito, sono state sub campionate per la granulometria, e dei 3 campioni per sito, è stato ricavato un solo campione composito di circa 18-20 g; il resto è stato messo da parte per le indagini chimiche. Tutte queste operazioni sono state condotte con strumenti e contenitori di ceramica o plastica per prevenire un eventuale scambio di metalli con le pareti dei contenitori. Questi sub-campioni sono stati preventivamente setacciati con un setaccio a maglie di diametro 2 mm, per eliminare gli eventuali frammenti di conchiglie di molluschi presenti, dopodiché si sono pesati i grammi totali del campione e si è operata una seconda setacciatura (maglie di diametro 63 μm) per separare la sabbia dalla componente più fine; in alcuni casi è stato necessario effettuare la fase finale di separazione "a umido", utilizzando un becker ed una spruzzetta di acqua distillata, ponendo successivamente in stufa il campione per qualche ora e solo dopo raccogliendo il sedimento fine secco dal fondo del becker. Circa 1.5-2 g di frazione fine per ogni campione sono stati lasciati *over night* con una miscela di acqua deionizzata e Sodio esametafosfato (un agente anti flocculante) e solo il giorno successivo analizzati al sedigrafo (modello 5000 D della ditta Micromeritics): questo restituisce una curva cumulativa di massa percentuale delle varie frazioni granulometriche comprese tra 63 μm e 0.25 μm (Figura 22).

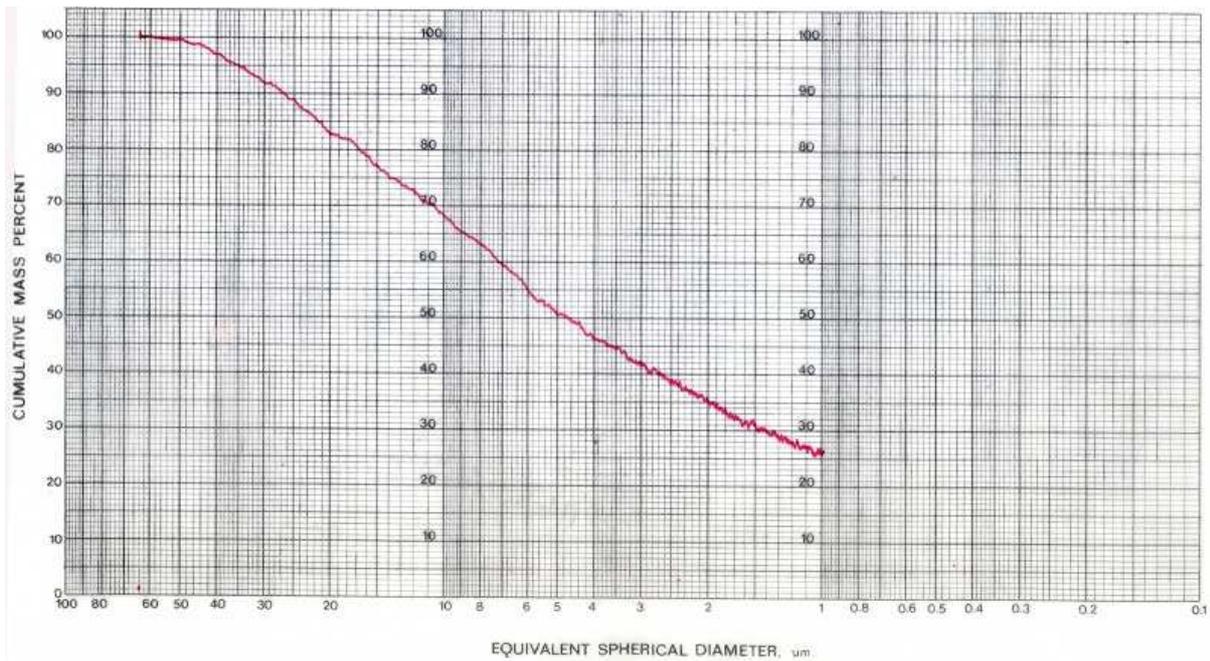


Figura 22 – Esempio di curva cumulativa di massa percentuale delle varie frazioni granulometriche tra 63 µm e 0.25 µm restituita dal sedigrafo modello 5000 D della ditta Micromeritics.

In seguito sono stati effettuati i calcoli percentuali delle frazioni di sabbia, silt e argilla riportati ai pesi dei campioni.

3.4.2 Contenuto totale di metalli

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 nel mese di Giugno 2009 e tra Giugno e Luglio del 2011, e sono state successivamente congelate, liofilizzate e omogeneizzate per poter procedere alla digestione acida in microonde.

Sono stati pesati circa 0.1 g di campione di sedimento liofilizzato ed omogenato e si è seguito il protocollo che prevede:

- Aggiunta di 5 ml di acqua Milli-Q
- Aggiunta di 3 ml di acqua regia (costituita da HNO₃ e HCl in rapporto rispettivamente 1:3)
- Aggiunta di 1.5 ml di HF (48%) allo scopo di sciogliere i silicati
- Prima digestione in microonde per circa 1 h a T_{max}=180 °C, P_{max}=140 psi e potenza pari al 100%
- Aggiunta di 7 ml di una soluzione satura di H₃BO₃ allo scopo di neutralizzare l'acido

fluoridrico che non ha reagito

- 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 μm 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).

Per la determinazione dell'As si è reso necessario condurre una nuova 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:

- prelievo di un'aliquota di 0.15 g di sedimento liofilizzato e omogenato;
- aggiunta di 4 ml di H_2O Milli-Q;
- aggiunta di 2 ml di H_2SO_4 (98%);
- aggiunta di 2 ml di H_2O_2 ;
- digestione in microonde in 2 *step* successivi:
 - 5 minuti a $P_{\text{max}} = 120$ psi e $T_{\text{max}} = 120$ °C con potenza pari al 50%;
 - 30 minuti a $P_{\text{max}} = 140$ psi e $T_{\text{max}} = 170$ °C con potenza pari al 100%;
- 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, in cui viene

gorgogliato un flusso di Ar che strappa l'AsH₃ nella cella di quarzo posta lungo il cammino ottico dello strumento, dove il metallo 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 ug/kg di sedimento.

3.4.3 Speciazione geochimica

La procedura di estrazioni sequenziali utilizzata per la speciazione geochimica è costituita da sei steps generali, ed è illustrata in Figura 24.

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

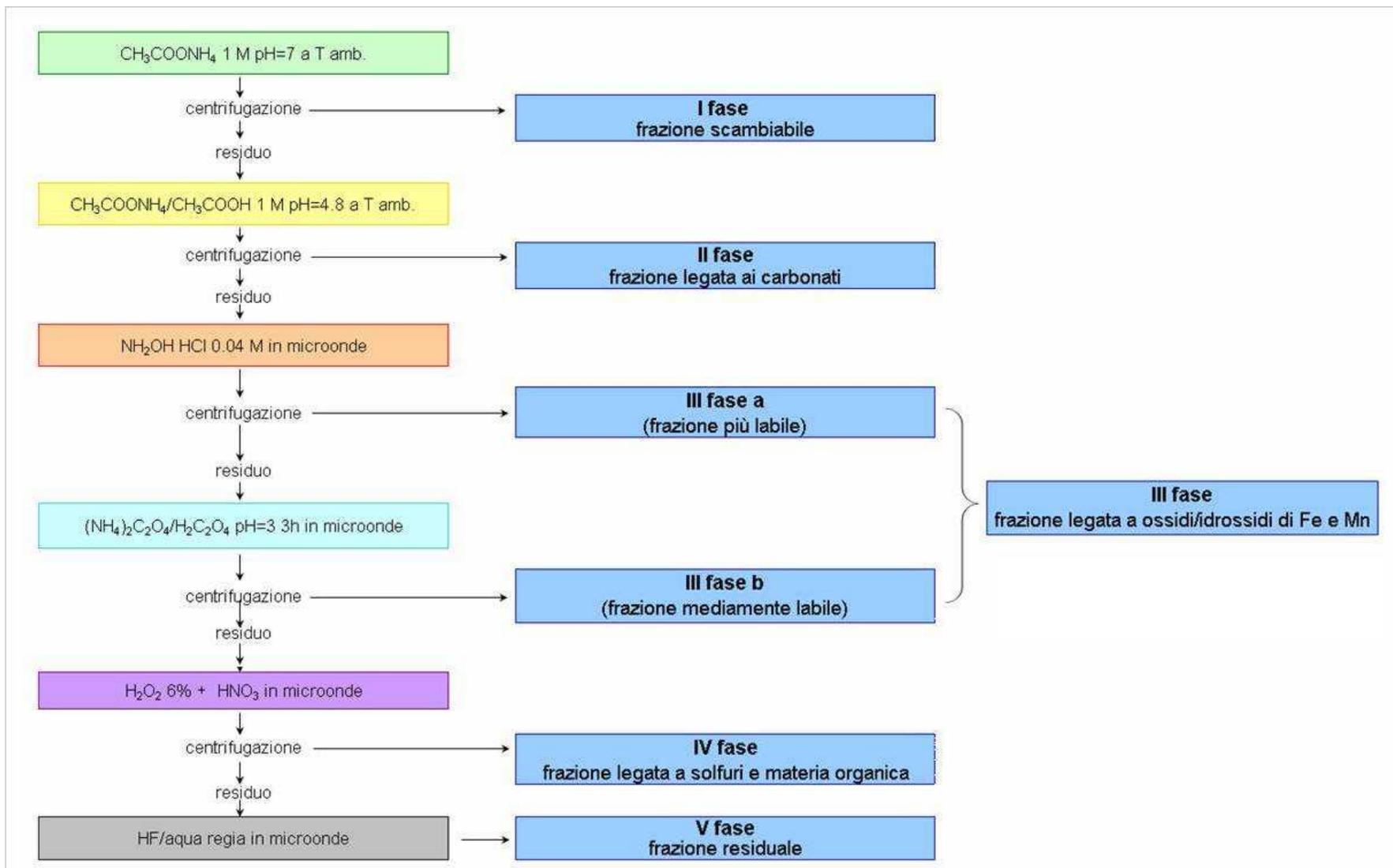


Figura 23 – Procedura di estrazioni sequenziali per la speciazione geochimica

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

L'estrazione della prima fase viene eseguita su un'aliquota di circa 1.4 g di sedimento seccato, setacciato 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 stazione, mediante spettroscopia ad assorbimento atomico con lo strumento Spectra 250 Plus Varian, sia nella configurazione con bruciatore ad aria/acetilene, che nella configurazione con fornetto 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 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 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 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 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 $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.04 M in CH_3COOH al 25% e consente di solubilizzare principalmente gli ossidi di manganese, più facilmente riducibili. Un'aliquota di campione di circa 1.4 g viene trattata con 30 ml di questa soluzione in digestore a microonde per 30 min a $T_{\text{max}}=100^\circ\text{C}$, $P_{\text{max}}=50$ 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.

Per motivi pratici e di immediatezza si preferisce fare riferimento alle varie fasi in termini che descrivono le caratteristiche del sedimento solubilizzato, ma sarebbe più corretto definire le varie fasi geochimiche operativamente, ovvero citando la soluzione estraente.

3.5 Analisi sugli organismi

3.5.1 Contenuto totale di metalli

Durante il primo anno di lavoro è stata messa a punto la procedura per determinare il contenuto di metalli in tessuti molli e ghiandola digestiva di *R. philippinarum*; 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 distinguendo tra tessuti molli (*soft tissue*, ST) e ghiandola digestiva (epatopancreas, EPT), pretrattati tramite congelamento, liofilizzazione e omogenizzazione manuale.

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 omogenato:

- 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.

3.5.2 Quantificazione delle metallotioneine

Nel corso del primo anno di lavoro è stata messa a punto la metodica per l'estrazione e la quantificazione di MT da campioni di ghiandola di *Ruditapes philippinarum*. 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 (Figura 24) 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 infatti un certo quantitativo stechiometrico di TNB (tionitrobenzoato), un composto giallognolo con massima assorbanza a $\lambda_{Abs}= 412 \text{ nm}$

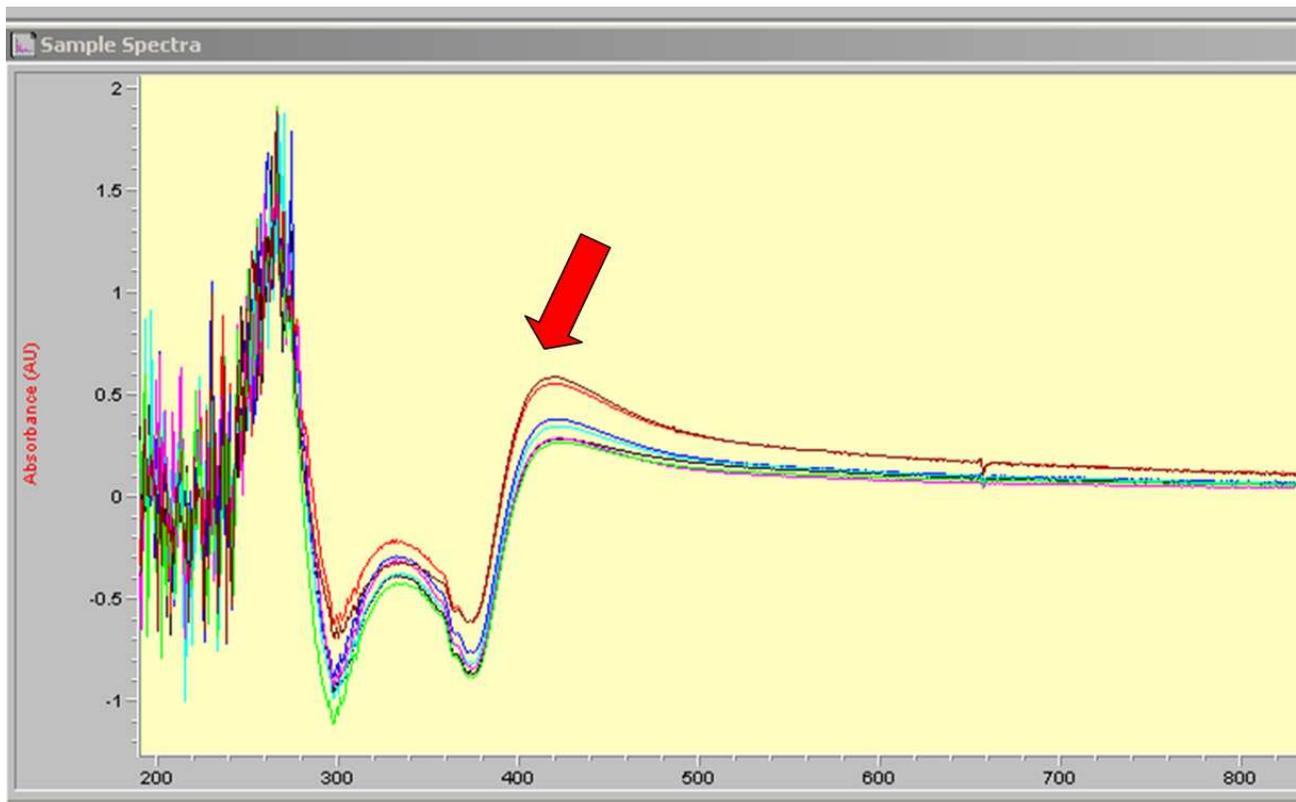


Figura 24 – Output grafico della valutazione del contenuto di gruppi -SH in spettrofotometria UV; in evidenza il picco di massima assorbanza del DTNB a $\lambda_{Abs}= 412 \text{ nm}$.

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

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

- 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;
- porre le ghiandole su carta da filtro da 3 mm, eliminando le parti grasse in eccesso;
- trasferire le ghiandole in provette a fondo tondo da 15 ml; le provette vanno tenute in ghiaccio ad ogni *step*;
- 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;
- omogeneizzare con un *potter* elettrico;
- centrifugare la soluzione omogenea così ottenuta a 30000xg per 20 min, la centrifuga deve essere mantenuta a 4 °C;
- recuperare tutto il surnatante e trasferirlo in nuove provette; vortexare per alcuni secondi;
- 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;
- centrifugare a 6000xg per 10 min, con T=4 °C;
- recuperare il surnatante (2-4 ml);
- 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;
- conservare i campioni a -20 °C per almeno 1 h;
- centrifugare a 6000xg per 10 min.; eliminare il surnatante e mantenere il pellet;
- risospendere il pellet con Etanolo, Cloroformio e buffer omogeneizzante, in rapporto rispettivamente, 87:1:12 in volume;
- centrifugare per 10 min. a 6000xg e rimuovere il surnatante;

- asciugare completamente il pellet con N₂ gas;
- risospendere il pellet con 150 µl di una soluzione 0.25 M NaCl e 150 µl di una soluzione composta da HCl 1 N ed Acido Etilendiamminotetraacetico (EDTA) 4 mM;
- preparare la soluzione stock di Glutathione (GSH) e il Reattivo di Ellman (Acido Ditionitrobenzoico o DTNB);
- preparare almeno 3 standard con il GSH ed un bianco;
- aggiungere ad ogni campione 150 µl di soluzione 0.25 M NaCl, 150 µl della soluzione di HCl 1 N ed EDTA 4 mM;
- 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;
- aggiungere a bianco, standard e campioni 4.2 ml della soluzione di DTNB;
- centrifugare i campioni a 3000xg per 5 min;
- 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 Glutathione (GSH): si preparano così una serie di standard in base alla concentrazione della soluzione madre e si costruisce una curva di taratura in cui 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:

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

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) con la collaborazione del dottor Davide De Lucrezia presso il Parco Scientifico e Tecnologico VEGA di Venezia

3.5.3 Fattore di bioaccumulo (BAF)

Ogni organismo acquatico può assorbire contaminanti dal sedimento, e poiché i sedimenti sono la fonte prevalente di contaminanti, la loro concentrazione negli organismi è stata studiata in rapporto a quella nei sedimenti. In termini numerici è stato dunque calcolato il fattore di bioaccumulo (BAF). Tale indice è definito dalla formula:

$$\text{BAF} = [M]_{\text{org}}/[M]_{\text{sed}}$$

Si tratta quindi del rapporto tra la concentrazione (espressa come mg/kg d.w. della matrice considerata) dell'inquinante nei tessuti e la concentrazione dello stesso nel sedimento (Thomann *et al.*, 1995; Greja and Salinas, 2003; Qiu *et al.*, 2011). Se il valore è superiore all'unità, significa che l'organismo bioaccumula il metallo considerato.

L'utilizzo di questo fattore, accoppiato a studi di tossicocinetica, in numerosi studi su diverse specie di Molluschi Bivalvi, ha dimostrato che il tasso ed il livello di accumulo dipendono fortemente da specie e metallo; in particolare, l'analisi dei valori di BAF ha indicato una marcata variazione della concentrazione di metalli pesanti nei tessuti di *V. pullastra* and *R. decussatus* (El-Shenawy, 2002). Hummell *et al.* (1997) riportano ad esempio che la vongola è un indicatore migliore di contaminazione da Cu rispetto al più comunemente usato mitilo.

3.5.4 Condition Index (CI)

Un importante parametro utile per verificare lo stato di salute di Molluschi Bivalvi eduli (e di conseguenza quello dei siti produttivi) è l'indice di condizione o *condition index* (CI): 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 & Stephensons 1974; Bayne & Thompson 1970).

In questo studio si è scelto di utilizzare l'indice di condizione (CI) 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*.

Operativamente sono state registrate con un calibro le tre dimensioni delle singole vongole (lunghezza, larghezza e spessore, Figura 25) e ne sono state pesate, con una bilancia analitica di precisione, le parti molli *in toto* e la sola ghiandola digestiva e, per differenza, si è ottenuto il peso delle sole parti molli. Il peso secco (d.w.) è stato stimato sulla base della percentuale media di perdita di umidità dei tessuti e della ghiandola. Il valore di CI è stato calcolato utilizzando la formula:

$$CI = d.w. / L1 * L2 * L3$$

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

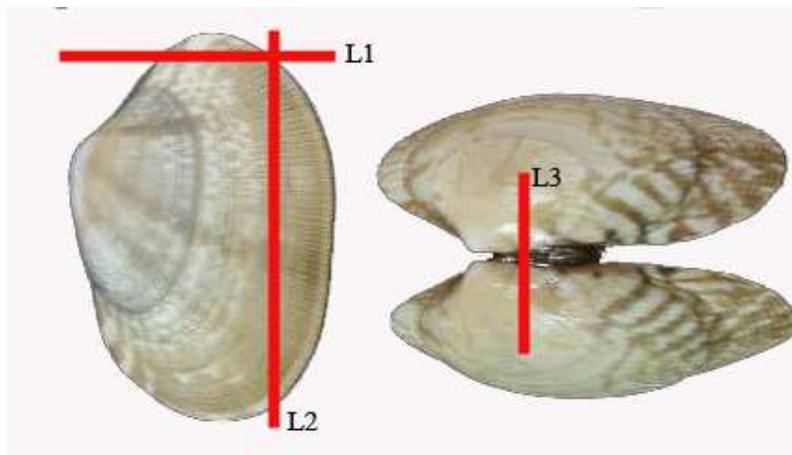


Figura 25 - Schema in cui sono evidenziate le 3 dimensioni del guscio di una vongola utilizzate per calcolare l'indice di condizione

Tale indice è stato calcolato considerando i tessuti *in toto*, la sola ghiandola digestiva e i tessuti privati della ghiandola. In base agli studi condotti da Lares & Orians (1997) sul genere *Mytilus*, questo indice di condizione può oscillare in un *range* di valori compresi tra 1 e 50 mg/cm³.

3.6 Metodi analitici utilizzati per l'analisi dei metalli nei campioni di sedimento e organismi

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

Per quanto riguarda le analisi in spettroscopia di assorbimento atomico (AAS), lo strumento utilizzato è lo Spectra 250 Plus Varian (Figura 26). 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 fornetto di grafite (modello GTA-96 della Varian), per gli elementi a concentrazione più bassa. L'analisi con fornetto 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.



Figura 26 – Assorbimento Atomico *Spectra 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 27).



Figura 27 – Spettrometro di massa con sorgente al plasma di Argon accoppiato induttivamente (ICP-MS) modello 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:
 - 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.
 - 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.
 - 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.
 - 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.

3.7 Controllo e ottimizzazione della performance delle procedure di estrazione e delle analisi strumentali dei metalli pesanti e metalloidi testati

La complessità delle procedure di estrazione (metallo totale, speciazione geochimica) e delle matrici stesse dei campioni (sedimento, ghiandole e tessuti extraghiandolari), il numero elevato di soluzioni estraenti a diversa composizione chimica (da 1 a 6 steps), la contemporanea presenza di numerosi analiti in concentrazioni estremamente differenti (i livelli di concentrazione variano dai ug/l ai mg/l) hanno richiesto l'ottimizzazione e il continuo e puntuale controllo della performance delle procedure di estrazione e delle analisi strumentali.

Tale controllo è stato effettuato replicando le estrazioni (tre repliche per ciascuna estrazione e per le analisi strumentali) anche utilizzando, quando necessario, metodologie analitiche diverse (preferibilmente ICP-MS e AAS e, quando disponibili, ICP-OES e AFS) effettuando contemporaneamente le analisi sui bianchi di controllo (soluzioni in acqua Milli-Q uguali a quelle usate per l'estrazione dei metalli dai campioni, diluite a uguali volumi finali) e quantificando le concentrazioni degli analiti grazie all'utilizzo di curve di calibrazione ottenute tramite il metodo delle concentrazioni standard e, quando necessario, tramite quello delle aggiunte standard, che permette di minimizzare le interferenze dovute alla particolare matrice in esame.

La forte eterogeneità delle soluzioni provenienti da matrici piuttosto complesse ha richiesto l'ottimizzazione, nel caso di analisi con AAS, per ogni fase estrattiva dei diversi parametri di misura, soprattutto per quanto riguarda la temperatura e i tempi di essiccamento, incenerimento e atomizzazione dei metalli esaminati.

Per quanto riguarda le analisi con tecnica ICP-MS, le numerose interferenze connesse con la complessità delle matrici testate hanno reso necessario l'esecuzione di un test quotidiano gestito dal software (*Daily Test*) sullo strumento, che monitora la percentuale di ioni a doppia carica e di ossidi, la risposta in intensità di alcuni elementi di riferimento (Rh, Mg, Pb), ed eventualmente permette di ottimizzare parametri quali il flusso di gasi di nebulizzazione (0.99 l/min), voltaggio della lente (6.90 volt), generatore di radio frequenza (1300 Watt), flusso di introduzione del campione (1 ml/min). Si è inoltre reso necessario analizzare soluzioni diluite per minimizzare la formazione di depositi salini sulle superfici interne dello strumento, che potrebbero inficiare l'analisi riducendo notevolmente la sensibilità della risposta strumentale.

L'accuratezza e la precisione delle procedure utilizzate per estrarre i metalli sono state stimate sottoponendo ad analisi materiali di riferimento certificati, in particolare *Marine Sediment Reference Material for Trace metals and other Constituents* MESS-3 (*National Research Council, Canada*) per quanto riguarda la concentrazione di metalli nei sedimenti, e lo *Standard Reference Material (SRM) 2976 (Mussel Tissue, U.S. National Institute of Standards and Technology)* per quanto riguarda la concentrazione di metalli negli organismi. L'accordo tra i valori certificati ed i valori misurati tramite le tecniche ICP-MS e AAS varia a seconda del metallo e della tecnica utilizzata, mantenendosi generalmente entro una variazione al di sotto del 10%.

Non essendo disponibile un idoneo materiale di riferimento certificato per la speciazione geochimica, la qualità dei risultati analitici ottenuti dalle estrazioni sequenziali dei metalli pesanti e As, è stata valutata e stimata confrontando la somma delle concentrazioni riscontrate per ciascun metallo nelle diverse fasi geochimiche con la quantità di metallo ottenuta mediante digestione totale dei campioni di sedimento.

3.8. Analisi statistiche sui dati ambientali

Per quanto riguarda le analisi chimiche ed ecologiche su organismi e sedimenti, i valori medi di concentrazione per ogni stazione sono stati visualizzati graficamente tramite tabelle e istogrammi utilizzando il programma Microsoft Excel; è stata inoltre condotta uno studio sull'indipendenza dei gruppi di variabili e sulle medie osservate tramite test T di Student a due code con intervallo di confidenza al 95%. Tale test è stato eseguito utilizzando il software STATISTICA (Stat Soft Inc. data analysis software system), versione 8.0. Tramite lo stesso programma sono state eseguite anche indagini statistiche di correlazione.

3.9 Analisi genetiche

Complessivamente sono stati analizzati 70 individui adulti di *Ruditapes philippinarum* raccolti nelle stazioni identificate per le analisi ambientali in Laguna di Venezia, Delta del Po e Sacca di Scardovari, al fine di individuare eventuali caratteristiche genetiche specifiche a livello geografico. Tutti gli individui analizzati provengono dalla biobanca di campioni raccolti negli anni 2009-2011.

Per effettuare confronti su scala biogeografica più ampia sono stati raccolti e tipizzati 14 campioni commerciali provenienti dalla Spagna (Galizia, La Coruna) per comparare i campioni italiani con quelli provenienti da altre aree di produzione europee.

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

In Tabella 3 sono indicate le stazioni di campionamento, le coordinate GPS ed il numero di campioni analizzati per ciascuna di esse.

Tabella 3 – Elenco delle stazioni di campionamento in Laguna di Venezia e Delta del Po, comprensivo di identificativo e coordinate GPS, e numero di campioni analizzati (N)

STAZIONE	ID	GPS	N
Zona “della Busa” (Lag. Centrale)	A	45° 23' 33" N 12° 16' 66" E	20
Palude di Monte (Lag. Nord)	B	45° 28' 23" N 12° 22' 66" E	16
Laguna di Marinetta	MR	45° 02' 31" N 12° 22' 36" E	11
Laguna di Caleri	VL	45° 05' 27" N 12° 19' 29" E	11
Sacca degli Scardovari	SC	44° 51' 45" N 12° 25' 10" E	12

Tutti gli individui sono stati caratterizzati attraverso il sequenziamento del gene mitocondriale *16S* ed attraverso l'analisi di sette loci microsatelliti, utilizzando come *out-group* tre campioni della specie nativa e congenerica *Ruditapes decussatus*, raccolti in laguna di Venezia.

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 Biologia Evolutiva e Funzionale (Università di Parma).

3.9.1 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) del DNA mitocondriale (Passamonti & Scali, 2001; Passamonti *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2004; Passamonti, 2007): i maschi 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 piuttosto 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) (Figura 28). 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.



Figura 28 – Fotografia di un esemplare di *R. philippinarum* privo della valva superiore; in evidenza i tessuti da cui sono stati prelevati i frammenti per l'estrazione del DNA (da <http://www.msn.ve.it>, modificata).

Il DNA genomico è stato estratto attraverso l'utilizzo del protocollo classico Sodio Dodecilsolfato (SDS), proteinasi K e fenolo cloroformio (Moore, 1999) oppure 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× (Figura 29), attraverso confronto con marcatore di peso molecolare ed analisi spettrofotometrica a 260–280 nm.



Figura 29 - Celle per elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio

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 (Figura 30).

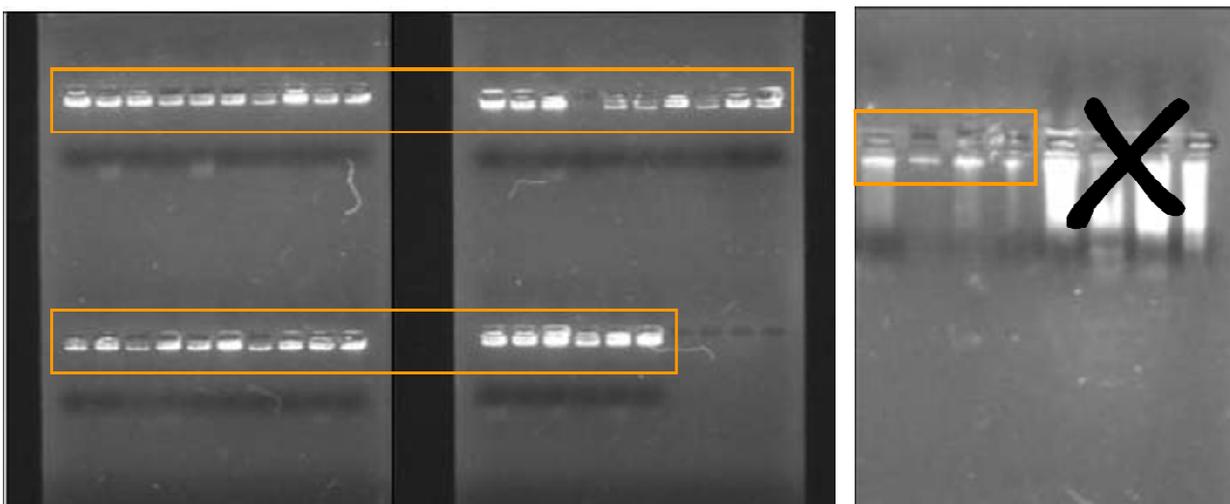


Figura 30 - Esempio di DNA genomico estratto: ad alto peso molecolare (a sinistra e nel rettangolo) e degradato (a destra).

3.9.2. Amplificazione tramite PCR

Per quanto concerne l'analisi del DNA mitocondriale, le prove effettuate nel primo anno di dottorato hanno permesso di scegliere come marcatore mitocondriale più informativo ed efficiente la sequenza di un frammento del gene *16S rDNA*, già con successo utilizzato per descrivere la 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') e *16SbrALT* (5' CCGGTCTGAACTCAGATCATGT 3') (Mikkelsen *et al.*, 2006) che amplificano circa 600 paia di basi (bp).

Le condizioni di PCR sono le seguenti (Chiesa *et al.*, 2010; Chiesa *et al.*, 2011b):

- Volume finale di reazione pari a 50 µl 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):
 - 2 cicli di 15 s 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.

3.9.3. 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 CEQTM DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter), ed analisi di elettroforesi capillare su gel di acrilamide tramite il sequenziatore automatico per acidi nucleici “CEQTM 8000 DNA Analysis System” (Beckman Coulter) (Figura 31), con 5 pmol di ciascun primer *forward* (FW) o *reverse* (RV).



Figura 31 - Sequenziatore automatico per acidi nucleici.

La lettura analitica delle sequenze ottenute dall'elettroforesi capillare su gel di acrilammide 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, con il software ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), per il riallineamento multiplo manuale delle sequenze e la rimozione dei *gaps*.

3.9.4. 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 and 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.* (2011). In un volume finale di 20 μ l sono stati addizionati

- 10 ng di DNA templatato,

- 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 "CEQ™ 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.

3.9.5. Analisi statistiche e filogenetiche dei dati di genetica molecolare

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* 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 Neighbour Joining (NJ) è stato costruito attraverso il modello Maximum Composite Likelihood di evoluzione del DNA, con 1000 repliche di bootstrap. 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 GenAEx 6.4.1 (Peakall e Smouse, 2006).

Per valutare la Conformità all'Equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) delle frequenze alleliche analizzate è stato utilizzato il software GenAEx mentre il software GDA, mediante il metodo di preservazione dei genotipi, è stato utilizzato per il test di Linkage disequilibrium e per la valutazione del dendrogramma UPGMA.

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

4. Risultati e Discussione

Si riporta per maggior immediatezza, la corrispondenza tra le stazioni di campionamento e la denominazione utilizzata (Tabella 4).

Tabella 4 – Elenco delle stazioni di campionamento e corrispondenza con la denominazione utilizzata.

STAZIONE	ID
Zona “della Busa” (Lag. Centrale)	A
Palude di Monte (Lag. Nord)	B
Canale della Perognola (Lag. Sud)	E
Valle delle Dolce (Lag. Sud)	H
Zona Industriale (Lag. centro-Nord)	ZI
Delta del Po, laguna. di Marinetta	MR
Delta del Po, laguna. di Caleri	VL
Delta del Po, Sacca degli Scardovari	SC
Costa Galiziana	ESP

4.1 Indagine granulometrica

Il risultato dell'analisi granulometrica di base sui siti di interesse della Laguna di Venezia e del Delta del Po è riportato in grafico a barre percentuali nella Figura 32.

La ricerca bibliografica (Paesanti & Pellizzato, 2000) indica che la composizione granulometrica più propizia per un allevamento è, come già osservato, un misto di sabbia e sedimenti fini, in cui la componente sabbiosa dovrebbe attestarsi tra il 50 e il 70% e la componente fine (argille + silt) dovrebbe variare tra il 10 e il 25%).

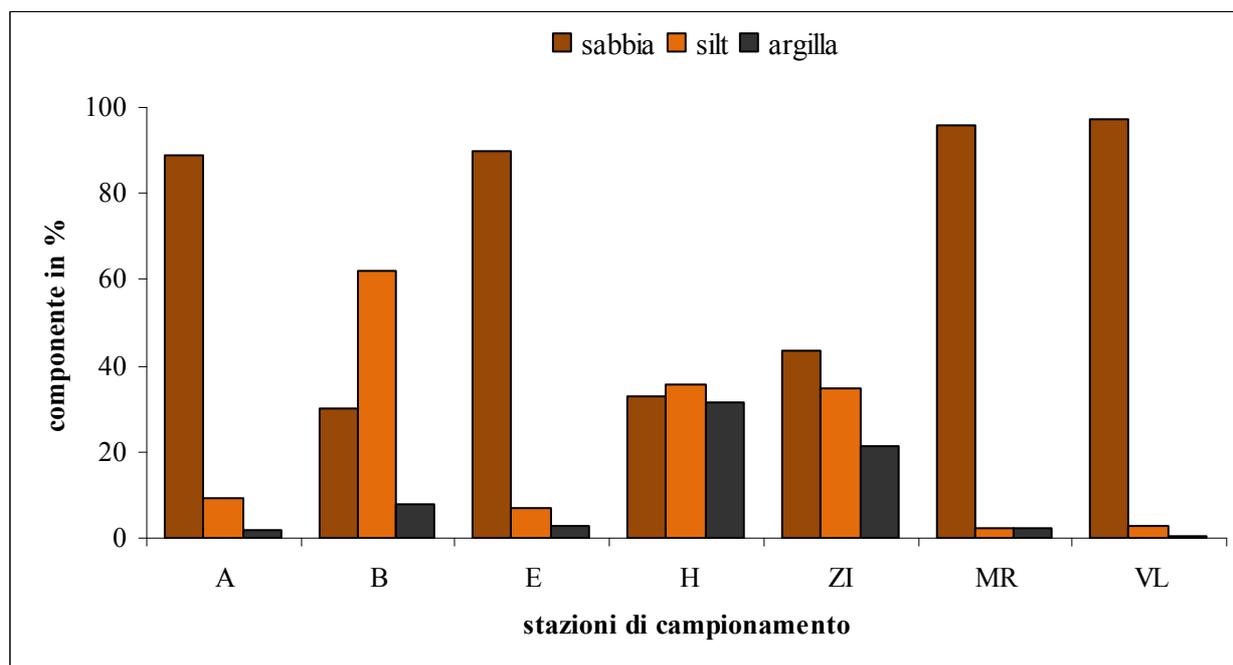


Figura 32 – Istogramma riportante i risultati in percentuale dell'analisi granulometrica per le stazioni della Laguna di Venezia e per le stazioni del Delta del Po.

Dai grafici a barre, si può notare come nella Laguna di Venezia la maggior parte delle stazioni considerate (a parte Valle delle Dolce (H), Palude del Monte (B) e Zona Industriale (ZI) siano a netta prevalenza sabbioso-siltosa, con percentuali di sabbia ben al di sopra del 50% e percentuali di argilla inferiori al 10%. Se da un lato la bassa percentuale di argilla le potrebbe collocare all'interno del *range* ottimale di crescita per *R. philippinarum*, la percentuale di sabbia è quasi sempre troppo elevata. In particolare, per quanto riguarda la stazione H, essa ha una composizione granulometrica abbastanza omogenea, con percentuali di sabbia, silt e argilla intorno al 30%; al contrario, la stazione B appare in contrasto con le altre, essendo a prevalenza siltosa (62.2%) e con una percentuale di sabbia del 30%, in questo caso al di sotto della percentuale ottimale per l'allevamento. Infine, il campione prelevato nella Zona Industriale (ZI) mostra una forte

componente di sedimenti fini (silt 34.9% e argilla 21.4%) e una bassa percentuale di sabbia (43.7%) qualificandosi anch'esso come tecnicamente inadatto all'allevamento e alla raccolta di vongole. Le due stazioni del Delta del Po (MR e VL) per le quali è stato possibile condurre l'analisi, sono entrambe caratterizzate da una netta prevalenza della componente sabbiosa. A questo proposito, facendo riferimento a quanto descritto nel paragrafo 1.5, si ricorda che il destino del particolato che raggiunge l'ambiente estuarino dipende essenzialmente dalle sue caratteristiche granulometriche. Le particelle più grossolane mantengono la loro dimensione individuale ed il loro comportamento deposizionale è governato unicamente da fattori idrodinamici e gravitazionali. Piuttosto recentemente sono state studiate le caratteristiche dei sedimenti lungo tutto il corso del fiume Po, evidenziando i principali fattori che controllano origine, mobilità e destino dei nutrienti e metalli pesanti legati alle matrici sedimentarie (Vignati *et al.*, 2003). In questi studi è stata ampiamente documentata la rapida sedimentazione di materiale a granulometria più grossolana trasportato dal fiume nelle regioni immediatamente adiacenti le bocche distributarie (Nelson, 1970; Boldrin *et al.*, 1988; Fox *et al.*, 2004). Tutto questo, insieme ad un'elevata idrodinamica e un forte ricambio idrico, contribuisce a spiegare le elevate percentuali di sabbia (> 90%) riscontrate nelle stazioni MR e VL, al di fuori del range ottimale per *R. philippinarum*.

Basandosi esclusivamente sui dati ricavati da questa indagine granulometrica, nessuna delle stazioni considerate risulterebbe idonea all'allevamento di vongole. Tuttavia, sebbene molto importante, il rapporto tra granulometria fine e grossolana dei sedimenti non è l'unico fattore ad influire sulla sopravvivenza della specie in una determinata area. Nello specifico, l'ossigenazione dei sedimenti in cui vivono è certamente un fattore limitante per questi organismi. Da dati di riferimento bibliografici (GRAL, 2006, 2009), il prodotto allevato in stazione H (Laguna di Venezia sud) risulta essere di buona qualità, nonostante i rapporti tra le componenti granulometriche non siano ideali. Questa discrepanza si può spiegare tenendo conto del fatto che il tenore di ossigeno presente nei sedimenti, in genere maggiore nelle matrici sabbiose, è fortemente influenzato non solo da cause naturali (moto ondoso e venti) ma anche dall'azione dell'uomo dovuta alla pesca con strumenti idraulici e alle attività di dragaggio dei fondali: è certamente possibile che in alcuni casi, tali attività comportino una maggiore ossigenazione dei sedimenti che, dal punto di vista della qualità finale del prodotto allevato, "compensano" la scarsa idoneità granulometrica dei siti presi in considerazione.

A conferma dell'importanza di una buona ossigenazione dei sedimenti nelle aree di allevamento, va ricordato che una situazione che può compromettere gravemente l'allevamento dei molluschi è rappresentata dalle cosiddette "crisi distrofiche", ovvero una diminuzione progressiva dell'ossigeno

disciolto prima nei sedimenti e successivamente nell'intera colonna d'acqua, che culmina nella maggiore attività dei batteri anaerobi del fondo, i quali liberano grandi quantità di solfuro d'idrogeno, ammoniaca e metano, composti tossici per gli organismi (ARPAV, 2006).

4.2 Contenuto totale di metalli nei sedimenti

Per quanto riguarda la Laguna di Venezia e i livelli di presenza di metalli pesanti nei sedimenti, sono stati scelti alcuni valori limite che possono essere di aiuto per ottenere informazioni assolutamente indicative sulla qualità delle aree analizzate in questo studio. Nello specifico, vista l'assenza di riferimenti normativi più adeguati, si è scelto di fare riferimento alla Legge Speciale per Venezia (Ministero dell'Ambiente, Roma, 1993). Le concentrazioni di metalli pesanti ammissibili nei sedimenti secondo tale protocollo sono riportate in Tabella 5.

Tabella 5 - Criteri di sicurezza ambientale per lo scavo, il trasporto e il riutilizzo dei sedimenti dei canali della Laguna di Venezia; i valori di concentrazione sono espressi in mg/kg di peso secco (Ministero dell'Ambiente, Roma, 1993).

mg/kg d.w.	Classe A	Classe B	Classe C
As	15	25	50
Cd	1	5	20
Cr	20	100	500
Cu	40	50	400
Hg	0.5	2	10
Ni	45	50	150
Pb	45	100	500
Zn	200	400	3000

Il Ministero dell'Ambiente classifica i sedimenti sulla base di tre categorie definite dal Protocollo Ministero Ambiente e Comune di Venezia del 1993, aventi lo scopo di valutare le condizioni di contaminazione. I sedimenti di Classe A sono definiti come i meno contaminati ed è concesso il ricollocamento in acque aperte all'interno della laguna. Il materiale dragato appartenente alla Classe B può essere collocato in laguna con adeguati sistemi di isolamento delle acque (corone e *capping*) costituiti da materiale incontaminato. I sedimenti di Classe C vanno invece confinati all'interno di strutture permanentemente emerse con criteri di elevata impermeabilità .

In Tabella 6 sono riportati i valori di concentrazione (e le relative medie e deviazioni standard percentuali) dei metalli pesanti riscontrati nelle aree campionate nel corso della campagna del 2009.

Tabella 6 – Campagna 2009: valori di concentrazione, medie e deviazioni standard percentuali dei metalli pesanti (in mg/kg d.w. e ug/kg d.w.) riscontrati nei sedimenti delle aree campionate.

sito	mg/kg	M	SD%	mg/kg	M	SD%	mg/kg	M	SD%	mg/kg	M	SD%	mg/kg	M	SD%	ug/kg	M	SD%	mg/kg	M	SD%	mg/kg	M	SD%	ug/kg	M	SD%
A	4,93			19,9			9,67			6,52			83,9			280			15,8			12000			310		
	4,64	4,67	5,4	18,2	19,9	8,2	10,8	10,1	5,8	6,44	6,69	5,5	88,3	88,1	4,7	310	290	6,9	16,6	16,2	2,6	11700	11400	7,0	250	280	14,6
	4,43			21,5			10,0			7,11			92,1			270			16,2			10500			-		
B				51,0			16,3			18,9			109			780			26,0			14200			720		
	8,79	8,79		43,8	45,7	10,0	20,0	17,8	10,9	20,6	20,3	6,3	65,9	92,9	25,4	350	570	37,9	25,9	26,1	0,7	18400	16300	12,9	750	750	3,2
				42,5			17,0			21,4			104			600			26,3			16300			770		
H	11,5			51,4			26,0			24,1			133			220			32,0			27300			250		
	11,5	11,7	1,9	51,7	51,9	1,0	24,7	25,4	2,6	23,0	23,0	4,6	123	128	3,8	190	210	8,2	30,9	32,7	6,9	27400	27400	0,6	180	220	16,5
	11,9			52,5			25,6			22,0			128			220			35,3			27600			220		
MR	3,75			128			52,1			8,69			98,4			160			25,3			22900			240		
	3,39	3,57	5,1	94,7	113	15,0	47,4	51,6	7,9	5,55	7,87	25,9	53,0	91,8	39,1	80,0	120	33,6	16,6	20,4	21,8	16600	20200	16,1	200	220	9,7
	3,56			117			55,5			9,38			124			110			19,5			21100			220		
VL				71,6			30,7			7,06			113			110			23,2			22600			210		
	5,77	5,77		60,3	65,4	8,8	31,8	32,3	5,8	6,43	7,07	9,0	83,6	111	24,0	100	110	4,7	22,8	22,2	6,4	18900	20370	9,6	180	180	12,8
				64,4			34,4			7,71			137			110			20,6			19600			160		
ZI				53,4			24,7			129			1030			967			135			24300			750		
	30,8	30,8		53,4	53,4	0,04	24,8	23,2	11,7	117	123	7,0	970	1000	4,3	876	922	6,9	125	130	5,1	22100	22200	9,5	694	722	5,6
				-			20,1			-			-			-			-			20100			-		

Dai dati riportati in Tabella 6 e dal confronto con i valori soglia riportati nella Tabella 5, si evince che la maggior parte dei metalli presenti nei sedimenti delle stazioni campionate si collocano sempre al di sotto del limite di Classe A. Fanno eccezione le concentrazioni di Cr e Ni: in particolare, in base alla classificazione del Ministero entrambi i metalli Cr e Ni si collocano tra le Classi A e B. Infine, discorso a parte va fatto per il campione della Zona Industriale (ZI), il quale presenta per la maggior parte dei metalli considerati valori al di sopra del limite di Classe B o C, ulteriormente confermando il degrado ambientale dell'area. Il valore di Hg rilevato nell'area B, si è dimostrato essere un picco anomalo e isolato che nelle analisi successive si è visto rientrare nei limiti previsti per legge.

Le deviazioni standard percentuali riportate in Tabella 6 indicano dal punto di vista analitico la buona qualità della procedura seguita per il campionamento e le successive analisi, mentre da un punto di vista ecologico sono indice di una contaminazione abbastanza omogenea all'interno delle aree campionate.

Nella Figura 33 sono riportati gli istogrammi che rappresentano graficamente l'andamento della concentrazione dei metalli pesanti analizzati; è riportata una barra orizzontale ad indicare il valore limite relativo alla Classe A della Legge Speciale per Venezia.

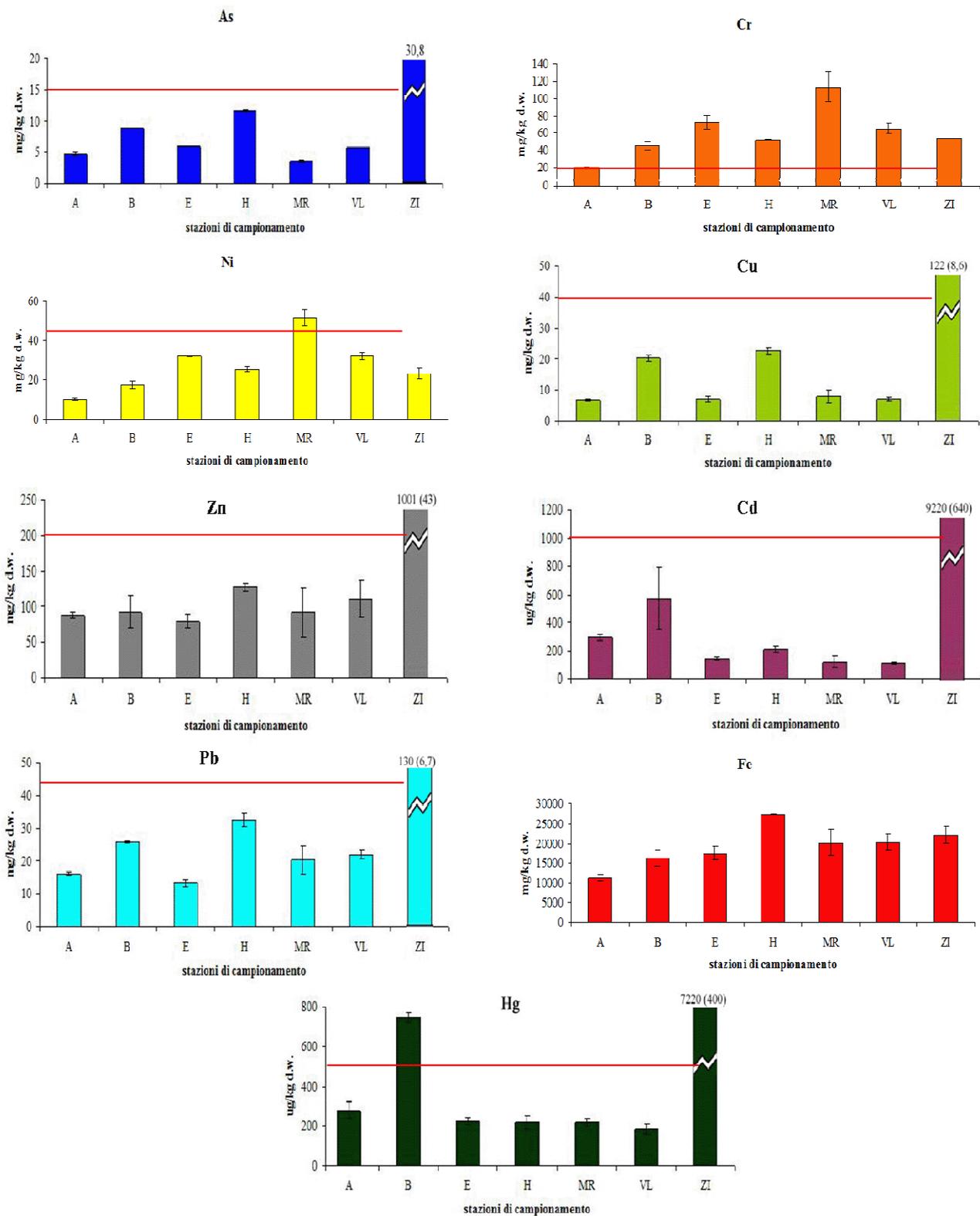


Figura 33 – Campagna 2009: distribuzioni delle concentrazioni medie dei vari metalli misurati nelle stazioni di campionamento: la barra indica il valore di classe A secondo la Legge Speciale per Venezia (Ministero dell’Ambiente, Roma, 1993).

Il T test eseguito confrontando i valori di concentrazione per tutte le stazioni, a coppie tra di loro, ha messo in evidenza svariate differenze significative (riportate schematicamente nella Tabella 7): in generale, si notano differenze a vario livello di significatività per tutti i metalli e tutte le stazioni, in particolare c'è una forte differenza nelle concentrazioni di Cr e Ni tra le aree della Laguna di Venezia e le aree del Delta del Po; molto significativa è in generale la differenza di concentrazione di metalli tra la Zona Industriale e le aree di allevamento indagate. Tale situazione viene confermata graficamente dall'andamento degli istogrammi presentati nella Figura 33. Si può osservare che l'area "migliore" dal punto di vista della contaminazione da metalli pesanti è la stazione A (Busa, Laguna di Venezia centrale).

Tabella 7 – Campagna 2009: livelli di significatività del T test condotto confrontando i valori di concentrazione dei metalli per tutte le stazioni a coppie tra loro; ns = non significativo, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.001$. Le differenze molto significative sono evidenziate in rosso.**

	As	Cr	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Fe	Hg
A - B	**	***	**	***	ns	ns	***	**	***
A - E	ns	***	***	ns	ns	***	*	**	ns
A - H	***	***	***	***	***	**	***	***	ns
A - MR	**	**	***	ns	ns	**	ns	*	ns
A - VL	ns	***	***	ns	ns	***	**	**	*
A - ZI	***	***	**	***	***	***	***	**	**
B - E	-	**	***	***	ns	*	***	ns	***
B - H	**	ns	**	*	ns	*	**	***	***
B - MR	**	**	***	***	ns	*	ns	ns	***
B - VL	-	**	***	***	ns	*	**	ns	***
B - ZI	-	ns	*	***	***	***	***	*	***
E - H	**	**	***	***	**	**	***	***	ns
E - MR	**	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E - VL	-	ns	ns	ns	ns	*	***	ns	ns
E - ZI	-	*	**	***	***	***	***	*	***
H - MR	***	**	***	***	ns	*	*	*	ns
H - VL	**	*	**	***	ns	***	**	**	ns
H - ZI	***	*	ns	***	***	***	***	*	***
MR - VL	**	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MR - ZI	***	*	***	***	***	***	***	ns	***
VL - ZI	-	ns	**	***	***	***	***	ns	***

Per quanto riguarda le analisi condotte sui campioni del 2011, le concentrazioni medie rilevate sono riportate in Tabella 8 e in forma grafica in Figura 34.

Tabella 8 – Campagna 2011: valori di concentrazione medi dei metalli pesanti riscontrati nei sedimenti delle aree campionate.

	As	Cr	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Fe	Hg
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	ug/kg	mg/kg	mg/kg	ug/kg
A	9,32	101	13,2	10,5	79,2	150	14,3	19000	220
B	11,4	131	17,0	15,7	233	240	17,3	20600	410
H	6,03	124	14,2	6,76	47,9	100	7,16	12800	140
MR	9,84	178	42,0	14,8	122	120	17,2	27500	90,0
VL	4,71	147	37,2	8,46	67,7	70,0	13,2	21000	-
SC	9,52	151	62,2	26,9	143	160	24,5	34300	150

Il confronto con le concentrazioni totali medie dei campioni del 2009 indica che tali concentrazioni subiscono in alcuni siti e per alcuni elementi, in particolare Cr e Fe, delle variazioni che, tenendo conto del fatto che i livelli misurati sono relativamente bassi (quasi sempre inferiori al limite di Classe A della tabella ministeriale), rientrano abbondantemente all'interno della normale fisiologia di ecosistemi di transizione fortemente antropizzati, soggetti all'apporto massivo di acque dolci (e di conseguenza di inquinanti) di corsi d'acqua importanti (tipo il fiume Po nel caso del Delta) e all'idrodinamismo dello scambio mareale alle bocche di porto, che sicuramente sarà stato influenzato dagli interventi effettuati recentemente per la realizzazione del MoSE.

Tale andamento è confermato graficamente dagli istogrammi in Figura 35, riportanti il confronto tra le due serie temporali per ogni area indagata.

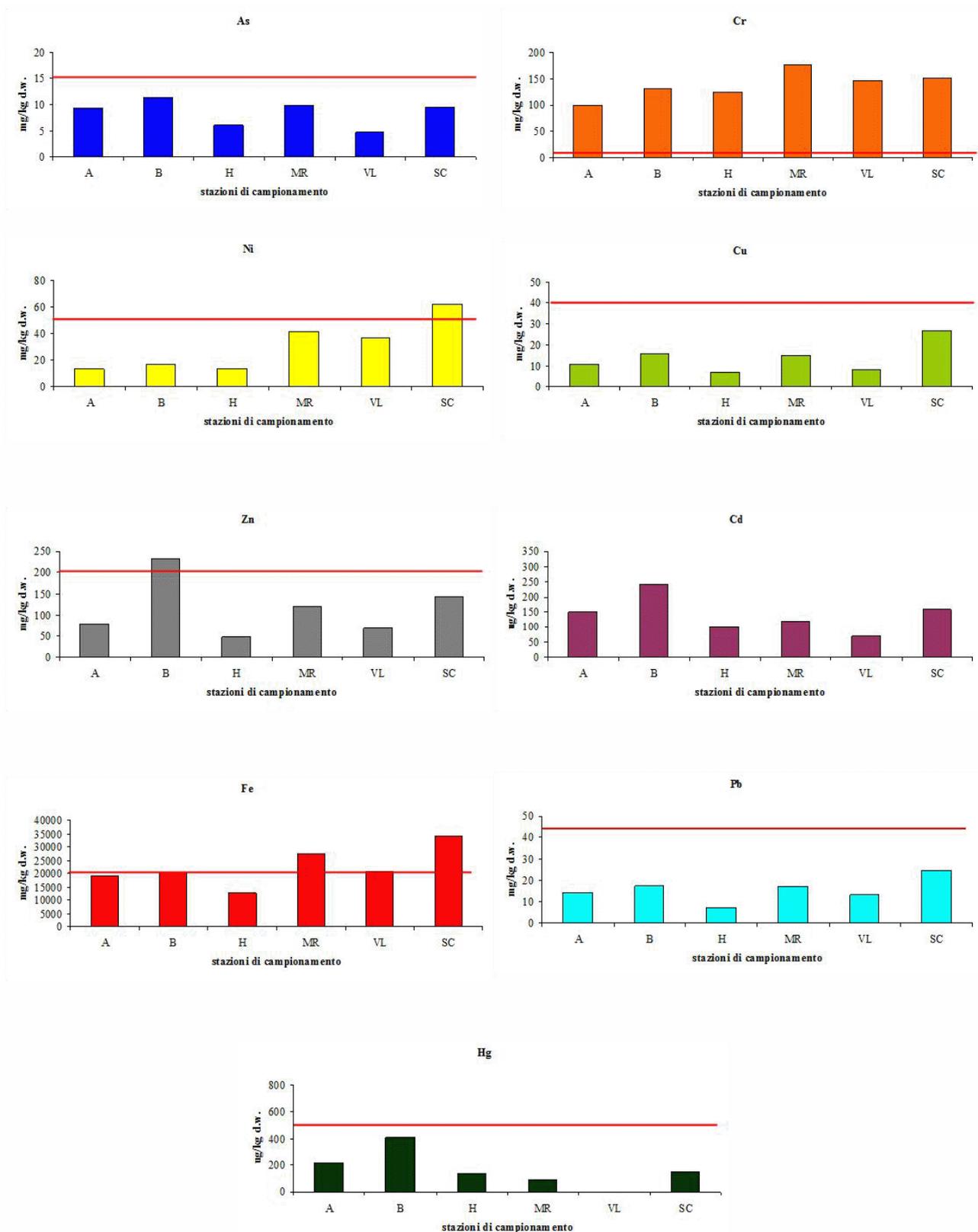


Figura 34 – Campagna 2011: distribuzione delle concentrazioni medie dei vari metalli misurati nelle stazioni di campionamento.

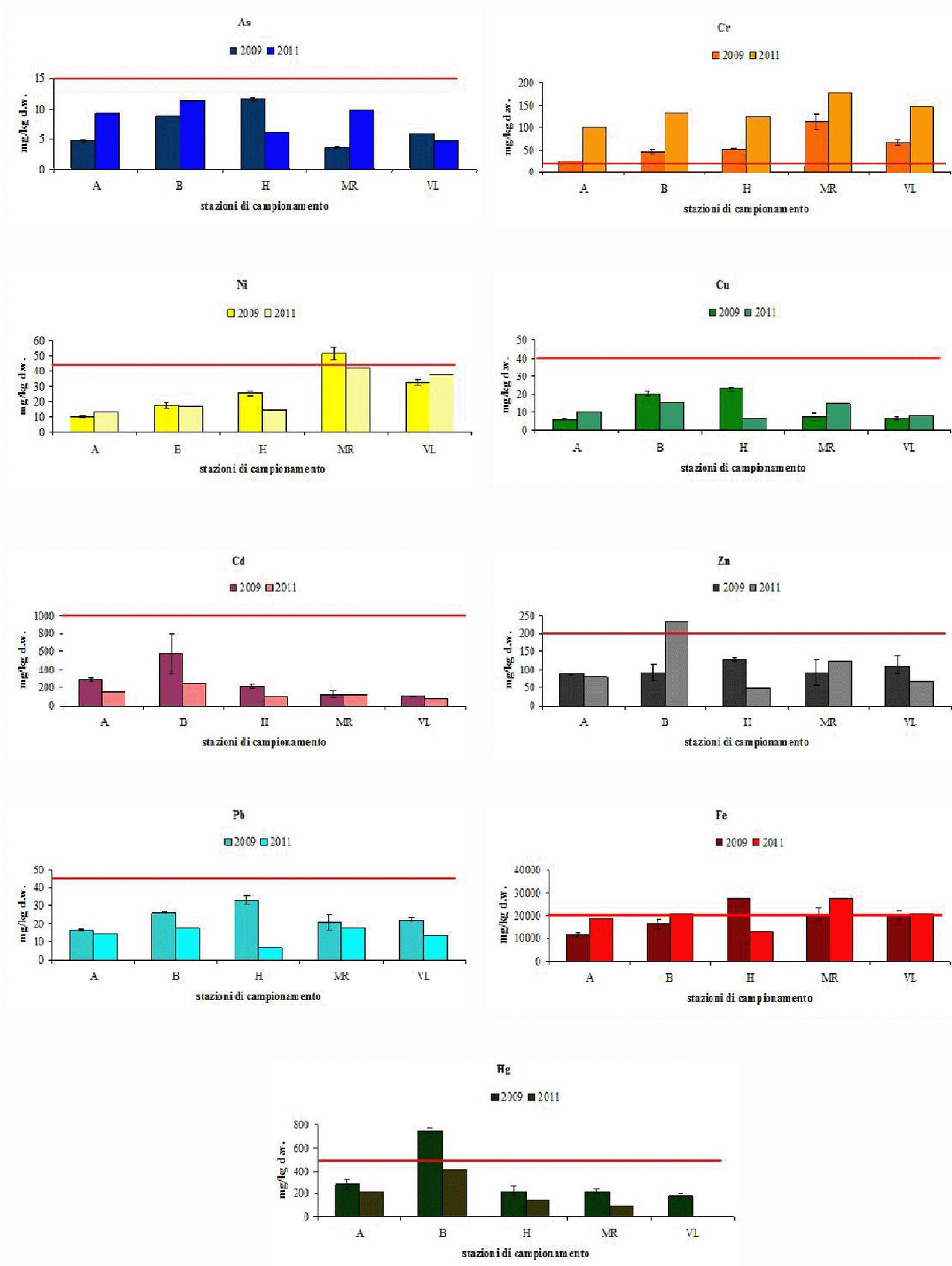


Figura 35 – Confronto tra le distribuzioni medie dei vari metalli misurati nelle aree di campionamento nelle annate 2009 e 2011

In generale, come già ripetutamente osservato, le concentrazioni dei metalli considerati nelle varie stazioni sono quasi sempre al di sotto dei limiti legislativi di riferimento della Classe A. Gli unici elementi che superano tali limiti sono Cr e Ni: nello specifico, il Cr supera il limite nei campioni del 2009 per tutte le aree a parte la stazione A e in tutte le aree senza eccezioni in quelli del 2011. La concentrazione di Ni è superiore al limite nella stazione MR (campionamento 2009) e nella stazione SC (campionamento 2011).

Per quanto riguarda il Delta del Po, è largamente riconosciuto che la concentrazione totale di un elemento nell'ambiente naturale superficiale può variare anche di un ordine di grandezza (Tarvainen & Kallio, 2002) in relazione alle diverse proprietà geologiche dei sedimenti e delle relative rocce di origine; in particolare, studi mineralogici e geochimici condotti nella pianura del Po (Amorosi *et al.*, 2002; Vignati *et al.*, 2003; Amorosi & Sammartino, 2007), hanno dimostrato che i livelli di concentrazione di Cr e Ni nei sedimenti dell'area sono sistematicamente più alti della maggior parte delle linee guida sulla qualità dei sedimenti che si trovano in letteratura. Gli alti valori di concentrazione di Cr e Ni riscontrati riflettono quindi le caratteristiche geochimiche del bacino scolante del fiume Po, e rappresentano perciò un livello di background non del tutto collegato all'influenza antropica (Amorosi & Sammartino, 2007).

Nello specifico della Laguna di Venezia, risulta evidente che tale andamento apparentemente caotico nella distribuzione degli inquinanti considerati possa aver risentito delle alterazioni e dei cambiamenti che ha subito l'idrodinamica della Laguna (soprattutto nel bacino di Chioggia e nella zona Nord) a seguito del completamento dei lavori del progetto di costruzione di barriere mobili artificiali (MoSE): in particolare, si è verificata una progressiva alterazione della batimetria delle tre bocche di porto, che a sua volta ha portato ad una modificazione delle interazioni laguna-mare, dell'idrodinamismo locale attorno alle bocche e della circolazione generale nel bacino lagunare; tutto ciò ha certamente influito sulla risospensione dei sedimenti e sulla qualità complessiva dell'ambiente lagunare (Ghezzi *et al.*, 2010).

Più in generale, un altro importante parametro da considerare riguarda gli effetti che hanno le attività di ripascimento e di mantenimento dei canali tramite attività di dragaggio sulle proprietà dei sedimenti e sulla loro contaminazione e tossicità: il dragaggio è una pratica comune nelle aree costiere del Nord Adriatico, utile per prevenire fenomeni di siltazione e per mantenere stabili le caratteristiche idrodinamiche dei sistemi lagunari (Guerra *et al.*, 2009), ma non solo: in tutto il mondo, la gestione delle acque e della "funzione nautica" delle acque superficiali sono minacciate dalla naturale deposizione dei sedimenti (Mamindy-Pajani *et al.*, 2010). A seconda della natura dei

contaminanti e delle condizioni ambientali, possono infatti verificarsi due fenomeni contrastanti durante queste attività: il contaminante può essere rimosso dalla colonna d'acqua per finire depositato nei sedimenti (che agiscono quindi come substrato di raccolta), oppure può distribuirsi in acqua per effetto di risospensione (e quindi il sedimento agirebbe da sorgente). Il dragaggio di sedimenti contaminati modifica grandemente le loro proprietà biochimiche e chimico-fisiche, e cambiamenti, anche di lieve entità, di pH o di potenziale redox in queste condizioni potrebbero indurre rapidi cambiamenti anche nella mobilità e biodisponibilità dei metalli. Rimobilizzazione e/o rilascio di metalli legati ai sedimenti all'interfaccia con la colonna d'acqua possono a loro volta portare ad effetti negativi anche sugli organismi (Caplat *et al.*, 2005; Spencer *et al.*, 2006; Nieto *et al.*, 2007; Wauhob *et al.*, 2007; Bocchetti *et al.*, 2008).

I picchi di contaminazione riscontrati in Laguna di Venezia relativamente a metalli quali Cr, Ni, Fe, Pb e Zn (elementi caratterizzati da un'alta persistenza nell'ambiente) sono certamente dovuti ad effetti di rimobilizzazione del sedimento in seguito all'intervento antropico, ma non va dimenticato che si tratta di metalli le cui variazioni di concentrazione, storicamente, sono sempre state legate alla lavorazione industriale di Porto Marghera, all'industria vetraria di Murano, e, particolarmente il Pb, al traffico veicolare natante.

4.3 Contenuto di metalli negli organismi

Al fine di valutare il reale ed effettivo bioaccumulo di metalli negli organismi non è sufficiente considerare esclusivamente la concentrazione di inquinanti nel totale dei tessuti: è fondamentale tenere conto anche della distribuzione di tali inquinanti tra i vari organi; in *R. philippinarum*, e nei Molluschi Bivalvi in genere, la ghiandola digestiva, o epatopancreas, ha un ruolo fondamentale nella gestione metabolica degli inquinanti sul breve periodo, agendo da primo e principale organo detossificante. Per questo motivo si è scelto di valutare separatamente il contenuto dei metalli presenti nella ghiandola digestiva e quello dei metalli presenti nei tessuti molli restanti, ricavando dalla somma dei due i metalli totali presenti nell'intero organismo.

In Tabella 9 sono riportati i valori di concentrazione media e le relative deviazioni standard percentuali dei metalli pesanti riscontrati negli organismi delle aree campionate nel corso del 2009.

Generalmente, l'andamento delle concentrazioni dei metalli negli organismi rispecchia quello delle concentrazioni totali nel sedimento (Tabella 6, Figura 33) ad eccezione del Cr e del Ni. Infatti, il Cr nell'organismo varia da un minimo di 1.39 mg/kg della stazione A (Laguna di Venezia, Busa) ad un massimo di 3.66 mg/kg della stazione MR (Delta del Po, laguna di Marinetta), mentre il Ni (sempre valutato nei tessuti totali) varia da un minimo di 5.54 mg/kg della stazione A ad un massimo di 16.6 mg/kg nella stazione MR. Da questo si evince che malgrado la concentrazione di Cr totale nei sedimenti vari da un minimo di 19.9 mg/kg (stazione A) ad un massimo di 113 mg/kg (stazione MR), la concentrazione dell'elemento nelle vongole varia circa del doppio, a dimostrazione che non c'è una relazione diretta tra la concentrazione di Cr nel sedimento e quella nelle vongole. Questo risultato è confermato dalle analisi di speciazione geochimica che hanno dimostrato che una parte predominante (anche fino al 90%) del Cr si trova nella fase residuale, cioè in forma non biodisponibile in tutte le aree testate (si veda il paragrafo 4.4).

Il T test eseguito confrontando i valori di concentrazione per tutte le stazioni a coppie tra di loro, ha messo in evidenza svariate differenze significative (riportate schematicamente nella Tabella 10): in generale, le differenze più significative si riscontrano tra le stazioni della Laguna di Venezia e le stazioni sul Delta del Po, e all'interno dell'area lagunare, soprattutto tra la stazione posizionata a nord (B) e quelle localizzate più a sud (E, H).

Tale andamento è confermato graficamente dagli istogrammi riportati in Figura 36.

Se si va a considerare la ripartizione dei metalli tra i tessuti, sia nei campioni non stabulati del 2009 che in quelli non stabulati del 2011 (Figure 36 e 37) si può osservare come nella maggior parte dei casi non ci sia una differenza significativa tra la concentrazione di metalli nei tessuti extraghiandolari e quella nella ghiandola digestiva. L'eccezione è rappresentata da Cu (che nella ghiandola mostra una concentrazione più elevata rispetto ai restanti tessuti) e Cd (la cui concentrazione nella ghiandola è più bassa rispetto al resto dei tessuti). La più alta concentrazione di Cu nell'epatopancreas si spiega considerando che il Cu è un metallo essenziale, cofattore di molti enzimi, e tenendo presente l'importante ruolo metabolico della ghiandola nella fisiologia di questi organismi.

Tabella 9 – Campagna 2009: valori di concentrazione media in mg/kg d.w. e ug/kg d.w. (con deviazione standard percentuale) dei metalli pesanti riscontrati negli organismi delle aree campionate: TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli privi di ghiandola digestiva, EPT = ghiandola digestiva o epatopancreas.

sito	metallo	As		Cr		Ni		Cu		Zn		Cd		Pb		Fe		Hg	
	tessuto	mg/kg	SD%	ug/kg	SD%	mg/kg	SD%	mg/kg	SD%	ug/kg	SD%								
A	TOT	10,1	-	1,39	-	5,54	-	7,83	-	87,4	-	130	-	0,89	-	294	-	290	-
	ST	12,1	1,1	1,59	12,6	6,89	44,2	8,78	21,9	106	12,4	180	10,2	1,12	15,8	368	8,9	360	24,9
	EPT	13,3	3,7	2,33	12,9	5,04	8,7	14,7	28,8	104	20,3	20,0	43,4	0,73	44,4	244	21,1	260	0,6
B	TOT	15,2	-	2,13	-	10,0	-	5,70	-	88,4	-	250	-	1,18	-	416	-	240	-
	ST	18,5	18,9	2,50	27,1	12,6	13,8	6,26	14,8	110	18,6	330	10,9	1,48	3,2	530	15,9	280	4,1
	EPT	16,4	17,6	2,84	41,4	7,62	24,6	10,6	23,7	81,1	10,8	60,0	31,6	0,98	23,7	286	24,7	330	10,4
E	TOT	14,5	-	2,30	-	7,42	-	4,81	-	76,6	-	140	-	0,89	-	489	-	220	-
	ST	17,0	13,2	2,72	23,2	9,20	21,4	4,46	3,1	92,0	6,8	190	28,2	1,10	77,9	575	26,8	260	1,8
	EPT	19,1	7,9	2,88	11,2	6,70	3,9	13,2	3,3	86,7	13,1	50,0	30,6	0,79	23,4	622	19,2	280	18,7
H	TOT	10,4	-	2,03	-	9,48	-	5,62	-	71,0	-	220	-	1,01	-	581	-	230	-
	ST	12,3	13,3	2,26	11,7	11,5	9,9	5,25	10,3	84,3	4,7	300	5,0	1,21	4,7	727	13,4	260	1,5
	EPT	12,4	4,1	3,00	71,0	9,43	6,0	13,1	13,0	80,2	3,3	50,0	6,9	1,06	20,4	484	23,0	360	21,4
MR	TOT	8,57	-	3,66	-	16,6	-	5,66	-	117	-	180	-	1,59	-	694	-	240	-
	ST	10,1	8,0	4,63	16,0	21,6	5,7	5,69	3,8	144	12,7	200	11,1	2,03	35,8	884	5,1	270	2,9
	EPT	10,9	6,5	2,74	54,9	9,06	7,7	12,8	8,8	113	17,6	260	0,0	1,09	41,6	492	10,8	360	19,9
VL	TOT	8,42	-	3,46	-	12,9	-	6,08	-	89,5	-	140	-	1,27	-	757	-	220	-
	ST	9,88	16,4	4,34	7,3	16,4	23,1	5,50	14,9	108	6,1	190	14,0	1,57	12,4	955	13,5	260	1,2
	EPT	10,5	4,7	2,87	21,6	10,0	17,0	16,2	15,2	94,5	15,6	50,0	16,3	1,14	12,8	594	2,1	280	22,6
SC	TOT	7,25	-	1,87	-	12,8	-	5,36	-	73,7	-	180	-	0,69	-	332	-	210	-
	ST	8,46	3,2	2,32	27,8	16,6	19,3	5,46	1,6	90,5	6,9	250	18,9	0,86	15,4	423	36,7	250	1,5
	EPT	9,54	0,1	1,64	47,3	7,46	0,8	11,6	5,9	71,0	11,8	30,0	6,0	0,61	13,5	238	49,0	270	3,8

Tabella 10 – Campagna 2009: livelli di significatività del T test condotto confrontando i valori di concentrazione dei metalli nei vari tessuti degli organismi per tutte le stazioni a coppie tra di loro: ns = non significativo, * = p < 0.05, ** = p < 0.01, * = p < 0.001. Le differenze molto significative sono evidenziate in rosso.**

	As		Cr		Ni		Cu		Zn		Cd		Pb		Fe		Hg	
	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT
A - B	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	*	ns	*	ns	ns	*
A - E	*	**	*	ns	ns	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns
A - H	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	*	ns	ns
A - MR	*	**	**	ns	**	**	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	***	**	ns	ns
A - VL	ns	**	***	ns	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	**	***	ns	ns
A - SC	***	**	ns	ns	*	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B - E	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	*	ns
B - H	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns							
B - MR	*	*	*	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	**	*	ns	ns
B - VL	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	**	**	*	ns
B - SC	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	**	ns
E - H	ns	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E - MR	**	**	*	ns	***	**	**	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
E - VL	*	***	*	ns	*	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
E - SC	**	**	ns	ns	*	*	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns
H - MR	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
H - VL	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
H - SC	ns	**	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MR - VL	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns							
MR - SC	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	**	ns
VL - SC	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	**	*	*	*	**	ns

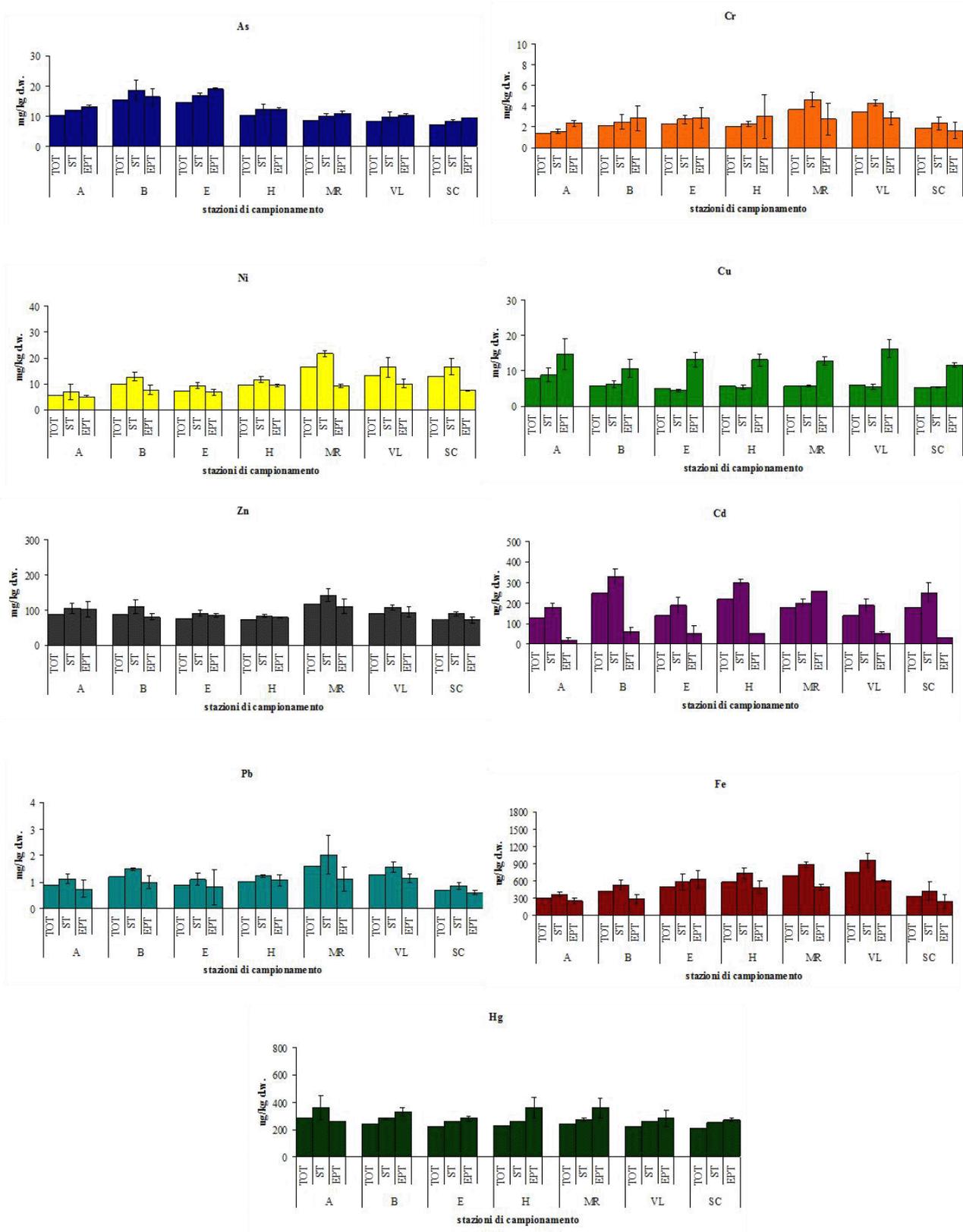


Figura 36 – Campagna 2009: concentrazione media dei vari metalli analizzati negli organismi e loro distribuzione nei diversi tessuti: TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli privi di ghiandola, EPT = epatopancreas o ghiandola digestiva.

Per quanto riguarda i campioni del 2011, è stato possibile sottoporli a spurgo in impianto industriale, al fine di poter valutare la qualità di un prodotto il più possibile simile a quello immesso sul mercato.

In Tabella 11 sono riportati i valori di concentrazione media dei metalli pesanti riscontrati negli organismi delle aree campionate sul Delta del Po tra Giugno e Luglio 2011; nella tabella seguente (Tabella 12), sono invece riportati i valori di concentrazione media per quanto riguarda le aree in Laguna di Venezia.

In Figura 37 sono rappresentati gli stessi dati in forma di istogrammi. Come si può notare proprio dai grafici relativi alle stazioni sul Delta del Po, e come supportato dall'analisi statistica (T test), non ci sono particolari differenze tra uno spurgo di 24 ore e uno di 48; per le stazioni in Laguna di Venezia è stato quindi considerato solo il dato di concentrazione relativo allo spurgo di 48 ore, essendo maggiormente assicurato in questo modo il raggiungimento dell'equilibrio chimico all'interno dell'organismo, avvalorato dal tempo necessario per il raggiungimento della stabilizzazione della componente microbiologica (in tale periodo di tempo la vongola si considera depurata in maniera esaustiva).

Tabella 11 – Campagna 2011: valori di concentrazione media (con deviazione standard percentuale) dei metalli pesanti riscontrati negli organismi delle aree campionate sul Delta del Po: TOT = tessuti in toto, ST = tessuti molli privi di ghiandola digestiva, EPT = ghiandola digestiva o epatopancreas; NS = organismi non spurgati, 24h = organismi spurgati 24h, 48h = organismi spurgati 48

		As						Cr						Ni						Cu					
		NS		24h		48h		NS		24h		48h		NS		24h		48h		NS		24h		48h	
staz.	tessuto	mg/kg	SD%																						
MR	TOT	19,7	-	14,9	-	16,4	-	6,23	-	1,96	-	2,03	-	24,6	-	15,2	-	13,9	-	12,9	-	9,89	-	9,43	-
	ST	22,2	5,0	16,5	8,9	18,9	8,6	7,82	32,4	2,10	14,9	2,19	5,7	30,7	15,3	18,0	3,1	16,7	14,7	11,9	10,0	9,01	7,5	9,28	7,4
	EPT	31,1	8,4	20,8	3,9	21,7	7,1	5,05	17,4	2,99	6,5	3,39	8,7	21,1	7,2	16,6	6,4	15,2	18,6	34,7	8,4	21,09	5,7	20,1	7,3
VL	TOT	17,8	-	16,9	-	16,4	-	6,26	-	2,92	-	2,61	-	19,7	-	15,3	-	16,0	-	10,6	-	9,81	-	9,10	-
	ST	20,5	23,9	15,4	4,9	20,4	18,5	7,37	20,3	3,65	1,4	3,27	13,8	23,7	30,7	19,6	9,3	20,9	14,9	10,2	22,4	10,3	3,5	9,90	4,3
	EPT	24,1	10,9	16,8	42,2	14,4	10,8	7,67	18,6	2,43	20,0	2,18	13,9	21,0	12,1	10,9	35,8	10,0	28,8	24,8	15,5	17,7	42,3	13,5	18,8
SC	TOT	20,5	-	13,8	-	14,2	-	5,39	-	2,23	-	2,17	-	18,3	-	14,7	-	13,4	-	12,1	-	9,33	-	8,60	-
	ST	22,9	16,7	20,6	4,0	16,0	6,4	6,55	14,1	2,48	25,7	2,54	25,0	22,2	7,5	17,6	12,7	16,1	17,9	11,2	12,7	8,12	2,3	8,20	6,8
	EPT	31,0	15,2	17,3	3,6	19,6	2,3	5,47	22,7	2,82	7,9	2,60	5,8	18,6	8,6	14,7	1,7	14,0	6,8	29,6	11,4	18,8	9,4	18,4	4,0
		Zn				Cd				Pb				Fe											
		NS		24h		48h		NS		24h		48h		NS		24h		48h		NS		24h		48h	
staz.	tessuto	mg/kg	SD%	mg/kg	SD%	mg/kg	SD%	ug/kg	SD%	ug/kg	SD%	ug/kg	SD%	mg/kg	SD%										
MR	TOT	174	-	186	-	181	-	359	-	288	-	346	-	1,95	-	0,61	-	1,00	-	2305	-	378	-	508	-
	ST	209	1,5	215	12,5	213	17,0	460	15,2	370	13,5	450	15,6	2,41	18,5	0,75	15,2	1,28	12,1	2960	36,5	423	10,0	591	20,2
	EPT	197	3,5	222	5,1	213	4,6	260	3,8	210	0,0	210	14,3	1,80	26,3	0,57	11,2	0,67	33,3	1470	21,5	509	11,6	642	8,2
VL	TOT	152	-	189	-	179	-	300	-	346	-	313	-	2,10	-	0,69	-	0,67	-	2200	-	420	-	384	-
	ST	187	28,0	235	3,4	228	4,9	370	24,3	440	11,4	420	14,3	2,32	22,0	0,86	9,1	0,87	12,5	2580	22,5	504	12,9	471	9,4
	EPT	147	5,7	167	46,5	134	23,6	270	33,3	280	32,1	150	13,3	3,41	10,9	0,63	7,9	0,41	16,9	2750	22,4	455	52,9	361	10,1
SC	TOT	154	-	169	-	178	-	322	-	283	-	267	-	1,79	-	0,64	-	0,58	-	1890	-	385	-	340	-
	ST	181	9,2	194	2,6	210	14,9	410	12,2	360	8,3	350	2,9	2,16	14,8	0,72	19,3	0,69	20,8	2350	12,6	416	6,4	386	9,8
	EPT	186	3,2	193	2,2	205	4,4	240	16,7	200	40,0	170	5,9	1,86	18,3	0,76	27,9	0,66	17,9	1670	30,9	524	7,6	455	3,9
		Hg																							
		NS		24h		48h																			
staz.	tessuto	mg/kg	SD%	mg/kg	SD%	mg/kg	SD%																		
MR	TOT	0,86	-	0,86	-	0,83	-																		
	ST	1,01	4,0	0,99	0,0	0,98	0,6																		
	EPT	1,07	4,7	1,03	1,6	1,00	2,1																		
VL	TOT	1,09	-	0,88	-	0,91	-																		
	ST	1,39	14,4	1,09	2,0	1,04	3,7																		
	EPT	0,76	6,6	0,80	0,0	1,13	10,8																		
SC	TOT	0,82	-	0,84	-	0,82	-																		
	ST	0,98	1,0	0,97	0,8	0,97	0,9																		
	EPT	0,93	1,1	0,97	1,9	0,98	4,2																		

Tabella 12 – Campagna 2011: valori di concentrazione media (con deviazione standard percentuale) dei metalli pesanti riscontrati negli organismi delle aree campionate in Laguna di Venezia: TOT = tessuti in toto, ST = tessuti molli privi di ghiandola digestiva, EPT = ghiandola digestiva o epatopancreas; NS = organismi non spurgati, 24h = organismi spurgati 24h, 48h = organismi spurgati 48h.

		As				Cr				Ni				Cu				Zn				Cd			
		NS		48h		NS		48h		NS		48h		NS		48h		NS		48h		NS		48h	
staz.	tessuto	mg/kg	SD%	ug/kg	SD%	ug/kg	SD%																		
A	TOT	19,2	-	18,9	-	2,70	-	1,80	-	11,5	-	5,90	-	20,0	-	15,0	-	243	-	208	-	422	-	380	-
	ST	21,3	3,5	21,2	7,9	3,15	1,3	2,07	17,8	13,0	5,6	6,85	4,5	16,9	7,3	13,5	3,2	303	23,0	260	7,0	540	16,7	490	8,2
	EPT	28,2	12,9	32,1	3,7	3,30	21,6	2,71	25,5	16,0	26,8	8,57	2,7	53,4	4,6	47,7	11,0	208	7,8	183	10,5	290	13,8	220	4,5
B	TOT	40,5	-	36,8	-	3,73	-	2,03	-	20,0	-	15,5	-	14,9	-	14,3	-	141	-	98,2	-	606	-	510	-
	ST	43,9	3,8	41,5	10,0	4,34	7,9	2,26	7,5	23,9	4,9	19,2	14,4	11,2	6,9	10,5	3,9	168	34,3	114	7,3	800	12,5	670	6,0
	EPT	69,7	1,5	56,9	11,2	4,83	18,0	3,25	3,8	22,6	9,8	14,5	36,2	51,4	10,8	54,4	23,4	162	2,6	131	12,8	310	12,9	240	29,2
H	TOT	18,9	-	17,5	-	2,49	-	1,46	-	15,5	-	8,39	-	9,82	-	11,2	-	125	-	101	-	231	-	240	-
	ST	20,4	13,0	17,8	21,1	2,86	9,2	1,48	8,4	18,1	13,4	9,22	10,8	7,70	1,8	7,91	12,8	146	3,8	118	20,5	300	13,3	310	25,8
	EPT	37,1	9,2	40,1	4,5	3,77	22,2	3,32	22,2	20,8	1,6	14,9	9,6	38,1	13,1	47,6	12,2	167	6,3	131	3,0	140	21,4	120	25,0
		NS		48h		NS		48h		NS		48h													
staz.	tessuto	mg/kg	SD%																						
A	TOT	1,48	-	0,42	-	1320	-	365	-	1,02	-	0,92	-												
	ST	1,69	1,0	0,48	17,3	1540	2,8	397	10,8	1,28	9,7	1,15	2,6												
	EPT	2,00	28,8	0,62	4,3	1620	42,4	706	9,5	0,85	0,2	0,83	1,4												
B	TOT	1,79	-	0,46	-	1930	-	694	-	0,96	-	0,94	-												
	ST	1,96	6,7	0,51	21,5	2340	11,4	777	10,9	1,19	1,0	1,14	2,5												
	EPT	2,97	10,5	0,78	45,1	2010	1,5	1110	30,0	0,90	2,8	1,00	15,5												
H	TOT	0,95	-	0,28	-	1200	-	329	-	0,92	-	0,89	-												
	ST	1,16	16,3	0,30	63,2	1480	16,1	326	23,8	1,10	0,9	1,09	0,0												
	EPT	1,04	36,5	0,56	9,0	1100	13,4	804	1,5	1,13	20,5	0,91	18,6												

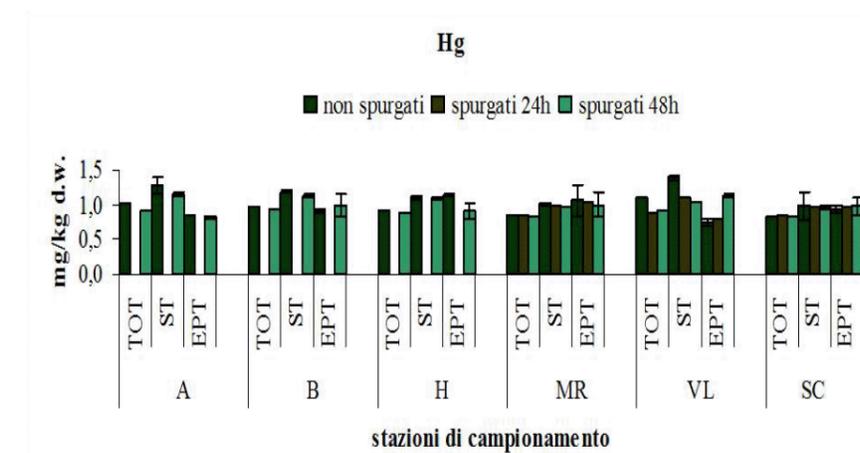
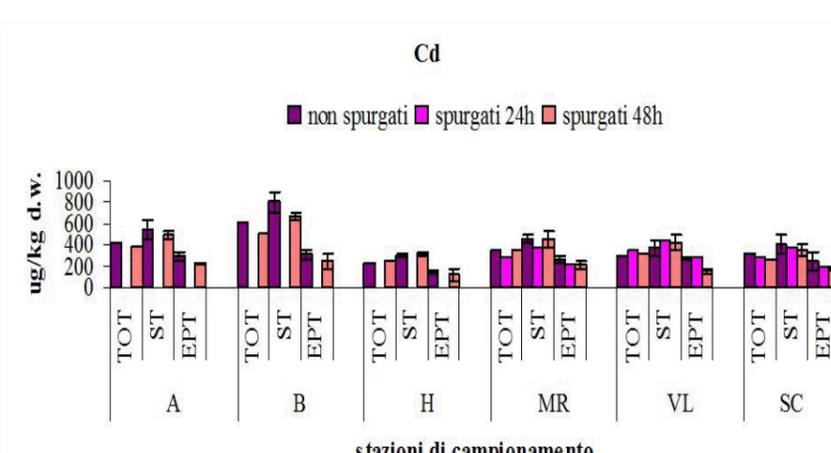
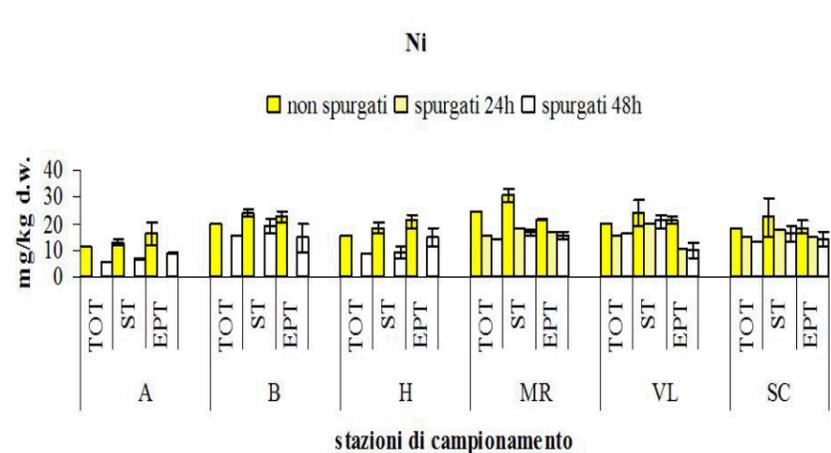
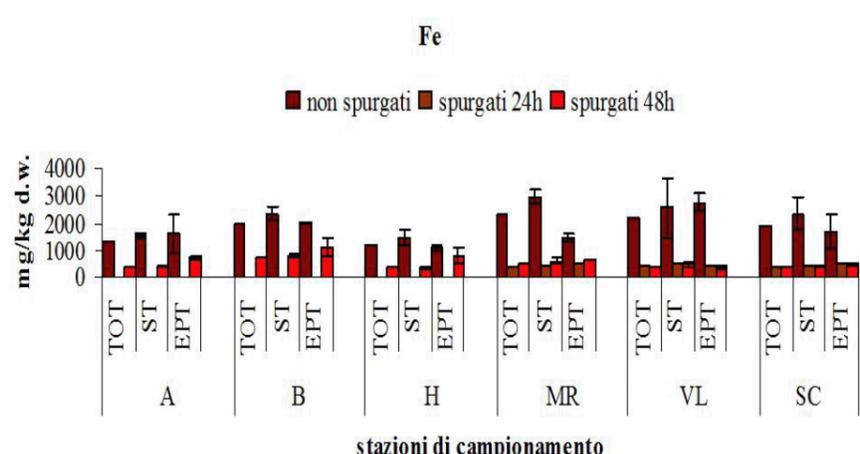
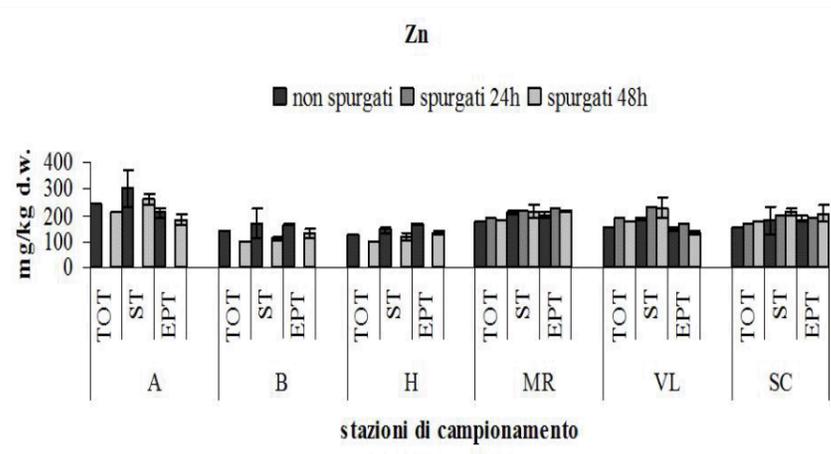
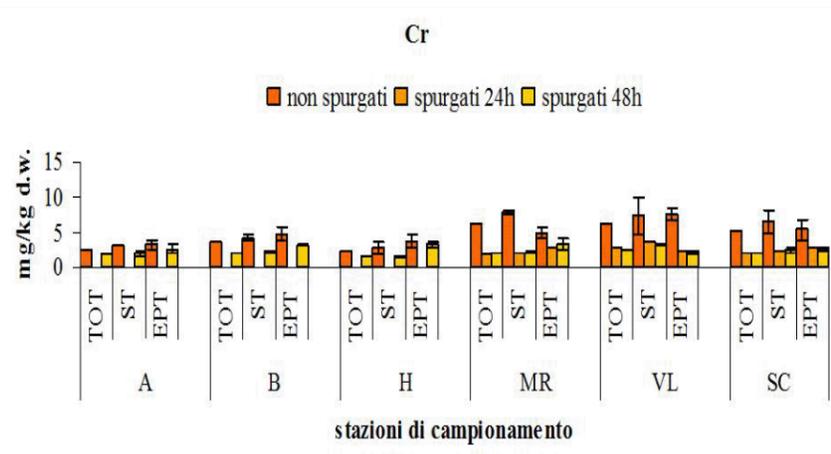
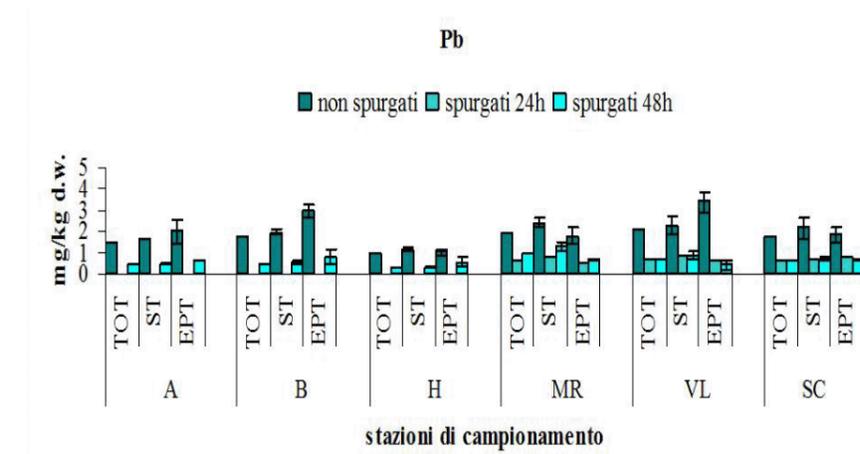
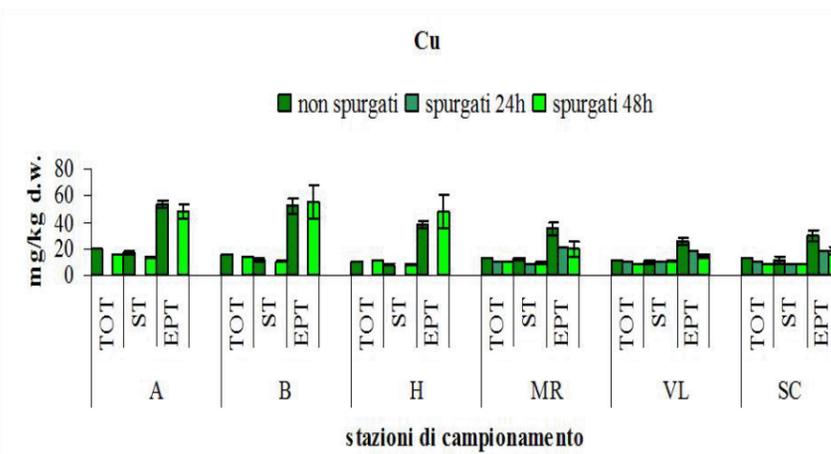
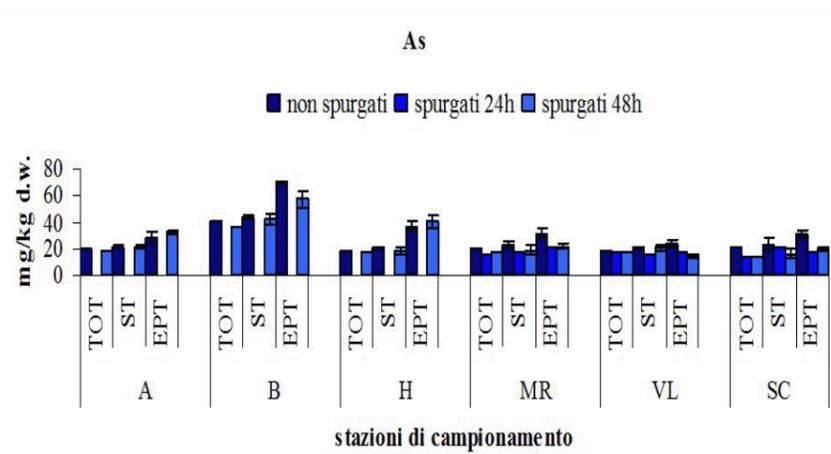


Figura 37 - Campagna 2011: concentrazione media dei vari metalli analizzati negli organismi e loro ripartizione nei diversi tessuti: TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli privi di ghiandola, EPT = epatopancreas o ghiandola digestiva. Confronto tra campioni non spurgati, spurgati 24 ore e spurgati 48 ore.

In Laguna ogni metallo mostra un comportamento differente, tuttavia si può osservare che alcuni dei metalli più tossici, come ad esempio As, Cd e Hg (Figura 37), non sembrano risentire dell'effetto dello spurgo, mantenendo pressoché invariate le loro concentrazioni, sia nei tessuti molli che nella ghiandola (il T test non ha evidenziato differenze significative dal punto di vista statistico). Questo dato si spiega se si prende in considerazione il legame che questi metalli, una volta metabolizzati, hanno con le strutture biologiche nei vari comparti cellulari: in particolare, per metalli come Pb, Fe e Cr (Figura 37) si ha una consistente riduzione (circa 50%) delle loro concentrazioni all'interno dei tessuti degli organismi. Tale riduzione è attribuibile alla presenza all'interno dei tessuti molli di una importante frazione di metallo (circa il 50%, probabilmente associata alla frazione residuale del sedimento ingerito) che l'organismo non riuscendo a metabolizzare espelle direttamente insieme al contenuto stomacale durante lo spurgo; lo stesso discorso non vale invece per i sopracitati As, Cd e Hg, che per quanto presenti in basse concentrazioni, rimangono più facilmente adsorbiti alle strutture cellulari diventando parte integrante dell'organismo.

Per le stazioni sul Delta del Po si può osservare come la concentrazione di Cr e Ni (presenti in alte concentrazioni nei sedimenti) vari con un rapporto molto minore rispetto alla variazione della loro concentrazione nei sedimenti, confermando così la loro scarsa biodisponibilità (si veda in proposito il paragrafo 4.4, Figure 41-44). Osservando i valori di concentrazione, si nota che As, Zn e Cu presentano concentrazioni minori in queste aree, mentre la concentrazione di Pb è comparabile con quella riscontrata negli organismi della Laguna di Venezia.

In generale, As, Zn e Cu mostrano concentrazioni interessanti, maggiori o equiparabili, in quantità assoluta, nell'epatopancreas rispetto ai tessuti molli extraghiandolari, avvalorando l'ipotesi di una contaminazione recente.

Il T test condotto confrontando i valori di concentrazione per tutte le stazioni a coppie tra di loro (sia per i campioni spurgati 48 ore che per i campioni non spurgati), è riassunto schematicamente nelle Tabelle 13 e 14. Emergono svariate differenze a vario livello di significatività, ma si può osservare che è confermato il trend osservato per i campioni raccolti nel 2009, sia per i campioni non spurgati che per i campioni spurgati 48 ore: anche se i livelli di significatività variano molto da metallo a metallo, in generale le maggiori differenze sono identificabili tra le aree della Laguna di Venezia (A, B, E, H) e le aree del Delta del Po (MR, VL, SC), e in misura minore tra le zone in Laguna centro-nord (B, A) e quelle in Laguna sud (E, H), senza particolari differenze per quanto riguarda il livello di significatività considerato tra i vari tessuti.

Tabella 13 – Campagna 2011: livelli di significatività del T test condotto confrontando i valori di concentrazione dei metalli nei vari tessuti degli organismi per tutte le stazioni a coppie tra loro (campioni non spurgati): ns = non significativo, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Le differenze molto significative sono evidenziate in rosso.

	As		Cr		Ni		Cu		Zn		Cd		Pb		Fe		Hg		
	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	
A - B	***	***	**	ns	***	ns	**	ns	ns	**	*	ns	*	ns	**	ns	ns	ns	*
A - E	***	*	ns	ns	ns	ns	***	***	*	**	**	**	***	*	ns	ns	ns	ns	**
A - H	ns	*	ns	ns	*	ns	***	**	*	*	*	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A - MR	ns	ns	*	ns	**	ns	**	**	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	**
A - VL	ns	ns	**	**	ns	ns	*	***	ns	**	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
A - SC	ns	ns	**	ns	***	ns	**	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	***	***
B - E	***	***	ns	ns	**	**	*	**	ns	**	***	**	***	***	**	***	**	***	**
B - H	***	***	**	ns	*	ns	**	*	ns	ns	**	**	**	**	*	***	***	***	ns
B - MR	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	**	**	ns	ns	*	ns	*	**	**	**
B - VL	**	***	*	*	ns	ns	ns	**	ns	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
B - SC	***	***	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	**	**	ns	ns	*	ns	ns	***	ns	ns
E - H	**	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	ns	*	ns	ns	**	ns	ns	*	ns	ns	ns
E - MR	***	*	ns	ns	**	**	*	ns	***	***	**	***	**	*	ns	*	*	**	**
E - VL	*	**	*	*	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	***	*	**	ns	ns	ns
E - SC	ns	ns	*	ns	**	**	ns	ns	*	***	**	*	***	**	**	*	**	**	***
H - MR	ns	ns	*	ns	*	ns	**	ns	***	*	*	**	*	ns	ns	ns	ns	*	ns
H - VL	ns	**	**	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	**	*	*	ns	ns	ns
H - SC	ns	ns	**	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	*	*	**	*	*	ns	***	ns	ns
MR - VL	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	**	ns	ns	ns	**	ns	*	*	**	**
MR - SC	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
VL - SC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	**	**

Tabella 14 – Campagna 2011: livelli di significatività del T test condotto confrontando i valori di concentrazione dei metalli nei vari tessuti degli organismi per tutte le stazioni a coppie tra loro (campioni spurgati 48h): ns = non significativo, * = p < 0.05, ** = p < 0.01, * = p < 0.001. Le differenze molto significative sono evidenziate in rosso.**

	As		Cr		Ni		Cu		Zn		Cd		Pb		Fe		Hg	
	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT	ST	EPT
A - B	**	**	ns	ns	**	ns	***	ns	***	*	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
A - E	*	**	ns	ns	*	ns	***	ns	***	*	***	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns
A - H	ns	**	ns	ns	*	**	***	ns	**	*	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A - MR	ns	***	ns	ns	**	*	***	***	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	***	***
A - VL	ns	***	*	ns	**	ns	***	***	ns	ns	ns	**	**	**	ns	**	*	*
A - SC	*	***	ns	ns	**	***	***	***	ns	ns	**	**	ns	ns	ns	**	***	**
B - E	*	ns	ns	ns	**	ns	*	ns	*	ns	***	ns	**	ns	**	ns	ns	ns
B - H	**	*	**	ns	**	ns	*	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
B - MR	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	**	**	ns	**	ns	ns	ns	***	ns
B - VL	**	***	*	**	ns	ns	ns	**	***	ns	**	ns	*	ns	**	*	*	ns
B - SC	***	***	ns	**	ns	ns	**	**	**	**	***	ns	ns	ns	**	*	***	ns
E - H	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
E - MR	**	**	ns	ns	*	ns	ns	*	*	***	**	ns	***	ns	ns	ns	***	ns
E - VL	*	***	**	*	**	ns	ns	*	**	ns	**	ns	***	ns	ns	ns	ns	*
E - SC	**	***	ns	*	*	ns	ns	*	*	***	***	ns	**	ns	ns	ns	***	ns
H - MR	ns	***	**	ns	**	ns	ns	**	*	***	ns	*	**	ns	*	**	***	ns
H - VL	ns	***	**	ns	**	ns	*	***	**	ns	ns	ns	**	*	*	***	ns	ns
H - SC	ns	***	*	ns	*	ns	ns	***	*	***	ns	ns	*	ns	ns	***	***	ns
MR - VL	ns	**	*	**	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	*	*	ns	ns	**	*	ns
MR - SC	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	**	ns	ns
VL - SC	ns	**	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	*	*	ns

Infine, in Figura 38 sono riportati gli istogrammi di confronto temporale tra le due serie di campionamenti (2009 e 2011): in questo caso sono riportati i valori relativi ai soli campioni non spurgati, dal momento che durante la prima raccolta non è stato possibile sottoporre i campioni a spurgo.

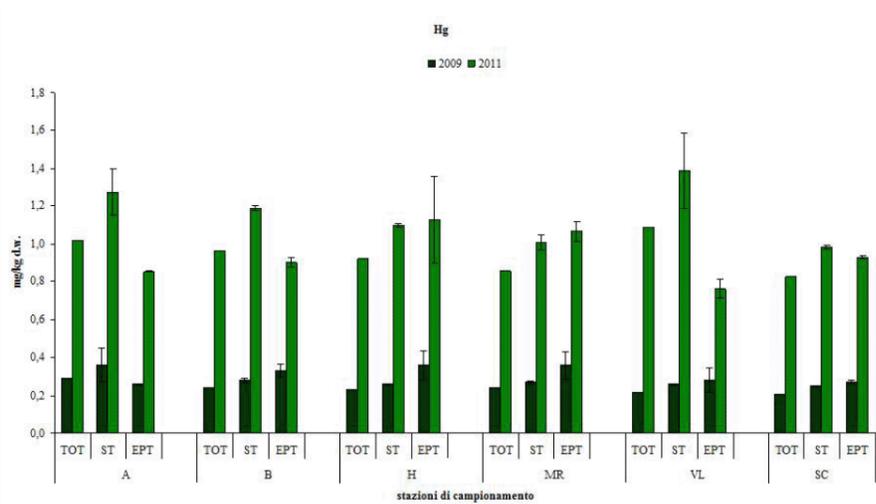
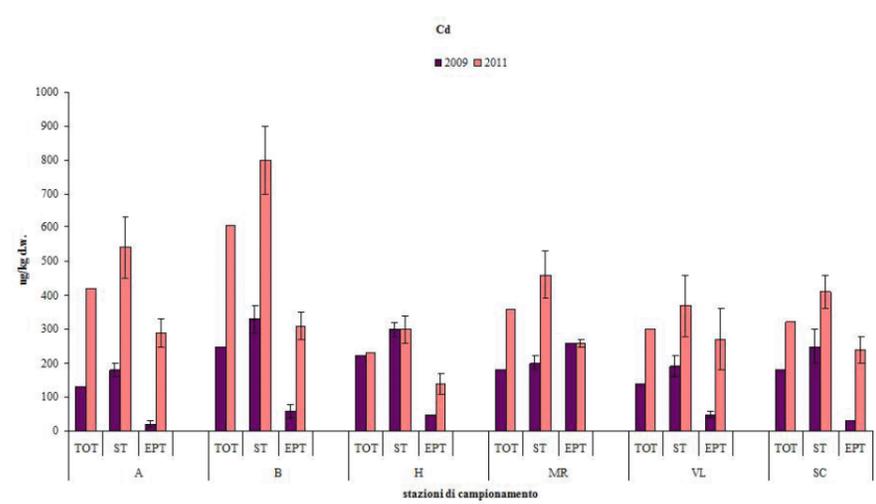
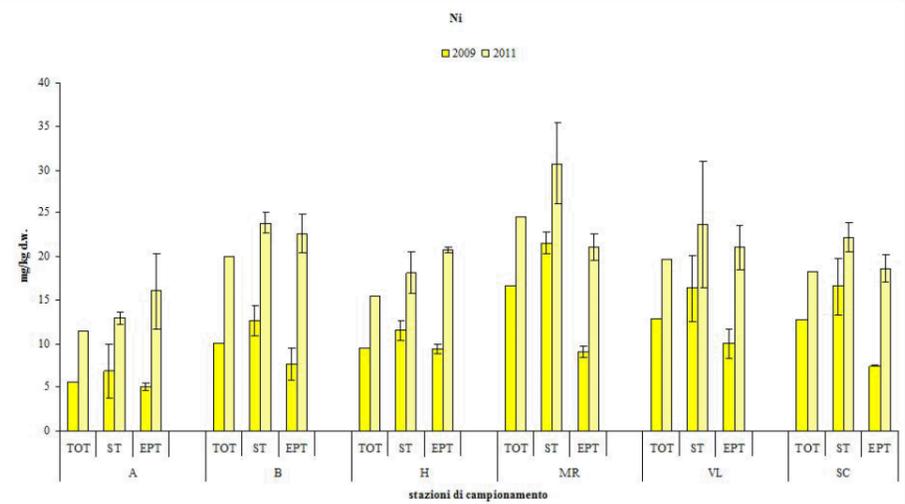
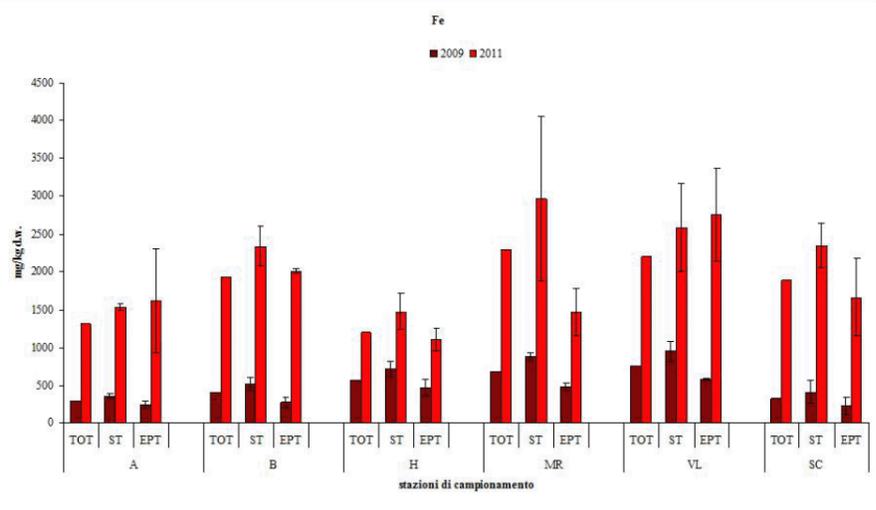
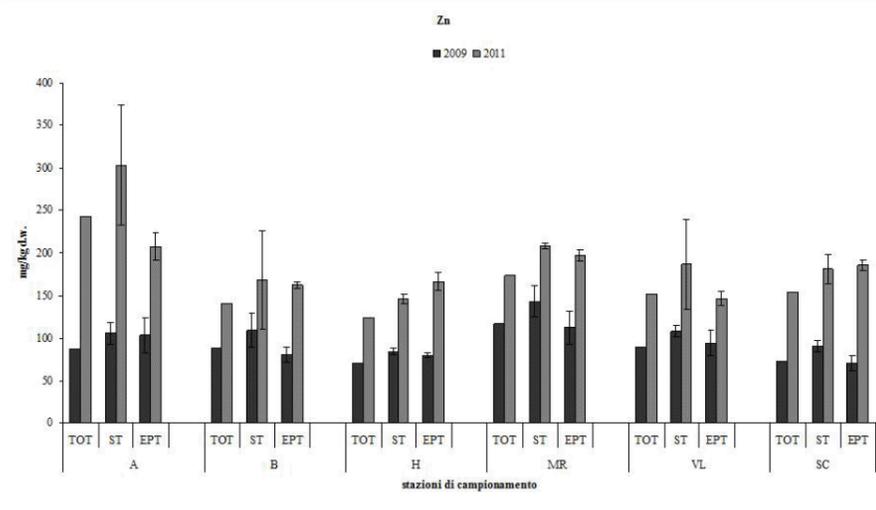
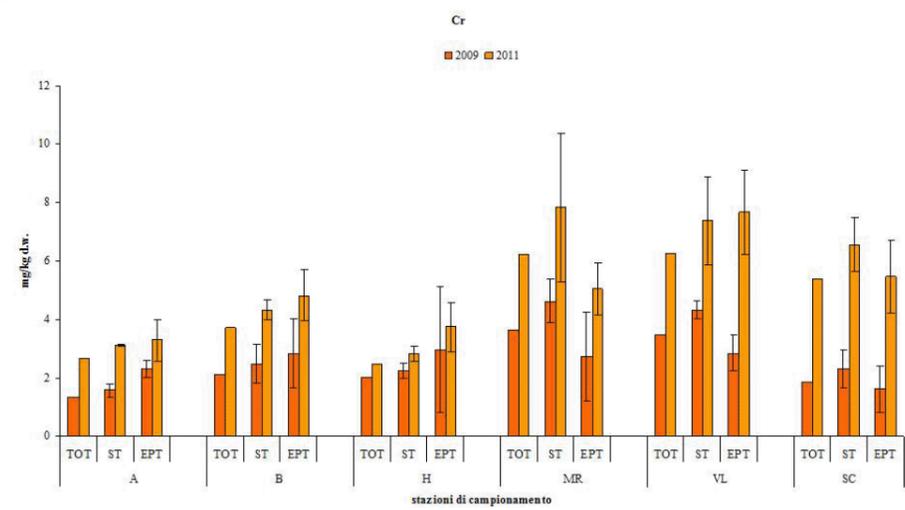
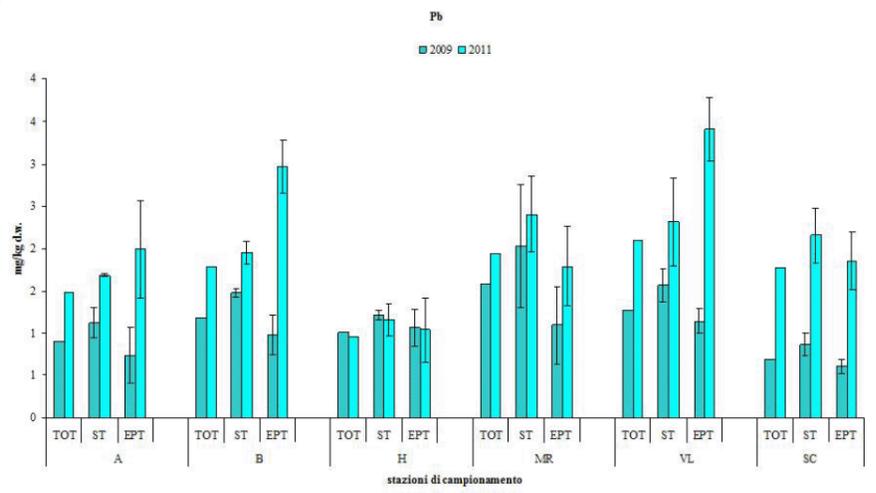
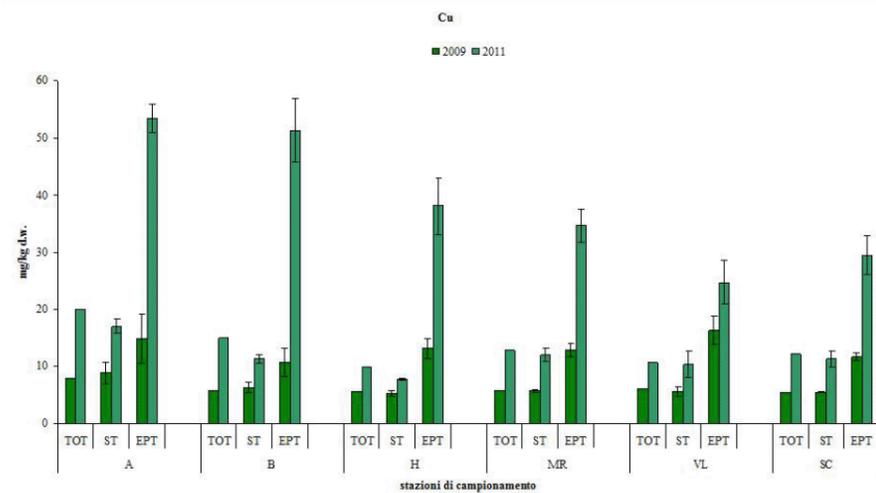
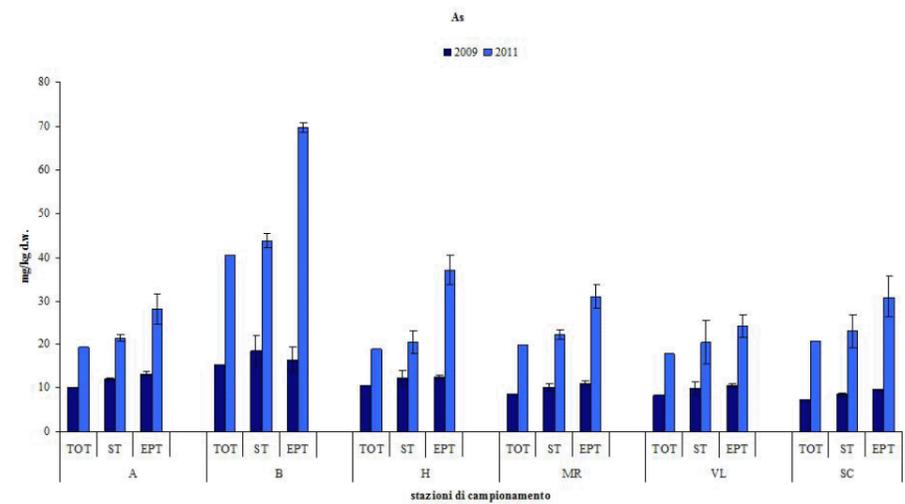


Figura 38 – Confronto temporale 2009-2011 tra le concentrazioni medie dei vari metalli analizzati nei tessuti degli organismi delle aree indagate (campioni non spurgati): TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas.

In generale, si nota uno spiccato aumento (oltre il 50%) della concentrazione di metalli pesanti bioaccumulati dalla campagna 2009 a quella 2011, significativo soprattutto per alcuni metalli di spiccata tossicità quali As, Pb, Cd e Hg, ed evidente sia nei tessuti extraghiandolari che nell'epatopancreas, e sia nelle aree lagunari che nel Delta.

Dei nove metalli analizzati, in particolare proprio As, Pb, Cd, e Hg sono elementi che in generale esibiscono una elevata tossicità, sia nei riguardi del *biota* lagunare, sia nei confronti dell'uomo (Arizzi Novelli *et al.*, 2003; Beltrame *et al.*, 2009; Bernardello *et al.*, 2006; Bustamante *et al.*, 2002; Chong & Wang, 2000; Chora *et al.*, 2009; Cooper *et al.*, 2010; Sfriso *et al.*, 2008).

Se si vanno a considerare i valori per se stessi della campagna 2009, si può osservare che le concentrazioni riscontrate in questo studio sono confrontabili con valori riscontrati in altri studi condotti sulla stessa specie modello (Irato *et al.*, 2003; Sfriso *et al.*, 2008).

Per quanto concerne riferimenti normativi relativi a contenuti di metalli pesanti ammissibili negli organismi, in questo contesto si fa riferimento alla normativa 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, quali 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. Questa attività è stata svolta dal gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (gruppo CONTAM: *Panel on Contaminants in the Food Chain*): questo gruppo è parte integrante dell'EFSA, ma opera in maniera indipendente, aperta e trasparente, in risposta a richieste di consulenza scientifica formulate dai responsabili della gestione dei rischi, o di propria iniziativa.

Nel gennaio 2009 il gruppo CONTAM dell'EFSA ha adottato un parere sul cadmio negli alimenti, in cui fornisce una valutazione aggiornata dell'esposizione in Europa e stabilisce una nuova dose settimanale tollerabile (TWI - *Tolerable Weekly Intake*). Per la popolazione generale, ad eccezione dei fumatori, la fonte principale di esposizione al cadmio è rappresentata dagli alimenti. A seguito dell'analisi di nuovi dati, il gruppo CONTAM ha ridotto la TWI per il cadmio a 2.5 microgrammi per chilogrammo di peso corporeo ($\mu\text{g}/\text{kg p.c.}$). Attualmente l'esposizione media al cadmio degli

adulti attraverso la dieta si aggira intorno a questo valore e l'esposizione di determinati sottogruppi, quali i vegetariani e i fumatori, può essere superiore. Tuttavia, il rischio di effetti nocivi, anche nei gruppi con livelli di esposizione superiori alla TWI, è estremamente basso (EFSA Journal, 2009).

Nel 2004 lo stesso gruppo ha adottato un parere sul mercurio e il metilmercurio, (EFSA Journal, 2004) quest'ultimo essendo 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. Dai grafici 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).

Infine, il piombo è un contaminante ambientale che si trova sia in natura sia come risultato di attività umane quali l'estrazione mineraria. In un parere pubblicato ad aprile 2010 (EFSA Journal, 2010) sui possibili rischi per la salute relativi alla presenza di piombo negli alimenti il gruppo CONTAM ha ritenuto che siano i cereali, gli ortaggi e l'acqua potabile a contribuire in maggior misura all'esposizione alimentare al piombo per la maggioranza degli Europei. Il gruppo ha concluso che gli attuali livelli di esposizione al piombo costituiscono un rischio basso o trascurabile per la salute della maggior parte degli adulti, ma che esistono potenziali preoccupazioni in particolare in merito a effetti sullo sviluppo neurologico per feti, neonati e bambini.

In Tabella 15 sono riportati i valori medi di concentrazione dei metalli considerati nei tessuti *in toto* degli organismi relativamente ai campioni del 2009, espressi in mg/kg di peso umido (*wet weight, w.w.*). Nella Tabella 16, è riportato lo stesso calcolo per i campioni del 2011. La concentrazione in peso umido è stata stimata sulla base di prove effettuate sui tessuti degli organismi per determinare la perdita percentuale di umidità.

Tabella 15 – Campagna 2009: valori medi di concentrazione dei metalli pesanti, espressi in mg/kg w.w.

	As	Cr	Ni	Cu	Cd	Pb	Zn	Fe	Hg
A	1,82	0,25	1,00	1,41	0,02	0,16	15,7	52,9	0,05
B	2,74	0,38	1,80	1,03	0,04	0,21	15,9	74,9	0,04
E	2,62	0,41	1,34	0,87	0,03	0,16	13,8	88,0	0,04
H	1,88	0,37	1,71	1,01	0,04	0,18	12,8	105	0,04
MR	1,54	0,66	2,98	1,02	0,03	0,29	21,0	125	0,04
VL	1,51	0,62	2,33	1,10	0,03	0,23	16,1	136	0,04
SC	1,30	0,34	2,30	0,96	0,03	0,12	13,3	59,8	0,04

Tabella 16 – Campagna 2011: valori medi di concentrazione dei metalli pesanti, espressi in mg/kg w.w.; NS = campioni non spurgati, 48h = campioni spurgati 48 ore.

	As		Cr		Ni		Cu		Cd		Pb		Zn		Fe		Hg	
	NS	48h	NS	48h	NS	48h												
A	3,46	3,40	0,49	0,32	2,07	1,06	3,60	2,70	0,08	0,07	0,27	0,08	43,7	37,5	238	65,6	0,18	0,17
B	7,29	6,62	0,67	0,36	3,59	2,80	2,68	2,57	0,11	0,09	0,32	0,08	25,4	17,7	347	125	0,17	0,17
H	3,41	3,15	0,45	0,26	2,78	1,51	1,77	2,02	0,04	0,04	0,17	0,05	22,4	18,1	215	59,2	0,17	0,16
MR	3,55	2,95	1,12	0,37	4,43	2,51	2,31	1,70	0,06	0,06	0,35	0,18	31,3	32,5	415	91,5	0,15	0,15
VL	3,20	2,96	1,13	0,47	3,54	2,89	1,91	1,64	0,05	0,06	0,38	0,12	27,4	32,2	396	69,2	0,20	0,16
SC	3,69	2,56	0,97	0,39	3,29	2,41	2,18	1,55	0,06	0,05	0,32	0,11	27,7	32,1	340	61,2	0,15	0,15

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 82%, si può affermare che i campioni analizzati sono al di sotto dei valori soglia proposti dalla Commissione Europea per Pb, Hg e Cd.

A scopo di confronto, sono stati riportati in Tabella 17 gli intervalli di concentrazione minima e massima misurati nei campioni di vongole del Delta del Po, della Laguna di Venezia (dati relativi ai campioni del 2009) e della Laguna di Marano, questi ultimi ricavati dalla bibliografia (Sfriso *et al.*, 2008). Sempre a scopo di confronto, nella Tabella è riportato anche l'intervallo di variazione nella concentrazione dei metalli nei sedimenti. In didascalia sono indicati i limiti di riferimento normativi secondo il Regolamento CEE No 1881/2006 per quanto riguarda la concentrazione di Cd, Pb e Hg ammissibile nei tessuti di molluschi eduli.

Nella Tabella 18 sono invece riassunti i valori medi e/o gli intervalli di variazione della concentrazione di metalli in *R. philippinarum* riportati in letteratura.

Tabella 17 – Intervalli di concentrazione minima e massima (mg/kg) dei metalli misurati nei sedimenti e negli organismi nelle stazioni della Laguna di Venezia e del Delta del Po (campionamento 2009); confronto con dati di letteratura relativi alla Laguna di Marano (Sfriso *et al.*, 2008). SED = concentrazione totale nei sedimenti; TOT = concentrazione nei tessuti totali delle vongole; d.w. = dry weight, peso secco; w.w. = wet weight, peso umido. Concentrazioni massime ammissibili nei molluschi secondo il Regolamento CEE No 1881/2006: Pb = 1,5 mg/kg w.w., Cd = 1,0 mg/kg w.w., Hg = 0,5 mg/kg w.w.

Laguna di Venezia	SED d.w.	4,67 - 11,7	19,9 - 72,7	10,1 - 32,2	6,69 - 23,0	0,14 - 0,57	13,2 - 32,7	79,2 - 128	11400 - 27400	0,22 - 0,75
	TOT d.w.	10,1 - 15,2	1,39 - 2,30	5,54 - 10,0	4,81 - 7,83	0,13 - 0,25	0,89 - 1,18	71,0 - 88,4	294 - 581	0,22 - 0,29
	TOT w.w.	1,82 - 2,74	0,25 - 0,41	1,00 - 1,80	0,87 - 1,41	0,02 - 0,04	0,16 - 0,21	12,8 - 15,9	52,9 - 105	0,04 - 0,05
Delta del Po	SED d.w.	3,57 - 5,77	65,4 - 113	32,3 - 51,6	7,07 - 7,87	0,11 - 0,12	20,4 - 22,2	91,8 - 111	20200 - 20370	0,18 - 0,22
	TOT d.w.	7,25 - 8,57	1,87 - 3,66	12,8 - 16,6	5,36 - 6,08	0,14 - 0,18	0,69 - 1,59	73,7 - 117	332 - 757	0,21 - 0,24
	TOT w.w.	1,30 - 1,54	0,34 - 0,66	2,30 - 2,98	0,96 - 1,10	0,03	0,12 - 0,29	13,3 - 21,0	59,8 - 136	0,04
Laguna di Marano	SED d.w.	4,0 - 6,6	39,0 - 70,0	18 - 26	2,7 - 4,3	0,09 - 0,62	2,5 - 6,3	4,0 - 27	4180 - 11324	0,40 - 0,57
	TOT d.w.	42,8 - 64,0	3,10 - 5,70	8,37	8,18 - 13,7	0,26 - 0,49	2,54	60 - 81,7	-	1,35 - 2,03
	TOT w.w.	-	-	-	-	-	0,45	-	882 - 1299	0,25 - 0,30

Tabella 18 – Valori medi e/o intervalli di concentrazione minima e massima (mg/kg d.w.) di metalli misurati in campioni di *R. philippinarum* riportati in letteratura.

	As	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn	Fe	Hg		
Laguna di Venezia (Marghera)		0.4-1.2	0.9-8.1	22.2-55.7		1.3-26.3	100.8-156.4	268.2-765.4		Popolazioni naturali Epatopancreas	Irato <i>et al.</i> 2003
Laguna di Venezia (Chioggia)		0.2-0.6	1.8-9.3	17.8-42.6		1.5-8.5	79.9-111.1	263.7-521.5		Popolazioni naturali Epatopancreas	
Inizio (provenienza Laguna di Venezia)		0.52		9.4			97.2		0.163	Vongole di origine Tessuti totali	Baudrimont <i>et al.</i> 2005
Gironde estuary (Francia)		~ 0.7		~ 13			~ 72		~ 0.12	Vongole trapiantate Tessuti totali	
Jiaozhou Bay (Cina)		0.65-3.31	9.64-35.47	5.07-26.03	0.89-14.77	5.26-52.75	52.12-110.32			Popolazioni naturali Tessuti totali (dep. 24h)	Wang <i>et al.</i> 2010
Spagna del sud (costa atlantica)	10.8-27.4	0.48-2.72	0.65-3.47	8.38-17.3	0.40-1.95	1.67-5.00	74.3-130	220-699	0.10-2.34	Popolazioni naturali Tessuti totali (dep. 24h)	Usero <i>et al.</i> 1997
Kyeonggi Bay (Corea)		0.53-2.2	0.61-2.38	5.47-14.3	0.34-1.72	2.74-33.5	64.7-162	268-1230		Popolazioni naturali Tessuti totali	Ji <i>et al.</i> 2006

Come si evince dai dati riportati, la concentrazione dei metalli riscontrati nei siti del Delta del Po e della Laguna di Venezia testati in questo studio, per quanto riguarda i tre metalli per i quali esiste un riferimento legislativo, sono abbondantemente al di sotto del valore ammissibile, mentre per gli altri, sono comunque inferiori rispetto alle concentrazioni riscontrate nella Laguna di Marano (Sfriso *et al.*, 2008). Dal confronto con i dati di concentrazione disponibili in letteratura relativi anche ad altre aree di allevamento europee ed extra europee (Tabella 18), si può notare come tali valori siano generalmente in linea con i risultati fino ad ora presentati.

Vista la mancanza di riferimenti limite normativi per la maggior parte dei metalli analizzati, sulla base delle considerazioni sopraesposte è possibile esprimere in modo del tutto preliminare e cautelativo, un giudizio positivo sia sulla idoneità dei siti testati ad essere utilizzati come aree di allevamento della vongola *R. philippinarum* sia sulla qualità alimentare del prodotto allevato. È necessario comunque approfondire ulteriormente gli aspetti riguardanti comportamento e destino ed ecotossicità dei metalli con studi specifici in aree opportunamente scelte ed in numero limitato, in modo da poter seguire l'evoluzione le variazioni nel tempo di alcuni parametri che si sono dimostrati influenzare il comportamento ed il destino metabolico dei metalli negli ecosistemi ad aree per l'allevamento delle vongole.

Nel paragrafo 4.4 verranno prese in considerazione nel dettaglio le relazioni tra la concentrazione dei metalli nelle varie fasi geochimiche dei sedimenti e le concentrazioni di bioaccumulo fin qui discusse.

4.4 Speciazione geochimica

Di seguito sono riportati e discussi metallo per metallo i risultati relativi all'analisi di speciazione geochimica condotta sui campioni di sedimento prelevati nelle aree di interesse nel corso del 2009 e del 2011. Si ricorda (si veda il paragrafo 4.2) che essendo il valore di concentrazione dei metalli in quantità assoluta maggiore nella campagna 2011 rispetto a quella 2009, ovviamente anche i valori di concentrazione nelle varie fasi geochimiche della campagna 2011 sono molto elevati. Si rimanda inoltre ai paragrafi 1.5 e 3.4.3 per una completa descrizione del significato ambientale del processo di speciazione geochimica.

Arsenico

In Tabella 19 sono riportati i valori di concentrazione di As riscontrati nelle varie fasi geochimiche relativamente ai campioni del 2009; in Tabella 20, sono invece riportati i valori per i campioni del 2011. La distribuzione percentuale tra le fasi geochimiche nelle aree campionate relativamente all'anno 2009 è riportata graficamente in Figura 39, mentre nella figura successiva (Figura 40) è riportato lo stesso grafico per i campioni del 2011.

Tabella 19 – Campionamento 2009: 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	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	MEDIA	SD	RESA %
A		0,13	0,75	0,98	0,23	1,34	3,43			
	0,05	0,11	0,83	0,94	0,34	1,31	3,58	3,46	0,10	74,2
	0,06	0,10	0,85	0,80	0,33	1,24	3,39			
B	0,09	0,11	1,27	1,14	0,44	3,64	6,68	6,68		76,0
E	0,06	0,05	0,77	1,03	0,57	1,31	3,79	3,79		64,3
H	0,10	0,14	0,00	2,07	0,54	5,28	8,12			
	0,09	0,17	1,37	2,04	0,97	5,13	9,76	8,77	0,87	75,2
	0,09	0,13	0,00	2,22	0,52	5,47	8,43			
MR	0,05	< L.O.D.	0,39	1,22	0,27	0,81	2,73			
	0,04	< L.O.D.	0,36	1,19	0,21	1,02	2,82	2,68	0,16	75,2
	0,04	< L.O.D.	0,33	1,12	0,17	0,85	2,50			
VL	0,03	< L.O.D.	0,26	4,11	0,08	0,65	5,13	5,13		89,0
ZI	0,75	1,30	8,73	5,18	1,00	5,98	22,9	22,9		74,6

Tabella 20 - Campionamento 2011: valori medi 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	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	RESA %
A	0,21	0,59	1,51	1,51	0,49	4,00	8,30	89,1
B	0,15	1,99	1,26	1,46	0,75	5,74	11,3	99,7
H	0,03	0,18	0,81	0,47	0,54	1,50	3,53	-
MR	0,10	0,30	0,74	1,54	0,27	1,81	4,77	-
VL	0,17	0,46	0,83	3,27	0,04	0,72	5,49	117
SC	0,05	1,35	1,80	4,22	0,14	2,32	9,88	104

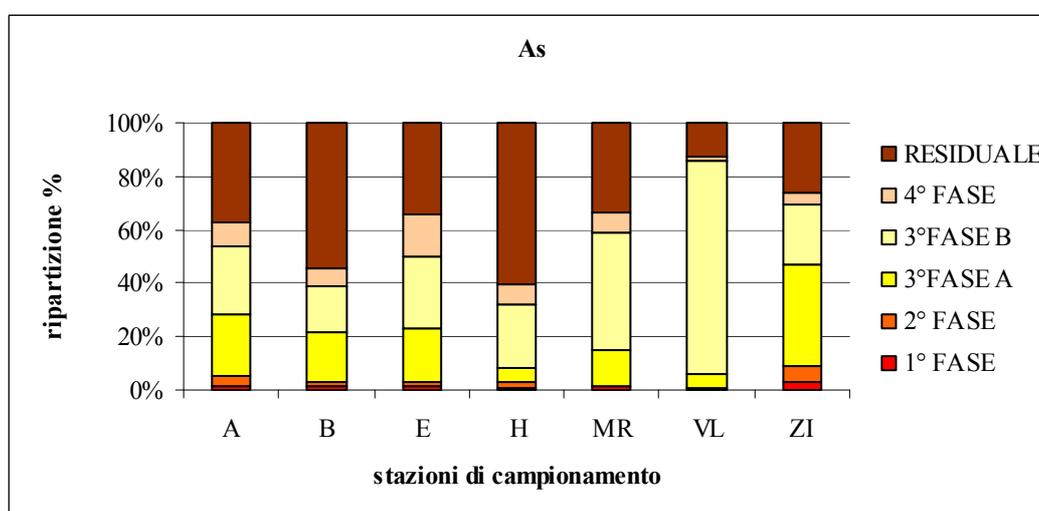


Figura 39 – Campionamento 2009: distribuzione percentuale dell'As nelle varie fasi geochimiche.

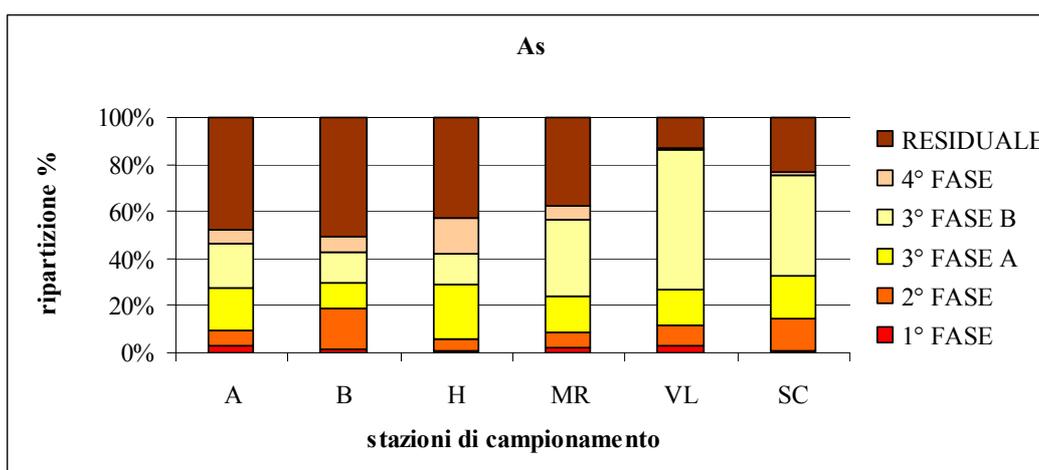


Figura 40 – Campionamento 2011: distribuzione percentuale dell'As nelle varie fasi geochimiche.

Come si può notare dai grafici e dalle tabelle, la frazione maggioritaria (circa 80-95%) dell'As presente nei siti si trova ripartita, in maniera diversa a seconda della stazione considerata, tra la

terza fase e la fase residuale; la distribuzione percentuale risulta estremamente eterogenea e dipendente dal sito.

È noto dalla bibliografia (Argese *et al.*, 2005; Argese *et al.*, 2009) che l'As potenzialmente biodisponibile nei sedimenti è associato quasi prevalentemente agli ossidi e idrossidi di Fe e Mn. La stabilità di questi composti si è dimostrata dipendere fortemente dal grado di cristallinità di tali ossidi; quelli amorfi sono facilmente riducibili in condizioni lievemente riducenti e portano alla trasformazione del Fe³⁺ insolubile a Fe²⁺ solubile trascinando in soluzione tutti i metalli e metalloidi ad essi associati. Man mano che il grado di cristallinità degli ossidi/idrossidi di Fe aumenta, essi diventano sempre più stabili e sempre meno riducibili, richiedendo per la loro riduzione condizioni fortemente anossiche. In questo caso, a livelli di cristallinità più alti diventa necessario aumentare l'acidità a livelli tali da solubilizzare direttamente gli ossidi/idrossidi di Fe³⁺ e quindi l'intera fase.

La disomogeneità riscontrata nei vari siti campionati per quanto riguarda mobilità e biodisponibilità dell'As, potrebbe essere legata al differente grado di cristallinità degli ossidi di Fe presenti nelle matrici sedimentarie delle diverse aree considerate.

Le distribuzioni nei due anni hanno dimostrato andamenti leggermente differenti. Anche per il 2011 la ripartizione percentuale è fortemente dipendente dal sito e piuttosto disomogenea, con una parte preponderante (80-95%) suddivisa tra terza fase e fase residuale, ma si evidenzia una significativa presenza di As nella seconda fase, comunque maggiore rispetto al 2009.

In Tabella 21 sono riportati i valori del coefficiente di correlazione tra le varie fasi geochimiche della speciazione e altri parametri ambientali importanti, ovvero concentrazione totale di As nei sedimenti, concentrazione all'interno degli organismi (suddivisa in tessuti totali, tessuti molli extraghiandolari ed epatopancreas) e percentuale granulometrica di sedimenti fini e sabbia. In Tabella 22 è riportata la stessa matrice di correlazione relativa al campionamento del 2011.

Tabella 21 – Campionamento 2009: matrice di correlazione per l'As tra le varie fasi della speciazione geochemica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancras) e la percentuale granulometrica di sedimenti fini (argilla + silt) e di sabbia. Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	-0,61	0,12	0,05	-0,53	-0,85	-0,57	1,00
TOT	0,12	-0,64	0,71	-0,39	0,06	-0,15	-0,55
ST	0,16	-0,59	0,76	-0,40	0,01	-0,13	-0,52
EPT	-0,31	-0,92	0,46	-0,54	0,06	-0,49	-0,39
%SED FINI	1,00	0,66	0,16	0,66	0,40	0,93	-0,57
%SABBIA	-1,00	-0,66	-0,16	-0,66	-0,40	-0,93	0,57

Tabella 22 – Campionamento 2011: matrice di correlazione per l'As tra le varie fasi della speciazione geochemica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancras). Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	0,11	0,66	0,51	-0,08	0,48	0,79	1,00
TOT	0,17	0,85	0,18	-0,20	0,70	0,83	0,63
ST	0,39	0,74	0,06	-0,27	0,70	0,82	0,52
EPT	0,04	0,51	0,05	-0,65	0,97	0,78	0,46

Per quanto riguarda i campioni del 2009, l'alto coefficiente di correlazione tra la percentuale granulometrica fine e la concentrazione di As nella prima fase (e inversamente, l'alto valore di r negativo riscontrato con la percentuale di sabbia) si può spiegare prendendo in considerazione i fenomeni di adsorbimento che interessano gli ioni e considerando che la prima fase è costituita dalla frazione di As biodisponibile formata da arseniato già in soluzione più quello adsorbito fisicamente sulle particelle di sedimento.

Se si prende in considerazione la matrice relativa ai campioni del 2011, essa mette in evidenza valori di r molto significativi tra la concentrazione di As nei vari tessuti degli organismi e la seconda fase, a conferma del fatto che questi campioni (a differenza di quelli dell'annata precedente) presentano una più significativa concentrazione di As associato a queste fasi. Va tuttavia ricordato che la concentrazione totale di As nei sedimenti è molto bassa e che anche la frazione direttamente scambiabile è minima. Contrariamente a quanto ci si poteva aspettare dalle percentuali di ripartizione dell'elemento nella terza fase, nei campioni del 2011 non si evidenzia alcun valore di r significativo tra la terza fase B e la concentrazione di As nei sedimenti o negli organismi. Una possibile spiegazione di questo risultato potrebbe derivare dal fatto che le vongole acquisiscono i composti indispensabili alla crescita attraverso due vie, dall'acqua o direttamente da

particelle di sedimento fine inglobate. Gli andamenti rilevati lasciano supporre che l'As riscontrato nella biomassa derivi proprio da quello presente nelle particelle di sedimento assorbite, e le condizioni che tali particelle incontrano all'interno dell'organismo siano tali per cui si solubilizza solo la frazione legata alla seconda fase e alla terza fase più labile (3A) rappresentata prevalentemente da ossidi/idrossidi di Mn amorfi, mentre la 3B (che richiede condizioni di riduzione più forti) non viene digerita. In effetti nella matrice di correlazione relativa ai dati del 2009 si osserva un valore significativo dell'indice tra i tessuti molli extraghiandolari e la terza fase A, a conferma di questa osservazione.

Una buona correlazione si ha anche tra la concentrazione di As presente nella quarta fase e quella presente nella ghiandola dei campioni raccolti nel 2011. Anche questo caso è interpretabile con le stesse considerazioni fatte sopra.

Infine, la buona correlazione tra la concentrazione di As nei tessuti extraghiandolari e nella ghiandola e la concentrazione di As in fase residuale (rispettivamente $r = 0.82$ e $r = 0.78$) si potrebbe spiegare come dovuta alla presenza nell'organismo di metallo residuale accumulato con le particelle di sedimento che l'organismo non riesce a metabolizzare. Bisogna ricordare che le vongole non sono state spurgate.

Cromo

In Tabella 23 sono riportati i valori di concentrazione del Cr riscontrati nelle diverse fasi geochimiche nel campionamento del 2009, mentre nella tabella successiva (Tabella 24), sono riportati i valori medi relativi ai campioni del 2011. In Figura 41 è mostrata la ripartizione percentuale del Cr tra le varie fasi geochimiche dei campioni del 2009, nella Figura 42 quella dei campioni del 2011.

Tabella 23 – Campionamento 2009: 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	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	MEDIA	SD	RESA %
A		0,09	0,69	4,98	< L.O.D.	9,06	14,8	15,9	1,27	80,2
	0,02	0,09	0,73	4,65	< L.O.D.	11,8	17,3			
	0,02	0,10	0,74	4,76	< L.O.D.	9,98	15,6			
B	0,03	0,42	2,13	11,0	0,11	30,1	43,8	43,8		95,8
E	0,03	0,31	1,70	18,2	0,05	37,3	57,5	57,5		79,1
H		0,31	1,44	14,0	< L.O.D.	33,9	49,7	51,9	1,99	100
	0,03	0,29	1,43	13,5	0,02	37,2	52,4			
	0,02	0,30	1,50	15,3	0,02	36,3	53,5			
MR		0,11	1,93	43,3	0,13	74,1	120	117	7,59	103
	0,02	0,14	1,89	36,5	0,14	69,7	108			
	0,02	0,14	1,94	21,5	0,19	99,1	123			
VL	0,02	0,33	1,13	19,7	0,03	34,0	55,2	55,2		84,4
ZI	0,04	1,08	4,27	16,8	0,16	23,7	46,1	46,1		96,3

Tabella 24 - Campionamento 2011: 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	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	RESA %
A	1,44	1,58	2,83	5,40	0,94	71,2	83,4	82,9
B	0,99	1,44	3,08	8,19	0,78	57,1	71,6	-
H	0,91	1,35	3,14	7,30	0,72	77,1	90,5	72,7
MR	0,83	1,89	5,67	19,4	0,83	118	147	82,4
VL	0,75	1,41	4,41	19,9	0,76	117	144	97,8
SC	0,80	2,45	7,55	31,8	1,01	105	148	98,3

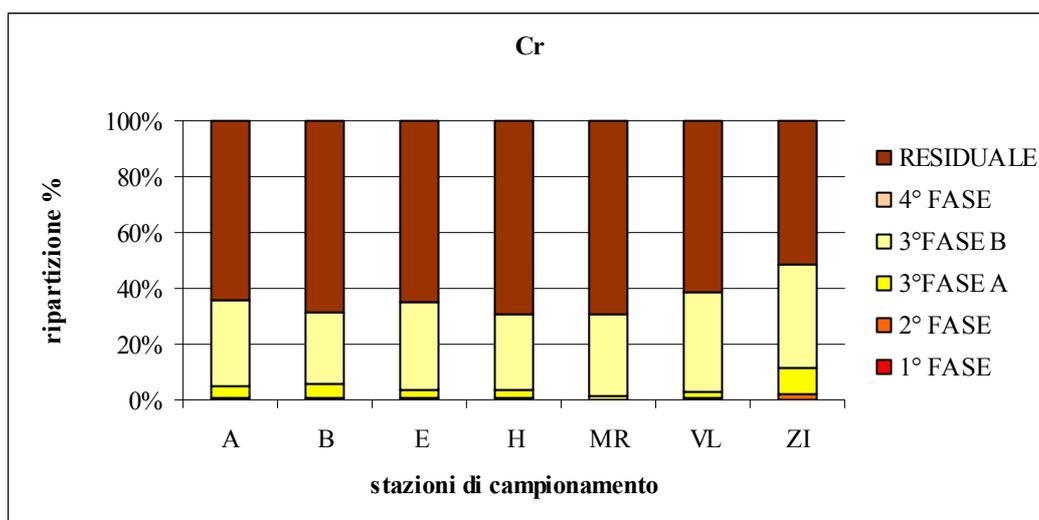


Figura 41 – Campionamento 2009: distribuzione percentuale del Cr nelle varie fasi geochimiche.

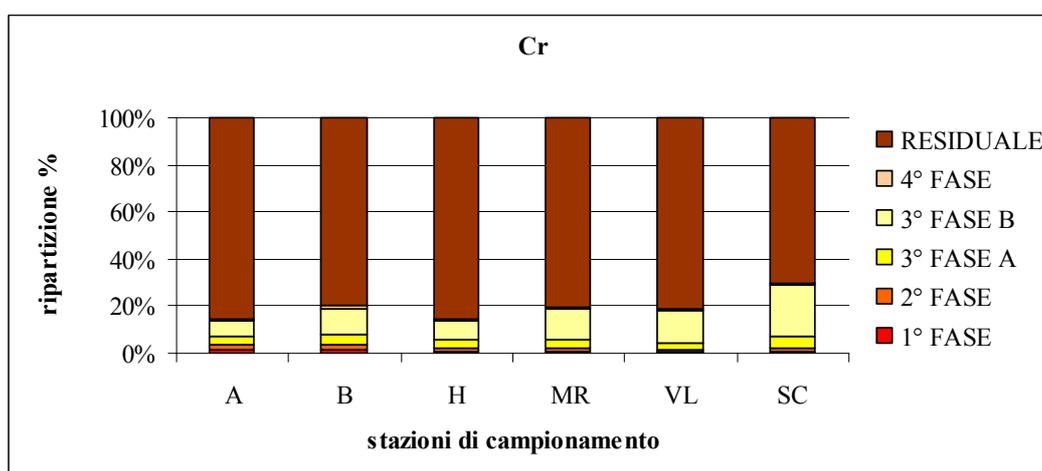


Figura 42 – Campionamento 2011: distribuzione percentuale del Cr nelle varie fasi geochimiche.

Per quanto riguarda i campioni del 2009, la distribuzione del metallo tra le fasi geochimiche si presenta omogenea per tutte le aree. È chiaramente evidente dalla ripartizione percentuale che una frazione preponderante (dal 55 al 70%) di questo metallo si trova nella fase residuale, cioè non biodisponibile. La parte restante risulta associata prevalentemente alla terza fase B e in misura molto minore alla terza fase A, ovvero le frazioni che si rendono disponibili quando il sedimento si trova in condizioni anossiche. Le fasi prima, seconda e quarta sono praticamente inesistenti ad eccezione di una piccolissima percentuale presente nella seconda fase del campione ZI.

L'andamento della ripartizione tra le fasi per i campioni del 2011 è lo stesso del 2009, omogeneo per tutte le aree e con la frazione preponderante rappresentata dalla fase residuale (in percentuale

maggiore rispetto al 2009), in accordo con la nota estrema stabilità dei composti del Cr presenti nel sedimento.

Nelle Tabelle 25 e 26 sono riportati i risultati delle indagini di correlazione, rispettivamente per il campionamento del 2009 e quello del 2011.

Tabella 25 – Campionamento 2009: matrice di correlazione per il Cr tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancras) e la percentuale granulometrica di sedimenti fini (argilla + silt) e di sabbia. Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	-0,49	-0,93	0,15	0,99	0,61	0,95	1,00
TOT	-0,78	-0,65	-0,25	0,83	0,37	0,67	0,76
ST	-0,76	-0,64	-0,23	0,83	0,39	0,67	0,76
EPT	0,11	0,47	-0,48	-0,71	-0,86	-0,70	-0,73
%SED FINI	0,64	0,57	0,33	-0,73	-0,12	-0,48	-0,73
% SABBIA	-0,64	-0,57	-0,33	0,73	0,12	0,48	0,73

Tabella 26 – Campionamento 2011: matrice di correlazione per il Cr tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancras). Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	-0,80	0,46	0,72	0,70	-0,05	0,78	1,00
TOT	-0,70	0,45	0,71	0,79	0,11	0,88	0,87
ST	-0,69	0,48	0,73	0,79	0,13	0,88	0,89
EPT	-0,72	0,09	0,42	0,61	-0,15	0,67	0,56

Le matrici di correlazione tendono a confermare l'andamento evidenziato dai grafici e dalle tabelle. In particolare, per il 2009 si evidenzia una buona correlazione tra la concentrazione di Cr rilevata nei tessuti degli organismi e quella rilevata nella terza fase B. Inoltre la matrice di correlazione evidenzia l'ottimo coefficiente di correlazione ($r = 0.99$) tra la concentrazione totale di Cr nel sedimento e quella presente nella terza fase B. Questo alto valore di r è molto probabilmente la causa del coefficiente di correlazione significativo trovato tra la concentrazione totale del Cr nel sedimento e quella presente nei tessuti totali ed extraghiandolari degli organismi.

Anche nel caso del Cr, la granulometria sembra avere un ruolo importante nella distribuzione del metallo nelle matrici sedimentarie; si notino in particolare i valori significativi di correlazione ($r = 0.73$) tra la componente sabbiosa e la terza fase B, a dimostrazione che la fase 3B si trova associata prevalentemente alla componente più grossolana della matrice sedimentaria. Ciò è ulteriormente

confermato dalla correlazione negativa ($r = -0.73$) tra fase 3B e la componente più fine del sedimento.

Per quanto riguarda la matrice relativa ai campioni del 2011, gli alti valori dei coefficienti di correlazione confermano in toto quanto osservato nei campioni del 2009, anzi esaltano maggiormente il ruolo del Cr associato agli ossidi e idrossidi di Fe e Mn come principale fonte di metallo biodisponibile per gli organismi.

Nichel

Nelle Tabelle 27 e 28 sono mostrate, rispettivamente per il 2009 e il 2011, le concentrazioni di Ni riscontrate nelle fasi geochimiche del sedimento. Le Figure 43 e 44 riportano invece la ripartizione percentuale del Ni tra le diverse fasi.

Tabella 27 - Campionamento 2009: 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 Cr nei sedimenti.

Ni	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	MEDIA	SD	RESA %
A		0,28	0,71	2,85	0,72	2,17	6,00			
	0,16	0,30	0,88	3,04	0,69	3,41	7,80	7,14	0,98	70,3
	0,16	0,25	0,94	3,44	0,63	2,81	7,60			
B	0,10	0,49	1,36	5,69	3,87	5,86	17,4	17,4		97,9
E	0,10	0,32	3,18	9,87	3,32	8,86	25,7	25,7		79,7
H	0,12	0,51	2,23	10,2	5,69	7,26	20,4			
	0,12	0,47	1,91	9,33	5,50	8,74	26,1	24,1	3,28	95,0
	0,11	0,44	2,19	9,99	6,09	7,21	26,0			
MR	0,14	0,32	7,09	19,3	7,11	18,3	52,2			
	0,12	0,31	6,90	18,5	7,15	17,6	50,6	54,6	5,62	106
	0,12	0,33	7,26	18,9	13,6	20,8	61,0			
VL	0,07	0,41	4,72	12,0	5,62	7,57	30,4	30,4		94,2
ZI	0,41	0,68	1,57	9,23	2,48	4,70	19,1	19,1		82,2

Tabella 28 - Campionamento 2011: 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 Cr nei sedimenti.

Ni	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	RESA %
A	0,46	3,30	2,25	2,45	1,51	3,06	13,0	98,7
B	0,51	3,82	2,69	3,69	2,98	2,81	16,5	97,3
H	0,67	2,60	2,57	3,13	1,57	5,84	16,4	115
MR	0,66	2,87	6,62	7,82	8,84	14,2	41,0	97,8
VL	0,63	2,33	7,21	8,87	6,87	12,0	37,9	102
SC	0,98	4,55	10,4	12,4	17,3	15,5	61,2	98,4

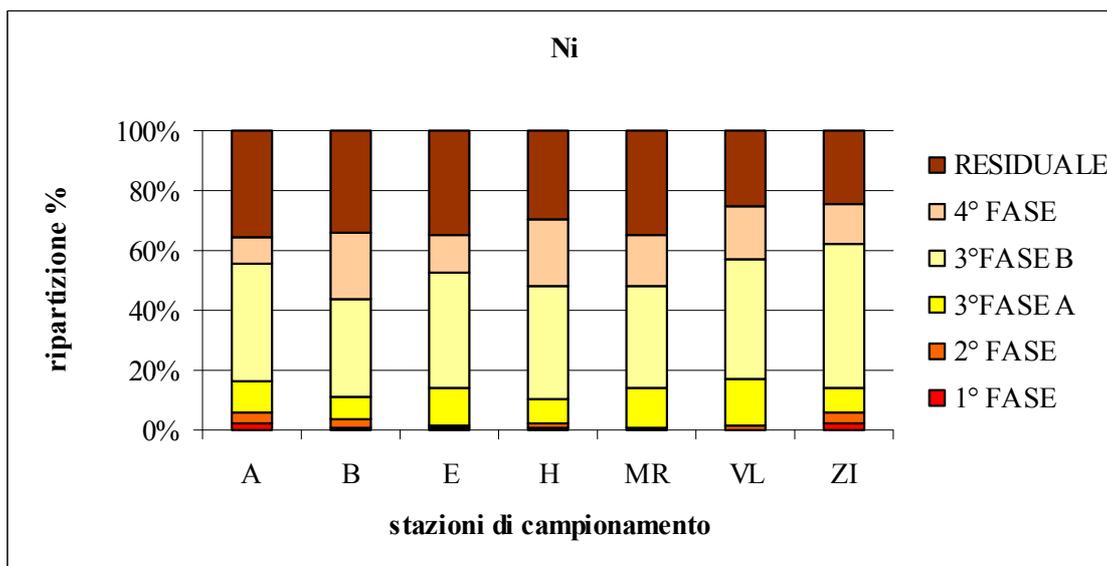


Figura 43 – Campionamento 2009: distribuzione percentuale del Ni nelle varie fasi geochimiche..

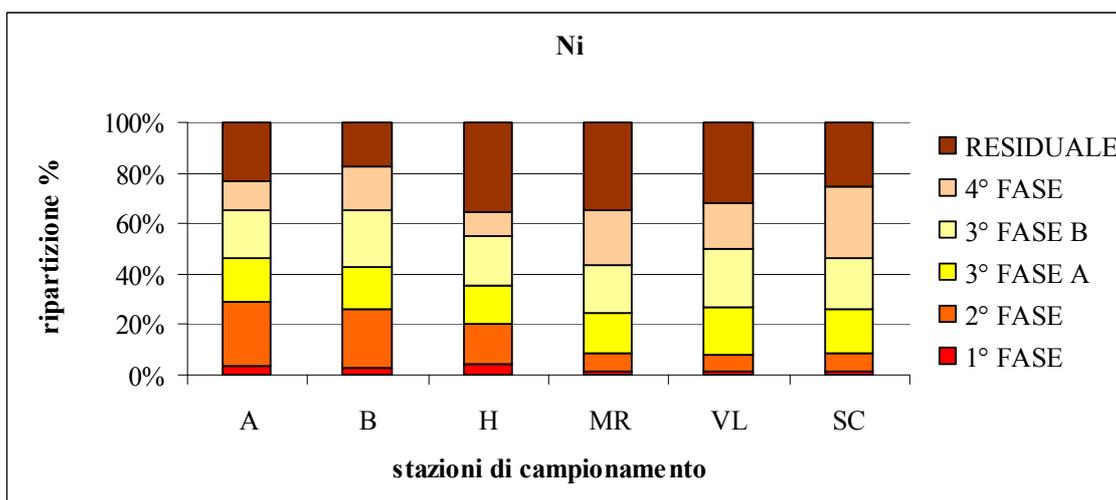


Figura 44- Campionamento 2011: distribuzione percentuale del Ni nelle varie fasi geochimiche.

Per quanto riguarda il campionamento 2009, la distribuzione tra le diverse aree è abbastanza simile, con qualche differenza nella ripartizione tra le fasi potenzialmente biodisponibili (seconda, terza, quarta fase) e la fase residuale. In particolare, si può notare come la frazione direttamente scambiabile (prima fase) sia molto bassa, con valori più consistenti in Zona Industriale (ZI), paragonabili a quelli riscontrati nella stazione A.

La fase più rappresentata è la terza, che oscilla in percentuale nelle diverse stazioni tra il 40 e il 55%. L'altra fase importante (circa 25-35%) è costituita dalla residuale, seguita in ordine di importanza dalla quarta fase, che varia tra il 10 e il 20%. Infine, la seconda fase varia tra il 3 e il 6%. Quindi, complessivamente, la frazione potenzialmente biodisponibile risulta variare tra il 65 e il 75%.

Nei campioni del 2011 il Ni ha dimostrato di avere una distribuzione tra le fasi geochimiche più omogenea rispetto ai campioni del 2009: in particolare, aumenta la percentuale associata alla seconda fase (5-20%) e diminuisce quella associata alla terza fase (40%), mentre rimane invariata la percentuale associata alla quarta fase (10-20%). Praticamente il metallo risulta distribuito in percentuali quasi uguali tra la seconda fase, terza fase A, terza fase B, quarta fase e residuale, dimostrando così l'assenza di forme associative preferenziali di questo elemento con particolari componenti del sedimento, confermando quanto detto per i campioni del 2009.

Facendo riferimento alle concentrazioni totali di Ni nei sedimenti dei vari siti (Figure 33 e 34), si può notare una netta differenziazione tra la concentrazione di Ni presente nell'area della Laguna di Venezia e la concentrazione di Ni presente nei sedimenti del Delta del Po. Questa differenziazione è meno evidente nella distribuzione percentuale delle fasi tra i diversi siti, portando a ipotizzare che i processi responsabili dell'accumulo di Ni nel sedimento e della sua distribuzione tra le diverse fasi geochimiche siano praticamente gli stessi.

In Tabella 29 e 30 sono riportati i valori del coefficiente di correlazione tra le varie fasi geochimiche della speciazione e gli altri parametri ecotossicologici già citati, per i campioni del 2009 e per quelli del 2011.

Tabella 29 – Campionamento 2009: matrice di correlazione per il Ni tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancras) e la percentuale granulometrica di sedimenti fini (argilla + silt) e di sabbia. Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	-0,37	-0,09	0,40	0,50	0,33	0,46	1,00
TOT	-0,48	0,28	-0,08	0,05	-0,01	-0,01	0,84
ST	-0,45	0,25	-0,09	0,04	-0,03	-0,01	0,84
EPT	-0,79	0,61	0,12	0,25	0,30	0,04	0,60
%SED FINI	-0,63	0,55	-0,05	-0,16	-0,01	-0,26	-0,42
% SABBIA	0,63	-0,55	0,05	0,16	0,01	0,26	0,42

Tabella 30 – Campionamento 2011: matrice di correlazione per il Ni tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancras). Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	0,86	0,40	0,99	0,99	0,98	0,94	1,00
TOT	0,26	-0,07	0,48	0,50	0,42	0,60	0,51
ST	0,29	-0,06	0,50	0,52	0,45	0,63	0,53
EPT	-0,03	-0,25	-0,01	0,04	-0,08	0,07	-0,02

La matrice di correlazione riportata in Tabella 30, mostra buoni coefficienti di correlazione tra la concentrazione di Ni nei tessuti extraghiandolari

Nei campioni del 2009, non si evidenziano correlazioni significative tra questi parametri e le varie fasi geochimiche, tuttavia è molto significativa la correlazione tra concentrazione totale di Ni nei sedimenti e concentrazione nei tessuti degli organismi. Considerando la tossicità di questo elemento, si può ipotizzare che non venga processato dall'organismo, ma si accumuli come inquinante, confermando quanto osservato al paragrafo 4.3.

Per i campioni del 2011, la matrice di correlazione mette in evidenza valori di r significativi tra la concentrazione totale di Ni nei sedimenti e le fasi terza, quarta e residuale, ovvero quelle più rappresentate.

Rame

Nelle Tabelle 31 e 32 sono riportati i valori di concentrazione di Cu nelle varie fasi geochimiche dei sedimenti campionati nel 2009 e nel 2011. Le Figure 45 e 46 mostrano invece la ripartizione percentuale del Cu tra le varie fasi.

Tabella 31 - Campionamento 2009: 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 Cr nei sedimenti.

Cu	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	MEDIA	SD	RESA %
A		0,52	0,32	0,61	2,33	1,26	5,03			
	0,45	0,57	0,34	0,77	2,83	1,22	6,18	5,71	0,60	85,3
	0,41	0,50	0,33	0,55	3,00	1,13	5,92			
B	0,53	2,01	0,23	0,70	9,78	3,84	17,1	17,1		84,1
E	0,25	0,44	0,29	0,53	3,25	1,42	6,18	6,18		89,4
H	0,82	4,22	1,47	0,33	11,39	2,98	21,2			
	0,84	4,02	1,38	1,00	11,33	3,30	21,9	21,5	0,33	93,4
	0,85	3,83	1,32	1,32	10,22	3,84	21,4			
MR	0,59	0,76	0,76	0,58	2,67	1,51	6,87			
	0,49	0,79	0,93	0,45	2,68	1,77	7,11	7,12	0,25	90,4
	0,56	0,78	0,85	0,47	2,92	1,78	7,37			
VL	0,36	0,60	0,77	0,61	2,29	2,34	6,96	6,96		98,5
ZI	5,54	23,3	5,30	2,68	42,8	5,24	84,8	84,8		80,8

Tabella 32 - Campionamento 2011: 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 Cr nei sedimenti.

Cu	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	RESA %
A	0,19	0,72	0,02	0,83	4,18	3,07	9,01	85,5
B	0,46	1,01	0,03	0,78	8,90	2,87	14,1	89,8
H	0,41	8,70	0,07	1,11	1,76	2,53	14,6	-
MR	1,05	2,15	0,93	1,48	3,85	4,64	14,1	95,1
VL	0,83	1,18	0,61	1,79	2,04	3,23	9,67	114
SC	1,85	5,51	2,49	1,91	9,25	8,68	29,7	110

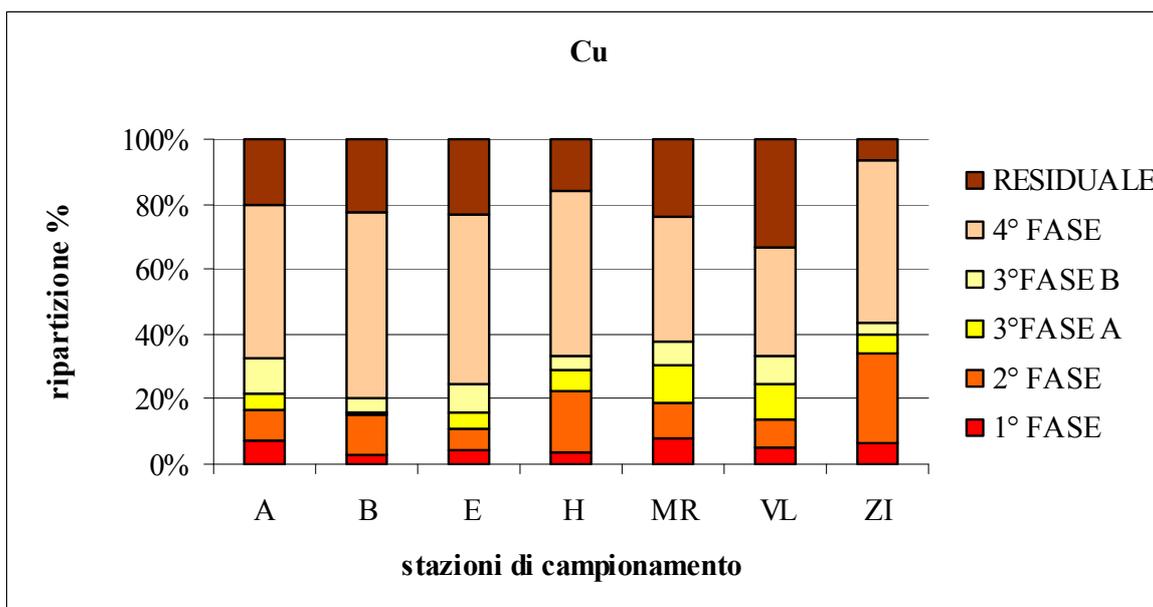


Figura 45 – Campionamento 2009: distribuzione percentuale del Cu nelle varie fasi geochimiche.

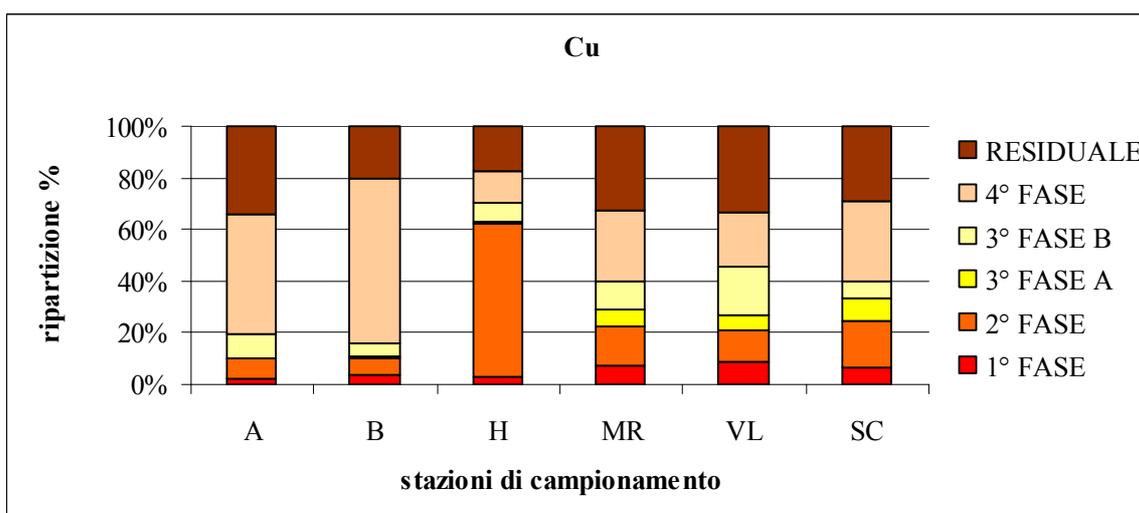


Figura 46 – Campionamento 2011: distribuzione percentuale del Cu nelle varie fasi geochimiche.

Per quanto riguarda i campioni del 2009, la distribuzione del metallo tra le fasi geochimiche nelle varie aree è abbastanza simile in quanto il Cu è presente in tutte le fasi con differenze più o meno significative nella distribuzione tra di esse, differenze probabilmente associate alla diversa tessitura del sedimento.

Risulta inoltre evidente che una frazione preponderante (circa 35-60%) di tale metallo è associata alla quarta fase, in conformità con quanto riportato in altri lavori di letteratura (Argese & Bettiol, 2001; Argese *et al.*, 2002) dove è dimostrato che il Cu ha una grande affinità con la quarta fase: una

motivazione per cui il Cu trova nella quarta fase una forma associativa preferenziale è sicuramente da ricercarsi nella forte affinità chimica esistente tra il Cu e la materia organica, dovuta alla formazione di organo complessi stabili tra metallo e acidi umici e fulvici, i quali contenendo gruppi idrossilici e carbossilici sono in grado di chelare il metallo. Tale frazione si rende biodisponibile quando il sedimento è sottoposto a forti condizioni ossidanti.

La frazione restante (circa 40-65%) si trova distribuita tra le fasi geochimiche rimanenti, in particolare dal 5 al 10% si trova associato alla prima fase e tra il 10 e il 30% si trova in fase residuale.

La quantità di Cu presente sotto forma direttamente scambiabile intervalla tra 0.25 e 0.83 mg/kg, a seconda del sito considerato. La frazione di Cu potenzialmente mobilizzabile in ambiente leggermente acido (seconda fase) intervalla tra 0.44 e 4.02 mg/kg (escludendo la Zona Industriale, dove il valore è nettamente maggiore), mentre quella potenzialmente biodisponibile in condizioni più o meno riducenti varia tra 0.82 e 2.27 mg/kg (sempre escludendo il campione ZI). Infine, risulta essere presente una parte significativa di Cu associato alla fase residuale (1.20-5.24 mg/kg), con i valori più alti associati alle aree della Zona Industriale e del Delta del Po; in queste ultime aree si riscontrano anche i livelli più bassi di Cu associato alla sostanza organica. Tali risultati sono attribuibili alla tessitura del sedimento che caratterizza tali aree, di natura prevalentemente sabbiosa a minor contenuto di sostanza organica.

La ripetizione delle analisi nel 2011 ha riconfermato quanto rilevato per il 2009; sebbene si notino alcune differenze nella distribuzione del metallo all'interno delle diverse fasi geochimiche nelle varie aree. In generale, si conferma la forte affinità del Cu per la quarta fase, anche se il suddetto metallo è risultato essere associato alla fase residuale con una percentuale più alta rispetto al 2009. Inoltre, la stazione H mostra una netta preponderanza del Cu associato alla seconda fase, risultato che può essere spiegato se si considera la granulometria di quella stazione, l'unica a mostrare una distribuzione percentuale omogenea delle tre componenti sabbia, silt e argilla (Figura 32):

Nelle Tabelle 33 e 34 sono riportati i risultati delle analisi di correlazione per i campioni del 2009 e del 2011: si notino nella Tabella 33 gli alti valori di r tra le componenti granulometriche e tutte le fasi geochimiche a parte la fase 3A; in particolare, i valori sono negativi per quanto riguarda la sabbia e positivi per la componente fine, confermando l'ipotesi che la differenza di distribuzione tra le varie aree è effettivamente dovuta alla tessitura del sedimento

Tabella 33 – Campionamento 2009: matrice di correlazione per il Cu tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas) e la percentuale granulometrica di sedimenti fini (argilla + silt) e di sabbia. Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	0,80	0,94	0,40	0,86	1,00	0,91	1,00
TOT	0,00	-0,21	-0,16	0,09	-0,26	-0,29	-0,24
ST	-0,01	-0,21	-0,33	0,06	-0,16	-0,24	-0,17
EPT	-0,35	-0,40	0,18	-0,18	-0,64	-0,52	-0,61
%SED FINI	0,70	0,87	0,22	0,83	0,99	0,90	0,98
%SABBIA	-0,70	-0,87	-0,22	-0,83	-0,99	-0,90	-0,98

Tabella 34 – Campionamento 2011: matrice di correlazione per il Cu tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas). Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	0,82	0,05	0,85	0,42	0,86	0,91	1,00
TOT	-0,43	-0,61	-0,31	-0,61	0,25	-0,16	0,03
ST	-0,21	-0,66	-0,09	-0,33	0,18	0,02	0,11
EPT	-0,69	-0,30	-0,62	-0,95	0,24	-0,46	-0,17

Per quanto riguarda i campioni del 2011, gli alti valori del coefficiente di correlazione riscontrato tra concentrazione di Cu totale nei sedimenti e concentrazione in prima e terza fase sono dovuti al fatto che all'aumentare della concentrazione totale di questo metallo aumenta anche la sua porzione biodisponibile e quella associata ad ossidi di Fe; l'alto valore di r tra la concentrazione di Cu nella quarta fase e la sua concentrazione totale nel sedimento è ulteriore conferma di quanto osservato in precedenza in relazione all'elevata affinità di questo metallo per la sostanza organica.

Zinco

In Tabella 35 sono riportati i valori di concentrazione di Zn nelle varie fasi geochimiche per i campioni raccolti nel 2009, mentre in Tabella 36 sono mostrati i valori medi di concentrazione nelle fasi per i campioni del 2011. Le Figure 47 e 48 mostrano invece le ripartizioni percentuali dello Zn tra le diverse fasi geochimiche, rispettivamente per il 2009 e per il 2011.

Tabella 35 - Campionamento 2009: 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 Cr nei sedimenti.

Zn	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	MEDIA	SD	RESA %
A		18,3	19,6	22,3	15,1	12,6	87,8			
	16,6	18,3	20,0	20,7	16,0	12,3	104	97,2	8,39	110
	16,2	17,1	20,4	23,6	15,1	7,41	100			
B	11,4	26,3	29,8	29,9	15,1	26,7	139	139		150
E	6,24	11,7	21,7	29,8	20,4	16,9	107	107		135
H	5,83	14,3	20,7	47,7	19,6	34,1	142			
	5,91	13,4	20,7	34,0	18,5	31,8	124	130	10,4	102
	5,52	13,3	20,7	38,8	15,8	30,2	124			
MR	6,10	12,3	28,1	25,8	18,9	14,7	106			
	6,27	13,9	20,8	45,9	17,6	16,3	121	110	9,77	120
	7,09	14,0	20,7	26,0	16,8	17,9	102			
VL	5,17	11,4	26,4	31,3	20,5	25,7	121	121		108
ZI	270	332	120	48,7	41,0	21,6	835	835		99,6

Tabella 36 - Campionamento 2011: 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 Cr nei sedimenti.

Zn	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	RESA %
A	9,12	25,1	24,6	32,1	16,8	< L.O.D.	108	136
B	10,2	37,4	12,9	25,8	22,9	12,0	121	-
H	7,12	12,9	13,4	18,1	14,6	< L.O.D.	66,1	138
MR	6,61	22,2	24,3	27,5	29,1	< L.O.D.	110	89,8
VL	7,31	17,4	20,7	26,8	13,5	< L.O.D.	85,7	127
SC	6,94	34,1	24,8	23,4	23,5	41,2	154	108

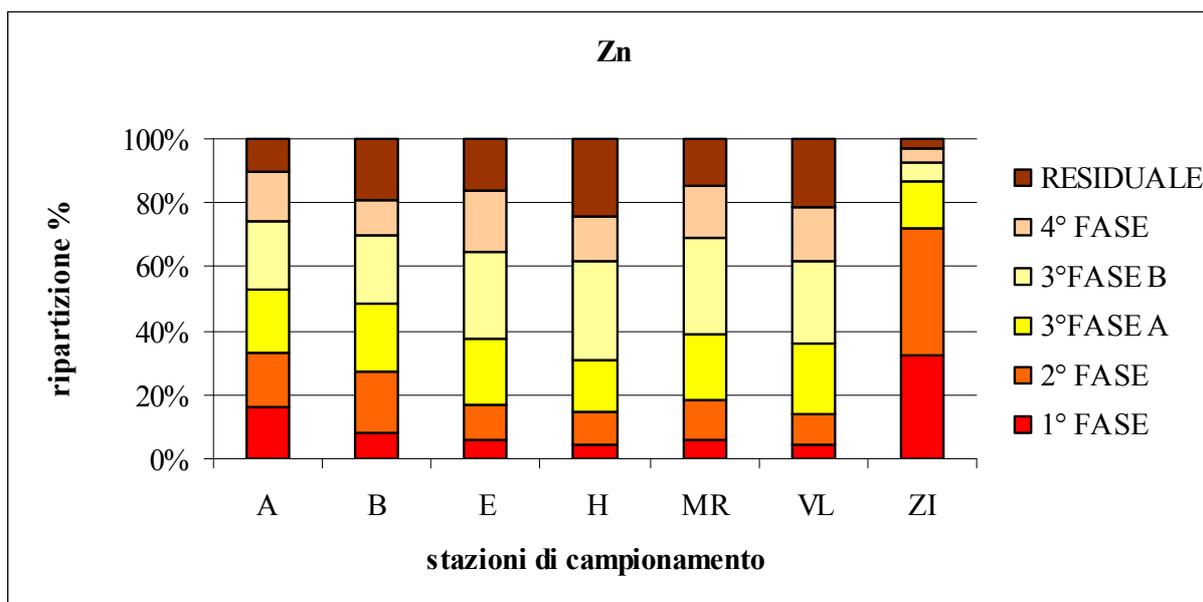


Figura 47 – Campionamento 2009: distribuzione percentuale dello Zn nelle varie fasi geochimiche.

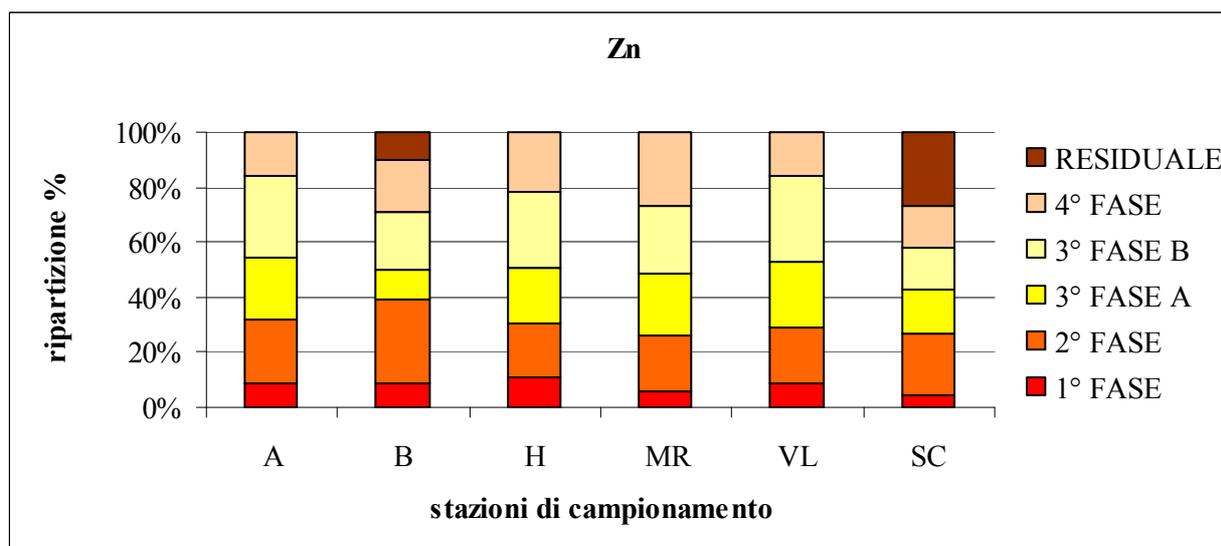


Figura 48 – Campionamento 2011: distribuzione percentuale dello Zn nelle varie fasi geochimiche.

Considerando tabella e grafico relativi al 2009, si può osservare che in generale, se si esclude la Zona Industriale, questo metallo appare distribuito uniformemente su tutte le fasi e su tutte le aree, con più o meno piccole differenze a seconda della stazione considerata.

La frazione maggioritaria è quella potenzialmente biodisponibile (all'interno della quale è prevalente la terza fase) che rappresenta circa il 75% del totale. La frazione residuale varia tra circa il 10 e il 20%, a seconda del sito di campionamento. A differenza degli altri metalli, lo Zn ha una

significativa presenza nella fase direttamente scambiabile, evidente soprattutto nel campione della Zona Industriale.

Come il Ni, anche lo Zn si trova quasi equamente distribuito tra le varie fasi geochimiche, dimostrando così l'assenza di forme associative preferenziali con particolari componenti del sedimento.

Lo Zn è un elemento ubiquitario, e tra i metalli estratti uno dei più facilmente mobilizzabili, fortemente soggetto a contaminazione. Ecco perché molto raramente i campioni testati per questo metallo sono riproducibili nel tempo. Comunque, la distribuzione di Zn dei campioni del 2011 tra le fasi geochimiche è abbastanza uniforme nelle diverse aree. Tuttavia rispetto ai campioni dell'annata precedente, la frazione di Zn associata alla fase residuale diminuisce (è nulla nelle stazioni A, H, MR, VL) e aumenta quella associata alla prima e alla seconda fase.

Nelle Tabelle 37 e 38 sono riportati i risultati delle analisi di correlazione sulle due annate.

Tabella 37 – Campionamento 2009: matrice di correlazione per lo Zn tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas) e la percentuale granulometrica di sedimenti fini (argilla + silt) e di sabbia. Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	-0,42	-0,21	-0,03	0,75	0,13	0,80	1,00
TOT	0,02	0,03	0,23	-0,20	-0,16	-0,42	-0,32
ST	0,03	0,07	0,27	-0,21	-0,18	-0,40	-0,33
EPT	0,20	-0,27	-0,27	-0,43	-0,06	-0,73	-0,36
%SED FINI	0,07	0,62	0,30	0,48	-0,49	0,72	0,45
% SABBIA	-0,07	-0,62	-0,30	-0,48	0,49	-0,72	-0,45

Tabella 38 – Campionamento 2011: matrice di correlazione per lo Zn tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas) e la percentuale granulometrica di sedimenti fini (argilla + silt) e di sabbia. Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	0,56	0,90	-0,22	0,12	0,63	0,46	1,00
TOT	0,26	0,08	0,66	0,86	0,02	-0,22	-0,18
ST	0,28	0,06	0,65	0,87	-0,02	-0,25	-0,20
EPT	-0,02	0,18	0,65	0,48	0,46	0,07	-0,04

Per quanto concerne i campioni del 2009, le uniche correlazioni significative ad emergere riguardano la relazione tra la concentrazione di Zn totale nei sedimenti e la concentrazione nella

terza fase e nella fase residuale, che sono comunque quelle maggiormente rappresentate nella distribuzione percentuale.

Nel caso dei campioni del 2011, i valori di r tendono a confermare l'andamento mostrato nella Figura 48, soprattutto per quanto riguarda la correlazione tra concentrazione totale di Zn nei sedimenti e concentrazione in seconda fase, essendo quest'ultima ben rappresentata (10-30%).

La correlazione tra concentrazione di Zn nei tessuti degli organismi e la concentrazione in terza fase, potrebbe indicare che la biodisponibilità di questo metallo tende a svilupparsi soprattutto in condizione anossiche.

Cadmio

Nelle Tabelle 39 e 40 sono riportati i valori di concentrazione di Cd riscontrati nelle diverse fasi geochimiche, rispettivamente per il campionamento del 2009 e per quello del 2011. Nelle Figure 49 e 50 sono invece mostrate graficamente le distribuzioni percentuali di Cd tra le varie fasi del sedimento.

Tabella 39 - Campionamento 2009: 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 Cr nei sedimenti.

Cd	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	MEDIA	SD	RESA %
A		0,11	0,02	0,00	0,01	< L.O.D.	0,14			
	0,20	0,10	0,02	0,01	0,01	0,03	0,37	0,28	0,12	94,8
	0,20	0,10	0,02	0,00	0,01	< L.O.D.	0,32			
B	0,23	0,34	0,06	0,00	0,01	0,05	0,68	0,68		117
E	0,08	0,06	0,01	0,00	0,00	< L.O.D.	0,14	0,14		103
H	0,09	0,11	0,01	0,00	0,01	< L.O.D.	0,22			
	0,09	0,10	0,01	0,00	0,01	< L.O.D.	0,21	0,21	0,01	103
	0,08	0,11	0,01	0,00	0,00	< L.O.D.	0,21			
MR	0,06	0,03	0,00	0,01	0,01	< L.O.D.	0,11			
	0,05	0,03	0,00	0,01	0,00	< L.O.D.	0,09	0,11	0,01	89,6
	0,05	0,04	0,01	0,01	0,01	< L.O.D.	0,12			
VL	0,04	0,03	0,00	0,01	0,01	< L.O.D.	0,09	0,09		85,7
ZI	1,79	2,33	0,16	0,02	0,14	0,09	4,52	4,52		59,3

Tabella 40 - Campionamento 2011: 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 Cr nei sedimenti.

Cd	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	RESA %
A	0,09	0,07	0,01	0,10	0,06	0,02	0,34	-
B	0,13	0,09	0,01	0,01	0,02	0,01	0,27	113
H	0,06	0,03	0,01	0,01	0,01	0,03	0,15	-
MR	0,07	0,04	0,01	0,01	0,02	0,02	0,17	-
VL	0,04	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,12	-
SC	0,07	0,07	0,02	0,01	0,02	0,01	0,19	117

In riferimento ai campioni del 2011, le concentrazioni di Cd presenti nella maggior parte delle fasi geochimiche sono talmente basse da risultare dello stesso ordine di grandezza del valore del bianco reagenti. Ciò comporta deviazioni standard molto alte, che determinano rese percentuali che si discostano notevolmente da quella teorica. Ciononostante, a scopo di confronto, sono stati riportate le percentuali di ripartizione tra le varie fasi geochimiche.

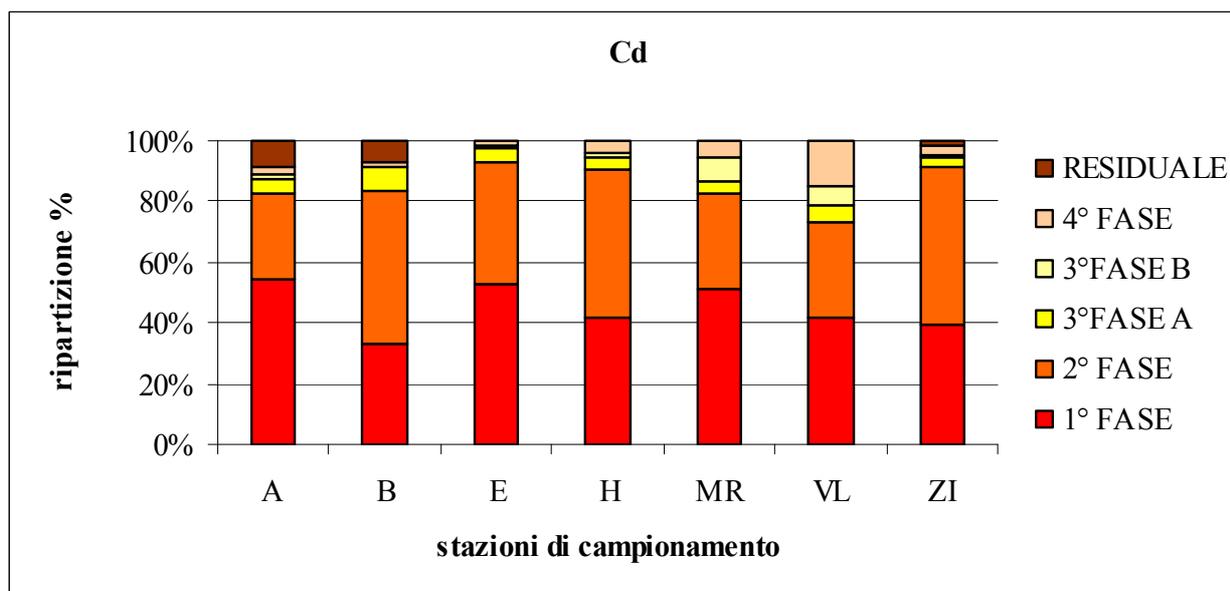


Figura 49 – Campionamento 2009: distribuzione percentuale del Cd nelle varie fasi geochimiche.

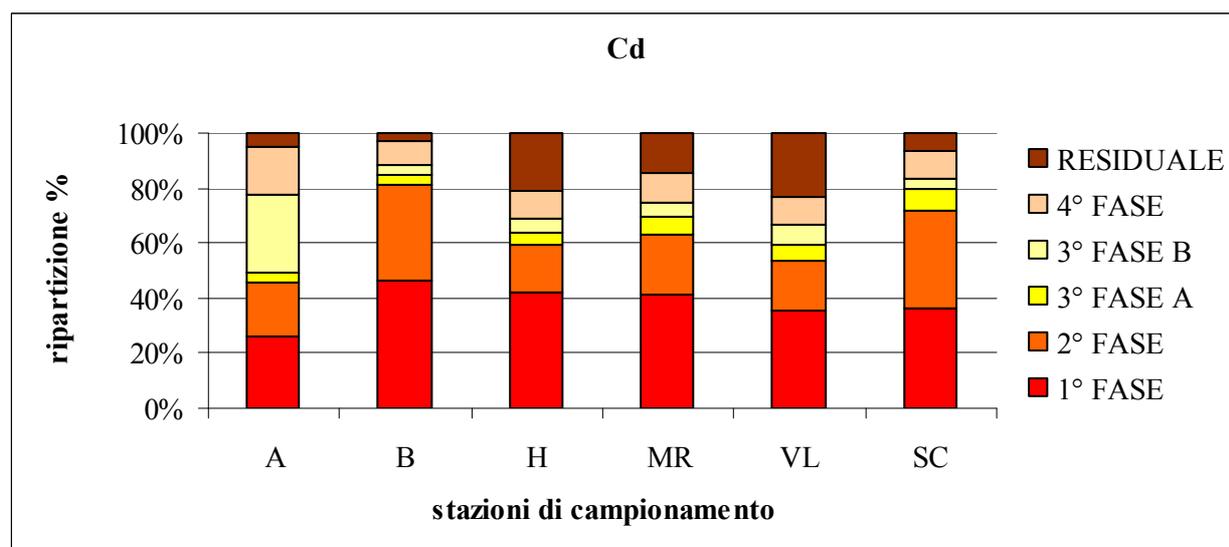


Figura 50 – Campionamento 2011: distribuzione percentuale del Cd nelle varie fasi geochimiche.

La distribuzione tra le fasi si presenta abbastanza simile, con la frazione maggioritaria del metallo ripartita tra prima e seconda fase, ovvero le fasi considerate più “mobili” e biodisponibili. In generale, pur con leggere differenze a seconda della stazione considerata si raggiungono valori percentuali di oltre 80%. La frazione di Cd associata alla terza fase oscilla circa tra il 5 e il 10%, mentre per quanto riguarda la quarta fase, i valori di distribuzione percentuale oscillano tra circa il 3 e il 15%, e solo le stazioni A (Laguna di Venezia centrale) e B (Laguna di Venezia nord) hanno rilevato una certa quantità di Cd presente nella fase residuale.

I campioni del 2011 presentano una ripartizione percentuale tra le diverse fasi geochimiche che ricalca quella riscontrata nei campioni del 2009: un'importante frazione del metallo si presenta sottoforma direttamente scambiabile (25-45%), e comunque la parte predominante si trova associata tra prima e seconda fase (40-80%). Rispetto ai campioni del 2009, aumenta leggermente la frazione di Cd associata alla fase residuale.

Il Cd è sicuramente il metallo più biodisponibile tra quelli testati, anche se va ricordato che le concentrazioni misurate nei sedimenti e negli organismi sono tra le più basse.

Nelle Tabelle 41 e 42 sono riassunti i risultati delle analisi di correlazione condotte sulle due annate

Tabella 41 – Campionamento 2009: matrice di correlazione per il Cd tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas) e la percentuale granulometrica di sedimenti fini (argilla + silt) e di sabbia. Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	SED
SED	0,91	0,98	0,99	-0,37	-0,20	1,00
TOT	0,40	0,78	0,66	-0,38	-0,07	0,69
ST	0,44	0,81	0,68	-0,51	-0,01	0,71
EPT	-0,37	-0,25	-0,25	0,56	-0,16	-0,28
%SED FINI	0,50	0,77	0,64	-0,57	-0,04	0,70
% SABBIA	-0,50	-0,77	-0,64	0,57	0,04	-0,70

Tabella 42 – Campionamento 2011: matrice di correlazione per il Cd tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas). Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	0,95	0,97	0,50	0,08	0,29	-0,92	1,00
TOT	0,93	0,86	0,27	0,19	0,34	-0,78	0,88
ST	0,94	0,87	0,26	0,18	0,33	-0,78	0,89
EPT	0,52	0,61	0,35	0,32	0,40	-0,62	0,51

Per i campioni del 2009, si può notare la forte correlazione positiva tra la concentrazione totale di Cd nei sedimenti e le prime 3 fasi, ovvero quelle più biodisponibili.

È interessante notare, osservando anche i grafici delle Figure 36 e 37 relativi al contenuto di Cd negli organismi, che l'elevata presenza di questo metallo in prima e seconda fase ha portato evidentemente l'organismo ad una buona "gestione" del metallo. Dal punto di vista tossicologico,

infatti, il Cd è un metallo che facilmente viene assorbito e bioaccumulato, ma anche processato, rientrando nel pattern dei metalli pesanti che danno induzione genetica per le proteine detossificanti.

Di nuovo, i valori dell'indice di correlazione per i campioni del 2011 confermano l'andamento della distribuzione percentuale, evidenziando forti valori di correlazione tra concentrazione totale di Cd nei sedimenti (e come ci si aspettava anche negli organismi) e concentrazione dello stesso in prima e seconda fase. Parallelamente, si notino i valori di r forti negativi con la concentrazione in fase residuale, scarsamente rappresentata in tutte le aree.

Piombo

Nelle Tabelle 43 e 44 sono riportati i valori di concentrazione di Pb nelle diverse fasi geochimiche, per i campioni del 2009 e per quelli del 2011. Le Figure 51 e 52 mostrano invece la ripartizione percentuale del metallo tra le fasi.

Tabella 43 - Campionamento 2009: 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 Cr nei sedimenti.

Pb	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	MEDIA	SD	RESA %
A		3,11	1,53	0,42	0,39	8,99	14,4	13,6	0,74	84,1
	0,22	3,21	1,50	0,46	0,32	7,60	13,3			
	0,19	3,14	1,53	0,43	0,36	7,43	13,1			
B	0,16	4,78	5,13	0,61	0,36	8,69	19,7	19,7		75,6
E	0,09	1,55	1,62	0,46	0,14	8,04	11,9	11,9		89,8
H	0,19	6,31	4,49	1,34	0,52	8,68	21,5	22,0	0,57	67,1
	0,19	5,95	4,57	1,10	0,54	9,40	21,8			
	0,19	5,64	5,08	1,41	0,30	9,99	22,6			
MR	0,12	3,02	1,78	0,78	0,85	9,42	16,0	15,6	0,31	76,4
	0,11	3,43	1,73	0,74	0,63	8,83	15,5			
	0,08	3,40	1,61	0,75	0,39	9,18	15,4			
VL	0,12	2,23	1,79	1,85	1,16	11,7	18,9	18,9		85,2
ZI	28,9	28,0	25,1	3,01	3,29	13,2	101	101		99,8

Tabella 44 - Campionamento 2011: 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 Cr nei sedimenti.

Pb	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	RESA %
A	0,28	3,38	1,18	0,96	2,23	6,35	14,4	101
B	0,29	6,27	0,99	0,40	4,20	3,01	15,2	87,6
H	0,17	2,16	0,53	0,23	0,36	4,55	8,02	112
MR	0,30	5,62	2,26	1,06	0,71	6,60	16,5	96,1
VL	0,19	3,65	1,29	0,76	0,43	5,78	12,1	91,8
SC	0,08	10,4	3,86	1,51	0,48	4,07	20,4	83,3

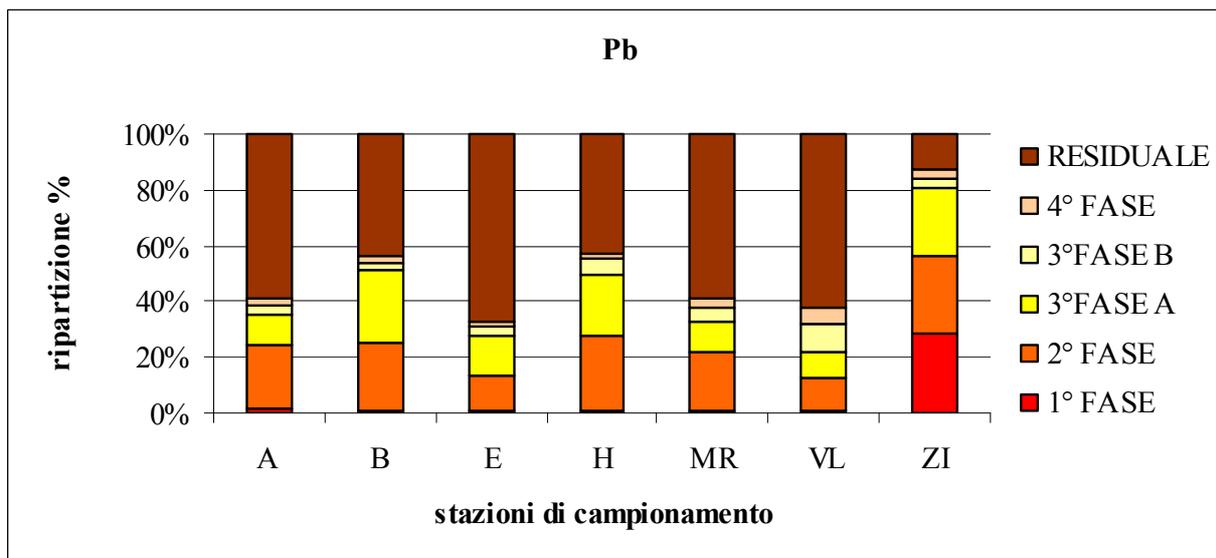


Figura 51 – Campionamento 2009: distribuzione percentuale del Pb nelle varie fasi geochimiche.

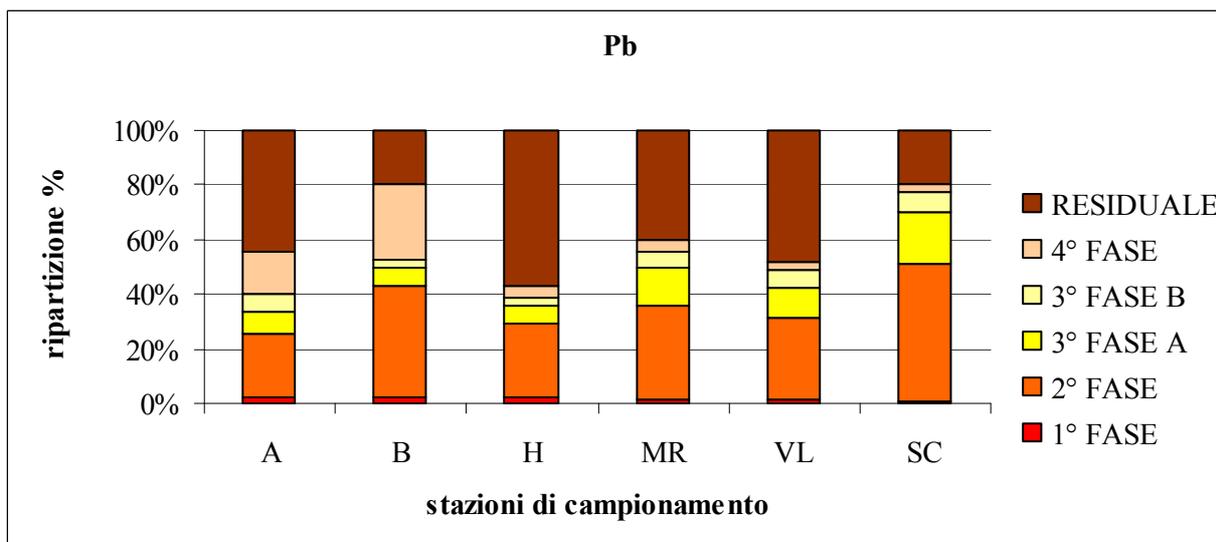


Figura 52 – Campionamento 2011: distribuzione percentuale del Pb nelle varie fasi geochimiche.

Nei campioni del 2009, si può notare come la fase più rappresentata sia quella residuale (circa 40-60%), con valori di concentrazione che oscillano tra gli 8 e i 13 mg/kg. La frazione restante si trova associata prevalentemente ai carbonati (seconda fase) e ad ossidi e idrossidi di Fe (terza fase) mentre solo una quantità minoritaria è associata alla sostanza organica (quarta fase); anche in questo caso, è generalmente trascurabile il Pb associato alla prima fase immediatamente biodisponibile, unica eccezione è rappresentata dal campione della Zona Industriale, a ulteriore conferma della spiccata pericolosità di tale area per la salute degli organismi.

Nei campioni del 2011 la distribuzione si mantiene simile a quella rilevata nei campioni del 2009, con una prevalenza (con qualche eccezione) delle frazioni associate alla seconda fase (20-50%), alla residuale (20-60%), e in misura minore alla terza fase (10-30%).

Nelle Tabelle 45 e 46 sono riportati i risultati delle analisi di correlazione per le due annate di campionamento.

Tabella 45 – Campionamento 2009: matrice di correlazione per il Pb tra le varie fasi della speciazione geochemica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas) e la percentuale granulometrica di sedimenti fini (argilla + silt) e di sabbia. Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	0,44	0,89	0,83	0,51	0,23	0,36	1,00
TOT	-0,42	0,02	-0,07	0,29	0,56	0,46	0,19
ST	-0,43	-0,01	-0,10	0,24	0,53	0,42	0,14
EPT	-0,23	0,30	0,27	0,78	0,75	0,80	0,64
%SED FINI	0,49	0,88	0,99	-0,02	-0,33	-0,16	0,79
%SABBIA	-0,49	-0,88	-0,99	0,02	0,33	0,16	-0,79

Tabella 46 – Campionamento 2011: matrice di correlazione per il Pb tra le varie fasi della speciazione geochemica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas). Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	-0,25	0,96	0,88	0,81	0,13	-0,22	1,00
TOT	0,13	0,45	0,44	0,49	0,07	0,17	0,59
ST	0,08	0,53	0,57	0,61	-0,06	0,25	0,66
EPT	0,21	0,07	-0,10	-0,04	0,39	-0,11	0,19

Per quanto riguarda il 2009, si può osservare come l'alto valore di r tra la concentrazione totale dei sedimenti e la concentrazione nella seconda e nella terza fase confermino l'andamento osservato graficamente in precedenza. Inoltre, la discreta presenza di Pb nelle fasi biodisponibili rende ragione della distribuzione di tale metallo sia in EPT che in ST, constatata dal grafico riportato in Figura 36. Infine, anche in questo caso si osservano forti correlazioni con le percentuali granulometriche (negative con la sabbia, positive con la componente fine) soprattutto per quanto riguarda seconda e terza fase, ulteriormente confermando l'innescarsi di meccanismi associativi con carbonati e ossidi e idrossidi di Fe a seconda della struttura più o meno cristallina della matrice sedimentaria considerata.

La matrice relativa ai campioni del 2011 mette in evidenza una forte correlazione tra concentrazione totale di Pb nei sedimenti e concentrazione in seconda e terza fase, generalmente ben rappresentate.

Ferro

Nelle Tabelle 47 e 48 sono riportati i valori di concentrazione di Fe riscontrati nelle varie fasi geochimiche, rispettivamente per il campionamento del 2009 e per quello del 2011. Nelle Figure 53 e 54 sono invece mostrate le ripartizioni percentuali del Fe tra le diverse fasi.

Tabella 47 - Campionamento 2009: 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 Cr nei sedimenti.

Fe	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	MEDIA	SD	RESA %
A		184	617	3280	387	4720	9200	9330	320	82,0
	0,04	171	614	2857	403	5650	9700			
	0,02	169	629	3179	366	4770	9110			
B	0,24	137	1384	3853	862	6460	12690	12690		77,9
E	0,47	260	1148	3020	347	8000	12770	12770		72,7
H	0,64	210	1297	6603	2502	12700	23360	23440	520	85,4
	1,08	191	1295	5487	2835	14200	24000			
	0,45	167	778	6601	727	14700	22960			
MR	0,21	411	922	4840	503	9780	16460	17240	2080	85,3
	0,24	423	944	4296	420	9580	15670			
	0,25	423	936	4415	254	13570	19600			
VL	0,05	302	853	6521	351	9150	17170	17170		84,4
ZI	0,35	107	1923	5651	4958	6100	18740	18740		84,5

Tabella 48 - Campionamento 2011: 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 Cr nei sedimenti.

Fe	1° FASE	2° FASE	3° FASE A	3° FASE B	4° FASE	RESID.	SOMMA	RESA %
A	< L.O.D.	267	662	6120	2100	6130	15280	80,5
B		694	859	6940	4620	4400	17500	85,0
H		556	559	3410	687	6100	11300	88,6
MR		1410	1930	8190	1120	13000	25600	92,9
VL		1060	1150	6440	930	9380	19000	90,6
SC		2090	2840	12100	1350	17800	36200	106

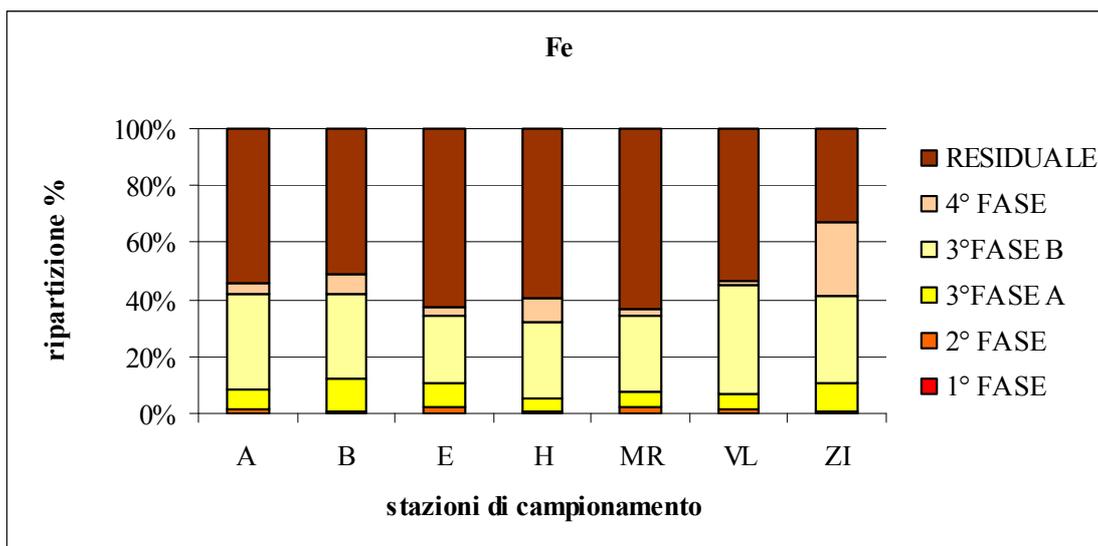


Figura 53 – Campionamento 2009: distribuzione percentuale del Fe nelle varie fasi geochimiche.

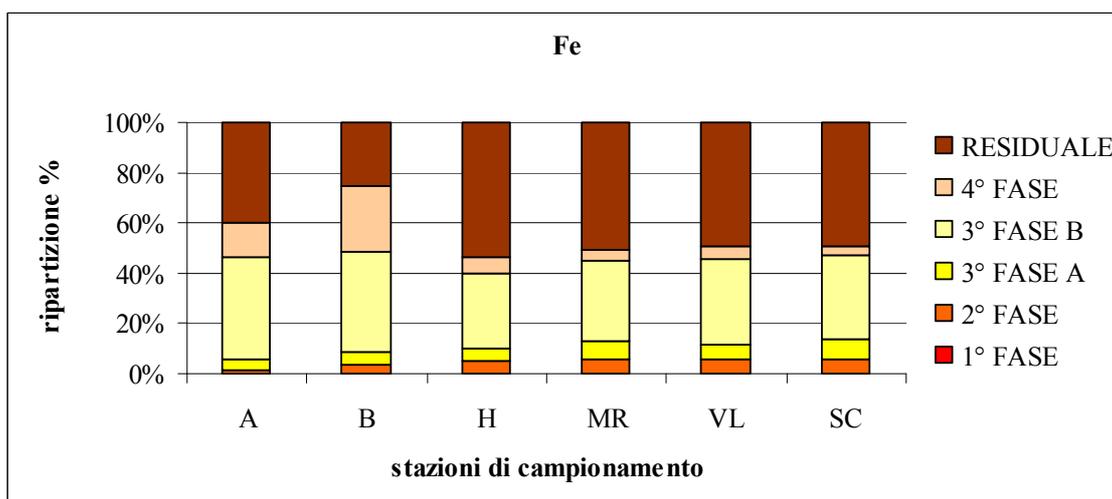


Figura 54 – Campionamento 2011: distribuzione percentuale del Fe nelle varie fasi geochimiche

Anche questo metallo appare distribuito omogeneamente sulle diverse aree, con piccole differenze tra le varie fasi sia per il 2009 che per il 2011; in particolare è assente il Fe direttamente scambiabile (prima fase) e predomina il Fe residuale su tutte le aree (a parte le stazioni A e B della serie 2011 e ZI della serie 2009). Tra le fasi potenzialmente biodisponibili predomina, come prevedibile, la terza fase, con percentuali significative ma molto minori della quarta fase, variabili a seconda del sito e dell'anno considerati. Infine una assolutamente minoritaria percentuale è rappresentata dalla seconda fase.

Tenendo conto che gli ossidi e idrossidi di Fe sono una componente importante del sedimento e che essi costituiscono una fase associativa preferenziale per la maggior parte dei metalli analizzati

(fanno eccezione Cu e Cd), e che si solubilizzano quando il sedimento si trova in condizioni anossiche, essi costituiscono una delle più importanti fonti di metalli per gli organismi marini e in particolare per quelli bentonici come *R. philippinarum*. Va sottolineato che le aree di allevamento delle vongole, proprio per la presenza massiva di questi organismi, sono frequentemente soggette a crisi anossiche, soprattutto nel periodo estivo, quando la temperatura dell'acqua aumenta e la concentrazione nella colonna d'acqua di O₂ disciolto diminuisce, in particolare nelle zone di acqua bassa.

Nelle Tabelle 49 e 50 sono riportati i risultati delle indagini statistiche di correlazione, rispettivamente per il campionamento del 2009 e per quello del 2011.

Tabella 49 – Campionamento 2009: matrice di correlazione per il Fe tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas) e la percentuale granulometrica di sedimenti fini (argilla + silt) e di sabbia. Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	1°	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	0,13	0,36	0,15	0,74	0,05	0,48	1,00
TOT	0,80	0,16	0,40	0,49	0,50	0,76	0,67
ST	0,80	0,09	0,42	0,47	0,51	0,72	0,66
EPT	0,54	0,70	0,11	0,55	0,29	0,90	0,55
%SED FINI	-0,50	-0,19	0,27	0,28	-0,19	-0,33	0,37
%SABBIA	0,50	0,19	-0,27	-0,28	0,19	0,33	-0,37

Tabella 50 – Campionamento 2011: matrice di correlazione per il Fe tra le varie fasi della speciazione geochimica e la concentrazione totale del metallo nei sedimenti (SED), la sua concentrazione negli organismi (TOT = tessuti totali, ST = tessuti molli extraghiandolari, EPT = epatopancreas). Sono evidenziati in rosso i valori di r significativi.

	2°	3°A	3°B	IV	RES	SED
SED	0,91	0,96	0,98	-0,05	0,90	1,00
TOT	0,60	0,54	0,52	0,05	0,47	0,61
ST	0,65	0,59	0,55	0,02	0,52	0,64
EPT	0,08	0,00	0,13	0,19	-0,03	0,11

Le matrici di correlazione mettono in evidenza coefficienti molto alti tra la concentrazione totale di Fe nei sedimenti e le fasi 2°, 3A, 3B, soprattutto per i campioni di sedimento del 2011 (in cui la concentrazione del metallo era più elevata). Per quanto riguarda il 2009, sebbene in quantità minima, la prima fase presenta un buon coefficiente di correlazione con la concentrazione rilevata nei tessuti extraghiandolari degli organismi e un valore significativo di r per quanto riguarda la concentrazione di Fe presente nella seconda fase e quella rilevata nell'epatopancreas, probabilmente attribuibile alla mobilizzazione del Fe associato ai carbonati quando il sedimento ingerito attraversa

l'apparato digerente delle vongole. Sempre nei campioni del 2009 si evidenzia una forte correlazione tra la concentrazione di Fe nella fase residuale e le concentrazioni nei tessuti degli organismi, in particolare in quelli ghiandolari. Questa correlazione è probabilmente dovuta al Fe residuale presente nel sedimento ingerito dall'organismo, che sosta nella ghiandola in attesa di essere espulso con le pseudofeci non potendo essere metabolizzato. Questo risultato, supportato anche da quelli ottenuti dalle analisi di bioaccumulo nelle vongole spurgate, mette in evidenza la necessità di studiare le correlazioni tra concentrazione di metalli nel sedimento e nelle varie fasi geochimiche con quelle nei tessuti degli organismi sottoposti a spurgo controllato, al fine di evitare false correlazioni ed errate conclusioni su meccanismi di bioaccumulo, biodisponibilità dei metalli, meccanismi di assunzione degli inquinanti e, in generale, sulla qualità e sicurezza alimentare del prodotto allevato.

Mercurio

I risultati dell'analisi di speciazione geochimica per il Hg hanno dimostrato che questo metallo è presente in concentrazioni molto basse, sia nei campioni del 2009 che nei campioni del 2011. In particolare, la sua concentrazione in entrambe le annate è inferiore al limite di rilevabilità dello strumento (LOD) per tutte le fasi a parte la residuale, e comunque anche in questo caso la sua concentrazione è inferiore al limite di Classe A stabilito per legge (500 ug/kg).

D'altra parte, il Hg è presente negli organismi (Figure 36 e 37) dove viene bioaccumulato significativamente nell'epatopancreas, in maniera più cospicua rispetto al resto dei tessuti.

Le principali vie di assunzione di sostanze (nutrienti e inquinanti) da parte delle vongole sono quelle associate al particolato solido (particolarmente quello più fine). Quindi le vongole possono assumere inquinanti sia dal fitoplancton, che da microorganismi animali vivi o morti, che dal sedimento. Essendo organismi filtratori, possono assumere gli inquinanti direttamente dalla fase disciolta.

Come riportato in letteratura (Han *et al.*, 2011) è noto che il Hg presente nel sedimento viene metilato e sotto tale forma assorbito dai microrganismi acquatici (batteri, fitoplancton). Una probabile via di assunzione del Hg da parte delle vongole potrebbe essere attraverso la dieta. Questa ipotesi spiegherebbe la presenza di Hg nelle vongole e contemporaneamente anche la presenza di questo metallo nella fase residuale e non biodisponibile del sedimento.

4.5 Fattore di bioaccumulo

Si rimanda al paragrafo 3.5.3 per una più completa descrizione di questo parametro e di come è stato calcolato.

In Tabella 51 sono riportati i valori del fattore calcolati per tutti i metalli considerati e per le varie stazioni di campionamento del 2009.

Tabella 51 – Campagna 2009: valori del fattore di bioaccumulo; BAF_{TOT} = rapporto tra concentrazione dei metalli nei tessuti totali degli organismi e concentrazione totale nel sedimento, BAF_{ST} = rapporto tra la concentrazione dei metalli nei tessuti extraghiandolari e la concentrazione totale nel sedimento, BAF_{EPT} = rapporto tra la concentrazione dei metalli nella ghiandola digestiva e concentrazione totale nel sedimento; sono evidenziati in rosso i valori > 1 .

		As	Cr	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Fe	Hg
A	BAF_{TOT}	2,17	0,07	0,55	1,17	0,99	0,46	0,06	0,03	1,50
	BAF_{ST}	2,59	0,08	0,68	1,31	1,20	0,61	0,07	0,03	1,87
	BAF_{EPT}	2,84	0,12	0,50	2,20	1,18	0,08	0,05	0,02	1,35
B	BAF_{TOT}	1,73	0,05	0,56	0,28	0,95	0,43	0,05	0,03	0,32
	BAF_{ST}	2,11	0,05	0,71	0,31	1,18	0,58	0,06	0,03	0,38
	BAF_{EPT}	1,87	0,06	0,43	0,52	0,87	0,11	0,04	0,02	0,44
E	BAF_{TOT}	2,47	0,03	0,23	0,70	0,97	1,02	0,07	0,03	0,98
	BAF_{ST}	2,89	0,04	0,29	0,65	1,16	1,36	0,08	0,03	1,15
	BAF_{EPT}	3,23	0,04	0,21	1,91	1,09	0,36	0,06	0,04	1,24
H	BAF_{TOT}	0,90	0,04	0,37	0,24	0,55	1,04	0,03	0,02	1,07
	BAF_{ST}	1,05	0,04	0,45	0,23	0,66	1,44	0,04	0,03	1,18
	BAF_{EPT}	1,06	0,06	0,37	0,57	0,63	0,23	0,03	0,02	1,63
MR	BAF_{TOT}	2,40	0,03	0,32	0,72	1,27	1,47	0,08	0,03	1,10
	BAF_{ST}	2,82	0,04	0,42	0,72	1,56	1,68	0,10	0,04	1,25
	BAF_{EPT}	3,06	0,02	0,18	1,62	1,23	2,16	0,05	0,02	1,64
VL	BAF_{TOT}	1,46	0,05	0,40	0,86	0,80	1,33	0,06	0,04	1,22
	BAF_{ST}	1,71	0,07	0,51	0,78	0,97	1,79	0,07	0,05	1,43
	BAF_{EPT}	1,82	0,04	0,31	2,30	0,85	0,45	0,05	0,03	1,54

Nella Tabella sono messi in evidenza i valori di BAF maggiori di 1, valore soglia indice di effettivo bioaccumulo nell'organismo. Si può notare come su tutte le stazioni venga bioaccumulato As e Hg (a parte la stazione B in Laguna di Venezia nord). In particolare, è noto (Argese *et al.*, 2009) che l'As assunto sotto forma di As inorganico, all'interno degli organismi viene organicato e accumulato prevalentemente sotto forma di arsenobetaina: ciò spiega i significativi valori del fattore di bioaccumulo riscontrati. Per quanto riguarda Cr e Ni, nonostante le elevate concentrazioni

rilevate nei sedimenti (soprattutto nelle aree del Delta del Po) sembrano non essere soggetti a bioaccumulo; infine, il Cd bioaccumula nelle stazioni in Laguna di Venezia sud (E, H) e nelle stazioni del Delta del Po (MR, VL). Questi valori confermano quanto osservato in relazione ai dati della speciazione geochimica del sedimento. Sembra inoltre che i valori di BAF_{ST} e BAF_{EPT} seguano l'andamento dei valori delle concentrazioni di bioaccumulo (si veda il paragrafo 4.3) confermando quindi la validità dei risultati.

Va sottolineato come il calcolo di questo indice sia stato effettuato su campioni non spurgati, e che dalle analisi della concentrazione di metalli negli organismi, risulta che dopo una depurazione controllata di almeno 24 ore la concentrazione degli inquinanti nei tessuti in generale tende a diminuire. Tuttavia, lo stesso indice calcolato considerando i campioni sottoposti a depurazione nel corso del 2011 mostra valori non significativamente minori rispetto al campionamento precedente, come riportato in Tabella 52.

Tabella 52 - Campagna 2011: valori del fattore di bioaccumulo BAF_{TOT} calcolato per i campioni non spurgati (NS) e spurgati 48 ore (48h); sono evidenziati in rosso i valori > 1.

		As	Cr	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Fe	Hg
A	BAF (NS)	2,06	0,03	0,87	1,90	3,06	2,67	0,10	0,06	4,63
	BAF (48h)	2,02	0,02	0,45	1,42	2,63	2,53	0,03	0,02	4,19
B	BAF (NS)	3,56	0,03	1,18	0,95	0,61	2,50	0,10	0,09	2,35
	BAF (48h)	3,23	0,02	0,92	0,91	0,42	2,13	0,03	0,03	2,29
H	BAF (NS)	3,14	0,02	1,09	1,45	2,60	2,00	0,13	0,09	6,58
	BAF (48h)	2,90	0,01	0,59	1,66	2,10	2,40	0,04	0,02	6,37
MR	BAF (NS)	2,00	0,04	0,59	0,87	1,43	3,00	0,11	0,08	9,50
	BAF (48h)	1,67	0,01	0,33	0,64	1,48	2,58	0,06	0,02	9,24
VL	BAF (NS)	3,77	0,04	0,53	1,25	2,25	4,29	0,16	0,11	-
	BAF (48h)	3,49	0,02	0,43	1,08	2,64	5,00	0,05	0,02	-
SC	BAF (NS)	2,15	0,04	0,29	0,45	1,07	2,00	0,07	0,05	5,49
	BAF (48h)	1,49	0,01	0,22	0,32	1,24	1,69	0,02	0,01	5,50

I dati riportati in tabella mostrano un andamento leggermente diverso rispetto a quello osservato per i campioni del 2009: in questo caso, i metalli a bioaccumulare maggiormente sono As, Cu, Zn e Cd e Hg che mostrano alti indici in quasi tutte le stazioni, senza particolari differenze tra l'indice calcolato sui campioni non spurgati e quello calcolato sui campioni depurati 48 ore.

4.6 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*.

In Figura 55 è riportato l'istogramma mostrante l'andamento della concentrazione media di MT nell'epatopancreas degli organismi delle stazioni considerate relativamente al campionamento del 2009.

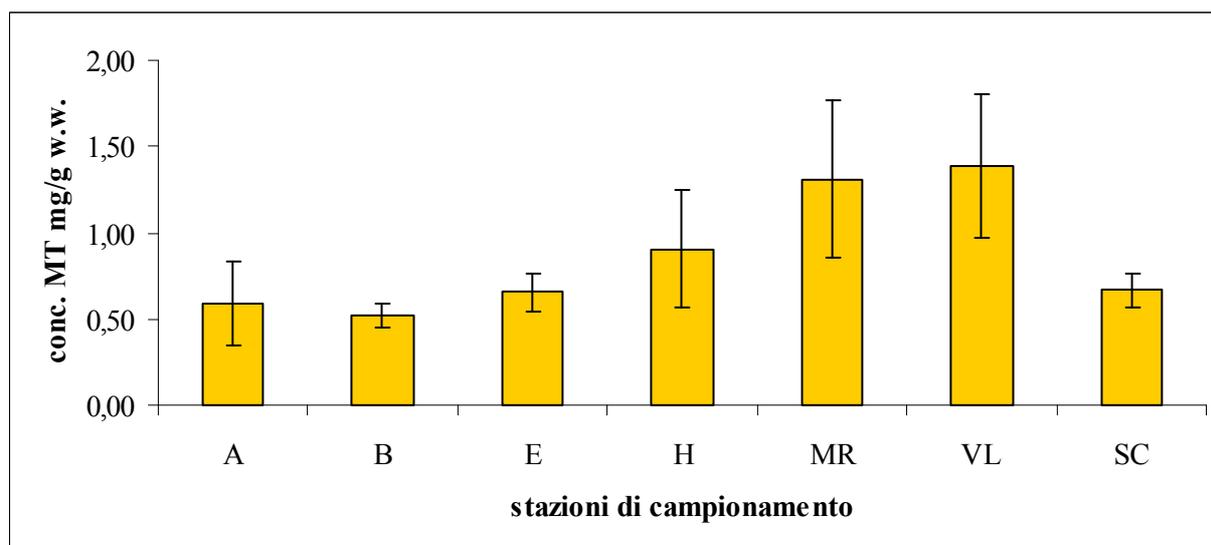


Figura 55 – Concentrazioni medie di MT nell'epatopancreas degli organismi nelle diverse stazioni relativamente all'anno 2009

Dal grafico si può notare come non siano evidenti trend significativi nell'andamento della concentrazione di queste proteine tra le varie stazioni, come confermato anche dal T test statistico che non ha evidenziato differenze significative.

Per quanto riguarda i campioni del 2011, la concentrazione di MT è stata calcolata sia per i campioni non sottoposti a spurgo, sia per i campioni spurgati 48 ore. Gli istogrammi relativi all'andamento delle concentrazioni medie sono quindi presentati in Figura 56.

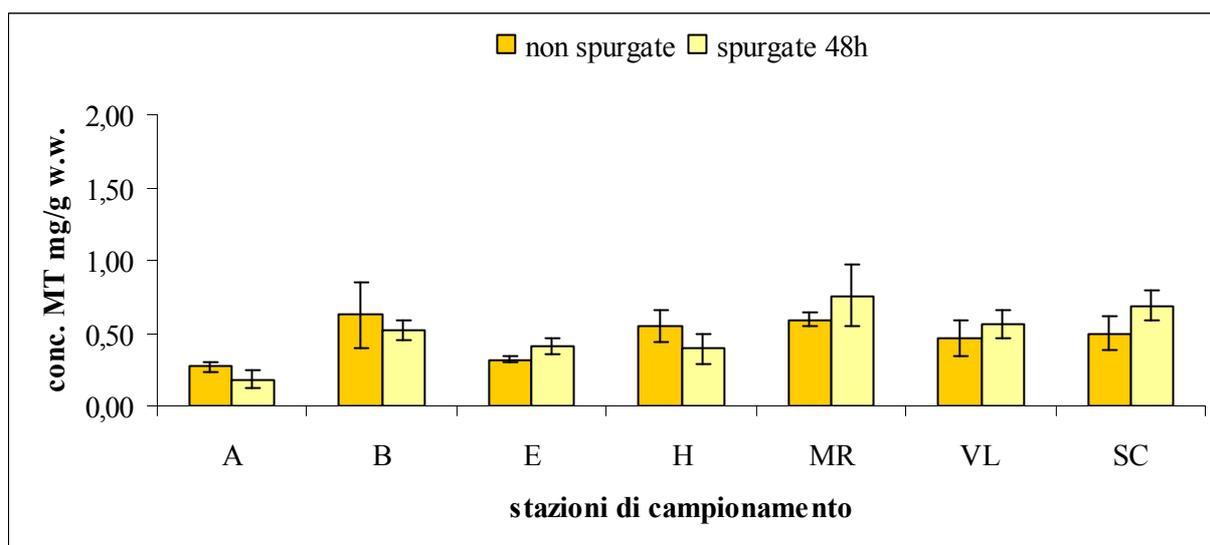


Figura 56 – Concentrazione media di MT nell’epatopancreas degli organismi nelle diverse stazioni relativamente all’anno 2011; confronto tra campioni spurgati 48 ore e campioni non spurgati

Anche in questo caso, non si evidenziano andamenti particolari nella concentrazione tra le varie stazioni, e nemmeno la depurazione controllata degli organismi sembra influenzare la loro concentrazione.

Di fatto, la bibliografia relativa alle MT nei Molluschi Bivalvi è alquanto vasta; è pertanto difficile fornire valori di riferimento di concentrazione che abbiano validità al di fuori degli studi specifici nei quali sono stati ricavati; qualsiasi confronto tra quantità di MT in tessuti di Molluschi Bivalvi presenti in letteratura deve infatti tenere in considerazione la procedura di isolamento e la non esistenza di un metodo ottimale per la quantificazione di MT nei Molluschi marini (Isani *et al.*, 2000). Quando si utilizzano MT come biomarkers di contaminazione ambientale è importante sottolineare anche come i cambiamenti nella concentrazione di MT possano essere legati a molti stimoli endogeni ed esogeni e l’interpretazione dei dati sia complicata dalla presenza di diverse isoforme; ad es. nei mitili, il rapporto tra isoforme mono- e dimeriche è molto alto nella ghiandola digestiva, intermedio nel mantello e basso nel piede e muscolo adduttore (George *et al.*, 1979; Carpenè *et al.*, 1980; Carpenè *et al.*, 1983).

Inoltre va tenuto in considerazione un aspetto temporale: è infatti possibile che non si siano registrati picchi particolari 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.

La statistica tende a supportare queste osservazioni, evidenziando differenze significative solamente nel confronto tra le serie temporali (2009 e 2011), riportato graficamente in Figura 57.

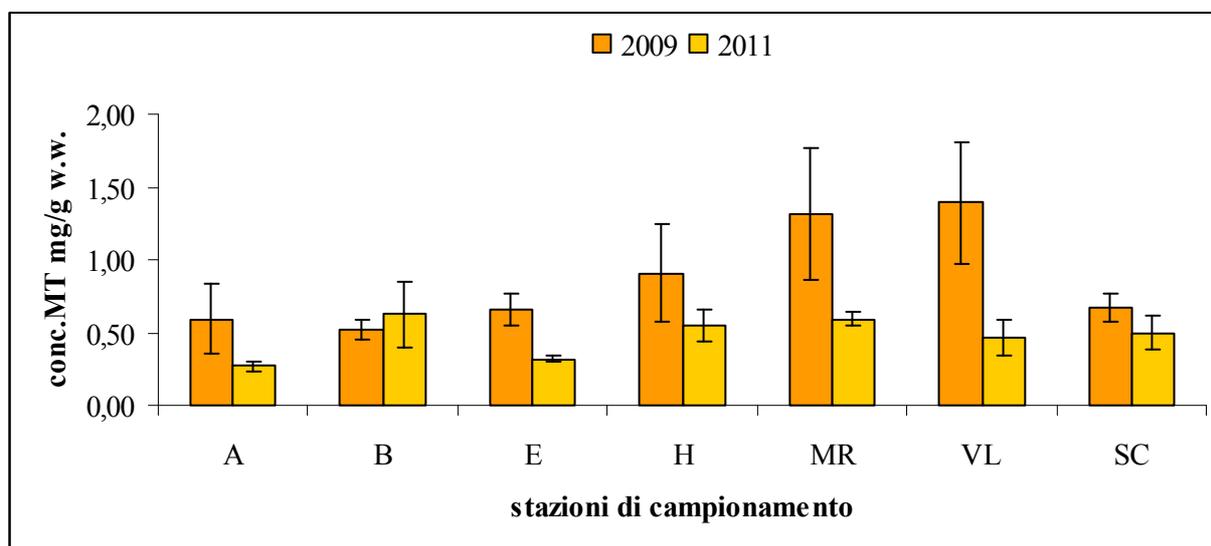


Figura 57 - Concentrazione media di MT nell'epatopancreas degli organismi nelle diverse stazioni; confronto tra le serie temporali (2009 e 2011).

Si può notare in particolare (anche ad un'analisi visiva degli istogrammi) un trend di generale diminuzione della concentrazione di MT tra il 2009 e il 2011, particolarmente significativo per le stazioni E, MR e VL ($p < 0,05$).

Sebbene dunque il dato di concentrazione per se stesso non abbia fornito informazioni particolarmente rilevanti, se correlato al contenuto di metalli (soprattutto Cd, Zn, Ni, e Cu) e alla loro ripartizione nei vari tessuti, può invece rivelare utili dettagli per meglio definire il quadro di contaminazione generale dei siti considerati.

Nello specifico, per i dati ricavati nel corso del 2009, la correlazione tra la concentrazione di MT e la concentrazione di metalli nella ghiandola, ha prodotto risultati statisticamente significativi ($r = 0.79$) solo nel caso del Ni e del Pb, risultato in parte atteso, essendo il Ni uno dei metalli essenziali il cui metabolismo viene regolato dalle MT (Amiard *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda l'analisi di correlazione tra la concentrazione di MT e la concentrazione dei metalli nel resto dei tessuti, gli unici risultati statisticamente significativi ($r > 0.70$) emergono per Cr, Ni, Fe e Pb: questo è un dato rilevante da un punto di vista ecotossicologico, in quanto conferma

il ruolo di queste proteine nella gestione metabolica dei metalli pesanti, anche in risposta a fenomeni di inquinamento cronico e costante nel tempo.

In generale, l'assenza di altre particolari correlazioni tende a suggerire che la ghiandola rappresenta la prima difesa dell'organismo nei confronti degli inquinanti inorganici, innescando la sintesi di MT, che sul breve termine, riescono a smaltire l'eccesso metabolico di metalli; tuttavia in una situazione di cronico inquinamento, è possibile che le MT (ed i metalli legati ad esse) tendano a distribuirsi anche nei tessuti extra ghiandolari; questa ipotesi deve essere confermata dallo studio della concentrazione di queste proteine anche in altri tessuti (ad esempio branchie e mantello). Per quanto riguarda il Ni, a conferma del legame di questo metallo con le proteine in questione, emerge anche una forte correlazione con la quantità di Ni biodisponibile nei sedimenti (somma delle prime quattro fasi della speciazione geochimica).

È stata condotta un'indagine per individuare eventuali correlazioni tra la concentrazione delle MT e la concentrazione negli organismi di tre metalli in particolare oltre al Ni: Cu, Zn e Cd; infatti Cu e Zn sono anch'essi metalli essenziali il cui metabolismo viene in parte regolato dalle MT, mentre il Cd è in grado di indurre la sintesi *ex novo* di MT (Isani *et al.*, 2000) ed è un forte competitore con gli altri metalli essenziali per i siti di legame sulle suddette proteine. Si è considerata la concentrazione dei metalli nella ghiandola, la loro frazione biodisponibile nel sedimento e la combinazione delle loro concentrazioni a coppie di due (nella ghiandola e nel resto dei tessuti e anche come frazione biodisponibile nel sedimento): emerge che di nuovo, l'unico metallo (o combinazione) a correlare riguarda il Ni. Si può ipotizzare che il Cd induca comunque la sintesi di MT (come è confermato dalla bibliografia sull'argomento, si veda in particolare: Isani *et al.*, 2000; Hamza *et al.*, 2000; Serafim & Bebianno, 2001; Bebianno & Serafim, 2003; Irato *et al.*, 2003; Ciocan & Rotchell, 2004; Amiard *et al.*, 2006; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2009) e che poi si inneschino meccanismi di scambio ionico e sostituzione chimica con il Ni, il quale è presente in concentrazioni molto più alte rispetto al Cd.

Le analisi di correlazione condotte sui campioni del 2011 confermano questo andamento, di nuovo evidenziando l'importanza del Ni quale metallo in questo caso preferenziale nella gestione metabolica delle MT di questi organismi. In particolare, c'è una buona correlazione ($r = 0.85$) tra la concentrazione delle MT e la concentrazione di Ni nella ghiandola degli organismi: il valore di r aumenta ($r = 0.90$) se si mette in relazione la somma delle concentrazioni di Ni e Cd con le concentrazioni delle MT. Una buona correlazione si evidenzia anche considerando la concentrazione del suddetto metallo nei tessuti extraghiandolari ($r = 0.75$) e nei tessuti *in toto* ($r = 0.85$). Per quanto riguarda le correlazioni con Cd, Cu, e Zn, emerge un forte valore di r (0.90) se si

considera la somma delle concentrazioni di Cd e Ni nella ghiandola, valore che diminuisce a 0.75 e 0.85 se si valuta la correlazione della stessa somma ma – rispettivamente – nei tessuti extraghiandolari e in quelli totali. Si evidenziano invece forti correlazioni negative considerando tutte le altre possibili combinazioni di questi metalli a coppie di due nei vari tessuti. Complessivamente, tenuto conto che Cd e Ni sono i due principali metalli tossici che inducono la sintesi di MT, mentre Cu e Zn sono invece due metalli fisiologici la cui gestione metabolica è in parte regolata dalle MT, emerge un quadro di forte *turnover* e scarso immagazzinamento di queste proteine nella ghiandola digestiva: evidentemente, l'organismo non è in grado di destinare sufficienti risorse fisiologiche per la sintesi di proteine detossificanti perché la quantità di questi metalli in ingresso nel suo metabolismo è persistente, innescando meccanismi di *downregulation*.

Tale ipotesi avvalorata quanto osservato nei paragrafi precedenti in relazione a bioaccumulo e ripartizione di metalli pesanti e speciazione geochimica, confermando un quadro generale di contaminazione cronica e continuativa, ancora in evoluzione.

I risultati sin qui ottenuti confermano che la quantificazione delle MT può essere molto utile, ma solo se integrata 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).

4.7 Condition Index (CI)

Il CI 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). Si veda anche il paragrafo 3.5.4 per una più completa descrizione di questo indice.

Nelle Figura 58 sono riportati gli istogrammi che mettono in evidenza l'andamento medio di questo parametro per tutte le stazioni considerate, confrontando il dato relativo al primo campionamento del 2009 con quello del campionamento successivo; in particolare, la figura mostra il grafico relativo al CI calcolato considerando i tessuti *in toto* degli organismi. Poiché i campioni raccolti nel 2011 sono stati sottoposti a spurgo controllato, per il confronto temporale con la serie del 2009 sono stati considerati i soli campioni non depurati.

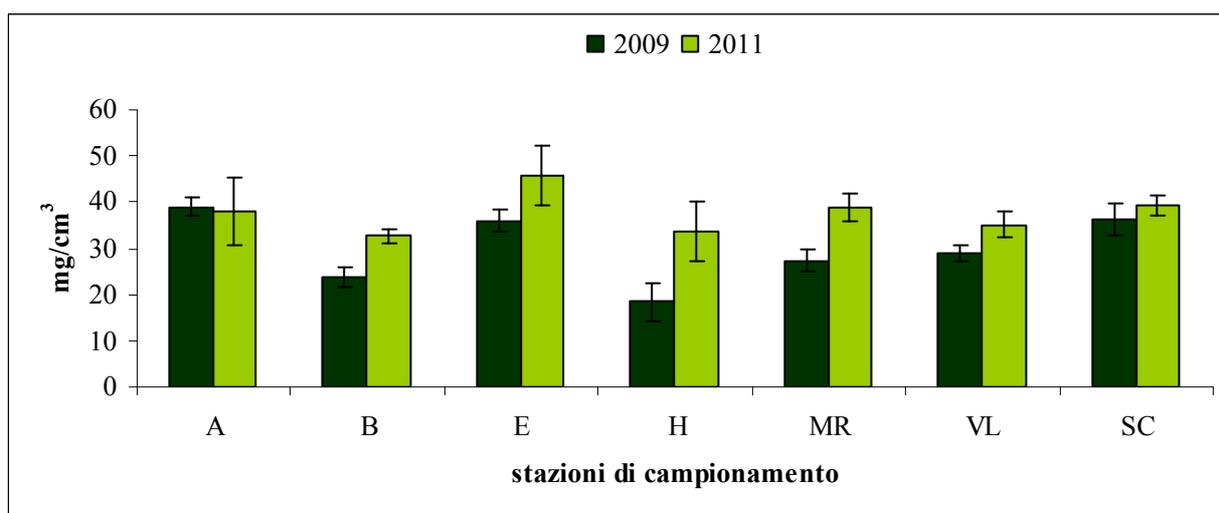


Figura 58 – Indice di condizione medio per le stazioni di campionamento in Laguna di Venezia e sul Delta del Po, calcolato considerando il peso dei tessuti totali degli organismi non sottoposti a depurazione, confronto temporale per le due serie di campionamenti.

Nella Figura 59 sono mostrati gli istogrammi di confronto, relativamente all'anno 2011, tra campioni non spurgati e campioni spurgati 48 ore; l'analisi statistica (T test) ha confermato l'assenza di differenze significative.

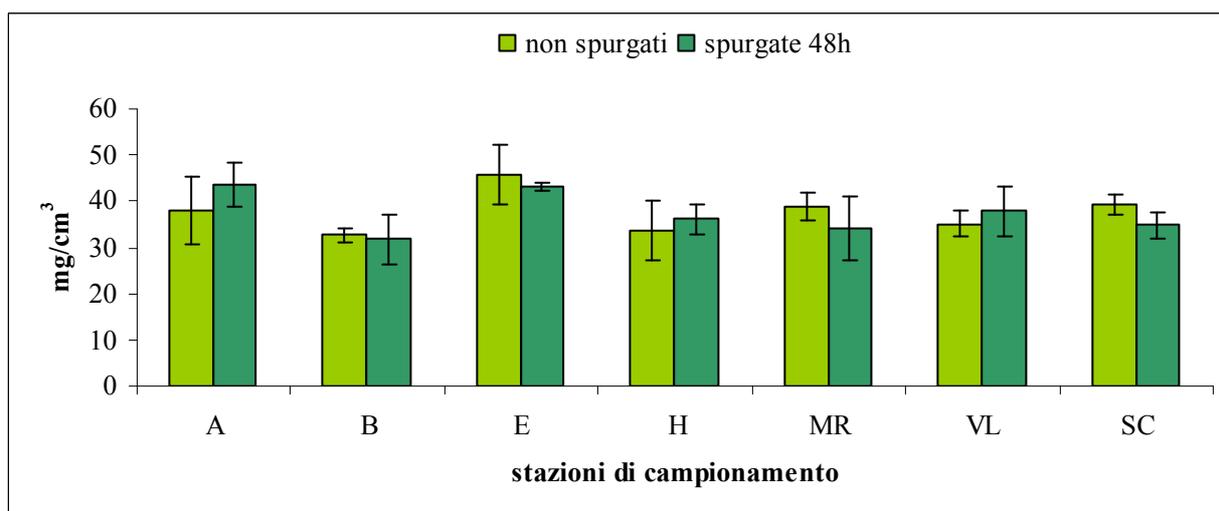


Figura 59 – Indice di condizione medio per le stazioni di campionamento in Laguna di Venezia e sul Delta del Po, confronto tra campioni non spurgati e campioni spurgati 48h.

In entrambi i casi non sono evidenti trend particolari, e dal punto di vista statistico, il T test sull'indipendenza delle variabili nella maggior parte dei casi non ha portato a valori di p significativi. Tuttavia, come si può notare anche dall'analisi degli istogrammi, la stazione B e la stazione H (rispettivamente Laguna Nord e Laguna Sud) sono quelle che si differenziano maggiormente dalle altre, mostrando un incremento significativo dell'indice tra il 2009 e il 2011; un andamento analogo e statisticamente significativo, lo si riscontra anche nelle stazioni MR e VL del Delta del Po.

In un recente studio condotto sul mitilo *Perna viridis* (Sasikumar & Krishnakumar, 2010), è stata valutata la risposta intrinseca alla variazione dei parametri ambientali di due potenziali siti per l'allevamento, caratterizzati da diversi apporti fluviali da terra; nel sito maggiormente influenzato da apporti terrigeni e quindi caratterizzato dalle peggiori condizioni ambientali relative, si evidenziava una scarsa crescita dei tessuti, testimoniata da un CI più basso, dovuta ad un diverso utilizzo dell'energia e delle riserve normalmente destinate allo sviluppo somatico. Ecco che quindi un CI medio oltre a rappresentare la generale condizione di salute dell'organismo può aiutare anche nella scelta di potenziali siti per l'attività di acquacoltura in ambienti idrologicamente raffrontabili.

Le indagini di correlazione tendono a confermare questa osservazione, mostrando una correlazione significativa e negativa ($r = -0.70$) con la percentuale granulometrica di sedimenti fini. Ciò è ulteriore prova della stretta relazione tra le caratteristiche fisiche delle matrici sedimentarie e la condizione di salute relativa degli organismi, a sua volta molto dipendente dalla diversa biodisponibilità (e di conseguenza bioaccumulo) dei vari metalli.

Lo stesso indice calcolato sui tessuti molli extraghiandolari e sul solo epatopancreas, al di là di una attesa diminuzione in valore assoluto, mostra andamenti analoghi a quelli sopra riportati, ovvero non si manifestano differenze significative tra le varie stazioni. Questo risultato indica che, nonostante gli organismi siano soggetti ad un inquinamento cronico e continuativo e tendano a bioaccumulare notevolmente metalli pesanti, come evidenziato dalle analisi precedenti, la massa relativa delle varie frazioni di tessuto considerate (soprattutto la ghiandola digestiva) non mostra variazioni significative, suggerendo dunque che tali organismi si siano ben adattati al sistema e alle aree in cui vengono allevati.

4.9 Analisi Genetiche

4.9.1. Estrazione e purificazione del DNA genomico

Il DNA genomico estratto dagli 87 campioni di tessuto prelevato dagli esemplari di *Ruditapes* sp. analizzati è risultato di elevato peso molecolare e di buona qualità, sia all'analisi spettrofotometrica, che attraverso l'analisi elettroforetica sul gel di agarosio (Figura 60).

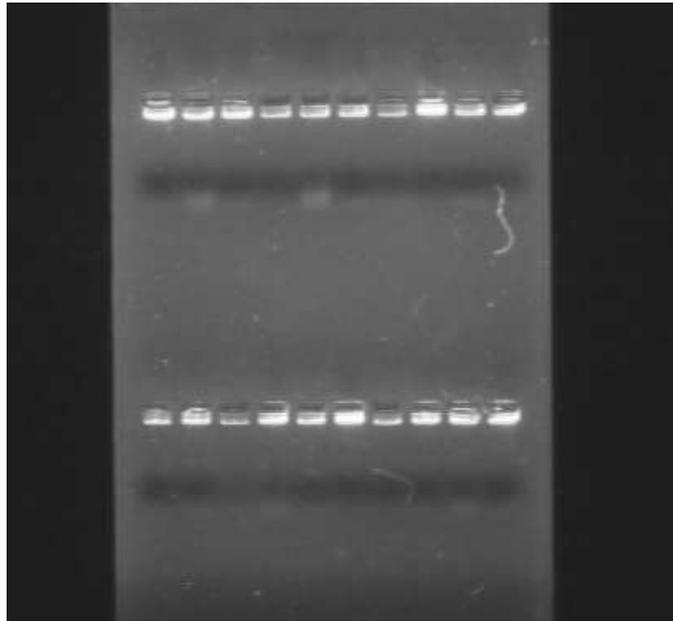


Figura 60 - Immagine di elettroforesi su gel d'agarosio all'1% visibile ai raggi ultravioletti. Il DNA genomico estratto dai tessuti di *Ruditapes* sp. si presenta di elevato peso molecolare e di buona qualità in tutti i campioni (Foto S. Chiesa).

Ciò ha permesso di effettuare l'analisi del sequenziamento diretto del gene mitocondriale *16S*rDNA e l'analisi dei sette loci microsatelliti.

4.9.2. Analisi del gene mitocondriale *16S*

Attraverso l'utilizzo dei primers specifici *16SarALT/16SbrALT* è stato possibile ottenere un amplificato di circa 600 bp in tutti i campioni analizzati, di buona qualità e concentrazione (Figura 61):

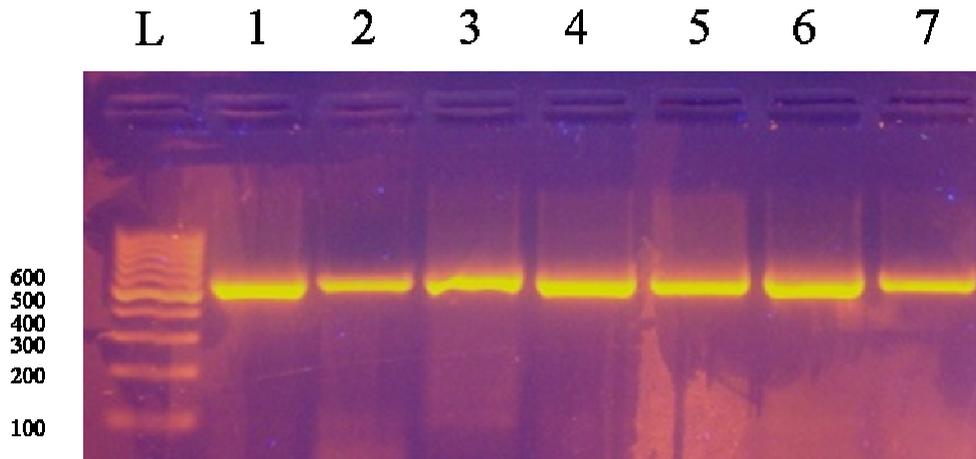


Figura 61 - Esempio di amplificato (circa 600 bp) ottenuto dal gene 16S. L = ladder, o marcatore di peso molecolare e di concentrazione (100-1000bp), 1-7 = campioni di *Ruditapes sp.* (Foto S. Chiesa).

L'analisi di sequenziamento diretto è stata condotta sul prodotto purificato della prima PCR di amplificazione: il prodotto purificato si presentava di buona qualità e concentrazione (Figura 62).

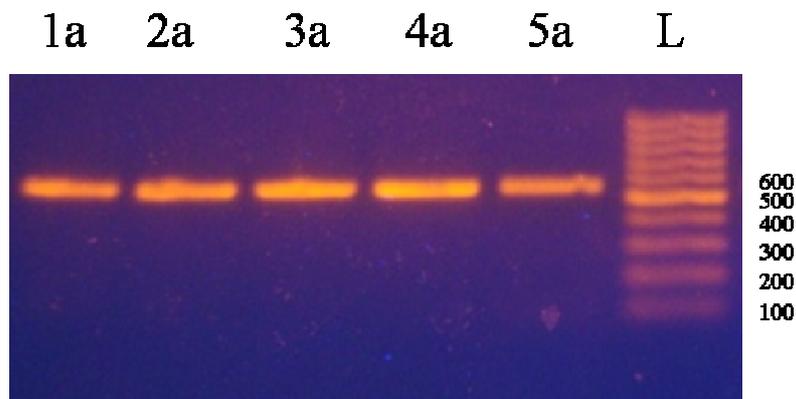


Figura 62 - Esempio di purificato (circa 600 bp) ottenuto dal gene 16S. L = ladder, o marcatore di peso molecolare e di concentrazione (100-1000bp), 1a-5a = purificati di un frammento del gene 16S di *Ruditapes sp.* (Foto S. Chiesa).

Le sequenze nucleotidiche grezze (Raw Data) sono state analizzate dal “Sequencing module” del CEQ 8000, ottenendo gli elettroferogrammi e le successioni nucleotidiche da impiegare negli altri software bioinformatici (Figura 63).



Figura 63 - Elettroferogramma e sequenza delle basi 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 (Figura 64).

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JF748736.1	Ruditapes philippinarum isolate BU12 16S ribosomal RNA (rrnL) gene,	752	752	100%	0.0	100%
JF748741.1	Ruditapes philippinarum isolate SC3 16S ribosomal RNA (rrnL) gene, p	747	747	100%	0.0	99%
JF748740.1	Ruditapes philippinarum isolate FU11 16S ribosomal RNA (rrnL) gene,	747	747	100%	0.0	99%
JF748739.1	Ruditapes philippinarum isolate PC4 16S ribosomal RNA (rrnL) gene, p	741	741	100%	0.0	99%
JF748738.1	Ruditapes philippinarum isolate PM29 16S ribosomal RNA (rrnL) gene,	741	741	100%	0.0	99%
JF748737.1	Ruditapes philippinarum isolate PM20 16S ribosomal RNA (rrnL) gene,	725	725	100%	0.0	99%
JN969951.1	Ruditapes philippinarum isolate TaRph 16S ribosomal RNA gene, parti	405	718	99%	1e-109	99%
HQ634142.1	Ruditapes philippinarum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; r	405	729	99%	1e-109	99%
DQ356383.1	Venerupis (Ruditapes) philippinarum 16S ribosomal RNA gene, partial	405	718	99%	1e-109	99%
AF484295.1	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate fTph13 female 16S riboso	405	729	99%	1e-109	99%
AF484289.1	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate fTph7 female 16S riboso	405	729	99%	1e-109	99%
AF484291.1	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate fTph9 female 16S riboso	405	729	99%	1e-109	99%
AF199467.1	Tapes philippinarum isolate TphVEN-f1 16S ribosomal RNA gene, part	405	729	99%	1e-109	99%
AF199468.1	Tapes philippinarum isolate TphVEN-f2 16S ribosomal RNA gene, part	405	729	99%	1e-109	99%
AB065375.1	Venerupis philippinarum mitochondrial DNA, complete genome, female	405	724	99%	1e-109	99%
AF484292.1	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate fTph10 female 16S riboso	399	724	99%	6e-108	99%
AF484288.1	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate fTph6 female 16S riboso	399	713	99%	6e-108	99%
AJ548765.1	Tapes philippinarum partial mitochondrial 16S rRNA gene	398	722	98%	2e-107	99%
AF484290.1	Venerupis (Ruditapes) philippinarum isolate fTph8 female 16S riboso	394	718	99%	3e-106	99%
AJ417847.1	Ruditapes philippinarum partial 16S rRNA gene	392	716	99%	1e-105	99%

Figura 64 - Esito della procedura di BLAST relativa al confronto tra la sequenza del mtDNA di riferimento per *Ruditapes philippinarum* (F-type) e la sequenza di un esemplare assegnato su base mitocondriale alla medesima specie.

Ciò consente di verificare la reale identità delle sequenze nucleotidiche ottenute, e di escludere la presenza di contaminazioni ed interferenze dovute al fenomeno della DUI (Doubly Uniparental Inheritance).

In particolare, tutte le sequenze ottenute del gene *16S* risultano omologhe alle sequenze 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, attraverso la rimozione dei gaps e il controllo degli elettroferogrammi tramite Sequencer. Le estremità 5'-3' sono state tagliate per eliminare dal dataset le aree nelle quali il sequenziamento delle basi non risultava affidabile.

L'allineamento finale comprende le 87 sequenze ottenute dai campioni, e le sequenze di riferimento di *R. philippinarum* e *R. decussatus* scaricate dalla banca dati GenBank (Accession Numbers: AF484294; AF484296; AM085107; DQ356383, AJ417847).

Il dataset finale è costituito da sequenze corrispondenti a 407 paia basi (Figura 65). Tutte le successive analisi statistiche e filogenetiche sono state svolte a partire da tali sequenze.

Le sequenze nucleotidiche più significative ottenute dai campioni analizzati sono state registrate in GenBank con i seguenti Accession Numbers: JF748736-41 (Tabella 53).

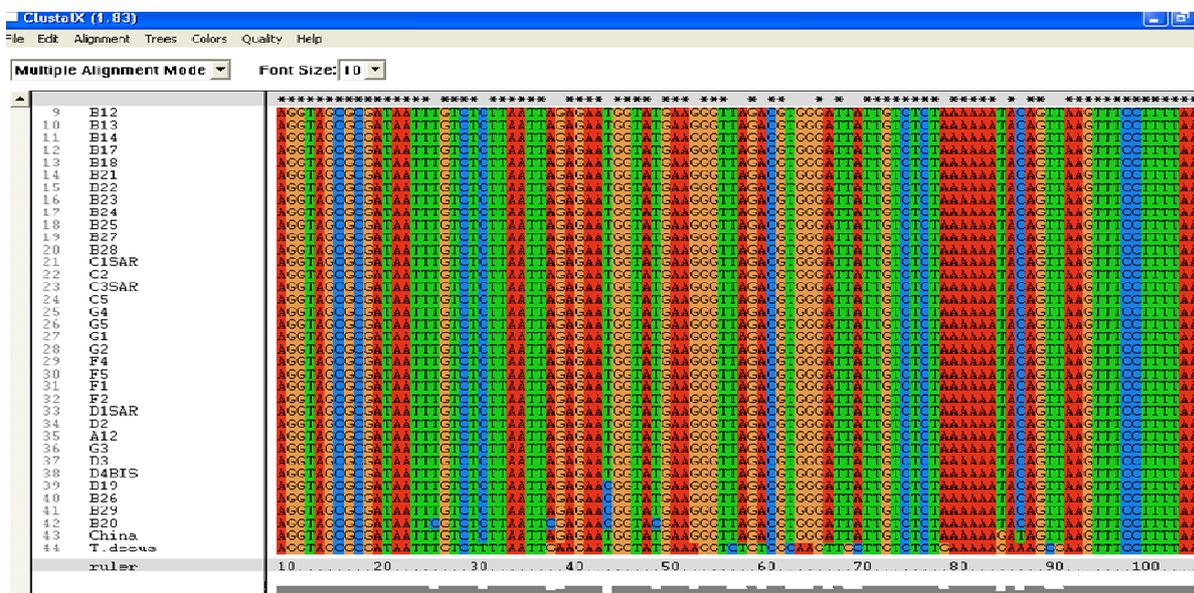


Figura 65 - Esempio di grafico relativo a circa 100 bp dell'allineamento multiplo delle sequenze di *16S* di *Ruditapes philippinarum* e *R. decussatus* attraverso il software ClustalX.

Tabella 53 - Sequenze del gene 16S della specie *Ruditapes philippinarum* registrate in GenBank. Per ogni sequenza è indicato l'acronimo, la lunghezza della sequenza, ed il GenBank Accession Number.

Acronimo Sequenza	Lunghezza Sequenza	GenBank Accession Number
BU12 <i>16S</i> ribosomal RNA	407	JF748736
PM20 <i>16S</i> ribosomal RNA	407	JF748737
PM29 <i>16S</i> ribosomal RNA	407	JF748738
PC4 <i>16S</i> ribosomal RNA	407	JF748739
FU11 <i>16S</i> ribosomal RNA	407	JF748740
SC3 <i>16S</i> ribosomal RNA	407	JF748741

Dall'allineamento delle sequenze di *Ruditapes philippinarum* e *Ruditapes decussatus*, sono state identificate più di ottanta 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 transversioni e quattro transizioni (C-T).

Considerando, invece, solo le sequenze di *R. decussatus*, sono state identificate 7 mutazioni alle posizioni 172, 262, 347, 359, 380, 383, 402. Di queste, cinque sono transizioni e due transversioni.

L'analisi di Minimum Spanning Network (al 95% di confidenza) ha identificato complessivamente 14 aplotipi, dei quali 3 aplotipi per le sequenze di *R. decussatus* e 11 aplotipi per quelle di *R. philippinarum*. TCS 1.21 ha indicato la distribuzione dei 14 aplotipi in due distinti aplogruppi (Figura 66).

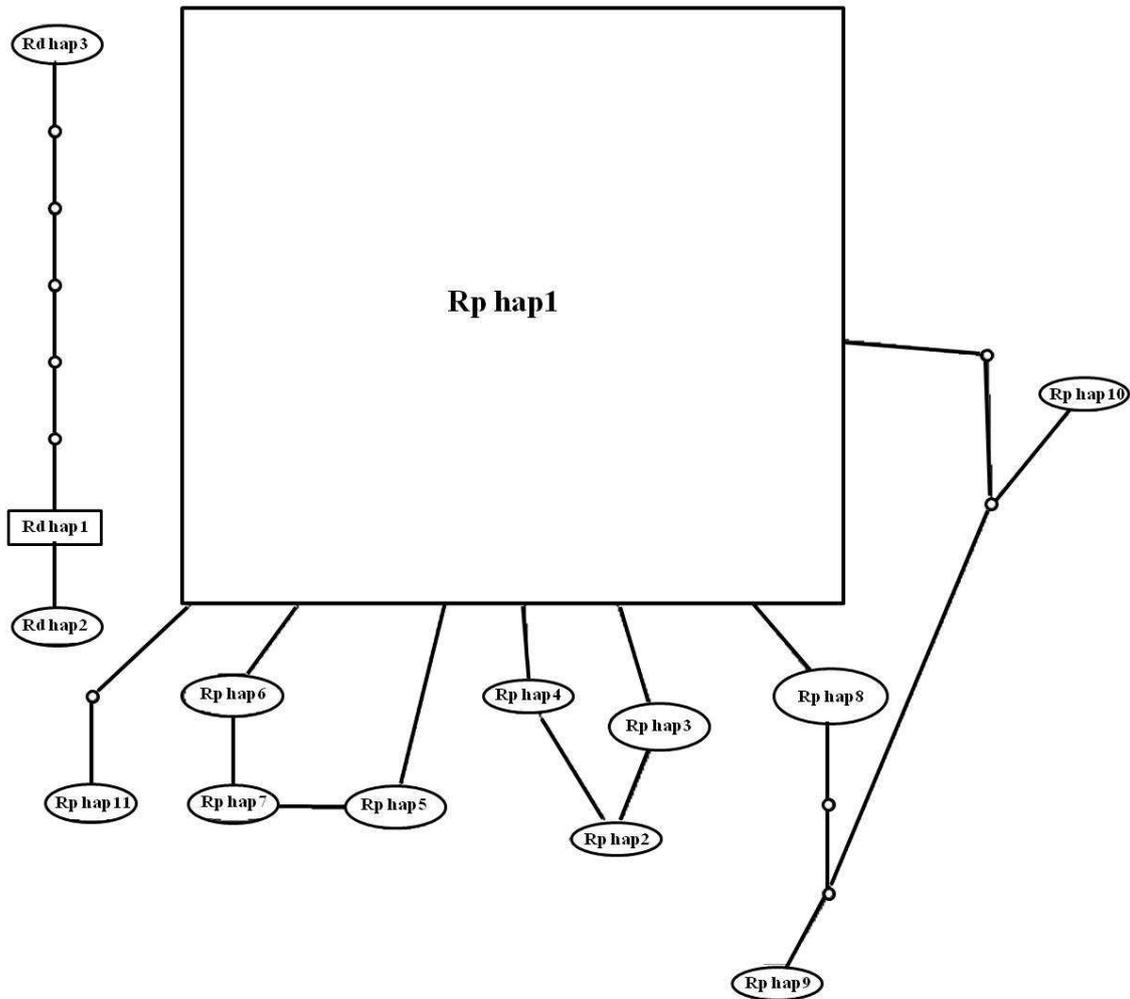


Figura 66 - Minimum Spanning Network delle sequenze di 16S rDNA di *R. philippinarum* e *R. decussatus* ottenuto con il software TCS. I quadrati indicano gli aplotipi più rappresentativi di ciascun aplogruppo. La dimensione è proporzionale alla rappresentativa numerica di ogni aplotipo.

L'aplogruppo H1 di *R. philippinarum* comprende 11 aplotipi (Rp hap 1-11); il più frequente è l'aplotipo Rp hap1 (0.1762) (Tabella 54).

L'aplogruppo H2 di *R. decussatus* include 3 aplotipi: Rd hap1 (frequenza = 0.1666), Rd hap2 (frequenza = 0.6666), e Rd hap3 (frequenza = 0.1666) (Tabella 54).

Tabella 54 - Risultati dell'analisi degli aplotipi sulle sequenze di 16S di *R. philippinarum* e *R. decussatus*.

Acronimo Aplotipo	Aplogruppo	Frequenza (weight)
Rp hap1	H1	0.1762
Rp hap2	H1	0.0090
Rp hap3	H1	0.1604
Rp hap4	H1	0.1581
Rp hap5	H1	0.1604
Rp hap6	H1	0.1604
Rp hap7	H1	0.0112
Rp hap8	H1	0.1604
Rp hap9	H1	0.0011
Rp hap10	H1	0.0011
Rp hap11	H1	0.0011
Rd hap1	H2	0.1666
Rd hap2	H2	0.6666
Rd hap3	H2	0.1666

L'analisi di Minimum Spanning Network effettuata solo sulle sequenze di *R. philippinarum* ha fornito la stessa distribuzione aplotipica.

Da un punto di vista della distribuzione geografica, l'aplotipo Rp hap1 è comune a tutte le popolazioni di *R. philippinarum* analizzate, sia a quelle dell'Alto Adriatico (Laguna di Venezia, Laguna di Caleri, Marinetta e Sacca degli Scardovari), che a quella proveniente dalla costa Galiziana (Spagna) (Figure 67, 68)



Figura 67 - Risultati dell'analisi degli aptotipi sulle sequenze di 16S di *R. philippinarum* e *R. decussatus*.

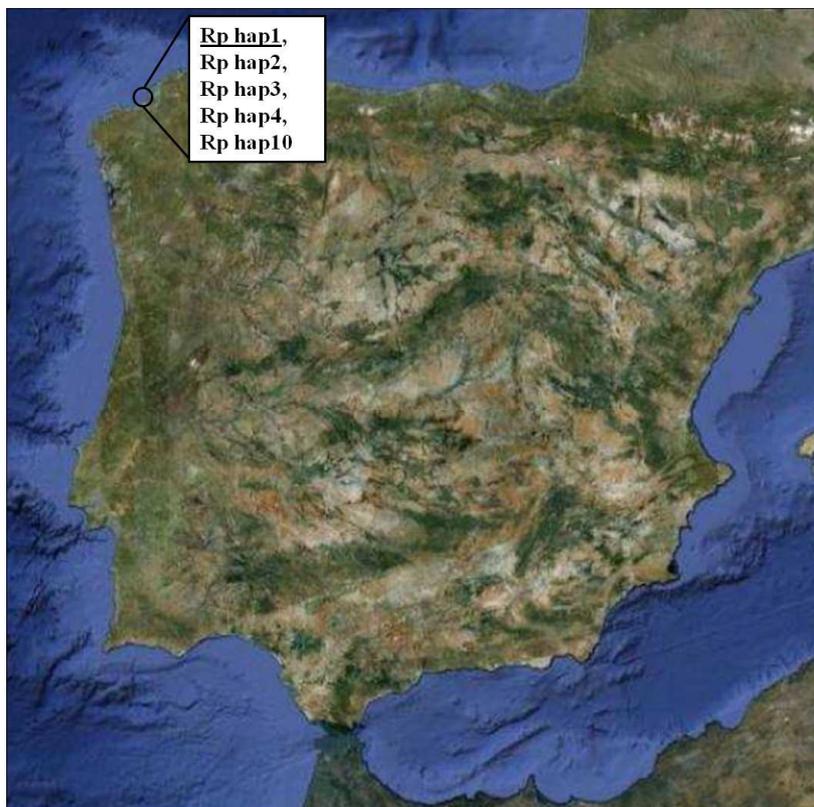


Figura 68 - Distribuzione geografica degli aptotipi identificati nei campioni provenienti dalla Galizia, attraverso l'analisi di un frammento del gene 16S.

La distribuzione geografica degli aplotipi di *R. philippinarum* mostra una netta separazione biogeografica tra le popolazioni analizzate. Infatti, mentre l'aplotipo Rp hap1 è comune in tutte le popolazioni analizzate, gli altri aplotipi mostrano una netta distinzione geografica.

Gli aplotipi Rp hap8 e Rp hap9 sono stati individuati solo nei campioni provenienti dalla Laguna di Venezia Nord (stazione B), mentre l'aplotipo Rp hap5 è esclusivo della popolazione della Laguna di Venezia Centro (stazione A).

Per quanto riguarda il delta del Po, l'aplotipo Rp hap6 è stato riscontrato solo nei campioni della laguna di Caleri (stazione VL), l'aplotipo Rp hap7 è esclusivo della popolazione della laguna di Marinetta (stazione MR).

Gli aplotipi Rp hap2, Rp hap3, Rp hap4, Rp hap10 sono stati riscontrati solo nei campioni provenienti dalla Spagna.

Infine, è necessario sottolineare che l'aplotipo Rp hap11 corrisponde alla sequenza di *R. philippinarum* scaricata della banca dati GenBank (A.N. DQ356383) proveniente dalla Cina.

Tale aplotipo non è mai stato riscontrato nei campioni europei analizzati.

Attraverso il software MEGA5 è stato poi sviluppato il Tajima's Neutrality Test per gli aplotipi di *R. philippinarum* e *R. decussatus*, che ha sottolineato la presenza complessiva di 88 siti polimorfici con $p_s=0.216$, $\Theta=0.043$, diversità nucleotidica pari a $\pi=0.014$ e Tajima test statistic D pari a -2.229. Lo stesso test effettuato solo sulle sequenze nucleotidiche di *R. philippinarum* ha indicato la presenza di 11 siti polimorfici, con $p_s=0.027$, $\Theta=0.005$, diversità nucleotidica $\pi=0.001$ e Tajima test statistic D pari a -2.019 (Tabella 55).

Tabella 55 - Risultati del test di Tajima. m = numero di sequenze, S = numero di siti polimorfici, $p_s = S/m$, $\Theta = p_s/a1$, π = diversità nucleotidica, e D è il valore del Tajima test.

	m	S	p_s	Θ	π	D
Rp	84	11	0.027	0.005	0.001	-2.019
Rp + Rd	87	88	0.216	0.043	0.014	-2.229

I risultati del test di Tajima (Tabella 55) concordano con quanto mostrato dal dato di distribuzione degli aplotipi a livello locale. Infatti, il D di Tajima è un buon indicatore del *pattern* di distribuzione allelica/aplotipica e il valore di D negativo (-2.019), indica uno spostamento dalla condizione di neutralità, e sottolinea indirettamente che nel pool studiato ci sono molti aplotipi rari (poco frequenti), suggerendo che la struttura genetica delle popolazioni analizzate sia influenzata da attività antropiche. Ciò trova conferma nell'origine alloctona della *R. philippinarum*, introdotta a partire dai primi anni '80 e da allora soggetta ad intense attività di pesca ed acquacoltura.

Infine, l'albero filogenetico costruito secondo l'approccio di Neighbour Joining riflette i due aplogruppi individuati attraverso l'analisi di Minimum Spanning Network (Figura 69), e i valori del bootstrap risultano superiori al >95% per entrambi gli aplogruppi su 1000 repliche effettuate.

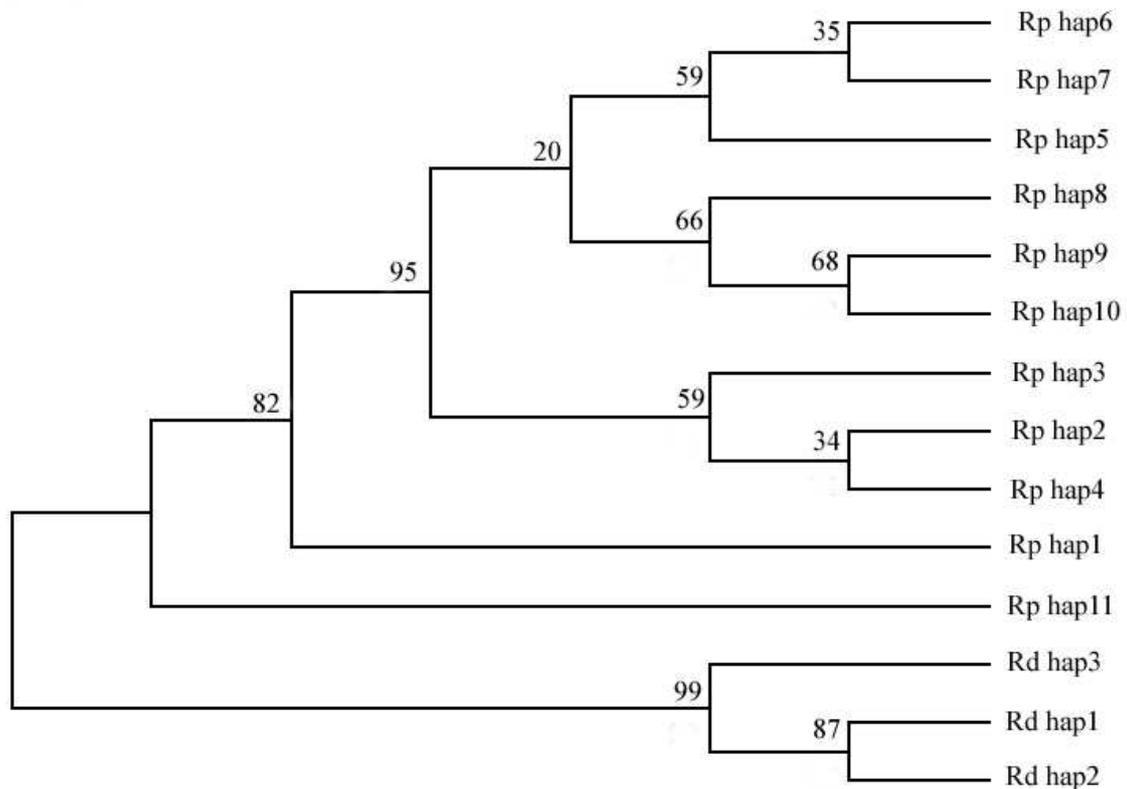


Figura 69 - Albero filogenetico Neighbour-Joining

L'albero filogenetico costruito secondo l'approccio di Maximum Likelihood mostra esattamente la stessa topologia dell'albero di Neighbour Joining; è chiaramente visibile la struttura difiletica con la suddivisione in due rami distinti di *R. philippinarum* e *R. decussatus*. La separazione dei nodi è supportata da valori di bootstrap pari al 100% su 1000 repliche (Figura 70).

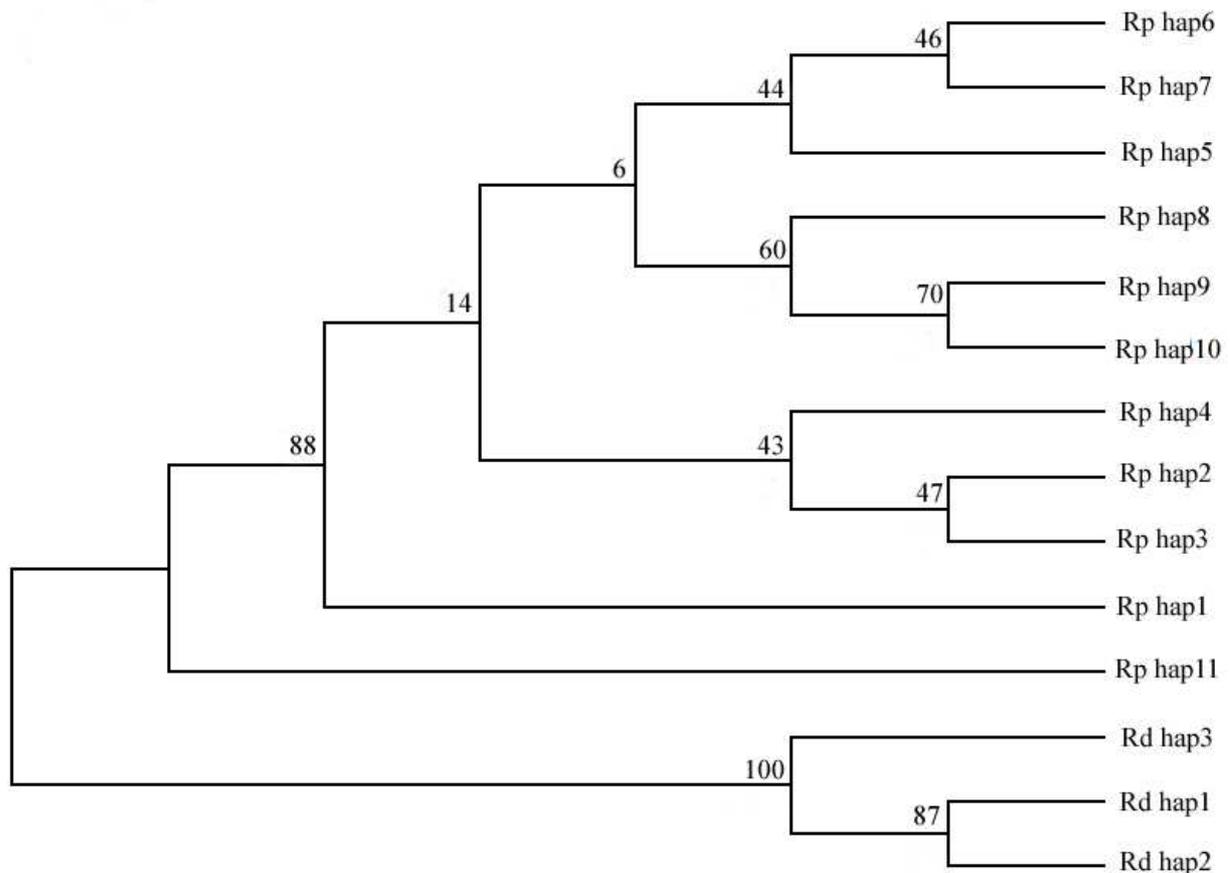


Figura 70 - Albero filogenetico di Maximum Likelihood

Inoltre, dall'osservazione degli alberi filogenetici, è possibile osservare come l'aplotipo Rp hap11 di origine cinese possa rappresentare l'aplotipo caratteristico delle popolazioni dell'areale primario di distribuzione di *R. philippinarum*, data la sua posizione basale all'interno degli alberi.

L'aplotipo Rp hap1, presenta una posizione ravvicinata con l'aplotipo Rp hap11 in entrambi gli alberi filogenetici, 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. A partire da tale aplotipo, sarebbero quindi derivati tutti gli altri aplotipi osservati, con specifiche differenze a livello geografico.

In particolare, gli aplotipi Rp hap2,3,4, caratteristici dei campioni provenienti dalla Spagna, formano un gruppo distinto con valori di bootstrap elevati (>90%).

Considerando l'insieme dei dati forniti dal MSN, dal test di Tajima e dagli alberi filogenetici, nonché 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 quindi verificati successivi eventi introduttivi, e che le mutazioni osservate a carico del frammento del gene *16S* qui analizzato, non possano essere considerate mutazioni spontanee.

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 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) alla maggior parte dei campioni del Nord Adriatico e dei 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).

Roman e Darling (2007) sostengono 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. L’analisi del 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).

Infine, è necessario sottolineare che la scarsità di dati relativi alla genetica di popolazione della vongola verace filippina non permette di confrontare i dati ottenuti con altri pubblicati in letteratura. Mao *et al.* (2011), attraverso il sequenziamento diretto di un frammento di circa 600bp del gene mitocondriale *COI*, hanno individuato 74 aplotipi analizzando 19 popolazioni distribuite lungo le coste del Giappone e della Cina, su un’area geografica molto estesa e localizzata all’interno dell’areale primario della specie. 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 le popolazioni primarie di *R. philippinarum* presentano elevata diversità genetica, e tali differenze possono quindi mantenersi anche nelle popolazioni introdotte, come quelle dell'Alto Adriatico e della costa Galiziana.

4.9.3. 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 71).

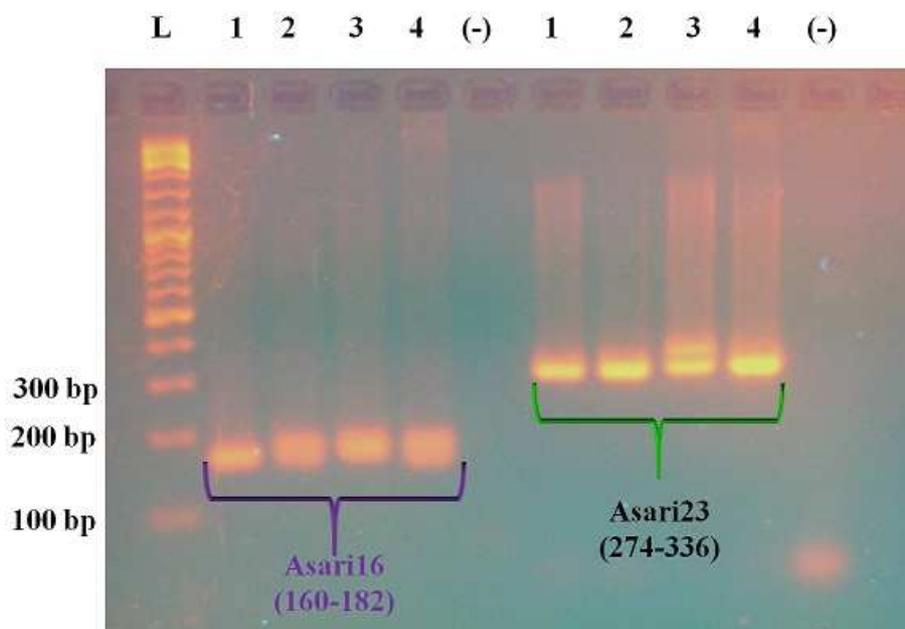


Figura 71 - Esempio di amplificati dei loci microsatelliti Asari16 ed Asari23. L = ladder, o marcatore di peso molecolare e di concentrazione (100-10000bp), 1-4 = campioni di *Ruditapes philippinarum*, (-) = controllo negativo (Foto S. Chiesa). Si distinguono i campioni omo- ed eterozigoti a ciascun 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 72, 73).

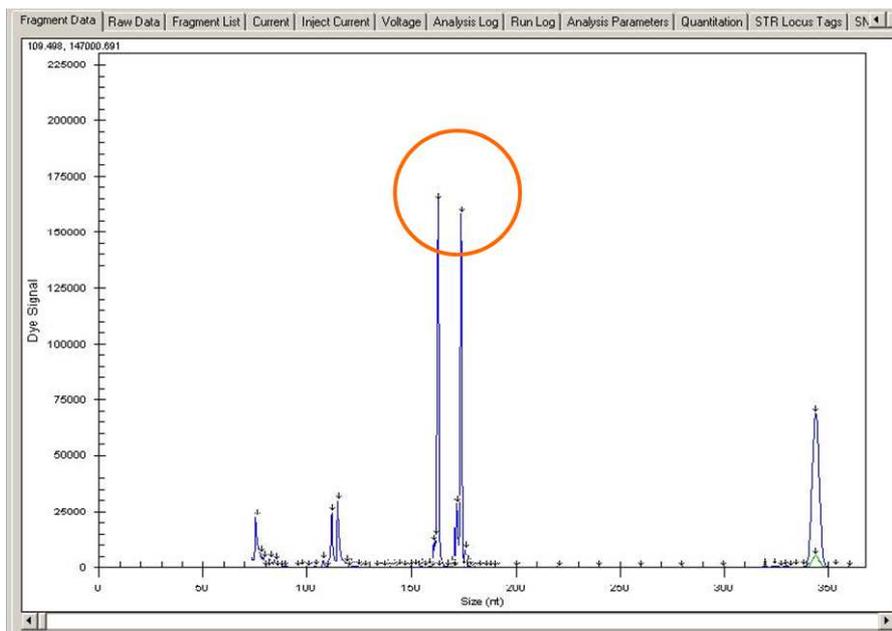


Figura 72 - Profilo elettroforetico capillare di un campione eterozigote al locus Asari16. Sono visibili i due picchi elettroforetici distinti (162-172 bp). In ascissa la dimensione dei frammenti, in ordinata l'intensità del segnale di fluorescenza.

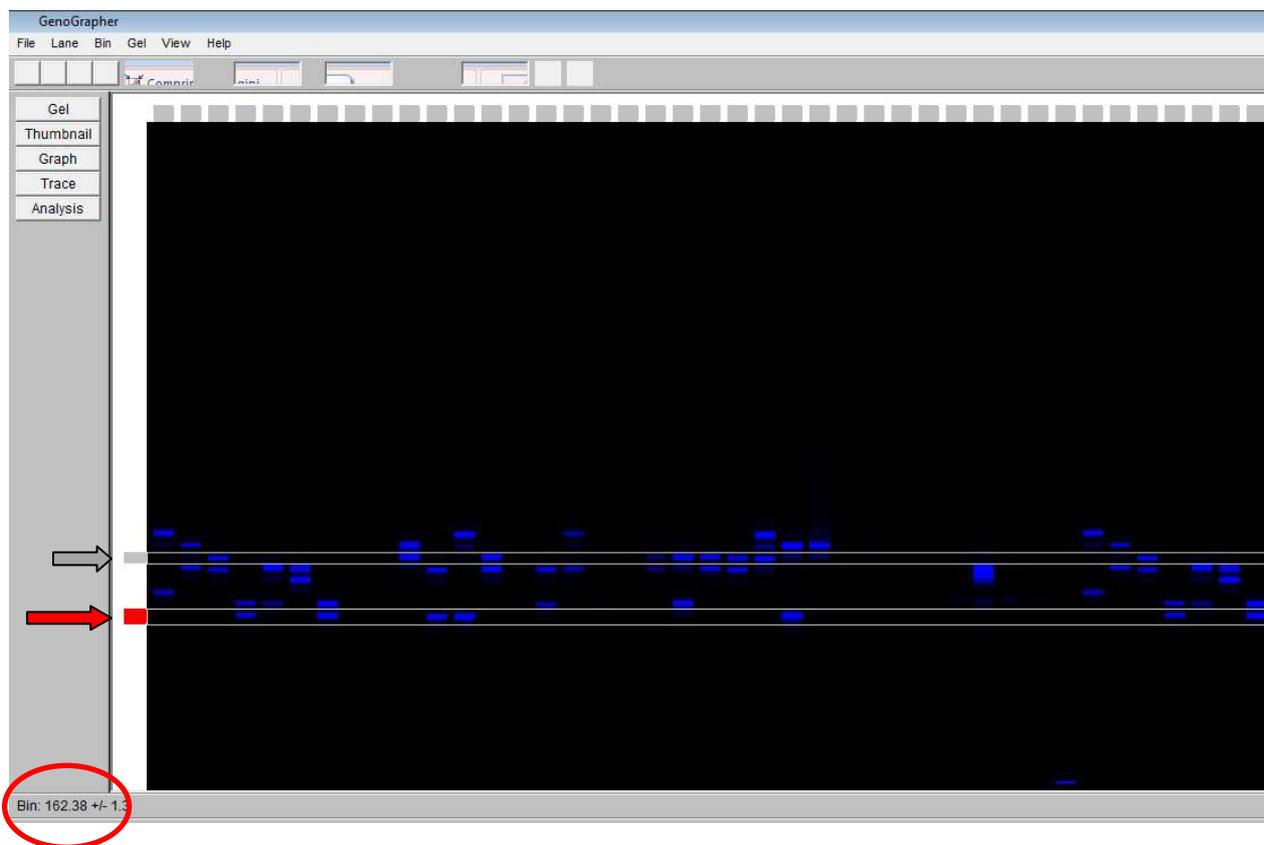


Figura 73 - Gel virtuale ottenuto con Software Genographer per il locus Asari16: ciascuna colonna rappresenta un singolo campione, ciascuna riga contiene i frammenti della stessa dimensione. In particolare, i frammenti evidenziati nella riga in basso (freccia rossa) hanno un peso molecolare di 162 bp, (corrispondenti all'allele 162), la riga in alto (freccia grigia) rappresenta il valore di 172 bp (allele 172).

Una volta identificate le varianti alleliche di ciascun campione per ogni singolo locus, è stato ottenuto un dataset di 87 campioni x2 (diploidi) x7(loci) = 1218 dati.

E' da sottolineare, inoltre, come in alcuni campioni non sia 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.

Al locus *Asari16*, ad esempio, il 5% dei campioni non ha amplificato; tale percentuale è pari al 20% al locus *Asari23*, al 15% al locus *Asari24*, a sale a circa il 35% per gli altri loci. 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.

Per confermare tale ipotesi 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 dei risultati inerenti l'equilibrio di Hardy-Weinberg (Tabella 56).

Tabella 56 - Risultati del test di drop-out allelico per la ricerca di alleli nulli effettuato con micro-checker 2.2.3. Per ciascun locus sono riportate le frequenze stimate per gli alleli nulli secondo il logaritmo di Van Oosterhout

Locus	Null Present	Van Oosterhout
<i>Asari16</i>	No	-0.0015
<i>Asari23</i>	Yes	0.1476
<i>Asari24</i>	Yes	0.0858
<i>Asari54</i>	Yes	0.1343
<i>Ktp5</i>	Yes	0.3503
<i>Ktp8</i>	Yes	0.1498
<i>Ktp22</i>	Yes	0.3668

Il numero di alleli per locus è pari a 10 per il locus *Asari16*, 9 per *Asari23*, 6 per *Asari24*, 7 per *Asari54*, 14 per *Ktp5*, 8 per *Ktp8*, 15 per *Ktp22*, per un totale di 69 alleli individuati. Tali valori sono conformi a quanto descritto in letteratura (Yasuda *et al.*, 2007; An *et al.*, 2009), anche se le popolazioni introdotte qui analizzate, presentano generalmente un numero di alleli di poco inferiore.

Inoltre, al locus *Asari16*, nei campioni analizzati 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 *Ktp5* sono stati identificati due nuovi alleli 206 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 57 e 58.

Su un totale di 69 alleli, sono stati registrati complessivamente 18 alleli privati, cioè specifici per una singola popolazione (Figure 74 e 75).

Nel dettaglio, al locus *Asari16* gli alleli 166 e 182 sono caratteristici della popolazione della Laguna di Venezia Centrale (stazione A); al locus *Asari23* l'allele 304 è specifico della popolazione spagnola, mentre l'allele 310 è presente solo nei campioni della Sacca di Scardovari (stazione SC); al locus *Asari24* l'allele 178 è presente solo nei campioni provenienti dalla Spagna (ESP); al locus *Asari54* l'allele 247 è stato identificato solo nei campioni della popolazione della Laguna di Venezia Nord (stazione B), mentre l'allele 259 è stato individuato solo nei campioni di Scardovari (stazione SC); al locus *Ktp5* gli alleli 162 e 188 sono stati individuati solo nei campioni provenienti dalla laguna di Caleri (stazione VL), gli alleli 206 e 216 solo nei campioni della Laguna di Venezia Nord (stazione B), l'allele 164 nei campioni della Laguna di Venezia Centrale (stazione A), e l'allele 174 solo nella popolazione della laguna di Marinetta (stazione MR); al locus *Ktp8* l'allele 158 è stato osservato solo nei campioni della Laguna di Venezia Nord (stazione B), l'allele 196 solo nei campioni spagnoli. Infine, al locus *Ktp22* l'allele 253 è individuato solo nella popolazione Laguna di Venezia Nord, e gli alleli 262 e 265 solo nella popolazione Laguna di Venezia Centrale (stazione A).

Tabella 57 - Frequenze alleliche di ciascun locus microsatellite analizzato nelle diverse popolazioni. Locus = locus microsatellite; N = numero di campioni analizzati per ciascun locus; Allele/n = variante allelica; A = popolazione Busa (Lag. Venezia Centrale); B = popolazione Palude del Monte (Lag. Venezia Nord); MR = popolazione Laguna Marinetta; VL = popolazione Laguna Caleri; SC = popolazione Sacca di Scardovari; ESP = popolazione Spagnola (Galizia).

Locus	Allele/n	A	B	MR	VL	SC	ESP
<i>Asari16</i>	N	18	14	10	10	12	14
	162	0.111	0.214	0.150	0.100	0.167	0.143
	164	0.083	0.036	0.200	0.200	0.167	0.107
	166	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	168	0.083	0.179	0.000	0.100	0.000	0.036
	170	0.056	0.000	0.050	0.000	0.000	0.214
	172	0.194	0.179	0.300	0.300	0.250	0.179
	174	0.083	0.179	0.050	0.100	0.167	0.179
	176	0.167	0.107	0.150	0.100	0.125	0.143
	178	0.167	0.107	0.100	0.100	0.125	0.000
	182	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Asari23</i>	N	14	15	9	7	10	10
	300	0.107	0.067	0.000	0.000	0.050	0.100
	304	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050
	306	0.214	0.100	0.111	0.000	0.000	0.100
	310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000
	312	0.000	0.000	0.000	0.429	0.050	0.000
	316	0.607	0.767	0.667	0.357	0.500	0.650
	324	0.071	0.067	0.111	0.000	0.200	0.000
	328	0.000	0.000	0.056	0.000	0.050	0.000
	336	0.000	0.000	0.056	0.214	0.100	0.100
<i>Asari24</i>	N	18	16	8	7	10	10
	166	0.472	0.438	0.438	0.071	0.150	0.350
	170	0.028	0.000	0.063	0.000	0.000	0.100
	172	0.028	0.125	0.250	0.143	0.000	0.050
	174	0.361	0.406	0.250	0.286	0.450	0.000
	176	0.111	0.031	0.000	0.500	0.400	0.450
	178	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050
<i>Asari54</i>	N	9	15	4	4	7	6
	243	0.000	0.133	0.000	0.125	0.000	0.000
	247	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000
	249	0.667	0.667	0.875	0.750	0.429	0.250
	251	0.167	0.100	0.125	0.125	0.000	0.250
	253	0.056	0.033	0.000	0.000	0.357	0.500
	257	0.111	0.000	0.000	0.000	0.143	0.000
	259	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000

Locus	Allele/n	A	B	MR	VL	SC	ESP
<i>Ktp5</i>	N	9	10	5	5	4	10
	158	0.000	0.000	0.200	0.100	0.000	0.000
	162	0.000	0.000	0.000	0.200	0.000	0.000
	164	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	166	0.000	0.000	0.200	0.000	0.500	0.100
	168	0.222	0.250	0.400	0.400	0.000	0.200
	170	0.556	0.150	0.000	0.000	0.000	0.350
	172	0.000	0.150	0.000	0.000	0.250	0.050
	174	0.000	0.000	0.200	0.000	0.000	0.000
	176	0.056	0.200	0.000	0.000	0.000	0.200
	178	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.100
	184	0.056	0.000	0.000	0.200	0.250	0.000
	188	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000
	206	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000
216	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	
<i>Ktp8</i>	N	9	10	7	6	9	7
	158	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000
	162	0.111	0.250	0.143	0.417	0.167	0.143
	164	0.333	0.100	0.429	0.167	0.222	0.571
	166	0.444	0.400	0.214	0.250	0.444	0.071
	168	0.111	0.150	0.071	0.083	0.167	0.000
	170	0.000	0.000	0.071	0.083	0.000	0.000
	172	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000	0.071
196	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.143	
<i>Ktp22</i>	N	9	11	6	3	8	13
	220	0.222	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000
	223	0.056	0.091	0.000	0.000	0.000	0.038
	226	0.000	0.091	0.000	0.000	0.000	0.038
	229	0.111	0.227	0.333	0.333	0.125	0.346
	232	0.000	0.091	0.000	0.000	0.000	0.038
	235	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.154
	238	0.111	0.000	0.167	0.000	0.125	0.000
	241	0.167	0.091	0.167	0.333	0.000	0.115
	244	0.056	0.136	0.000	0.333	0.125	0.038
	247	0.056	0.182	0.083	0.000	0.125	0.154
	250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.077
	253	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000
	259	0.056	0.000	0.083	0.000	0.250	0.000
262	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
265	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

Tabella 58 - Frequenze alleliche di ciascun locus microsatellite analizzato nelle diverse popolazioni. Locus = locus microsatellite; N = numero di campioni analizzati per ciascun locus; Allele/n = variante allelica; A = popolazione Busa (Lag. Venezia Centrale); B = popolazione Palude del Monte (Lag. Venezia Nord); MR = popolazione Laguna Marinetta; VL = popolazione Laguna Caleri; SC = popolazione Sacca di Scardovari; ESP = popolazione Spagnola (Galizia).

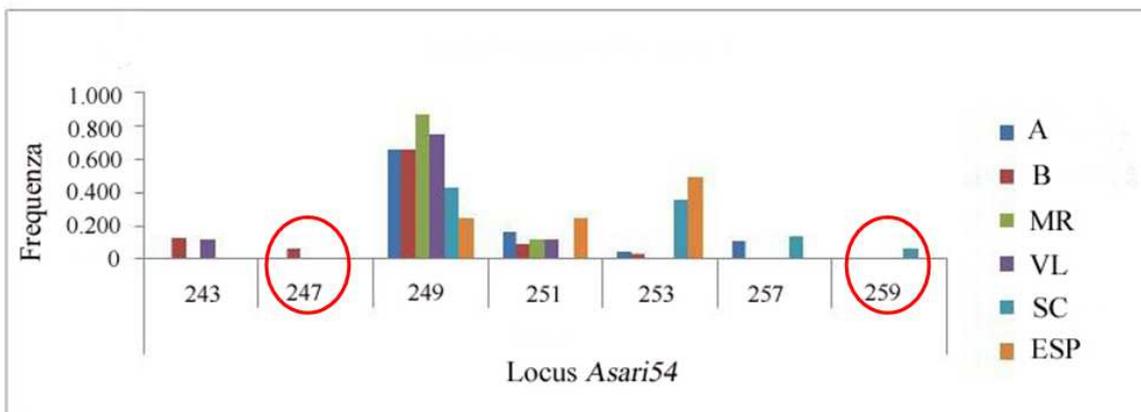
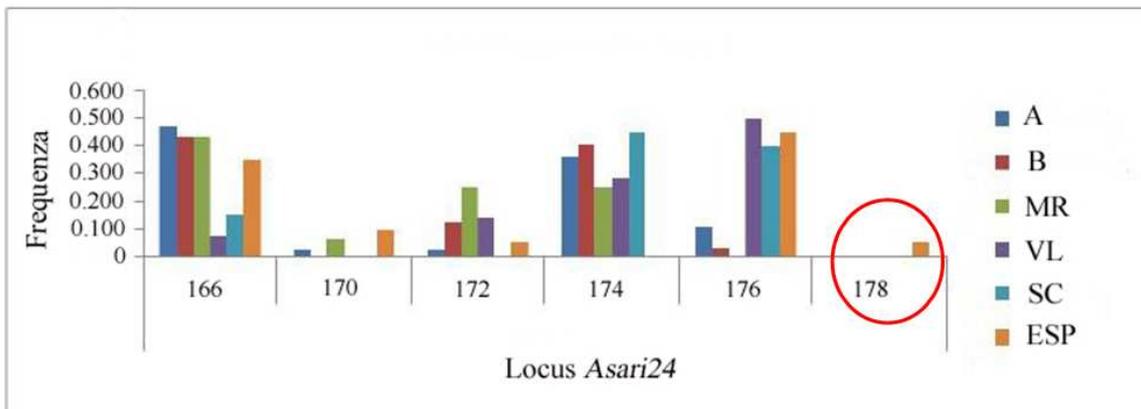
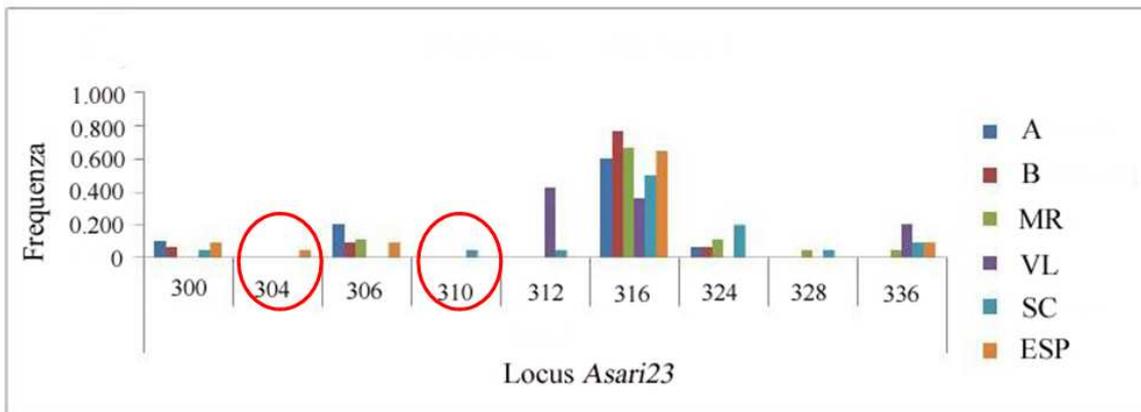
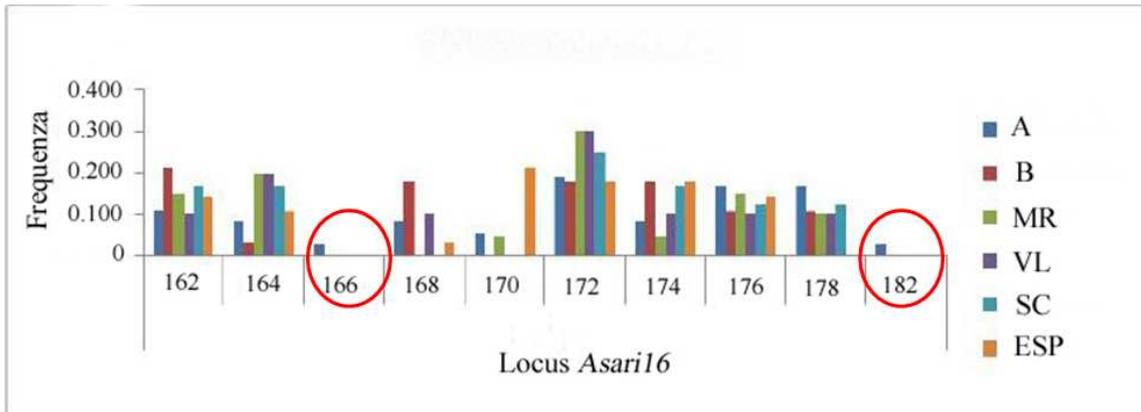


Figura 74 - Istogrammi delle frequenze alleliche per ciascuna popolazione ai loci microsatelliti *Asari16-54* (a-d); sono evidenziati gli alleli privati.

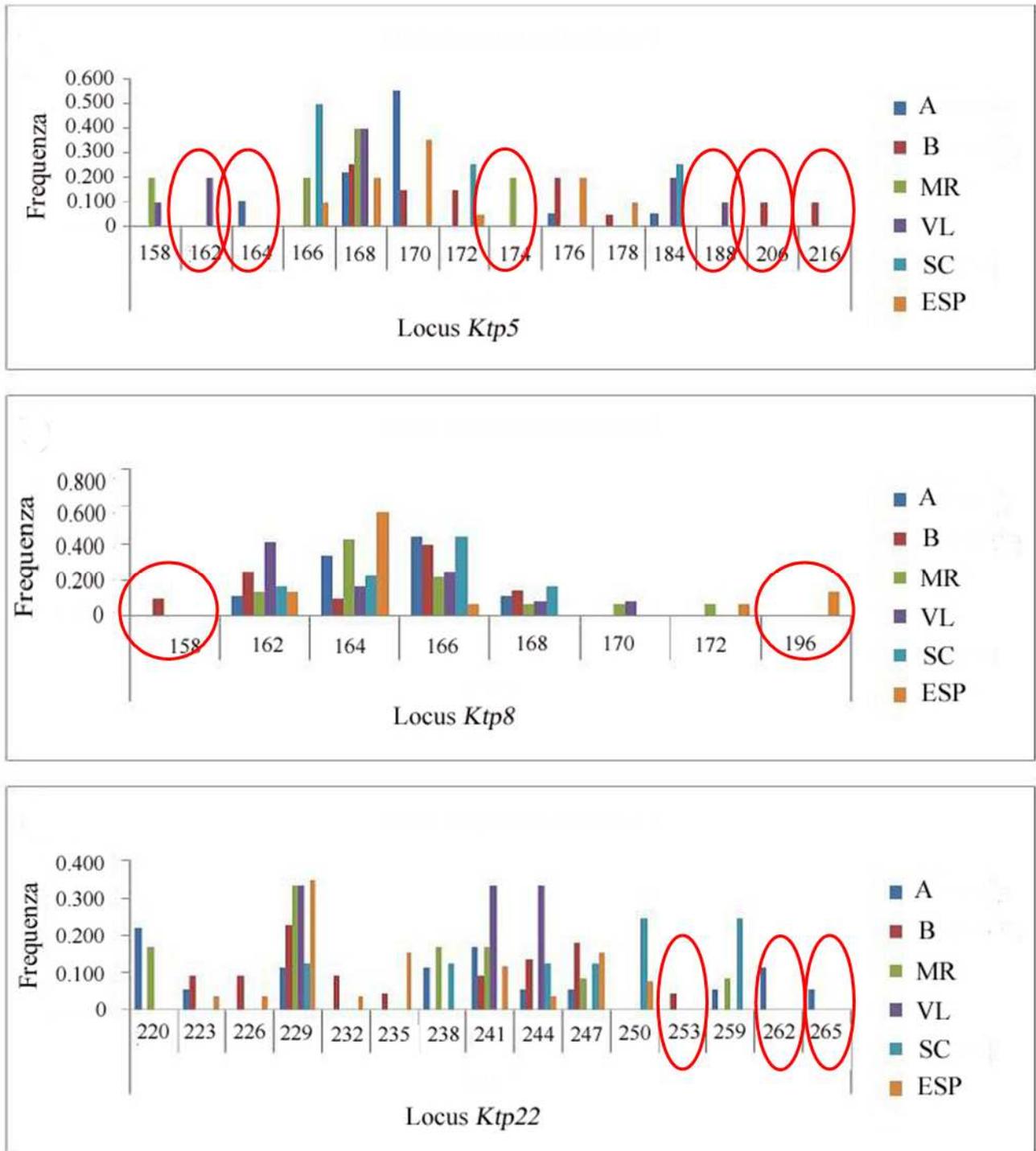


Figura 75 - Istogrammi delle frequenze alleliche per ciascuna popolazione ai loci microsatelliti *Ktp5-22* (a-c); sono evidenziati gli alleli privati.

La presenza 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 limitato dei campioni analizzati potrebbe influenzare il numero elevato di alleli privati osservati nelle popolazioni delle lagune costiere dell'Alto Adriatico e della Galizia, come descritto in precedenza per altri bivalvi (Astanei *et al.*, 2005). Infatti, è piuttosto improbabile che tali popolazioni abbiano accumulato un elevato numero di mutazioni, dato lo scarso lasso di tempo trascorso dalla loro introduzione (Astanei *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda i valori percentuali dell'eterozigosi attesa (H_E), essa differisce tra i 7 loci analizzati, variando tra un valore minimo del 21% al locus *Asari54* (popolazione MR) ad un valore massimo del 87% al locus *Ktp22* (popolazione A). I valori di eterozigosi osservata (H_O) variano invece tra un minimo del 10% al locus *Asari24* (popolazione SC) ad un valore massimo del 100% al medesimo locus (popolazione ESP).

I valori percentuali dell'eterozigosi attesa ed osservata per ciascun locus e per ciascuna popolazione sono riportati in Tabella 59.

I valori di eterozigosi osservata riscontrati nei campioni analizzati, sono 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). Al locus *Asari16* il valore medio qui osservato è pari al 85%, a fronte del 90% descritto da Yasuda *et al.* (2007), al locus *Asari23* è 42%, al locus *Asari24* è 50%, al locus *Asari54* è 38%, a fronte del 50%, 81% e 13% rispettivamente descritti da Yasuda *et al.* (2007). Per quanto riguarda invece la serie *Ktp*, al locus *Ktp5* l'eterozigosi osservata media è pari al 23%, al locus *Ktp8* è 54%, mentre al locus *Ktp22* è pari al 18%, a fronte del 65%, 60% ed 82% rispettivamente, descritti in letteratura (An *et al.*, 2009).

Inoltre, è possibile evidenziare anche una significativa discrepanza tra i valori dell'eterozigosi attesa ed osservata nei campioni analizzati: in particolare, al locus *Asari23*, *Asari24*, *Ktp5* e *Ktp22*.

Pop	Locus	N	H _o	H _e
A	<i>Asari16</i>	18	0.889	0.869
	<i>Asari23</i>	14	0.071	0.569
	<i>Asari24</i>	18	0.778	0.633
	<i>Asari54</i>	9	0.444	0.512
	<i>Ktp5</i>	9	0.111	0.623
	<i>Ktp8</i>	9	0.556	0.667
	<i>Ktp22</i>	9	0.333	0.870
B	<i>Asari16</i>	14	0.786	0.834
	<i>Asari23</i>	15	0.400	0.393
	<i>Asari24</i>	16	0.750	0.627
	<i>Asari54</i>	15	0.533	0.522
	<i>Ktp5</i>	10	0.200	0.830
	<i>Ktp8</i>	10	0.200	0.735
	<i>Ktp22</i>	11	0.273	0.860
MR	<i>Asari16</i>	10	0.900	0.810
	<i>Asari23</i>	9	0.333	0.525
	<i>Asari24</i>	8	0.125	0.680
	<i>Asari54</i>	4	0.250	0.219
	<i>Ktp5</i>	5	0.400	0.720
	<i>Ktp8</i>	7	0.857	0.735
	<i>Ktp22</i>	6	0.167	0.792
VL	<i>Asari16</i>	10	0.900	0.820
	<i>Asari23</i>	7	0.429	0.643
	<i>Asari24</i>	7	0.286	0.643
	<i>Asari54</i>	4	0.500	0.406
	<i>Ktp5</i>	5	0.400	0.740
	<i>Ktp8</i>	6	0.833	0.722
	<i>Ktp22</i>	3	0.000	0.667
SC	<i>Asari16</i>	12	0.750	0.823
	<i>Asari23</i>	10	0.800	0.690
	<i>Asari24</i>	10	0.100	0.615
	<i>Asari54</i>	7	0.429	0.663
	<i>Ktp5</i>	4	0.000	0.625
	<i>Ktp8</i>	9	0.667	0.698
	<i>Ktp22</i>	8	0.000	0.813
ESP	<i>Asari16</i>	14	0.929	0.837
	<i>Asari23</i>	10	0.500	0.545
	<i>Asari24</i>	10	1.000	0.660
	<i>Asari54</i>	6	0.167	0.625
	<i>Ktp5</i>	10	0.300	0.775
	<i>Ktp8</i>	7	0.143	0.622
	<i>Ktp22</i>	13	0.308	0.808

Tabella 59 - Eterozigosi attesa ed osservata per ciascun locus e ciascuna popolazione. Pop = popolazione N = numero di campioni, H_o = eterozigosi osservata, H_e = eterozigosi attesa.

Il deficit di eterozigosi osservata è stato confermato dal test di Hardy-Weinberg: in particolare, una significativa deviazione dall'equilibrio di HW è stata osservata ai loci *Asari23*, *Asari24*, *Ktp5*, *Ktp8*,

Ktp22. In Tabella 60 sono riportati i valori del ChiSq test e la loro significatività statistica per ciascuna popolazione (Tabella 60a) e ciascun locus (Tabella 60b).

Tabella 60 - Risultati del test di Hardy-Weinberg per ciascuna popolazione (a) e ciascun locus (b). Pop = popolazione; ChiSq = χ^2 , prob = probabilità, Signif = significatività statistica. ns= non significativo, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

a)

Pop	Locus	ChiSq	Prob	Signif	ChiSq	Prob
A	<i>Asari16</i>	39.90	0.69	ns	25.08	0.40
B		22.03	0.40	ns		
MR		21.39	0.44	ns		
VL		20.83	0.47	ns		
SC		17.17	0.31	ns		
ESP		29.19	0.11	ns		
A		<i>Asari23</i>	33.17	0.00		
B	4.19		0.65	ns		
R	17.50		0.06	ns		
VL	3.14		0.37	ns		
SC	23.60		0.31	ns		
ESP	11.48		0.32	ns		
A	<i>Asari24</i>		4.87	0.90	ns	14.69
B		24.27	0.00	***		
MR		16.16	0.01	*		
VL		10.89	0.09	ns		
SC		13.09	0.00	**		
ESP		18.89	0.04	*		
A		<i>Asari54</i>	10.00	0.12	ns	
B	17.40		0.07	ns		
MR	0.08		0.78	ns		
VL	0.44		0.93	ns		
SC	9.52		0.15	ns		
ESP	6.67		0.08	ns		
A	<i>Ktp5</i>		36.00	0.00	***	23.54
B		43.29	0.00	**		
MR		11.25	0.08	ns		
VL		11.25	0.34	ns		
SC		8.00	0.05	*		
ESP		31.48	0.01	**		
A		<i>Ktp8</i>	5.50	0.48	ns	
B	27.80		0.00	**		
MR	12.06		0.67	ns		
VL	13.36		0.20	ns		
SC	6.56		0.36	ns		
ESP	28.00		0.00	**		
A	<i>Ktp22</i>		73.00	0.01	**	46.82
B		61.61	0.00	**		
MR		30.00	0.01	*		
VL		6.00	0.11	ns		
SC		40.00	0.00	***		
ESP		70.30	0.00	***		

b)

Pop	Locus	ChiSq	Prob	Signif
A	<i>Asari16</i>	39.898	0.687	ns
	<i>Asari23</i>	33.173	0.000	***
	<i>Asari24</i>	4.867	0.900	ns
	<i>Asari54</i>	10.000	0.125	ns
	<i>Ktp5</i>	36.000	0.000	***
	<i>Ktp8</i>	5.500	0.481	ns
	<i>Ktp22</i>	73.000	0.005	**
B	<i>Asari16</i>	22.027	0.398	ns
	<i>Asari23</i>	4.187	0.651	ns
	<i>Asari24</i>	24.266	0.000	***
	<i>Asari54</i>	17.400	0.066	ns
	<i>Ktp5</i>	43.289	0.003	**
	<i>Ktp8</i>	27.803	0.002	**
	<i>Ktp22</i>	61.612	0.005	**
MR	<i>Asari16</i>	21.389	0.435	ns
	<i>Asari23</i>	17.500	0.064	ns
	<i>Asari24</i>	16.163	0.013	*
	<i>Asari54</i>	0.082	0.775	ns
	<i>Ktp5</i>	11.250	0.081	ns
	<i>Ktp8</i>	12.056	0.675	ns
	<i>Ktp22</i>	30.000	0.012	*
VL	<i>Asari16</i>	20.833	0.469	ns
	<i>Asari23</i>	3.142	0.370	ns
	<i>Asari24</i>	10.893	0.092	ns
	<i>Asari54</i>	0.444	0.931	ns
	<i>Ktp5</i>	11.250	0.338	ns
	<i>Ktp8</i>	13.360	0.204	ns
	<i>Ktp22</i>	6.000	0.112	ns
SC	<i>Asari16</i>	17.167	0.309	ns
	<i>Asari23</i>	23.600	0.313	ns
	<i>Asari24</i>	13.086	0.004	**
	<i>Asari54</i>	9.520	0.146	ns
	<i>Ktp5</i>	8.000	0.046	*
	<i>Ktp8</i>	6.563	0.363	ns
	<i>Ktp22</i>	40.000	0.000	***
ESP	<i>Asari16</i>	29.190	0.110	ns
	<i>Asari23</i>	11.479	0.321	ns
	<i>Asari24</i>	18.889	0.042	*
	<i>Asari54</i>	6.667	0.083	ns
	<i>Ktp5</i>	31.480	0.008	**
	<i>Ktp8</i>	28.000	0.002	**
	<i>Ktp22</i>	70.296	0.001	***

Anche Yasuda *et al.* (2007) hanno riscontrato una significativa deviazione dall'equilibrio di HW in una popolazione giapponese, al locus *Asari 23* ($p < 0.05$). Inoltre, alcuni dei loci *Ktp* descritti da An *et al.*, risultano deviare significativamente dall'equilibrio di HW (An *et al.*, 2009).

Il test di Linkage disequilibrium ha dimostrato l'assenza di linkage tra tutti i loci analizzati ($p \gg 0.01$).

Esistono in letteratura pochi lavori che descrivono il deficit di eterozigosi nei bivalvi marini (Bierne *et al.*, 1998; McGoldrick *et al.*, 2000; Hedgecock *et al.*, 2004) o dulcicoli (Wilson *et al.*, 1999), 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 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. Infine, è necessario sottolineare come la presenza di alleli nulli sia uno dei problemi più comuni nell'analisi dei loci microsatelliti, e che tale fenomeno può determinare il deficit di eterozigoti (Brookfield, 1996; Hoarau *et al.*, 2002). 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, dovuti a mutazioni presenti nella sequenza di annealing dei primers, rappresenta una delle ipotesi più plausibili per spiegare il deficit di eterozigosi osservato.

Il valore di F_{st} calcolato per confronti a coppie tra tutte le popolazioni, ha un valore compreso tra 0.03 e 0.096 (Tabella 61). In accordo con Hartl e Clark (1997), i valori di F_{st} possono essere interpretati in modo differente: se F_{st} è inferiore a 0.05 il differenziamento è basso, se oscilla fra 0.05 e 0.15 il differenziamento fra le due popolazioni è moderato, se l'oscillazione è fra 0.15 e 0.25 è elevato, se invece è superiore a 0.25 le due popolazioni sono da considerare molto differenziate l'una dall'altra.

Come si può osservare dai valori in tabella, il differenziamento genetico osservato tra le popolazioni di *R. philippinarum* analizzate, risulta di moderata entità e di basso livello. La maggior parte della diversità genetica è quindi imputabile alla variabilità all'interno delle singole popolazioni, piuttosto che tra popolazioni diverse. I valori più elevati, comunque, si riscontrano tra le popolazioni italiane e la popolazione spagnola.

Tabella 61 - Valori F_{st} per confronti a coppie tra le popolazioni (al di sotto della diagonale in rosso). In nero i valori di moderato differenziamento, in blu quello di basso differenziamento.

	A	B	MR	VL	SC	ESP
A	0.000					
B	0.030	0.000				
MR	0.042	0.039	0.000			
VL	0.077	0.067	0.066	0.000		
SC	0.069	0.064	0.081	0.077	0.000	
ESP	0.063	0.071	0.082	0.096	0.073	0.000

I valori maggiori sono rappresentati nel confronto tra la popolazione spagnola con quelle dell'Alto Adriatico, mentre i valori più bassi si osservano tra le popolazioni della Laguna di Venezia e quella della laguna di Marinetta.

Tale risultato è confermato anche dai valori delle distanze genetiche di Nei, calcolate a coppie per tutte le popolazioni (Tabella 62). I valori delle distanze di Nei sono compresi in un intervallo tra 0 ed 1, ove 0 sta ad indicare una distanza genetica nulla, mentre 1 indica una elevata distanza.

Tabella 62 - Valori delle distanze genetiche di Nei, per confronti a coppie tra le popolazioni (al di sotto della diagonale in rosso).

	A	B	MR	VL	SC	ESP
A	0.000					
B	0.049	0.000				
MR	0.064	0.058	0.000			
VL	0.263	0.185	0.125	0.000		
SC	0.268	0.232	0.249	0.244	0.000	
ESP	0.224	0.294	0.261	0.382	0.304	0.000

Tali valori indicano un limitato differenziamento tra le diverse popolazioni analizzate; anche in questo caso, i valori più elevati sono stati registrati tra la popolazione spagnola e le popolazioni dell'Alto Adriatico.

L'applicazione del software Genetix ha permesso inoltre lo sviluppo dell'analisi Fattoriale delle Corrispondenze. Tale analisi permette di visualizzare in tre dimensioni la distribuzione dei campioni in base alla varianza del dataset.

Come mostrato in Figura 76, i primi 3 assi spiegano complessivamente il 71% della varianza; ciò suggerisce un livello di differenziamento moderato tra i campioni delle diverse popolazioni.

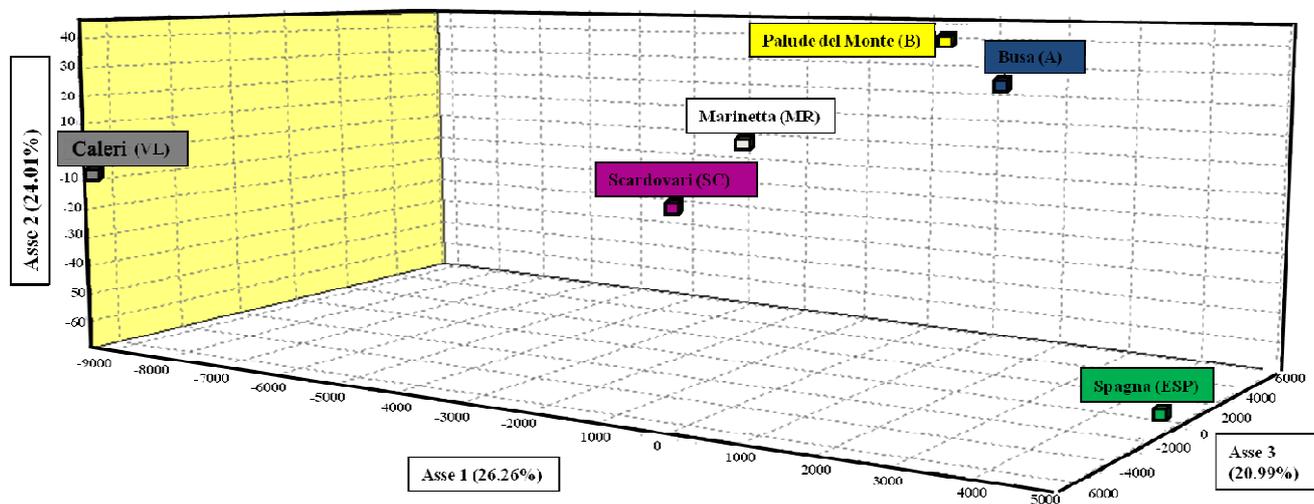


Figura 76 - Analisi Fattoriale delle Corrispondenze per le popolazioni italiane e spagnole, elaborato tramite il software Genetix, per 7 loci microsatelliti

E' possibile evidenziare come le popolazioni della Laguna di Venezia - Palude del Monte (B) e Busa (A)-, la popolazione di Scardovari (SC) e quella di Marinetta (MR) si trovino molto vicine, mentre maggiormente differenziate sono le popolazioni della laguna di Caleri (VL) e soprattutto la

popolazione spagnola (ESP), come già evidenziato in precedenza dall'analisi Fst e delle distanze genetiche di Nei, lungo l'asse 1 che spiega il 26.26% della varianza.

Infine, in Figura 77 è visibile il dendrogramma UPGMA ottenuto dal dataset dei loci microsatelliti con coefficiente di coancestralità.

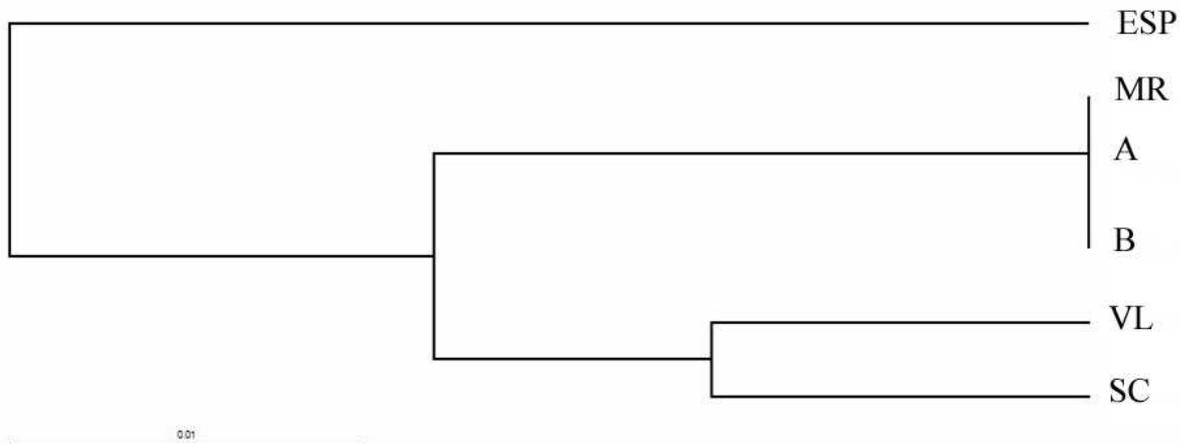


Figura 77 - Dendrogramma UPGMA costruito con GDA secondo il coefficiente di coancestralità

Come nell'immagine relativa alla FCA, anche nel dendrogramma UPGMA le popolazioni della laguna di Venezia (A, B) risultano molto vicine, così come la popolazione della laguna di Marinetta (MR). Un gruppo distinto è formato dalle popolazioni di Caleri (VL) e Scardovari (SC); emerge inoltre una netta separazione della popolazione spagnola (ESP) da tutte le popolazioni dell'Alto Adriatico.

Complessivamente, i valori di Fst, le distanze di Nei, l'analisi FCA, il dendrogramma UPGMA indicano tutti un moderato livello di differenziamento genetico tra le popolazioni analizzate. 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 (Lagune costiere dell'Alto Adriatico e costa Galiziana). 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).

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), *D. polymorpha* (Astaneì *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.

Infine, 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 della larve, che la loro dispersione.

5. Conclusioni

Il presente progetto di Dottorato si inserisce 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. Tale progetto ha avuto i seguenti obiettivi:

- identificare e validare marcatori molecolari, fisiologici ed ambientali utili per valutare la qualità ambientale dei siti di allevamento della vongola verace filippina, e la sicurezza alimentare del prodotto.
- valutare la diversità genetica delle vongole nell'area del Nord Adriatico in un'ottica di tracciabilità e sostenibilità di filiera.
- individuare un efficiente sistema di controlli e di monitoraggio dell'inquinamento di tipo inorganico (metalli pesanti e metalloidi) e degli effetti che l'attività di allevamento e di raccolta hanno sui sedimenti e sull'ecosistema dell'area in generale.

Le aree in concessione, infatti, sono soggette a continue alterazioni chimico-fisiche, morfologiche e granulometriche dei fondali lagunari causate sia dall'intenso sfruttamento delle aree stesse per l'allevamento, sia dall'utilizzo di mezzi impropri e non autorizzati per la raccolta del prodotto, che sono causa di frequenti crisi anossiche che ne pregiudicano la capacità produttiva in seguito alla messa in circolo di sedimenti anossici tossici.

Lo studio sulla qualità delle aree di allevamento ha riguardato gli effetti sulla qualità ambientale prodotti dalla presenza di metalli pesanti e As nelle principali matrici ambientali delle aree indagate. In particolare sono stati determinati i livelli di presenza di As, Cr, Ni, Cu, Cd, Zn, Pb, Fe e Hg sia nei sedimenti che in esemplari di *Ruditapes philippinarum* delle aree di allevamento della Laguna di Venezia (Palude del Monte, Busa, Perognola, Valle delle Dolce) e del Delta del Po (Laguna di Caleri, Laguna di Marinetta, Sacca degli Scardovari).

Lo stato di salute delle aree prese in considerazione in riferimento alla contaminazione metallica, è stata valutata sia attraverso la determinazione dei metalli totali sia attraverso la determinazione delle diverse forme associative (qualitative e quantitative) in cui i metalli si trovano distribuiti nel sedimento mediante la procedura di speciazione geochimica.

Per quanto riguarda le concentrazioni di metalli totali nei sedimenti, non esistendo una normativa specifica di riferimento che leghi il livello di inquinamento metallico allo stato di salute delle aree di allevamento, si sono adottati i criteri utilizzati dal Ministero dell'Ambiente nel "protocollo

recante i criteri di sicurezza ambientale per gli interventi di escavazione, trasporto e reimpiego dei fanghi estratti dai canali di Venezia” che suddivide in tre classi di contaminazione (Classe A, B, C) considerando degli intervalli di concentrazione per alcuni importanti metalli.

Anche per quanto riguarda le vongole, non sono stati fissati limiti legislativi per le concentrazioni di metallo ammissibili per i prodotti eduli delle aree di venericoltura se non quelli riportati nel Regolamento CE 1881/2006 e che riguardano tre metalli di particolare tossicità (Cd, Pb, Hg).

Per una prima valutazione della sicurezza alimentare della vongola *R. philippinarum* nelle aree della Laguna di Venezia e del Delta del Po testate, si sono confrontati i livelli di presenza dei metalli di interesse oltre che con i sopracitati limiti della Comunità Europea (che riguardano solo tre dei nove metalli interessati dalle analisi), anche con quelli rilevati nell’area a minore contaminazione tra quelle studiate, e con i valori riportati già in letteratura di un’altra area adibita a venericoltura nell’Alto Adriatico (Laguna di Marano).

Le concentrazioni dei metalli considerati nelle varie stazioni sono quasi sempre al di sotto dei limiti legislativi di riferimento della Classe A. Gli unici elementi che superano tali limiti sono Cr e Ni: nello specifico, il Cr supera il limite nei campioni del 2009 per tutte le aree a parte la stazione Busa e in tutte le aree senza eccezioni in quelli del 2011. La concentrazione di Ni è superiore al limite nella stazione della Laguna di Marinetta (campionamento 2009) e nella stazione di Scardovari (campionamento 2011). L’area “migliore” dal punto di vista della contaminazione da metalli pesanti si è rivelata essere la stazione di Busa in Laguna di Venezia centrale.

Avendo bisogno di un riferimento per stabilire limiti di sicurezza ambientali ed alimentari per i sedimenti delle aree testate, si sono scelte le concentrazioni di metallo misurate nei campioni di vongole che sono cresciute in un sedimento risultato generalmente tra i meno contaminati tra tutti quelli testati.

In base al criterio utilizzato in questo studio per una valutazione preliminare della qualità ambientale e alimentare dei siti e degli organismi, la contaminazione dei metalli nelle vongole per quanto riguarda Pb, Cd e Hg è risultata molto inferiore sia ai limiti di riferimento CE, sia alle concentrazioni riscontrate nella Laguna di Marano. Di conseguenza è possibile esprimere un giudizio positivo sulla idoneità delle aree indagate per le attività di venericoltura e sulla relativa risorsa alieutica.

La determinazione delle diverse forme associative in cui i metalli si trovano distribuiti nel sedimento realizzata mediante la procedura di speciazione geochimica, permette di trarre alcune conclusioni importanti.

La distribuzione percentuale di As tra le sei fasi è risultata essere estremamente eterogenea e dipendente dal sito. Le fasi più rappresentate sono la terza e la residuale (80-90%), con il restante 10-20% distribuito tra prima, seconda e quarta fase. Queste ultime, insieme alla frazione più labile della terza fase, cioè la terza fase A, costituiscono l'As biodisponibile per le vongole, come si evince dai buoni coefficienti di correlazione trovati. Inoltre gli ottimi coefficienti di correlazione trovati tra la concentrazione di As presente in queste fasi e la percentuale di granulometria fine evidenzia l'importante ruolo di questa associazione nel bioaccumulo di As nelle vongole. Tenendo conto che le vongole si nutrono di particelle sospese nell'acqua o depositate nel fondale, è lecito supporre che la principale fonte di As per l'organismo sia quello presente nel particolato fine del sedimento o sospeso nell'acqua, che una volta assorbito all'interno della vongola, incontra condizioni tali per cui si rende biodisponibile solo l'As direttamente scambiabile o quello più labilmente legato alla seconda fase, terza fase A e quarta fase, mentre quello presente in forme fisico-chimiche stabili e resistenti, tipo quello legato alla terza fase B e alla fase residuale, non venendo metabolizzato, attraversa i vari organi inalterato e viene direttamente espulso insieme al contenuto stomacale (pseudofeci). L'As assunto sotto forma di As inorganico, all'interno degli organismi viene organicato e accumulato prevalentemente sotto forma di arsenobetaina: ciò spiega i significativi valori del fattore di bioaccumulo riscontrati in tutte le stazioni.

La distribuzione del Cr tra le fasi geochimiche si presenta omogenea per tutte le aree, sia per quanto riguarda i campioni del 2009 che quelli del 2011, mostrando gli stessi andamenti. In entrambi i casi, praticamente la totalità del metallo si trova ripartito tra la fase residuale maggioritaria, e la terza fase B, con una percentuale molto piccola presente nella terza fase A: di conseguenza, la prima, seconda, e quarta fase presentano percentuali molto basse o sono praticamente nulle. Nei campioni del 2011 aumenta la fase residuale (70-85%) rispetto a quelli del 2009 (50-70%), mentre la terza fase A e B mostra un andamento esattamente speculare a 100. Entrambe le matrici di correlazione mostrano alti coefficienti tra concentrazione totale di Cr nel sedimento e quella presente nella terza fase A e terza fase B; concentrazione di Cr nei tessuti extraghiandolari e ghiandolari e quella presente nella terza fase B; concentrazione totale di Cr nel sedimento e quella presente nei tessuti extraghiandolari, probabilmente causata dal fatto che entrambi sono altamente correlabili alla terza fase B. Infine, i campioni del 2009 presentano un coefficiente di correlazione significativo tra il contenuto di Cr presente nella terza fase B e la percentuale di sabbia, confermato anche dal

corrispondente coefficiente di correlazione negativo con la componente percentuale fine del sedimento. Questo potrebbe limitare la biodisponibilità del Cr nei riguardi della vongola per la maggior difficoltà ad essere assorbito a causa delle sue maggiori dimensioni.

I risultati ottenuti in questo studio, visto gli alti livelli di presenza dell'elemento nei sedimenti di tutte le aree di allevamento ed, in particolare, nelle aree del Delta del Po, e visto il comportamento e il possibile ruolo che tale elemento potrebbe avere sulla qualità ambientale e sulla sicurezza alimentare del prodotto della venericoltura dell'Alto Adriatico, meritano un ulteriore approfondimento.

I livelli di Cr rilevati nei sedimenti delle aree di allevamento delle vongole *R. philippinarum*, ad eccezione del sito A del campionamento del 2009, si collocano generalmente tra poco inquinati e molto inquinati, in particolare, per quanto riguarda le aree di allevamento del Delta del Po. Se però si considerano 1) i risultati della speciazione geochimica (fino a quasi il 90% del Cr si trova nella frazione residuale e quindi non biodisponibile); 2) l'effetto dell'operazione di spurgo sulla concentrazione di Cr nella biomassa della vongola (tale operazione viene effettuata in appositi impianti prima che il prodotto venga immesso sul mercato) che comporta una riduzione della concentrazione di Cr di circa il 50%; 3) le concentrazioni di Cr rilevate nella biomassa del sito di Busa (ovvero il sito che nel campionamento del 2009 è risultato inferiore al limite di Classe A) e quella di Cr presente nella biomassa di vongole del sito della laguna di Marinetta (risultato avere il sedimento più inquinato per quanto riguarda tale elemento), si nota che mentre le concentrazioni di Cr nel sedimento variano di circa un ordine di grandezza, le relative concentrazioni nei tessuti degli organismi variano di circa il doppio, e quindi non c'è una relazione diretta tra concentrazione di Cr nei sedimenti e concentrazione negli organismi. In assenza di qualsiasi indicazione (in letteratura, nelle tabelle ministeriali e regionali, etc.) sulle concentrazioni limite accettabili nei tessuti delle vongole per quanto riguarda il Cr, al momento è solo possibile esprimere, in modo del tutto preliminare e cautelativo un giudizio positivo sull'idoneità dei siti indagati ad essere utilizzati come aree di allevamento della vongola *R. philippinarum*, tenendo conto però della necessità di approfondire gli aspetti riguardanti il comportamento, il destino e la tossicità del Cr con studi specifici in aree opportunamente scelte ed in numero limitato in modo da poter seguire l'evoluzione e le variazioni nel tempo di alcuni parametri che si sono dimostrati influenzare il comportamento e il destino metabolico del Cr nell'ecosistema adibito ad area per l'allevamento delle vongole.

I risultati della speciazione geochimica per quanto riguarda Zn e Ni hanno indicato che non esistono forme associative preferenziali e che i due metalli si distribuiscono più o meno omogeneamente tra le fasi geochimiche principali. Entrambi i metalli presentano una frazione direttamente scambiabile

che, anche se in quantità decisamente minore rispetto alle altre frazioni, è significativa, in particolare per lo Zn, e importante a causa della maggiore biodisponibilità. Le analisi di correlazione evidenziano l'importanza della terza fase B come fonte di metallo per l'organismo. L'analisi del fattore di bioaccumulo indica che mentre il Ni, nonostante le alte concentrazioni riscontrate nei sedimenti, non è soggetto a bioaccumulo negli organismi, lo Zn invece tende a concentrarsi maggiormente nei tessuti delle vongole, senza particolari differenze nella sua distribuzione tra tessuti molli ed epatopancreas. In ogni caso, in base ai criteri di valutazione di qualità e sicurezza adottati, anche in questo caso il giudizio sui livelli di contaminazione è positivo.

Anche per il Pb vale quanto osservato per Zn e Ni: c'è una frazione direttamente scambiabile molto ridotta e una distribuzione tra le fasi restanti più o meno importante in termini di quantità a seconda dei siti considerati. Va ricordato che i valori di concentrazione di Pb riscontrati nel sedimento sono al di sotto del limite di Classe A, mentre per quanto riguarda gli organismi, le concentrazioni rilevate sono inferiori sia al limite CE che ai valori di letteratura relativi alla Laguna di Marano. L'analisi del fattore di bioaccumulo conferma il giudizio positivo sui livelli di contaminazione delle aree indagate.

Il Cu presenta una forte affinità per la quarta fase, che si rende biodisponibile quando il sedimento è in condizioni ossidate; presenta inoltre una significativa frazione direttamente scambiabile. Anche per il Cu le concentrazioni rilevate nel sedimento sono molto inferiori al limite di Classe A, mentre per quanto riguarda le concentrazioni di bioaccumulo, sono anche in questo caso inferiori ai valori rilevati nei campioni della Laguna di Marano. Il fattore di bioaccumulo di questo metallo varia da sito a sito, ma in generale si mantiene su valori non molto superiori a 1; inoltre va ricordato che il Cu è un metallo essenziale per la fisiologia degli organismi, quindi anche in questo caso la valutazione preliminare sullo stato di contaminazione è buona.

Il Cd è, tra i metalli considerati, quello che presenta una prima fase prevalente rispetto alle altre, consistente è anche la seconda fase, e quindi la maggior parte di questo elemento è presente in forma direttamente scambiabile o comunque biodisponibile in condizioni leggermente acide. Questo si evince anche dagli ottimi coefficienti di correlazione tra la quantità di Cd presente nei tessuti delle vongole e quella presente in prima e seconda fase. I valori di concentrazione di questo elemento nei sedimenti sono sempre molto più bassi dei limiti normativi di riferimento (Classe A). Il calcolo del fattore di bioaccumulo indica una forte tendenza di questo metallo a concentrarsi nei tessuti, ma bisogna considerare che le concentrazioni rilevate negli organismi sono molto inferiori al valore soglia europeo. In via del tutto preliminare, il giudizio sullo stato di contaminazione è positivo.

Per quanto riguarda il Hg, sulla base dei dati di speciazione geochimica esso è presente nei sedimenti completamente associato alla frazione residuale (e quindi in teoria non biodisponibile) anche se le analisi delle concentrazioni negli organismi hanno evidenziato un alto fattore di bioaccumulo. Si può ipotizzare che una probabile via di assunzione del Hg da parte delle vongole potrebbe essere attraverso la dieta (fitoplancton e microorganismi) sotto forma di metil mercurio. In ogni caso, le concentrazioni rilevate sono inferiori ai riferimenti normativi adottati, quindi è possibile esprimere una valutazione positiva.

Infine, per quanto riguarda il Fe, i risultati della speciazione indicano una distribuzione più o meno omogenea tra le diverse aree campionate, con una prevalenza del Fe associato alla fase residuale e alla terza fase, è assente o minima la fase direttamente scambiabile. Va ricordato che gli ossidi e idrossidi di Fe sono una componente importante del sedimento e che costituiscono una fase associativa preferenziale per la maggior parte dei metalli analizzati (fanno eccezione Cu e Cd): solubilizzandosi quando il sedimento si trova in condizioni anossiche, essi costituiscono una delle più importanti fonti di metalli per gli organismi marini e in particolare per quelli bentonici come *R. philippinarum*.

La vongola può assimilare metalli pesanti attraverso diverse vie di assunzione: attraverso le forme solubili in acqua, attraverso il particolato solido sospeso, e attraverso fitoplancton e microorganismi animali vivi o morti (dieta). I risultati sin qui ottenuti indicano che tutte e tre queste vie sono importanti e attive nel determinare il bioaccumulo dei metalli nell'organismo che si distribuiscono nei diversi tessuti a seconda della loro affinità specifica.

Le analisi di quantificazione delle metallotioneine nell'epatopancreas delle vongole tendono a confermare un quadro di forte *turnover* e scarso immagazzinamento di queste proteine nella ghiandola digestiva: evidentemente, l'organismo non è in grado di destinare sufficienti risorse fisiologiche per la sintesi di proteine detossificanti perché la quantità di questi metalli in ingresso nel suo metabolismo è persistente, innescando meccanismi di *downregulation*. Tale ipotesi avvalorata quanto osservato in relazione a bioaccumulo e ripartizione di metalli pesanti e speciazione geochimica, confermando un quadro generale di contaminazione cronica e continuativa, ancora in evoluzione. Le analisi di correlazione con le concentrazioni dei vari metalli nella ghiandola e nel resto dei tessuti degli organismi, confermano il ruolo di queste proteine nella gestione metabolica dei metalli pesanti, anche in risposta a fenomeni di inquinamento cronico e costante nel tempo. In particolare, la ghiandola rappresenta la prima difesa dell'organismo nei confronti degli inquinanti inorganici, innescando la sintesi di MT, che sul breve termine, riescono a smaltire l'eccesso metabolico di metalli; tuttavia in una situazione di cronico inquinamento, è possibile che le MT (ed

i metalli legati ad esse) tendano a distribuirsi anche nei tessuti extra ghiandolari; questa ipotesi deve essere confermata dallo studio della concentrazione di queste proteine anche in altri tessuti (ad esempio branchie e mantello).

Per quanto riguarda il calcolo dell'indice di condizione degli organismi, i risultati ottenuti indicano che, nonostante gli organismi siano soggetti ad un inquinamento cronico e continuativo e tendano a bioaccumulare notevolmente metalli pesanti, la massa relativa delle varie frazioni di tessuto considerate (soprattutto la ghiandola digestiva) non mostra variazioni significative, suggerendo dunque che tali organismi si siano ben adattati al sistema e alle aree in cui vengono allevati.

In conclusione, i numerosi risultati ottenuti richiedono un'ulteriore e più mirata indagine di approfondimento. Sulla base delle informazioni sin qui ottenute, la qualità ambientale delle aree di allevamento e la sicurezza alimentare della risorsa alieutica, sono da considerarsi buone, anche se alcuni aspetti della gestione dell'allevamento e della pesca di *R. philippinarum* vanno sicuramente migliorati in un'ottica di maggiore sostenibilità e tutela degli ecosistemi. Nello specifico, lo studio della sostenibilità eco sistemica della venericoltura in aree lagunari fornisce conoscenze in rapporto alla gestione medesima delle risorse naturali, al fine di mitigare gli impatti derivanti dalla stessa attività di allevamento e raccolta del prodotto.

Le analisi genetiche svolte, basate su un approccio integrato attraverso il sequenziamento di un frammento del gene mitocondriale *16S*, e la genotipizzazione di sette loci microsatelliti, hanno fornito per la prima volta informazioni sulla struttura genetica delle popolazioni di vongola verace filippina nell'area del Mediterraneo. Sino ad oggi, infatti, anche se l'Italia rappresenta il secondo produttore mondiale di *R. philippinarum*, la genetica molecolare è stata a lungo trascurata, con grave deficit di conoscenza. L'approccio basato sulla genetica molecolare è infatti indispensabile per conoscere la struttura delle popolazioni di specie invasive, per determinarne la variabilità, l'origine geografica, e predire scenari futuri e futuri impatti sulle specie native. Inoltre, essa è fondamentale per gestire in modo consapevole le risorse alieutiche, sottoposte al prelievo da pesca.

Dai dati sin qui raccolti ed elaborati, emerge innanzi tutto che le analisi basate sul DNA si sono dimostrate particolarmente utili 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.

E' stato possibile stabilire come le popolazioni analizzate nell'Alto Adriatico ed in Galizia siano state oggetto di introduzioni multiple, con almeno due (o più) "effetti del fondatore" successivi, come suggerito dall'analisi degli aplotipi mitocondriali, che presentano una marcata 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.

Particolarmente interessante risulta il fatto che sia l'analisi dell'mtDNA, sia l'analisi dei loci microsatelliti, mostrano che i campioni provenienti dalla costa Galiziana della Spagna hanno profili genetici distinti rispetto ai campioni di vongola verace filippina raccolti nell'Alto Adriatico. All'interno delle aree produttive europee, questo dato rappresenta il primo elemento utile per la tracciabilità delle vongole veraci, che permetterebbe, se confermato, di risalire all'origine geografica del prodotto attraverso l'analisi del DNA, ovvero di ottenerne la "tracciabilità molecolare". Ciò consentirebbe di distinguere chiaramente i prodotti italiani da quelli spagnoli, con conseguente vantaggio sia dei produttori italiani, sia del consumatore finale, che potrebbe scegliere ed acquistare le vongole italiane con maggiore sicurezza e garanzia.

Per quanto riguarda invece le aree produttive dell'Alto Adriatico, le differenze tra le vongole veraci prodotte nelle diverse lagune costiere sono meno marcate, anche se l'analisi del DNA mitocondriale indica che esistono degli aplotipi ben distinti a livello locale. Anche in questo caso, 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.

La presente ricerca presenta notevoli prospettive future, sia in termini di conoscenza di base, sia in termini applicativi (Chiesa *et al.*, 2011c). Infatti, per confermare i dati sin qui raccolti ed implementare le conoscenze relative alla struttura genetica delle popolazioni alieutiche, sarà necessario aumentare l'area di studio, includendo altre aree produttive europee ed extracomunitarie, confrontare i dati ottenuti con quelli relativi alle popolazioni primarie (Cina, Giappone, Corea), aumentare il numero di loci analizzati.

Ciò consentirà di costruire un database più completo ed esaustivo dei profili genetici della vongola verace filippina, che verranno poi utilizzati per costruire il "passaporto molecolare" dei prodotti immessi sul mercato, a garanzia del consumatore finale, e per valorizzare le attività dei produttori locali.

6. Bibliografia

Allen H.E. *et al.* (eds). (1989). Metal speciation and Transport in groundwaters. *Workshop organized by U.E.S.P.A. and American Chemical Society*, May 24-26, 1989, Jekyll Island, Georgia.

Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76: 160-202.

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.

Amorosi A., Sammartino I. (2007) Influence of sediment provenance on background values of potentially toxic metals from near surface sediments of Po coastal plain (Italy). *International Journal of Earth Science (Geol. Rundsch)* 96: 389-396.

Amorosi A., Centineo M.C., Dinelli E., Lucchini F., Tateo F. (2002). Geochemical variations as indicators of provenance changes in Late Quaternary deposits of SE Po Plain. *Sediment Geology* 151: 273–292.

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.

Argese E., De Pol R., Bettiol C., Gobbo L., Quinci E., Rigo C., Sfriso A. (2009). Arsenic metabolism in mussels *Mytilus galloprovincialis* and *Tapes philippinarum*: influence of environmental factors and comparison between the two biota species. In: *Proceedings 2009 International Workshop on Arsenic and Humic Substances in Groundwater and Their Health Effects*. Tainan City, Taiwan, May 11-12, 2009, p. 35-37

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., Bertini S., Gobbo L., Rigo C. (2002). Optimization of metal speciation techniques in various environmental matrices and application to the study of pollution in the lagoon of Venice. In: *Scientific Research and Safeguarding of Venice*. Ed. P. Campostrini. Istituto Veneto di Scienze, Lettere e Arti. pp. 387-391.

Argese E., Bettiol C. (2001). Heavy metal partitioning in sediments from the lagoon of Venice (Italy). *Toxicological and Environmental Chemistry*. 79: 157-170.

Arizzi Novelli A., Losso C., Ghetti P.F., Volpi Ghirardini A. (2003). Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparisons with exposure concentrations in the Lagoon of Venice, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (6): 1295-1301.

ARPAV. (2006). Le lagune del Delta del Po. Ecosistemi fragili. Rilevamento in continuo della qualità delle acque. Anno 2003-2004. Dipartimento Provinciale di Rovigo, Osservatorio acque di transizione, Rovigo, Italy, 33 pp.

Asaro M. (2004). Fishery chain traceability, food safety tool for consumer: problems and solutions. *Proceedings Mediterranean Seafood Exposition (MSE)*, 01-02 February 2004, Rimini, Italy.

Astanei 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.

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

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. (1989). Trace element speciation – Analytical methods and problems. *Boca Raton/Fla.*, CRC Press.

Batley G.E., Gardner D. (1977). *Water Research* 11: 745-756.

Baudrimont M., Schäfer J., Marie V., Maury-Brachet R., Bossy C., Boudou A., Blanc G. (2005). Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Science of The Total Environment* 337: 265-280

Bayne B.L., Thompson R.J. (1970). Some physiological consequences of keeping *Mytilus edulis* in the laboratory. *Helgoländerwiss. Meeresunters* 20: 526–552.

Bebianno M.J., Serafim M.A. (2003). Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 53–66.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Rfauste N., Catch F. (1996–2002). GENETIX4.04, software under Windows TM for the genetics of the populations. Laboratory Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. University of Montpellier II, Montpellier, France.

Beltrame M.O., De Marco S.G., Marcovecchio J.E. (2009). Dissolved and particulate heavy metals distribution in coastal lagoons. A case study from Mar Chiquita Lagoon, Argentina. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 85: 45-56

- 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
- Bernhard M., Brinckman F.E., Salder O.S. (eds). (1986). The importance of chemical “speciation” in Environmental Processes. Dahlem-Konferenzen, Life Sciences Research Report 33, p 763. *Springer-Verlag, Berlin*.
- 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.
- Boatto V., Pellizzato M. (eds.) (2005). La filiera di *Tapes philippinarum* in Italia. Edizioni Franco Angeli.
- Bocchetti R., Fattorini D., Pisanelli B., Macchia S., Oliviero L., Pilato F., Pellegrini D., Regoli F. (2008). Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels *Mytilus galloprovincialis* to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology* 89: 257–266.
- 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.
- Boldrin A., Bortoluzzi G., Frascari F., Guerzoni S., Rabitti S. (1988). Recent deposits and suspended sediments off the Po della Pila (Po River, main mouth) Italy. *Marine Geology* 79: 159-170.
- 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.
- Boscolo 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
- Breber P. (2002). Introduction and acclimatisation of the Pacific carpet clam, *Tapes philippinarum*, to Italian waters. In: Leppakoski E. *et al.* (eds) Invasive aquatic species of Europe: distribution, impacts and management, Kluwer, Dordrecht, pp. 120-126.
- Breber P. (1985). On growing of the carpet shell clam (*Tapes decussatus* (L.)): Two Years' Experience In Venice Lagoon. *Aquaculture* 44: 51–56.
- Breber P. (1985). L'introduzione e l'allevamento in Italia dell'Arsella del Pacifico, *Tapes semidecussatus* Reeve (*Bivalvia: Veneridae*). *Oebalia* 11(2): 675–680.
- 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.

Bustamante P., Cosson R.P., Gallien I., Canrant F., Miramand P. (2002). Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Marine Environmental Research* 53: 227-241.

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.

Caplat C., Texier H., Barillier D., Lelievre C. (2005). Heavy metals mobility in harbour contaminated sediments: the case of Port-en-Bessin. *Marine Pollution Bulletin* 50: 504–511.

Carpenè E. (1993) Metallothionein in marine molluscs. In: Ecotoxicology of metals in Invertebrates. Dallinger R., Rainbow P.S. (eds) Lewis Publ, London, 1993, pp 55-72.

Carpenè E., Cattani O., Hakim G., Serrazanetti G.P. (1983). Metallothionein from foot and posterior adductor muscle of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 74 (2): 331–336.

Carpenè E., Cortesi P., Crisetig G., Serrazanetti G.P. (1980). Cadmium-binding proteins from the mantle of *Mytilus edulis* (L.) after exposure to cadmium. *Thal Jugosl* 16 (2–4): 317–323.

Castellani C., Barbanti A. (2010). L'inquinamento e i suoi effetti. In: Stato dell'ecosistema lagunare veneziano. Strumenti del magistrato alle acque di Venezia, Marsilio, Venezia, pp. 195-235.

Castellani C., Bocci M. (2010). Le sostanze eutrofizzanti e i loro effetti. In: Stato dell'ecosistema lagunare veneziano. Strumenti del magistrato alle acque di Venezia, Marsilio, Venezia, pp. 147-195.

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

Cesari P., Pellizzato M. (1985). Molluschi pervenuti in laguna di Venezia per apporti volontari o casuali. Acclimazione di *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughely, 1933) e di *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Bolettino Malacologico* 21: 237-274.

Chapman P.M., Wang F. (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (1): 3-22

Chester R., Voutsinou F.G. (1981). The initial assessment of trace metal pollution in coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 12: 84-91.

Chiesa S., Scalici M., Negrini R., Gibertini G., Nonnis Marzano F. (2011a). Fine-scale genetic structure, phylogeny and systematics of threatened crayfish species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 1–11.

- 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.
- Chiesa S., Manente S., Bordignon G., Minervini G., Bilanicova D., Pojana D., Cecchin A., Baccarani G. *et al.* (2011c). Validation of a new tool for seafood safety and traceability: the case of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Economia Agro-alimentare* 1-2: 503-507.
- 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., 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.
- Ciocan C.M., Rotchell J.M. (2004). Cadmium Induction of metallothionein isoforms in juvenile and adult mussels (*Mytilus edulis*) . *Environmental Science and Technology* 38 (4): 1073-1078.
- Chong K., Wang W-X. (2001). Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Pollution* 115: 107-121.
- Chora S., Geribaldi-Starita M., Guignonis J.M., Samson H., Romeo M., Bebianno M.J. (2009). Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquatic Toxicology* 94: 300-308.
- CNR (2001). Progetto DRAIN. Determinazione degli apporti inquinanti dal Bacino Scolante alla Laguna di Venezia. Presentazione e discussione dei metodi e dei risultati principali del progetto. Atti del Workshop, Venezia, 14-15 Giugno 2001.
- CNR (1987). Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives* 74: 3-9.
- Cooper S., Hare L., Campbell P.G.C. (2010). Subcellular partitioning of cadmium in the freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, after separate short-term exposure to waterborne or diet-borne metal. *Aquatic Toxicology*.
- Dallinger R. (1995). Mechanisms of metal incorporation into cells. *Cellular Biology in Environmental Toxicology*, pp. 135-154.
- Darnley A.G. (1997). A global geochemical reference network: the foundation for geochemical baselines. *Journal of Geochemical Exploration* 60:1-5

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., Allersma E. (1976). Processes affecting heavy metals in estuarine sediments. In: *Estuarine Chemistry*, (Burton J.D., Liss P.S. eds), Academic Press, London, pp. 131–157.

Decreto Ministeriale 23 Aprile 1999. Modificazione al DM 8/10/96 recante: “Modalità di prestazione delle garanzie finanziarie a favore dello Stato da parte delle imprese esercenti attività di trasporto dei rifiuti”. Ministero dell’Ambiente, Roma, Italia.

Decreto Ministeriale 9 Febbraio 1999. Carichi massimi di inquinanti nella laguna di Venezia. Ministero dell’Ambiente, Roma, Italia.

Depledge M., Fossi M.C. (1994). The role of *biomarker* in environmental assessment: invertebrates. *Ecotoxicology* 3: 173–179.

DGR Regione Veneto No 2432 del 1 Agosto 2006 avente come oggetto “Molluschi Bivalvi vivi: D.G.R.V. No 3366/2004 e sue integrazioni e modifiche”. Giunta Regionale del Veneto, Italia.

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.

Edwards E. (2005). World shellfish production keeps growing. *Fish Farming International* 32 (1): p. 38.

EFSA Journal. (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) claiming biotransformation of xenobiotic substances (ID 1378, 2388, 2401, 3900, 3942, 4039, 4510, 4513, 4544, 4628, 4639), “elimination”, “cleansing” and “purification” (ID 1347, 4024, 4442, 4457), elimination of heavy metals (ID 1887, 3156), and maintenance of normal bowel function (ID 4039) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. [doi:10.2903/j.efsa.2010.1733]

EFSA Journal. (2009). Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. [doi:10.2903/j.efsa.2009.980].

EFSA Journal. (2004). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to mercury and methylmercury in food. [doi:10.2903/j.efsa.2004.34].

El-Shenawy N.S. (2002). The effects of metal bioaccumulation on glutathione and lipid peroxidation as biomarkers of aquatic ecosystem pollution of *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra* from Lake Timsah, (Ismailia). *Egypt Journal of Zoology* 39: 475–492.

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.
- Fisher H. (1983). Shell weight as an independent variable in relation to cadmium content of molluscs. *Marine Ecology Progress Series* 12: 59-75.
- Forstner U., Wittman G.T.W. (1981). Metal Pollution in the aquatic environment, (2nd edition), *Springer-Verlag, Berlin*.
- 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.
- Fox J.M., Hill P.S., Milligan T.G., Boldrin A. (2004). Flocculation and sedimentation on the Po River delta. *Marine Geology* 203: 95-107.
- Fränzle 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.
- 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., 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. *Environmental Science and Technology* 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.
- George S.G., Carpenè E., Coombs T.L., Overnell J., Youngson A. (1979). Characterization of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis* (L.), exposed to cadmium. *Biochimica et Biophysica Acta* 580: 225–233.
- Ghezzi M., *et al.* in press (2010) Changes in Venice Lagoon dynamics due to construction of mobile barriers, *Coastal Engineering*.
- 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., Astanei 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.
- G.R.A.L. (2009) Adeguamento del Piano d'uso sostenibile delle aree in concessione per venericoltura. 46 pp.
- G.R.A.L. (2006) Piano d'uso sostenibile delle aree in concessione per venericoltura. 93 pp.
- Greja J.A.G., Salinas J.I.S. (2003). Recovery simulations of grossly polluted sediments in the Bilbao Estuary. *Marine Pollution Bulletin* 46 (1): 42–48.
- Guerra R., Pasteris A., Ponti M. (2009). Impacts of maintenance canals dredging in a northern Adriatic coastal lagoon. I: effects on sediment properties, contamination and toxicity. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 85: 134-142.
- Guerzoni S., Tagliapietra D. (2006). Atlante della Laguna. In: Venezia tra terra e mare. Marsilio, Venezia. 241 pp.
- Guo X., Ford S.E., Zhang F. (1999). Molluscan aquaculture in China. *Journal of Shellfish Research* 18(1): 19–31.
- 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., Pellerin J., Joux L., Berthet B. (2000). The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussates* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 127: 185–197.
- 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.
- Han S., Gieskes J., Obraztsova A., Deheyn D.D., Tebo B.M. (2011). Relocation effects of dredged marine sediments on mercury geochemistry: Venice lagoon, Italy. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, uncorrected proof.

- Harte M.E. (1998). Is Cyclininae a monophyletic subfamily of Veneridae (Bivalvia)? *Malacologia* 40 (1-2): 297-304
- Hartl D.L., Clark A.G. (1997). Principles of population genetics. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- 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.
- Hoarau G., Rijnsdorp A.D., Van der Veer H.W., Stam W.T., Olsen J.L. (2002). Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: microsatellites revealed large scale spatial and temporal homogeneity. *Molecular Ecology* 11: 1165–1176.
- 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 vulgate*. *Journal of Chromatography* 104: 457-459.
- Hummell H., Modderman R., Amiard-Triquet C., Rainglet F., Van-Duijn Y., Hessevoort M., deJong J., Bogaards R., Bachelet G., Desprez M., Marchand J., Sylvand B., Amiard J.-C., Rybarczyk H., deWolf L. (1997). A comparative study on the relation between copper and condition in marine bivalves and the relation with copper in the sediment. 38(1–3):165–181.
- ICRAM (1995) Sperimentazione di un “rastrello vibrante” per la pesca delle vongole veraci in concessione demaniale lagunare, Relazione finale, Chioggia, 32 pp.
- Irato P., Santovito G., Cassini A., Piccinini E., Albergoni V. (2003). Metal Accumulation and Binding Protein Induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis*, and *Ruditapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 476 – 484
- Isani G., Kindt M., Carpenè E. (2000). Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grande, France)* 46: 311-330
- 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.
- Ji J., Choi H.J., Ahn I. (2006). Evaluation of Manila clam *Ruditapes philippinarum* as a sentinel species for metal pollution monitoring in estuarine tidal flats of Korea: Effects of size, sex, and spawning on baseline accumulation. *Marine Pollution Bulletin* 52: 447-453.
- 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.
- Keen A.M. (1969). Superfamily Veneracea pp 670-690. In: Leslie Reginald Cox *et al.*, Part N (Bivalvia) Mollusca 6, Vol. 1-2: XXXVII, 925 pp.
- Kingston H.M., Jessie L.B. (1988) Introduction to microwave sample preparation. ACS Professional Reference Book
- 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.
- 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.
- 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.
- Landner L. (ed.) (1987). Speciation of metals in water, sediment and soil systems. *Lecture Notes in Earth Sciences* No. 11, p 190, Springer-Verlag, Berlin.
- 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., Lulier M. (2006) Isolation and characterisation of *Mytilus edulis* metallothionein genes. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 142: 12-18.
- Leignel V., Hardvillier Y., Lulier M. (2005) Small metallothionein MT-10 genes in coastal and hydrothermal Mussels. *Marine Biotechnology* 7: 236-244.
- Legge Regionale 12 Luglio 2007 No. 15 (BUR No. 63/2007). Interventi per la tutela, la promozione e lo sviluppo della zona costiera del Veneto e per la creazione di zone di tutela biologica marina. Regione Veneto.
- Lemoine S., Lulier 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
- Leppard G.G. (ed.) (1983). Trace element speciation in surface waters and its ecological implication. *Proc. NATO Advance Research Workshop*, Nervi, Italy, November 2-4, 1981, p. 320. Plenum Press New York.

- 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., Belkhode 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., Volpi Ghirardini A. (2010). Overview of ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy). *Environment International* 36: 92–121.
- 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.
- 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.
- Luoma S.N. (1989). Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* 176(177): 379–96
- 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 (revised). 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.
- 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.
- Mamindy-Pajany Y., *et al.* in press (2010). The toxicity of composted sediments from Mediterranean ports evaluated by several bioassays. *Chemosphere*.

- Manente S. (2003). Trasferimento di inquinanti tossici da sedimenti a Molluschi in ambiente di transizione. *Dipartimento di Scienze Ambientali*. Venice, Italy, Ca' Foscari. PhD.
- Mao Y., Gao T., Yanagimoto T., Xiao Y. (2011). Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on *COI* gene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 407: 171–181.
- 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.
- MAV-CVN. (1999). Heavy metal distribution in lagoon bottoms (in Italian). Final Report
- MAV (2010) Stato dell'ecosistema lagunare veneziano. Strumenti del magistrato alle acque di Venezia, Marsilio, Venezia, 289 pp.
- 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.
- Milan M., Coppe A., Reinhardt R., Cancela L.M., Leite R.B., Saavedra C., Ciofi C., Chelazzi G., Patarnello T., Bortoluzzi S., Bargelloni L. (2011). Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring. *BMC Genomics* 12 (234).
- 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.
- Ministero dell'Ambiente (1993). Criteri di sicurezza ambientale per lo scavo, trasporto e riutilizzo di sedimenti dai canali di Venezia. 23 pp.
- Mitchell L.G., Mutchmor J.A., Dolphin W.D. (1991). *Zoologia, Zanichelli*, Bologna.
- Molinaroli E., Guerzoni S., Sarretta A., Cucco A., Umgieser G. (2007). Links between hydrology and sedimentology in the Lagoon of Venice, Italy. *Journal of Marine Systems* 68: 303-317.
- Moore D. D. (1999). Manipulation of DNA. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl (Eds.), *Current protocols in molecular biology* (pp. 211–223). New York: John Wiley & Sons Inc.
- 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.
- Nelson B.W. (1970). Hydrography, sediment dispersal and recent historical development of the Po river delta, Italy. In: Morgan JP (ed) Deltaic sedimentation, modern and ancient, *SEPM Sp Publ* 15, pp 152–184.

- Nieto J.M., Sarmiento A.M., Oli'as M., Canovas C.R., Riba I., Kalman J., Delvalls T.A. (2007). Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrit Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary. *Environment International* 33: 445–455.
- 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.
- Nonnis Marzano F., Corradi N., Papa R., Tagliavini J., Gandolfi G. (2003). Molecular evidence for introgression and loss of genetic variability in *Salmo (trutta) macrostigma* as a result of massive restocking of Apennine populations (Northern and Central Italy). *Environmental Biology of Fishes* 68: 349-356.
- 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
- 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.
- Patterson J.W., Passino R. (eds). (1987). Metals speciation, separation, and recovery, 779 p. *Chelsea/MI Lewis Publ* (Second International Symposium, May 14-19, 1989, Rome).
- 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.
- 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.
- Pellizzato M., Favretto J., Galvan T., Penzo P. (2006). Produzione alieutica in laguna di Venezia. *Biologia Marina Mediterranea* 13: 897-900.
- Pellizzato M., Da Ros L. (2005). Clam farming quality as a management tool: a proposal based on recent studies in Northern Adriatic lagoons. *Aquaculture International* 13 (1-2): 57-66
- Pellizzato M., Giorgiutti E. (1997). Attrezzi e sistemi di pesca nella Provincia di Venezia, Provincia di Venezia, ASAP.
- Pellizzato M., Mattei N., Renzoni A. (1989). Allevamento su scala commerciale di *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in alcune valli venete. *Oebalia* XV (2): 735–744.
- Pellizzato M., Mattei N. (1986). Allevamento di *Tapes (Ruditapes) philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in alcuni biotopi lagunari veneti. *Nova Thalassia* 8(Suppl. 3): 393–402.
- Perin G. (2004). Ecotossicologia. *Dipartimento di Scienze Ambientali.*, Venice, Italy Ca' Foscari.
- Perin G. (2004). Ambiente e Salute. *Dipartimento Scienze Ambientali.*, Venice, Italy Ca' Foscari.
- Phyllips D.J.H., Rainbow P.S. (1989). Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. *Marine Environmental Research* 28: 207–10.
- 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.
- Pranovi F., Da Ponte F., Raicevich S., Giovanardi O. (2004). A synoptic-multidisciplinary study of the immediate effects of mechanical clam-harvesting in the Venice Lagoon. *ICES Journal of Marine Science* 61: 43–52.

- Presa P., Pérez M., Diz A.P. (2002). Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp.). *Conservation Genetics* 3: 441–443.
- Provincia di Venezia. (2009). Piano per la gestione delle risorse alieutiche delle lagune di Venezia e Caorle. A cura di Torricelli P., Boatto V., Franzoi P., Pellizzato P., Silvestri S., ed Arti Grafiche Zotelli, Dosson di Casier, TV, 203 pp.
- Provincia di Venezia. (2000). Piano per la gestione delle risorse alieutiche delle lagune della provincia di Venezia. SannioPrint, Benevento, 102 pp.
- Qiu Yao-Wen, Yu Ke-Fu, Zhang G., Wang Wen Xiong. (2011). Accumulation and partitioning of seven trace metals in mangroves and sediment cores from three estuarine wetlands on Hainan Island, China. *Journal of Hazardous Materials* 190: 631-638.
- Ravera O. (2000) The Lagoon of Venice: the result of both natural factors and human influence. *Journal of Limnology* 59(1): 19-30.
- 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.
- Regolamento (CE) No 1881/2006 della Commissione Europea del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE) (GU L 364 del 20.12.2006, p. 5).
- Regolamento (CE) No 1907/2006 della Commissione Europea e del Parlamento del 18 dicembre 2006 riguardante la registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche (REACH).
- Roesijadi G. (1996). Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 113 (2): 117–123.
- Roesijadi G. (1994) Behaviour of MT-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. *Marine Environmental Research* 38: 147-168.
- 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.
- Rossi R., Paesanti F., Turolla E., Pellizzato M., Caramori G., Rossetti E., Zentilin A., Melaku Canu D., Solidoro C., Pastres R., De Leo G., Donati F., Zoppelletto M., Ceschia G. (2000). Elementi di valutazione ecologica, economica e sociale per fronteggiare la flessione produttiva di vongole filippine nell'Alto Adriatico. *Report prepared for the Ministero delle Politiche Agricole e Forestali*.
- Roman J., Darling J.A. (2007). Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 454–464.
- Ruiz F. (2001) Trace metals in Estuarine sediments from the Southwestern Spanish Coast. *Marine Pollution Bulletin* 42: 482–490
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487-491.

- Salminen R., Tarvainen T. (1997) The problem of defining geochemical baselines. A case study of selected elements and geological materials in Finland. *Journal of Geochemical Exploration* 60: 91–98
- Salomons W. (1985). Sediments and water quality. *Environmental Technology Letters* 6: 315-326.
- Sasikumar G., Krishnakumar P.K. (2010). Aquaculture planning for suspended bivalve farming systems: The integration of physiological response of green mussel with environmental variability in site selection. *Ecological Indicators*.
- 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.
- Serafim M.A., Bebianno M.J. (2001). Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(3): 544–552.
- Sfriso A., Argese E., Bettioli C., Facca C. (2008). *Ruditapes philippinarum* seed exposure to metals in polluted areas of the Venice lagoon. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 79: 581–590
- Sfriso A., Favaretto M., Ceoldo S., Facca C., Marcomini A. (2005b). Organic carbon changes in the surface sediments of the Venice lagoon. *Environment International*, 31: 1002-1010.
- 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.
- Sønstebo 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.
- Spencer K.L., Dewhurst R.E., Penna P. (2006). Potential impacts of water injection dredging on water quality and ecotoxicity in Limehouse Basin, River Thames, SE England, UK. *Chemosphere* 63: 509–521.
- Stillman M.J. (1995). *Coordination Chemistry Reviews* 144: 461-511.
- Tagliapietra D., Volpi Ghirardini A. (2006). Notes on coastal lagoon typology in the light of the EU Water Framework Directive: Italy as a case study. *Aquatic Conservation. Marine and Freshwater Ecosystems* 16: 457-467.

Tagliati E., Righetti G., Locatelli C. (2003). Determination of heavy metals in environmental matrices sampled inside the Park of the Po Delta. *Annali di Chimica* 93: 659-666.

Tajima F. (1989). Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Tarvainen T., Kallio E. (2002) Baselines of certain bioavailable and total heavy metal concentrations in Finland. *Applied Geochemistry* 17: 975–980.

Taylor M.G. (1995). Mechanisms of metal immobilization and transport in cells. *Cellular Biology in Environmental Toxicology*, pp 155-169.

Taylor D.R., Keller S.R. (2007). Historical range expansion determines the phylogenetic diversity introduced during contemporary species invasion. *Evolution* 61: 334–345.

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.

Tessier A., Campbell P.G.C. (1987). Partitioning of trace metals in sediments: relationship with bioavailability. *Hydrobiologia* 149: 43-52.

Tessier A., Campbell P.G.C, Bisson M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 51: 844-851.

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.

Thomann R.V., Mahony J.D., Mueller R. (1995). Steady-state model of biota sediment accumulation factor for metals in two marine bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry* 4: 989 –998.

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. pp. 177–188

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.

Usero J., González-Regalado E., Gracia I. (1997). Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the atlantic coast of Southern Spain. *Environment International* 23: 291–298

- 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., 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.
- 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.
- Vignati D., Pardos M., Diserens J., Ugazio G., Thomas R., Dominik J. (2003). Characterisation of bed sediments and suspension of the river Po (Italy) during normal and high flow conditions. *Water Research* 37:2847-2864.
- Vincenzi S., Zucchetta M., Franzoi P., Pellizzato M, Pranovi F, De Leo G.A., Torricelli P. (2011) Application of a Random Forest algorithm to predict spatial distribution of the potential yield of *Ruditapes philippinarum* in the Venice Lagoon, Italy. *Ecological Modelling* 222: 1471-1478.
- 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.
- 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.
- Wauhob T.J., Nipper M., Billiot E. (2007). Seasonal variation in the toxicity of sediment-associated contaminants in Corpus Christi Bay, TX. *Marine Pollution Bulletin* 54: 1116-1126.
- Wells PG. (1999). Biomonitoring the health of coastal marine ecosystems: the roles and challenges of microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin* 39: 39-47.
- Wilson, A.B., Naish, K.A., Boulding, E.G., 1999. Multiple dispersal strategies of the invasive quagga mussel (*Dreissena bugensis*) as revealed by microsatellite analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 2248-2261.
- Wu R.S.S., Siu W.H.L., Shin P.K.S. (2005). Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 51: 623-34.
- Xiaoyu Wang, Yi Zhou, Hongsheng Yang, Qing Wang and Shilin Liu (2010). Investigation of heavy metals in sediments and Manila clams *Ruditapes philippinarum* from Jiaozhou Bay, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 170: 631-643.
- 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.

Zentilin A., Orel G., Zamboni R. (2007) L'Introduzione in Europa di *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1852), la vongola verace filippina. *Annales, Ser Inst nat* 17(2).

Zhu S., Saucier B., Durfey J., Chen S., Dewey B. (1999) Waste excretion characteristics of Manila clam (*Tapes philippinarum*) under different temperature conditions. *Aquacultural Engineering* 20: 231-244.

Zonta R., Argese E., Costa F., Zaggia L. (1995b). Useful trace parameters to investigate the environmental conditions in areas of the Venice Lagoon. *Wetlands Ecology* 3: 139-147.

6.1 Siti Internet di interesse

www.istitutoveneto.it/veneziahome_bda.htm

www.istitutoveneto.it/veneziamilva

www.ambiente.veneziahome.it

http://www.comune.veneziahome.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/4880

www.lvdl.isti.cnr.it/

www.parcologunaveneziahome.it/

www.atolagunadiveneziahome.it/

http://www.magisacque.it/territorio/frame_veneziahome.htm

http://www.apatveneziahome.it/apat/news_controller.php

http://www.arpa.veneto.it/alimenti/htm/alimenti_salute.asp

http://www.arpa.veneto.it/acqua/htm/acque_mc.asp

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast

<http://www.efsa.europa.eu/it/scdocs/scdoc/1570.htm>

<http://www.efsa.europa.eu/it/scdocs/scdoc/1351.htm>

http://www.efsa.europa.eu/it/scdocs/scdoc/980.htm

http://www.efsa.europa.eu/it/scdocs/scdoc/34.htm

www.corila.it

www.fao.org

www.gral.it

maps.google.it

7. Produzione Scientifica del Candidato

7.1 Partecipazione a Congressi Internazionali

- 20th SETAC Europe Congress “*Science and Technology for Environmental Protection*”. Poster dal titolo “*Ecotoxicological markers to evaluate environmental quality of old and new aquaculture sites in Venice Lagoon, Italy*”. Seville, Spain, 23-27th May 2010.
- 27th ESCPBnew (New European Society for Comparative Physiology and Biochemistry) Congress “*Biological Effects Of Climatic Changes And Pollution: From Biomarkers To System Biology*”. Poster dal titolo “*Health state of Mollusc productive sites: biochemical, physiological and molecular markers*”. Alessandria, Italy, September 5-9th 2010.
- EAS “*European Aquaculture Society*”. Poster dal titolo “*Population genetics of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Northern Adriatic Sea based on mitochondrial and microsatellite markers*”. Porto, Portugal, 6-8th October 2010.
- ECSA 50 “*Estuarine & Coastal Science Association*”. Presentazione dal titolo “*Chemical, Biochemical and Molecular Markers To Assess Safety and Traceability Of Clam Products In Northern Adriatic Lagoons*”. Venice, Italy, 3-7th June 2012.

7.2 Partecipazione a Congressi Nazionali

XVIII° Convegno Siea (*Società Italiana Economia Agro-alimentare*) “Strategie e strumenti di valorizzazione nelle filiere alimentari”. Poster dal titolo “*Validation of a new tool for seafood safety and traceability: the case of Manila clam *Ruditapes philippinarum**”. Venezia, 3-5 giugno 2010.

7.3 Abstract brevi

- Manente S., **Baccarani G.**, Gobbo L., Mane E., Ravagnan G., Argese E. (2010). Ecotoxicological markers to evaluate environmental quality of old and new aquaculture sites in Venice Lagoon, Italy. *20th SETAC Europe annual meeting, Seville, Spain*.
- **Baccarani G.**, Manente S., Chiesa S., Gobbo L., Minervini G., Mane E., Bordignon G., Ravagnan G., Argese E. (2010). Health state of Mollusc productive sites: biochemical, physiological and molecular markers. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 157A/1S: S38.
- Chiesa S., Manente S., Nonnis Marzano F., **Baccarani G.**, Minervini G., De Lucrezia D., Gobbo L., Minello F., Bettiol C., Bordignon G., Poli I., Ravagnan G., Argese E. (2012). “Chemical, Biochemical and Molecular Markers To Assess Safety and Traceability Of Clam Products In Northern Adriatic Lagoons”. *50th ECSA meeting, Venice, Italy*

7.4 Extended abstracts

- Chiesa S., Manente S., Bordignon G., Minervini G., Bilanicova D., Pojana G., Cecchin A., **Baccarani G.**, Gobbo L., Minello F., De Lucrezia D., Facca C., Argese E., Benedetti A., Marcomini A., Nonnis Marzano F., Poli I., Ravagnan G., Sfriso A. and Zanetto G. (2010). Validation of a new tool for seafood safety and traceability: the case of Manila clam *Ruditapes philippinarum*". *Atti del XVIII° Convegno Siea. Società Italiana Economia Agro-alimentare*.
- 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 2010*.

7.5 Pubblicazioni originali su riviste con I.F.

Chiesa S., Nonnis Marzano F., Minervini G., De Lucrezia D., **Baccarani G.**, Bordignon G., Poli I., Ravagnan G., Argese E. The invasive manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in Northern Adriatic Sea: population genetics assessed by an integrated molecular approach. *Fisheries Research* 2011.

Chiesa S., Manente S., Bordignon G., Minervini G., Bilanicova D., Pojana G., Cecchin A., Baccarani G., Gobbo L., Minello F., De Lucrezia D., Facca C., Argese E., Benedetti A., Marcomini A., Nonnis Marzano F., Poli I., Ravagnan G., Sfriso A., Zanetto G. Validation of a new tool for seafood safety and traceability: the case of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Economia agro-alimentare*, n. 1/2, pagine 503-507. DOI: 10.3280/ECAG2011-001023

Ringraziamenti

*“It's been a long road
Getting from there to here
It's been a long time
But my time is finally near...”*

È stato veramente un lungo viaggio, questo Dottorato...

...e tante sono le persone che mi hanno accompagnato lungo la strada e verso le quali ho un debito di riconoscenza...

Il Professor Emanuele Argese, il cui supporto e incrollabile fiducia anche nei momenti più neri mi hanno fatto arrivare a questo traguardo...GRAZIE.

La Dottoressa Sabrina Manente, in prima linea, sempre e comunque, a sopportarmi e a spronarmi a dare di più e a fare meglio...GRAZIE.

La Dottoressa Stefania Chiesa, il Professor Francesco Nonnis Marzano e tutta l'unità di ricerca del Laboratorio di Zoologia Biochimica e Molecolare dell'Università di Parma: non solo mi hanno aiutato enormemente nel Progetto, ma Stefania in particolare mi è stata sempre vicina dandomi fiducia e sostenendomi in più di una “crisi” (e ce ne sono state parecchie!)...GRAZIE.

Il Dottor Davide De Lucrezia e la Professoressa Irene Poli, senza i quali questo percorso non sarebbe nemmeno iniziato, e Davide in particolare, mio ennesimo “angelo custode” in questi anni...GRAZIE.

Il Direttore del G.R.A.L., Dottor Ruggero Ruggeri, per aver finanziato il Progetto, ma anche per essersi dimostrato una persona onesta, integra e più che disponibile nel comprendere le inevitabili problematiche connesse con la Ricerca, nel proporre nuove idee e soluzioni e nell'ascolto delle Persone...GRAZIE.

Il Signor Nicola Penzo (G.R.A.L.) e il Dottor Marco Milia per la disponibilità e l'aiuto nel reperire i campioni; il Professor Giampietro Ravagnan, il Dottor Guido Bordignon e il Signor Italo Ongaro per il prezioso aiuto logistico...GRAZIE.

Il Dottor Giovanni Minervini, per l'aiuto che mi ha fornito nell'elaborazione statistica dei dati e per essere sempre stato franco e diretto nei suoi consigli...GRAZIE.

La Dottoressa Cinzia Bettiol, la Dottoressa Fabiola Minello e la Dottoressa Elisabetta Sartorato per l'aiuto nelle analisi in laboratorio...GRAZIE.

La Signora Lorena Gobbo, tecnica ineguagliabile e “regina dell'assorbimento atomico”, senza la quale sarei ancora fermo ai blocchi di partenza...GRAZIE.

Il Signor Riccardo Zonta, per la sua simpatia e disponibilità e il grande aiuto nella parte grafica...GRAZIE.

Marta Cristoforetti e Silvia Breda, le due super-laureande che sono state fondamentali “salvatrici” nelle fasi finali delle analisi...GRAZIE.

Il Professor Giancarlo Rampazzo e la Professoressa Annamaria Volpi Ghirardini, che mi hanno dato utili consigli per la stesura finale di questa tesi...GRAZIE.

La Dottoressa Roberta Attanasio della Georgia State University di Atlanta, per avermi dato la possibilità di espandere le mie conoscenze e capacità, mettendomi alla prova come suo “graduate assistant” con i suoi studenti per 3 anni consecutivi (e anche per l'aiuto che mi ha dato nell'espandere la mia biblioteca di fantascienza!)...GRAZIE.

Infine, il Signor Nicola Miotello, segretario sempre paziente e pronto a venirmi incontro nel momento del bisogno...GRAZIE.

Oltre a tutte queste persone che mi sono state vicine in ambito universitario in quel di Venezia, devo ringraziare anche altre persone della mia città natale, Modena (e non solo...)

...in primis, tutta la mia Famiglia: Papà Giorgio, Mamma Luciana, mio fratello Gabriele e Nonna Amelia...

...vi voglio bene...GRAZIE.

Per la parte “non solo Modena” devo ringraziare Giovanni “Giove” Borghi, ora Ricercatore a Losanna, prima dottorando triestino e prima ancora laureando normalista a Pisa...

...nonostante i tuoi viaggi, mi sei sempre stato vicino e mi hai aiutato a superare i momenti più bui...GRAZIE.

Lo stesso (meno i viaggi...) vale per Andrea Pigoni, con il quale nei weekend ho condiviso fugaci chiacchierate in biblioteca sui massimi sistemi esistenziali...

...ci conosciamo da tanto (forse TROPPO) e anche tu – nonostante tutto - ci sei sempre stato...GRAZIE.

Devo un GRAZIE anche a tutti i (9) membri della neonata Associazione di Promozione Sociale “GruSt”, in particolare Elisa Barchi e Antonio Guidotti...

...come “Presidente Assenteista”, ho apprezzato molto la vostra comprensione, il vostro sostegno e la vostra amicizia...GRAZIE.

Vorrei ringraziare anche tutti i ragazzi e gli educatori dello Spazio Giovani e del gruppo di I media di Catechismo di Albareto, con i quali nonostante le mie periodiche assenze, sono riuscito a costruire qualcosa di bello (e speriamo duraturo): in particolare, devo un grosso GRAZIE ad Alessandro Rubbiani, ad Anastasia Tarantini e Valentina De Faveri, per la pazienza e la disponibilità che hanno mostrato...GRAZIE.

E, *dulcis in fundo*, veniamo al mitico “Equipaggio” Albaretese-Nonantolano della *USS Pathfinder*: il “capitano” Andrea Vincetti (“*You are my superior officer. You are also my friend. I have been and always shall be yours...*”), la “dottoressa” Laura Luppi (quasi! Coraggio!), “l’Ufficiale alle Comunicazioni” Chiara Rigolon (sei UNICA, grazie...), lo svalvolato “Ingegnere Capo” Luca Mattioli (e non aggiungo altro...te ve!) il Guardiamarina Alessandro Montorsi, il “P.A.O.E.” Daniele Villani, i “Marinai Aggiunti” Chiara Badodi, Serena Vantin, Mariangela Lombardo, Stefano Vantin, Fabio Luppi e tutto il gruppo “M.A.C.O.”: Luca, Marco, Simo, Pella, Robby, Anto, Maet (con i quali ho appena iniziato anche a condividere avventure memorabili nel reame di Faerun)...

...per più di tre anni avete sopportato i miei sfoghi e le mie tirate, e mi siete stati accanto, proprio come una vera famiglia! A parole è difficile esprimere il sentimento che mi lega a ciascuno di voi! Siete grandi e sono orgoglioso di essere il vostro “Primo Ufficiale”...GRAZIE.

Sicuramente ci sono altre persone che, in più piccola parte, hanno contribuito a farmi raggiungere questo traguardo, e rivolgo un GRAZIE DI CUORE anche a costoro che ho dimenticato di menzionare...

Ora, è il momento di guardare avanti, al “territorio inesplorato”...

...al Futuro...

...il Viaggio deve continuare!

Lunga Vita e Prosperità

Estratto per riassunto della tesi di dottorato

Studente: Gianluca Baccarani matricola: 955658

Dottorato: Scienze Ambientali

Ciclo: XXIV

Titolo della tesi¹ : Identificazione e validazione di marcatori molecolari, fisiologici ed ambientali per la gestione delle risorse alieutiche lagunari

Abstract:

La vongola filippina *Ruditapes philippinarum* rappresenta una delle principali risorse economiche per l'acquacoltura nel Nord Adriatico. Molte criticità di gestione rimangono irrisolte, specialmente nella Laguna di Venezia: pesca illegale, rischi per la salute, overfishing. Qualità e integrità ambientale dei siti di allevamento sono dunque aspetti di indagine fondamentali. Il presente progetto si inserisce nell'ambito di un approccio integrato per la gestione della risorsa e la specifica messa a punto di un percorso di tracciabilità di filiera. È stato analizzato il contenuto di metalli pesanti e la loro biodisponibilità nei sedimenti; sono state condotte analisi di bioaccumulo e quantificato il contenuto di metallothioneine negli organismi; è stata valutata la diversità genetica delle popolazioni tramite l'utilizzo di marcatori del DNA nucleare e mitocondriale. Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi chimiche è possibile esprimere un giudizio positivo sullo stato di salute delle aree indagate, anche se la gestione dei siti può essere migliorata in un'ottica di sostenibilità e mitigazione degli impatti; le analisi genetiche hanno mostrato un chiaro differenziamento biogeografico degli aplotipi e il verificarsi di eventi introduttivi multipli. La presente ricerca presenta notevoli prospettive future, sia in termini di conoscenza di base, sia in termini applicativi.

Manila clam *Ruditapes philippinarum* represents one of the main economic resources for Northern Adriatic aquaculture. Many management issues are still unsolved, especially in the Venice Lagoon: illegal fishing, health risks, overfishing. Hence, the evaluation of quality and integrity of production sites is a very important topic. The present work is part of an integrated and multidisciplinary approach aimed at improving the management of the resource and also developing a specific traceability path. Heavy metals content both in sediments and organisms was determined; also, metallothioneins levels were evaluated. Finally, the level of genetic diversity among populations was assessed, through specific molecular markers. Results showed that, in general, the environmental quality of farming sites could be considered as quite good, although management of clam farming should be improved for a sustainable exploitation of the resource and for a mitigation of impacts. Genetic analysis showed a clear geographic structuring of haplotypes and the occurrence of multiple introduction events from different recruitment stocks. The present project presents interesting future perspectives, both in terms of basic knowledge and application.

Firma dello studente

¹ Il titolo deve essere quello definitivo, uguale a quello che risulta stampato sulla copertina dell'elaborato consegnato.



Università
Ca' Foscari
Venezia

DEPOSITO ELETTRONICO DELLA TESI DI DOTTORATO

DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA DELL'ATTO DI NOTORIETA'

(Art. 47 D.P.R. 445 del 28/12/2000 e relative modifiche)

Io sottoscritto

nat ... a (prov.) il

residente a in n.

Matricola (se posseduta) Autore della tesi di dottorato dal titolo:

.....
.....
.....

Dottorato di ricerca in

(in cotutela con)

Ciclo

Anno di conseguimento del titolo

DICHIARO

di essere a conoscenza:

- 1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decado fin dall'inizio e senza necessità di nessuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni;
- 2) dell'obbligo per l'Università di provvedere, per via telematica, al deposito di legge delle tesi di dottorato presso le Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e di Firenze al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi;
- 3) che l'Università si riserva i diritti di riproduzione per scopi didattici, con citazione della fonte;
- 4) del fatto che il testo integrale della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione viene archiviato e reso consultabile via internet attraverso l'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto dell'Università Ca' Foscari, oltre che attraverso i cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze;
- 5) del fatto che, ai sensi e per gli effetti di cui al D.Lgs. n. 196/2003, i dati personali raccolti saranno trattati, anche con strumenti informatici, esclusivamente nell'ambito del procedimento per il quale la presentazione viene resa;
- 6) del fatto che la copia della tesi in formato elettronico depositato nell'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto è del tutto corrispondente alla tesi in formato cartaceo, controfirmata dal tutor, consegnata presso la segreteria didattica del dipartimento di riferimento del corso di dottorato ai fini del deposito presso l'Archivio di Ateneo, e che di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi;
- 7) del fatto che la copia consegnata in formato cartaceo, controfirmata dal tutor, depositata nell'Archivio di Ateneo, è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie.

Data _____

Firma _____

AUTORIZZO

- l'Università a riprodurre ai fini dell'immissione in rete e a comunicare al pubblico tramite servizio on line entro l'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto il testo integrale della tesi depositata;
- l'Università a consentire:
 - la riproduzione a fini personali e di ricerca, escludendo ogni utilizzo di carattere commerciale;
 - la citazione purché completa di tutti i dati bibliografici (nome e cognome dell'autore, titolo della tesi, relatore e correlatore, l'università, l'anno accademico e il numero delle pagine citate).

DICHIARO

- 1) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non infrange in alcun modo il diritto d'autore né gli obblighi connessi alla salvaguardia di diritti morali od economici di altri autori o di altri aventi diritto, sia per testi, immagini, foto, tabelle, o altre parti di cui la tesi è composta, né compromette in alcun modo i diritti di terzi relativi alla sicurezza dei dati personali;
- 2) che la tesi di dottorato non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata prodotta nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazione di tipo brevettuale o di tutela;
- 3) che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà tenuta indenne a qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi.

A tal fine:

- dichiaro di aver autoarchiviato la copia integrale della tesi in formato elettronico nell'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto dell'Università Ca' Foscari;
- consegno la copia integrale della tesi in formato cartaceo presso la segreteria didattica del dipartimento di riferimento del corso di dottorato ai fini del deposito presso l'Archivio di Ateneo.

Data _____

Firma _____

La presente dichiarazione è sottoscritta dall'interessato in presenza del dipendente addetto, ovvero sottoscritta e inviata, unitamente a copia fotostatica non autenticata di un documento di identità del dichiarante, all'ufficio competente via fax, ovvero tramite un incaricato, oppure a mezzo posta

Firma del dipendente addetto

Ai sensi dell'art. 13 del D.Lgs. n. 196/03 si informa che il titolare del trattamento dei dati forniti è l'Università Ca' Foscari - Venezia.

I dati sono acquisiti e trattati esclusivamente per l'espletamento delle finalità istituzionali d'Ateneo; l'eventuale rifiuto di fornire i propri dati personali potrebbe comportare il mancato espletamento degli adempimenti necessari e delle procedure amministrative di gestione delle carriere studenti. Sono comunque riconosciuti i diritti di cui all'art. 7 D. Lgs. n. 196/03.