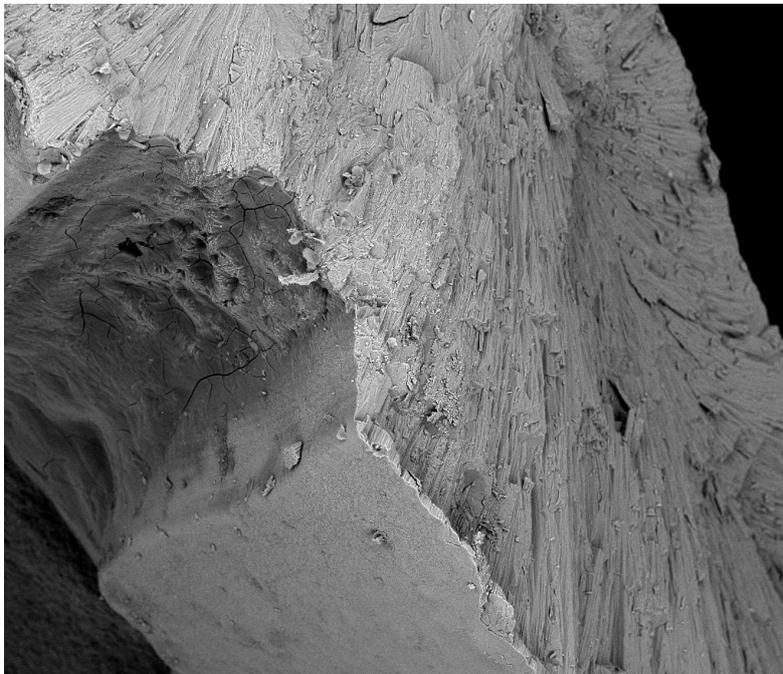


Dottorato di ricerca in Scienze Ambientali, XXIII ciclo
Scuola di dottorato in Scienze e Tecnologie
(A. A. 2009/2010)
Settore scientifico disciplinare di afferenza CHIM/12

Contributo allo studio del chimismo degli otoliti di *Dicentrarchus labrax* di allevamento: l'otolite come possibile tracciante ambientale.



Tesi di Dottorato di Traina Anna

Il Direttore della Scuola di Dottorato:
Prof. Paolo Ugo

Tutor del dottorando:
Prof. Bruno Pavoni

Co-tutor:
Dott.ssa Angela Cuttitta

Indice

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUZIONE | 2 |
| 1.2.1 <i>Elementi in tracce</i> | 12 |
| 1.2.2 <i>Il gruppo dei lantanidi</i> | 16 |
| 1.4 Cenni sulla biologia delle spigole..... | 21 |
| 1.4.1 <i>Allevamento di spigola</i> | 23 |
| 2. MATERIALI E METODI | 24 |
| 2.1 Campionamento..... | 24 |
| 2.2 Area di studio | 25 |
| 2.2.1 <i>Trappeto</i> | 25 |
| 2.2.2 <i>Allevamento “Ittica Trappeto”</i> | 27 |
| 2.2.3 <i>Licata</i> | 27 |
| 2.2.4 <i>Allevamento “Sicilittica” di Licata</i> | 28 |
| 2.3 Metodi analitici..... | 32 |
| 2.3.1 <i>Cenni di ICP-AES</i> | 32 |
| 2.3.2 <i>Cenni di ICP-MS</i> | 33 |
| 2.3.3 <i>Acquisizione misure morfometriche</i> | 34 |
| 2.3.4 <i>Estrazione dei metalli in fase disciolta</i> | 35 |
| 2.3.4 <i>Mineralizzazione del mangime</i> | 37 |
| 3. RISULTATI | 39 |
| 3.1 Elementi in tracce | 39 |
| 3.1.1 <i>Elementi in tracce negli otoliti</i> | 39 |
| 3.1.3. <i>Elementi in tracce nei mangimi</i> | 44 |
| 3.2. Trattamento statistico dei dati relativi agli elementi in tracce | 45 |
| 3.2.1. <i>Analisi uni variata: metalli in tracce negli otoliti</i> | 45 |
| 3.2.2. <i>Analisi multivariata relativa ai metalli in tracce negli otoliti</i> | 51 |
| 3.3 Lantanidi..... | 56 |
| 4. INTERPRETAZIONE E DISCUSSIONE | 58 |
| 4.1 Elementi in tracce negli otoliti..... | 60 |
| 4.2 Pattern di distribuzione dei lantanidi negli otoliti..... | 70 |
| 5. CONCLUSIONI..... | 76 |

1. INTRODUZIONE

1.1 Otoliti: struttura e composizione

Nel cranio dei teleostei, precisamente nell'orecchio interno, sono presenti tre strutture pari, dette macule, rivestite interiormente da un epitelio sensoriale (Morris and Kittleman, 1967). Le macule si differenziano per la loro posizione in sacco, otricolo e lagena (Fig. 1 A) e ospitano gli otoliti, strutture preposte alla percezione acustica e all'equilibrio.

Gli otoliti, durante la vita del pesce, si accrescono in diversi intervalli di tempo con un ritmo specie specifico, secondo una regolare deposizione di matrice organica e precipitazione di carbonato di calcio, formando una serie di bande concentriche, gli anelli di accrescimento, chiare e scure intorno ad un nucleo (Fig. 2). Osservando gli anelli di accrescimento al microscopio ottico a luce trasmessa è possibile distinguere una zona ricca di carbonato di calcio che appare ialina ed una zona composta principalmente da matrice organica che appare opaca (Campana and Neilson, 1985; Pannella, 1971; Morales-Nin, 1987b; Mugiva, 1987). Tale processo di cristallizzazione a bande alternate risulta essere sotto diretto controllo ormonale dell'organismo (Wright, 1991) ed è regolato da una serie di fattori sia endogeni che esogeni (Morales-Nin, 2000). Gli otoliti possono essere definiti, dunque, carbonati biogenici (biominerali) perché sono solidi cristallini in cui la formazione del minerale è influenzata e/o controllata dagli organismi viventi e perché costituiti sia da componenti organiche che inorganiche. Rispetto ai minerali prodotti inorganicamente, i biominerali posseggono insolite morfologie (Weiner, 2008).

Gli otoliti a seconda della loro dimensione e composizione si distinguono in: asterischi, lapilli e sagitte (Morris and Kittleman, 1967). Lapillo e asterisco, misurano qualche millimetro mentre le sagitte possono superare anche il centimetro (Fig.1 B).

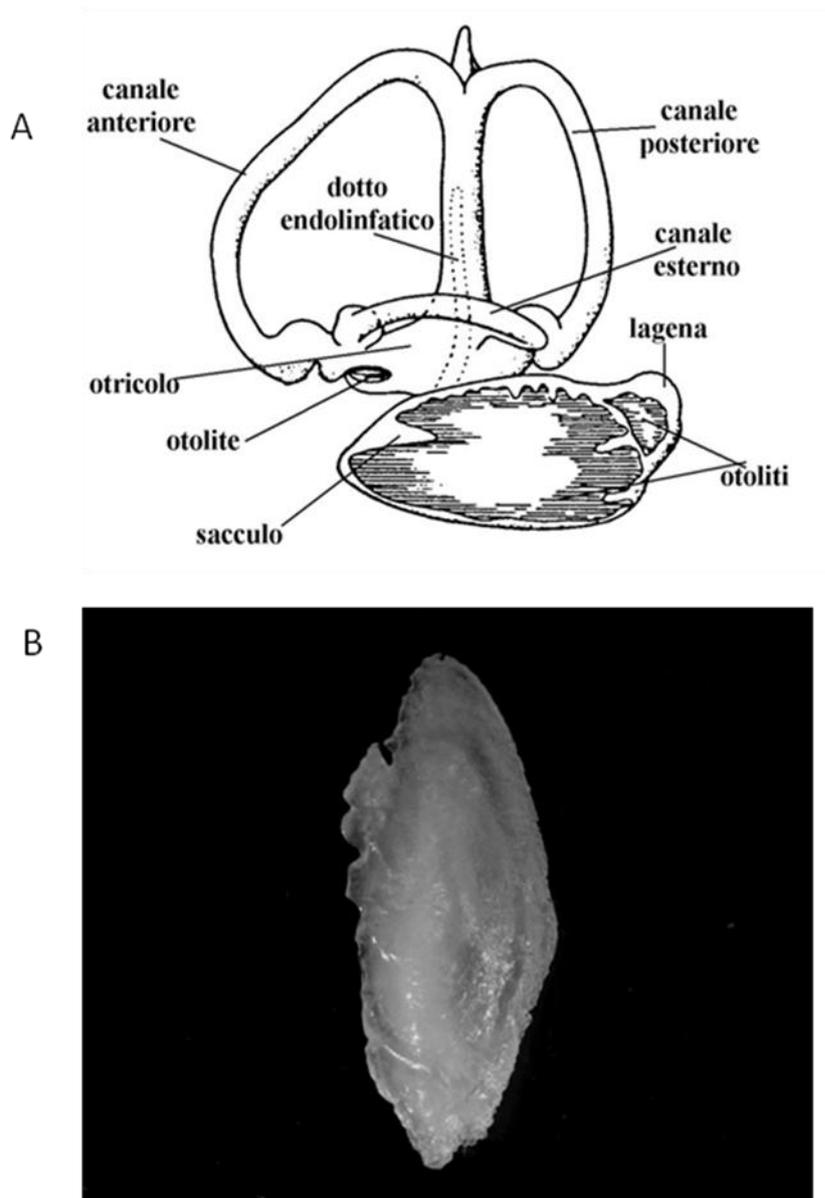


Figura. 1: A. Struttura dell'orecchio interno degli osteitti. Sono visibili le tre macule: Sacculo, Otricolo e Lagena;

B. Sagitta di *Dicentrarchus labrax* proveniente dall'allevamento di Trappeto

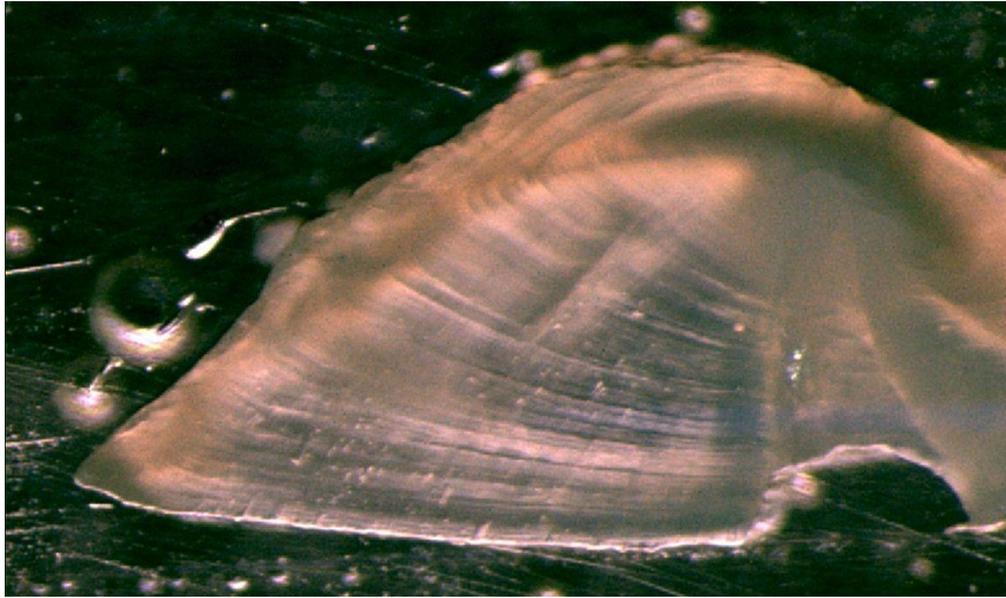


Figura 2: Sezione trasversale di otolite di *Dicentrarchus labrax* dove è visibile l'alternanza degli anelli opachi e ialini.

Per le loro maggiori dimensioni le sagitte sono quelli tra gli otoliti particolarmente utilizzati per la determinazione dell'età dei pesci, per studi di carattere morfologico e studi di carattere chimico. Le sagitte, generalmente di forma ellittica, sono caratterizzate da una zona prossimale convessa ed una distale concava, con un asse di accrescimento orientato lungo la direzione antero-posteriore. Il lato convesso o prossimale è diviso in due aree da un solco profondo, il solco acustico, sul quale si inseriscono le fibre nervose provenienti dalle pareti del sacco (Fig.4 C).

Lo studio dei processi di biomineralizzazione, sia in invertebrati che vertebrati, ha suscitato sempre un grande interesse da parte di biologi, geologi e chimici costituendo così materia di ricerche di carattere interdisciplinare. Lowenstam (1981) descrisse due diverse modalità di biomineralizzazione esistenti in natura definendole come "indotta" e "mediata da matrice organica", quest'ultima venne poi nominata da

Mann (1983) con il termine “biologicamente controllata”. La prima definizione coinvolge generalmente organismi più semplici e si basa sul fatto che perturbazioni relativamente minori, come l'introduzione di un prodotto finale biologicamente ottenuto dal metabolismo, il rilascio di particolari cationi da parte delle cellule, o la costruzione di superfici cariche (per esempio una superficie di cellule), possono indurre i minerali a precipitare in determinate circostanze (Lowenstame and Weiner, 1989). La seconda, avviene in organismi più complessi ed implica un controllo da parte dell'organismo che utilizza diverse attività cellulari per dirigere la nucleazione, la crescita, la morfologia e la localizzazione del minerale depositato (Lowenstam e Weiner, 1989)

I processi di biomineralizzazione consistono nella conversione di ioni in soluzione in composti solidi attraverso attività cellulari che rendono possibili i cambiamenti chimico-fisici necessari per la formazione dei biominerali e la loro crescita cristallina. Tale processo coinvolge: la fase minerale, le macromolecole che costituiscono la struttura in cui si formano i minerali e l'interfase che collega le due fasi (Weiner, 2008).

La matrice organica riveste un ruolo fondamentale nei processi di biomineralizzazione. Tale matrice comprende "macromolecole strutturali" appartenenti alla fase insolubile, (come il collagene nell'osso e nella dentina, chitina), ed il complesso chitina-proteina (nel guscio dei molluschi), che rappresenta il substrato su cui avviene la deposizione della fase inorganica, e "macromolecole acide" (appartenenti alla fase solubile) come glicoproteine, ricche in gruppi carichi negativamente, che possono interagire con le facce cariche dei cristalli. Quando adsorbite su un substrato, queste macromolecole controllano, con meccanismi ancora sconosciuti, tutte le fasi della mineralizzazione, (forma, dimensioni, struttura,

orientazione, composizione, polimorfo del minerale, Frankel and Mann, 1994) condizionandone quindi la cristallizzazione e la crescita.

La modalità comune di crescita dei cristalli dei carbonati biogenici avviene in tre successive fasi (Fig.3):

1. l'iniziale creazione di un'interfaccia strutturale in uno spazio limitato;
2. l'interazione di macromolecole con l'interfaccia strutturale;
3. formazione di siti di nucleazione del cristallo (Lowenstam, 1981).

Le macromolecole sono in grado quindi di controllare i siti di mineralizzazione, il set-up delle soluzioni, la nucleazione, la crescita cristallina ed il termine della crescita.

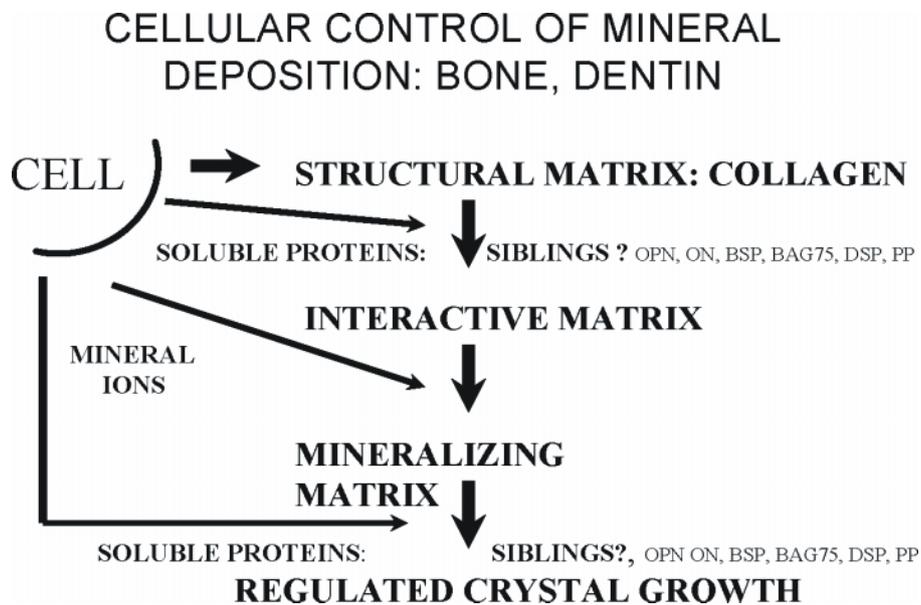


Figura 3: Fasi di formazione di un biominerale

Gli otoliti sono costituiti principalmente da carbonato di Calcio (CaCO_3) che nelle sagitte e nei lapilli mineralizza nel sistema cristallino trigonale dell'aragonite. Gli asterischi, invece, sono costituiti dalla vaterite, un raro polimorfo del carbonato di calcio (Lowenstam and Weiner, 1989). All'interno del carbonato e della frazione proteica sono presenti anche elementi minori (<1 ppm) come Na e Sr ed in tracce ($<0,1$ ppm) Zn, Mg, Mn, Ba, Cd e Fe (Carlstrom, 1963; Campana and Nielson, 1985).

La frazione carbonatica degli otoliti costituisce circa il 92-96% della massa totale dell'otolite, il restante 0,01-10% è costituita principalmente da proteine (otolina, Degens, 1969), amminoacidi, glicosamminoglicani, lipidi e zuccheri (Mugiyia, 1968; Sasagawa and Mugiyia, 1996; Murayama *et al.*, 2002; Dauphin and Dufour, 2003).

Studi sperimentali hanno messo in evidenza che le macromolecole della parte proteica e la vicina presenza di cellule secernitrici della macula influenzano la nucleazione e la crescita del cristallo (Addadi *et al.*, 1985, Belcher *et al.*, 1996; Wheeler e Sikes, C. S; Ibsch *et al.* 2004). Secondo alcuni autori (Takagi and Takahashi, 1999; Takagi, 2000, Takagi *et al.*, 2000) infatti le cellule del sacco, camera in cui precipita la sagitta, emettono componenti della matrice organica sulla quale, successivamente, viene depositato il cristallo.

È possibile distinguere una frazione solubile ed una insolubile (Degens *et al.*, 1969; Baba *et al.*, 1991; Asano and Mugiyia, 1968; Borelli *et al.*, 2001); alcune componenti della frazione solubile presentano dei siti di legame per il Ca o CaCO_3 come per esempio la proteina OMM-64 (Those *et al.*, 2008; Wright, 1991; Asano and Mugiyia, 1993) che formerebbe insieme all'otolina la struttura proteica svolgendo così anche un ruolo di controllo della morfologia del cristallo durante il processo di biomineralizzazione dell'otolite (Those *et al.*, 2008; Baba *et al.*, 1991; Secor *et al.*, 1995; Asano and Mugiyia, 1993).

Il calcio sottoforma di minerale insolubile cristallino *idrossiapatite di calcio*, oltre ad essere presente nel sistema scheletrico ha una funzione fondamentale nelle cellule quale regolatore e messaggero intracellulare.

L'epitelio sacculare è composto da tre tipi differenti di epitelio: sensoriale, di transizione e squamoso (Figg. 4 A, B). L'epitelio sensoriale è ricco di vasi sanguigni e terminazioni nervose ed è costituito da cellule prismatiche ($\pm 25 \mu\text{m}$), rivestite da cellule di sostegno. L'otolite è fissato all'epitelio sensoriale tramite una matrice proteica (membrana otica) lungo il solco acustico (Dunkelberger *et al.*, 1980). Come si nota nelle figure 4 A e B, la porzione di transizione è ben sviluppata a livello della parte anteriore dell'otolite; essa è formata da cellule più piccole e cuboidali ($5-7 \mu\text{m}$) e si assottiglia formando l'epitelio squamoso che si distribuisce sul lato opposto della macula (epitelio sensoriale), dalla parte opposta del solco (Parmentier *et al.*, 2007). Tale differente struttura dell'epitelio influenza la composizione dell'endolinfa, come dimostrato su trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Borelli *et al.*, 2001; Payan *et al.*, 2002) e rombo (*Psetta maxima*) (Borelli *et al.*, 2001). Nel liquido presente all'interno delle camere otiche, dunque esiste un gradiente prossimo-distale, dove per prossimale si intende la zona tra l'otolite e la macula sensoriale (Payan *et al.*, 2002). Infatti, nella zona distale, e quindi nella porzione più lontana dall'epitelio sensoriale, è stato misurato un aumento spaziale di ioni Ca^{2+} e ioni HCO_3^- ed un aumento di pH che permette l'abbattimento della concentrazione degli ioni H^+ dalla zona di precipitazione di CaCO_3 favorendo la cattura di ioni necessari alla calcificazione. Il gradiente prossimo distale che si crea nell'endolinfa svolge quindi un ruolo importante per la precipitazione e la crescita dell'otolite. Pertanto è verosimile che la composizione del cristallo rifletta quella dell'endolinfa e che la frazione proteica

giochi un ruolo fondamentale nella formazione del minerale carbonatico dell'otolite (Borelli *et al.*, 2001; Payan *et al.*, 2002; Falini *et al.*, 2005).

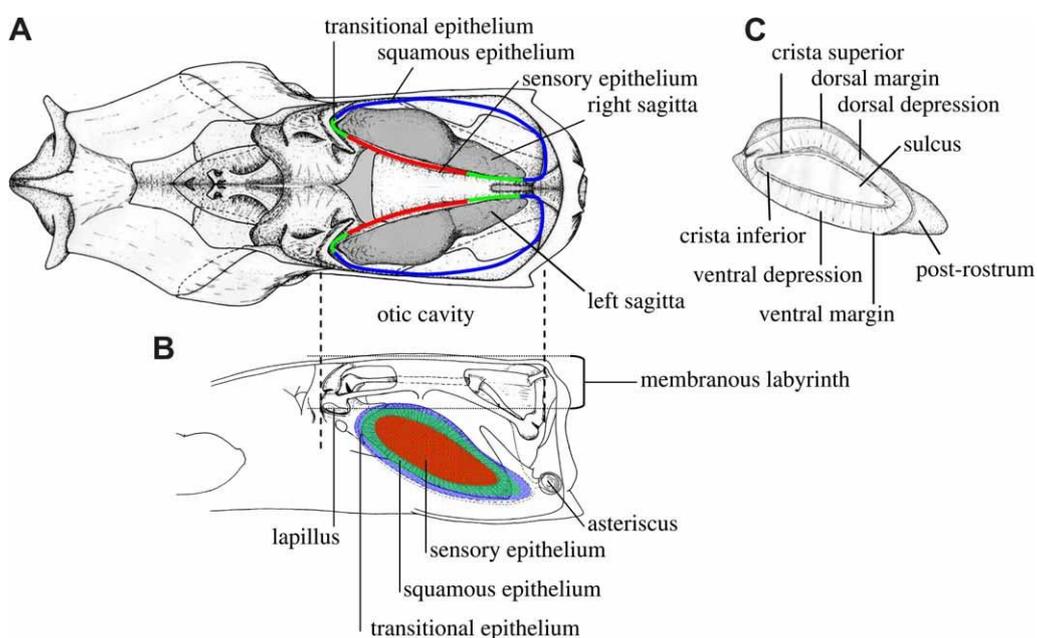


Figura 4: Vista dorsale (A) e laterale (B) della cavità otica e dell'epitelio sacculare di un pesce appartenente alla famiglia dei carapidi (*Carapus boraborensis*). C: Vista laterale della sagitta destra di *Carapus boraborensis* (parte prossimale o del solco)

Inoltre, secondo Kalish (1991) la differenza nel chimismo degli otoliti potrebbe essere determinata dalla presenza, nel plasma, di proteine capaci di legare il Ca. E' stato ipotizzato che la presenza di ioni di metalli nell'endolinfa, disponibili per la precipitazione nell'otolite, sia una funzione della concentrazione di tali proteine e del loro grado di discriminare altri elementi piuttosto che il Ca. Pertanto, la presenza di proteine e la loro variazione di concentrazione a livello del plasma ed endolinfa potrebbe complicare ogni correlazione tra la composizione dell'acqua di mare e quella degli otoliti (Kalish, 1991) e renderla quindi non così semplicemente lineare.

1.2 Gli otoliti negli studi di carattere ambientale

Il carbonato che costituisce gli otoliti non viene riassorbito né rielaborato (Campana and Neilson, 1985). Questa peculiare caratteristica rende gli otoliti utili traccianti per determinare la “*life history*” dell’individuo e per fornire indicazioni sull’ambiente in cui il pesce è vissuto (Campana, 1999). L’esame della microstruttura degli otoliti può quindi essere utile anche per discriminare diversi stock (Campana *et al.*, 2000; Gillander and Kingsford, 2000; Rooker *et al.*, 2003), le rotte migratorie o stabilire connessioni tra habitat degli stadi giovanili ed adulti (Gillanders and Kingsford, 1996, 2000; Gillanders, 2002; Zimmerman, 2000; Yang *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2008), ed in maniera minore come indicatore di inquinamento ambientale (Ranaldi and Gagnon, 2008b; Saquet *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2000). Lo studio della composizione chimica degli otoliti può avere dunque un valore potenziale come indicatore ambientale, “*natural tags*” o “*elemental fingerprint*” (Thorrold *et al.*, 1997; 1998; Patterson *et al.*, 1999; Gillanders and Kingsford, 2000). Sono numerosi i meccanismi che regolano l’abbondanza degli elementi in traccia all’interno degli otoliti, tra questi la loro quantità nelle risorse trofiche e nell’ambiente (Secor, 1998), la chimica e la temperatura dell’acqua (Radtke, 1989; Hoff and Fuiman, 1995), il tipo di dieta (Limburg, 1995), il tasso di crescita (Sadovy and Severin, 1992). Anche diversi fattori endogeni, possono influenzare la presenza degli elementi in tracce negli otoliti; tra questi: lo stato fisiologico (Kalish, 1989; De Pontual *et al.*, 2003), età, stress e l’habitat (Kingsford and Gillanders 2003). Per tutti questi meccanismi risulta quindi complesso lo studio delle modalità di incorporazione dal mezzo acquatico alla struttura carbonatica e sebbene molti siano gli studi effettuati, ancora si conosce ben poco.

le cellule contengono alte concentrazioni di Mg (5-10 mmole), Fe e Cu sono necessari per la sintesi delle proteine eme: emoglobina, mioglobina citocromo e citocromo ossidasi, lo Zn partecipa all'azione di quasi tutti gli enzimi nei loro gruppi prostetici.

Cd, Hg, Cr, Pb etc appartengono invece al secondo gruppo costituito da metalli che non hanno una precisa funzione biologica ed includono i maggiori contaminanti in ambiente acquatico (Viarengo, 1985).

Alcuni elementi chimici innaturalmente introdotti nel sistema marino dall'attività antropica, come "i metalli pesanti", possono bioaccumularsi nei pesci (Hellowell, 1986) o per diretta esposizione attraverso le branchie o per ingestione di particolato marino e sedimenti di fondo contaminati (Bervotes *et al.*, 2001). Gli elementi disciolti in soluzione hanno una biodisponibilità maggiore rispetto a quelli associati a fasi solide, per questo motivo gli otoliti possono accumulare alcuni metalli direttamente dall'acqua di mare attraverso le branchie, piuttosto che da prede o da componenti vegetali. La maggior parte degli studi sui pesci esposti a contaminazione da metalli pesanti ha interessato soprattutto i tessuti molli come per esempio fegato, branchie, muscoli e reni. Questi organi posseggono un meccanismo efficiente per l'eliminazione di composti potenzialmente tossici (Olsson *et al.*, 1998) e per la rigenerazione dei tessuti danneggiati (Tsonis, 2000). Sebbene i metalli vengano probabilmente trattenuti all'interno dei tessuti molli per un periodo superiore rispetto a quello di permanenza in acqua (Phillips, 1997), questi potrebbero essere persi nel momento in cui il tessuto viene rigenerato. Il percorso degli ioni dall'ambiente all'otolite coinvolge diverse barriere e compartimenti: uno scambio efficiente di elementi e contaminanti avviene per esempio attraverso le branchie, che consentono

la respirazione tramite l'estrazione dell'ossigeno disciolto nell'acqua. Considerando che gli elementi disciolti vengono assorbiti e trasportati dal flusso sanguigno e depositati a livello degli organi (es. cuore, viscere e gonadi), è verosimile che gli stessi elementi attraverso un processo di osmoregolazione vengano trasportati al plasma e successivamente a livello della camera otica, all'endolinfa e quindi all'otolite. Questo significa che l'otolite può incorporare nella sua struttura cristallina elementi contaminanti, in relazione alla loro concentrazione nell'acqua di mare. In questo senso l'otolite può fornire informazioni sulla composizione chimica dell'ambiente ed essere considerato un potenziale bioindicatore (Romanek *et al.*, 1996). Inoltre, rispetto ai tessuti molli che si rigenerano, gli otoliti registrano in maniera permanente la composizione chimica dell'acqua di mare e di conseguenza la presenza di eventuali concentrazioni anomale (Ranaldi and Gagnon, 2008). Infatti, è stato già dimostrato da studi recenti che le caratteristiche chimiche della colonna d'acqua possono essere "registrate" dalle strutture calcificate degli organismi (Bath *et al.*, 2000; Elsdon and Gillanders, 2003). Esistono due diverse modalità di accumulo di metalli all'interno degli otoliti: l'incorporazione attraverso la secrezione dalla membrana otica di piccoli cristalli di nucleazione sulla cui superficie possono aderire gli elementi chimici, o attraverso le cellule dell'epitelio sacculare che trasportano metalli solubili nel sangue (Morales-Nin, 2000).

Elementi come Mg^{2+} , Zn^{2+} e Sr^{2+} ed altri metalli di transizione, per le dimensioni del loro raggio ionico, possono essere incorporati all'interno degli otoliti nella fase cristallina come sostituti del Ca, negli spazi interstiziali della struttura del cristallo e/o nella matrice proteica (Campana, 1999). E' stata riscontrata una similarità nella sequenza e nella funzione tra proteine di otoliti e proteine capaci di legare i metalli suggerendo un coinvolgimento delle proteine nel processo di uptake dei metalli

all'interno degli otoliti (Murayama *et al.*, 2000; Mugiya *et al.*, 1979; Morales-Nin, 2000; Borelli *et al.*, 2003). Recentemente è stato osservato che tra il 40% ed il 60% di Zn che si trova nell'intero otolite è associato alla parte solubile della matrice proteica (Miller *et al.*, 2006, Kalish, 1991) mentre il Mn è debolmente associato o non è del tutto legato alla matrice proteica (Miller *et al.*, 2006).

Negli ultimi decenni è aumentato l'interesse per lo studio della microstruttura e della composizione chimica degli otoliti in termini di processo di uptake degli elementi all'interno del carbonato degli otoliti (Campana, 2005). Tuttavia esaminando la relazione tra la composizione dell'acqua e quella degli otoliti, alcuni autori concludono che l'incorporazione di alcuni elementi in tracce è influenzata dalla composizione dell'acqua (Mugiya *et al.*, 1991; Bath *et al.*, 2000, Elsdon and Gillanders, 2003) mentre altri, hanno riscontrato poca correlazione tra chimismo degli otoliti e la composizione dell'acqua (Hanson and Zdanowicz, 1999; Thorrold *et al.*, 1997; Milton *et al.*, 2000) dimostrando che alcune differenze possono essere conseguenza di un'alterazione causata dalla manipolazione del pesce o dell'otolite (Proctor and Trasher 1998; Milton and Chenery, 1998). Inoltre, è stato riscontrato che la composizione chimica degli otoliti può differire tra due specie suggerendo che l'uptake degli elementi avviene in maniera specie-specifica all'interno del carbonato di calcio (Dove *et al.*, 1996; Gillanders and Kingsford, 2003; Swearer *et al.*, 2003; Geffen *et al.*, 1998; Bath Martin and Wuenschel, 2006).

1.2.2 Il gruppo dei lantanidi

I lantanidi (da qui in poi REEs, Rare Earth Elements) sono un gruppo costituito da 14 elementi (La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu), escludendo il Pm, che nei sistemi naturali si trovano con uno stato di ossidazione trivalente (ad eccezione del Ce e dell'Eu). Nella letteratura moderna, le REEs sono suddivise in LREE (lantanidi leggeri, dal La al Nd) e HREE (lantanidi pesanti, dal Sm al Lu pesanti). I raggi ionici delle REEs diminuiscono sistematicamente con l'aumentare del numero atomico dal La(57) al Lu(71); questa caratteristica, chiamata "Contrazione dei lantanidi", è dovuta al progressivo riempimento degli elettroni del guscio f (Shannon, 1976).

Per identificare le variazioni delle REEs nei processi naturali, è necessario escludere l'influenza degli stessi in natura attraverso la normalizzazione rispetto ad uno standard che rappresenti la composizione chimica del mantello primordiale come la condrite, negli studi di petrologia magmatica, o che rappresenti la composizione chimica della crosta continentale come la roccia sedimentaria terrigena denominata "shale". In genere, per una migliore comparazione con i dati di letteratura si utilizzano il "Post Archaean Australian Shale (PAAS)" e il "North American Shale Composition (NASC)".

Secondo le regole di Goldschmidt, il comportamento delle REEs e la loro distribuzione in minerali e rocce è principalmente controllata dalle cariche ioniche e dal raggio degli elementi (comportamento CHARAC). Nelle soluzioni acquose il comportamento della loro precipitazione è fortemente influenzata dal frazionamento

dovuto alla complessazione chimica che non dipende esclusivamente dalla carica ionica e dal raggio degli elementi, ma è controllata anche dalla configurazione elettronica degli elementi e dal tipo dei leganti che complessano. Per questa ragione, i sistemi acquosi sono caratterizzati da comportamenti che non dipendono né dal raggio né dalla carica (non-CHARGE and RADIUS-CONTROLLED CHARAC) delle REEs ed i loro pattern sono “irregolari”.

L'abbondanza delle REEs nelle acque marine è controllata da due diverse sorgenti litogenica (continentale) ed idrotermale (sorgenti vulcaniche sottomarine) ed è influenzata da processi di interazione chimica particella/soluzione che dipendono dalla profondità dell'acqua, dalla salinità e dallo stato di ossidazione delle acque marine (Elderfield, 1988).

Le principali caratteristiche dei pattern delle REEs nelle acque di mare sono:

- anomalia negativa di Ce,
- anomalie positive di La, Gd,
- impoverimento delle LREE rispetto alle HREE.

L'anomalia negativa di Ce nell'acqua di mare è dovuta alla ossidazione del Ce trivalente al meno solubile Ce tetravalente e successiva rimozione attraverso i processi di scavenging sulle particelle sospese lungo la colonna d'acqua (Sholkovitz *et al.*, 1994). Inoltre l'arricchimento delle HREEs rispetto alle LREEs nei pattern di acqua di mare è dovuto alla formazione di complessi dei lantanidi leggeri (La, Pr, Nd, Sm) con ioni carbonato presenti tendendo ad un impoverimento degli stessi in nella fase disciolta dell'acqua di mare.

La relativa abbondanza delle Terre Rare negli oceani moderni varia sia in funzione della regione studiata sia in funzione delle profondità delle masse d'acqua, per questa ragione le REEs sono ampiamente utilizzate come traccianti per le masse d'acqua oceaniche (Ederfield, 1988; Piepgras and Jacobsen, 1992). I segnali delle REEs registrati nelle rocce sedimentarie antiche hanno importanti implicazioni per l'interpretazione delle sorgenti di input oceanico e della chimica della acqua di mare. Anomalie nei contenuti di elementi sensibili alle variazioni redox del sistema marino, come Ce ed Eu, possono fornire importanti informazioni sull'ossigenazione degli oceani.

La ricerca di un tracciante geochimico attendibile per le REEs in acqua di mare ha indirizzato l'attenzione degli studiosi sulla composizione chimica dei precipitati marini considerati utili registri della composizione chimica dell'acqua marina attraverso la storia della Terra. Alcuni studi hanno suggerito che i carbonati biogenici tali come i carbonati scheletrici (foraminiferi, Palmer 1985; coralli, Sholkovitz and Shen, 1995), le apatiti (carbonati di fosforo) dei denti di pesci (Wright *et al.*, 1987) e i carbonati costituenti le microbialiti (Webb and Kamber, 2000), strutture sedimentarie in cui la precipitazione dei minerali carbonatici è mediata dai batteri, rappresentano potenziali proxies utilizzabili per lo studio della geochimica delle REEs in acqua di mare.

Considerato che ad oggi non esistono studi che dimostrano il coinvolgimento delle REEs nei processi metabolici dei pesci è probabile che il frazionamento delle REEs attraverso le barriere biologiche sia quasi nullo, di conseguenza l'aragonite biogenica che costituisce l'otolite potrebbe essere utilizzato come tracciante geochimico. Inoltre, la peculiare inerzia chimica dell'aragonite dell'otolite implica

che il contenuto delle REEs rimanga invariato durante la vita del pesce a meno che non esistano variazioni nella chimica dell'acqua di mare.

1.3 Scopo del lavoro

Lo scopo principale di questo lavoro di ricerca è stato quello di verificare il possibile impiego degli otoliti come traccianti ambientali considerandoli dunque come bioindicatori. Inoltre, i risultati di questo lavoro vogliono inserirsi all'interno di una più ampia tematica di ricerca sullo studio degli otoliti considerati importanti indicatori della "life history" di specie ittiche (Campana, 1999; Bath *et al.*, 2000, Elsdon and Gillanders, 2003)

A tal fine è stata determinata la composizione chimica di otoliti di *Dicentrarchus labrax* provenienti da due distinti allevamenti della Sicilia. In particolare sono state determinate le concentrazioni dei seguenti elementi: Sr, Fe, Mg, Ba, Cd, Mn e Zn e Lantanidi.

Si è deciso di campionare individui non selvatici poiché le condizioni di allevamento, con caratteristiche chimiche dell'acqua poco variabili, sono sembrate le più favorevoli per il raggiungimento dello scopo del lavoro. Infatti, si presuppone che gli esemplari accresciuti in ambiente controllato siano soggetti a condizioni chimiche pressoché costanti, data la relativa omogeneità delle masse d'acqua a cui sono esposti. La scelta del *Dicentrarchus labrax* risiede nel fatto che essendo una delle specie più commercializzate, ed apprezzate da parte dei consumatori per le loro qualità organolettiche, è anche una delle più allevate in Sicilia da diversi decenni e per tale motivo vi sono ampie conoscenze relativamente la biologia di tale specie.

1.4 Cenni sulla biologia delle spigole

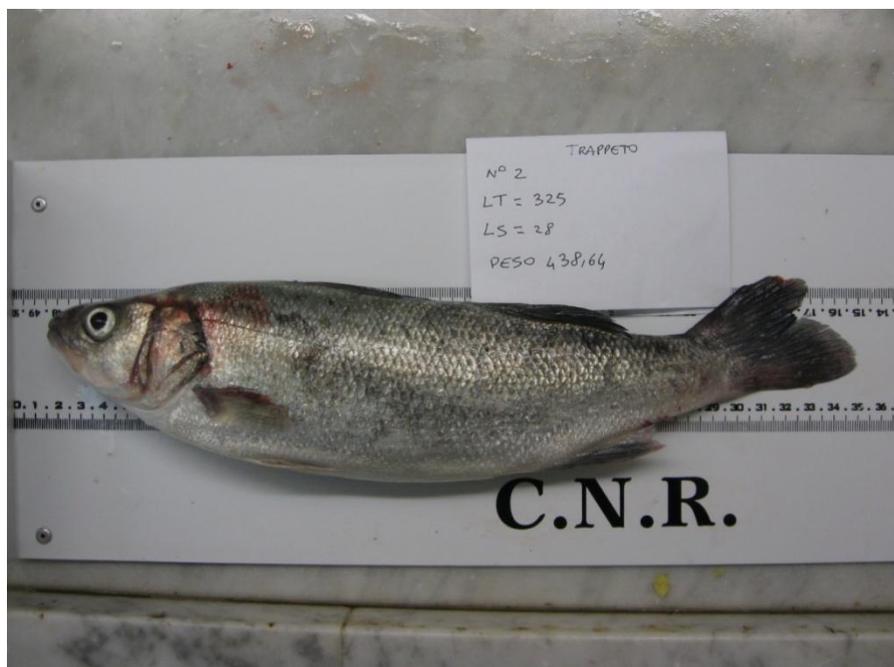


Figura. 5: *Dicentrarchus labrax*. **Regno** Animalia, **Phylum** Chordata, **Classe** Osteichthyes, **Ordine** Perciformes, **Famiglia** Serranidae, **Genere** *Dicentrarchu*, **Specie** *labrax*. **Classificazione**
Linneo, 1758

Il *Dicentrarchus labrax* è un animale ben presente lungo tutte le coste della nostra penisola, e più in generale del Mediterraneo, in Atlantico e anche nei mari freddi del nord. Essendo una specie euriterma ed eurialina tollera ampi intervalli di temperatura (5-28°C) e di salinità dell'acqua. Questa caratteristica le permette una grande capacità di adattamento a diversi ambienti: si trova, infatti, sia intorno alle scogliere che in prossimità delle spiagge, a stretto contatto col fondo o vicinissima alla superficie, in acqua salata ed in quella salmastra o dolce. Nel Mar Mediterraneo si

riproduce nella stagione invernale, da Dicembre a Marzo. La deposizione delle uova generalmente ha luogo nei pressi degli estuari di fiumi e nelle zone sottocosta. La spigola si nutre di anellidi, crostacei, molluschi e piccoli pesci, ed insieme all'orata (*Sparus aurata*) è stata la prima specie eurialina di elevato pregio commerciale ad essere riprodotta artificialmente ed allevata in condizioni intensive (www.rivistadiagraria.org). In natura, a differenza di tutti gli altri serranidi che sono ermafroditi (proterogini), la spigola è gonocorica ed il raggiungimento della maturità sessuale dipende più dalla taglia che dall'età. Il dimorfismo sessuale è poco pronunciato: le differenze tra i due sessi risiedono unicamente nel fatto che le femmine presentano dimensioni leggermente maggiori e una forma della testa più appuntita. I maschi raggiungono la maturità sessuale a due anni, le femmine a tre anni. La differenziazione del sesso si può osservare nelle femmine tra i 128 e 250 giorni dopo la fecondazione, equivalente a 65-155 mm lunghezza totale. L'esposizione a lungo termine ad alti regimi di temperatura ha un effetto mascolinizzante. Al contrario, la variazione verso basse temperature durante il periodo labile (18 a 60 mm di lunghezza totale) permette un significativo aumento della proporzione di femmine nella discendenza (Mylonas *et al.*, 2003). Ancora è assente un reale controllo su un riproducibile regime del protocollo di temperatura che si tradurrebbe in un rapporto di sesso fortemente sbilanciato a favore di femmine. In cattività la percentuale di individui maschi è superiore aggirandosi intorno al 70-99% (Mylonas *et al.*, 2003).

1.4.1 Allevamento di spigola

Le peculiari caratteristiche organolettiche e la qualità attribuita a questa specie, hanno reso l'allevamento di spigole, negli ultimi decenni, un'attività redditizia. L'Italia, insieme alla Francia e alla Spagna, è uno dei principali paesi in cui si allevano spigole. In Sicilia le prime tecniche di allevamento erano principalmente di tipo estensivo e correlate alla produzione di sale (Trapani); in questi impianti il pesce era nutrito in maniera naturale, sfruttando le risorse dell'ambiente. Dopo gli anni '80, con lo sviluppo di conoscenze e nuove tecniche di maricoltura, si rese possibile l'allevamento di massa degli avannotti consentendo una profonda trasformazione del settore. La piscicoltura può essere condotta in modo estensivo o intensivo, a seconda che l'alimentazione del pesce sia basata su catene trofiche naturali o seminaturali, ovvero avvenga secondo distribuzione di mangimi di qualsiasi natura. Viene utilizzata talvolta la definizione di acquacoltura semi-intensiva o semi-estensiva per indicare differenti livelli di integrazione ad una base di alimentazione naturale. Ad oggi la maggior parte degli impianti siciliani di acquacoltura sono a carattere intensivo e prevedono sia strutture a terra (vasche), che gabbie galleggianti in mare.

Negli impianti presso cui sono stati prelevati i campioni oggetto di questo lavoro si pratica un allevamento di tipo intensivo in cui il pesce è alimentato artificialmente.

Il processo di allevamento intensivo in vasche prevede l'immissione di avannotti (pesci in stadi giovanili) acquistati generalmente presso ditte specializzate, negli impianti e loro alimentazione fino al raggiungimento della taglia commerciale. Nelle avannotterie, gli esemplari ancora in stato larvale, vengono inizialmente alimentate con prede vive (*Brachionus plicatilis* ed *Artemia salina*) e successivamente svezziati per mezzo di mangime artificiale. Dal momento in cui gli avannotti sono svezziati, e

quindi abituati all'alimentazione secca, possono essere inviati alla "semina" nelle vasche di allevamento che avviene a circa 45-60 giorni di vita. Le successive fasi di "preingrasso" ed "ingrasso" consentono di ottenere, nell'arco di poco più di un anno, un pesce di taglia commerciale che, per la spigola, aggira intorno ai 350 g. Come precedentemente descritto, gli avannotti vengono generalmente acquistati da ditte specializzate. Nel caso dell'allevamento "Ittica Trappeto" questi provengono dalla "Panittica" di Bari. Diversamente non è stato possibile avere informazioni sulla precisa provenienza degli avannotti allevati presso l'impianto "Sicilittica" di Licata. E' da sottolineare comunque che poichè gli avannotti vengono seminati a circa 45-60 giorni di vita nelle acque dell'allevamento, dove vivranno più di un anno, il periodo precedente passato all'interno delle vasche dell'avannotteria non sarà determinante ai fini della composizione chimica dell'otolite.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento

Un totale di 140 otoliti sono stati estratti da 70 esemplari di *Dicentrarchus labrax* provenienti da due allevamenti situati vicino le coste siciliane: "Sicilittica" di Licata (39 campioni) e "Ittica Trappeto" di Trappeto (31 campioni). In entrambi gli allevamenti, la presenza di maschi era superiore al 50%. Gli esemplari al momento della cattura avevano poco più di un anno di età, una lunghezza totale di circa 30 cm ed una peso medio di 300 gr.

Da ciascun allevamento è stato prelevato inoltre un campione di acqua con Kartell da 1 litro precedentemente avvinata e portata successivamente in laboratorio per la preparazione dell'analisi della fase disciolta.

Contestualmente è stato campionato del mangime rappresentativo della dieta della specie ittica allevata.

2.2 Area di studio

Al fine di verificare il possibile utilizzo degli otoliti come traccianti ambientali, gli esemplari di *Dicentrarchus labrax* sono stati campionati da due allevamenti con caratteristiche specularmente opposte. I due impianti sono infatti situati su coste differenti della Sicilia (costa Nord e Sud) (Fig. 6) e per la loro posizione geografica presentano caratteristiche idrofisiche ed idrochimiche differenti che influenzano le condizioni di allevamento. Nell'impianto di Trappeto le gabbie sono poste lontano dalla costa e soggette ad un elevato idrodinamismo. Al contrario, l'allevamento di Licata insiste proprio all'interno dell'area portuale in cui il ricambio di acqua è sicuramente molto più limitato rappresentando quindi un sistema più chiuso.

2.2.1 Trappeto

L'allevamento "Ittica Trappeto" è situato nella costa nord occidentale della Sicilia (Fig. 6 A) e precisamente nel Golfo di Castellammare (Tp). Lo specchio di mare in cui si trova l'allevamento è caratterizzato da un piccolo insediamento urbano, la città di Trappeto, poco distante dalla quale, gravitano attività antropiche caratterizzate da

industrie quali oleifici, stabilimenti enologici, industrie conserviere, fabbriche per la lavorazione del marmo e distillerie di alcool. Le acque costiere di quest'area sono infatti caratterizzate, soprattutto a levante, da una forte eutrofizzazione di origine industriale causata da scarichi di reflui non depurati provenienti da attività industriali situati sulla Piana di Partinico (distillerie) oltre che da reflui urbani che vengono riversati direttamente a mare tramite i corsi d'acqua.

A causa della morfologia dell'assetto costiero e del profilo batimetrico, le parti più interne del Golfo di Castellammare sono soggette a un ridotto scambio idrico. L'ampiezza dell'entroterra e la buona piovosità invernale consentono lo sviluppo di numerosi corsi d'acqua per la maggior parte a carattere torrentizio, i cui bacini idrografici hanno estensioni territoriali estremamente variabili. Fra questi i principali da est verso ovest sono il Fiume Nocella, il Fiume Jato ed il Fiume Freddo (o S. Bartolomeo). Il Fiume Jato sfocia a pochi chilometri ad est della città di Trappeto dopo un percorso di 32 Km. Il Fiume Nocella sfocia invece ad est della città di Trappeto è alimentato da una serie di impluvi che si sviluppano in destra idrografica e che discendono dai rilievi a nord e presenta un'ampia variabilità delle caratteristiche di portata ($0.01 \text{ m}^3/\text{s}$ - $136 \text{ m}^3/\text{s}$); il suo stato ecologico risulta ad oggi compromesso per la presenza di numerosi scarichi abusivi e la mancanza di un depuratore; nell'alveo si riversano infatti i reflui dei centri urbani montani circostanti quali Montelepre, Giardinello, Borgetto e Partinico. A ciò si aggiungono fitofarmaci e fertilizzanti utilizzati nelle diverse colture che, una volta raggiunte le acque del golfo possono accumularsi negli organismi entrando così nella rete trofica marina.

2.2.2 Allevamento “Ittica Trappeto”

L'impianto di Trappeto è definito off-shore poiché le gabbie si trovano, ad una distanza dalla costa compresa tra 1400 e 2000 metri e ad una profondità tra 26 e 39 metri, con temperature medie negli ultimi tre anni di 21°C, in un'area al riparo da forti correnti, lontano dalle aree di migrazione dei grandi predatori (Fig.7) .

L'allevamento è costituito da 3 gabbie Farmocean 4500 e da un modulo a sei gabbie galleggianti Farmocean Mark II, quest'ultimo utilizzato per il preingrasso di giovani inferiori a 15 g. Il sistema delle gabbie consiste in una rete agganciata ad una massiccia struttura esagonale, che ha diversi livelli di galleggiamento, uno per le normali operazioni di pesca ed un altro per le operazioni di servizio e manutenzione. Nella parte superiore della struttura vi è un sistema di alimentazione controllato da un computer, che fornisce ai pesci la quantità ottimale del mangime, secondo un programma stabilito, in base alla quantità di pesce presente all'interno della gabbia, alla temperatura delle acque del mare e alle dimensioni del pesce.

2.2.3 Licata

L'allevamento Sicilittica di Licata è situato nella costa sud orientale della Sicilia, nel Golfo di Gela, tratto di costa compreso tra Capo Scalambri e Licata, in un'area che si estende per circa 21.000 m² (Fig.6 B). La città di Licata sorge sulla costa del Canale di Sicilia, sulla sponda destra della foce del fiume Salso che con uno sviluppo di 144 km, è il maggiore corso d'acqua della Sicilia. Il suo bacino si estende infatti per 2049 km² interessando quattro province: Palermo, Caltanissetta, Enna e Agrigento. Licata è fra i principali centri commerciali della Sicilia proprio per

l'attività del suo porto peschereccio. Sulla costa in cui sorge il porto incidono importanti attività antropiche quali, installazioni civili attività di tipo agricolo, zootecnico, artigianale. Nell'hinterland sono presenti anche attività industriali, con industrie chimiche, dello zolfo, del cemento, cantieristiche ed alimentari. Da uno studio condotto dalla Regione Sicilia (2007) è emerso che le cause principali dell'inquinamento sono gli scarichi civili non adeguatamente trattati associati alla concomitante riduzione delle portate, quindi delle capacità di diluizione, soprattutto nel periodo primaverile estivo. La foce del Fiume Salso è stata spesso monitorata per l'alterazione del suo stato trofico conseguente all'apporto di reflui urbani (studio della Regione Sicilia 2007) e sulla base dei valori dell'indice LIM (Livello di Inquinamento espresso dai Macrodescrittori) il suo stato ecologico e ambientale è risultato appartenente alla classe III e quindi mostra una qualità ambientale di livello medio (Piano di tutela delle acque della Sicilia).

2.2.4 Allevamento "Sicilittica" di Licata

L'allevamento è definito in-shore in quanto si trova ad una distanza di circa 1 Km dal litorale costiero, è costituito da un sistema 24 atolli galleggianti rettangolari in una parte ristretta all'interno delle due braccia del porto dove il fondo raggiunge la profondità media di circa 7 metri (Fig. 8). Le condizioni climatiche risultano essere favorevoli per la specie allevata in quanto le temperature medie mensili del sito non raggiungono, nel periodo invernale, valori al di sotto dei 13°C e nel periodo estivo non superano mai i 26°C (17 °C -temperatura media registrata negli ultimi 3 anni).

Tuttavia, la posizione dell'allevamento all'interno del porto, suggerisce condizioni idrodinamiche ristrette.

Le diverse condizioni ambientali e di maricoltura dei due impianti sono state precedentemente rimarcate attraverso uno studio condotto dall'Istituto Cooperativo di Ricerca sul Mare (2004). In questo caso è stato valutato l'impatto che le stesse attività di maricoltura possono avere sull'ambiente. Tra le diverse fonti responsabili di impatto, l'immissione nell'ambiente di sostanza organica nelle diverse forme è senz'altro quella predominante. Qualunque sia la fonte di sostanza organica in uscita da un sistema di maricoltura (mangime non ingerito, feci, fouling delle gabbie) la sede di accumulo è rappresentata dai fondali circostanti in un'area più o meno vasta in funzione delle caratteristiche del sito di allevamento ed in particolare dell'idrodinamismo. E' stata studiata la struttura del sedimento, del contenuto di sostanza organica e del comparto bentonico per valutarne lo stato di salute. Dalla valutazione di tali parametri è emerso che il sito di Trappeto essendo più aperto è sottoposto ad un idrodinamismo più elevato al contrario di Licata che, per le sue caratteristiche, risulta fortemente confinato poiché le attività di maricoltura si collocano all'interno di un'area portuale immediatamente a ridosso delle diga foranea. In questa situazione è quasi impossibile discriminare con assoluta certezza l'effetto delle attività di maricoltura da quello più generale del confinamento delle acque all'interno e degli altri carichi organici che su di esso insistono.

Da quanto detto, i due allevamenti presentano caratteristiche differenti. Proprio le loro peculiari caratteristiche, le diverse condizioni ambientali e la distinta locazione delle gabbie di allevamento sono state valutate a priori per dar forza alla ricerca e per dare un contributo allo studio del chimismo degli otoliti come “registratori delle condizioni ambientali”.

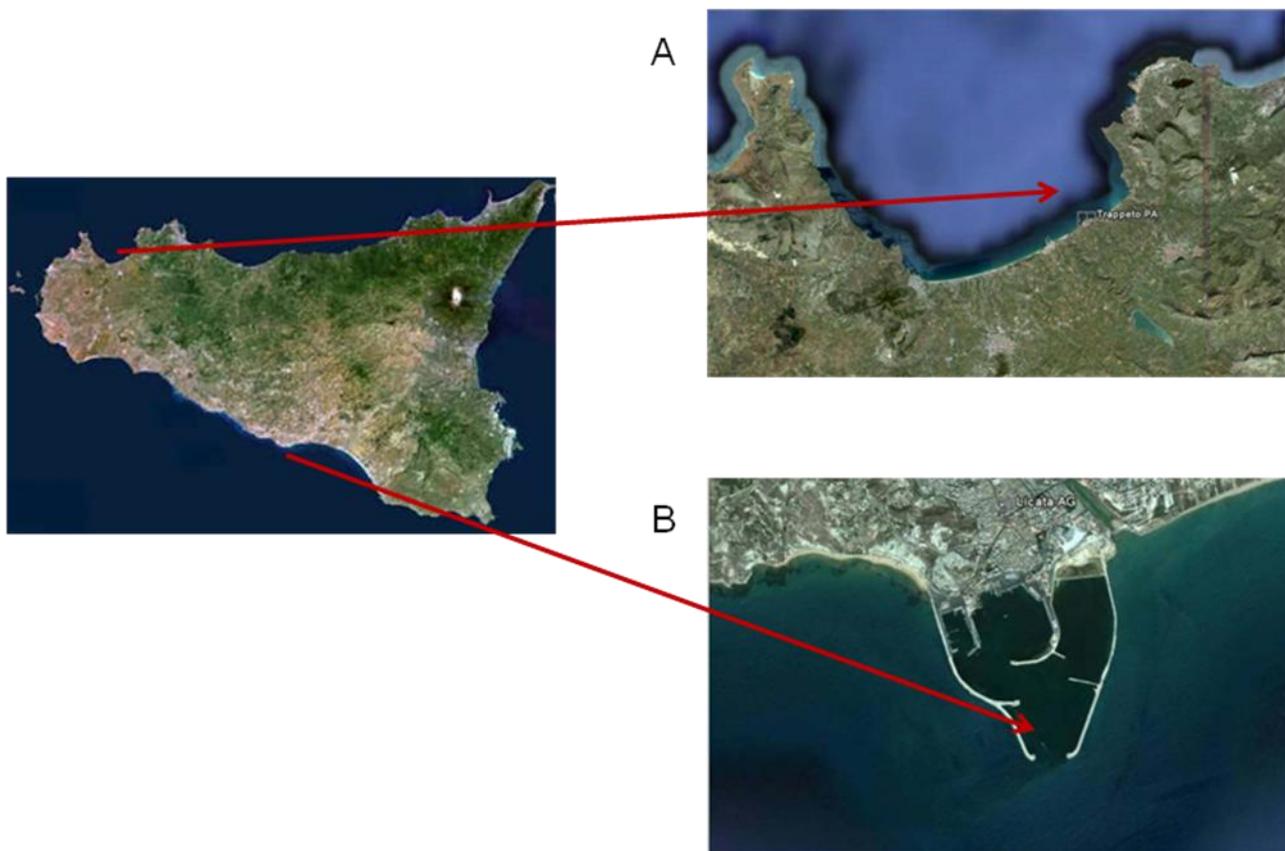


Figura.6: Area di studio:A.”Ittica Trappeto” (Trappeto); B. “Sicilittica” (Licata)



Figura 7: Particolare dell'impianto di Trappeto.



Figura 8: Particolare dell'impianto di Licata.

2.3 Metodi analitici

2.3.1 Cenni di ICP-AES

Con questa tecnica di spettrometria ad emissione atomica, vengono studiati gli spettri di emissione dei singoli elementi alla diverse lunghezze d'onda caratteristiche a seguito di eccitazione del plasma. In particolare l'ICP-AES vista-mpx in dotazione presso IAMC-CNR di Napoli, misura gli spettri di emissione di atomi e ioni tramite le transizioni che avvengono nel range 100 - 900 nm che include l'ultravioletto, la luce visibile (dal violetto a 380 nm al rosso a 760 nm) e il vicino infrarosso. Il campione in soluzione liquida è portato al nebulizzatore dove, grazie ad un flusso di argon, è ridotto in minute particelle e trasportato alla torcia. Qui il campione è desolvato e atomizzato nel plasma dove gli atomi allo stato eccitato emettono radiazioni a caratteristiche lunghezze d'onda che sono rilevate dal detector. La luce emessa dal plasma è focalizzata all'ingresso dello spettrometro attraverso un sistema di lenti convesse (grating) e poi l'intensità delle linee di emissione sono misurate da apparecchi fotosensibili. Tale strumentazione produce analisi multielementare simultaneamente grazie al rilevatore CCD (Charged-Coupled Device) che consente una lettura simultanea sull'intero range di lunghezze d'onda. Le interferenze che si possono generare sono di due tipologie fondamentali: sovrapposizioni spettrali ed effetti di matrice (che possono essere limitate con l'utilizzo di lunghezze d'onda alternative ed/o aumentando la risoluzione dello spettrometro). L'affidabilità delle letture è valutata considerando i valori di detection limit dello strumento in corrispondenza delle singole lunghezze d'onda fornite dalla casa costruttrice, la

lettura dei bianchi effettuata per ogni worksheet, l'analisi dello spettro dell'elemento e il relativo background. La precisione analitica – misurata come RDS – è di 5-10%.

2.3.2 Cenni di ICP-MS

ICP-MS-VARIAN (Inductively coupled plasma mass spectrometry). La spettrometria di massa è una tecnica strumentale d'analisi che si basa sulla separazione, l'identificazione e la quantificazione degli elementi costitutivi di un campione in funzione della loro massa. Sfrutta l'accoppiamento di una torcia di quarzo a plasma che genera ioni e di uno spettrometro di massa quadrupolare che separa questi ioni in base alla loro massa. Il campione in soluzione viene trasformato in un aerosol liquido tramite l'argon gassoso che si trova nella camera di vaporizzazione. L'aerosol così formato è inviato in una torcia a plasma ad argon ($15 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$) ad alta temperatura (tra 6000 e 10000 °C), in grado di vaporizzare, dissociare ed ionizzare completamente la maggior parte degli elementi. Una parte di questo plasma (10%) è aspirata da un primo orifizio di circa 1 mm di diametro posto alla sommità di un cono in nichel o in platino ("sampler"), quindi si riduce sotto l'effetto del vuoto moderato (1-2 mbar) e passa in un secondo orifizio ("skimmer"). Successivamente, un sistema di vuoto differenziale accelera gli ioni verso un insieme di lenti elettrostatiche (lenti ioniche) che estrae gli ioni caricati positivamente e li trasporta verso il quadrupolo. Il quadrupolo a seconda della frequenza applicata fa transitare soltanto gli ioni che presentano una relazione particolare tra massa e carica. Tali ioni saranno trasferiti al rilevatore. Tutte le calibrazioni sono effettuate con standards certificati (almeno 5 standards per ogni retta di calibrazione) diluiti in una

soluzione che ha la stessa miscela di acidi della soluzione di campione da analizzare. Questa strumentazione permette di analizzare in alcuni minuti simultaneamente molti elementi diversi a partire da soluzioni contenenti un ampio range di concentrazioni di elementi minori ed in tracce, ed è d'altra parte dotata di una sensibilità eccellente che permette di individuare elementi presenti al livello di ppt nella soluzione. La precisione analitica – misurata come RDS – che dipende dal potenziale d'ionizzazione degli elementi e dalle matrici studiate, è tra il 3% e il 4% non superando mai il 10%.

2.3.3 Acquisizione misure morfometriche

Per ciascun esemplare campionato sia a Trappeto che a Licata è stato eseguito lo stesso protocollo di campionamento; inoltre una volta in laboratorio, tutti i pesci sono stati analizzati dal punto di vista morfometrico per verificare l'omogeneità del campione. In particolare sono state prelevate le seguenti misure:

- Lunghezza Totale (LT - dall'apice della bocca alla fine della pinna caudale), in mm.
- Lunghezza Standard (LS - dall'apice della bocca alla biforcazione della pinna caudale), in mm.
- Peso totale in gr (W)

Per registrare le misure di lunghezza e peso sono stati utilizzati l'ittiometro e la bilancia di precisione. Infine i campioni sono stati fotografati con una macchina digitale con l'etichetta identificativa riportante il numero del campione, la data, la provenienza e le misure biometriche.

Per l'estrazione degli otoliti è stata asportata la testa del pesce ed aperte capsule otiche tramite utilizzo di forbici e pinzette teflonate. Gli otoliti prelevati sono stati posti in acqua ossigenata per qualche minuto per eliminare gli eventuali residui tissutali; sciacquati con acqua Milli-Q (Millipore, $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) ed asciugati mediante flusso d'aria sotto cappa.

Le coppie di otoliti sono state interamente mineralizzate con 1 ml di soluzione di HNO_3 al 69% (Iperpur-Plus) e portate a volume di 10 cc con acqua MilliQ. Le soluzioni sono state analizzate tramite ICP-AES (Inductively Coupled plasma Atomic Emission Spettrometry) per la determinazione degli elementi Sr, Fe, Mg, Ba, Cd, Mn e Zn e tramite ICP-MS (Inductively Coupled plasma Mass Spectrometry) per la determinazione del gruppo dei lantanidi.

2.3.4 Estrazione dei metalli in fase disciolta

L'analisi dell'acqua è stata eseguita secondo uno specifico protocollo che prevedeva che l'acqua fosse filtrata con un filtro da $40 \mu\text{m}$ ed acidificata con 100 μl di HNO_3 (suprapur).

La procedura analitica utilizzata per analizzare la concentrazione di metalli in tracce in fase disciolta, richiede una fase preliminare di trattamento di metalli presenti nel campione; questa da un lato, aumenta considerevolmente il limite di sensibilità e, dall'altro, riduce al minimo le interferenze della matrice.

Come agenti chelanti sono stati utilizzati ammonio pirrolidin-ditiocarbammato di ammonio (APDC) e dietilditiocarbammato di dietilammonio (DDDC) per formare complessi metallo-carbammato grazie alle loro proprietà di complessamento non

selettive. Tale processo viene eseguito in un intervallo di pH relativamente ampio (la complessazione e l'estrazione sono possibili in un ampio range di pH ma abbiamo operato tra 4-5 in modo tale da avere una procedura da utilizzare su più composti contemporaneamente).

Il cloroformio è stato scelto come solvente organico per la sua bassa solubilità in acqua e la sua alta efficienza di estrazione dei metalli. Dopo la chelazione, i metalli sono stati trasformati in specie non cariche solubili in solvente organico, in grado quindi di sostituire le molecole d'acqua con il gruppo legante APDC. La successiva estrazione della fase organica in ambiente acido ha permesso di eliminare problemi di instabilità del complesso e di ottenere una soluzione stabile utilizzabile per un lungo periodo di tempo prima dell'analisi strumentale. Con questa tecnica, adattando le condizioni di pH, è stato possibile concentrare i metalli più comuni come Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Pb, Zn, Al, Mo, V, Ni, con rese di estrazione dell'ordine del 50 -100%. Tutte le apparecchiature, i campioni e la procedura di estrazione liquido-liquido e di pre-concentrazione sono trattati sottocappa a flusso laminare per ridurre al minimo i rischi di contaminazione. La procedura analitica per la fase disciolta è stata effettuata secondo il protocollo descritto da Scelfo (1997). I metalli così ottenuti sono stati quindi analizzati con ICP-MS (Inductively Coupled plasma Atomic Emission Spectrometry).

Le analisi di tutti i campioni sono state effettuate presso l'IAMC di Napoli.

2.3.4 Mineralizzazione del mangime

Da ciascun campione di mangime sono stati pesati 0.5 grammi. A ciascuna aliquota sono stati aggiunti 10 ml di HNO₃ (69%) ultrapure. I liner, collocati in supporti di ceramica e successivamente chiusi con gli appositi tappi pressurizzati provvisti di valvola di sfiato, sono stati alloggiati in un dispositivo rotore ed introdotti nel forno. Il processo di mineralizzazione è avvenuto secondo uno specifico programma di variazione della temperatura con il tempo messo a punto per la digestione di matrici biologiche. Tale programma ha previsto una rampa iniziale di 30 min per il raggiungimento della temperatura di 160±5 °C, una fase di mantenimento della stessa per 210 min ed una fase finale di raffreddamento della durata di 20 min durante la quale si è interrotta l'erogazione delle onde elettromagnetiche per permettere l'abbassamento della temperatura e della pressione all'interno dei liner.

Nel processo di mineralizzazione sono stati inseriti inoltre dei valori limite di temperatura ($T_{\max}=180^{\circ}\text{C}$), pressione ($P_{\max}=40$ bar; $P/\text{sec}=0,4$ bar/sec) e potenza erogata ($W_{\max}=1400$ per 16 liner) per prevenire rapidi e pericolosi cambiamenti delle condizioni termobariche all'interno dei liner.

Successivamente il campione totalmente digerito è stato recuperato in apposite provette graduate di polipropilene e portato ad un volume finale di 35-40 ml con acqua deionizzata (Milli-Q). Per valutare la riproducibilità e l'accuratezza delle metodiche di preparazione e delle tecniche analitiche sono stati sottoposti a digestione acida duplicati dei campioni.

Per ogni campione di mangime sono stati analizzati tramite ICP-AES gli stessi elementi in tracce (Sr, Fe, Mg, Ba, Cd, Mn e Zn) analizzati all'interno degli otoliti.

3. RISULTATI

3.1 Elementi in tracce

Al fine di confrontare i dati ottenuti nel presente lavoro con quelli riportati in letteratura, le concentrazioni degli elementi in tracce (Sr, Ba, Mg, Fe, Mn, Cd, Zn) sono espressi in micromoli e rapportati al Ca (in moli) per opportuni confronti con la letteratura (Campana, 1999). Le tabelle 2 e 3 mostrano il range dei valori dei rapporti **Elemento/Ca** ($\mu\text{moli/mole}$) degli otoliti campionati a Licata e a Trappeto rispettivamente. Nelle figure comprese tra 9 e 15 i box plot sintetizzano i dati statistici di base dei pattern di distribuzione dei rapporti Elemento/Ca.

3.1.1 Elementi in tracce negli otoliti

Sr/Ca: i valori dei rapporti **Sr/Ca** degli otoliti di Licata mostrano un intervallo compreso tra 1406 e 2614 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 2250 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 2, Fig. 9). Gli otoliti di Trappeto presentano un simile intervallo di valori con un minimo e massimo rispettivamente di 1526 e 2462 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a di 2236 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 3, Fig. 9).

Ba/Ca: il rapporto **Ba/Ca** assume un valore minimo di 0.97 $\mu\text{moli/mole}$ ed un valore massimo di 3.19 $\mu\text{moli/mole}$ per gli otoliti di Licata (mediana uguale a 1.78 $\mu\text{moli/mole}$; (Tab. 2, Fig. 10), mentre l'intervallo di valori per gli otoliti di Trappeto risulta essere un po' più basso e compreso tra 0.80 e 1.36 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 1.12 $\mu\text{moli/mole}$ (Tab. 3, Fig. 10).

Mg/Ca: il rapporto **Mg/Ca** negli otoliti di Licata varia da 36.3 a 922.6 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 47.5 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 2, Fig. 11), mentre negli otoliti di Trappeto lo stesso rapporto assume valori inferiori con un minimo di 33.4 $\mu\text{moli/mole}$ ed un massimo di 859.7 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 42.8 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 3, Fig. 11).

Fe/Ca: i rapporti di concentrazione **Fe/Ca** negli otoliti di Licata sono superiori rispetto a quelli di Trappeto, in particolare, i rapporti sono rispettivamente compresi tra 0.49 $\mu\text{moli/mole}$ e 31.63 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 1.12 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 2, Fig. 12) e tra 0.26 $\mu\text{moli/mole}$ e 10.0 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 0.77 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 3, Fig. 12).

Mn/Ca: il rapporto **Mn/Ca** varia da 1.40 a 8.78 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 2.83 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 2, Fig.13) negli otoliti di Licata, mentre nell'allevamento di Trappeto anche i valori di **Mn/Ca** sono più bassi con un minimo di 1.24 $\mu\text{moli/mole}$ ed un massimo di 6.99 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 2.01 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 3, Fig.13).

Cd/Ca: similmente, il rapporto **Cd/Ca** per gli otoliti di Licata, mostra valori compresi tra 0.02 e 0.08 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 0.05 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 2, Fig.14) che sono più alti rispetto ai rapporti **Cd/Ca** degli otoliti di Trappeto che variano da 0.005 a 0.06 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 0.035 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 3, Fig.14).

Zn/Ca: diversamente, lo **Zn/Ca** è l'unico rapporto che mostra valori superiori negli otoliti di Trappeto rispetto a quelli di Licata. In particolare, i rapporti **Zn/Ca** a Trappeto assumono valori compresi tra 2.35 e 8.69 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 4.91 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 2, Fig.15) mentre a Licata sono compresi tra 0.98 e 3.98 $\mu\text{moli/mole}$ (mediana uguale a 1.89 $\mu\text{moli/mole}$; Tab. 3, Fig.15).

| | <i>Massimo</i> | <i>Minimo</i> | <i>Mediana</i> |
|--------------|----------------|---------------|----------------|
| <i>Sr/Ca</i> | 2614 | 1406 | 2250 |
| <i>Ba/Ca</i> | 3.19 | 0.97 | 1.78 |
| <i>Mg/Ca</i> | 922.6 | 36.3 | 47.5 |
| <i>Fe/Ca</i> | 31.63 | 0.49 | 1.12 |
| <i>Mn/Ca</i> | 8.78 | 1.40 | 2.83 |
| <i>Cd/Ca</i> | 0.08 | 0.02 | 0.05 |
| <i>Zn/Ca</i> | 3.98 | 0.98 | 1.89 |

Tabella 2: Valori massimi, minimi e di mediana delle concentrazioni di elementi in tracce relativi ai campioni di Licata. Tutti i valori sono espressi in $\mu\text{moli/mole}$

| | <i>Massimo</i> | <i>Minimo</i> | <i>Mediana</i> |
|--------------|----------------|---------------|----------------|
| <i>Sr/Ca</i> | 2462 | 1526. | 2236. |
| <i>Ba/Ca</i> | 1.36 | 0.80 | 1.12 |
| <i>Mg/Ca</i> | 859.7 | 33.4 | 42.8 |
| <i>Fe/Ca</i> | 10.04 | 0.26 | 0.77 |
| <i>Mn/Ca</i> | 6.99 | 1.24 | 2.01 |
| <i>Cd/Ca</i> | 0.06 | 0.01 | 0.03 |
| <i>Zn/Ca</i> | 8.69 | 2.35 | 4.91 |

Tabella 3: Valori Massimi, minimi e di mediana delle concentrazioni di elementi in tracce relativi ai campioni di Trappeto. Tutti i valori sono espressi in $\mu\text{moli/mole}$

3.1.2. Elementi in tracce nell'acqua

I valori di concentrazione di elementi in tracce in fase disciolta (espressi nanomoli/L) dei due allevamenti e quelli generalmente presenti in acqua di mare sono riportati in Tab. 4.

| | <i>Ba</i> | <i>Fe</i> | <i>Mn</i> | <i>Cd</i> | <i>Zn</i> |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Licata</i> | <dl | 893.19 | 1.31 | 0.27 | 97.82 |
| <i>Trappeto</i> | <dl | 1212.85 | 2.02 | 0.15 | 132.69 |
| <i>Acqua di mare</i> (<i>Turekian, 1968</i>) | 152.92 | 60.88 | 7.28 | 0.98 | 764.76 |

Tabella 4: Valori di concentrazione (*nmoli/L*) di elementi in tracce nelle acque di Licata e Trappeto e confronto con i valori in acqua di mare (*Turekian, 1968*)

3.1.3. Elementi in tracce nei mangimi

In Tab. 5 sono riportate le concentrazioni degli elementi in tracce (espressi in ppm) all'interno dei mangimi somministrati nei due allevamenti.

Dall'analisi dei mangimi risulta che il contenuto di alcuni elementi (Fe, Mn, Sr, Zn e Ca) è maggiore nei mangimi di Licata rispetto alla concentrazione degli stessi nei mangimi di Trappeto (Tab. 5).

| | <i>Ca</i> | <i>Sr</i> | <i>Ba</i> | <i>Mg</i> | <i>Fe</i> | <i>Mn</i> | <i>Cd</i> | <i>Zn</i> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Licata</i> | 4272,03 | 15.19 | 1.71 | 714.00 | 107,69 | 18.34 | 0.10 | 34.55 |
| <i>Trappeto</i> | 3662,29 | 12.34 | 1.70 | 596.34 | 67.54 | 14.70 | 0.10 | 24.15 |

Tabella 5: Valori di concentrazione (**ppm**) di elementi in tracce nei mangimi di Licata e Trappeto

3.2. Trattamento statistico dei dati relativi agli elementi in tracce

3.2.1. *Analisi uni variata: metalli in tracce negli otoliti*

Il primo passo nell'analisi statistica del dataset è stato quello di effettuare una caratterizzazione delle serie numeriche relative ai diversi rapporti **Elemento/Ca**, valutando, separatamente per ognuna delle aree oggetto di studio (Licata e Trappeto), i parametri statistici di base (indici di tendenza centrale, indici di dispersione e forma, distribuzioni di frequenza ecc). La determinazione di tali indici, oltre a fornire una visione sintetica del dataset, ha permesso di identificare gli strumenti statistici da utilizzare nelle analisi successive. In particolare l'analisi delle distribuzioni di frequenza e degli indici di forma hanno evidenziato una marcata non normalità delle serie numeriche (tale tendenza è stata confermata dal test di Shapiro-Wilk), che persisteva anche a seguito delle opportune trasformazioni.

Tutte le analisi successive sono quindi state effettuate utilizzando metodi non parametrici.

Per ogni rapporto Elemento/Ca degli otoliti sono stati generati, separatamente per le due aree in oggetto (Licata e Trappeto), dei box & whisker plot (Figg. 9-15) al fine di effettuare un confronto visuale tra i valori registrati nelle due aree. La significatività delle differenze (riportata in basso a sinistra in ognuno dei grafici) riscontrate in termini di mediana tra le due popolazioni studiate sono state verificate tramite applicazione del test non parametrico Kruskal & Wallis (KW-non parametric test). Quest'ultimo come gli altri test non parametrici prescinde per la propria validità dalle condizioni di normalità e di omogeneità delle varianze delle popolazioni statistiche considerate.

I box plot mettono in evidenza che **Sr/Ca** è l'unico rapporto che non mostra differenze significative tra le due aree di campionamento (Fig.9). I valori del rapporto **Ba/Ca** dell'area di Trappeto risultano significativamente inferiori ($p < 0,05$) a quelli dell'area di Licata con valori della mediana rispettivamente di 1.12 e 1.78 $\mu\text{moli/mole}$ (Fig.10). Il rapporto **Mg/Ca** si distribuisce in un range di valori maggiore a Licata piuttosto che a Trappeto ed il valore di $p < 0,05$ indica una differenza significativa tra le due aree (Fig.11). Allo stesso modo i rapporti **Fe/Ca**, **Mn/Ca** e **Cd/Ca** mostrano differenze significative tra le due zone ($p < 0,05$) con valori di mediana maggiori negli otoliti prelevati dall'allevamento di Licata rispetto all'allevamento di Trappeto (Figg. 12-14).

Diversamente dagli altri elementi il rapporto **Zn/Ca** risulta essere maggiore negli otoliti di Trappeto dove la distribuzione mostra un valore di mediana pari a 4.9 $\mu\text{moli/mole}$ contro una mediana 1.9 $\mu\text{moli/mole}$ riportata per la distribuzione di Licata. Anche in questo caso il valore di $p < 0,05$ indica che esiste tra la zona di Trappeto e di Licata una differenza significativa nella distribuzione del rapporto **Zn/Ca** (Fig. 15).

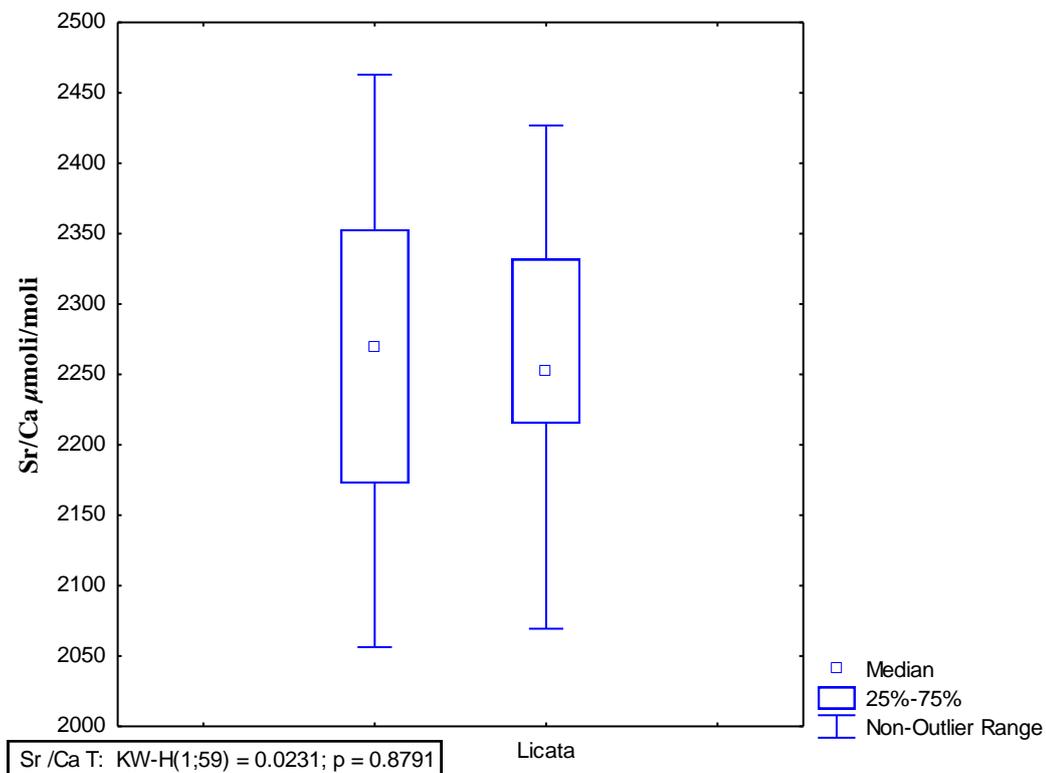


Figura 9: Box plot relativi al rapporto Sr/Ca di otoliti di *Dicentrarchus labrax* di Trappeto e Licata
Il grafico è stato realizzato eliminando gli outliers.

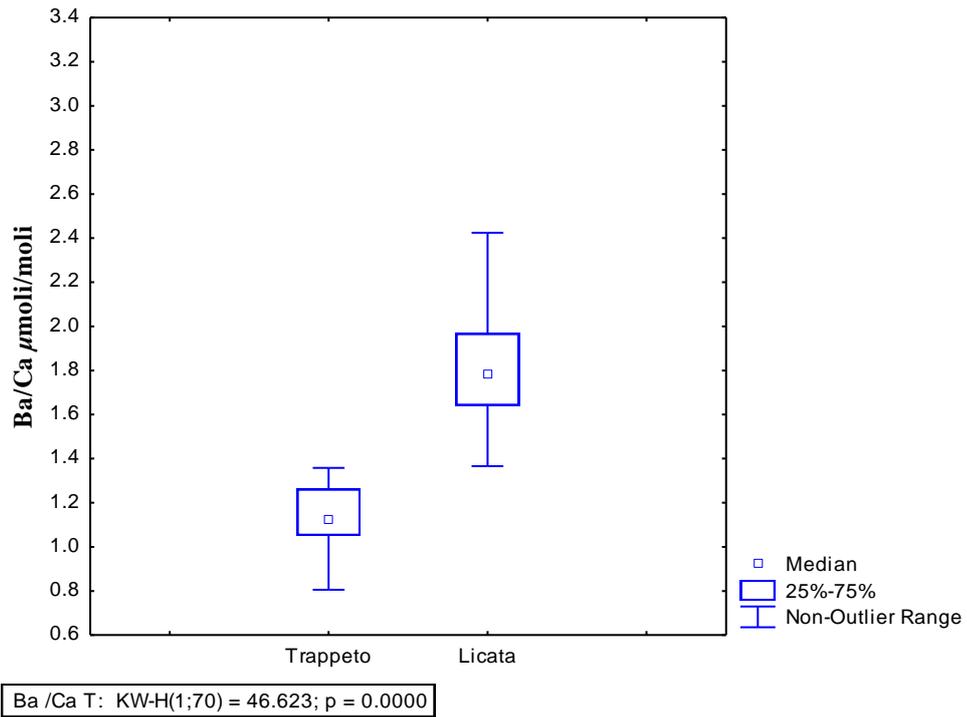


Figura 10: Box plot relativi al rapporto Ba/Ca di otoliti di *Dicentrarchus labrax* di Trappeto e Licata. Il grafico è stato realizzato eliminando gli outliers.

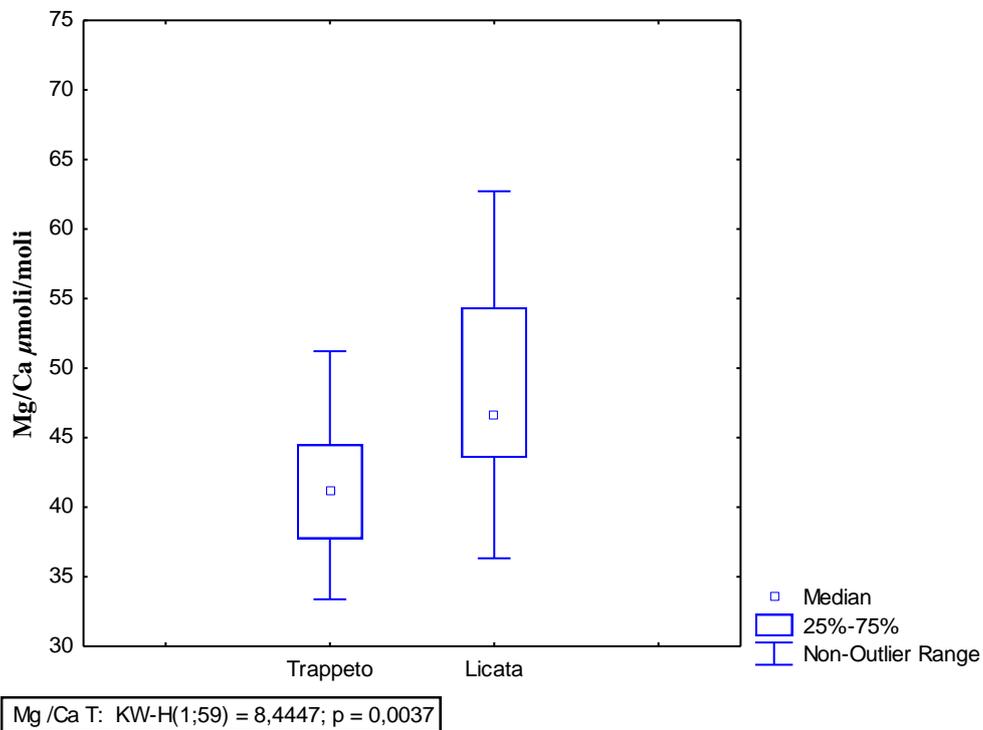


Figura 11: Box plot relativi al rapporto Mg/Ca di otoliti di *Dicentrarchus labrax* di Trappeto e Licata. Il grafico è stato realizzato eliminando gli outliers

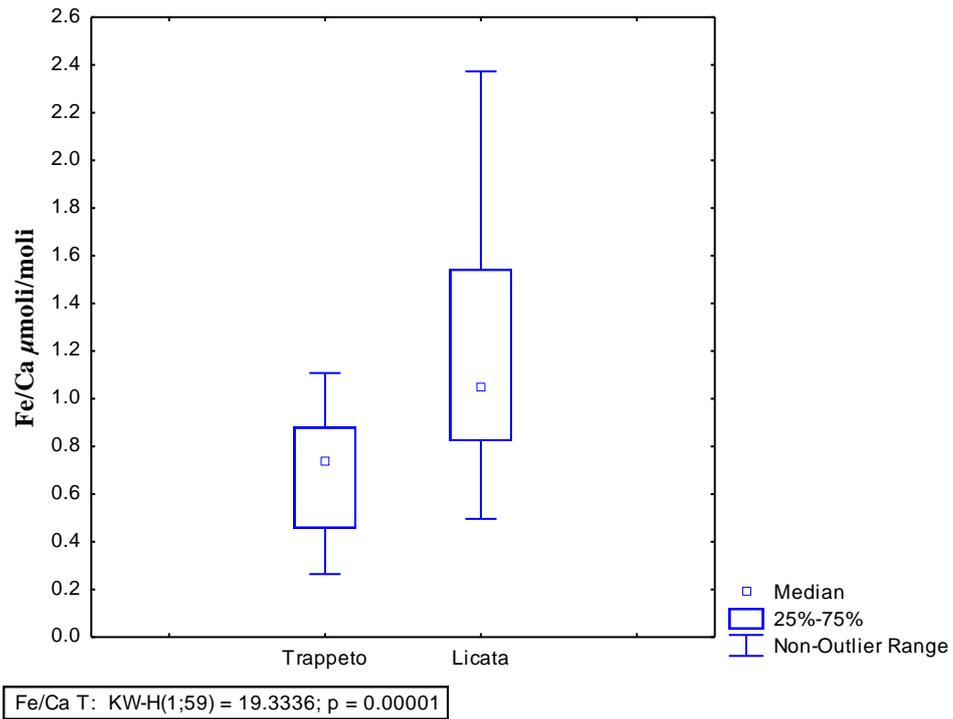


Figura 12: Box plot relativi al rapporto Fe/Ca di otoliti di *Dicentrarchus labrax* di Trappeto e Licata. Il grafico è stato realizzato eliminando gli outliers.

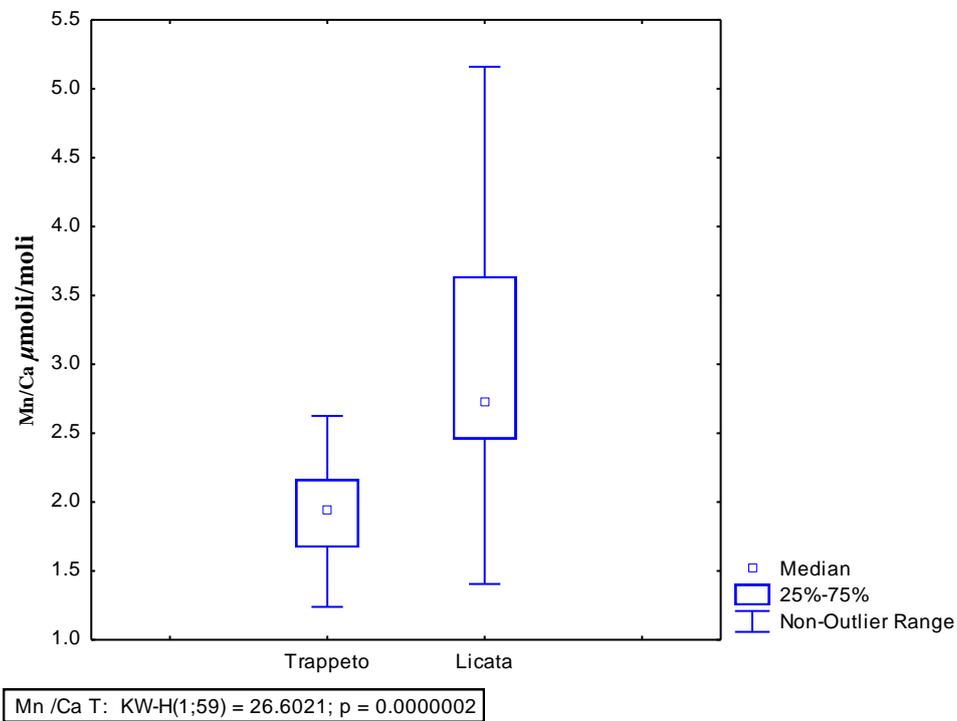


Figura 13: Box plot relativi al rapporto Mn/Ca di otoliti di *Dicentrarchus labrax* di Trappeto e Licata. Il grafico è stato realizzato eliminando gli outliers.

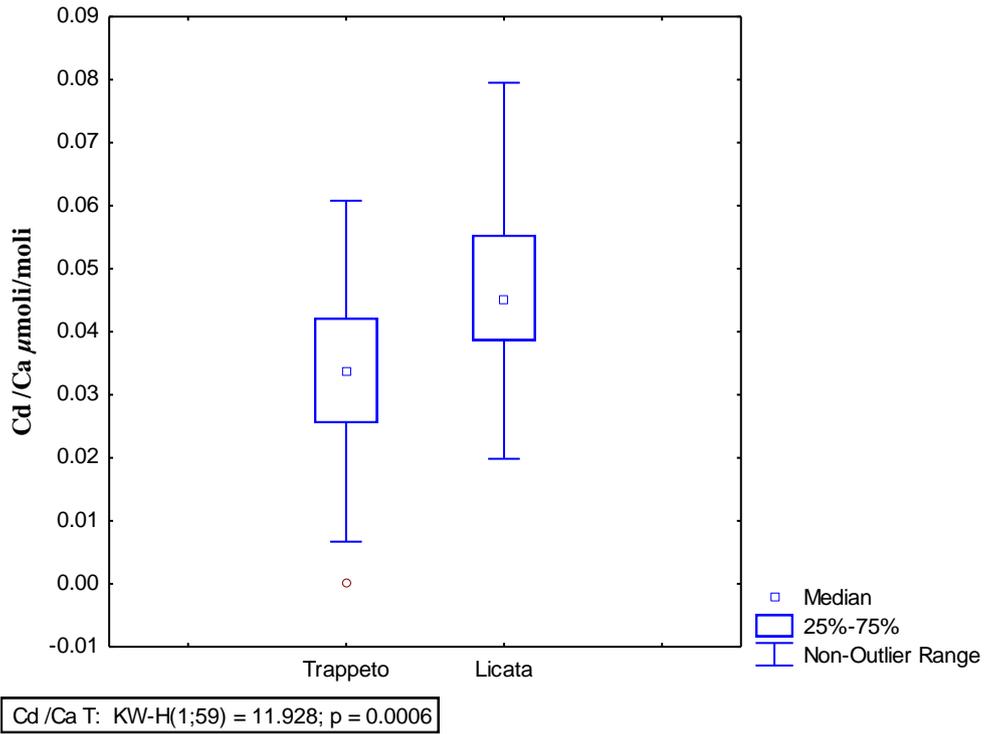


Figura 14: Box plot relativi al rapporto Cd/Ca di otoliti di *Dicentrarchus labrax* di Trappeto e Licata. Il grafico è stato realizzato eliminando gli outliers.

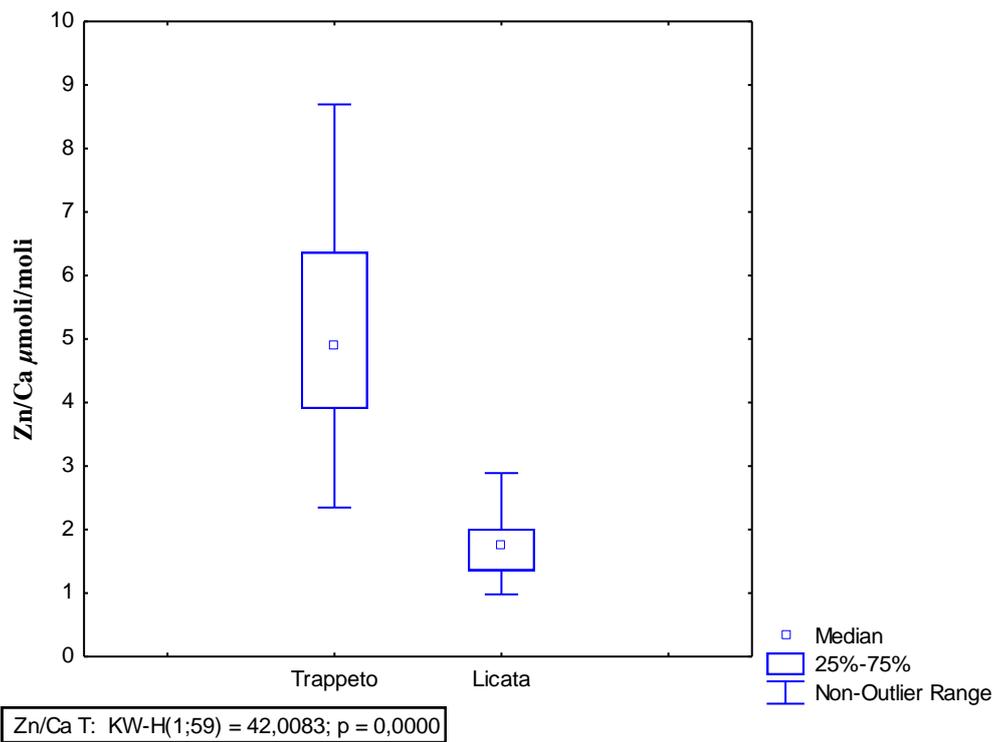


Figura 15: Box plot relativi al rapporto Zn/Ca di otoliti di *Dicentrarchus labrax* di Trappeto e Licata. Il grafico è stato realizzato eliminando gli outliers.

3.2.2. *Analisi multivariata relativa ai metalli in tracce negli otoliti*

Allo scopo di valutare se l'intero dataset mostrasse una tendenza a raggrupparsi in modo differente rispetto alla suddivisione geografica (Trappeto e Licata), o se esistessero all'interno di tale classificazione dei sottogruppi ben definiti, è stata effettuata un'analisi dei cluster. È stato utilizzato un metodo di classificazione gerarchico, con la metrica euclidea come misura di distanza e il metodo di Ward per l'aggregazione delle unità. L'analisi delle componenti principali è stata invece utilizzata per cercare di definire quali fossero i fattori che maggiormente differenziavano le osservazioni.

Data la marcata non normalità dei dati, entrambe le analisi sono state effettuate sui dati trasformati per ranghi.

Se si considera nel dendrogramma di Fig. 16 una distanza Euclidea di 500 si evidenzia la presenza di due clusters ben distinti. In particolare, si nota che al cluster 1 appartengono tutti i campioni da Licata, al cluster 2 appartengono i campioni provenienti da Trappeto. Ad una analisi più approfondita, e quindi ad un livello di distanza inferiore, si osserva la presenza di un cluster 3 (Fig. 17). Identificati i gruppi per ognuna delle variabili è stato eseguito un test ANOVA tra i tre clusters, al fine di individuare eventuali differenze significative. I risultati confermano in parte quanto è stato dedotto dall'analisi univariata dove i gruppi Licata e Trappeto si differenziano per tutti i rapporti Elemento/Ca tranne che per **Sr/Ca**. Di contro, la CA ha messo in luce la presenza di un sottogruppo in Trappeto che si differenzia rispetto al gruppo di appartenenza principalmente per i rapporti **Sr/Ca, Mg/Ca e Mn/Ca**

Tesi di dottorato di Traina Anna

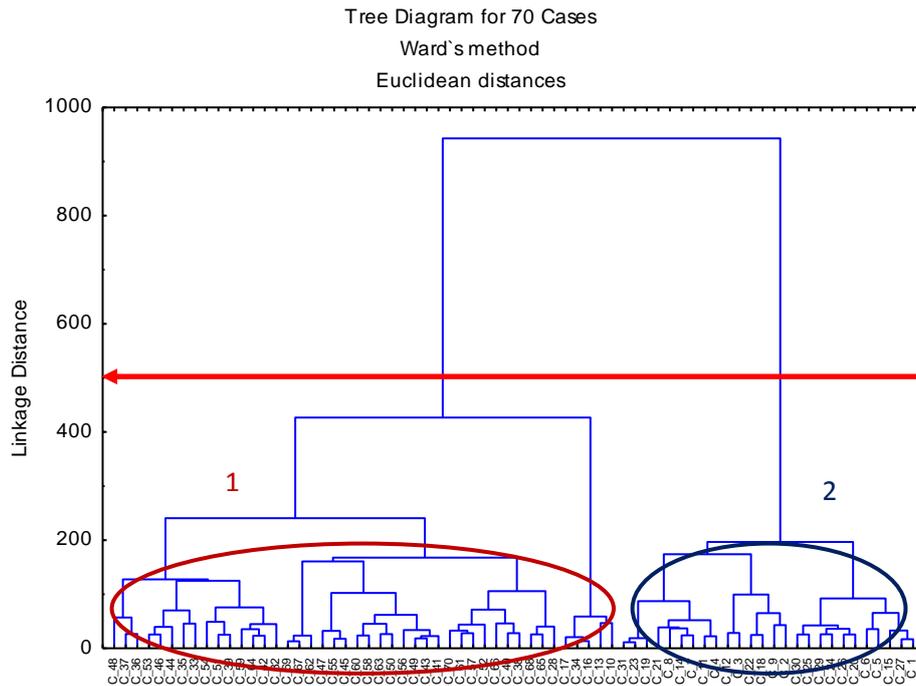


Figura 16: Cluster analysis. Sono visibili due diversi cluster: cluster 1 = Trappeto, cluster 2 = Licata.

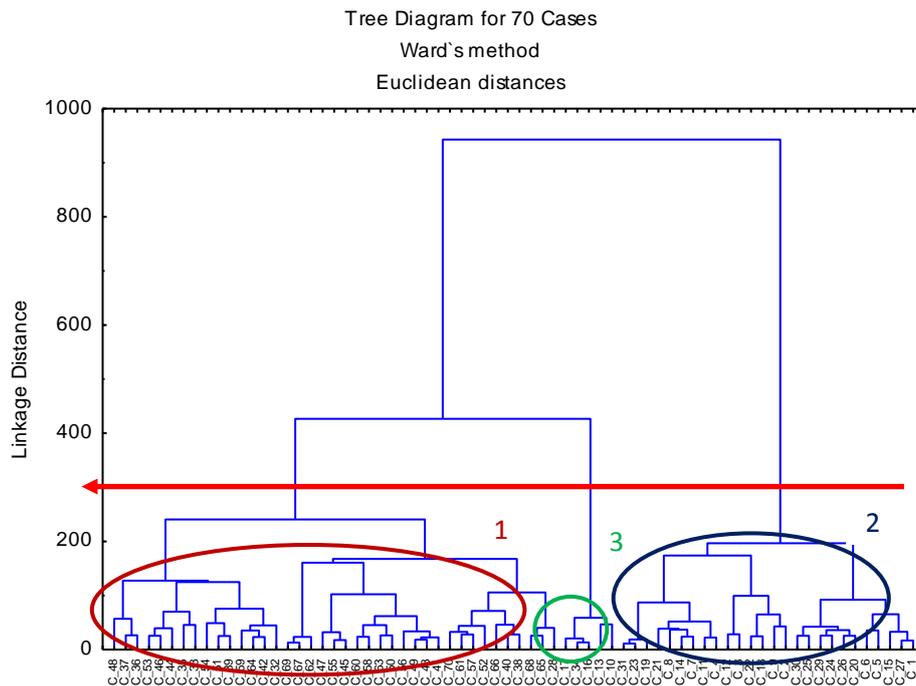


Figura 17: Cluster analysis. Sono visibili i tre diversi cluster: 1 = Licata, cluster 2 = Trappeto, cluster 3 = costituito da campioni provenienti da Trappeto ma che si differenziano rispetto al gruppo di appartenenza principalmente per i rapporti Sr/Ca, Mg/Ca e Mn/Ca

Al fine di ottenere una migliore comprensione dei fattori che maggiormente differenziano le osservazioni è stata applicata l'analisi delle componenti principali (PCA). Tale tecnica trasforma in maniera lineare un set di variabili tra loro correlate in un set più piccolo di nuove variabili tra loro non correlate. Le nuove variabili così ottenute sono una combinazione lineare delle variabili originali. In genere, il primo fattore (prima componente principale) è la combinazione delle variabili che spiegano la maggior parte della varianza nel sistema osservato.

In questo caso la PCA è servita a valutare se esistessero dei processi relativi al comportamento degli elementi in tracce all'interno dell'otolite, che potessero spiegare le differenze riscontrate tra i due gruppi.

La PCA effettuata sull'intero dataset ha evidenziato che il Fattore 1 spiega da solo il 43% della varianza mentre il Fattore 2 spiega circa il 20% della variabilità (Fig. 18). In particolare tutte le variabili sono anticorrelate in maniera significativa al Fattore 1, l'unica eccezione è data dal rapporto **Sr/Ca** che risulta unicamente correlato al Fattore 2. Tuttavia il valore di correlazione di **Ba/Ca** vs Fattore 2 (0.51, Tab. 6) si avvicina ad un valore significativo considerando che il Ba ha un comportamento simile allo Sr all'interno dell'otolite.

| | <i>Factor 1</i> | <i>Factor 2</i> | <i>Factor 3</i> |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Sr/Ca</i> | -0.08 | 0.68 | -0.70 |
| <i>Fe/Ca</i> | -0.77 | -0.26 | -0.02 |
| <i>Mg/Ca</i> | -0.66 | -0.46 | -0.41 |
| <i>Ba/Ca</i> | -0.76 | 0.51 | 0.04 |
| <i>Cd/Ca</i> | -0.72 | 0.04 | 0.12 |
| <i>Mn/Ca</i> | -0.75 | -0.36 | -0.06 |
| <i>Zn/Ca</i> | 0.60 | -0.49 | -0.48 |

Tabella 6: PCA effettuata su tutti i campioni.

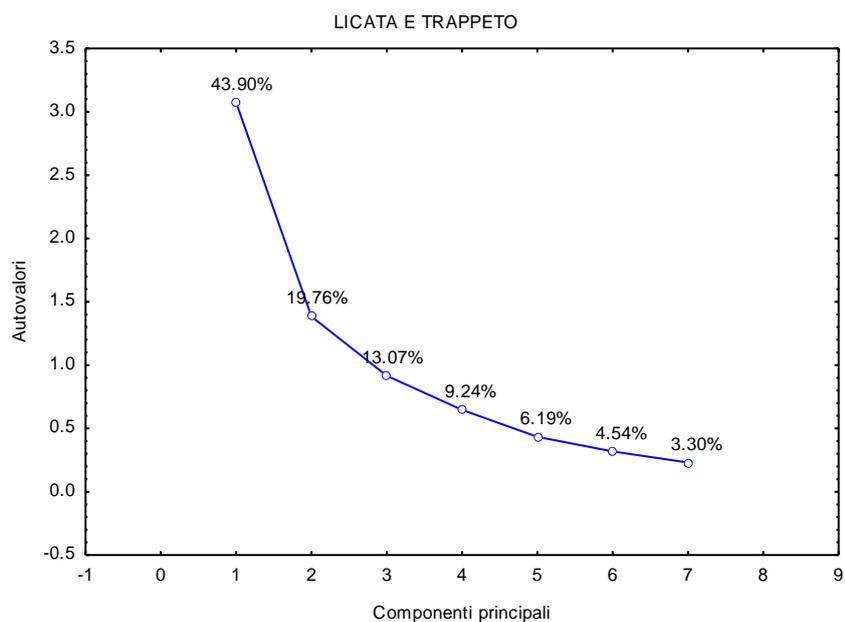


Figura 18: Grafico degli auto valori della matrice di correlazione

Di seguito sono riportate le matrici di correlazione per gli elementi in tracce negli otoliti dei due allevamenti (Tab. 7-8):

| | <i>Sr/Ca</i> | <i>Fe/Ca</i> | <i>Mg/Ca</i> | <i>Ba/Ca</i> | <i>Cd/Ca</i> | <i>Mn/Ca</i> | <i>Zn/Ca</i> |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>Sr/Ca</i> | 1.00 | -0.24 | -0.14 | 0.45 | -0.17 | -0.43 | -0.01 |
| <i>Fe/Ca</i> | | 1.00 | 0.68 | -0.22 | 0.42 | 0.60 | 0.01 |
| <i>Mg/Ca</i> | | | 1.00 | -0.31 | 0.20 | 0.61 | 0.09 |
| <i>Ba/Ca</i> | | | | 1.00 | 0.17 | -0.35 | 0.02 |
| <i>Cd/Ca</i> | | | | | 1.00 | 0.32 | -0.04 |
| <i>Mn/Ca</i> | | | | | | 1.00 | -0.01 |
| <i>Zn/Ca</i> | | | | | | | 1.00 |

Tabella 7: Matrice di correlazione degli elementi in tracce negli otoliti di Trappeto
Sono significative a $p < 0.05$

| | <i>Sr/Ca</i> | <i>Fe/Ca</i> | <i>Mg/Ca</i> | <i>Ba/Ca</i> | <i>Cd/Ca</i> | <i>Mn/Ca</i> | <i>Zn/Ca</i> |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>Sr/Ca</i> | 1.00 | 0.01 | 0.10 | 0.48 | 0.12 | 0.09 | -0.00 |
| <i>Fe/Ca</i> | | 1.00 | 0.28 | 0.01 | 0.33 | 0.11 | 0.35 |
| <i>Mg/Ca</i> | | | 1.00 | 0.41 | 0.31 | 0.56 | 0.42 |
| <i>Ba/Ca</i> | | | | 1.00 | 0.29 | 0.15 | 0.03 |
| <i>Cd/Ca</i> | | | | | 1.00 | 0.02 | 0.19 |
| <i>Mn/Ca</i> | | | | | | 1.00 | 0.52 |
| <i>Zn/Ca</i> | | | | | | | 1.00 |

Tabella 8: Matrice di correlazione degli elementi in tracce negli otoliti di Licata
Sono significative a $p < 0.05$

3.3 Lantanidi

I valori dei rapporti REE/Ca sono riportati nella Tabella 9 insieme ai valori di concentrazione delle REEs nei carbonati biogenici che costituiscono gli scheletri dei foraminiferi (Haley et al., 2005) e nell'aragonite biogenica dei coralli (Sholkovitz and Shen, 1995). Negli otoliti di Trappeto, le concentrazioni medie lungo il gruppo dei lantanidi variano da 1,00 a 0,02 nmol/mol (da La a Lu, Tab. 9), mentre Licata presenta concentrazioni più alte delle LREEs con valori medi che variano da 1,43 a 0,01 nmol/mol (da La a Lu, Tab. 9). I contenuti di lantanidi negli otoliti di Licata e di Trappeto mostrano valori simili tranne nel caso degli elementi La, Ce, Pr che presentano valori più alti negli otoliti di Licata (Tab. 9).

Se consideriamo le concentrazioni medie delle LREEs (La, Pr, Ce, Nd), gli otoliti di *Dicentrarchus labrax* presentano valori circa 3-4 ordini di grandezza più bassi rispetto a quelli riportati per i foraminiferi planctonici e bentonici (Tab. 9) con un decremento dei valori muovendoci dal Sm fino al Lu. Di contro, le concentrazioni dei lantanidi degli otoliti studiati (Licata e Trappeto) e i valori di lantanidi riportati per i coralli risultano comparabili. Infatti, l'aragonite degli otoliti mostra valori delle LREEs simili a quelli riportati per l'aragonite dei coralli con concentrazioni di HREE poco più bassi ma con uno stesso ordine di grandezza rispetto a quelli dei coralli (Tab. 9).

Tesi di dottorato di Traina Anna

| Campione | La | Ce | Pr | Nd | Sm | Eu | Gd | Tb | Dy | Ho | Er | Tm | Yb | Lu |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Trappeto | 2,68 | 0,43 | 0,47 | 1,85 | 0,35 | 0,16 | 0,29 | 0,03 | 0,16 | 0,03 | 0,1 | 0,02 | 0,11 | 0,01 |
| | 0,77 | 0,07 | 0,15 | 0,61 | 0,12 | 0,1 | 0,15 | 0,04 | 0,11 | 0,05 | 0,08 | 0,05 | 0,08 | 0,03 |
| | 0,51 | 0,04 | 0,06 | 0,46 | 0,05 | 0,09 | 0,05 | 0 | 0,03 | 0 | 0,03 | 0,01 | 0,03 | |
| | 0,68 | 0,05 | 0,07 | 0,52 | 0,07 | 0,08 | 0,09 | 0 | 0,02 | 0 | 0,03 | 0,01 | 0,04 | |
| | 1,13 | 0,11 | 0,07 | 0,8 | 0,12 | 0,08 | 0,07 | 0 | 0,02 | 0 | 0,03 | 0,01 | 0,04 | |
| | 1,4 | 0,16 | 0,28 | 1,19 | 0,29 | 0,25 | 0,16 | 0,03 | 0,08 | 0,04 | 0,07 | 0,02 | 0,08 | 0,03 |
| | 0,83 | 0,31 | 0,14 | 0,55 | 0,1 | 0,17 | 0,12 | 0,02 | 0,06 | 0,02 | 0,06 | 0,01 | 0,07 | 0,02 |
| | 0,82 | 0,16 | 0,15 | 0,57 | 0,14 | 0,2 | 0,11 | 0,02 | 0,07 | 0,03 | 0,09 | 0,01 | 0,08 | 0,02 |
| | 1,19 | 0,13 | 0,21 | 0,63 | 0,15 | 0,15 | 0,13 | 0,03 | 0,1 | 0,03 | 0,06 | 0,01 | 0,06 | 0,02 |
| | 0,36 | 0 | 0,04 | 0,14 | 0,04 | 0,15 | 0,03 | 0,01 | 0 | 0,02 | 0,04 | 0,01 | 0,04 | 0,01 |
| | 0,6 | 0,17 | 0,13 | 0,42 | 0,09 | 0,21 | 0,11 | 0,04 | 0,1 | 0,04 | 0,08 | 0,03 | 0,08 | 0,04 |
| <i>media</i> | <i>1</i> | <i>0,15</i> | <i>0,16</i> | <i>0,7</i> | <i>0,14</i> | <i>0,15</i> | <i>0,12</i> | <i>0,02</i> | <i>0,07</i> | <i>0,02</i> | <i>0,06</i> | <i>0,02</i> | <i>0,06</i> | <i>0,02</i> |
| <i>nmol/mol</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Licata | 0,72 | 2,25 | 0,16 | 0,45 | 0,07 | 0,09 | 0,03 | 0,01 | 0,05 | 0,02 | 0,04 | | 0,02 | 0 |
| | 1,28 | 2,82 | 0,19 | 0,47 | 0,07 | 0,1 | 0,03 | 0,02 | 0,05 | 0,03 | 0,04 | 0 | 0,02 | 0,01 |
| | 2,02 | 3,69 | 0,43 | 1,61 | 0,2 | 0,14 | 0,1 | 0,02 | 0,09 | 0,03 | 0,07 | | 0,03 | 0 |
| | 1,4 | 3 | 0,33 | 1,16 | 0,18 | 0,1 | 0,09 | 0,02 | 0,06 | 0,02 | 0,05 | | 0,02 | |
| | 0,42 | 0,95 | 0,09 | 0,25 | 0,06 | 0,08 | 0 | 0,01 | 0,05 | 0,02 | 0,03 | | 0,02 | |
| | 0,28 | 1,23 | 0,07 | 0,18 | 0,05 | 0,03 | 0,01 | 0 | 0,05 | 0,01 | 0,02 | | 0 | |
| | 0,58 | 1,08 | 0,2 | 0,19 | 0,05 | 0,23 | 0 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,04 | 0,03 | |
| | 1,34 | 1,69 | 0,1 | 0,23 | 0,04 | 0,07 | 0 | 0,01 | 0,05 | 0,01 | 0,03 | | 0 | |
| | 0,75 | 2,64 | 0,3 | 0,49 | 0,08 | 0,08 | 0,01 | 0,01 | 0,04 | 0,02 | 0,04 | | 0,02 | |
| | 0,98 | 2,67 | 0,21 | 0,6 | 0,12 | 0,11 | 0,07 | 0,01 | 0,08 | 0,03 | 0,05 | | 0,03 | |
| | 1,58 | 2,99 | 0,3 | 0,87 | 0,1 | 0,09 | 0,06 | 0,02 | 0,08 | 0,02 | 0,05 | | 0,03 | |
| | 0,52 | 0,89 | 0,12 | 0,26 | 0,06 | 0,07 | 0,02 | 0 | 0,03 | 0,01 | 0,03 | | 0,01 | |
| | 1,28 | 2,25 | 0,24 | 0,71 | 0,11 | 0,39 | 0,1 | 0,02 | 0,08 | 0,02 | 0,07 | | 0,03 | |
| | 1,85 | 5,58 | 0,37 | 0,91 | 0,16 | 0,11 | 0,07 | 0,03 | 0,11 | 0,05 | 0,08 | | 0,05 | |
| | 3,32 | 4,59 | 0,62 | 1,97 | 0,23 | 0,11 | 0,11 | 0,04 | 0,15 | 0,05 | 0,11 | | 0,04 | 0 |
| | 4,32 | 10,3 | 0,71 | 2,09 | 0,38 | 0,18 | 0,25 | 0,07 | 0,25 | 0,09 | 0,15 | 0,01 | 0,13 | 0,02 |
| | 1,17 | 9,15 | 0,27 | 0,72 | 0,1 | 0,11 | 0,04 | 0,02 | 0,09 | 0,03 | 0,05 | | 0,02 | |
| | 1,91 | 4,14 | 0,38 | 0,97 | 0,27 | 0,15 | 0,06 | 0,03 | 0,12 | 0,05 | 0,1 | | 0,07 | 0,02 |
| <i>media</i> | <i>1,43</i> | <i>3,44</i> | <i>0,28</i> | <i>0,78</i> | <i>0,13</i> | <i>0,12</i> | <i>0,06</i> | <i>0,02</i> | <i>0,08</i> | <i>0,03</i> | <i>0,06</i> | <i>0,02</i> | <i>0,03</i> | <i>0,01</i> |
| <i>mmol/mol</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Foraminif. p. ¹ | 0,86 | 0,34 | 0,16 | 0,65 | 0,12 | 0,04 | 0,17 | 0,03 | 0,21 | 0,04 | 0,14 | 0,04 | 0,12 | 0,02 |
| Foraminif. b. ¹ | 0,99 | 0,74 | 0,19 | 0,69 | 0,17 | 0,05 | 0,2 | 0,02 | 0,28 | 0,05 | 0,2 | 0,06 | 0,16 | 0,02 |
| <i>pmol/g</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Corallo ² | 7,17 | 17,8 | | 13,8 | 3,89 | | 6,42 | | 5,18 | | 4,41 | | 2,52 | 0,34 |
| Corallo ² | 12,1 | 24,2 | | 20,5 | 7,41 | | 9,84 | | 5,45 | | 6,19 | | 2,76 | 0,38 |
| Otolite Tr* | 9,49 | 1,41 | 1,52 | 6,7 | 1,31 | 1,42 | 1,13 | 0,26 | 0,66 | 0,3 | 0,58 | 0,17 | 0,6 | 0,22 |
| Otolite Li* | 12,4 | 30,2 | 2,47 | 6,86 | 1,12 | 1,09 | 0,58 | 0,18 | 0,7 | 0,26 | 0,5 | 0,16 | 0,28 | 0,08 |

Tabella 9: Concentrazioni dei lantanidi negli otoliti di Trappeto e Licata; tutte le concentrazioni dei lantanidi sono rapportati al Ca dell'otolite (REE/Ca). 1: valori di concentrazione in foraminiferi planctonici e bentonici (dati da Haley *et al.*, 2005) 2: valori di concentrazione nei coralli (dati da Sholkovitz., 1995)

4. INTERPRETAZIONE E DISCUSSIONE

Gli studi di elementi in tracce nei carbonati biogenici (foraminiferi, coralli etc..) hanno dato ampie informazioni sulle proprietà chimico-fisiche di ambienti acquatici moderni e antichi (Boyle, 1981; Shen and Boyle, 1987, 1988)

Recentemente è stato proposto il possibile utilizzo della microchimica degli otoliti come utile proxy per la ricostruzione di composizione chimica dei sistemi marini (Thorrold *et al.*, 1997b, 1998,b).

Qualsiasi relazione tra composizione chimica dell' acqua di mare e otolite sarà determinata dalle cinetiche di trasporto di ioni dall'acqua alla superficie di precipitazione (otolite), ma sarà anche funzione del meccanismo con cui gli elementi in tracce sono incorporati nell'aragonite dell'otolite.

La maggior parte degli studi sul chimismo degli otoliti si basa sul presupposto che l'acqua in cui gli esemplari vivono sia il principale fattore in grado di influenzare la composizione chimica degli stessi otoliti (Radtke, 1989; Hoff and Fuiman, 1995; Campana *et al.*, 2000; Gillander and Kingsford, 2000; Rooker *et al.*, 2003; Ranaldi and Gagnon, 2008b; Saquet *et al.*, 2002; Yamashita *et. al.*, 2000). Questa ipotesi ed il fatto che gli otoliti siano carbonati biogenici in grado di "registrare" le caratteristiche chimiche dell'acqua di mare in cui vivono (Ranaldi and Gagnon, 2008; Elsdon and Gillanders, 2003) stanno alla base del significato e quindi dell'interpretazione data ai risultati ottenuti dagli otoliti di *Dicentrarchus labrax* provenienti dai due allevamenti siciliani di Licata e Trappeto.

Considerando che gli individui di ciascun allevamento sono cresciuti all'interno di sistemi differenti (Fig.6), ci si aspetta che la variazione del chimismo degli otoliti possa riflettere le variazioni esistenti tra le diverse masse d'acqua in cui insistono gli

allevamenti. Inoltre, le attività di maricoltura che comportano l'immissione nelle acque di cibo (mangimi), che viene consumato in parte, l'accumulo di feci e altri prodotti di escrezione nel sedimento, possono influenzare in maniera rilevante le condizioni dell'ambiente (Ackefors and Enell, 1990; Seymour and Bergheim, 1991) e quindi determinare una variazione del chimismo dell'otolite. Infatti, da uno studio comparativo effettuato sui tessuti di esemplari di *Dicentrarchus labrax* di allevamento e selvatici, è emerso che il contenuto totale di lipidi, acidi grassi ed elementi in tracce risulta differente con percentuali maggiori negli esemplari allevati (Alasalvar *et al.*, 2002). Gli autori suggeriscono che questa differenza sia con buona probabilità dovuta ai costituenti della dieta somministrata al *Dicentrarchus labrax* di allevamento (Alasalvar *et al.*, 2002). In maniera simile ci si aspetta che i mangimi somministrati alle specie allevate possano influenzare la composizione chimica dell'otolite.

Dall'elaborazione statistica effettuata su tutto il dataset si osserva che la composizione chimica degli otoliti delle due aree di allevamento differisce in maniera significativa per quasi tutti gli elementi analizzati tranne per lo Sr che mostra lo stesso range di valori di concentrazione in entrambe le aree. In particolare, gli elementi Mg, Fe, Ba, Cd e Mn assumono valori maggiori a Licata, mentre lo Zn è l'unico elemento che si ritrova in concentrazione maggiore a Trappeto.

4.1 Elementi in tracce negli otoliti

Lo Stronzio

Lo Sr per il suo stato di ossidazione (Sr^{2+}) e per la dimensione del suo raggio ionico (circa 1.12 Å per lo Sr e circa 1 Å per il Ca) risulta essere un buon vicariante del Ca^{2+} nel reticolo cristallino ortorombico dell'aragonite in accordo con le regole di vicarianza di Pauling (Mason *et al.*, 1982; Speer, 1983).

Nello studio della chimica dell'otolite, lo Sr è uno degli elementi in tracce maggiormente investigati per diverse ragioni. La sua concentrazione in acqua è relativamente stabile ma varia tra i diversi habitat acquatici, infatti, molti studi riportano che le concentrazioni di tale elemento variano tra acqua dolce e acqua di mare registrando valori fino a 8 volte più elevati nell'acqua di mare. Dai dati di letteratura risulta che la concentrazione di Sr nelle acque oceaniche ha un valore di circa 7.9 mg/l (White, 1997), mentre nel Mar Mediterraneo può assumere un valore più alto compreso tra 7 ed 8 mg/L (Bernat *et al.*, 1972). Il contenuto di Sr all'interno degli otoliti sarà quindi maggiore in individui di ambienti marini rispetto a quelli fluviali (Kalish, 1990; Campana, 1999; Secor *et al.*, 2000; Arai, 2002; Bath *et al.*, 2000; Zimmerman, 2005). Infatti, il rapporto **Sr/Ca**, e quindi la relazione esistente tra concentrazione di Sr nei differenti anelli di crescita dell'otolite e la salinità dell'acqua di mare, è il marker più comunemente utilizzato per descrivere la “*life history*” di diverse specie di pesce anadromi e catadromi (Kalish, 1990, Arai *et al.*, 2006, Yamashita *et al.*, 2000; Milton *et al.*, 2008; Limburg *et al.*, 2001). Gli studi finora effettuati su otoliti di diverse specie di pesce non sono però riusciti a stabilire una chiara correlazione tra salinità e contenuto di Sr all'interno degli otoliti se non per alcune specie suggerendo quindi la possibilità che la relazione tra **Sr/Ca** e

salinità sia specie-specifico (Secor *et al.*, 1995; Secor *et al.*, 1998; Tzeng, 1996; Secor and Rooker, 2000; Chang *et al.*, 2004; Zimmerman, 2005).

Oltre la salinità, sembra anche che la temperatura (T) sia un fattore in grado di influenzare il contenuto di Sr all'interno dell'otolite anche se i dati di letteratura sono spesso contraddittori. Alcuni autori infatti riportano una correlazione negativa tra temperatura e Sr nell'otolite (Martin *et al.*, 2004; Elsdon *et al.*, 2002; Radtke *et al.*, 1990, Townsend *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1996) mentre altri suggeriscono una relazione positiva tra le due grandezze (Kalish, 1989, Arai *et al.*, 1995), altri ancora non riscontrano alcuna relazione tra temperatura dell'acqua e contenuto di Sr nell'otolite (Gallahar and Kingsford, 1996).

In realtà, nonostante sia nota la relazione esistente tra il contenuto di Sr nei carbonati inorganici e la concentrazione di Sr nell'acqua di mare da cui precipitano (Lorens, 1981; Rimstidt *et al.*, 1998), questa relazione nei carbonati biogenici è complicata da effetti cinetici e fisiologici capaci di influenzarne l'incorporazione (Hart and Cohen, 1996). Diversi autori hanno individuato nella fisiologia il fattore che influenza maggiormente la composizione chimica dell'otolite (Bath *et al.*, 2000; Elsdon and Gillanders 2002; Martin *et al.*, 2004). Kalish (1991) ha suggerito che le diverse concentrazioni di proteine che legano elementi in tracce nel sangue possono influenzare la disponibilità di cationi disciolti nell'endolinfa, incluso lo Sr.

Nel caso degli otoliti studiati, i valori di **Sr/Ca** fra le due aree di campionamento Trappeto e Licata non presentano differenze significative e i valori sono coerenti con quanto riportato in letteratura relativamente alla specie *Dicentrarchus labrax* del Mare del Nord (1000-2200 $\mu\text{moli/mole}$; Leakey *et al.*, 2009; Tab. 10.). Considerando che i due allevamenti presentano caratteristiche geografiche differenti, come

precedentemente descritto, i valori di **Sr/Ca** anche nel nostro caso non sembrano essere influenzati dalle suddette variabili ambientali.

Inoltre, il fatto che le concentrazioni di Sr misurate rientrino nel intervallo di valori riportati per otoliti *Dicentrarchus labrax* provenienti dal Mare del Nord (Leakey *et al.*, 2009; Tab. 10), con temperature e salinità dell'acqua differenti dalle acque dei siti di campionamento studiati, avvalorata l'ipotesi suggerita che nel caso della specie *Dicentrarchus labrax* la distribuzione di Sr negli otoliti possa essere indipendente dalle variabili ambientali temperatura e salinità.

I rapporti **Ba/Ca**, **Mg/Ca**, **Fe/Ca**, **Mn/Ca** e **Cd/Ca** mostrano valori significativamente maggiori negli otoliti di *Dicentrarchus labrax* proveniente dall'allevamento di Licata rispetto a quelli di Trappeto. L'unico rapporto che risulta essere significativamente maggiore ($p < 0.05$) a Trappeto è **Zn/Ca**.

Il Bario

Nello studio della geochimica delle masse d'acqua il Ba viene utilizzato come tracciante di processi di upwelling data la sua correlazione con i nutrienti (Broecker and Peng, 1982). Le acque continentali, inoltre, sono arricchite in Ba e questa caratteristica permette di utilizzare le concentrazioni di Ba nell'acqua di mare come misura degli apporti fluviali all'interno di un bacino (Shen *et al.*, 1992). Nel bacino del Mediterraneo infatti, le concentrazioni di Ba mostrano valori più elevati rispetto a quelle Atlantiche (Lea *et al.*, 1990) riflettendo gli effetti degli apporti fluviali, che contengono elevate concentrazioni di Ba, e una dinamica interna sostanzialmente limitata. Recenti studi hanno sottolineato il potenziale utilizzo del rapporto Ba/Ca dell'otolite come tracciante ambientale basandosi sull'evidenza che la distribuzione del Ba all'interno degli otoliti risulta direttamente proporzionale alla quantità presente in acqua e non sarebbe influenzato dalla temperatura (Bath *et al.*, 2000; Milton and Chenery, 2001; Elsdon and Gillanders, 2004; de Vries *et al.*, 2005).

Tenendo in considerazione quanto detto sopra i valori di Ba/Ca maggiori negli otoliti di Licata potrebbero essere spiegati con un input di acque continentali in prossimità dell'allevamento e soprattutto dai fenomeni a mesoscala che caratterizzano l'area del Canale di Sicilia prospiciente Licata. Esiste infatti una costante linea di upwelling costiero (Grancini and Michelato, 1997) che apporta durante tutto l'anno in superficie l'acqua del fondo ricca di nutrienti e con una

temperatura media di 11°C. Il fronte salino tipico dell'area di Capo Passero determinato dal vortice ciclonico in quest'area è un altro elemento tra quelli a mesoscala che caratterizzano questo bacino caratterizzandolo come una zona ad alta concentrazione di nutrienti.

Tutto ciò può giustificare la correlazione del rapporto **Ba/Ca** con il Fattore 1 (Tab. 6);

Il Magnesio

Il Mg è uno dei comuni componenti dell'acqua di mare, la cui concentrazione di circa 1300 ppm risulta di 2 ordini superiore rispetto a quella delle acque continentali. L'abbondanza di questo elemento in ambiente marino è pressoché costante poiché ha un tempo di residenza abbastanza lungo di circa 10.000.000 anni (Spaargeren, 1991). Il Mg è un elemento fondamentale perché responsabile di molti processi metabolici essenziali (es. sintesi di proteine, acidi nucleici, trasmissione impulsi muscolari etc.), ha una concentrazione media di 5-10 mM in tutti i fluidi intracellulari ed in particolare è presente nei mitocondri in quanto partecipa al meccanismo di riduzione dell'ATP in ADP.

Alcuni autori suggeriscono l'esistenza di una relazione lineare tra la salinità dell'acqua di mare e la concentrazione di Mg negli otoliti, indicando che il Mg avrebbe un comportamento simile a quello che si riscontra nella calcite inorganica dove l'uptake del Mg all'interno del reticolo cristallino del minerale carbonatico non è regolato da effetti biologici (Wansardn *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 2003; Arai *et al.*, 2006 controllare). Altri autori ipotizzano che l'incorporazione del Mg negli otoliti subisca un controllo di tipo biologico (Martin *et al.*, 2005; Sarimin *et al.*, 2009).

I rapporti **Mg/Ca** degli otoliti studiati presentano valori decisamente più alti rispetto a quelli riportati per la specie *Dicentrarchus labrax* del Mare del Nord (Leakey *et al.*, 2009) con valori del rapporto più elevati negli otoliti di Licata (Tab. 10). Tenendo in considerazione che la concentrazione di Mg è maggiore nel mangime di Licata (Tab. 5) è probabile che l'intervallo di valori del rapporto **Mg/Ca**, maggiore negli otoliti di Licata, sia giustificato dalla concentrazione più elevata di Mg introdotto con la dieta.

Dall'analisi chimica dei mangimi risulta infatti che sia a Licata che a Trappeto, il Mg ha una concentrazione predominante rispetto agli altri elementi analizzati (Tab. 5).

La correlazione tra **Mg/Ca** ed il Fattore 1 (Tab. 6), interpretato come la variabilità ambientale influenzata dall'attività umana, è giustificata dalle variazioni dei livelli di Mg nelle acque di allevamento sia dovuta alla sorgente esterna rappresentato dal mangime che da un arricchimento nelle acque dovute all'apporto fluviale del Fiume Salso che, come descritto in precedenza, ha un bacino idrografico molto ampio, e nel suo tragitto attraversa anche la formazione rocciosa "Serie Gessoso-Solfifera" dell'epoca geologica Messiniano notoriamente ricca in Sali di magnesio.

Possiamo ipotizzare dunque che a causa delle condizioni di cattività degli esemplari da noi studiati, in cui l'apporto nutrizionale è elevato e costante a differenza di quello selvatico, il metabolismo del Mg sia elevato e comporti quindi un maggiore accumulo di tale elemento all'interno dell'otolite.

Il Ferro

Il Fe insieme a Mn e Zn sono elementi “essenziali” per la fisiologia dei teleostei, essendo un componente integrale di proteine coinvolte nella respirazione cellulare e nel trasporto dell’ossigeno (Bury and Grossell, 2003).

Il valore maggiore dei rapporti **Fe/Ca** e **Mn/Ca** registrato negli otoliti di spigola provenienti da Licata potrebbe essere attribuito ad una maggiore concentrazione degli stessi nel mangime distribuito nell’allevamento. Effettivamente come mostrato dall’analisi chimica del mangime Fe, Mn e Zn risultano essere presenti in concentrazioni maggiore nel mangime di Licata rispetto a quello di Trappeto (Tab. 5). Un recente lavoro su *Dicentrarchus labrax* pubblicato da Alasalvar *et al.* (2002) ha messo in evidenza il differente contenuto di Zn e Fe all’interno di esemplari allevati e selvatici; in particolare gli esemplari di allevamento presentavano una differenza significativa del contenuto di Fe nella carne rispetto a quelli selvatici. Anche in questo caso la maggiore concentrazione è stata attribuita al tipo di mangime utilizzato. È ipotizzabile quindi che il Fe venga incorporato all’interno dell’otolite in maniera proporzionale alla sua concentrazione nel mangime.

Il Manganese

Come per il Fe e il Mg, la concentrazione di Mn all’interno del carbonato degli otoliti risulta essere influenzato dalla quantità in acqua di mare, sebbene alcuni studi abbiano riscontrato una minore evidenza di tale relazione ed altri dimostrato la capacità di incorporazione a livello degli otoliti anche attraverso un trasferimento trofico, quindi tramite le componenti vegetali, prede e detrito (Pantreath, 1976,

Sanchez-Jerez *et al.*, 2002). Infatti, sebbene molti animali accumulino metalli in maniera più efficiente dall'acqua che dal cibo, per alcune specie, è verosimile che vi sia un apporto maggiore attraverso gli alimenti per via della loro alta concentrazione (Ward, 1989; Ni *et al.*, 2000). Difatti anche il Mn è un elemento presente nei mangimi per pesci di allevamento con tenore massimo di concentrazione pari 100 mg/Kg di alimento completo. I valori registrati di **Mn/Ca** all'interno degli otoliti, si avvicinano ai valori medi riportati da Leakey *et al.*, (2009) (Tab. 10) ma sono maggiori nelle spigole di Licata rafforzano l'ipotesi che le condizioni trofiche accoppiate a quelle idrologiche dell'allevamento influenzino la diversa quantità di Mn negli otoliti.

Lo Zinco

Anche per lo Zn è possibile osservare una relazione positiva tra la concentrazione negli otoliti e quella in acqua di mare (Gao *et al.*, 2010) soprattutto all'interno della fase proteica degli otoliti (Miller *et al.*, 2006) ed un ulteriore input è sicuramente costituito dalle attività antropiche (Sanchez-Jerez *et al.*, 2002).

In effetti il contenuto di Zn nelle acque dell'allevamento di Trappeto risulta superiore rispetto a quello delle acque di Licata (Tab. 4) come i valori di **Zn/Ca** all'interno degli otoliti di *Dicentrarchus labrax* provenienti dallo stesso allevamento (Tab. 3). Come descritto precedentemente a pochi chilometri dalla città di Trappeto è presente una attiva distilleria che scarica nelle acque del fiume Nocella i propri reflui che, come riportato in letteratura, contengono metalli pesanti quali Cd, Cr, Ni e Zn (Pandey *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2006).

Inoltre dalla matrice di correlazione (Tab. 7) degli elementi in tracce a Trappeto, si osserva che lo Zn è l'unico elemento che non risulta essere correlato con altri elementi essenziali che vengono introdotti con la dieta suggerendo quindi l'ipotesi che sia legato ad altre fonti.

Poiché si sono riscontrate differenze significative per ciascun elemento non è da escludere che i parametri chimico-fisici contribuiscano alla biodisponibilità degli elementi in tracce disciolti (Phillips and Rainbow, 1994) e quindi costituiscano un fattore importante nelle differenze osservate. Inoltre bisogna considerare anche le possibili variazioni a livello del metabolismo che possono verificarsi in un individuo sottoposto a stress; le proteine capaci di legare i metalli indotte dall'esposizione di metalli pesanti possono aumentare la tolleranza del pesce agli stessi e cambiare il normale metabolismo di nutrienti come lo Zn (Hodson, 1988).

Il Cadmio

Il Cd invece è un elemento “non essenziale” che se assunto in quantità eccessive può risultare tossico per l'organismo.

La presenza del Cd in ambiente marino può dipendere dalla grande variabilità ecologica e da fattori geologici e quindi dal tipo di roccia, suolo o vegetazione. L'analisi dei mangimi di entrambi gli allevamenti mostra un contenuto di Cd con valori simili e sicuramente inferiore rispetto agli altri elementi (Tab. 5). Il maggiore rapporto **Cd/Ca** registrato negli otoliti di Licata potrebbe in questo caso essere attribuito non alla componente mangime ma ad un input di tipo antropico (Sanchez-Jerez *et al.*, 2002). Il Cd è un elemento utilizzato per la composizione di vernici ed il fatto che le vasche sia confinate proprio all'interno del porto in cui vi è un passaggio

e la sosta di imbarcazioni e potrebbe in qualche modo alterare la concentrazione di questo elemento nelle acque circostanti e di conseguenza essere introdotto nell'organismo dei pesci giustificando così i valori più alti a Licata.

| | <i>Licata</i> | <i>Trappeto</i> | <i>Leakey et al., 2009</i> |
|--------------|---------------|-----------------|----------------------------|
| <i>Sr/Ca</i> | 1406 - 2614 | 1526 - 2462 | - |
| <i>Ba/Ca</i> | 0.97 - 3.19 | 0.80 - 1.36 | 1.5 - 2.2 |
| <i>Mg/Ca</i> | 36 - 922 | 33 - 859 | 0.10 - 0.13 |
| <i>Fe/Ca</i> | 0.49 - 31.63 | 0.26 - 10.04 | - |
| <i>Mn/Ca</i> | 1.40 - 8.78 | 1.24 - 6.99 | 6 - 9.5 |
| <i>Cd/Ca</i> | 0.02 - 0.08 | 0.01 - 0.06 | - |
| <i>Zn/Ca</i> | 0.98 - 3.98 | 2.35 - 8.69 | 2 - 8 |

Tabella 10: Intervalli dei valori delle concentrazioni di elementi in tracce relativi ai campioni di Licata, Trappeto e confronto con i valori riportati da Leakey *et al.*, (2009) relativi a *Dicentrarchus Labrax* del Mare del Nord.

4.2 Pattern di distribuzione dei lantanidi negli otoliti

Al fine di comprendere i pattern di distribuzione dei lantanidi all'interno degli otoliti studiati, i valori di REE/Ca sono stati normalizzati al post-Archaean Australian Shales (PAAS of McLennan, 1989) che rappresenta l'abbondanza naturale dei lantanidi nella crosta continentale (Fig. 19). Le anomalie di Ce sono state calcolate secondo il metodo Bau and Dulski (1996), in cui i valori dei rapporti normalizzati di $Ce/Ce^* = 2Ce/(Pr+La)$ sono plottati contro i valori dei rapporti normalizzati di $Pr/Pr^* = 2Pr/(Ce+Nd)$. Le anomalie negative di Ce staranno nel campo delimitato da valori $Ce/Ce^* < 1$ e $Pr/Pr^* > 1$, mentre nel campo delimitato $Ce/Ce^* > 1$ e $Pr/Pr^* < 1$ avremo anomalie positive di Ce (Fig. 20). Le anomalie di Eu sono state calcolate secondo la formula $Eu/Eu^* = 2Eu/(Sm+Gd)$; il rapporto $La/Yb > 1$ indicherà un arricchimento di LREEs su HREEs mentre $La/Yb < 1$ indicherà un impoverimento di LREEs rispetto a HREEs (Fig. 21).

I pattern dei lantanidi negli otoliti di Trappeto mostrano un andamento simile al pattern di distribuzione dei lantanidi caratteristico dell'acqua di mare (Fig.19). In particolare, si osserva un'anomalia negativa di Ce ed un trend di arricchimento delle LREEs rispetto a HREEs.

I pattern di distribuzione negli otoliti di Licata sono caratterizzati da un trend delle LREEs (La, Ce, Pr, Nd) quasi piatto dove in alcuni casi è evidente un'anomalia positiva del Ce. Il diagramma di Fig. 20 mostra come il gruppo degli otoliti di Trappeto ricade ampiamente nel campo di anomalia negativa di Ce ed anomalia positiva di La, avvicinandosi al range di valori calcolati per l'acqua di mare. Inoltre, tutti i rapporti La/Yb (esclusi due) calcolati per gli otoliti di Trappeto presentano valori < 1 (Fig. 21) confermando il trend di arricchimento dei LREEs su HREEs.

Alcuni otoliti di Licata si trovano nel campo di anomalia positiva di Ce mentre altri mostrano valori dei rapporti Ce/Ce* e Pr/Pr* vicino 1 indicando assenza di anomalie (che si traduce in un andamento piatto lungo la linea La-Ce-Pr-Nd nei pattern). Questo comportamento dei lantanidi suggerisce condizioni di acqua poco ossigenata (anomalie positive di Ce) in un sistema che riceve notevoli apporti di particolato terrigeno-colloidale (particolato organico) generalmente arricchito ricco in LREEs. L'input terrigeno esterno associato anche, probabilmente, al particolato organico (ricco in lantanidi leggeri) che si produce all'interno dell'allevamento di Licata arricchisce le acque di LREEs ($La/Yb > 1$) riflettendosi sulla chimica dell'otolite.

I pattern di distribuzione dei lantanidi negli otoliti di Trappeto suggeriscono che la struttura cristallina dell'aragonite incorpora i lantanidi senza importanti processi di frazionamento, e che il contenuto dei lantanidi nell'otolite dipende dalla concentrazione degli stessi nell'acqua di mare. Inoltre, gli otoliti di Trappeto indicano una condizione di acqua di mare normale ossigenato (anomalia negativa Ce) rispetto agli otoliti di Licata che riflettono un sistema con acque poco ossigenate (anomalie positive di Ce) dove i notevoli input terrigeni esterni probabilmente creano una condizione di torbidità delle acque.

Per quanto detto, i pattern di distribuzione confermano le differenze ambientali tra l'allevamento di Trappeto e quello di Licata e supportano la possibilità di utilizzare l'otolite come proxy negli studi della geochimica marina dei lantanidi.

Un caratteristica comune di tutti i pattern degli otoliti studiati (sia Trappeto che Licata) è un' evidente anomalia positiva di Eu (Fig. 19) con valori di Eu/Eu* compresi in un range tra 2 e 10 (esclusi tre valori) dove ricadono entrambi i gruppi di otoliti di Licata e Trappeto (Fig. 21). Questa peculiarità suggerisce che il comportamento dell'Eu all'interno dell'otolite non dipende dalle diverse condizioni

ambientali in cui si trovano gli allevamenti ma deve esistere un processo intrinseco durante la formazione dell'aragonite dell'otolite che assorbe preferenzialmente Eu rispetto a tutti gli altri lantanidi. Probabilmente i processi di vicarianza all'interno della struttura cristallina dell'aragonite la cui precipitazione è controllata da molecole organiche (frazione proteica) può spiegare il frazionamento dell'Eu. Alcuni studi di carattere sperimentale associati ad osservazioni naturali (Parekh *et al.*, 1977; Lakshtanov and Stipp, 2004) hanno evidenziato che la calcite mostra un alta affinità per Eu^{3+} . Questi studi suggeriscono che dato il raggio ionico del catione Eu^{3+} (0.95 Å) non è molto differente dal Ca^{2+} (1.00 Å) se la carica discrepante può essere compensata, Eu^{3+} può sostituire il Ca^{2+} ed essere incorporato nella calcite con un minimo di distorsione della struttura cristallina. La sostituzione del Ca^{2+} da parte dell' Eu^{3+} potrebbe spiegare la forte anomalia positiva di Eu in tutti gli otoliti studiati.

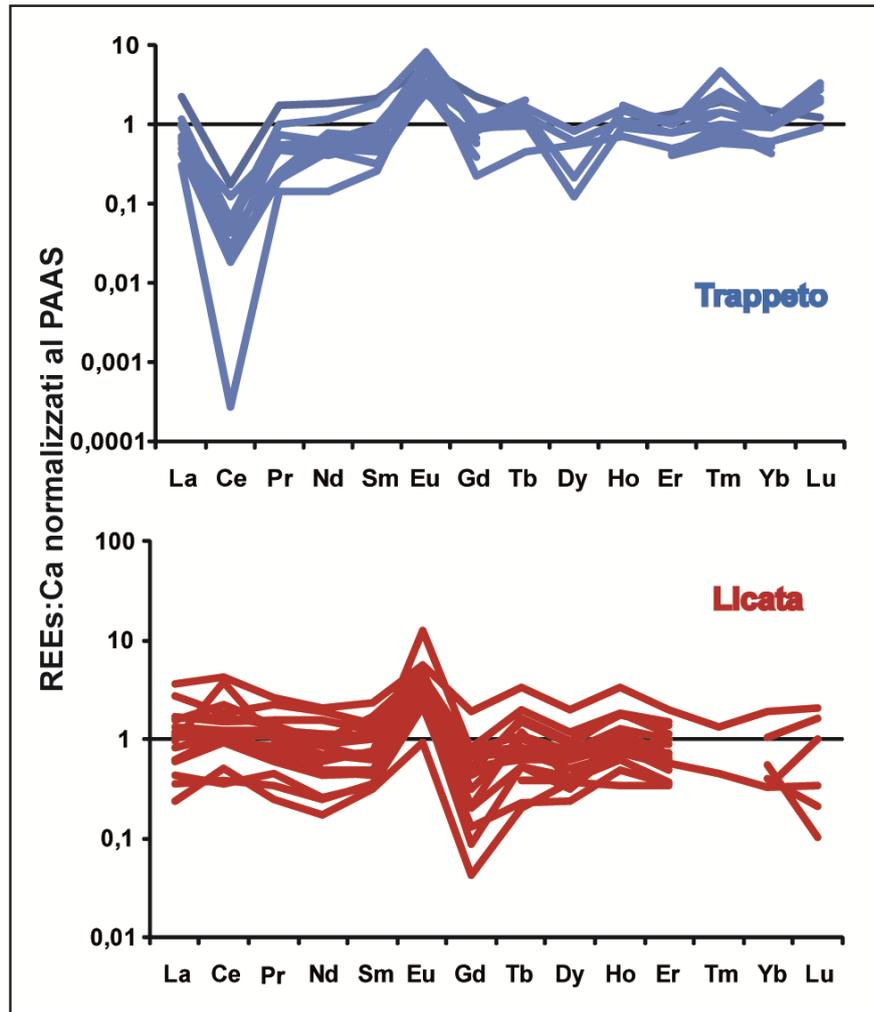


Figura 19: Pattern di distribuzione dei lantanidi negli otoliti di Trappeto e di Licata. Tutti le concentrazioni dei lantanidi rapportati al Ca ($nmol/mol$) sono normalizzate ai valori del PAAS (McLennan, 1989); le concentrazioni REE/Ca normalizzate sono rappresentate su scala logaritmica

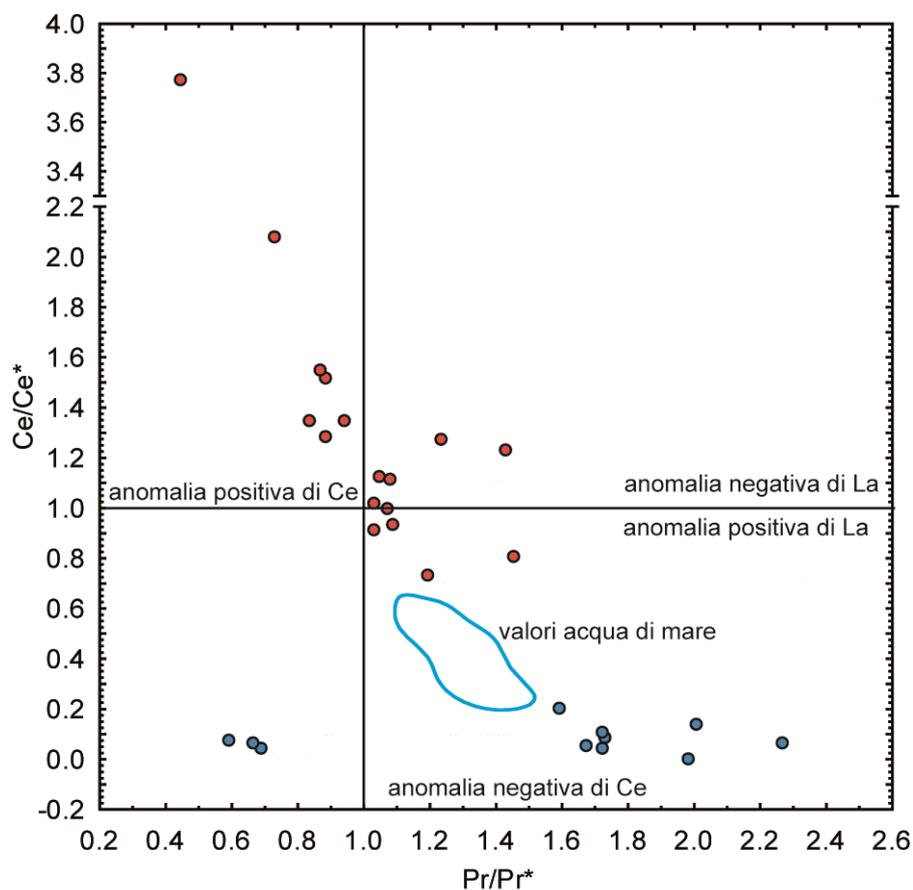


Figura 20: Il grafico mostra i valori dei rapporti Ce/Ce* contro quelli di Pr/Pr* negli otoliti di Licata e Trappeto. Nel campo delimitato da valori Ce/Ce* < 1 e Pr/Pr* > 1 avremo anomalie negative di Ce e anomalie positive di La, mentre nel campo delimitato Ce/Ce* > 1 e Pr/Pr* < 1 avremo anomalie positive di Ce. Cerchi azzurri = Trappeto, cerchi rossi = Licata.

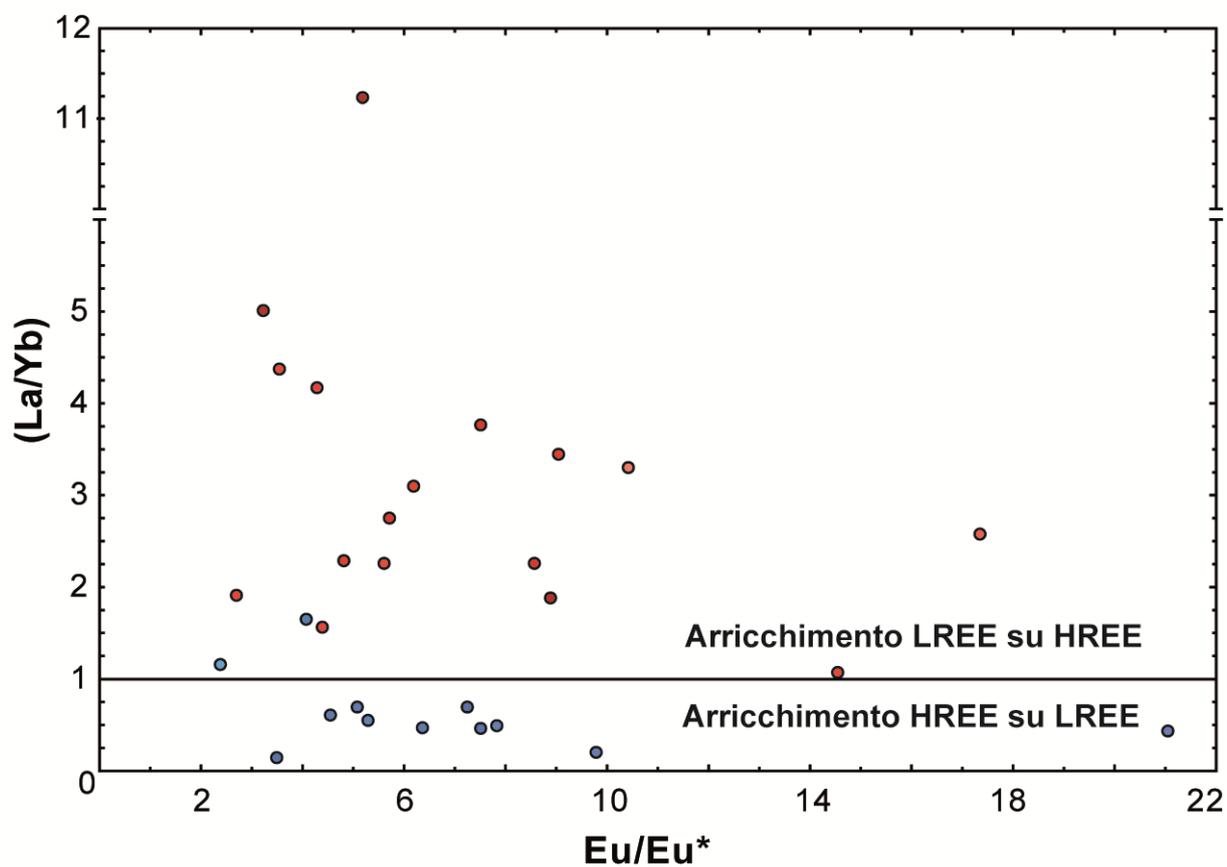


Figura 21: Il grafico mostra i valori dei rapporti La/Yb contro quelli di Eu/Eu* (anomalia di Eu) negli otoliti di Licata e Trappeto. I punti con valori di La/Yb < 1 (quasi tutti quelli di Trappeto) sono caratterizzati da un arricchimento delle HREE su LREE tipico dei valori rappresentativi dell'acqua di mare. Nota che tutti gli otoliti studiati hanno valori di Eu/Eu* > 1 indicativi di anomalia positiva di Eu. Cerchi azzurri = Trappeto, cerchi rossi = Licata.

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dall'analisi di elementi in tracce all'interno degli otoliti di *Dicentrarchus labrax* provenienti da due allevamenti con caratteristiche differenti sia in termini di condizioni idrografiche sia in termini di cura degli animali hanno fornito diverse informazioni di seguito elencate:

- Per ciò che riguarda elementi come Fe, Mg, Mn e Cd, si può ipotizzare che il fenomeno di uptake negli otoliti sia dovuto sia alla elevata concentrazione degli stessi nell'acqua di mare o nei mangimi usati che ad una variazione di tipo endogeno dovuta all'eccessivo tasso metabolico nei pesci allevati. Tutti gli elementi studiati tranne lo Sr sono influenzati dai parametri chimico-fisici che regolano le masse d'acqua all'interno dell'allevamento: composizione dei mangimi, condizioni di ossigenazione del fondo, accumulo di sostanza organica nel sedimento, tasso di degradazione della sostanza organica, caratteristiche oceanografiche a mesoscala dei bacini su cui gli allevamenti insistono, etc...
- L'incorporazione di Sr all'interno dell'otolite, più che essere associata alla concentrazione dello stesso in acqua di mare è legata alla preferenziale incorporazione nei siti del Ca e quindi alla struttura dell'aragonite.
- Relativamente allo Zn, l'unico metallo che presenta rapporti in concentrazioni maggiori a Trappeto rispetto a Licata, possiamo ipotizzare che la fonte di tale input sia dovuta agli insediamenti industriali che insistono nel Golfo di Castellammare.

- Il “seawater-like pattern” degli otoliti di Trappeto ha evidenziato l'importanza dell'otolite come proxy della composizione dell'acqua di mare e nello stesso tempo le anomalie di Ce hanno dato indicazioni sulle condizioni di ossigenazione dei due allevamenti.
- Lo studio della chimica dell'otolite ha consentito di distinguere gli esemplari provenienti dai due allevamenti (Licata e Trappeto) suggerendo che la distribuzione degli elementi in tracce nei carbonati biogenici, possa costituire un valido tracciante ambientale. Infatti a Licata gli animali si trovano in un bacino piuttosto chiuso, con caratteristiche idrografiche stabili ed un fondale mobile di circa 6-7 m, dove anche la risospensione del mangime non consumato contribuisce all'arricchimento in metalli rispetto a Trappeto dove le condizioni idrografiche sono determinate da una corrente costiera che a volte raggiunge intensità notevoli.

Generalmente negli studi di discriminazione degli stock sono stati osservati campioni provenienti da aree estremamente distanti o capaci di effettuare grandi migrazioni. Questo studio fornisce un importante contributo per lo studio del chimismo dell'otolite in quanto si sono riscontrate differenze significative su individui che, sebbene siano stati allevati nello stesso mare (Mediterraneo), sono stati esposti a condizioni oceanografiche e chimico-fisiche differenti.

Riteniamo comunque che le ipotesi di questo studio necessitino di ulteriori approfondimenti mirati a verificare la possibile relazione tra le variabili dell'acqua

(salinità, temperatura e chimismo dell'ambiente), la composizione mangimistica e la composizione chimica dell'otolite. Tali studi, inoltre, potrebbero essere supportati e validati conducendo le indagini in ambienti controllati. Ciò consentirebbe di poter monitorare costantemente ed eventualmente modificare artificialmente i parametri chimico-fisici delle acque e verificarne l'impatto sulla composizione chimica del carbonato dell'otolite.

In futuro tali strumenti d'indagine potrebbero rappresentare una discriminante per il monitoraggio delle condizioni ambientali d'allevamento.

RINGRAZIAMENTI

Mario Sprovieri, Elvira Oliveri, Daniela Salvagio, Marco Barra, Stella Tamburino, Marianna Del Core, Davide Vallese, tutte le ragazze ed i ragazzi dell'“Open Space” Walter Basilone, Dino Patti, Papà Giacomo e Mamma Magy, Alessandra e Carla, le mie Babes e i miei Vicins.

BIBLIOGRAFIA

- Ackefors, H. & Enell, M. (1990). Discharge of nutrients from Swedish fish farming to adjacent sea areas. *Ambio.*, 19, 28 – 35.
- Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Zubcov, E., Shahidi, F. and Alexis, M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.*, 79; 145-150.
- Arai, N., Sakamoto, W., and Maeda K. (1995). Correlation between ambient seawater temperature and strontium-calcium concentration ratios in otoliths of red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.*, 62: 652–653.
- Arai, T. (2002). Migratory history of Whses: present status and perspectives of the analytical methods. *Japanese Journal of Ichthyology*, 49: 1–23.
- Arai, T., Hirata, T. (2006). Determination of trace elements in otoliths of chum salmon *Oncorhynchus keta* by laser ablation-ICP-mass spectrometry *Fish Sci.*, 72: 977–984.
- Arai, T., Hirata, T., Takagi Y. (2006). Application of laser ablation ICPMS to trace the environmental history of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Mar. Environ. Res.*, 63, 55–66.
- Bath, G.E, Thorrold, S.R., Jones, c.m., Campana, S.E., McLaren, J.W., Lam, W. H. L. (2000). Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64, 1705–1714.
- Bath Martin, G. & Wuenschel, M. J. (2006). Effect of temperature and salinity on otolith elemental incorporation in juvenile gray snapper *Lutjanus griseus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 324, 229–239.
- Bau, M. and Dulski P. (1996). Distributions of yttrium and rare-earth elements in the Penge and Kuruman iron-formation, Transvaal Supergroup, South Africa. *Precamb. Res.*, 79, 37–55.
- Bernat, M., Church, T., and Allegre, C.J. (1972). Barium and strontium concentrations in Pacific and Mediterranean sea water profiles by direct isotope dilution mass spectrometry. *Earth planet. Sci. Lett.*, 16, 75-80.
- Bervotes, L., Blust, R., Verheyen, R., (2001). Accumulation of metals in the tissues of three spined Stickelback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 117-127.
- Borelli, G., Mayer-Gostan, N., De Pontual, H., Boeuf, G., Payan, P. (2001). Biochemical relationships between endolymph and otolith matrix in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Calcif. Tissue Int.* 69, 356–364.

- Boyle, E.A., (1981). Cadmium, zinc, copper, and barium in foraminiferal tests. *Earth Planet. Sci. Lett.* 53, 11 – 35.
- Broecker, W.S. & T.H. Peng. (1982). *Tracers in the Sea*, Eldigio Press, Palisades, New York.
- Brown, R.J., and K.P. Severin. (2008). A preliminary otolith microchemical examination of the diadromous migrations of Atlantic tarpon *Megalops atlanticus*. In *Biology and management of the world tarpon and bonefish fisheries*. Edited by J.S. Ault. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 259–274.
- Bury, N., & Grosell, M. (2003). Iron acquisition by teleost fish. *Compar. Biochem. Physiol. C.*,135, 97–105.
- Campana, S. E. & Neilson, J. D. (1985). Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42, 1014–1032.
- Campana, S. E. (1999). Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 188, 263–297.
- Campana, S.E., Chouinard, G.A., Hanson, J.M., Freche't, A., Bratney, J.(2000). Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. *Fish. Res.* 46, 343– 357.
- Campana S. E. (2005). Otolith science entering the 21st century. *Mar. Freshw. Res.* 56, 485-495.
- Carlstrom, D. (1963) A crystallographic study of vertebrate otoliths. *Biol. Bull.* 125, 441–463.
- Carre' M., Bentaleb I., Bruguier O., Ordinola E., Barrett N. T. and Fontugne M. (2006) Calcification rate influence on trace element concentrations in aragonitic bivalve shells: evidences and mechanisms. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 4906–4920.
- Chang, C.W., Lin, S.H., Iizuka, Y., Tzeng, W.N., (2004). Relationship between Sr:Ca ratios in otoliths of grey mullet *Mugil cephalus* and ambient salinity: validation, mechanisms, and applications. *Zool. Stud.* 43 (1), 74–85.
- De Pontual, H., Lagardère, F., Amara, R., Bohn M., Ogor, A. (2003). Influence of ontogenetic and environmental changes in the otolith microchemistry of juvenile sole (*Solea solea*). *J. Sea Res.*, 50, 199-211.
- de Vries, M.C., Gillanders, B.M., Elsdon, T.S. (2005). Facilitation of barium uptake into fish otoliths: influence of strontium concentration and salinity. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69, 4061-4072.
- Dove, S. G., Gillanders, B. M.&Kingsford, M. J. (1996). An investigation of chronological differences in the deposition of trace metals in the otoliths of two temperate reef fishes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 205, 15–33.

- Elderfield, H., (1988). The oceanic chemistry of the rare earth elements. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. A*, 325, 105–126.
- Elsdon, T.S., and Gillanders, B.M. (2002). Interactive effects of temperature and salinity on otolith chemistry: challenges for determining environmental histories of fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 59(11): 1796-1808.
- Elsdon, T.S., Gillanders, B.M. (2003). Relationship between water and otolith elemental concentrations in juvenile black bream *Acanthopagrus butcheri*. *Mar. Ecol. prog. Ser.s Vol. 260*: 263–272.
- Elsdon, T. S., Gillanders, B. M. (2004). Fish otolith chemistry influenced by exposure to multiple environmental variables. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 313(2), 269-284.
- Falini, G., Fermani, S., Vanzo, S., Miletic, M., Zaffino, G., (2005). Influence on the formation of aragonite or vaterite by otolith macromolecules. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1, 162–167.
- Frankel R. B. & Mann S. (1994). Biomineralization, in *Encyclopedia of inorganic chemistry*, edited by R. Scotto, Wiley and Sons, New York.
- Gallahar N. K. and Kingsford M. J. (1996). Factors influencing Sr/Ca ratios in otoliths of *Girella elevata*: An experimental investigation. *J. Fish. Biol.*, 48: 174–186.
- Gao, Y., Feng, Q., Ren, D., Qiao, L., Li, S. (2010). The relationship between trace elements in fish otoliths of wild carp and hydrochemical conditions *Fish. Physiol. Biochem.*, 36: 91–100.
- Geffen, A. J., Pearce, N. J. G. & Perkins, W. T. (1998). Metal concentrations in fish otoliths in relation to body composition after laboratory exposure to mercury and lead. *Mar. Ecol. prog. Ser.*, 165, 235–245.
- Gillanders, B.M., Kingsford, M.J. (1996). Elements in otoliths may elucidate the contribution of estuarine recruitment to sustaining coastal reef populations of a temperate reef fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 141, 13–20.
- Gillanders, B.M., Kingsford, M.J.(2000). Elemental fingerprints of otoliths of fish may distinguish estuarine nursery habitats. *Mar. Ecol. Prog., Ser.* 201, 273–286.
- Gillanders, B.M., (2002). Temporal and spatial variability in elemental composition of otoliths: implications for determining stock identity and connectivity of populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 59, 1 –11.
- Gillanders, B.M., Kingsford, M.J (2003) Spatial variation in elemental composition of otoliths of three species of fish (family Sparidae) *Estuarine- Coastal and Shelf Science* 57, 1049–1064.
- Grancini, G.F., Michelato, A. (1987). Current structure and variability in the Strait of Sicily and adjacent area. *Ann. Geophys. 5B*, (1), 75-88.

- Haley, B.A., Klinkhammer G.P., Mix, A.C, (2005). Revisiting the rare earth elements in foraminiferal tests. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 239,79– 97.
- Hanson, P.J. , Zdanowicz, V.S. (1999). Elemental composition of otoliths from Atlantic croaker along an estuarine pollution gradient. *J. Fish. Biol.*54: 656-668.
- Hart S. R. and Cohen A. L. (1996). An ion probe study of annual cycles of Sr/Ca and other trace elements in corals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 60: 3075–3084.
- Hellawell, J.M. (1986). *Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management*. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Hodson, P. V. (1988). The effect of metal metabolism on uptake, disposition and toxicity in fish. *Aquat. Toxicol.*, 11: 3-18
- Hoff G. R, Fuiman, L. A. (1995). Environmentally induced variation in elemental composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) in the otoliths of the white grunt, *Haemulon plumieri* (Pisces: Haemulidae). *Bull. Mar. Sci.*, 50:237-257.
- Istituto Cooperativo di Ricerca sul Mare. (2004). Relazione finale ricerche ambientali per lo sviluppo dell'acquacoltura responsabile (impatto ambientale della maricoltura in gabbie galleggianti) (D.M. 25/99 del 22.12.1999 – Legge 41/82 –Rif. 5 C 70).
- Ibsch, M., Anken, R.H., Rahmann, H. (2004). Calcium gradients in the fish inner ear sensory epithelium and otolithic membrane visualized by energy filtering transmission electron microscopy (EFTEM). *Adv. Space Res.*, 33:1395–1400.
- Kalish, JM. (1989). Otolith microchemistry: validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. J. Kalish. J.M. 1991. Determinants of otolith chemistry: Seasonal variation in composition of blood plasma, endolymph and otoliths of bearded rock cod *Pseudophycis barbatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 74: 137-159.
- Kalish, J.M. (1990). Use of otolith microchemistry to distinguish the progeny of sympatric anadromous and nonanadromous salmonids. *Fishery Bulletin US* 88: 657–666.
- Kalish J. M. (1991). Determinants of otolith chemistry: Seasonal variation in composition of blood plasma, endolymph and otoliths of bearded rock cod *Pseudophycis barbatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 74: 137–159.
- Lakshatanov, L. Z. and Stipp, S. L. S. (2004). Experimental study of europium (III) coprecipitation with calcite. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 68, 819–827.
- Lea D. W., Shen G. T., Boyle E. A. (1989). Coralline barium records temporal variability in equatorial Pacific upwelling. *Nature* 340, 373-376.
- Lea D.W., Boyle E.A. (1990). Foraminiferal reconstruction of Barium distributions in sea water masses of the glacial oceans. *Paleoceanography*, 5, 719- 742.

- Leakey C. D. B. , Martin A. J. , Fitzsimons M. F. (2009). Multi-element otolith chemistry of juvenile sole (*Solea solea*), whiting (*Merlangius merlangus*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in the Thames Estuary and adjacent coastal regions. *J. Sea Res.* 61: 268-274.
- Limburg, K. E. (1995). Otolith strontium traces environmental history of subyearling American shad *Alosa sapidissima*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119, 25–35.
- Limburg, K. E., Landergren, P., Westin, L., Elfman, M., Kristiansson, P. (2001). Flexible modes of anadromy in Baltic sea trout: making the most of marginal spawning streams. *J. Fish Biol.*, 59(3),682-695.
- Lorens R. B. (1981). Sr, Cd, Mn and Co distribution coefficients in calcite as a function of calcite precipitation rate. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45, 553–561.
- Lorrain A., Gillikin D. P., Paulet Y.-M., Chauvaud L., Le Mercier A., Navez J. and André L. (2005). Strong kinetic effects on Sr/ Ca ratios in the calcitic bivalve *Pecten maximus*. *Geology*, 33, 965–968.
- Lowenstam, H.A. (1981). Minerals formed by organisms. *Science*, 211, 1126-1131
- Lowenstam K., Weiner S. (1989). On biomineralization. Oxford University Press, 324 pp.
- Martin, G. B., Thorrold, S. R. (2005). Temperature and salinity effects on magnesium, manganese, and barium incorporation in otoliths of larval and early juvenile spot (*Leiostomus xanthurus*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 293, 223-232..
- Mason B., and Moore C. B. (1982). Principles of Geochemistry. Wiley.
- Mann S (1983). Mineralization in biological systems. *Struct. Bonding*, 54:125-174
- McLennan, S.M. (1989). Rare earth elements in sedimentary rocks: influence of the provenance and sedimentary process. In: Lipin, B.R., McKay, G.A. (Eds.), *Geochemistry and Mineralogy of Rare Earth Elements*. *Rev. Min.*, 21, 169–200.
- Miller, M.B., Clough, A.M., Batson, J.N., Vachet, R.W. (2006). Transition metal binding to cod otolith proteins. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 329: 135-143.
- Miller, J.A. (2007). Scales of variation in otolith elemental chemistry of juvenile staghorn sculpin (*Leptocottus armatus*) in three Pacific Northwest estuaries. *Mar. Biol. (Berl.)*, 151(2), 483-494.
- Milton, D. A. and Chenery, S. R. (1998). The effect of otolith storage methods on the concentrations of elements detected by laser-ablation ICPMS. *J. Fish. Biol.*, 53, 785-794.
- Milton, D. A., Tenakanai, C., Chenery, S.R., (2000). Can the movements of Barramundi in the Fly River region, Papua New Guinea be traced in their otoliths? *Est. Coast. Shelf Sci.*, 50, 855-868.

- Milton, D. A., Chenery, S. R. (2001). Sources and uptake of trace metals in otoliths of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*), J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 264, 47-65.
- Milton, D., Halliday, ., Sellin, M., Marsh, R., Staunton-Smith, J., Woodhead, J., (2008). The effect of habitat and environmental history on otolith chemistry of barramundi (*Lates calcarifer*) in estuarine populations of a regulated tropical river. Est. Coast. Shelf Sci., 78(2), 301-315.
- Mitsuguchi, T., Matsumoto, E., Uchida E. (2003). Mg/Ca and Sr/Ca ratios of Porites coral skeleton: Evaluation of the effect of skeletal growth rate. Coral reefs, 22, 381-388.
- Morales-Nin, B., Swan, S.C., Gordon, J.D.M., Palmer, M., Geffen, A.J., Shimmield, T., and Sawyer, T. 2005. Age-related trends in otolith chemistry of Merluccius merluccius from the northeastern Atlantic Ocean and the western Mediterranean Sea. Mar. Freshw. Res., 56(5), 599-607.
- Morales-Nin, B., (1987b). Ultrastructure of the organic and inorganic constituents of the otoliths of the sea bass. In: Summerfelt, R.C., Hall, G.E. (Eds.), Age and Growth of Fish. Iowa State University Press, Ames, pp. 331-343.
- Morales-Nin B. (2000) Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. Fish. Res. 46; 53-67.
- Morris, R. W. & Kittleman, L. R. (1967). Piezoelectric property of otoliths. Science 158: 368–370.
- Mugiya, Y. Hakomori, T., Hatsutori, K. (1991). Trace metal incorporation into otoliths and scales in the goldfish, *Carassius auratus*. Comp. Biochem. Physiol. 99C. 327-331.
- Mugiya, Y.(1987). Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Fish. Bull. US 85: 395-401.
- Mylonas, C. C., Anezaki, L., Divanach, P., Zanuy, S, Piferrer, F., Ron, B., Peduel, A., Ben Atia, I., Gorshkov, S. and Tandler A. (2003). Influence of rearing temperature at two periods during early life on growth and sex differentiation of two strains of European sea bass. Fish Physiol. Biochem., 28, 167–168.
- Ni, I. H., Wang, W. X. & Tam, Y. K. (2000). Transfer of Cd, Cr and Zn from zooplankton prey to mudskipper *Periophthalmus cantonensis* and glassy *Ambassis urotaenia* fishes. Mar. Ecol. prog. Ser.s, 194, 203–210.
- Olsson, P., Kling, P., Hogstrand, C. (1998). Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In W. J. Longstand, & M. J. Bebianno (Eds.), Metal metabolism in aquatic environments (pp. 337–338). London: Chapman and Hall.
- Palmer M. R. (1985). Rare earth elements in foraminifera tests. Earth Planet. Sci. Lett., 73, 285–298.

- Panella, G. (1971). Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 173, 1124–1127.
- Panella, G. (1980). Growth patterns in fish sagittae. In (D. C. Rhodes & R. A. Lutz, Eds) *Skeletal Growth of Aquatic Organisms*. New York: Plenum Press, pp. 519–560. 298 C. F. T. Andrus and D. E. Crowe.
- Parekh P. P., Möller P., Dukski P., and Bausch W. M. (1977). Distribution of trace elements between carbonate and non-carbonate phases of limestone. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 34, 39–50.
- Parmentier, R. e., Cloots, r., Warin, r., Henrist, C. (2007). Otolith crystals (in Carapidae): Growth and habit *Journal of Structural Biology* 159:462–473
- Patterson, W. P. (1999). Oldest isotopically characterized fish otoliths provide insight to Jurassic continental climate of Europe. *Geology*, 27, 199–202.
- Payan, P., Borelli, G., Priouzeau, F., De Pontual, H., Boeuf, G., Mayer-Gostan, N. (2002). Otolith growth in trout *Onchorynchus mykiss*: supply of Ca^{2+} and Sr^{2+} to the saccular endolymph. *J. Exp. Biol.* 205; 2687–2695.
- Piepergras, D.J., Jacobsen, S.B., (1992). The behavior of rare earth elements in seawaters: precise determination of variations in the north Pacific water column. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 56, 1851–1862.
- Phillips, D. H. (1977). The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments-a review. *Environ. Pollut.*, 13, 281–317.
- Phillips, D. H., & Rainbow, P. S. (1994). *Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. London: Chapman and Hall.
- Proctor, C. H. and R. E. Thresher (1998). Effects of specimen handling and otolith preparation on concentration of elements in fish otoliths. *Mar. Biol.*, 131,681-94.
- Radtke R. L., Townsend D. W., Folsom S. D., and Morrison M. A. (1990). Strontium: calcium concentration ratios in otoliths of herring larvae as indicators of environmental histories. *Environ. Biol. Fish.*, 27: 51–61.
- Ranaldi, M. M., Gagnon, M. M. (2008a). Zinc incorporation in the otoliths of juvenile pink snapper (*Pagrus auratus Forster*): the influence of dietary versus waterborne sources. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 360, 56–62.
- Ranaldi, M. M , Gagnon, M. M.(2008b). Trace Metal Incorporation in Otoliths of Black Bream (*Acanthopagrus butcheri Munro*), an Indicator of Exposure to Metal Contamination. *Water Air Soil Pollut.*, 194:31–43

- Rimstidt J. D., Balog, A. and Webb J. (1998). Distribution of trace elements between carbonate minerals and aqueous solutions. *Geochim.Cosmochim. Acta*, 62, 1851–1863.
- Radtke R. L. (1989). Strontium-calcium concentration ratios in fish otoliths as environmental indicators. *Comp. Biochem. Physiol.* 92A, 189-193.
- Regione Siciliana (2007). Piano di tutela delle acque siciliane (*di cui all'art. 121 del Decreto Legislativo 3 Aprile 2006, n°152*). Redatto da SOGESID S.p.A.
- Romanek C. S, Gauldie R. W. (1996). A predictive model of otolith growth in fish based on the chemistry of the endolymph. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114A, 71-79
- Rooker, J. R., Secor, D. H., Zdanowicz, V. S., De Metrio, G., Oris Relini, L. (2003). Identification of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* stock from putative nurseries using otolith chemistry. *Fish. Oceanogr.*, 12, 75– 84.
- Sanchez-Jerez, P., Gillanders, B. M., Kingsford, M. J. (2002). Spatial variability of trace elements in fish otoliths: comparison with dietary items and habitat constituents in seagrass meadows. *J. Fish. Biol.* 61, 801–821
- Sadovy Y, Severin K. P. (1992). Trace elements in biogenic aragonite: correlation of body growth rate and strontium levels sea bass *Lateolabrax japonicus* distributed in Ariake Sea. *Fish. Sci.*, 64, 740-743
- Saquet, M., Halden, N. M., Babaluk, J., Campbell, J. L., Nejedly, Z. (2002). Micro-PIXE analysis of trace element variation in otoliths from fish collected near acid mine tailings: potential for monitoring contaminant dispersal. *Nucl. Instrum. Methods B*, 189, 196-201.
- Scelfo, G. M., (1997). A practical handbook for trace metals and ancillary analyses. University of California Environmental Toxicology- Special publication. *Phys. Res. Sect. B*, 189, 196–201.
- Secor, D. H., Henderson-Arzapalo, A., Piccoli, P. M. (1995). Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 192, 15–33.
- Secor, D.H., Dean. J. M. and Campana S.E. [ed].(1995). *Recent Developments in Fish Otolith Research*. Univ. of South Carolina Press. Columbia, S.C. 730 pp.
- Secor, DH., Ohta, T., Nakayama, K., Tanaka, M. (1998). Use of otolith microanalysis to determine estuarine migrations of Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* distributed in Ariake Sea. *Fisheries Science* 64(5), 740-743.
- Secor, D. H., and Rooker, J. R. (2000). Is otolith strontium a useful scalar of life cycles in estuarine fishes? *Fish. Res.*, 46(1-3), 359-371.
- Seymour, E. A. & Bergheim, A. (1991). Towards a reduction of pollution from intensive aquaculture with reference to the farming of salmonids in Norway. *Aquacult. Eng.* 10, 73 – 88.

- Shen G. T. and Boyle E. A., (1987). Lead in corals: Reconstruction of historical industrial fluxes to the surface ocean. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 82, 289-304.
- Shen G. T. and Boyle E. A., (1988). Determination of lead, cadmium and other trace metals in annually-banded corals. *Chem. Geol.*, 67, 47-62.
- Shen G. T., Cole J. E., Lea D. W., Linn L. J., McConnaughey, T. A., Fairbanks, R. G. (1992). Surface ocean variability at Galapagos from 1936-1982: calibration of geochemical tracers in corals. *Paleoceanography*, 7, 563-588
- Shen C. C., Lee T., Chen C. Y., Wang C. H., Dai C. F. and Li L. A. (1996). The calibration of D[Sr/Ca] versus sea surface temperature relationship for *Porites* corals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 60, 3849-3858.
- Sholkovitz, E.R., Landing, W.M., Lewis, B.L., (1994). Ocean particle chemistry : the fractionation of rare-earth elements between suspended particles and seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 58, 1567-1579.
- Sholkovitz, E. and Shen, G.T., (1995). The incorporation of rare earth elements in modern coral. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 59, N. 13, pp. 2749-2756.
- Spaargaren, D.H., (1991). The biological use of chemical elements: selection on environmental availability and electron configuration. *Oceanol. Acta*, 14, 569-574.
- Thorrold, S. R., Jones, C. M. & Campana, S. E. (1997b). Response of otolith microchemistry to environmental variations experienced by larval and juvenile Atlantic croaker (*Micropogonius undulatus*). *Limnology and Oceanography*, 42, 102-111.
- Thorrold, S. R., Jones, C. M., Swart, P. K., Targett, T.E. (1998). Accurate classification of juvenile weakfish *Cynoscion regalis* to estuarine nursery areas based on chemical signatures in otoliths. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 173: 253-265.
- Townsend D. W., Radtke R. L., Malone D. P. and Wallinga J. P. (1995). Use of otolith strontium: calcium ratios for hindcasting larval cod distributions relative to water masses on Georges Bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 119, 37-44.
- Tsonis, P. A. (2000). Regeneration in vertebrates. *Developmental Biology*, 221, 273-284.
- Turekian, K. K., Oceans, Englewood, Cliffs, N. J., Prentice-Hall, 1968.
- Tzeng, W.N. (1996). Effects of salinity and ontogenetic movements on strontium : calcium ratios in the otoliths of the Japanese Eel, *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 199, 111-122.
- Viarengo, A. (1985). Biochemical Effects of Trace Metals. *Mar. Pollut. Bull.*, Vol. 16, No.4, pp. 153-158.

- Wansard, G., De deckker, P., Julià, R. (1998). Variability in ostracod partition coefficients $D(\text{Sr})$ and $D(\text{Mg})$. Implication for lacustrine paleoenvironmental reconstructions. *Chem. Geol.*, 146, 39-54.
- Ward, T. J. (1989). The accumulation and effects of metals in seagrass habitats. In *Biology of Seagrasses: a Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region* (Larkum, A. W. D., McComb, A. J. & Shepherd, S. A., eds), pp. 797–820. Amsterdam: Elsevier.
- Webb G. E. and Kamber B. S. (2000). Rare earth elements in Holocene reefal microbialites: A new shallow seawater proxy. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64, 1557–1565.
- Weiner S (2008) Biomineralization: a structural perspective. *J. Struct. Biol.*, 163; 229–234
- Wheeler, A.P. and Sikes, C.S.. (1989). Matrix-crystal interactions in CaCO_3 biomineralization. In: *Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*. S. Mann, J. Webb and R.J.P. Williams, eds. VCH Publ., Weinheim, pp. 99-131.
- Wells B. K, Rieman B. E, Clayton J. L, Horan D. L, Jones C. M (2003). Relationships between water, otoliths, and scale chemistries of Westslope cutthroat trout from the Coeur d'Alene River, Idaho: the potential application of hard-part chemistry to describe movements in freshwater. *Trans. Am. Fish. Soc.* 132:409–424.
- White W. M., (1997). *Geochemistry*, Cornell University. An online text-book, eventually to be published by John Hopkins University press.
- Wright J., Schrader H., and Holser W. T. (1987). Paleoredox variations in ancient oceans recorded by rare earth elements in fossil apatite. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 51, 631–644.
- Wright, P. J. (1991). Calcium binding by soluble matrix of the otoliths of Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J. Fish Biol.*, 38, 625-627.
- Yang, J., Arai, T., Liu, H., Miyazaki, N., and Tsukamoto, K. (2006). Reconstructing habitat use of *Coilia mystus* and *Coilia ectenes* of the Yangtze River estuary, and of *Coilia ectenes* of Taihu Lake, based on otolith strontium and calcium. *J. Fish Biol.* 69(4), 1120-1135.
- Yamashita, Y., Otake, T., Yamada, H., (2000). Relative contributions from exposed inshore and estuarine nursery grounds to the recruitment of stone flounder, *Platichthys bicoloratus*, estimated using otolith Sr:Ca ratios. *Fish. Oceanogr.*, 9, 316-327.
- Zimmerman, C. E. (2005). Relationship of otolith strontium-to-calcium ratios to salinity: experimental validation for juvenile salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62(1), 88-97.
- Zimmerman, C. E., and Reeves, G. H. (2000). Population structure of sympatric anadromous and nonanadromous *Oncorhynchus mykiss*: evidence from spawning surveys and otolith microchemistry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57(10): 2152-2162.