



Università
Ca' Foscari
Venezia

Scuola Dottorale di Ateneo
Graduate School

Dottorato di ricerca
in Scienze Ambientali
Ciclo XXIX

—
Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

**Tracciabilità di filiera e sicurezza alimentare della
vongola verace filippina *Ruditapes philippinarum*
(Adams and Reeve, 1850) prodotta nelle lagune
costiere dell'Alto Adriatico e di Aveiro (PT)**

**Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/07
Tesi di Dottorato di Silvia Breda, matricola 835392**

Coordinatore del Dottorato

Prof. Gabriele Capodaglio

**Supervisore del
Dottorando**

**Prof. Emanuele Argese
Dr.ssa Stefania Chiesa**

PREMESSA	1
OBIETTIVI.....	3
INTRODUZIONE.....	6
SITI DI INDAGINE.....	6
La Laguna di Venezia.....	6
La Laguna di Marano	7
La Ria de Aveiro	9
EQUILIBRI DINAMICI DI METALLI E METALLOIDI IN AMBIENTI DI TRANSIZIONE .	11
La speciazione geochimica nell'ambito della caratterizzazione dei sedimenti	15
LA VONGOLA VERACE FILIPPINA R. PHILIPPINARUM	18
L'introduzione in Europa e le sfide attuali	18
Biologia della specie e suo ruolo come bioindicatore	20
MATERIALI E METODI.....	24
ANALISI AMBIENTALI	24
Disegno sperimentale e campionamenti	24
Studio della granulometria	28
Trattamento dei campioni per l'estrazione di metalli e metalloidi	29
Digestione totale di campioni di sedimento marino.....	30
Digestione totale di campioni di R. philippinarum	31
Speciazione Geochimica	33
Controllo qualità del dato analitico	35
Analisi del contenuto di sostanza organica	37
Analisi statistiche sui dati ambientali.....	37
ANALISI GENETICHE	37
Estrazione e purificazione del DNA genomico	39

Amplificazione mediante PCR.....	39
Analisi dei geni mitocondriali	40
Genotipizzazione di loci microsatelliti	43
RISULTATI E DISCUSSIONE	45
ANALISI AMBIENTALI	45
Dati ambientali rilevati nei siti di studio	45
Studio della granulometria	47
ANALISI GENETICHE.....	103
Analisi dei geni mitocondriali	103
Genotipizzazione dei loci microsatelliti	114
CONCLUSIONI	119
ANALISI AMBIENTALI	119
ANALISI GENETICHE.....	121
BIBLIOGRAFIA	123

"When we try to pick out anything by itself, we find it hitched to everything else in the universe"

John Muir, scienziato ambientale, circa un secolo fa.

Un numero sempre maggiore di scienziati facenti capo a diverse discipline sostiene da tempo e con grande forza la necessità di adottare un approccio olistico alle Scienze.

Tale approccio nasce dalla consapevolezza che i sistemi complessi oggetto di osservazione (l'Uomo, la Natura, l'Economia...) sono soggetti a continui cambiamenti dovuti all'intervento di variabili diverse, ma interconnesse tra loro a dare effetti talvolta sinergici, talvolta antagonisti o indipendenti tra loro.

Come per la prima volta postulato da Edward De Bono, l'adozione del così detto "pensiero laterale" è un passaggio cruciale per poter comprendere e gestire i fenomeni ambientali in tutta la loro complessità. Si tratta di un approccio che richiede lo sforzo di tralasciare concetti obsoleti e percezioni tradizionali per preferire l'uso di ragione e intelletto al fine di esplorare nuove e multiple possibilità e approcci invece di perseguirne uno soltanto (De Bono, 1976).

Integrare diverse discipline tra loro per ottenere una visione complessiva dei fenomeni comporta, talvolta, di dover compiere la stessa operazione che ci è richiesta quando vogliamo osservare un quadro impressionista: la distanza dal soggetto deve essere adeguata per poterne apprezzare appieno la qualità. Allo stesso modo, un approccio multidisciplinare richiede che i fenomeni vengano analizzati sotto vari punti di vista e che le diverse metodologie di analisi disponibili siano consapevolmente applicate per una valutazione globale e sinottica.

Lo sviluppo di tali approcci ha costituito la base per la nascita di numerosi strumenti matematici e modellistici applicati ai fenomeni ambientali, talvolta con risultati positivi e talvolta invece, con esiti tutt'altro che conformi a quanto osservato in natura. La complessità di certi fenomeni è ancora lontana dal poter essere codificata in maniera generalista dalla *soft science* e si richiede ancora molto impegno nelle attività di laboratorio e di analisi per poter comprendere appieno fenomeni complessi.

Un esempio di questi fenomeni è costituito dalla valutazione del rischio posto dalle matrici ambientali contaminate, oggetto di questa tesi, laddove un nodo cruciale è dato dalle questioni relative alla biodisponibilità dei contaminanti stessi che è di grande interesse in molteplici campi di applicazione.

Tuttavia, va sottolineato che queste problematiche caratterizzate da estrema complessità, possono essere spiegate mediante meccanismi che valgono soprattutto a livello sito-specifico e che non possono essere *tout court* trasferite ad altri contesti.

L'interazione tra più specialisti (scienziati e non) e l'approfondimento da parte dei ricercatori degli aspetti connessi alle diverse discipline implicate sono elementi impliciti della metodologia e ne costituiscono un punto di forza. Ciò che ne consegue, in ultima analisi, è che i risultati ottenuti sono spesso di grande rilievo scientifico e di grande importanza per la gestione dei sistemi complessi da parte di tecnici e fautori di politiche ambientali che possono attingerne a piene mani e beneficiare delle ricadute concrete della ricerca nel campo delle scienze applicate.

Il presente lavoro di tesi si è concentrato sugli ambienti di transizione come ecosistemi modello, ricchi in termini di biodiversità vegetale e animale, generalmente plastici alle sollecitazioni naturali e antropiche, ma nello stesso tempo abitati da specie sensibili spesso utilizzate come indicatori dello stato di qualità ambientale. Talune specie, sono anche di interesse commerciale oltre che ecologico e costituiscono un ottimo oggetto di indagine sia dal punto di vista della sicurezza alimentare, legata alla qualità ambientale dei siti di raccolta, sia per quanto concerne l'origine geografica e la tracciabilità di filiera, che consente di aumentarne il valore di mercato e di garantirne l'origine ai consumatori.

Nel caso specifico, sono state prese in considerazione tre lagune costiere europee diverse dal punto di vista ecologico, ma importanti per la produzione della vongola verace filippina *Ruditapes philippinarum* - sinonimo *Venerupis philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). Nelle tre aree selezionate lungo le coste atlantiche e adriatiche sono stati condotti studi approfonditi in merito alla qualità ambientale per quanto concerne la presenza di metalli e metalloidi nei sedimenti e nei molluschi destinati alla vendita e al consumo. Inoltre, sono stati caratterizzati i profili genetici delle popolazioni di interesse commerciale al fine di valutare la possibilità di tracciarne la filiera di produttiva su base molecolare.

In particolare, lo scopo del lavoro è stato:

- in primo luogo quello di individuare quali siano le variabili ambientali maggiormente rilevanti nel contesto degli equilibri biogeochimici degli elementi negli ambienti di transizione;
- in seconda battuta, quello di stabilire quali siano le relazioni esistenti tra queste variabili (es. quali interagiscano tra loro e in che rapporti) ovvero scoprirne la gerarchia per distinguere tra quelle che rivestono un ruolo determinante e che hanno un'influenza predominante e costante rispetto a quelle che intervengono con minore forza o in diverso modo nel tempo;
- ipotizzare, infine, un modello concettuale della relazione tra le variabili che illustri e riassume le criticità legate allo sfruttamento delle risorse alieutiche in termini di rischio alimentare per il consumo di molluschi sessili che vivono infossati nel sedimento delle aree costiere e porre le basi per un'analisi di rischio sito-specifica che tenga conto della biodisponibilità dei contaminanti.

Per raggiungere tali obiettivi dal punto di vista operativo si è proceduto con la determinazione dei parametri ambientali nei siti di indagine, con l'analisi del contenuto totale di metalli e metalloidi nei sedimenti marini e con la relativa speciazione geochimica (effettuata anche sulle

diverse frazioni granulometriche), con la determinazione del livello di bioaccumulo di tali elementi nei tessuti degli esemplari di *Ruditapes philippinarum* e infine con il trattamento statistico dei dati raccolti mediante analisi multivariate.

Parallelamente a questi obiettivi, si è investigato anche il versante della tracciabilità della filiera alimentare mediante strumenti di biologia molecolare. In particolare, le popolazioni di vongola verace filippina *R. philippinarum* (oggetto di sfruttamento commerciale) sono state caratterizzate geneticamente attraverso marcatori mitocondriali (tramite sequenziamento dei geni *16S rDNA* e *COI*) e marcatori nucleari (loci microsatelliti). I risultati ottenuti sono stati confrontati con i dati presenti in letteratura in relazione alle popolazioni native per ricostruire i pattern di introduzione della vongola verace filippina in Europa, e per verificare i livelli di variabilità genetica delle popolazioni Europee. Tali dati sono necessari per verificare la diversità genetica delle popolazioni sfruttate a livello commerciale e l'utilità dei marcatori utilizzati ai fini della tracciabilità di filiera della vongola verace filippina, in particolare per verificarne la provenienza e l'origine geografica a garanzia dei consumatori finali.

Il presente studio, per quanto riguarda le analisi ambientali, si è concentrato per la maggior parte sulle tre aree costiere di **Venezia, Marano e Aveiro (PT)**, per le quali è stato possibile il prelievo contestuale di organismi e sedimenti nell'ambito delle diverse campagne di indagine condotte.

Per poter beneficiare di un termine di confronto ulteriore nell'Alto Adriatico, sono stati utilizzati anche i dati relativi a organismi e sedimenti prelevati nell'area del Delta del Po già pubblicati da Baccarani nel 2012 e relativi al campionamento dell'aprile 2009 (Baccarani, 2012). Tali dati, possono essere considerati omogenei e confrontabili, in quanto elaborati nell'ambito del medesimo gruppo di ricerca e con gli stessi obiettivi e metodologie.

Le indagini genetiche, invece, comprendono un set di campioni più allargato, frutto di uno studio che è partito nel 2009 e che comprende ora un set piuttosto nutrito di dati che ha consentito di ottenere una base statistica adeguata a trarre conclusioni valide su larga scala.

I due diversi ambiti di indagine (ambientale e genetico), dunque, sono stati sviluppati parallelamente allo scopo di ottenere informazioni che mirino a completare il quadro delle conoscenze a disposizione su questa specie. La valutazione della sicurezza alimentare e la tracciabilità della filiera non possono prescindere da nessuna di queste informazioni, poiché nel contempo è utile stabilire un protocollo per certificare l'origine della specie, ma anche stabilire la qualità ambientale dei siti di coltivazione e le dinamiche geochimiche sito-specifiche per poterne garantire il consumo anche in futuro.

Le attività di ricerca sono state svolte nell'ambito di un ampio network di collaborazioni.

La raccolta dei campioni di sedimento marino e vongole dell'area costiera portoghese è stata resa possibile grazie al contributo della Dr. Rosa Freitas e Dr. Etelvina Figueira del dipartimento di Biologia dell'Università di Aveiro.

La raccolta dei campioni e di materiale bibliografico specifico è stato condotto anche grazie alla collaborazione con il Dr. Roger Herbert, Centre for Conservation Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science and Technology, Bournemouth University (UK), e con la Dr.ssa Nathalie Caill-Milly, Ifremer, Laboratory Halieutic Resources from Aquitaine, Anglet (France). Le analisi genetiche e le successive analisi statistiche sono state svolte in collaborazione con il Prof. Francesco Nonnis Marzano presso il Laboratorio di Zoologia Biochimica e Molecolare del Dipartimento di Bioscienze (Università di Parma) e con la Dr.ssa Livia Lucentini, Laboratorio di Biodiversità Animale e Biotecnologie Naturalistiche, Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale (Università degli Studi di Perugia).

INTRODUZIONE

SITI DI INDAGINE

La Laguna di Venezia

Venezia e la sua laguna costituiscono un complesso sistema di interesse storico-artistico e ambientale che, attualmente, sta attraversando una delicata fase alla ricerca di un equilibrio tra le forti pressioni esercitate dalle attività antropiche da un lato, e la necessità di ripristino e conservazione del patrimonio storico-culturale e ambientale dall'altro.

La Laguna di Venezia è uno dei più ampi ecosistemi di transizione del Mediterraneo, che copre un'area di circa 550 Km². Si tratta di una laguna ampia con profondità media di 0,6 metri che è connessa al mare Adriatico mediante tre bocche di porto che permettono lo scambio d'acqua in seguito ai fenomeni tidali (Argese et al., 2003) ed è caratterizzato da una rete di canali di varia profondità, estuari, paludi salmastre e zone intertidali prevalentemente sommerse (ghebi e velme) o prevalentemente emerse (barene); l'escursione tidale si aggira attorno a 1 metro.

Le bocche di porto la suddividono così in tre bacini principali. Tuttavia, la laguna Nord (collegata tramite la bocca di porto di Lido), grazie alle sue caratteristiche morfologiche, può essere ulteriormente suddivisa in due sotto-bacini, così che da un punto di vista idrodinamico l'intera Laguna è generalmente rappresentata come suddivisa in 4 bacini: Nord (Treporti, 150 km²), centro-Nord (Lido, 100 km²), Centrale (Malamocco, 170 km²) e Sud (Chioggia, 130 km²) (Tagliapietra e Volpi Ghirardini, 2006). La Laguna è caratterizzata da un'alta macro e micro variabilità e da dinamiche "multisfaccettate" che includono ambienti estuarini e marini, paludi salmastre e aree fortemente antropizzate come la città di Venezia e la zona industriale di Porto Marghera (Ravera, 2000).

Il bacino idrografico denominato "Laguna Veneta" comprende circa 180 corsi d'acqua di diversa conformazione e importanza dai più piccoli e artificiali come rogge, scoli, rivi, rami, navigli, fossi, fosse, ai più grandi fiumicelli, fiumi e canali. L'idrografia dell'area oramai conserva pochi tratti di naturalità, poiché, già a partire dall'epoca medioevale e lungo i secoli successivi, il corso di questi corpi d'acqua ha subito numerosissime modifiche per ragioni dapprima urbanistico-commerciali e poi in risposta alle dinamiche meteo-climatiche al fine di ridurre al minimo i rischi posti dalla loro così diffusa presenza sul territorio della bassa pianura Veneta. Fra i più importanti fiumi che sfociano ancora oggi in laguna si trovano il Brenta, il Bacchiglione, il Dese, il Muson, il Livenza e numerosi sono i canali artificiali che irrorano la gronda lagunare come, per esempio, il Canale Tron e il Fiume Lusore.

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

L'ingresso dei contaminanti in laguna può avvenire a partire da sorgenti sia puntuali che non, in particolare, la presenza di un polo industriale di grande rilievo come quello di Porto Marghera dove hanno operato o sono ancora in esercizio impianti chimici e petrolchimici proprio nella zona di confine della laguna, costituisce una rilevante potenziale fonte di contaminazione del sistema acquatico (Argese et al., 2003).

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

La Laguna di Marano

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

La laguna di Marano comprende tre bacini: di Lignano (51,06 km²), di S. Andrea (22,21 km²) e di Buso (20 km² circa, per metà appartenente alla Laguna di Grado); ad essi corrispondono altrettante bocche lagunari (o porti), conosciute con lo stesso nome, che li uniscono al mare. La

laguna è protetta dal mare aperto da un cordone di banchi sabbiosi e di isole, tra cui l'isola di S. Andrea e quella di Martignano, conosciuta anche come Isola delle Conchiglie.

Molte delle specie vegetali e animali presenti nella laguna sono definibili dal punto di vista ecologico come "euriterme ed eurialine", in grado cioè di vivere in un habitat dove sono frequenti notevoli sbalzi di temperatura e di salinità. La vegetazione comprende specie sia arboree che erbacee, sia annue che perenni (AAVV, 2012).

Inoltre, la laguna comprende alcuni siti ospitanti la migrazione di importanti esemplari di fauna selvatica, i quali sono stati presentati alla Convenzione di Ramsar del 1971 dichiarandoli ufficialmente "siti protetti". In seguito, dopo l'implementazione della Direttiva Habitat (92/43/CEE) concernente la salvaguardia della biodiversità, l'intero bacino lagunare è stato inserito nella rete "Natura 2000" come sito di importanza Comunitaria (SCIs – IT3320037) e, per questo, beneficia a tutt'oggi di un contributo pubblico per la sua tutela (Covelli, 2012).

La zona costiera è sede di un importante sviluppo antropico il quale, in molti casi, ha comportato l'alterazione sia delle acque dolci che delle acque salate in termini di carico di nutrienti, tasso di sedimentazione e di input di sostanze inquinanti. Infatti, questo ambiente ha subito delle evidenti trasformazioni dal punto di vista morfologico che sono andate di pari passo con il deterioramento dei sedimenti (Fontolan et al., 2012). Oltretutto, le lagune di Marano e Grado sono state storicamente interessate da importanti eventi di contaminazione di metalli pesanti, dibenzodiossine policlorate (PCDDs), furani (PCDFs), idrocarburi policiclici aromatici (PAHs), e composti organici del mercurio legati ai processi industriali del polo chimico di Torviscosa, il più importante sito industriale della Regione (Ramieri et al., 2011).

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

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

dalle acque di dilavamento delle ex miniere dell'Idrja che sono una fonte di contaminazione costante per quanto riguarda questo metallo.

La Ria de Aveiro

La così detta "Ria" di Aveiro è la più grande laguna costiera del Portogallo e la più dinamica in termini di processi fisici e biogeochimici. È un ecosistema molto importante nella regione ove è situato sia per l'elevato valore naturalistico sia per l'intensa attività antropica che insiste sui suoi canali e sui suoi confini (Vaz et al., 2005).

La laguna di Aveiro è caratterizzata dalla presenza di quattro canali principali (Mira, S. Jacinto/Ovar, Ílhavo e Espinheiro) e da numerosi canali più piccoli. È una laguna a basso fondale situata nel nord est dell'Atlantico e separata dal mare da una striscia costiera. È caratterizzata da una geometria irregolare e complessa con stretti canali e significative zone intertidali come paludi fangose e acquitrini salmastri. È connessa all'Atlantico mediante un canale artificiale lungo 1,3 km, largo 350 metri e profondo 20 metri, tramite il quale scambia la maggior parte dell'acqua con l'oceano in seguito ai flussi tidali. La laguna raggiunge un massimo di 10 km di lunghezza e 45 km di larghezza e copre un'area di 83 km² durante le maree primaverili con un minimo di 66 km² con la bassa marea (Dias et al., 2000). Mediamente la profondità della laguna si attesta su 1 metro, tranne nei canali navigabili dove le operazioni di dragaggio sono frequenti e la profondità è di circa 7 metri, il canale più profondo (20 m) è quello di collegamento con l'oceano (Vaz et al., 2005). I due fiumi principali che scaricano nella zona orientale della laguna sono i Vouga e l'Antuã e apportano un contributo di acqua dolce con una portata rispettivamente di 29 m³/s e 2 m³/s. Il prisma tidale si attesta sui 70 milioni di m³ e si distribuisce per il 38% nel canale di S. Jacinto, per il 26% nel canale di Espinheiro, per il 10% nel canale di Mira e per l'8% nel canale di Ílhavo (Silva, 1994). La marea alla bocca della laguna è prevalentemente semi-diurna con una media di escursione tidale di 2 metri con un minimo di 0,6 m e un massimo di 3,2 m che corrisponde a un massimo di livello idrico di 3,5 m e un minimo di 0,3 m. Considerati questi parametri, la laguna si può definire "mesotidale" (Davies, 1964). È stato osservato che la differenza di salinità tra la superficie e il fondo è molto bassa, mentre i valori di temperatura sono sempre piuttosto bassi, la laguna quindi si può definire ben mescolata (Dias, 1999).

Le principali forze che governano la circolazione delle acque alla testa della laguna sono i flussi di acqua dolce, mentre alla bocca i flussi principali sono dati dai cambiamenti nel livello del mare che portano alternativamente ad una variazione di salinità e temperatura così come di altri parametri (Dias et al., 2005).

Da un punto di vista commerciale e dei servizi, la laguna di Aveiro costituisce un'area di importanza strategica lungo la costa portoghese, in particolare nell'area del Nord/Centro. Fornisce le condizioni naturali per la costruzione di porti, per la navigazione e per tutta una serie di servizi ricreativi, offre buone condizioni per lo sviluppo agricolo lungo i suoi margini e ha permesso lo stabilirsi di un buon numero di piccole e medie imprese. È abitata da circa 300 000 persone che vivono nelle aree costiere e nei canali interni. La pressione antropica nell'area ha condotto a una serie di problematiche legate all'inquinamento, a causa degli scarichi domestici e industriali provenienti dal bacino scolante. Offre buone condizioni per lo sviluppo agricolo lungo i suoi margini e ha permesso lo stabilirsi di un buon numero di piccole e medie imprese. È abitata da circa 300 000 persone che vivono nelle aree costiere e nei canali interni. La pressione antropica nell'area ha condotto a una serie di problematiche legate all'inquinamento. Gli studi più recenti relativi a questa tipologia di problematiche si basano sulla comprensione dei processi biologici, chimici e geologici che dipendono dall'idrodinamica della laguna (Dias et al., 1999; Vez et al., 2005).

In particolare nella Ria di Aveiro è stata osservata una notevole contaminazione da mercurio, determinata dalla presenza di reflui di origine industriale, che sono stati sversati nella laguna per almeno quattro decenni, a partire dagli anni '50 e fino al 1994 (Pereira et al., 2009). Nell'ultima decade, l'apporto di mercurio è diminuito notevolmente, ma le concentrazioni di questo elemento, nei sedimenti superficiali si mantengono tutt'ora su livelli elevati, in particolare nella baia di Laranjo e nella zona circostante (Pereira et al., 2009; Figueira et al., 2011).

EQUILIBRI DINAMICI DI METALLI E METALLOIDI IN AMBIENTI DI TRANSIZIONE

Metalli e metalloidi sono dei componenti naturali della crosta terrestre e dei suoli che risultano dalla sua erosione. Sono presenti anche nei corpi idrici in forma disciolta o associati al materiale particolato. Inoltre, si trovano anche in atmosfera in associazione con il particolato, con l'aerosol e, in qualche caso, anche in forma gassosa (Luoma and Rainbow, 2008).

Tali elementi sono soggetti a un equilibrio dinamico che ne comporta la distribuzione tra uno stock e l'altro secondo flussi descrivibili mediante tassi di movimento e ripartizione a partire dai quali è possibile distinguere il contributo umano da quello dei naturali cicli biogeochimici (Luoma and Rainbow, 2008).

Tali cicli comportano la mobilitazione e la deposizione del metallo o metalloide tra canali, fiumi, laghi, estuari, oceani, rocce, suoli e atmosfera. I tassi di movimento tra i diversi comparti sono un elemento centrale dei cicli biogeochimici e l'influenza primaria dell'uomo in questo contesto è quella di fungere da "acceleratore" di flussi. (Luoma and Rainbow, 2008) La conoscenza della natura dei cicli biogeochimici degli elementi è di fondamentale importanza per riuscire a quantificare gli input antropici. L'azione umana infatti, può accelerare l'immissione di contaminanti da uno stock a un'altro e in questo modo, intervenire sul quantitativo presente anche in altri depositi. (Luoma and Rainbow, 2008) In particolare, a livello locale tale accelerazione può comportare l'accumulo di elementi fino a concentrazioni che eccedono in larga misura quelle che le forme di vita presenti sulla terra abbiano mai sperimentato durante il loro percorso evolutivo, tanto da metterle a rischio di estinzione. (Luoma and Rainbow, 2008)

I diversi comparti del sistema terrestre sono collegati in modi complessi, l'atmosfera interagisce con gli oceani e la terraferma facilitando i flussi di elementi tra gli uni e l'altra fungendo molto spesso da vettore di trasporto sia su scala locale che anche su base globale. I flussi di acqua dolce mobilitano grandi masse di metalli e metalloidi, costituendone il principale input nelle acque costiere. (Luoma and Rainbow, 2008)

Metalli e metalloidi, caratterizzati da persistenza, bioaccumulabili e tossici, vengono rilasciati negli ecosistemi di transizione con sempre maggiore frequenza e intensità. Tali ecosistemi costituiscono un vero e proprio "filtro" per quanto riguarda tutto il materiale che dalla terraferma fa il suo ingresso nei mari e negli oceani, rivestendo quindi un ruolo cruciale nel determinare il destino delle sostanze inquinanti all'interfaccia tra la terra e i grandi corpi d'acqua (Du Laing, 2011).

Il destino dei contaminanti rilasciati dalle attività antropiche è influenzato dalle caratteristiche del corpo idrico recettore. In particolare, all'interfaccia tra l'input di acqua dolce e il bacino di acqua salata (recettore) avvengono una serie di processi di trasferimento di metalli e metalloidi tra la fase acquosa e la fase sedimentaria. Tale equilibrio è molto complesso e ne fanno parte, oltre che all'acqua dolce e all'acqua salata, anche il sedimento, che è stato individuato come terzo fondamentale membro del sistema (Chester, 2003), tanto che, nonostante il miglioramento delle norme che regolano gli scarichi e la restrizione della aree di possibile sversamento, l'eredità legata ai sedimenti contaminati rimane (Kalnejais et al., 2015). Infatti, in molte regioni è stato dimostrato che l'apporto di metalli e metalloidi alla colonna d'acqua provenga per la maggior parte dai sedimenti marini piuttosto che dalle acque fluviali (Rivera-Duarte and Flegal, 1994, 1997a).

Lo studio dei principali meccanismi che regolano tali dinamiche è complicato dai numerosi processi coinvolti, ma anche dalle caratteristiche fisico-chimiche di acqua e sedimento, come potenziale redox, pH, ossigeno disciolto, salinità e temperatura.

Metalli e metalloidi vengono veicolati da fiumi, canali e precipitazioni atmosferiche sotto forma disciolta, colloidale o in associazione al materiale sospeso. La maggior parte dei metalli presenti negli ambienti d'acqua dolce viene trasportata in associazione alle particelle a granulometria fine e alla materia organica, che sono molto efficienti nel catturare i metalli disciolti (Forstner and Wittman, 1981; Windom et al., 1989).

Il destino dei metalli che arrivano in lagune ed estuari è influenzato da una serie di processi che ne alterano la distribuzione tra fase disciolta e fase sospesa. Ad esempio, nelle zone estuarine, a ridosso della terraferma, il mescolamento tra acque dolci e salate provoca un brusco cambiamento delle condizioni chimico-fisiche della colonna d'acqua e, di conseguenza, anche la modificazione dello stato chimico e aggregativo dei metalli. In particolare, le variazioni di salinità, pH, temperatura e condizioni ossido-riduttive innescano una serie di processi che possono causare una rimozione anche consistente dei metalli pesanti dalla fase disciolta ed un conseguente loro accumulo nel sedimento (Salomons, 1985; De Pol, 2009). È allora evidente che tutti i processi che comportano il trasferimento dei metalli dalla fase acquosa alla fase sedimentaria non sono definitivi, poiché il cambiamento delle condizioni ambientali può comportare la ridistribuzione dei metalli tra le varie fasi geochimiche e quindi variarne la disponibilità.

I principali processi che si possono verificare sono i seguenti:

- rilascio, da parte del particolato, dei metalli adsorbiti; il deadsorbimento è favorito dall'aumento della concentrazione ionica;

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

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

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

Il materiale organico e gli ossidi/idrossidi di Fe e Mn possono partecipare in modo diretto alla formazione di flocculi con le particelle argillose, depositandosi sotto forma di film sugli aggregati appena formati, contribuendo così a stabilizzarli (Aston e Chester, 1976; Burton, 1976). Infatti, le secrezioni polimeriche batteriche (biofilm microbici) hanno un ruolo significativo negli ambienti intertidali, non solo perché influenzano i legami e la concentrazione dei contaminanti, ma anche perché hanno un ruolo nel determinare il loro passaggio nella catena trofica (Du Laing, 2012).

Gli aggregati di particelle fini rimangono in sospensione più o meno a lungo, tendendo comunque a sedimentare ed accumularsi nelle zone a basso fondale con scarsa idrodinamica. Poiché i metalli pesanti di origine antropica sono trasportati principalmente assieme alle particelle di piccole dimensioni, le aree di deposizione delle particelle fini rappresentano le zone di maggior accumulo dei metalli pesanti (De Pol, 2009; Luoma e Rainbow, 2008).

Nel caso particolare della Laguna di Venezia, i luoghi più soggetti a questo fenomeno di accumulo sono le velme e le paludi, dove la corrente è scarsa, e le aree estuarine a basso

fondale, che rappresentano le zone di primo impatto dei carichi inquinanti provenienti da fiumi e canali (Argese et al., 1992).

Una volta raggiunto il fondale, le forme associative dei metalli possono subire ulteriori cambiamenti in seguito a processi di diagenesi, all'attività bentonica e batterica presente nel fondale e a variazioni nelle condizioni chimico-fisiche del sedimento (Salomons, 1985; Kalnejais, 2015).

I metalli pesanti si trovano distribuiti fra i vari componenti del sedimento secondo forme associative che si differenziano per l'intensità e per il tipo di legame metallo-matrice. Ciascuna di queste forme presenta una diversa possibilità di rilascio verso l'ambiente acquatico (De Pol, 2009).

Metalli e metalloidi possono essere:

- presenti in forma solubile (ioni liberi, complessi organici o inorganici);
- direttamente scambiabili (adsorbiti mediante legami deboli al particolato fine);
- precipitati come composti inorganici (es. solfuri insolubili, carbonati);
- presenti come complessi di molecole organiche ad alto peso molecolare (acidi umici);
- legati a ossidi e idrossidi insolubili;
- legati al reticolo cristallino della struttura primaria dei minerali.

Il loro destino dipende da numerosi fenomeni come l'adsorbimento e il desorbimento, la precipitazione e la dissoluzione, la complessazione e la decomplessazione che dipendono da una vasta gamma di variabili in continua evoluzione a partire dal potenziale redox che condiziona fortemente la disponibilità di legami liberi per l'adsorbimento, la precipitazione e la complessazione, oltre che influenzare direttamente lo stato redox di metalli e metalloidi (Du Laing, 2012).

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

Al contrario, i metalli presenti come impurezze all'interno della struttura reticolare dei minerali detritici provenienti dalla degradazione delle rocce non sono disponibili o, più precisamente, possono passare in soluzione solo entro tempi geologici, in seguito all'erosione del minerale. Questi metalli costituiscono la frazione naturale o residuale (De Pol, 2009).

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

La speciazione geochimica nell'ambito della caratterizzazione dei sedimenti

La legislazione ambientale che riguarda i livelli di rischio sito-specifici nell'ambito della contaminazione di metalli e metalloidi nelle acque superficiali, nei sedimenti e nei suoli delle pianure alluvionali è ancora basata sulla misura del contenuto totale di contaminanti piuttosto che sulla relativa reale o potenziale esposizione nel lungo periodo (Du Laing, 2012). Come è stato già più volte sottolineato, le variazioni delle proprietà fisico-chimiche dell'ambiente spesso influenzano la mobilità di metalli e metalloidi come anche la loro biodisponibilità e tossicità specialmente negli ambienti di transizione (Luoma and Rainbow, 2008; Du Laing, 2012). Quindi, la misura delle loro concentrazione totale, non può essere considerata come un parametro realmente rappresentativo dei rischi veri o potenziali cui è soggetta una determinata matrice. Tali rischi possono invece essere valutati a partire dal reale assorbimento dei contaminanti da parte degli organismi, ma anche sulla base della distribuzione del metallo o metalloide nelle diverse possibili forme chimiche associate al particolato, piuttosto che disciolte in fase liquida. Le reazioni di precipitazione e dissoluzione, specialmente di ossidi e idrossidi di Fe e Mn, come anche la precipitazione in forma di solfuri acquisiscono una grande importanza in seguito alla riduzione del particolato sospeso inizialmente in forma ossidata, come anche nel caso di sedimenti e suoli appartenenti a barene, velme, ghebi e paludi (Du Laing, 2012). Quindi, per valutare le problematiche connesse al crescente input di metalli e metalloidi nell'ambiente c'è la necessità di adottare procedure analitiche che possano aiutare nella comprensione del tipo di rischio collegato a ciascuna forma chimica in cui sono presenti i contaminanti in base alla specie target desiderata e in ultima analisi all'uomo. Le procedure di estrazione sequenziale sono state sviluppate per valutare il rischio connesso al rilascio di metalli dalla fase associata a suoli/sedimenti alla colonna d'acqua in seguito a diverse possibili variazioni delle variabili chimico-fisiche più importanti (Du Laing, 2012).

In questo contesto, le procedure di speciazione geochimica, che consentono di determinare la ripartizione dei metalli tra le diverse fasi geochimiche che compongono il sedimento, possono fornire informazioni importanti riguardo alla possibilità di rilascio dei metalli nella colonna d'acqua, alla loro biodisponibilità ed alla loro origine (De Pol, 2009).

I vari protocolli disponibili in letteratura relativi alla procedura di estrazione sequenziale, o speciazione geochimica, includono generalmente un certo numero di soluzioni estraenti che sono applicate ad una aliquota di matrice contaminata in maniera sequenziale e in ordine crescente di aggressività, in modo che le frazioni successive corrispondono a elementi sempre meno mobili. Le procedure di estrazione sequenziale forniscono informazioni dettagliate

riguardo l'origine, le modalità di solubilizzazione, di mobilità, di disponibilità biologica e fisico-chimica degli elementi nei campioni solidi e hanno dimostrato di essere in grado di fornire un mezzo adeguato per determinare gli elementi associati alle principali fasi di accumulo in suoli e sedimenti (Du Laing, 2010). In generale, si considera la partizione delle diverse forme chimiche ottenute a partire dalla speciazione come un'insieme di frazioni che vanno definite in maniera operativa poiché le soluzioni estraenti non sempre sono perfettamente selettive (Du Laing, 2012). Il contenuto totale di ciascun metallo risulta quindi ripartito in diverse frazioni, che sono generalmente indicate come frazione scambiabile, frazione associata ai carbonati, frazione associata a ossidi/idrossidi di Fe e Mn, frazione associata a materia organica e solfuri, frazione residuale.

La maggior parte del metallo di origine antropica è presente sotto forme potenzialmente disponibili e si trova principalmente in associazione a carbonati, ossidi/idrossidi di Fe e Mn, materia organica e solfuri (Forstner and Wittman, 1981). La frazione di metallo associata a queste fasi, sommata alla frazione scambiabile, costituisce la frazione non residuale del metallo totale presente nel sedimento (De Pol, 2009).

È importante sottolineare che la disponibilità al rilascio dei metalli, oltre a dipendere dalla particolare forma chimica in cui essi si trovano nel sedimento, è anche influenzata dalla struttura più o meno cristallina dei relativi componenti mineralogici (soprattutto per quanto riguarda la frazione degli ossidi-idrossidi di Fe e Mn) e dalla presenza più o meno accentuata di particelle costituite da aggregati di fasi mineralogiche diverse (De Pol, 2009; Breda, 2012).

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

La principale forma chimica in cui si trovano metalli e metalloidi in suoli e sedimenti è quella in associazione con ossidi e idrossidi di ferro e manganese con i quali hanno un altissima affinità chimica (Luoma and Rainbow, 2008; Du Laing, 2011; Eggleton and Thomas, 2004)). Tali ossidi/idrossidi, passando da condizioni ossidate a condizioni ridotte, fenomeno che si verifica soprattutto nei periodi caldi o nelle variazioni stagionali nelle aree a basso fondale, possono cambiare il loro stato di ossidazione da Fe^{3+} e Mn^{4+} , insolubili, a Fe^{2+} e Mn^{2+} , solubili. Questo processo comporta la solubilizzazione dei metalli associati agli ossidi/idrossidi di Fe e Mn, che possono in tal modo rendersi disponibili (Aston and Chester, 1976).

Un altro esempio è costituito dai solfuri, la cui origine autigenica è da ricercare in processi biologici caratteristici dei sedimenti anossici, in cui l'ossidazione batterica della materia organica è accompagnata dalla riduzione di solfati e dalla produzione di acido solfidrico, zolfo elementare

e altri composti dello zolfo. Si ha in prevalenza la formazione di solfuri di ferro, dato che, nei sedimenti, esso è il più abbondante tra i metalli che possono formare questi composti, ed in particolare di monosolfuro “amorfo” e pirite (Morse et al., 1987).

I solfuri possono subire processi ossidativi molto comuni nelle acque naturali, soprattutto negli strati superiori di sedimenti ridotti, nel momento in cui vengono a trovarsi in condizioni ossidanti. Essi vengono ossidati a solfato e lo ione ferroso, che si viene a trovare in soluzione, può essere successivamente ossidato e riprecipitare come ossido e/o idrossido (Morse et al., 1987). Tutti questi processi portano ad una variazione della ripartizione dei metalli tra i diversi livelli di profondità del sedimento.

I sedimenti di aree eutrofizzate, come ad esempio alcune zone della Laguna di Venezia, sono particolarmente ricchi di materia organica, con prevalenza di condizioni ridotte già dai primi centimetri al di sotto dell'interfaccia deposizionale (Zonta et al., 1995).

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

La disponibilità dei metalli presenti nei sedimenti può essere notevolmente influenzata, inoltre, da un effetto di schermo esercitato da materiale organico presente come ricoprimento sulla superficie di altre fasi importanti a cui i metalli sono associati. L'azione di ossidazione batterica da parte dei microorganismi presenti sul fondale, che porta alla distruzione della materia organica, può causare il rilascio dei metalli ad essa legati; può inoltre ridurre l'effetto di schermo, permettendo la rimobilizzazione dei metalli pesanti associati alle fasi mineralogiche sottostanti.

L'introduzione in Europa e le sfide attuali

La vongola verace filippina *R. philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) detta anche *Venerupis philippinarum*, è una specie di grande importanza commerciale conosciuta in tutto il mondo e considerata tra le 5 specie maggiormente prodotte a livello globale con 250000 tonnellate all'anno (Astorga, 2014). È originaria del mare Indo-Pacifico ed è stata introdotta in numerosi paesi per la pesca e l'acquacoltura (Gosling, 2003). A partire dai primi anni '70 la specie è stata introdotta in numerosi ambienti costieri anche in Europa, in particolare in Francia, Gran Bretagna, Italia, Spagna, Portogallo, solo per citare i principali paesi produttori (Chiesa et al., 2017). Le prime introduzioni in Europa risalgono al periodo 1972-1974 a opera dell'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) nella baia di Arcachon (Francia) dove vennero rilasciati un totale di 500000 giovanili e 1000 esemplari adulti provenienti dal Canada (Flassch e Leborgne 1992).

Nel 1980 la specie fu introdotta anche nel Regno Unito, in particolare nello schiuditoio di Conwy nel Galles Settentrionale, presso i laboratori del MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (Humphreys et al., 2015) e successivamente nella laguna di Venezia, attraverso le attività del Co.S.P.A.V. - Consorzio per lo Sviluppo della Pesca e dell'Acquacoltura del Veneto (Breber, 1985). La specie è stata quindi introdotta e ha poi colonizzato in fretta molte delle lagune del nord dell'Adriatico come quelle di Grado Marano, Caleri, Scardovari e Goro (Pellizzato, 1990).

In Spagna, a causa della scarsa regolamentazione, la specie era già presente alla metà degli anni '80 in numerose aree costiere (Perez-Camacho e Cuna, 1985).

Per quanto riguarda il Portogallo, la prima testimonianza relativa alla presenza della vongola verace filippina risale al 1984 nella Ria Formosa (Algarve) dove fu quasi certamente introdotta dalla Spagna (Ruano and Sobral, 2000). La specie non è mai stata autorizzata (Chainho et al., 2015) anche se l'acquacoltura è stata con molta probabilità il vettore principale per la sua introduzione (Chainho et al., 2015). A partire dagli anni '80 popolazioni ormai naturalizzate di vongola verace filippina sono state riportate in numerosi estuari in tutto il paese (Gaspar, 2010; Chainho, 2014; Chainho et al., 2015; Velez et al., 2015 a; b). Oggi la specie è considerata il bivalve più diffuso nell'estuario del Tago ed è abbondante nella Ria di Aveiro e nell'estuario del Sado (Chainho, 2014).

Per quanto riguarda la produzione commerciale di vongola verace filippina in Europa, essa deriva principalmente dalla raccolta di popolazioni selvatiche ormai naturalizzate, come accade in Francia (Bald et al., 2009), in Portogallo (Chainho et al., 2015), Spagna (Bidegain and Juanes,

2013) e in Inghilterra (Humpreys et al., 2015). Il supporto dell'acquacoltura, invece, è stato ed è di fondamentale importanza per le produzioni provenienti dalla Spagna, dal Regno Unito e dall'Italia (Chiesa et al., 2017). In particolare, nel Nord dell'Adriatico la specie si è diffusa molto velocemente a causa della rapida naturalizzazione delle popolazioni introdotte (Pellizzato, 1990). Il loro sfruttamento commerciale è diventato un'attività molto importante dal punto di vista economico tanto da costituire una delle attività più remunerative negli ecosistemi costieri di transizione ove la specie è stata introdotta. Un caso particolare è rappresentato dalla Laguna di Venezia, dove, a causa della mancanza di una adeguata regolamentazione e dell'adozione di un piano di sfruttamento non sostenibile è stata osservata una costante diminuzione della sua produzione (Boscolo Brusà et al., 2013). Tale situazione di declino ha, infine, determinato una recente transizione dalle attività di raccolta a quella di coltivazione vera e propria impostata sulla gestione del seme naturale (Boscolo Brusà et al., 2013). Attualmente nella laguna di Venezia la coltivazione della vongola verace filippina è condotta in specifiche aree date in concessione e gestite dai coltivatori (Boscolo Brusà et al., 2013) i quali utilizzano materiale da semina proveniente da popolazioni selvatiche naturalizzate (Chiesa et al., 2017). Un sistema di gestione analogo è stato adottato da tempo anche nelle altre lagune costiere del Nord dell'Adriatico, come ad esempio la sacca di Goro dove, grazie ad un'attenta attività di monitoraggio e gestione la produzione risulta stabile da circa tre decenni (Bartoli et al., in press).

In generale, il problema della coltivazione di questa specie in Europa è legato alla difficoltà nel reperimento del seme selvatico (Robert et al., 2013). Infatti, nonostante gli sforzi fatti sinora per migliorare la produzione di seme dagli schiuditoi, la coltivazione di vongole veraci rimane ancora fortemente dipendente dalla disponibilità di seme naturale (Robert et al., 2013; Chiesa et al., 2017).

Biologia della specie e suo ruolo come bioindicatore

I bivalvi sono molluschi caratterizzati dalla presenza di una conchiglia composta da due valve distinte ed incernierate tra loro mediante legamenti ed incastri. Le valve si aprono e richiudono grazie all'azione di robusti muscoli dorsali detti muscoli adduttori. Il corpo e il piede dei bivalvi è per lo più compresso lateralmente (figura 1). Il piede, privo della suola strisciante tipica dei Gasteropodi, si dilata per effetto della pressione sanguigna ed assume frequentemente (nei Veneridi sempre) la forma di una scure atta allo scavo dei substrati sabbiosi o fangosi: perciò i Bivalvi sono anche detti "Pelecipodi". La cavità palleale, che circonda il corpo del mollusco, è delimitata esternamente da due lembi di mantello (o pallio) che formano le valve. Nei bivalvi le branchie, che assolvono alla funzione respiratoria, sono molto sviluppate ed hanno struttura lamellare: di qui il termine "lamellibranchi" pure usato per designarli.

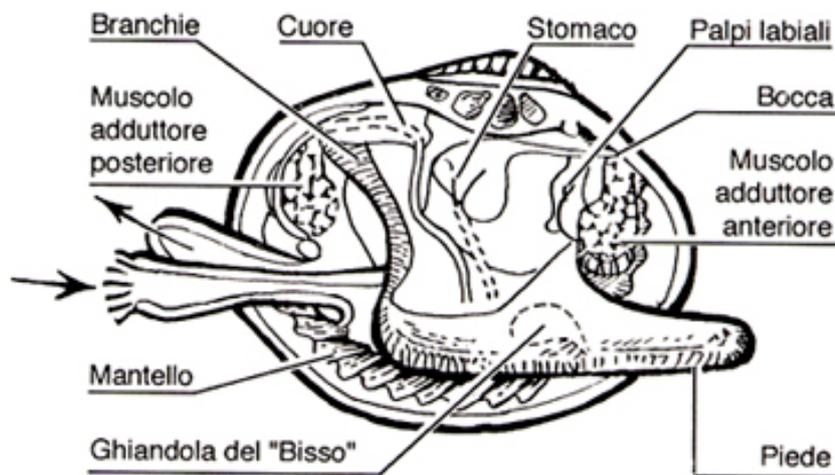


figura 1. rappresentazione schematica di *R. philippinarum* dopo rimozione della branchia superiore.

Le branchie, oltre ad assolvere alla funzione di organo respiratorio, sono generalmente adibite alla raccolta del cibo mediante il filtraggio dell'acqua. Ai due estremi dell'animale si aprono la bocca e l'ano, e la porzione posteriore dell'intestino attraversa il pericardio ed il ventricolo. Questi molluschi non possiedono un capo differenziato. I sessi sono prevalentemente separati; non mancano tuttavia le forme ermafrodite (Pellizzato, 1990). La vongola verace filippina vive al di sotto del fondale marino, infossata per alcuni centimetri e si nutre filtrando il sedimento delle acque vicine (Kanaya et al., 2005). La più importante fonte di nutrimento è data dal particolato sospeso che, soprattutto negli ambienti caratterizzati da frequenti eventi di perturbazione del fondale, viene risospeso (Chong and Wang, 2000). Tale modalità di nutrizione è detta microfagia, essa richiede l'ingestione di grandi volumi di acqua per poterne ricavare il necessario nutrimento: i movimenti ciliari delle branchie riescono a generare nell'acqua

circostante correnti che la fanno entrare all'interno (cavità del mantello). Le particelle rimangono imprigionate dalle secrezioni mucose e poi, grazie al battito ciliare, vengono avviate alla regione cefalica. Qui i palpi labiali operano una cernita del materiale convogliato: le particelle più grosse, o quelle indesiderate, vengono scartate e rigettate all'esterno come agglutinati di particelle e muco (pseudo-feci) per mezzo delle contrazioni del sifone esalante (Pellizzato, 1990).

Il volume di acqua che attraversa la cavità del mantello di un singolo animale è sorprendentemente grande (un organismo in buona salute e buone condizioni ambientali può filtrare fino a 50 litri/giorno). La corrente d'acqua è in parte utilizzata per la respirazione, anche se gli scambi di ossigeno e di anidride carbonica avvengono prevalentemente attraverso il mantello. Il meccanismo ciliare è attivo finché l'animale rimane immerso nell'acqua. Quando l'animale rimane allo scoperto in occasione delle basse maree o infossato nel sedimento (anche 10-12 cm), le valve si chiudono e l'anidride carbonica si accumula nella cavità del mantello. La conseguente diminuzione del pH deprime l'attività ciliare fino a sopprimerla. Non appena l'animale si trova nuovamente immerso nell'acqua le ciglia riacquistano la loro motilità (Pellizzato, 1990).

Proprio in virtù della sua tipologia di alimentazione, i molluschi marini e, in particolare, le specie fossorie che filtrano il sedimento, sono state molto spesso definite indicatori sensibili per il monitoraggio di sostanze tossiche nelle acque, perché sono in grado di offrire un'informazione integrata nel tempo di quelle frazioni di carico totale di contaminanti che hanno una effettiva rilevanza tossicologica e che, in buona sostanza, contribuiscono a elaborare la valutazione di rischio ecologico (Hagger et al., 2008). Il loro impiego è stato principalmente basato sulla valutazione del livello di contaminanti presente nei tessuti e sulla determinazione dei biomarker come indicatori del loro effetto sull'organismo (Livingstone, 1993).

Dal punto di vista strettamente fisiologico, i molluschi sono un buon indicatore dello stato di contaminazione da metalli e metalloidi proprio per la tolleranza che dimostrano verso questa tipologia di contaminanti. Gli alti livelli di metalli in tracce presenti nei Molluschi marini si spiegano se si vanno a considerare i tre meccanismi di escrezione e detossificazione principali di questi organismi:

- chelazione grazie a ligandi specifici: esistono infatti meccanismi di trasformazione chimica che riducono la disponibilità intracellulare di ioni metallici: ad esempio possono essere inclusi in strutture proteiche complesse a formare complessi di chelazione (metallotioneine) (Dallinger, 1995);

- compartimentazione intracellulare all'interno di lisosomi: questi organelli intracellulari funzionano come il sistema digestivo della cellula, e quindi accumulano dal citoplasma prodotti di scarto cellulare che non possono essere degradati, tra cui ioni metallici (Dallinger, 1995);
- formazione di precipitati insolubili, ovvero la formazione dei cosiddetti "granuli" cioè depositi inorganici circondati da membrana (Taylor, 1995).

Svariati bivalvi filtratori di sedimento sono stati testati con successo, incluse alcune specie di vongole come *Mya arenaria*, *Ruditapes (=Tapes) decussatus* e *Ruditapes (=Tapes) philippinarum* (Bebiano et al., 2003; Blaise et al., 2002; Paul-Pont et al., 2010). In particolare, la vongola verace filippina (*R. philippinarum*, figura 2) è stata suggerita come specie adatta al biomonitoraggio in aree di transizione, in primis per la sua larga diffusione in queste zone, ma



figura 2. Esempolari di vongola verace filippina *R. philippinarum*

anche per la sua importanza ecologica e il suo valore commerciale (Ji et al., 2006; Li et al., 2006). Infatti, questa specie è dotata di una veloce capacità di adattamento in diversi ambienti e di una crescita molto rapida (Usero et al., 1997) tanto da aver indotto considerevoli cambiamenti nell'ambito dello sfruttamento delle risorse in diversi sistemi acquatici (Velez et al., 2015). Da un punto di vista dei marker biochimici, tuttavia, gli studi condotti in campo hanno fornito dei risultati contrastanti e non sempre incoraggianti sulle reali capacità di utilizzo della vongola verace filippina come bioindicatore della qualità ambientale, suggerendo che le risposte biochimiche possano essere influenzate da numerosi fattori ambientali che possano limitarne la specificità (Moschino et al., 2012; Matozzo et al., 2012).

Questo organismo comunque si presta ad essere oggetto di analisi tossicologiche retrospettive, che si basano sull'impiego di analisi chimiche finalizzate all'identificazione del livello di

contaminanti potenzialmente biodisponibili (monitoraggio chimico) e alla valutazione del contenuto di contaminanti effettivamente presenti nell'organismo (monitoraggio biologico). Tale approccio è ampiamente riconosciuto come valido da molto tempo tanto che anche la normativa nazionale ne riconosce l'importanza (WFD 2000/60/CE e leggi nazionali).

Nel presente studio, la vongola verace filippina è stata utilizzata in particolare per confrontare i risultati ottenuti nell'ambito del bioaccumulo con i risultati della speciazione geochimica condotta sul sedimento. Quest'ultima fornisce dei risultati che si riferiscono a dinamiche e processi in continua evoluzione, al contrario del bioaccumulo, le cui cinetiche sono generalmente più lente e in grado di dare informazioni storizzate. I due differenti approcci sono però complementari, poiché, a partire dai livelli di bioaccumulo dei differenti metalli e metalloidi è possibile ipotizzare quali siano le dinamiche biogeochimiche di dissoluzione e solubilizzazione dei contaminanti più attive e frequenti nella matrice analizzata. In questo, senso, la risposta del bioindicatore viene valutata soltanto a confronto con la quota di metallo o metalloide che si è resa effettivamente biodisponibile nel tempo e contribuisce a chiarire quali siano le forze di maggior peso nel complesso sistema sedimento-acqua-biota negli ambienti di transizione.

Tabella 1 Siti di indagine sui quali si sono svolti gli studi presentati posti a confronto con i dati rilevati per i *siti della Laguna di Venezia (da Bacarani, 2012), per i *siti del Delta del Po (da Bacarani, 2012) e per i **siti della Laguna di Marano (da Breda, 2012) con relativi acronimi

area di campionamento	nome del sito	acronimo	coordinate GPS
Laguna di Venezia	Area della Busa	A *	45°23'043''N 12°16'66'' E
	Palude del Monte	B *	45°28'23'' N 12°22'66''E
	Valle delle Dolce	H *	45°13'24''N 12°14'02''E
	Zona Industriale	ZI *	45°26'64''N 12°17'02''E
	Sant'Angelo della Polvere	C	45°24'003'' N 12°16'206'' E
	San Marco in Boccalama	D	45°23'392'' N 12°16'243'' E
Delta del Po	Laguna della Marinetta	MR *	45°02'31''N 12°22'36''E
	Laguna di Caleri	VL *	45°05'27''N 12°19'29''E
	Sacca degli Scardovari	SC *	44°51'45''N 12°25'10''E
Laguna di Marano	Marano Nord Ovest	UD16 **	45.705717 N 13.133867 E
	Marano Sud Est	UD15 **	45.708467 N 13.10605 E
Canale di Mira (Ria de Aveiro)	Costa Nova A (Aveiro)	CN A	4954672.5 N 973612.9 W
	Costa Nova B (Aveiro)	CN B	4955398.1 N 973759.2 W
	Costa Nova C (Aveiro)	CN C	4956308.5 N 973729.8 W
Canale di ìlhavo (Ria de Aveiro)	ìlhavo A	ÌL A	4955108.7 N 966568.6 W
	ìlhavo B	ÌL B	4955244.8 N 966430.4 W
	ìlhavo C	ÌL C	4955583.6 N 966330 W
Canale di S. Jacinto (Ria de Aveiro)	Torreira A	TR A	4976977.2 N 968229.4 W
	Torreira B	TR B	4976532.19 N 968147.6 W
	Torreira C	TR C	4975732.9 N 967950.64 W

MATERIALI E METODI

ANALISI AMBIENTALI

Disegno sperimentale e campionamenti

Le aree di campionamento situate nelle tre lagune oggetto del presente studio (figure 3 e 4) sono state selezionate fra quelle per le quali è riportata la presenza di esemplari di *R. philippinarum* destinati al consumo alimentare. Sono stati raccolti contestualmente sia campioni di sedimento marino appartenenti allo strato superficiale (8-10 cm di profondità) che esemplari di vongola verace filippina. Per ogni sito analizzato nelle tre aree studiate il campione di

sedimento analizzato deriva dall'omogenizzazione, svolta in sito, di tre repliche distinte raccolte nel punto di campionamento corrispondente alle coordinate GPS riportate in tabella 4.

Le operazioni di prelievo del sedimento e degli organismi sono state svolte a motore spento, per evitare eventi di risospensione e soprattutto ridurre al minimo il rischio di contaminazione dei sedimenti (e delle acque interstiziali) causato dai fumi di scarico derivanti dalla combustione del carburante. I prelievi di sedimento sono stati tutti effettuati mantenendo l'imbarcazione controcorrente, di modo che gli strascichi di carburante non potessero generare una contaminazione secondaria. Gli strumenti scelti e utilizzati per tutte le operazioni di campionamento sono costituiti da materiale plastico e pertanto, non rappresentano una fonte di contaminazione per quanto riguarda gli analiti sui quali è concentrato lo studio. I campioni sono stati posti in contenitori in HDPE e conservati a -20°C per preservarne le caratteristiche fisico-chimiche in attesa delle successive analisi chimiche e granulometriche. In ogni sito di campionamento grazie a una sonda multi parametrica sono stati raccolti dati ambientali relativi al sedimento marino, come pH, salinità, potenziale redox e temperatura.

I prelievi di organismi sono stati condotti nelle diverse lagune nel rispetto delle differenze legate alla particolare morfologia e alle pratiche gestionali adottate in ciascuna area di studio.

Nelle lagune di Venezia e Marano, dove la specie è oggetto di coltivazione in aree delimitate e gestite tramite concessioni e dove i fondali sono piuttosto bassi, è stato possibile un prelievo manuale o automatizzato degli organismi; mentre nella Ria di Aveiro, dove le profondità sono maggiori e manca una gestione sistematica della risorsa, la raccolta è stata effettuata da sommozzatori nelle aree più prossime a quelle del prelievo dei sedimenti.

Nel caso delle analisi condotte sui campioni prelevati nelle lagune di Venezia e Marano, si è potuto disporre anche di campioni sottoposti allo spurgo, condotto con acqua salata pulita per 48 ore in appositi impianti industriali.

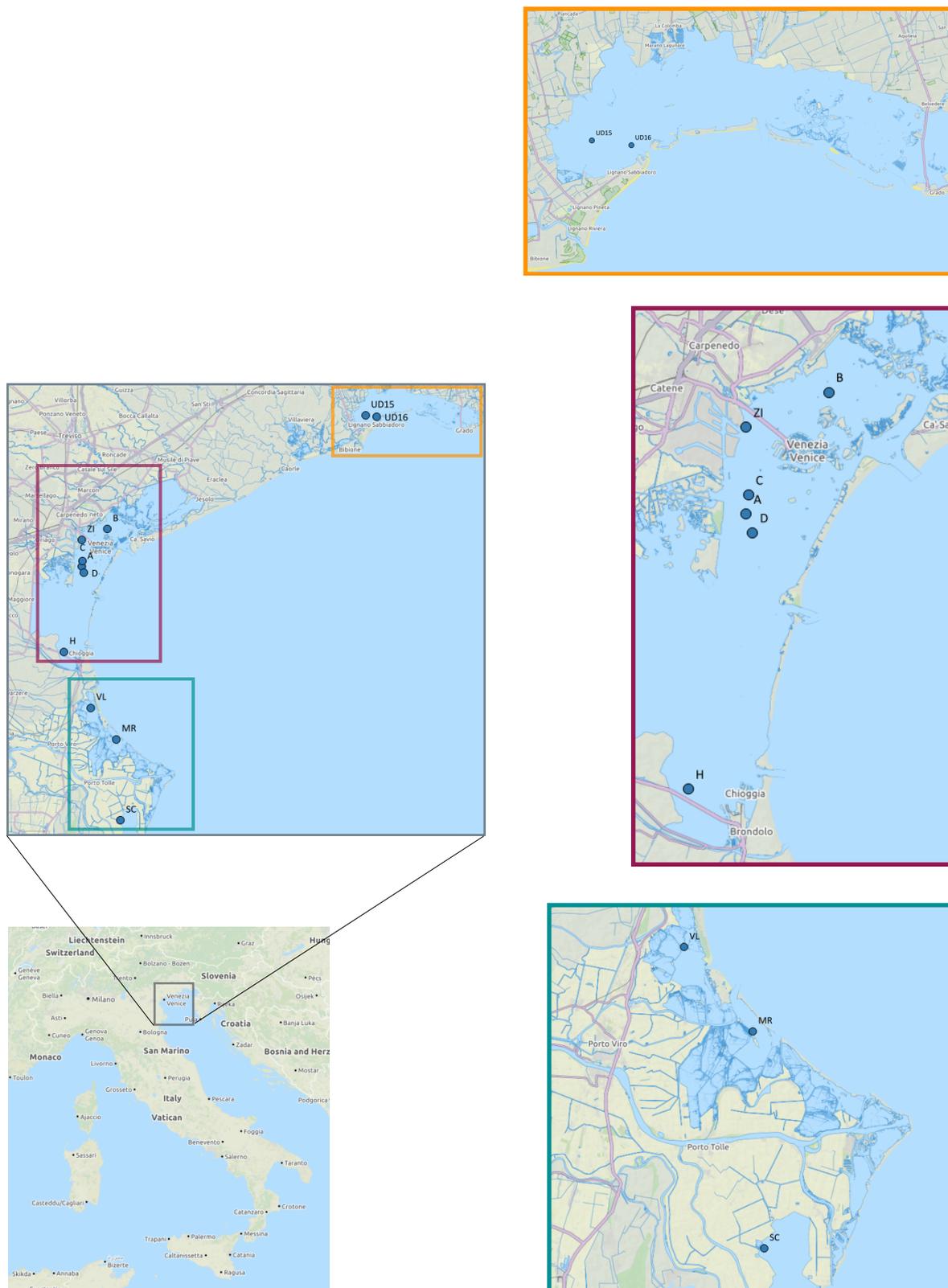


figura 3. Mappa dei siti di campionamento dell'Alto Adriatico; vengono qui illustrati anche i siti campionati nell'area del Delta del Po (in Baccarani, 2012).

Studio della granulometria

Le indagini granulometriche hanno rivestito un ruolo importante nell'ambito di questa tesi e sono state condotte utilizzando due diverse metodiche, per caratterizzare il sedimento nella maniera più completa possibile.

È stato eseguito sia un protocollo di analisi mediante una più convenzionale tecnica LISST (Laser In Situ Scattering and Transmissometry), sia una procedura di setacciatura a secco che è stata messa a punto al fine di evitare di alterare in alcun modo la struttura aggregativa del sedimento marino e mantenendo quindi inalterate le eventuali conformazioni degli agglomerati di particellato e biofilm organici.

L'analisi granulometrica LISST è stata effettuata in collaborazione con l'istituto ISMAR dal gruppo di Ricerca del Dr. Luca Zaggia. L'analisi LISST consente di ottenere la distribuzione granulometrica del materiale analizzato mediante il principio della diffrazione di un fascio laser. Il fascio laser è prodotto da un diodo con emissione a 670nm. Dopo che il raggio laser ha interagito con le particelle da analizzare, viene concentrato verso una serie di rilevatori, costituiti da 32 anelli concentrici di silicio. Poiché all'aumentare delle dimensioni delle particelle gli angoli di scattering diminuiscono, gli anelli più interni sono predisposti per rilevare le particelle di maggiori dimensioni. Successivamente al sistema di rilevatori è posta l'elettronica necessaria per preamplificare il segnale e processarlo. Dall'intensità di scattering si ricava la distribuzione granulometrica attraverso la relazione:

$$E=K NV$$

Dove E è l'energia angolare di scattering misurata, K una costante dipendente dallo strumento e NV la distribuzione granulometrica corrispondente alla distribuzione volumetrica. La distribuzione granulometrica così ottenuta è suddivisa in 32 classi comprese tra 2.5 e 500 μm (in questo caso), espresse come concentrazione volumetrica ($\mu\text{l/l}$).

I campioni sono stati preventivamente quartati in modo da ottenere un'aliquota rappresentativa. Tale aliquota è stata quindi immersa in un becker contenente acqua distillata e passata nel bagno ad ultrasuoni per disgregare eventuali colloidali. Successivamente si è utilizzato un agitatore magnetico per mantenere il campione mescolato e tramite una pipetta è stata prelevata una quantità tale da riempire la cella di misura del LISST (100 ml). Anche il sub campione immesso nel LISST viene mantenuto in agitazione al fine di ottenere una distribuzione rappresentativa.

La setacciatura a secco invece, è stata svolta in collaborazione con il laboratorio L.A.M.A. dell'Università IUAV di Venezia diretto dal prof. Fabrizio Antonelli. Tale analisi ha previsto l'utilizzo di un setacciatore meccanico sul quale sono stati montati vagli di maglia 2 mm; 0,063

mm e 0,025 mm. I vari setacci sono stati impilati uno sull'altro a maglie decrescenti e i campioni sono stati omogenizzati e poi posti a monte del primo setaccio. Una volta coperto il setaccio più in alto e assicurato l'intero sistema mediante una pressa a vite, è stato avviato il sistema di agitazione automatica per alcuni minuti. Una volta terminata la setacciatura le varie frazioni:

- > 2 mm
- 2 mm ÷ 0,063 mm
- 0,063 mm ÷ 0,025 µm
- < 25 µm

sono state recuperate e pesate mediante bilancia analitica per stabilirne il peso. A partire dal contributo percentuale di ciascuna frazione (in peso) è stato possibile ricavare la descrizione granulometrica di ogni campione.

Trattamento dei campioni per l'estrazione di metalli e metalloidi

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

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

I contenitori utilizzati per lo stoccaggio, la conservazione e l'estrazione dei campioni e delle soluzioni, sono in vetro Pyrex, polietilene e teflon e prima dell'uso sono stati preventivamente trattati secondo una procedura già descritta in letteratura (Batley e Gardner, 1977). Il protocollo prevede l'immersione dei contenitori in una soluzione di HNO₃ 0,1M per 48 ore, il loro lavaggio con H₂O Milli-Q, e la loro conservazione in sacchetti di plastica fino al momento dell'uso.

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

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

Tutti gli standard e le soluzioni diluite contenenti i metalli estratti sono stati preparati in HNO₃ 0,1M, per mantenere un ambiente acido ed evitare la precipitazione dei metalli disciolti.

Per la preparazione del modificatore di matrice, usato per migliorare la determinazione di Pb e Cd con il fornello di grafite, sono stati utilizzati Mg(NO₃)₂ 6H₂O allo 0,2%.

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

Digestione totale di campioni di sedimento marino

I campioni di sedimento marino sono stati congelati e successivamente sottoposti a liofilizzazione e omogenizzazione per poter procedere alla digestione acida mediante digestore microonde.

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

A tale scopo, sono stati pesati circa 0,1 g di campione di sedimento liofilizzato ed omogenizzato e si è seguito il protocollo che ha previsto:

- Aggiunta di 5 ml di acqua Milli-Q;
- Aggiunta di 3 ml di acqua regia (costituita da HNO₃ e HCl in rapporto 1:3);
- Aggiunta di 1.5 ml di HF (48%) allo scopo di sciogliere i silicati;
- Prima digestione in microonde per circa 1 h a $T_{\max}=180$ °C, $P_{\max}=140$ psi e potenza pari al 100%;
- Aggiunta di 7 ml di una soluzione satura di H₃BO₃ allo scopo di neutralizzare l'acido fluoridrico che non ha reagito;
- Secondo ciclo di digestione in microonde, alle stesse condizioni del precedente.

Il digestore utilizzato è il modello CEM MDS-2000, il quale è munito di sistemi di controllo continuo della temperatura e della pressione ($T_{\max}=200$ °C e $P_{\max}=200$ psi) e permette la regolazione dei valori di potenza fino ad un massimo di 630 W. I programmi possono essere eseguiti in più step, fino ad un massimo di cinque.

Tramite questo strumento è stata effettuata la mineralizzazione dei campioni in contenitori di teflon PFA®, posti in una camicia esterna finalizzata a garantire resistenza meccanica. Ogni contenitore è munito di coperchio in cui viene inserita una membrana di sicurezza in grado di rompersi nel caso si generino pressioni troppo elevate all'interno del contenitore, permettendo la fuoriuscita di gas o soluzione attraverso un apposito tubicino collegato con un contenitore esterno. Il sistema contenitore-coperchio si chiude ermeticamente tramite un tappo a vite. Il contenitore di controllo è munito di un tappo a tre vie che permette l'inserimento all'interno del campione di sonde per controllare la temperatura e la pressione.

La soluzione finale (limpida e senza residui) è stata filtrata con filtri di acetato di cellulosa di diametro 0,45 µm e portata a volume noto (50 ml). Le soluzioni così ottenute sono state

conservate a 4 °C in contenitori di polietilene siglati fino al momento dell'analisi effettuata mediante tecnologia ICP-MS.

La quantificazione di Hg nel sedimento è stata invece effettuata mediante spettroscopia di assorbimento atomico utilizzando la tecnica VGA-77 a vapori freddi. La soluzione ottenuta dalla digestione acida del campione contenente Hg²⁺ e una soluzione contenente SnCl₂ (25% w/v) in HCl (20% v/v) vengono convogliate in una serpentina mediante pompa peristaltica, dove Hg²⁺ viene ridotto a mercurio metallico. La miscela ottenuta viene inviata in un separatore liquido-vapore dove viene gorgogliato un flusso di Ar che rende possibile lo strippaggio dei vapori di Hg nella cella di quarzo posta lungo il cammino ottico dello strumento dove l'elemento viene analizzato e quantificato.

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

Digestione totale di campioni di *R. philippinarum*

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

Sono state analizzate 3 repliche per ogni stazione e ogni replica è stata ottenuta da un pool di circa 6 organismi sottoposti a congelamento a -20°C e successivamente liofilizzato.

Dopo opportuna omogenizzazione del campione liofilizzato mediante azoto liquido e mortaio, è stata applicata la metodica di estrazione acida e digestione in microonde che prevede:

- prelievo di 0,15 g di campione;
- aggiunta di 2 ml di acqua Milli-Q;
- aggiunta di 3 ml di HNO₃ concentrato (75%, 15,5 M);
- aggiunta di 2 ml di H₂O₂ al 30%;
- digestione in microonde CEM Explorer SPD Plus 24/28 a 175° per 12 minuti a 400 Psi, potenza 300 W;
- recupero del campione in 50 ml di volume con acqua Milli-Q.

Tale metodica ha consentito la solubilizzazione completa della biomassa e i campioni così ottenuti sono stati analizzati mediante spettrometria di massa con sorgente al plasma di Argon accoppiato induttivamente (ICP-MS Nexion 300 Perkin Elmer).

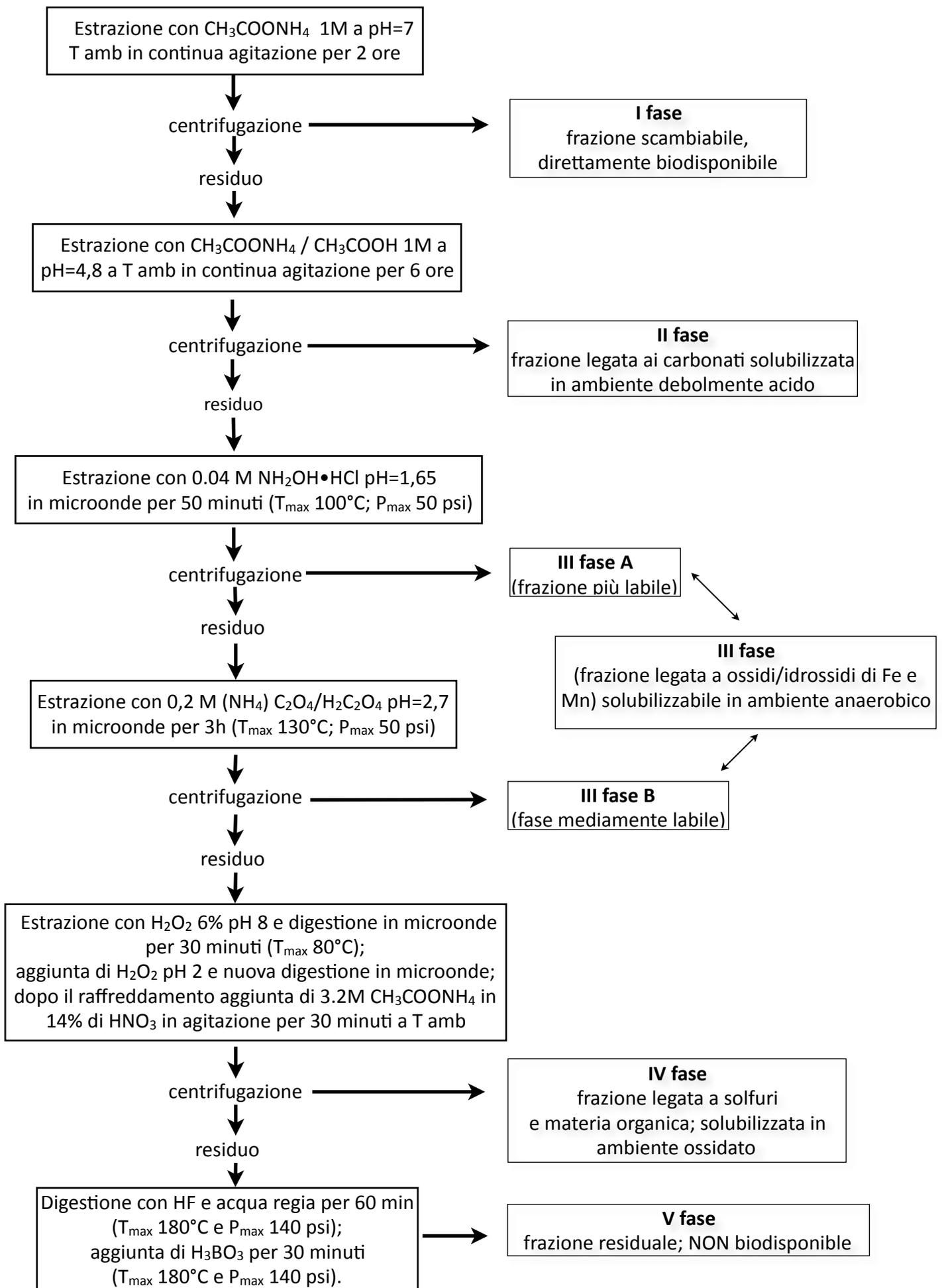


figura 5: schema di speciazione geochimica

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

Speciazione Geochimica

La determinazione del contenuto totale di metalli e metalloidi nei campioni di sedimento è un'informazione che risulta insufficiente ai fini della valutazione delle loro frazioni biodisponibili e quindi realmente assimilabili dagli organismi presenti. Al contrario, l'analisi di speciazione geochimica permette di prevedere, attraverso l'applicazione ai campioni di sedimento di un protocollo di estrazione sequenziale e selettivo, che simula le diverse condizioni ambientali (pH, Eh, salinità) a cui la matrice può essere periodicamente sottoposta, i differenti scenari sulla ripartizione, mobilità, biodisponibilità e bioaccumulo dei diversi elementi nelle matrici di interesse. Pur risultando un metodo laborioso e complesso, la speciazione geochimica risulta la tecnica più idonea a fornire informazioni riguardo la chimica del metallo presente nella matrice suolo/sedimento. La procedura impiegata si è basata su quella proposta da Tessier (Tessier et al., 1979) ottimizzata nel corso di studi successivi (Argese et al., 2003). Il protocollo utilizzato in questo lavoro di tesi è articolato in cinque fasi, come riportato nello schema di figura 5. La procedura di speciazione geochimica è stata applicata sui campioni tal quali e, dove possibile, sulle diverse frazioni granulometriche ricavate dalla procedura di setacciatura a secco riportata nel paragrafo relativo allo studio della granulometria. L'estrazione della prima fase viene eseguita su un'aliquota di circa 1,4 g di sedimento liofilizzato, ed omogeneizzato. Ciascuna estrazione successiva viene eseguita sul residuo della precedente.

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

Le analisi sono state effettuate mediante ICP-MS Nexion 300 Perkin Elmer in triplicato per ogni campione prelevato e, laddove necessario, sono state eseguite delle verifiche mediante spettroscopia ad assorbimento atomico con lo strumento Spectra 250 Plus Varian, sia nella configurazione con bruciatore ad aria/acetilene, che nella configurazione con fornello di grafite.

La **1° fase** (frazione scambiabile) comprende i metalli adsorbiti sul suolo fisicamente o mediante processi di scambio cationico. La soluzione estraente utilizzata è $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1 M a $\text{pH}=7$. Il campione viene trattato con 20 ml di tale soluzione, agitato per 2 ore e quindi trattato come sopra descritto.

La **2° fase** (frazione legata a carbonati) comprende i metalli associati ai carbonati più labili nel suolo, e la sua stabilità è funzione del pH . La soluzione estraente è $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1 M a $\text{pH}\sim 4.8$. Il residuo proveniente dalla prima estrazione viene trattato con 30 ml di soluzione, agitato per 6 ore e trattato come sopra descritto.

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

- frazione più labile: la soluzione estraente è $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.04 M in CH_3COOH al 25% e consente di solubilizzare principalmente gli ossidi di manganese, più facilmente riducibili. Un'aliquota di campione di circa 1.4 g viene trattata con 30 ml di questa soluzione in digestore a microonde per 30 min a $T_{\text{max}}=100^\circ\text{C}$, $P_{\text{max}}=50$ psi e potenza del digestore pari al 100%. L'estratto è poi trattato come descritto in precedenza;
- frazione mediamente labile: il residuo viene trattato con 50 ml di una soluzione di acido ossalico 0.2 M a pH 3, in grado di solubilizzare gli ossidi di ferro amorfi o con basso grado di cristallinità. L'estrazione viene condotta in digestore a microonde per 3 ore a $T_{\text{max}}=100^\circ\text{C}$, $P_{\text{max}}=50$ psi e potenza del digestore pari al 100%, quindi il campione viene trattato come descritto sopra.

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

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

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

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

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

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

Controllo qualità del dato analitico

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

L'accuratezza e la precisione delle procedure utilizzate per la determinazione del metallo totale nel sedimento sono state stimate analizzando due materiali di riferimento certificati: il PACS-2 (National Institute of Standards and Technology) e MESS-3 (National Research Council of Canada), i quali sono stati sottoposti simultaneamente e in tre repliche allo stesso trattamento dei campioni di sedimento e successivamente analizzati.

I valori di concentrazione riscontrati sono stati confrontati con i valori di riferimento certificati. I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 2a e 2b, i valori di concentrazione riportati sono stati ottenuti mediante ICP-MS (per As, Cd, Cr, Cu, Ni e Zn) e AAS (Fe e Hg).

Tabelle 2a e 2b Confronto tra valori di concentrazione certificati e valori di concentrazione ottenuti da digestione totale e analisi mediante ICP-MS e AAS.

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

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

Allo stesso modo, per validare le procedure di digestione degli organismi e l'affidabilità delle analisi dei metalli, sono stati simultaneamente analizzati i campioni di DORM-2 (muscolo di pesceccane liofilizzato National Research Council of Canada) e NIST (-SRM 2976, National Institute of Standard and Technology) di cui vengono di seguito (tabelle 2c e 2d) riportati i valori di concentrazione riscontrati a confronto con i valori certificati in mg/kg d.w. Anche in questo caso le analisi sono state svolte mediante ICP-MS e AAS.

Tabelle 2c e 2d Confronto tra valori di concentrazione certificati e valori di concentrazione ottenuti da digestione totale e analisi mediante ICP-MS e AAS.

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

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

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

La complessità della procedura di speciazione geochimica e della matrice stessa dei campioni, il numero elevato di soluzioni estraenti a diversa composizione chimica e la contemporanea

presenza di numerosi analiti in concentrazioni differenti hanno richiesto un continuo e puntuale controllo della performance della procedura di estrazione e delle analisi strumentali.

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

Analisi del contenuto di sostanza organica

Il contenuto di sostanza organica totale (TOM) nei sedimenti è stato determinato attraverso il protocollo di Byers et al (1978). In particolare, tale parametro è stato valutato come corrispondente alla diminuzione percentuale di peso di 1 grammo di sedimento liofilizzato, dopo combustione in forno a 450°C per 5 ore.

Analisi statistiche sui dati ambientali

Per quanto riguarda i dati ricavati dalle analisi chimiche e biologiche su organismi e sedimenti, il loro trattamento mediante strumenti di statistica descrittiva è stato condotto mediante i software Numbers (Apple iWork 3.6.2) e Excel (Microsoft Office 2011).

Le analisi di statistica multivariata (PCA e Cluster Analysis) sono state eseguite mediante il software STATISTICA (Stat Soft Inc. data analysis software system), versione 8.0.

ANALISI GENETICHE

La raccolta dei campioni di vongola verace filippina destinati alle analisi genetiche è stato condotto nel Nord dell'Adriatico e in Portogallo, ma anche in Spagna, Francia e Regno Unito per effettuare un confronto delle popolazioni su scala geografica più ampia.

Per questo, un primo dataset composto da campioni in gran parte provenienti dalle tre aree di indagine (Laguna di Venezia, Laguna di Marano e Ria de Aveiro) è stato ottenuto con un approccio molecolare integrato, attraverso la genotipizzazione di sette loci microsatelliti e tramite il sequenziamento diretto di un frammento del gene mitocondriale 16S rDNA. Complessivamente sono stati analizzati 132 individui adulti di vongola verace filippina raccolti nelle stazioni identificate per le analisi ambientali, ma anche nel Delta del Po (Caleri, Marinetta, Scardovari) e lungo la costa galiziana (loc. Coruna) al fine di individuare eventuali caratteristiche genetiche specifiche a livello geografico.

A questo pool di campioni, sono stati aggiunti più recentemente altri individui raccolti nella Sacca di Goro (Italia), nelle lagune di Óbidos e di Ria Formosa, nel Delta del Tago e del Sado (Portogallo); nella baia di Arcachon (Francia), e nel sud dell'Inghilterra (Poole Harbour and Southampton) si veda nel dettaglio tabella 3.

Tabella 3. Dettagli delle stazioni di campionamento considerate nell'ambito delle analisi genetiche (Tabella tratta da Chiesa et al., 2017). Per ciascun ambiente di transizione considerato è indicato il paese, l'area di campionamento, il sito specifico, l'acronimo ed il numero di campioni analizzati. Il simbolo * indica le popolazioni analizzate sia tramite sequenziamento del gene COI, che tramite genotipizzazione di loci microsatelliti e sequenziamento del gene 16S rDNA (si veda Chiesa et al., 2014; 2016).

Paese	Area	Sito	Acronimo	N
Italia	Laguna di Marano*	Site 1	UD	16
Italia	Laguna di Marano*	Site 2	GR	17
Italia	Laguna di Venezia*	Busa	AV	10
Italia	Laguna di Venezia*	Palude di Monte	BV	16
Italia	Laguna di Venezia*	Fusina	FV	9
Italia	Delta del Po*	Marinetta	MA	10
Italia	Delta del Po*	Caleri	CA	11
Italia	Sacca degli Scardovari*	Scardovari	SC	11
Italia	Sacca di Goro	Goro	GO	11
Portogallo	Ria de Aveiro*	Murtosa	MU	7
Portogallo	Ria de Aveiro*	Esteiro Rio Boco	ST	8
Portogallo	Ria de Aveiro*	Costa Nova	CN	7
Portogallo	Laguna di Óbidos	Laguna di Óbidos	OB	20
Portogallo	Ria Formosa	Ria Formosa	AL	2
Portogallo	Estuario del Tago	Estuario del Tago	TA	11
Portogallo	Estuario del Sado	Estuario del Sado	SD	16
Spagna	Galizia*	La Coruna	ES	10
Francia	Baia di Arcachon	Baia di Arcachon	AR	15

È stato quindi ottenuto un dataset finale di 223 campioni complessivi provenienti da cinque paesi diversi, che sono stati analizzati ex novo o rianalizzati tramite il sequenziamento diretto di un frammento del gene mitocondriale *COI*.

Si veda la Tabella xx per un quadro completo delle stazioni di campionamento e delle analisi svolte.

Le analisi genetiche e l'elaborazione dei dati sono state svolte in collaborazione con il Prof. Francesco Nonnis Marzano, Laboratorio di Zoologia Molecolare, Dipartimento di Bioscienze

dell'Università degli Studi di Parma e con Dr.ssa Livia Lucentini, Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie dell'Università degli Studi di Perugia.

Estrazione e purificazione del DNA genomico

La prima fase delle analisi ha previsto l'estrazione e la purificazione del DNA genomico ad alto peso molecolare, attraverso l'utilizzo di protocolli specifici. È stata posta particolare attenzione alla scelta dei tessuti da prelevare per l'estrazione del materiale genetico, in riferimento al fenomeno della DUI (Doubly Uniparental Inheritance) o eccezione alla trasmissione matrilineare dei mitocondri, che è stata dimostrata in alcune specie di molluschi bivalvi, quali il mitilo *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) (Zouros et al., 1994) e la vongola verace filippina (Passamonti e Scali, 2001). Nelle specie caratterizzate da DUI, gli organismi di sesso maschile posseggono mitocondri di origine materna nei tessuti somatici (es. muscolo) detti F-Type a trasmissione matrilineare e mitocondri di origine paterna nelle gonadi (detti M-type), che possono differire fino al 20-30% della sequenza del DNA; le femmine invece posseggono solo mitocondri di origine materna (F-Type). Di conseguenza, per le analisi filogenetiche e biogeografiche è necessario utilizzare solo il DNA mitocondriale di tipo F, grazie alla sua ereditarietà matrilineare. Per evitare la co-estrazione di DNA mitocondriale maschile debbono quindi essere selezionati dei tessuti specifici, che contengano una quantità ridotta di DNA M-type. Generalmente il tessuto del mantello e del piede sono da preferire poiché la presenza di genoma mitocondriale maschile è piuttosto trascurabile (Kappner e Bieler, 2006; Plazzi e Passamonti, 2010; Chiesa et al., 2011).

Prima di procedere alla lisi cellulare, i frammenti di tessuto prelevati sono stati lavati con acqua deionizzata per rimuovere eventuali tracce di sedimento e il DNA genomico è stato estratto attraverso l'utilizzo del un kit specifico "Wizard genomic DNA Purification Kit" (Promega). La qualità e la concentrazione del DNA genomico estratto sono state valutate attraverso corsa elettroforetica sul gel d'agarosio con marcatore di peso e concentrazione e mediante analisi spettrofotometrica.

Amplificazione mediante PCR

La chimica della PCR dipende dalle caratteristiche peculiari di complementarità delle basi costituenti la molecola del DNA. Sequenze di DNA di varia lunghezza possono essere amplificate efficacemente in laboratorio utilizzando la reazione di PCR. Il DNA amplificato è costituito da copie multiple della sequenza del templato, ottenuto ricostruendo in provetta le condizioni chimiche necessarie per realizzare una sintesi di DNA. La PCR è suddivisa in tre fasi fondamentali:

- Fase di **Denaturazione** delle molecole di DNA nella quale i due filamenti complementari che costituiscono il DNA si separano (*denaturano*) ad una temperatura maggiore di 90 °C (94-96 °C), in modo da formare singole catene di basi azotate (Adenina, Timina, Guanina e Citosina). A tale temperatura infatti si scindono i legami a idrogeno posti tra le coppie di basi che sono differenzialmente appaiate.

- Fase di **Annealing** o di Ibridazione. Il primer (o innesco) si unisce (ibrida) ad una regione complementare del DNA. La Temperatura di Annealing è compresa fra i 45-55 °C. Un primer oligonucleotidico è una breve sequenza di basi (circa 15-30 basi) che in particolari condizioni ibrida una regione bersaglio del DNA a singolo filamento.

- Fase di **Polimerizzazione**. La sintesi della nuova catena procede dall'estremità 3' libero del primer, attraverso l'attività di specifiche DNA polimerasi termoresistenti in grado di sintetizzare il filamento del DNA ad una temperatura di 72 °C.

La grande funzionalità che ha permesso il successo della tecnica PCR è stato l'isolamento e la purificazione di enzimi DNA-polimerasi da organismi termoresistenti come il batterio *Thermus aquaticus*, in grado di resistere a temperature superiori a quelle di denaturazione del DNA (90-95°C) e la messa a punto di apparecchiature termiche capaci di generare cicli di riscaldamento e raffreddamento dei campioni, i termociclatori o thermal cyclers.

Analisi dei geni mitocondriali

I frammenti dei geni mitocondriali *16S rDNA* e *COI* sono stati amplificati mediante tecnica di PCR, utilizzando dei primer specifici disponibili in letteratura e/o specificatamente disegnati.

Nel dettaglio, per l'amplificazione

Le condizioni di PCR sono quelle riportate anche in Chiesa et al., 2014: Volume finale di reazione pari a 50 µl contenente:

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

I cicli di Touch-down PCR sono stati così impostati (Chiesa et al., 2014): 2 cicli di 15s a 94 °C, 15 s a 52–48–46 °C, e 30 s a 70 °C; 30 cicli di 15 s a 94 °C, 15 s a 50 °C, e 30 s a 70 °C, in seguito a denaturazione iniziale di 1 min a 94 °C ed estensione finale a 70 °C per 10 min.

Per l'amplificazione del gene *COI* sono stati utilizzati più set di primers, alcuni disponibili in letteratura quali i primers universali *LCO1490/HCO2198* (Folmer et al., 1994) ed i primers degenerati *COIF-ALT/COIR-ALT* (Kappner e Bieler, 2006; Mikkelsen et al., 2006) disponibili per la famiglia dei Veneridae. Inoltre, un set di primers addizionali denominati *COIALTLIVFW/COIALTLIVRV* (Chiesa et al., 2017) sono stati specificamente disegnati attraverso il software PRIMER 3 (Rozen e Skaletsky, 1998) per l'amplificazione di un frammento di 704 bp.

I campioni per i quali non è stato possibile ottenere un amplificato attraverso un'unica PCR sono stati amplificati anche in seconda, tramite un approccio nested, utilizzando primers interni specificamente disegnati attraverso il software PRIMER 3, denominati *COIFILINTFW/COIFILINTRV* (Chiesa et al., 2017), per l'amplificazione di un frammento di 618 bp.

Le condizioni di PCR sono le seguenti (si veda Chiesa et al., 2017): Volume finale di reazione pari a 50 µl contenente

- 1 U di GoTaq Polymerase (Promega);
- Mg²⁺ 1,5 mM;
- dNTPs 0,2 mM;
- 10 pmol di ciascun primer.

I cicli di PCR sono stati così impostati:

Per i primers *LCO1490/HCO2198* ed i primers degenerati *COIF-ALT/COIR-ALT* sono state utilizzate le seguenti condizioni di PCR (Chiesa et al., 2017): 40 cicli di 30s a 95 °C, 45 s a 45 °C, e 60 s a 72°C, in seguito a denaturazione iniziale di 10 min a 95 °C ed estensione finale a 72°C per 10 min.

Per i primers *COIALTLIVFW/COIALTLIVRV* i cicli di PCR sono stati così impostati (Chiesa et al., 2017): 35 cicli di 30s a 94 °C, 55 s a 48 °C, e 45 s a 72°C, in seguito a denaturazione iniziale di 3 min a 94 °C ed estensione finale a 72°C per 10 min.

Infine, per i primers *COIFILINTFW/COIFILINTRV* i cicli di PCR sono stati così impostati (Chiesa et al., 2017): 35 cicli di 30s a 94 °C, 50 s a 52 °C, e 40 s a 72°C, in seguito a denaturazione iniziale di 3 min a 94 °C ed estensione finale a 72°C per 5 min.

Per l'analisi di sequenziamento diretto tutti i prodotti di PCR sono stati purificati e inviati per il sequenziamento Sanger alla ditta MACROGEN EUROPE (Amsterdam).

Le sequenze ottenute sono state verificate e corrette manualmente, quindi allineate tramite il software sMEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) e Sequencer 4.2 (Gene Code Corporation).

Per la ricostruzione filogenetica sono state anche utilizzati come outgroups altre specie congeneriche come *Ruditapes variegatus* (detta anche *R. variegata*, Soweby 1852) e *R.*

decussatus; quest'ultima rappresenta la specie nativa presente nel sud-est dell'Inghilterra, nella penisola iberica e nel Mediterraneo. Per l'allineamento del dataset del *16S rDNA* sono state utilizzate come outgroups anche le sequenze di *Ruditapes bruguieri* (Hanley, 1845), *Glaucanome rugosa* (Hanley, 1843) (family Glauconomidae) e *Corbicula fluminea* (O.F. Müller, 1774).

Complessivamente, il dataset del gene mitocondriale *COI* ha incluso nell'analisi anche circa 500 sequenze relative alle popolazioni di *R. philippinarum* native di Cina e Giappone, già disponibili nella banca dati GenBank. Tutte le sequenze reperite dalla banca dati GenBank sono state scelte e selezionate ponendo particolare attenzione alla denominazione "F-type", in relazione al fenomeno della DUI, come descritto nei paragrafi precedenti.

I dettagli di tutte le sequenze utilizzate provenienti dalla banca dati GenBank sono descritti per il *16S rDNA* in Chiesa et al. (2014) e per il *COI* in Chiesa et al. (2017).

L'analisi di Minimum Spanning Network (MSN) sulle sequenze dei geni *16S rDNA* e *COI* è stata effettuata attraverso il software TCS 1.21., con una soglia di confidenza del 95%. I dati sono stati quindi convertiti in un file rdf e quindi per ciascun dataset è stato ottenuto un median-joining network (Bandelt et al., 1999) utilizzando il software Network 4.611 (Fluxus-Engineering: <http://www.fluxus-engineering.com>) per gli aplotipi di *R. philippinarum* e degli outgroups. L'identificazione dei siti informativi, la traslazione delle sequenze nucleotidiche, l'analisi pairwise delle distanze genetiche, la composizione delle basi azotate, il rapporto transizioni/transversioni sono state calcolate tramite il software MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). L'espansione demografica o spaziale è stata stimata tramite il test D di neutralità di Tajima, utilizzando DNAsp 5.0, tramite 1000 permutazioni (Rossetti e Remis, 2012).

Le relazioni filogenetiche tra gli aplotipi di *R. philippinarum* e gli outgroups sono state ricostruite attraverso l'approccio di Maximum Likelihood e di Neighbour Joining attraverso 1000 repliche di bootstrap, utilizzando il software MEGA 6.06. Le stesse analisi statistiche e filogenetiche sono state effettuate includendo gli outgroups e separatamente sulle sole sequenze di *R. philippinarum*.

Genotipizzazione di loci microsatelliti

Per quanto riguarda invece le analisi dei marcatori nucleari, per descrivere la variabilità genetica di *Ruditapes philippinarum* sono stati selezionati sette loci polimorfici già descritti in letteratura e utilizzati sulle popolazioni asiatiche di vongola verace filippina. La genotipizzazione dei loci microsatelliti è avvenuta tramite amplificazione in PCR e successiva elettroforesi capillare su gel di acrilamide mediante sequenziatore automatico per acidi nucleici.

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

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

Le condizioni di PCR utilizzate sono le seguenti:

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

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

I prodotti amplificati così ottenuti sono stati analizzati attraverso corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2.5%, quindi una quota dell'amplificato pari a 0,8 µl e 0,25 µl di standard di peso molecolare (CEQ DNA Size standard- 400 Beckman-Coulter, Fullerton, CA) sono stati addizionati a 40 µl of formamide deionizzata (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). I campioni così preparati sono stati quindi analizzati nel dettaglio attraverso elettroforesi capillare su gel di acrilamide mediante il sequenziatore automatico "CEQTM 8000 DNA Analysis System" (Beckman Coulter).

I dati ottenuti sono stati quindi importati sul software Genographer (Vers.1.6.0, Benham J.J., Montana State University 2001) per l'identificazione degli alleli ed il confronto con il marcatore di peso molecolare standard.

Per verificare la presenza di alleli nulli nel dataset così ottenuto è stata condotta un'analisi con MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) e FREENA (Chapuis e Estoup, 2007) per tutti i loci e tutte le popolazioni, per stimare la presenza e la frequenza degli alleli nulli a ciascun locus e per ciascuna popolazione (Chiesa et al., 2016).

Il metodo ENA (Excluding Null Alleles) implementato in FREENA è stato utilizzato per correggere le frequenze alleliche in caso di alleli nulli, e le frequenze alleliche corrette e non corrette sono state confrontate statisticamente tramite il test di Wilcoxon (Chiesa et al., 2016).

Sono stati quindi costruiti gli alberi di Neighbour Joining tramite il package PHYLIP, sulla base dei valori di F_{st} ottenuti con e senza correzione tramite FREENA (Chiesa et al., 2016).

L'analisi delle frequenze alleliche, la percentuale di eterozigosi attesa (H_E) e osservata (H_O), le stime dei valori dell'indice di fissazione (F) e la conformità all'Equilibrio di Hardy-Weinberg sono stati analizzati tramite il software GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2006).

Infine, un'analisi di assegnazione dei genotipi su base geografica è stata condotta attraverso il software Structure 2.3.3 program (Pritchard et al., 2000). Per determinare il valore più appropriato del parametro K , ovvero del numero di gruppi di genotipi, sono stati utilizzati il metodo $[\ln(K)]$ ed il metodo delta K di Evanno et al. (2005), tramite il software Structure Harvester (Earl and Von Holdt, 2012).

RISULTATI E DISCUSSIONE

ANALISI AMBIENTALI

I siti oggetto di indagine sono stati analizzati per quanto concerne i parametri ambientali, la granulometria, il contenuto totale di metalli pesanti, la speciazione geochimica e il bioaccumulo.

I risultati ottenuti sono stati posti a confronto con quelli relativi a studi precedenti svolti dal gruppo di ricerca (Baccarani, 2012; Breda 2012).

Dati ambientali rilevati nei siti di studio

Tabella 5 Parametri ambientali rilevati nelle stazioni di campionamento mediante sonda multiparametrica

	pH	Eh (mV)	%S.O.	S (g/l)
UD16 **	7,40	-190	-	-
UD15 **	7,50	-130	-	-
CN A	6,72	-45	7,41	6,50
CN B	7,75	-2	0,93	5,20
CN C	6,60	-46	7,75	12,0
ÌL A	7,28	-255	3,96	3,60
ÌL B	7,20	-354	5,95	12,3
ÌL C	7,39	-378	2,75	14,9
TR A	7,12	-163	8,50	12,2
TR B	7,34	-333	10,2	11,4
TR C	7,80	51,8	1,14	10,6

Le analisi ambientali eseguite nelle diverse aree di indagine suggeriscono i primi elementi di variabilità presenti tra i siti. I valori di pH si attestano attorno alla neutralità, i due siti campionati nella laguna di Marano sono simili tra loro, mentre nella Ria di Aveiro la situazione è più variabile. All'interno degli stessi canali, infatti, troviamo sia siti che presentano un pH neutro (tutti i siti del canale di Ìlhavo, TR A, TR B), sia sub acido (CN A 6,72; CN C 6,60) e altri che invece mostrano valori sub alcalini (CN B 7,75; TR C 7,80).

Per quanto riguarda il potenziale redox, possiamo osservare come i valori registrati nella laguna di Marano siano entrambi negativi, caratteristici di situazioni di scarsa permeabilità del sedimento alla fase gassosa dove, grazie anche al contributo delle comunità microbiche, avviene un consumo di ossigeno che progressivamente porta a condizioni di anaerobiosi via via crescenti, anche nei primi centimetri di profondità del sedimento.

I siti appartenenti alla Ria de Aveiro sono molto variabili tra loro, anche all'interno delle stesse aree. Il canale di Mira, ad esempio, mostra due siti molto simili, entrambi con potenziale redox negativo (CN A e CN C), il terzo sito mostra invece un valore di potenziale debolmente negativo. Il canale di S. Jacinto mostra tre siti molto diversi uno dall'altro, TR B ha un valore di potenziale redox molto negativo, caratteristico di ambienti favorevoli allo sviluppo di comunità microbiche in grado di portare avanti reazioni di metanogenesi, TR A riporta un valore di potenziale redox negativo meno elevato, caratteristico di ambienti dove proliferano microorganismi Fe(III) riduttori e SO_4^{2-} riduttori, mentre il sito TR C mostra valori di potenziale redox micro aerobico. Il canale di Ìlhavo è caratterizzato da valori di potenziale redox negativi, anche se con livelli diversi di intensità, propri di ambienti metabolici differenti.

Per quanto riguarda la sostanza organica misurata nei vari siti campionati, possiamo osservare come il canale di Ìlhavo si presenti come per lo più omogeneo, con valori che variano entro l'intervallo $4,35 \pm 1,60$. Il canale di S. Jacinto è caratterizzato dalla presenza di due siti piuttosto omogenei che hanno percentuali di sostanza organica di 8,50 e 10,2, mentre il terzo sito, TR C ha un valore molto più basso: 1,14%. Infine, anche il canale di Mira presenta due siti omogenei tra loro con valori di sostanza organica corrispondenti a 7,41% e 7,75% mentre il terzo sito mostra un valore di sostanza organica molto più basso, che corrisponde allo 0,93%.

I valori di salinità sono piuttosto omogenei nei canale di Mira con valori attorno a 11 g/l, valori simili a questi si riscontrano anche nel canale di Ìlhavo (ÌL B e ÌL C) dove però si trova anche un sito piuttosto differente che riporta un valore di 3,60 g/l. Il canale di San Jacinto al contrario, mostra due siti omogenei tra loro con valori bassi di salinità (CN A e CN B) e un sito differente, con valori di salinità più simili agli altri due canali (CN C).

Tali valori di salinità, se confrontati con i valori già riscontrati nell'area centrale della laguna che variano tra 33 e 35 g/l (Dias et al., 2006), si dimostrano piuttosto bassi, caratteristici di acque a bassa salinità.

Studio della granulometria

Di seguito vengono riportati i dati relativi alla distribuzione granulometrica ottenuti (figura 6) mediante sonicazione e analisi laser (procedura LISST). I dati relativi ai campioni appartenenti alla laguna di Marano (UD15 e UD 16) sono stati invece ricavati da setacciatura a umido.

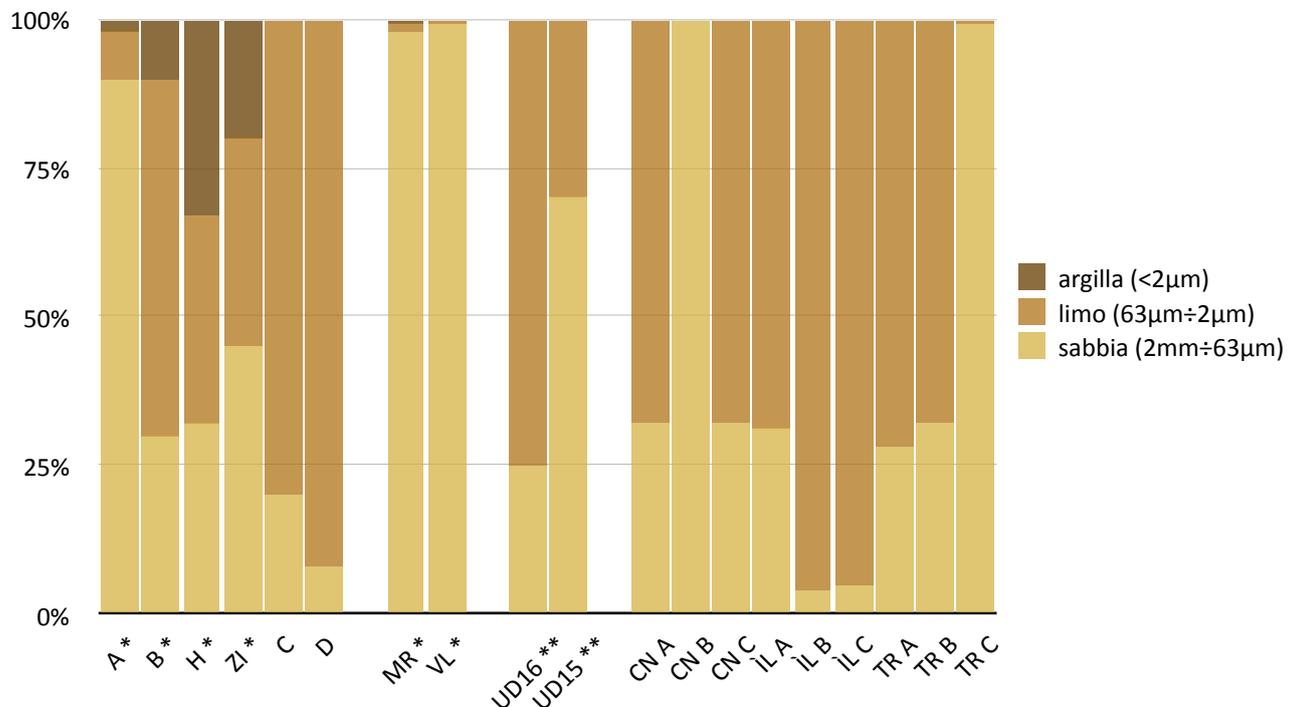


figura 6. Diagramma a barre riportante il contributo in percentuale delle diverse frazioni granulometriche nei campioni analizzati nell'ambito del presente studio e confrontati con i valori riscontrati per la laguna di Venezia nel lavoro di *Baccarani (2012) e **Breda (2012).

Come è possibile notare dal grafico, le diverse macro aree di campionamento si differenziano anche al loro interno mostrando una discreta variabilità. In particolare, è possibile notare come siano presenti nelle stesse aree, zone a prevalenza sabbiosa e zone a prevalente tessitura fine, con percentuali di frazione limoso-argillosa (al di sotto dei $63\mu\text{m}$) fino a un massimo di 95-96% rilevato in due siti campionati nel canale di ìlhavo nella Ria di Aveiro.

La zona del Delta del Po risulta invece più omogenea e a prevalenza sabbiosa, altre zone analoghe si rilevano in laguna di Venezia nell'area della Busa (90% sabbia), nella Ria de Aveiro e sia nel Canale di Mira (campione CN B, 99,8% di sabbia) che nel canale di S. Jacinto (campione TR C, 99% di sabbia).

Tale variabilità è indice della presenza nelle aree di indagine, anche a poche centinaia di metri di distanza, di zone caratterizzate da idrodinamica differente. Nelle aree a maggiore idrodinamica i fenomeni deposizionali riguardano principalmente la frazione sabbiosa, mentre nelle aree a bassa idrodinamica prevale la deposizione delle particelle più fine di natura limo-argillosa.

Le quattro zone analizzate sono infatti piuttosto diverse tra loro in termini di caratterizzazione idrologica e idrodinamica.

I campioni appartenenti alla laguna di Venezia sono caratterizzati da un pattern variegato, con una generale prevalenza di frazione fine che pesa per una percentuale che va dal 53% all'80%, si differenzia il campione relativo all'area della Busa che invece è a prevalenza sabbiosa (90% sabbia). Dal punto di vista idrodinamico, la laguna di Venezia presenta molte caratteristiche peculiari, come la presenza di zone intertidali in continua evoluzione che la rendono unica al mondo. Nei secoli eventi naturali (di lenta risoluzione) e interventi antropici (di impatto immediato) hanno modificato profondamente la sua morfologia. In particolare, fino al XV secolo prevalevano nettamente gli apporti di sedimento fluviale che ne facevano un bacino a prevalente vocazione deposizionale. Tale fenomeno, però, comportava notevoli sforzi nella manutenzione dei canali navigabili e si percepiva la minaccia derivante dalla perdita della peculiarità di Venezia, la cui inaccessibilità era un punto di forza per la sua difesa militare. Per questo, è stato deviato il corso di numerosi fiumi e canali, la cui foce è stata spostata a nord o a sud della laguna riducendo notevolmente l'apporto di acque dolci e di particolato fine. Inoltre, la laguna è ancora oggi luogo dove la navigazione ha un peso importante nel determinare fenomeni di risospensione del sedimento e conseguente trasporto del materiale eroso da parte delle correnti prevalenti (Molinaroli et al., 2014). In linea con tali considerazioni, non stupisce che questo sistema non sia completamente omogeneo, anche se generalmente si riscontrano dei pattern di distribuzione granulometrica confrontabili, eccezion fatta per l'area della Busa probabilmente soggetta a dinamiche mareali più incisive trovandosi in corrispondenza del canale dei petroli (Baccarani, 2012).

Tra le zone costiere analizzate, la Ria de Aveiro è l'unica a essere affacciata sull'oceano Atlantico e mostra caratteristiche abbastanza diverse rispetto alle lagune dell'Alto Adriatico. La sua idrologia, infatti, è condizionata prevalentemente dalle dinamiche tidali che sono particolarmente intense in questa area. Il prisma tidale è distribuito in maniera diseguale da nord a sud con una prevalente diffusione verso i canali settentrionali (per il 38% nel Canale di S. Jacinto) e verso la zona centrale. L'escursione tidale media è di 2 metri (Dias et al., 1999), il doppio rispetto a quanto accade per la laguna di Venezia o quella di Marano. Le dinamiche dei canali di acqua dolce hanno una certa influenza soltanto a monte dei canali presenti, ma si tratta di corsi d'acqua con portate piuttosto basse e che acquistano una certa importanza soltanto in seguito a fenomeni di consistenti precipitazioni (Dias et al., 1999). I dati raccolti, sono coerenti con queste dinamiche, infatti i campioni più vicini all'area centrale della Ria riportano percentuali maggiori di frazione sabbiosa (CN B e TR C) a conferma di una maggiore componente di trasporto piuttosto che di deposizione. Si differenziano i campioni appartenenti al canale di Ìlhavo che riportano valori di frazione limoso

argillosa piuttosto elevati, da 69% (IL A) fino a un massimo di 98-99% (IL B e IL C). Tale canale infatti, ospita solo l'8% del prisma tidale e, dal punto di vista della salinità, è descritto come verticalmente omogeneo a meno di eventi meteorici intensi nel cui caso diventa parzialmente mescolato. Infine, essendo il canale più lontano dalla bocca di collegamento con l'Oceano, sono stati riscontrati sia un certo ritardo nella propagazione tidale, sia una netta riduzione dell'ampiezza dell'escursione mareale tanto da renderlo una zona prevalentemente deposizionale (Dias et al., 1999).

L'area del Delta del Po è ancora differente, come dimostrano i dati relativi alla sua granulometria: i due campioni analizzati mostrano una percentuale di sabbia che si attesta sul 98-99% di frazione > 63µm. Si tratta di una zona di delta, appunto, dove prevalgono fenomeni di trasporto di sedimento fluviale e relativa deposizione. Le velocità di flusso registrate sono anche molto elevate, tanto da renderle più incisive rispetto ai fenomeni ondosi e/o mareali. Per questo, è possibile affermare che il Delta è prevalentemente influenzato dalle dinamiche fluviali più che da quelle marine.

La diversità tra i due campioni appartenenti alla laguna di Marano in termini di granulometria infine, è riconducibile alla loro disposizione rispetto alla bocca a mare. Infatti, il sito 15UD si trova a sud e nelle vicinanze del canale di San'Andrea che lo mette in comunicazione con l'Adriatico. In quell'area l'idrodinamica è particolarmente vivace, pertanto il sedimento presenta una quota maggioritaria di frazione sabbiosa. Viceversa, il sito 16UD si dimostra a prevalente natura pelitica essendo caratterizzato per l'85% dalla frazione fine.

Studio del metallo totale presente nel sedimento

Lo studio del contenuto di metallo/metalloide totale nella matrice analizzata fornisce informazioni in merito alla quantità complessiva di elemento target presente nelle sue diverse forme chimiche. È un'informazione importante dal punto di vista della valutazione ambientale dei siti poiché, per il momento, è uno dei pochi parametri considerati dalla normativa per determinarne il livello di qualità, pur rimanendo un valore puramente indicativo. I valori riscontrati possono essere confrontati con gli ancora incompleti limiti normativi presenti nelle regolamentazioni comunitarie e nazionali.

Allo stato attuale, infatti, non esistono ancora indicazioni normative specifiche e spesso vengono impropriamente utilizzati i valori di concentrazione limite fissati per i suoli (D. Lgs 152/06). Per quanto riguarda la panoramica della normativa nazionale, il DM 56 14 aprile 2009 contiene nuove indicazioni sul monitoraggio e la classificazione dei corpi idrici e elenca alcuni standard di qualità per le sostanze prioritarie e prioritarie pericolose, prevedendo anche analisi sui parametri della colonna d'acqua e talvolta anche sul biota. Tale normativa recepisce anche, per alcune specifiche sostanze, le indicazioni fornite dalla Direttiva 2008/105/CE. I valori indicati a livello tabellare ai fini della classificazione del buono stato chimico, vista la complessità della matrice sedimento, ammettono uno scostamento pari al 20% del valore riportato. La direttiva che integra e raccoglie le precedenti disposizioni in materia di tutela delle acque è la Direttiva 2000/60/CE che mirava all'obiettivo di ottenere un buono stato di qualità delle acque superficiali entro il 2015. All'interno di questa direttiva è indicato che i valori relativi agli standard di qualità ambientale dovrebbero essere stabiliti in relazione agli studi eseguiti a riguardo degli effetti acuti e cronici riscontrati nei diversi *taxa* e a diversi livelli della catena trofica. In questo senso la direttiva 2008/105/CE raccoglie e standardizza i dati disponibili, tuttavia i diversi Stati membri, per ora, possono scegliere se continuare a basarsi sui limiti fissati per i suoli.

Per quanto riguarda la laguna veneta, esistono dei limiti tabellari che fanno riferimento alla Legge Speciale per Venezia (Ministero dell'Ambiente, Roma, 1993) che prevede una classificazione di qualità dei sedimenti stabilita a partire dal contenuto totale di metalli e metalloidi presenti. Tali valori permettono di collocare il sedimento come poco contaminato e potenzialmente riutilizzabile in acque aperte all'interno della laguna (Classe A), oppure impiegabile in laguna, ma con adeguati sistemi di isolamento dalle acque (*corone* e *capping*) di materiale incontaminato (Classe B), oppure stoccabile in strutture permanentemente emerse con criteri di elevata impermeabilità (Classe C) (v. tabella 6).

tabella 6. Parametri stabiliti dalla *normativa nazionale per lo scavo, il trasporto e il riutilizzo dei sedimenti dei canali della Laguna di Venezia; i valori di concentrazione sono espressi in mg/kg p. s. (Legge Speciale per Venezia - Ministero dell'Ambiente, Roma, 1993) e **limiti che si riferiscono alla normativa comunitaria intesi come Standard di Qualità Ambientale valore Medio Annuo (SQA-MA, direttiva 2008/105/CE).

parametro	Classe A*	Classe B*	Classe C*	**limite normativo 2008/105/CE
Arsenico	15	25	50	12
Cadmio	1	5	20	0,3
Rame	40	50	400	
Mercurio	0,5	2	10	0,3
Nichel	45	50	150	30
Piombo	45	100	500	30
Zinco	200	400	3000	
Cromo totale	20	100	500	50
Cromo VI				2

Per quanto riguarda le aree di coltivazione o raccolta della vongola verace filippina, non sono stati stabiliti degli standard di qualità ambientale specifici per la contaminazione di metalli e metalloidi, quindi per una prima valutazione di qualità si può fare riferimento ai limiti sopracitati.

I dati raccolti sono stati interpretati alla luce dei principali fattori che possono determinare il trasporto e l'accumulo di contaminanti negli ambienti di transizione. Le dinamiche di queste zone sono spesso molto complesse e coinvolgono numerose forzanti che agiscono simultaneamente interagendo tra loro dando luogo a scenari caratteristici diversi a seconda del sito studiato.

Un ruolo preponderante è svolto dall'idrodinamica che può variare in maniera incisiva passando da un sito a un altro in virtù della topografia del luogo e del contributo delle maree e del moto ondoso locale (Bockheim et al., 2005; Lin et al., 2006). La dinamica dei flussi idrici può essere più o meno importante a seconda della sub area considerata e contribuisce a creare micro-zone dove prevalgono fenomeni deposizionali o di ablazione e trasporto. In virtù di tali fenomeni, ogni area è caratterizzata anche da uno specifico pattern granulometrico con prevalenza di frazione fine nelle aree a bassa idrodinamica e, viceversa, un contributo maggiore di frazione sabbiosa nelle aree dove prevalgono fenomeni ad elevata energia cinetica.

Questi fenomeni hanno un grosso peso nel determinare specifici pattern di contaminazione, anzitutto poiché le principali direzioni del flusso idrico nelle zone costiere condizionano anche la

dispersione dei contaminanti stessi che, dopo aver raggiunto le aree intertidali, vanno a distribuirsi in determinate direzioni seguendo le correnti già presenti.

Inoltre, nelle diverse aree il contributo delle singole frazioni granulometriche incide in maniera determinante sulla presenza e concentrazione di metalli e metalloidi. Essi infatti, dimostrano maggiore affinità con la frazione fine, ricca in residui metallici negativi cui i cationi possono adsorbirsi in base alla loro carica e al loro ingombro sterico (Grimwood and McGhee, 1979; Petersen et al., 1997; Van Ryssen et al., 1999; Li et al., 2000; Van den Berg et al., 2001; Zoumis et al., 2001; Fan et al., 2002; Du Laing et al., 2007). Anche la presenza di sostanza organica influisce sulla presenza di metalli e metalloidi nella frazione solida del sedimento (Saulnier and Mucci, 2000; Li et al., 2000; Zoumis et al., 2001; Fan et al., 2002; Eggleton and Thomas, 2004) e, a sua volta, anch'essa è maggiormente presente nelle aree dove l'energia cinetica è bassa.

Un altro importante aspetto da considerare sono i fenomeni sospensivi e risospensivi del sedimento che possono dipendere sia da forzanti naturali legate all'idrodinamica del sito, ma anche dalla presenza di attività antropiche (traffico veicolare natante, attività di pesca, interventi di dragaggio/imbonimento,...), dall'intensità e frequenza degli eventi meteorici e dai fenomeni di bioturbazione (Rinklebe, 2004), con impatti diversi a seconda del tipo di granulometrie coinvolte.

La posizione geografica dei siti determina anche una maggiore o minore vicinanza ai canali di scambio idrico, come le bocche di porto, attraverso le quali avviene il passaggio continuo di portate d'acqua più o meno significative. La qualità e la quantità di metalli e metalloidi presenti nel sedimento è determinata anzitutto dalle sue caratteristiche geopedologiche che possono condizionare la concentrazione di alcuni elementi anche fino a variarla di un ordine di grandezza (Luoma and Rainbow, 2008; Salomons and Förstner, 1984).

Numerosi parametri ambientali contribuiscono a creare le condizioni per l'accumulo di metalli e metalloidi nella fase solida piuttosto che per la loro solubilizzazione e mobilizzazione nella colonna d'acqua. Nello specifico pH, Eh, quantitativo di sostanza organica, temperatura, salinità e presenza di microorganismi sono le variabili che contribuiscono maggiormente a determinare dei microambienti dove si instaurano le dinamiche biogeochimiche specifiche di ogni sito.

Per i siti analizzati si riportano di seguito i livelli di contaminazione riscontrati a confronto con i limiti tabellari disponibili. Per una più immediata valutazione si riportano i limiti tabellari previsti per ciascun metallo o metalloide dalla normativa analizzata: in giallo il limite previsto per la colonna A (sedimenti appartenenti alla classe A), in arancione il limite previsto per la colonna B (sedimenti appartenenti alla classe B), in rosso il limite previsto per la colonna C (sedimenti appartenenti alla classe C) e in fuxia il limite tabellare della Direttiva Comunitaria 105 del 2008.

Arsenico

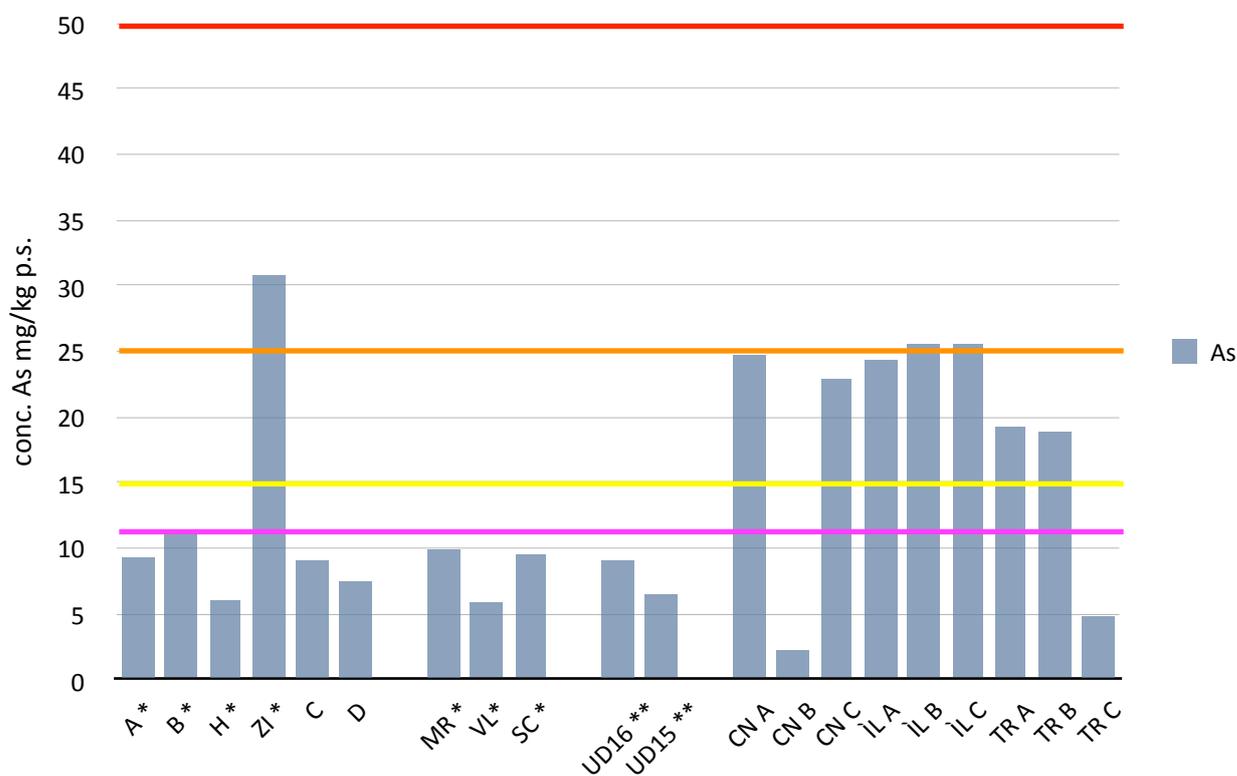


figura 7. Istogrammi riportanti i valori di concentrazione di Arsenico rilevati in ciascuno dei siti analizzati. La linea gialla rappresenta il limite tabellare di colonna A, la linea arancione quello di colonna B e la linea rossa quello di colonna C.

Per quanto riguarda l'Arsenico, come è possibile osservare dal grafico, i siti appartenenti alla laguna di Venezia risultano per lo più omogenei con valori che si attestano tra i 6 e gli 11 mg/kg p.s., appena al di sotto del limite tabellare più basso che, in questo caso, è quello stabilito a livello comunitario. Fa eccezione il campione prelevato dalla zona industriale che riporta una concentrazione di 30,8 mg/kg p.s. che supera il limite tabellare della colonna B.

I siti appartenenti al Delta del Po riportano una situazione analoga con valori che si attestano sui 9 mg/kg p.s., al di sotto del limite tabellare più basso.

I siti appartenenti alla laguna di Marano mostrano livelli di Arsenico in linea con gli altri siti analizzati nell'alto Adriatico e che si attestano sui 9,10 mg/kg p.s.(UD16) e sui 6,41 (UD15) mg/kg p.s.

La Ria di Aveiro mostra livelli di Arsenico variegati, il canale di S. Jacinto riporta due siti, CN A e CN C con valori di poco inferiori ai limiti tabellari di colonna B (24,6 mg/kg p.s. e 22,9 mg/kg p.s.).

Il canale di Ìlhavo mostra valori piuttosto omogenei appena al di sotto o appena al di sopra del limite tabellare di colonna B (24,2 mg/kg p.s. ÌL A; 25,4 mg/kg p.s. ÌL B; 25,5 mg/kg p.s. ÌL C), il canale di Mira presenta invece, due siti che superano il valore di colonna A, con valori di 19,2 mg/kg p.s. (TR A) e 18,9 mg/kg p.s. (TR B), mentre il terzo sito, TR C riporta valori molto più bassi di Arsenico (4,84 mg/kg p.s.).

L'area dell'alto Adriatico risulta piuttosto omogenea nei livelli di concentrazione di Arsenico e non si osservano particolari differenze tra le varie aree analizzate che sembrano essere costituite da una matrice di origine comune, eccezion fatta per il sito appartenente alla zona industriale, che riporta livelli di contaminazione più elevati proprio in virtù della sua posizione adiacente ai canali di scolo del polo chimico di Porto Marghera.

L'area della Ria di Aveiro presenta anch'essa valori molto omogenei, eccezion fatta per i due campioni appartenenti ai siti CN B e TR C che mostrano livelli di contaminazione molto inferiori, quasi ad indicare un'origine completamente diversa di questi sedimenti.

Pertanto, per quanto riguarda le concentrazioni di As nel sedimento, l'area dell'Alto Adriatico risulta poco contaminata, a eccezione ovviamente del sito adiacente al canale di scolo del polo chimico di Porto Marghera che supera il limite tabellare di colonna B.

Le aree della Ria di Aveiro, invece, risultano di qualità inferiore, dal momento che i valori di As sono superiori ai limiti di colonna A e, in alcuni casi, si avvicinano o superano quelli di colonna B, eccezion fatta per i siti CN B e TR C.

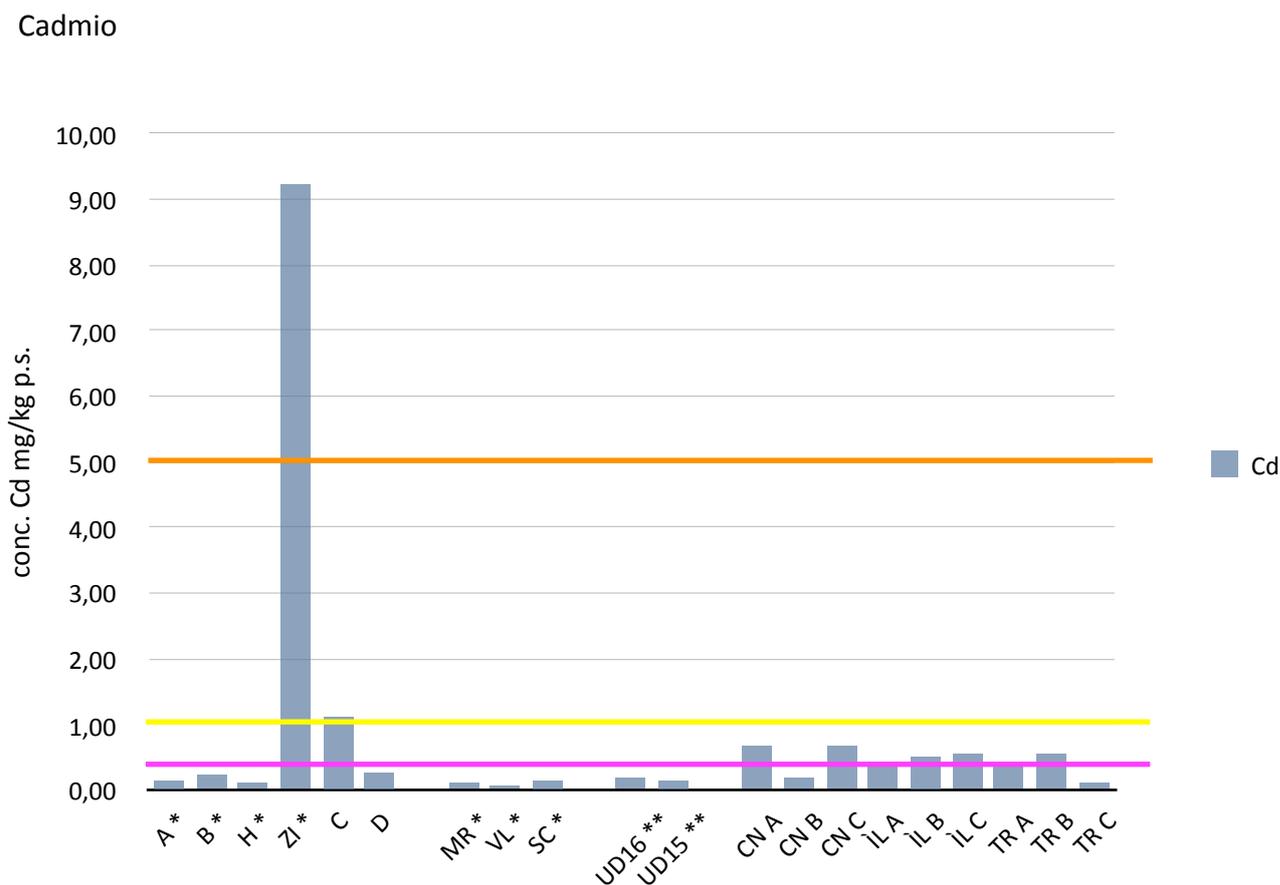


figura 8. Istogrammi riportanti i valori di concentrazione di Cadmio rilevati in ciascuno dei siti analizzati. La linea gialla rappresenta il limite tabellare di colonna A, la linea arancione quello di colonna B e la linea fuxia quello stabilito dalla normativa comunitaria.

I valori di Cadmio totale riscontrati nelle aree analizzate sono per lo più bassi e, fatta salva qualche eccezione, si attestano attorno a concentrazioni simili al valore tabellare limite stabilito a livello comunitario (0,3 mg/kg p.s.). Mediamente la laguna di Venezia riporta valori che oscillano tra 0,10 mg/kg p.s. e 1,10 mg/kg p.s., valore superiore al limite di colonna A, si riscontrano valori più alti per il campione prelevato dalla zona industriale che si attestano sui 9,22 mg/kg p.s., di molto superiore al limite tabellare di colonna B.

I valori riscontrati sul Delta del Po sono piuttosto bassi e inferiori al limite tabellare più basso, ossia quello stabilito a livello comunitario.

La Ria di Aveiro mostra valori generalmente simili tra loro per tutti e tre i canali campionati con concentrazioni di poco superiori al limite tabellare comunitario e sempre al di sotto del limite tabellare di colonna A. Due siti, CN B e TR A riportano invece, valori più bassi, appena sopra il limite di rilevabilità (CN B, 0,17 mg/kg p.s.; TR B 0,12 mg/kg p.s.).

In generale i valori di Cadmio riscontrati nelle diverse lagune mostrano pattern omogenei con valori sempre piuttosto bassi.

Per quanto concerne la qualità dei siti di allevamento/raccolta della vongola, tutte le aree analizzate riportano valori di Cadmio piuttosto bassi che oscillano entro un 20% attorno al valore limite stabilito a livello comunitario e quindi possono essere ritenute di buona qualità. Fanno eccezione i campioni più vicini all'area industriale, ZI e C che riportano valori oltre il limite di qualità necessari a garantire un prodotto adatto al consumo umano.

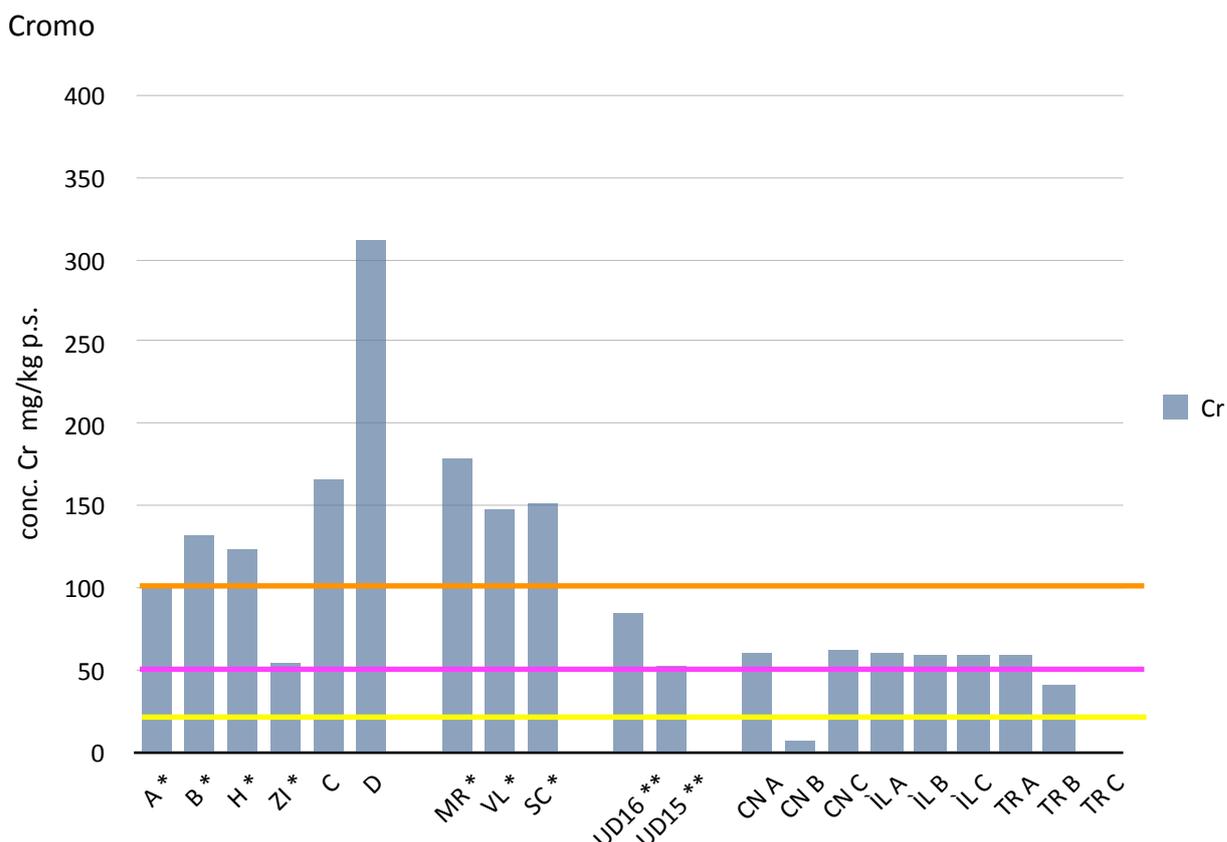


figura 9. Istogrammi riportanti i valori di concentrazione di Cromo rilevati in ciascuno dei siti analizzati. La linea gialla rappresenta il limite tabellare di colonna A, la linea arancione quello di colonna B e la linea fuxia quello stabilito dalla normativa comunitaria.

Per quanto riguarda i livelli di Cromo riscontrati, la Laguna di Venezia si mostra disomogenea, il campione che riporta i livelli più bassi di contaminazione (53,4 mg/kg p.s.) è quello prelevato in zona industriale, di poco inferiore al valore limite stabilito a livello comunitario e superiore al limite di colonna A (20 mg/kg p.s.). Gli altri siti analizzati mostrano livelli maggiori di contaminazione, alcuni attorno al valore limite di colonna B (campioni A, 101 mg/kg p.s.; B, 131 mg/kg p.s.; H 124 mg/kg p.s.) e altri che lo superano abbondantemente (campioni C, 166 mg/kg p.s.; D, 312 mg/kg p.s.).

I siti analizzati nel Delta del Po mostrano valori abbastanza omogenei tra loro e superiori al limite tabellare di colonna B (MR, 178 mg/kg p.s.; VL, 147 mg/kg p.s.; SC 151 mg/kg p.s.).

I campioni prelevati nella Laguna di Marano mostrano valori diversi, uno vicino al limite tabellare comunitario (UD15, 52,7 mg/kg p.s.) e l'altro che invece lo supera attestandosi sugli 84,8 mg/kg p.s. (UD16).

La Ria di Aveiro mostra, invece, valori molto omogenei tra loro, tutti di poco superiori al limite tabellare comunitario fissato sui 50 mg/kg p.s., eccezion fatta per i siti CN B e TR C che riportano invece, valori molto più bassi e inferiori al limite tabellare più basso che, in questo caso, è quello della colonna A (CN B, 6,68 mg/kg p.s.; TR C 1,33 mg/kg p.s.).

Generalmente il contenuto di Cromo dei siti analizzati, sembra essere legato anche a fattori diversi dalla sola natura geopedologica dei sedimenti, anche se alla base possiamo osservare che le diverse sub aree riportano una certa omogeneità tra loro a testimoniare quanto il fattore mineralogico sia comunque una variabile di fondamentale importanza per questo metallo (Mayer and Fink, 1980; MAV, 2004).

I siti della laguna di Venezia riportano valori di Cromo molto più elevati che la laguna di Marano e la Ria di Aveiro come già descritto in letteratura (MAV, 2004) ed è di origine naturale in quanto componente caratteristico delle componenti minerali del sedimento.

Tuttavia, attenendosi ai dati di contenuto totale quasi nessuna delle aree analizzate dovrebbe risultare idonea per la coltivazione o la raccolta di esemplari di vongola verace filippina.

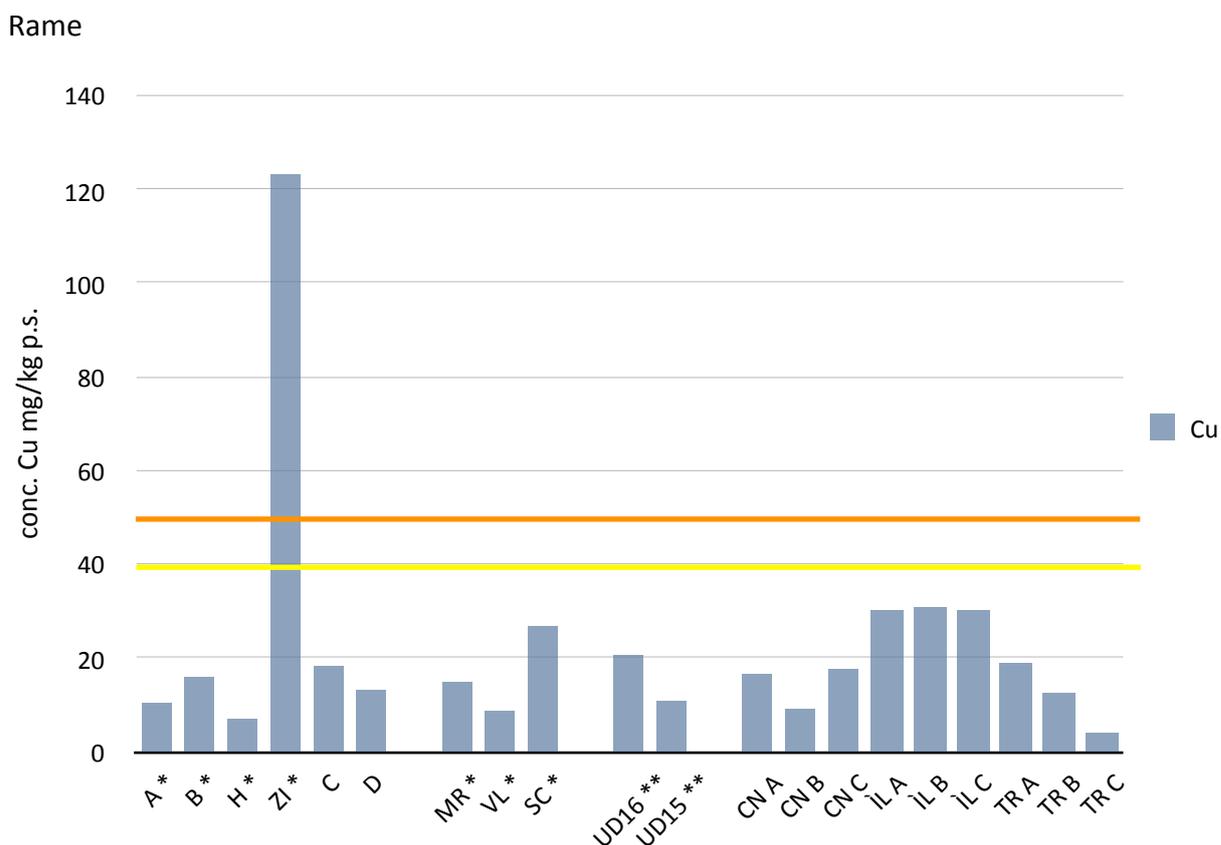


figura 10. Istogrammi riportanti i valori di concentrazione di Rame rilevati in ciascuno dei siti analizzati. La linea gialla rappresenta il limite tabellare di colonna A, la linea arancione quello di colonna B.

I livelli di concentrazione di Cu nei campioni appartenenti ai siti analizzati in Laguna di Venezia si attestano tutti ben al di sotto dei limiti fissati in colonna A, riportando i seguenti valori: A 10,5 mg/kg p.s.; B 15,7 mg/kg p.s.; H 6,76 mg/kg p.s.; C 18,3 mg/kg p.s.; D 13,3 mg/kg p.s.

Fa eccezione il campione prelevato in zona industriale che supera anche i limiti fissati in colonna B riportando un valore di concentrazione di 123 mg/kg p.s.

I valori riscontrati nel Delta del Po mostrano valori disomogenei tra loro, ma inferiori a quelli stabiliti dalla colonna A. Il valore più basso è stato riscontrato per il campione VL, 8,46 mg/kg p.s., cui segue il campione MR, 14,8 mg/kg p.s. e il campione SC 26,9 mg/kg p.s.

I due siti analizzati in Laguna di Marano riportano valori di 20,5 mg/kg p.s. (UD16) e di 10,9 mg/kg p.s. (UD15) anch'essi al di sotto dei limiti tabellari di colonna A.

La Ria di Aveiro mostra valori molto omogenei rilevati nel canale di Ilhavo (IL A 30,1 mg/kg p.s.; IL B 30,6 mg/kg p.s.; IL C 30,2 mg/kg p.s.), valori omogenei nel canale di S. Jacinto (CN A 16,5 mg/kg p.s.; CN C 17,4 mg/kg p.s.) cui fa eccezione il sito CN B che riporta un valore di molto inferiore (8,93 mg/kg p.s.), mentre si riscontra maggiore variabilità nel canale di Mira con valori rilevati che corrispondono a 18,9 mg/kg p.s. per TR A, 12,8 mg/kg p.s. per TR B e 3,73 mg/kg p.s. per TR C.

Gli andamenti osservati mostrano che una probabile causa delle oscillazioni presenti nelle concentrazioni di Rame rilevate nei diversi siti potrebbe essere legata al quantitativo di sostanza organica presente nel sedimento. Il Rame, infatti, viene facilmente chelato dalle molecole organiche prodotte dal metabolismo microbico e dalla presenza di altre specie vegetali. Tuttavia, la salinità gioca un ruolo importante nel determinare gli equilibri dei complessi così generati portando a possibili eventi associativi e dissociativi che dipendono principalmente dalla costante di equilibrio dei composti formati (Du Laing, 2009) in un costante equilibrio dinamico.

Nel caso delle lagune analizzate gli andamenti che si possono osservare dai dati relativi alla concentrazione totale di metallo sono legati sia agli input antropici (come si può osservare per il campione della zona industriale), ma anche alla presenza di questo equilibrio dinamico tra sostanza organica e salinità. Grazie ai dati relativi alla speciazione geochimica sarà possibile chiarire ulteriormente il contributo di queste dinamiche per ogni singolo sito.

Per quanto riguarda i livelli di contaminazione di Rame, tutti i siti risultano idonei alla raccolta o alla coltivazione della vongola verace filippina tranne il sito della zona industriale nella laguna di Venezia.

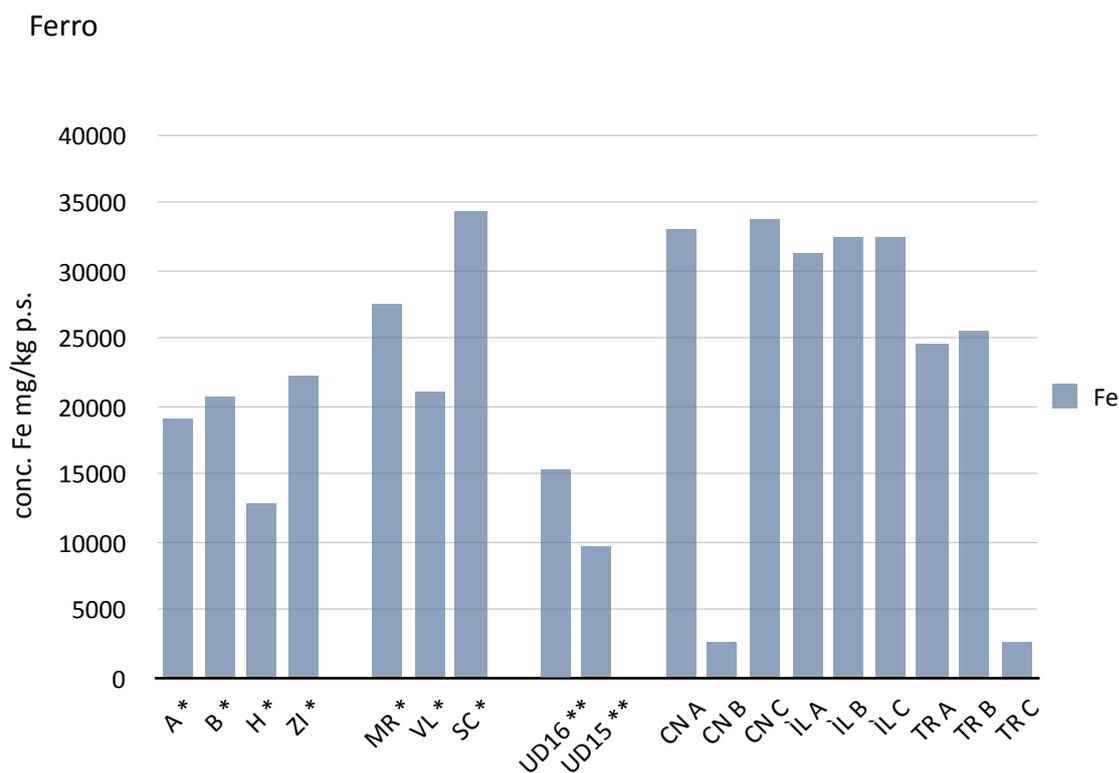


figura 11. Istogrammi riportanti i valori di concentrazione di Ferro rilevati in ciascuno dei siti analizzati.

I valori di concentrazione di Ferro rilevati in Laguna di Venezia sono piuttosto omogenei e si attestano attorno ai 20000 mg/kg p.s., eccezion fatta per il campione H che riporta un valore più basso (12800 mg/kg p.s.).

Nell'area del Delta del Po si rilevano valori mediamente più elevati, che partono da un minimo di 21000 mg/kg p.s. (VL) a un massimo di 34300 mg/kg p.s. (SC).

I siti analizzati in Laguna di Marano riportano valori mediamente inferiori rispetto alla Laguna di Venezia, il sito UD16 riporta una concentrazione di Fe nel sedimento marino di 15300 mg/kg p.s., mentre il sito UD15, un valore di 9690 mg/kg p.s.

Nella Ria di Aveiro si riscontra una condizione omogenea tra i siti appartenenti alle aree del canale di San Jacinto e al canale di ìlhavo con valori che si attestano sui 30000 mg/kg p.s., fa eccezione il sito CN B che ha un valore di oltre un ordine di grandezza più basso, 2630 mg/kg p.s. Il canale di Mira riporta valori mediamente più bassi, attorno ai 25000 mg/kg p.s. e fa eccezione il sito TR C che riporta un valore di addirittura un ordine di grandezza più basso (2530 mg/kg p.s.). Per questo metallo non esistono, al momento, limiti tabellari o valori soglia cui poter fare riferimento. Le concentrazioni di Ferro molto basse rilevate nei due siti CN B e TR C portano a pensare che tale sedimento, di prevalenza sabbiosa, abbia origine diversa dagli altri campioni. La conferma potrebbe venire dai risultati della speciazione geochemica.

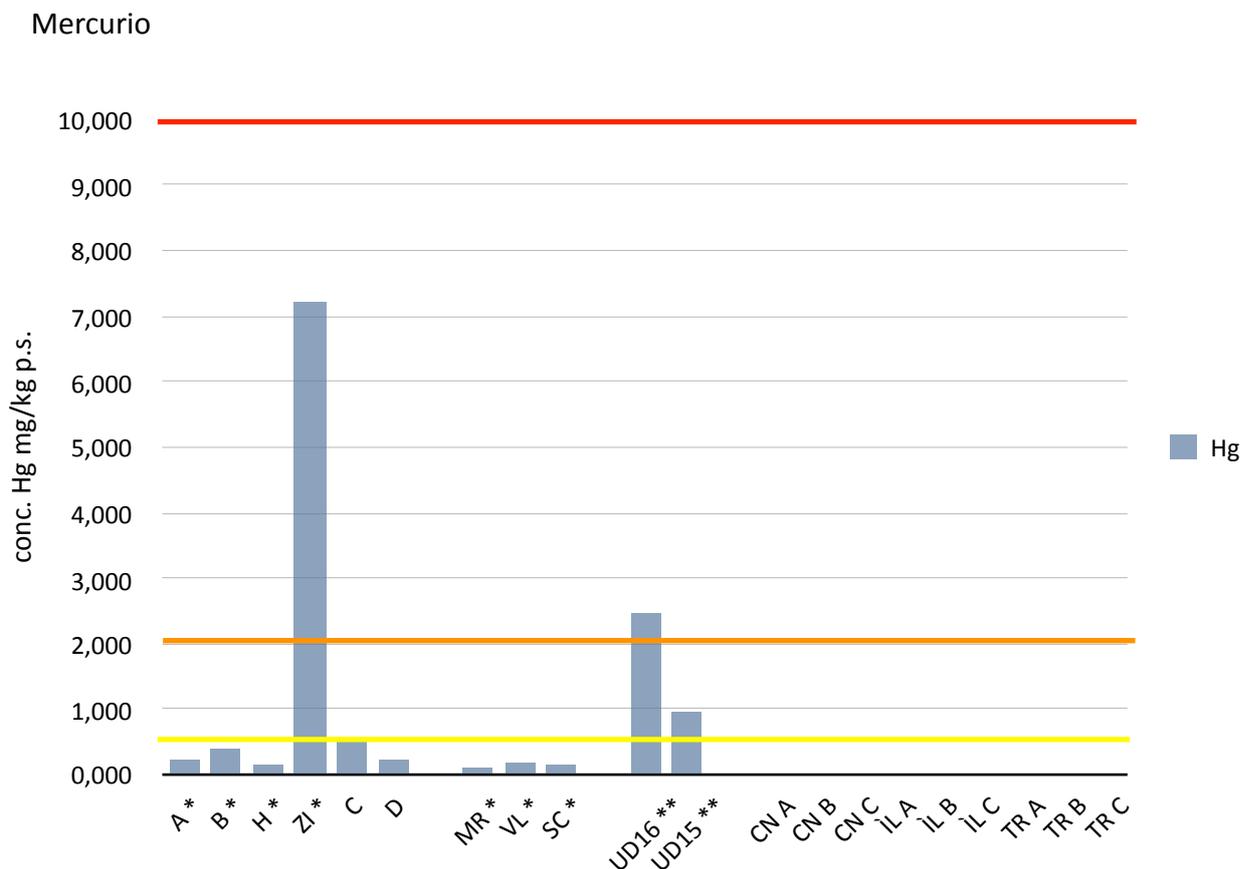


figura 12. Istogrammi riportanti i valori di concentrazione di Mercurio rilevati in ciascuno dei siti analizzati. La linea gialla rappresenta il limite tabellare di colonna A, la linea arancione quello di colonna B e la linea rossa quello di colonna C.

I livelli di contaminazione da Mercurio presenti nelle zone analizzate sono per lo più inferiori ai limiti tabellari di colonna A, come accade per i siti A, B, H, C, D, MR e SC; oppure talmente bassi da essere inferiori al limite di quantificazione (VL, CN A, CN B, CN C, ÌL A, ÌL B, ÌL C TR A, TR B e TR C).

Gli unici siti che si discostano da questo andamento, come per quasi tutti gli altri elementi, sono la zona industriale della Laguna di Venezia, che riporta valori superiori ai limiti di colonna B e i siti analizzati in Laguna di Marano.

Il campione UD16 riporta un valore di concentrazione (2,48 mg/kg p.s.) che supera i limiti tabellari di colonna B, mentre il campione UD15 riporta un valore (0,95 mg/kg p.s.) superiore al limite di colonna A.

Gli elevati valori di concentrazione riscontrati nell'area della zona industriale sono legati a fenomeni di contaminazione antropica già noti e che sono stati costanti e persistenti per lungo tempo. Anche per quanto riguarda la laguna di Marano, sono stati documentati episodi sia di immissione di Mercurio di origine industriale derivante dall'impianto Cloro-Soda di Torviscosa che apporti derivanti dal dilavamento delle miniere dell'Idrja già ampiamente documentati e descritti in letteratura (Covelli et al., 2012).

In generale è possibile valutare come idonei alla coltivazione o alla raccolta di vongola verace filippina i siti della Ria di Aveiro, i siti del Delta del Po e i siti della Laguna di Venezia (eccezion fatta per la zona industriale). La laguna di Marano mostra invece valori oltre la soglia della colonna A e per il sito UD16 anche oltre il limite di colonna B, pertanto non ha la qualità sufficiente a consentire la produzione di vongola verace filippina.

Nichel

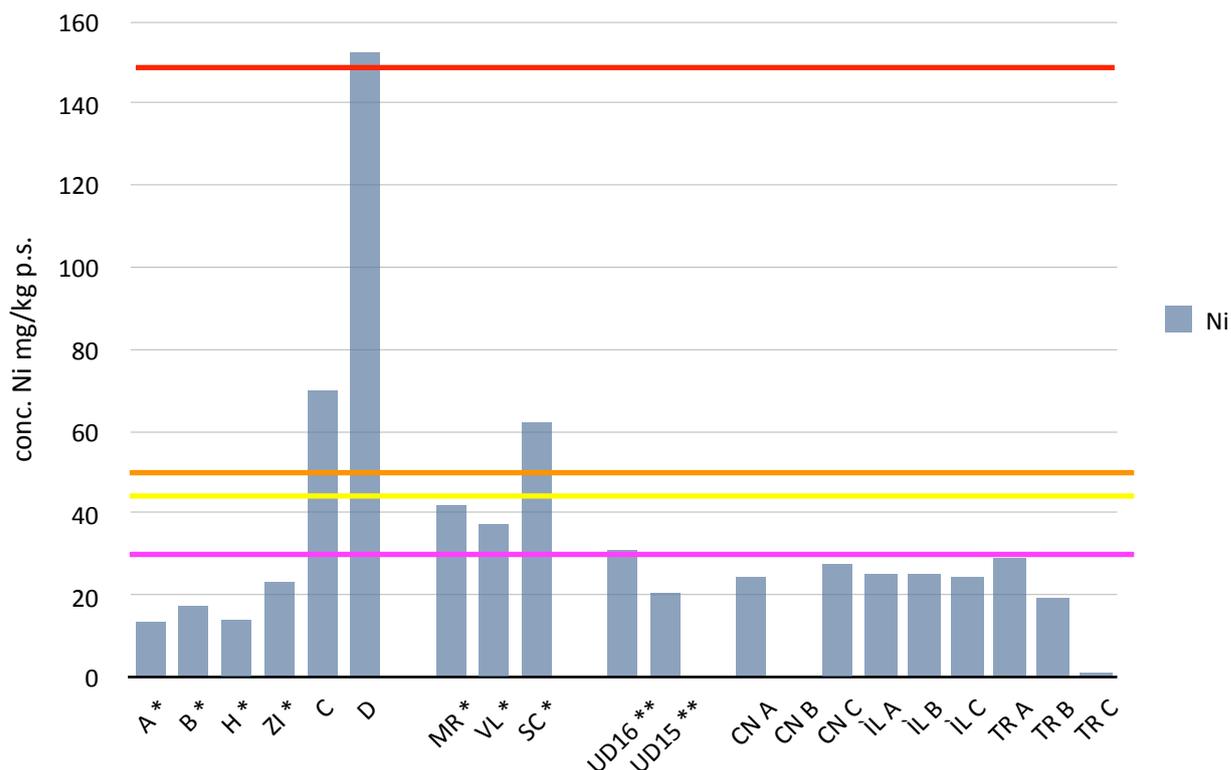


figura 13. Istogrammi riportanti i valori di concentrazione di Nichel rilevati in ciascuno dei siti analizzati. La linea gialla rappresenta il limite tabellare di colonna A, la linea arancione quello di colonna B, la linea rossa quello di colonna C e la linea fuxia quello stabilito dalla normativa comunitaria.

I livelli di concentrazione di Nichel nei campioni analizzati sono piuttosto variegati nelle diverse aree considerate. In laguna di Venezia è visibile un andamento omogeneo per i siti A, B, H e ZI che riportano valori inferiori al limite tabellare più basso, ossia quello stabilito a livello comunitario e sono compresi fra 13,2 mg/kg p.s. (A) e 23,2 mg/kg p.s. (ZI). I campioni C e D invece riportano valori di molto superiori e che vanno oltre il limite tabellare di colonna B, pari a 70 mg/kg p.s. (C) e oltre il limite di colonna C, 152 mg/kg p.s. (D).

Nel Delta del Po si trovano valori di concentrazione di Nichel sempre superiori al limite tabellare più basso disponibile, ovvero quello comunitario, con valori di poco al di sotto del limite tabellare di colonna A per due campioni (MR, 42,0 mg/kg p.s.; VL, 37,3 mg/kg p.s.) e al di sopra per il terzo sito (SC, 62,2 mg/kg p.s.).

I siti analizzati in Laguna di Marano sono, l'uno appena al di sopra del limite tabellare comunitario (UD16, 30,9 mg/kg p.s.) e l'altro che si attesta sui 20,7 mg/kg p.s.

I siti appartenenti alla Ria di Aveiro, sono piuttosto omogenei tra loro, oscillano attorno a un valore medio di 24,9 mg/kg p.s., al di sotto del limite tabellare comunitario, mentre si discostano i due siti

CN B che riporta un livello di Nichel al di sotto del limite di quantificazione e TR C che riporta il valore molto basso di 0,78 mg/kg p.s.

Si evidenzia per i campioni C e D appartenenti alla Laguna di Venezia un particolare accumulo di Nichel dovuto probabilmente agli interventi effettuati alle bocche di porto a cavallo tra le due campagne di campionamento (2011 e 2014), per valutare i possibili effetti di tale concentrazione è indispensabile approfondire attraverso lo studio di speciazione geochimica e di bioaccumulo di Nichel nelle vongole l'effettiva frazione biodisponibile e bioaccumulabile del metallo totale.

Delle aree analizzate, la Ria di Aveiro è da considerarsi idonea alla coltivazione e alla raccolta di vongola verace filippina come pure la Laguna di Marano e la Laguna di Venezia fatta eccezione per i siti C e D e per i siti del Delta del Po che risultano fuori dai limiti normativi.

Per una decisione definitiva e puntuale diventa indispensabile verificare il bioaccumulo nelle vongole.

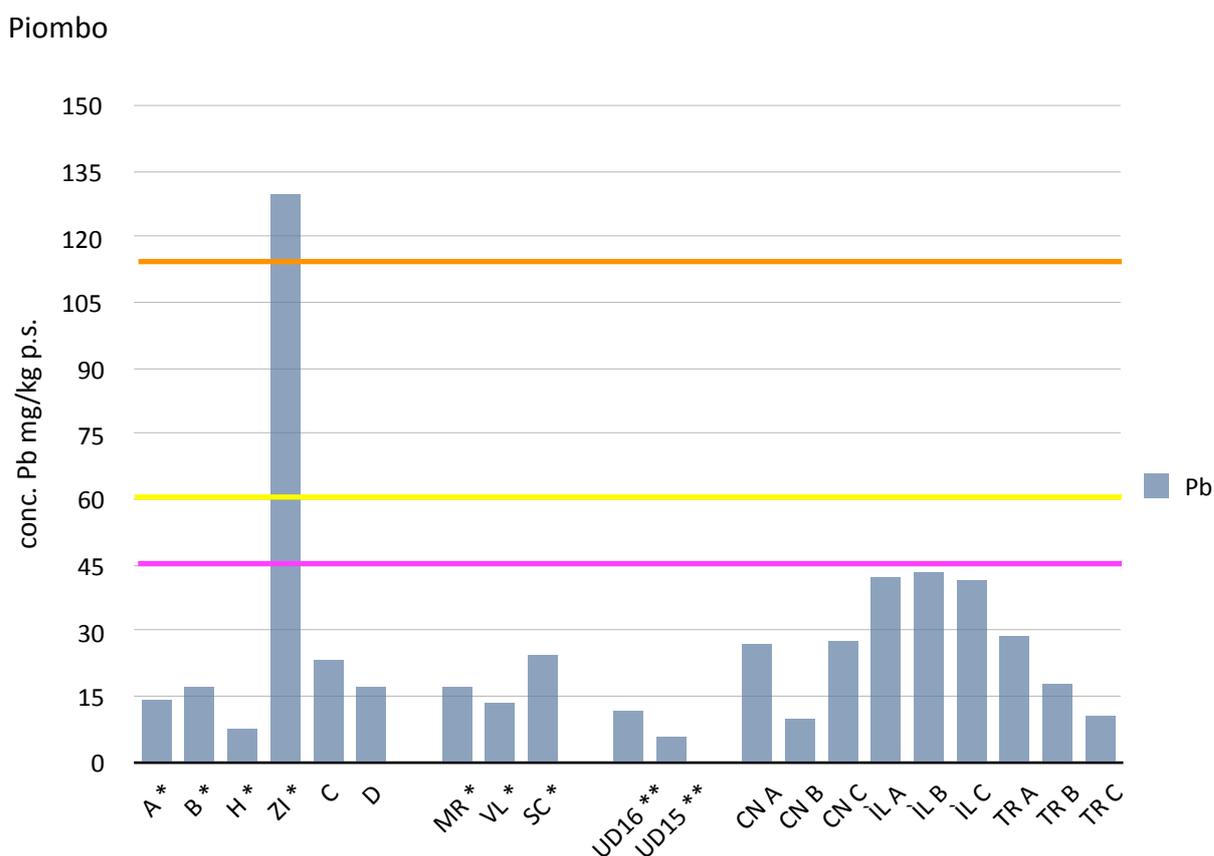


figura 14. Istogrammi riportanti i valori di concentrazione di Piombo rilevati in ciascuno dei siti analizzati. La linea gialla rappresenta il limite tabellare di colonna A, la linea arancione quello di colonna B e la linea fucsia quello stabilito dalla normativa comunitaria.

I valori di concentrazione di Piombo rilevati in Laguna di Venezia, sono tutti al di sotto del limite tabellare previsto dalla normativa comunitaria e oscillano da un minimo di 7,16 mg/kg p.s. (H) a un massimo di 23 mg/kg p.s. (C). Fa eccezione il campione prelevato in zona industriale che riporta un valore di 130 mg/kg p.s., superiore ai limiti tabellari di colonna B.

Per quanto riguarda il Delta del Po, riscontriamo valori omogenei tra loro e che oscillano attorno a 18 mg/kg p.s., con un minimo di 13,2 mg/kg p.s. (VL) e un massimo di 24,5 mg/kg p.s. (SC).

In laguna di Marano la situazione è analoga, ma con valori inferiori che si attestano sugli 11,5 mg/kg p.s. (UD16) e 11,5 mg/kg p.s. (UD15).

La Ria di Aveiro è caratterizzata dalla presenza di un canale piuttosto omogeneo, quello di ìlhavo, i cui valori sono tutti di poco al di sotto del limite tabellare comunitario (ìL A, 42,0 mg/kg p.s.; ìL B 43,5 mg/kg p.s.; ìL C 41,2 mg/kg p.s.). Il canale di S. Jacinto presenta due siti omogenei con valori di 27,0 mg/kg p.s. (CN A) e 27,6 mg/kg p.s. (CN C) con un sito, CN B che mostra un valore decisamente inferiore 9,59 mg/kg p.s. Il canale di Mira, mostra tre valori di concentrazione di Nichel diversi tra loro: TR A, 28,4 mg/kg p.s.; TR B 17,8 mg/kg p.s. e TR C 10,2 mg/kg p.s.

Generalmente, si osserva che i livelli di concentrazione di Pb nelle diverse sub aree sono omogenei. Fanno eccezione, per la Laguna di Venezia, il campione prelevato nella zona industriale che si trova nella zona di collettamento delle acque di scolo provenienti dal polo chimico industriale di Porto Marghera, ricche di contaminanti, e per la Ria di Aveiro, i campioni CN B e TR C che risultano molto meno contaminati rispetto ai siti limitrofi.

Per tutti i siti analizzati si può verificare un valore di buona qualità ambientale per la coltivazione o la raccolta della vongola verace filippina tranne che per il sito appartenente alla Zona Industriale di Porto Marghera, per il quale è necessario approfondire la biodisponibilità attraverso studi di speciazione geochimica e di bioaccumulo nelle vongole.

Zinco

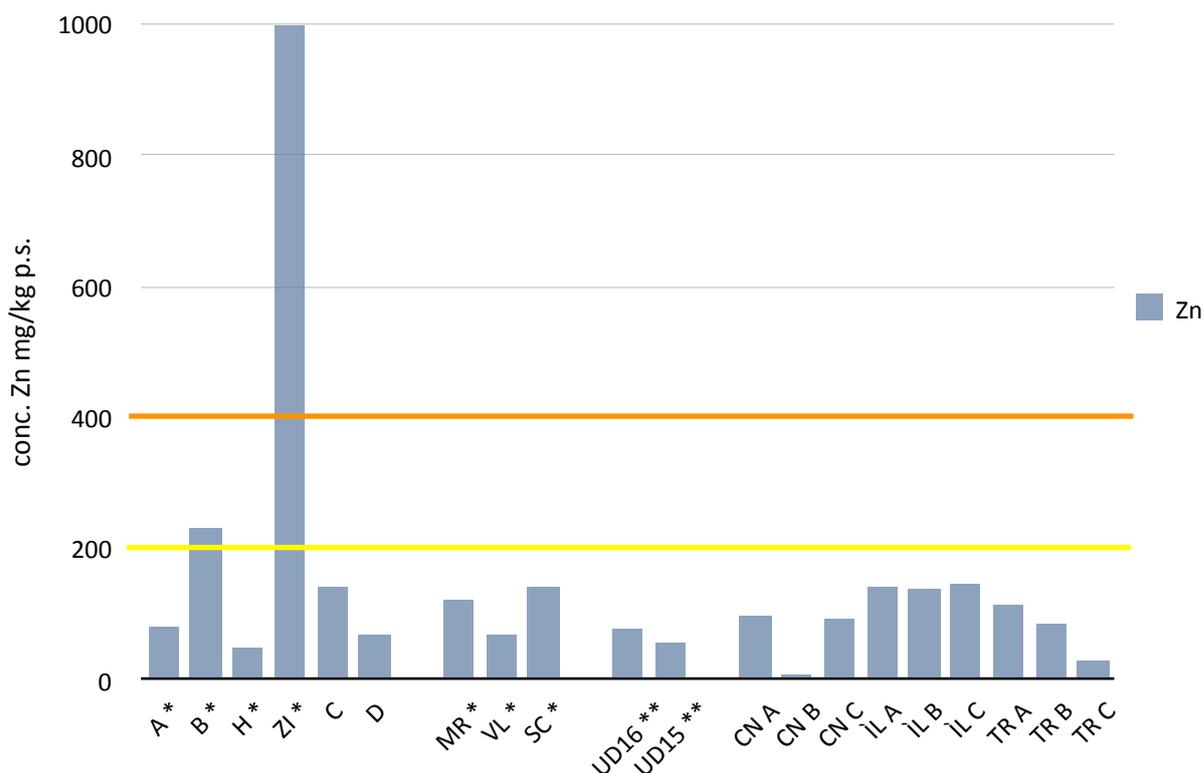


figura 15. Istogrammi riportanti i valori di concentrazione di Zinco rilevati in ciascuno dei siti analizzati. La linea gialla rappresenta il limite tabellare di colonna A, la linea arancione quello di colonna B.

I valori di concentrazione di Zinco rilevati per la laguna di Venezia sono tutti al di sotto del limite tabellare di colonna A, eccezion fatta per il campione B che, con un valore di 233 mg/kg p.s. supera di poco tale limite e per il campione ZI, che con un valore di 1000 mg/kg p.s., supera il limite tabellare di colonna B.

I siti analizzati nel Delta del Po riportano valori al di sotto del limite tabellare di colonna A: MR, 122 mg/kg p.s.; VL, 67,7 mg/kg p.s. e SC 143 mg/kg p.s.

Anche i due siti analizzati in Laguna di Marano riportano valori inferiori ai limiti tabellari e mediamente più bassi rispetto al Delta del Po: UD16, 78,1 mg/kg p.s.; UD15 57,5 mg/kg p.s.

Analogamente, nella Ria di Aveiro sono presenti siti che riportano una concentrazione di Zn nel sedimento omogenea e inferiore ai limiti (media 116 mg/kg p.s.), con due siti, CN B e TR C, che riportano valori inferiori alla media, CN B 8,65 mg/kg p.s.; TR C 28,9 mg/kg p.s.

Nelle aree prese in considerazione i livelli di Zinco sono piuttosto omogenei e fa eccezione solo il campione ZI appartenente all'area direttamente adiacente alle zone di scolo dei canali industriali di Porto Marghera.

In generale, è possibile notare come l'andamento della contaminazione riscontrata nelle tre zone di transizione analizzate è quasi sempre al di sotto dei limiti tabellari previsti dalla normativa citata, fa eccezione il sito della zona industriale di Venezia, che si presenta quasi sempre molto contaminato con valori ben al di sopra di quelli previsti dalla normativa comunitaria e dalla normativa per Venezia relativamente alla colonna A.

Per quanto riguarda il Cromo, sono numerosi i siti che presentano concentrazioni al di sopra dei limiti più bassi stabiliti, ossia quelli comunitari. Tale fenomeno può essere dovuto sia alla massiccia presenza di minerali che ne sono naturalmente ricchi che all'apporto antropico, poiché si tratta di uno tra i vari metalli legati ai processi industriali attivi nei diversi poli industriali adiacenti ai siti studiati.

Il sedimento marino, come già ricordato, costituisce poi un sito di deposito per tutti i contaminanti che possono essere, a seconda delle condizioni, risospesi nella colonna d'acqua, oppure essere resi mobili in seguito a variazioni di pH e potenziale redox del sedimento, fenomeni che possono portare alla solubilizzazione e mobilità degli elementi considerati.

Generalmente, per la maggior parte dei siti analizzati si può rilevare un valore di buona qualità ambientale per la coltivazione o la raccolta della vongola verace filippina tranne che per il sito appartenente alla Zona Industriale della Laguna di Venezia.

Escluso il campione appartenente alla zona industriale, i siti campionati in Laguna di Venezia, mostrano un pattern di discreta qualità, superando i limiti tabellari puntualmente e soltanto per Cd (sito c), Cr (siti B, H, C e D), Ni (siti C e D) e Zn (sito B). La presenza di aree più o meno omogenee per quanto riguarda il contenuto di metalli e metalloidi ha a che fare con le caratteristiche geochemiche dei sedimenti, ma anche con l'idrodinamica caratteristica della laguna che è in una fase di continui cambiamenti legati alla recente costruzione di barriere mobili artificiali (MOSE) che ha portato a numerose alterazione della batimetria delle tre bocche di porto con conseguenti impatti sull'idrodinamica delle sub-aree lagunari (Ghezzi et al., 2010), ma va anche considerato l'effetto di risospensione e trasporto dei sedimenti dovuto al transito veicolare navale ordinario e soprattutto straordinario, legato alle grandi imbarcazioni sempre più presenti in Laguna. Anche le attività di ripascimento e mantenimento dei canali hanno un impatto sull'idrodinamica e sulla qualità dei sedimenti lagunari, il dragaggio di sedimenti, infatti, comporta esso stesso effetti di risospensione e, ovviamente, di traslocazione artificiale di materiale di diversa qualità che viene allocato dove necessario per mantenere stabili le caratteristiche idrodinamiche dei sistemi lagunari per garantirne inalterata la "funzione nautica" (Guerra et al., 2009).

I due siti appartenenti alla laguna di Marano mostrano livelli di contaminazione simili e eccedono i valori limite per Cromo, Mercurio e Nichel (solo il campione UD16). Mediamente, il sito UD 16 mostra concentrazioni più elevate di metalli e metalloidi, probabilmente per la sua natura granulometrica che vede una prevalenza di frazione fine in cui, come è noto (Jung, 2010), i metalli tendono ad accumularsi per maggiore affinità chimico-fisica che li porta a trovarsi in forme aggregative e/o associative variabili, ma meno labili rispetto a quelle che si instaurano con la frazione grossolana. Inoltre, i due siti analizzati sono soggetti a fenomeni idrodinamici differenti, poiché interessati in maniera diversa dalle correnti di discreta intensità che si verificano nei pressi della bocca di porto. Il sito denominato UD16, infatti, si trova in una zona più interna della laguna, è meno coinvolto dalle correnti tidali e può costituire con maggiore probabilità un sito di deposito di sedimento proveniente dalle aree circostanti, trovandosi più vicino al bacino scolante e, quindi, può essere raggiunto con maggiore probabilità dalle acque di scolo provenienti dalla terraferma. Il sito UD15 invece, si trova nelle vicinanze della bocca di porto e, oltre ad essere maggiormente interessato dalle correnti tidali che portano a un continuo mescolamento di acque e sedimento, è anche più lontano dalle zone di deposito del sedimento lagunare costituendo un sito di scambio più che di accumulo.

Infine, la Ria di Aveiro, si dimostra un'area piuttosto omogenea dove i valori di concentrazione di metalli e metalloidi eccedono i valori limite per As, Cd e Cr.

Internamente ai diversi canali esistono comunque elementi di disomogeneità, come ad esempio nel canale di Mira, dove i livelli di concentrazione di metalli e metalloidi sono per lo più variabili nei tre siti analizzati. Infatti, oltre ad esserci un sito che mediamente riporta valori ben al di sotto della media dell'area (TR C), sono stati analizzati altri due siti che spesso si sono dimostrati disomogenei tra loro. Il canale di Ilhavo invece mostra tre siti che riportano valori di concentrazione di metalli e metalloidi del tutto paragonabili per ogni elemento analizzato.

Infine, il canale di Mira presenta due siti che mostrano valori paragonabili tra loro per tutti i metalli e metalloidi analizzati, mentre il terzo sito, CN B, è caratterizzato da valori di concentrazione molto più bassi rispetto alla media del sito anche di un ordine di grandezza. Anche in questo caso, la composizione granulometrica dei siti sembra avere un ruolo nel determinare una maggiore o minore affinità di base per la presenza di metalli e metalloidi. I due siti infatti, hanno una netta prevalenza di frazione grossolana, meno efficiente all'interazione chimico-fisica con questa tipologia di contaminanti a causa della ridotta area superficiale e dalla minore capacità di scambio cationico/anionico (Luoma and Rainbow, 2008). I sedimenti dei siti CN B e TR C sono talmente diversi da quelli dei canali cui appartengono da far pensare che possano essere stati oggetto di prelievo e ripascimento in queste aree.

Come si può cominciare a dedurre da questi primi dati presentati, le dinamiche in gioco hanno una forte impronta sito-specifica che caratterizza in maniera del tutto particolare l'equilibrio di tutte le forze in gioco nelle diverse aree di indagine.

È possibile avere ulteriore conferma di ciò osservando, per confronto, anche i dati raccolti nei due siti del Delta del Po, area vicina alla Laguna di Venezia, che presenta però le sue peculiarità.

Essi infatti, mostrano un pattern di qualità apparentemente inferiore, poiché tutti e tre i siti eccedono i limiti tabellari per Cr e Ni. Tuttavia, come è stato più volte sottolineato (Tarvainen e Kallio, 2002), la variazione, anche di un ordine di grandezza, nel livello di metalli e metalloidi nei sedimenti marini, può essere dovuto alle diverse proprietà geologiche dei sedimenti stessi e delle relative rocce di origine. In particolare, nel Delta del Po è già stato riscontrato (Amorosi et al., 2002; Vignati et al., 2003; Amorosi e Sammartino, 2007) che i livelli di concentrazione di questi elementi sono normalmente più alti dei valori limite proposti dalle linee guida e possono essere considerati a partire da livelli di background naturalmente più elevati che altrove, come legati alle caratteristiche geochemiche del bacino scolante del fiume Po.

Tutte le ipotesi relative all'origine, alle dinamiche e ai fenomeni di accumulo e mobilità di metalli e metalloidi sono state vagliate nella sezione seguente dedicata ai risultati della speciazione geochemica.

Fattore di bioaccumulo

Il fattore di bioaccumulo, (BAF), definito come il rapporto tra il contenuto di metallo/metalloide nei tessuti dell'organismo target e il contenuto di metallo/metalloide nel sedimento, è stato analizzato per i siti oggetto di studio ogni qualvolta è stato possibile il prelievo contestuale di campioni di vongola verace filippina e sedimento marino. Gli organismi, prima di essere trattati per le successive analisi, sono stati sottoposti alle operazioni di spurgo condotto a livello industriale o in laboratorio per un tempo non inferiore alle 24 ore e non superiore alle 48 ore mediante acqua salmastra pulita. Nel sito ZI (Zona Industriale) non sono stati trovati esemplari di *R. philippinarum*, pertanto non è stato possibile il calcolo del BAF.

Di seguito, vengono riportati in tabella 7 i valori di concentrazione nei tessuti degli organismi riscontrati per i diversi metalli e metalloidi analizzati e di seguito in tabella 8 i relativi valori di bioaccumulo.

Tabella 7 valori di concentrazione espressi in mg/kg dei diversi metalli riscontrate nei tessuti di organismi prelevati contestualmente ai sedimenti a confronto con i *dati disponibili per la laguna di Venezia (Baccarani, 2012) e i **dati disponibili per la laguna di Marano (Breda, 2012)

	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn
A *	18,9	0,38	1,80	15,0	365	5,90	0,42	208
B *	36,8	0,51	2,03	14,3	694	15,5	0,46	98
H *	17,5	0,24	1,46	11,2	329	8,39	0,28	101
MR *	14,9	0,29	1,96	9,89	378	15,2	0,61	186
VL *	16,9	0,35	2,92	9,81	420	15,3	0,69	189
SC *	13,8	0,28	2,23	9,33	385	14,7	0,64	169
UD16 **	12,7	0,28	2,42	6,94	279	7,68	0,26	80
UD15 **	21,8	0,18	2,59	21,1	258	9,81	0,26	73
CN A	40,0	0,25	1,50	5,12	795	6,63	1,90	119
ÌL A	57,0	0,43	1,30	5,50	825	6,47	2,40	130
TR A	48,5	0,37	1,30	5,10	783	7,53	2,10	117

Le concentrazioni degli elementi riscontrate negli esemplari di vongola verace filippina mostrano un contenuto di metalli/metalloidi abbastanza elevato e omogeneo nelle diverse aree analizzate, a parte qualche eccezione. Per la Laguna di Venezia il sito B riporta i valori di concentrazione più elevati per quasi tutti i metalli analizzati; gli organismi prelevati nel sito VL riportano il contenuto maggiore di metalli e metalloidi del Delta del Po, anche se i valori non si discostano poi molto da quelli degli altri due siti appartenenti alla stessa area.

I campioni prelevati dalla laguna di Marano mostrano valori abbastanza simili per tutti i metalli analizzati con un contenuto maggiore per As, Cu e Ni nei campioni del sito UD15. Nella Ria di Aveiro i valori di contenuto di metalli e metalloidi nei diversi siti è abbastanza omogeneo con valori talvolta più elevati per il sito ÌL A (As, Cd, Cu, Fe, Pb e Zn).

Gli organismi che risultano mediamente più contaminati sono quelli appartenenti ai siti B (Laguna di Venezia), VL (Delta del Po), UD15 (Laguna di Marano), ÌL A (Ria di Aveiro).

In tabella 8 sono riportati i valori di bioaccumulo calcolati per tutti i campioni analizzati e sono stati evidenziati in grassetto quelli con valore superiore a 1 dove si manifesta un effettivo bioaccumulo da parte dell'organismo. Tali valori vanno interpretati alla luce dei principali processi metabolici e fisiologici tipici della specie target fino ad ora noti, ma anche tenendo in debita considerazione l'influenza della forma chimica più o meno potenzialmente biodisponibile in cui il metallo o metalloide si trova nei sedimenti analizzati.

Tabella 8 valori del fattore di bioaccumulo (BAF) calcolati come rapporto tra il quantitativo di metallo/metalloide nei tessuti degli organismi e il quantitativo di metallo/metalloide presente nel sedimento a confronto con i *dati disponibili per la laguna di Venezia (Baccarani, 2012) e i **dati disponibili per la laguna di Marano (Breda, 2012)

BAF	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn
A *	2,03	2,53	0,02	1,43	0,02	0,45	0,03	2,63
B *	3,23	2,13	0,02	0,91	0,03	0,91	0,03	0,42
H *	2,90	2,40	0,01	1,66	0,03	0,59	0,04	2,11
MR *	1,51	2,42	0,01	0,67	0,01	0,36	0,04	1,52
VL *	2,93	5,00	0,02	1,16	0,02	0,41	0,05	2,79
SC *	1,45	1,75	0,01	0,35	0,01	0,24	0,03	1,18
UD16 **	1,40	1,56	0,03	0,34	0,02	0,25	0,02	1,03
UD15 **	3,40	1,13	0,05	1,94	0,03	0,47	0,05	1,26
CN A	1,68	0,37	0,02	0,30	0,02	0,26	0,07	1,26
ÌL A	2,28	0,86	0,02	0,18	0,03	0,26	0,06	0,91
TR A	2,54	1,09	0,03	0,32	0,03	0,31	0,09	1,19

Si nota anzitutto che in tutti i siti analizzati siano elevati i valori di bioaccumulo per l'Arsenico, fino a raggiungere valori massimi di 3,23 e 3,40 nei siti B (Laguna di Venezia) e UD15 (Laguna di Marano). Come è noto (Argese et al, 2009), l'Arsenico inorganico assunto dagli organismi può essere

organicato e accumulato sotto forma di arsenobetaina e questo fenomeno spiega i valori di BAF riscontrati.

Per quanto riguarda il Cd, si riscontrano valori di bioaccumulo maggiori di 1, in particolare nelle aree del nord Adriatico e nei siti VL, A e, in misura minore, nella laguna di Marano. Questa è una diretta conseguenza dell'alta mobilità e biodisponibilità di Cadmio (V) che tende ad accumularsi nelle vongole più che nel sedimento, quando questo si trova in condizioni riducenti. Valori superiori a 1 si riscontrano anche per il Cu in alcune stazioni (A, H, VL e UD15), tale metallo è fisiologico quindi è normalmente presente nei tessuti dell'organismo in virtù delle sue funzioni metaboliche.

Analogamente, anche i fattori di bioaccumulo dello Zinco sono maggiori di 1, ma trattandosi anche in questo caso di un metallo fisiologico per gli organismi, questo dato non desta particolare preoccupazione.

Sono molto bassi i valori di bioaccumulo per Cromo, Ferro e Piombo, a indicare che tali metalli non vengono bioaccumulati e che probabilmente non si trovano in forma biodisponibile anche se presenti in quantità elevate.

A livello normativo, sono presenti dei limiti tabellari per il quantitativo di metalli pesanti ammissibili negli organismi. I limiti stabiliti a livello comunitario sono contenuti del regolamento n. 1881/2006 e sono riportati valori di concentrazione in peso umido (p.u.) per Piombo (1,5 mg/kg p.u.), Mercurio (0,5 mg/kg p.u.) e Cadmio (1,0 mg/kg p.u.). Tali metalli, insieme all'Arsenico, sono considerati oggetto di attenzione e monitoraggio da parte di enti governativi quali, ad esempio, l'EFSA (European Food Safety Authority). In tabella 9 sono presentati i valori di concentrazione di questi quattro elementi negli organismi analizzati espressi in peso umido al fine di poterli confrontare con i valori soglia stabiliti dalla normativa comunitaria.

Tabella 9 valori di concentrazione espressi in mg/kg p.u. dei diversi metalli riscontrate nei tessuti di organismi prelevati contestualmente ai sedimenti a confronto con i *dati disponibili per la laguna di Venezia (Baccarani, 2012) e i **dati disponibili per la laguna di Marano (Breda, 2012).

	Cd	Pb
valore soglia reg 1881/2006 CE	1,0	1,5
A *	0,1	0,1
B *	0,1	0,1
H *	0,0	0,0
MR *	0,0	0,1
VL *	0,0	0,1
SC *	0,0	0,1
UD16 **	0,0	0,0
UD15 **	0,0	0,0
CN A	0,0	0,3
ÌL A	0,1	0,3
TR A	0,1	0,3

Come è possibile osservare dalla tabella 10, i campioni raccolti nei siti analizzati presentano livelli di concentrazione ampiamente al di sotto del limite normativo.

Infine, per un'ulteriore valutazione dei livelli di tossicità della matrice di crescita della specie target, è stato calcolato il quantitativo di vongole che è necessario consumare da parte di un uomo di 70 kg per eccedere i limiti di dose settimanale di metalli e metalloidi consentita così come stabilito mediante valori soglia dalla Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

Tabella 10 quota di vongole (espressa in kg di peso umido) che un adulto di 70 kg deve consumare per eccedere i valori di PTWI JECFA calcolata a partire dalle concentrazioni di metalli e metalloidi nelle vongole (peso umido) *dati disponibili per la laguna di Venezia (Baccarani, 2012) e i **dati disponibili per la laguna di Marano (Breda, 2012)

	As	Cd	Cu	Ni	Pb
PTWI (mg/kg•settimana)					
JECFA	0,015	0,007	3,5	0,035	0,025
PTWI₇₀ calcolato per 70 kg di peso corporeo (PTWI • 70 kg)					
	1,05	0,49	245	2,45	1,75
Dose settimanale di vongole che eccede il limite normativo per ogni sito e per ogni metallo (kg)					
A *	0,40	9,21	117	2,97	29,8
B *	0,20	6,86	122	0,48	16,3
H *	0,43	14,6	156	0,89	26,8
MR *	0,50	12,1	177	0,49	12,3
VL *	0,44	10,0	178	0,49	10,9
SC *	0,54	12,5	188	0,51	11,7
UD16 **	0,59	12,5	252	0,98	28,8
UD15 **	0,34	19,4	83	0,76	28,8
CN A	0,19	14,0	342	1,13	3,95
ÌL A	0,13	8,14	318	1,16	3,13
TR A	0,15	9,46	343	1,00	3,57

Come si può osservare dai risultati illustrati in tabella 10, in alcune zone i valori di consumo tale da eccedere i valori soglia di alcuni metalli, rende la dose permessa molto bassa. Il metallo che riporta i valori più bassi è l'Arsenico del sito B e nell'area della Ria di Aveiro, dove consumi di appena 130-200 grammi di vongole alla settimana risultano potenzialmente pericolose dal punto di vista tossicologico. Anche i valori limite determinati dal quantitativo di Nichel nel Delta del Po, portano la dose consumabile a quantità appena al di sotto dei 500 grammi alla settimana. In tutti gli altri casi si hanno valori attorno al chilogrammo o superiori, tali da garantire un consumo normale nel rispetto degli standard di sicurezza alimentare.

La speciazione geochemica

Di seguito vengono riportati i risultati relativi alla speciazione geochemica applicata sui campioni di sedimenti di tutti i siti analizzati secondo la metodica illustrata nel capitolo precedente.

Tali risultati permettono di valutare da una parte, il comportamento degli elementi analizzati rispetto alle fasi geochemiche di associazione per le quali hanno diversa affinità, e dall'altra parte evidenziano i livelli di diretta e potenziale biodisponibilità per ciascun contaminante.

Arsenico

In tabella 11 sono riportati i valori di concentrazione di Arsenico riscontrati nelle varie fasi geochemiche e nel grafico di figura 16 sono illustrate le distribuzioni percentuali di metalloide tra le varie fasi associative del sedimento.

Tabella 11 - valori medi di concentrazione di As riscontrati nelle varie fasi geochemiche, espressi in mg/kg p.s. È riportata anche la resa della procedura di speciazione calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di As riscontrato nei sedimenti appartenenti ai siti campionati nell'ambito del presente studio posti a confronto con i valori riscontrati *da Baccarani (2012) eBreda (2012).**

As	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	V fase	resa
A *	0,21	0,59	1,51	1,51	0,49	0,49	89%
B *	0,15	1,99	1,26	1,46	0,75	0,75	99%
H *	0,03	0,18	0,81	0,47	0,54	0,54	-
ZI *	0,03	<LOD	0,26	4,11	0,08	0,65	75%
C	0,15	1,95	1,32	1,80	1,00	3,00	102%
D	0,10	1,15	1,70	2,04	0,40	2,00	101%
MR *	0,10	0,30	0,74	1,54	0,27	1,81	-
VL *	0,17	0,46	0,83	3,27	0,04	0,72	117%
SC *	0,05	1,35	1,80	4,22	0,14	2,32	104%
UD16 **	0,31	1,83	3,1	2,97	1,63	21,3	117%
UD15 **	0,50	1,52	1,99	0,85	1,04	10,1	111%
CN A	<LOD	<LOD	2,86	7,76	<LOD	8,70	85%
ÌLA	<LOD	<LOD	4,98	8,39	<LOD	9,67	103%
TR A	<LOD	<LOD	1,98	3,88	<LOD	11,00	99%

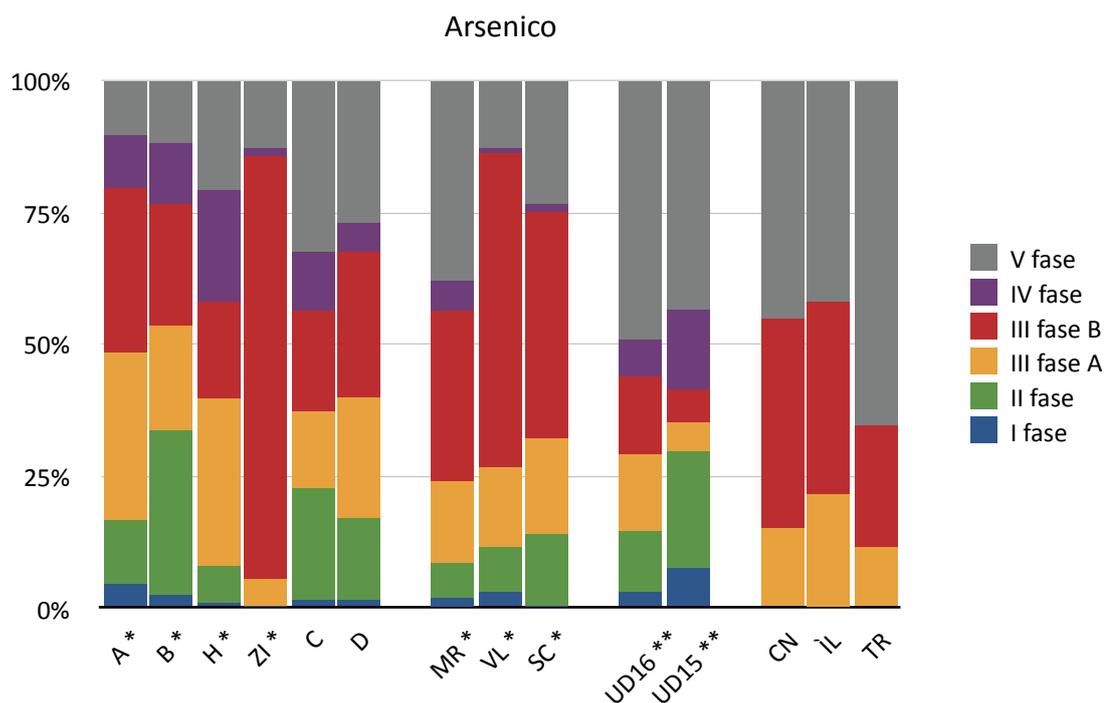


Figura 16 - Distribuzione percentuale dell'As nella varie fasi geochimiche

Come si può notare dai dati presentati, il metalloide è ripartito prevalentemente (80-100%) tra la terza fase e la fase residuale con una distribuzione percentuale diversa a seconda del sito analizzato. Il metalloide, associato alla terza fase con gli ossidi e idrossidi di Ferro e Manganese insolubili, viene mobilizzato e reso biodisponibile quando l'ambiente passa da condizioni aerobiche a quelle anaerobiche, determinando la riduzione di Fe^{3+} e Mn^{4+} , insolubili, a Fe^{2+} e Mn^{2+} solubili e quindi, il loro trasferimento, insieme ai metalli e metalloidi ad essi associati, dalla fase sedimentaria alla colonna d'acqua sovrastante.

In tutti i siti dell'alto Adriatico analizzati si riscontrano percentuali, seppur basse, di metalloide associato alla prima, seconda e alla quarta fase, cosa che non accade nella Ria di Aveiro, dove si riscontrano valori di concentrazione inferiori ai limiti di quantificazione in queste tre fasi.

La particolare affinità dell'Arsenico per gli ossidi e idrossidi di Fe che vanno ad essere solubilizzati nella terza fase era già nota in letteratura (Argese et al, 2005; Argese et al., 2009) e viene riconfermata anche da questi studi. Tale fase associativa, infatti, è tipicamente preferenziale anche per altri metalli e metalloidi e si dimostra tanto più stabile quanto maggiore è il grado di cristallinità raggiunto dall'ossido, che può essere amorfo (solubilizzato dalla terza fase A) oppure via via più cristallino (solubilizzato dalla terza fase B oppure dalla fase residuale). Il livello di cristallinità raggiunto dall'ossido è anche indicativo della sua età di formazione e, quindi, del grado della sua stabilità rispetto alle condizioni ambientali. Ad esempio, i sedimenti appartenenti all'area della laguna di Venezia e del Delta del Po, probabilmente contengono un quantitativo maggiore di

ossidi e idrossidi di Fe di formazione recente (terza fase A e B) rispetto ai sedimenti della laguna di Marano. Nello specifico, la laguna di Marano mostra quantitativi assoluti di Fe minori rispetto alle altre aree ed è caratterizzato anche da sedimenti che si trovano in uno stato redox piuttosto ridotto, tali condizioni si riflettono in un quantitativo minore di ossidi e idrossidi di Fe e quindi in una maggiore frazione di metalloide biodisponibile costituito da As trivalente solubile.

Sotto questo punto di vista la Ria di Aveiro si dimostra un ambiente molto diverso dove l'Arsenico non si trova né in forma biodisponibile (prima fase), né associato ai carbonati (seconda fase), né associato alla sostanza organica o ai solfuri (quarta fase). Tale fenomeno può essere legato alla maggiore idrodinamicità che comporta eventi risospensivi frequenti che movimentano sedimento e acqua interstiziale asportando continuamente le forme solubili.

Tabella 12 - valori medi di concentrazione di Cd riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg p.s. nei sedimenti appartenenti ai siti campionati nell'ambito degli studi già pubblicati *da Baccarani (2012) e **da Breda (2012).

Cd	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	V fase
A *	0,09	0,07	0,01	0,10	0,06	0,02
B *	0,13	0,09	0,01	0,01	0,02	0,01
H *	0,06	0,03	0,01	0,01	0,01	0,03
ZI *	1,79	2,33	0,16	0,02	0,14	0,09
MR *	0,07	0,04	0,01	0,01	0,02	0,02
VL *	0,04	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03
SC *	0,07	0,07	0,02	0,01	0,02	0,01
UD16 **	<LOD	0,09	0,01	0,01	<LOD	0,05
UD15 **	<LOD	0,07	0,01	0,01	<LOD	0,02

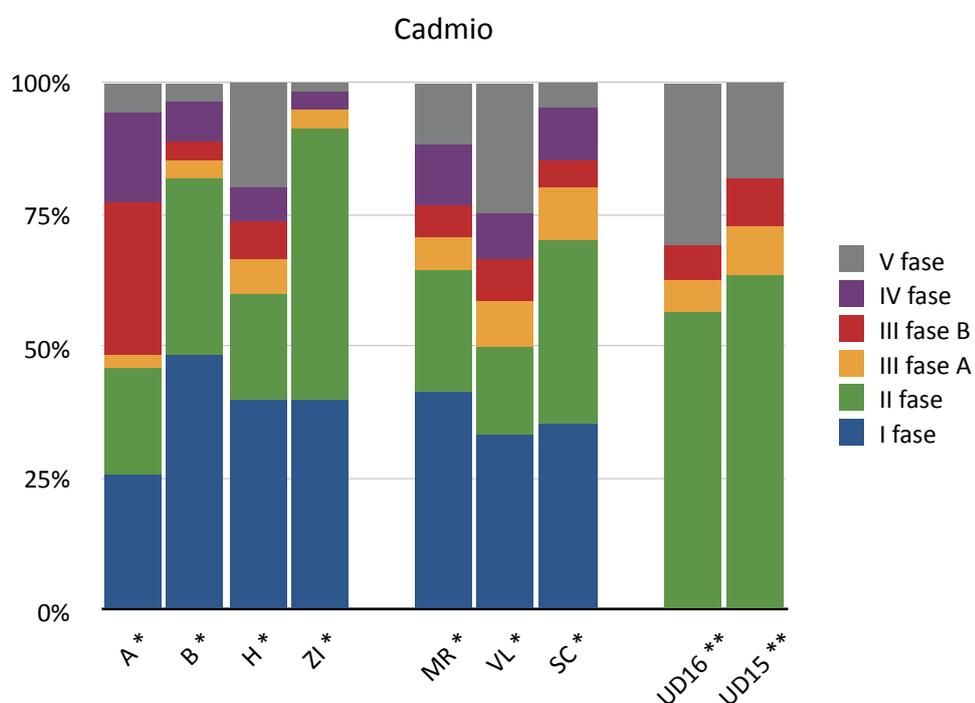


Figura 17 - Distribuzione percentuale del Cd nella varie fasi geochimiche

Per quanto riguarda i livelli di Cromo riscontrati, la Laguna di Venezia mostra una certa disomogeneità, il campione che riporta i livelli più bassi di contaminazione (53,4 mg/kg p.s.) è quello prelevato in zona industriale, di poco inferiore al valore limite stabilito a livello comunitario e superiore al limite di colonna A (20 mg/kg p.s.). Gli altri siti analizzati mostrano livelli maggiori di contaminazione, alcuni a Corno al valore limite di colonna B (campioni A, 101 mg/kg p.s.; B, 131 mg/kg p.s.; H 124 mg/kg p.s.) e altri che lo superano abbondantemente (campioni C, 166 mg/kg p.s.; D, 312 mg/kg p.s.).

I siti analizzati nel Delta del Po mostrano anch'essi valori abbastanza omogenei tra loro e superiori al limite tabellare di colonna B (MR, 178 mg/kg p.s.; VL, 147 mg/kg p.s.; SC 151 mg/kg p.s.).

I campioni prelevati nella Laguna di Marano mostrano valori diversi, uno vicino al limite tabellare comunitario (UD15, 52,7 mg/kg p.s.) e l'altro che invece lo supera attestandosi sugli 84,8 mg/kg p.s. (UD16).

La Ria di Aveiro mostra, invece, valori molto omogenei tra loro, tutti di poco superiori al limite tabellare comunitario fissato sui 50 mg/kg p.s., eccezion fatta per i siti CN B e TR C che riportano invece, valori molto più bassi e inferiori al limite tabellare più basso che, in questo caso, è quello della colonna A (CN B, 6,68 mg/kg p.s.; TR C 1,33 mg/kg p.s.).

I livelli di cadmio riscontrati nei campioni di sedimento delle diverse aree e la distribuzione di tale metallo nelle fasi geochimiche confermano quanto riportato in letteratura sulla mobilità e biodisponibilità di questo elemento. Infatti, esso risulta il più mobile e il più biodisponibile tra gli elementi studiati tanto che il suo accumulo nel sedimento risulta sempre molto limitato

Cromo

In tabella 13 sono riportati i valori di concentrazione di Cromo riscontrati nelle varie fasi geochimiche e nel grafico di figura 18 sono invece illustrate le distribuzioni percentuali di metallo tra le varie fasi associative del sedimento.

Tabella 13 - valori medi di concentrazione di Cr riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg p.s. È riportata anche la resa della procedura di speciazione calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Cr riscontrato nei sedimenti appartenenti ai siti campionati nell'ambito del presente studio posti a confronto con i valori riscontrati *da Baccarani (2012) eBreda (2012).**

Cr	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	V fase	resa
A *	1,44	1,58	2,83	5,40	0,94	71,2	83%
B *	0,99	1,44	3,08	8,19	0,78	57,1	96%
H *	0,91	1,35	3,14	7,30	0,72	77,1	73%
ZI *	0,04	1,08	4,27	16,8	0,16	23,7	96%
C	2,80	10,2	23,0	14,7	4,80	124	107%
D	4,90	12,4	23,4	112	4,40	95,0	81%
MR *	0,83	1,89	5,67	19,4	0,83	118	82%
VL *	0,75	1,41	4,41	19,9	0,76	117	98%
SC *	0,80	2,45	7,55	31,8	1,01	105	98%
UD16 **	5,46	10,8	<LOD	9,54	<LOD	51,7	97%
UD15 **	8,33	11,6	<LOD	5,99	<LOD	19,4	90%
CN A	0,02	0,09	0,55	1,06	0,16	15,04	80%
ÌL A	0,03	0,35	1,18	16,29	0,57	32,06	82%
TR A	0,02	0,01	0,22	1,11	0,39	4,02	83%

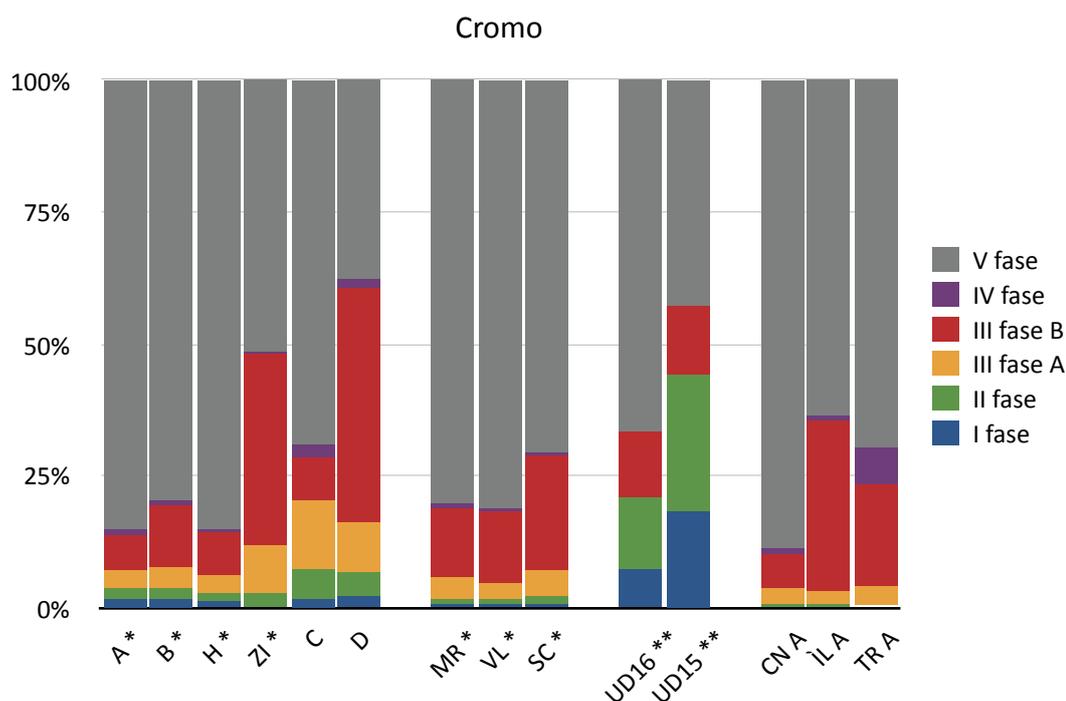


Figura 18 - Distribuzione percentuale del Cr nella varie fasi geochimiche

Per quanto riguarda il Cromo, è possibile notare come nei diversi siti analizzati sia sempre preponderante la quota di metallo associata alla fase residuale, ossia non biodisponibile.

La parte restante risulta associata alla terza fase B e alla terza fase A e in minima parte alla prima, seconda, alla quarta e alla prima fase, eccezion fatta per i campioni prelevati nella laguna di Marano UD16 e UD15 dove la prima fase pesa per una percentuale del 7 e del 18% e la seconda fase pesa per per il 14 e il 26%. In questi due siti quindi, la quota biodisponibile ha una significativa rilevanza rispetto a quanto accade nella Laguna di Venezia, nel Delta del Po e nella Ria di Aveiro.

La Laguna di Marano presenta una quantità di Cr biodisponibile maggiore rispetto alle altre aree, tuttavia tale contenuto è comunque inferiore ai limiti previsti dalla normativa. Nella laguna di Aveiro, la situazione è diverso e non si rileva una quota di metallo biodisponibile e il quantitativo presente in seconda fase sotto forma di carbonato è pure molto basso. Ancora una volta, si può ipotizzare che l'idrodinamica eserciti un effetto di dispersione delle forme più mobili del Cromo che sono costituite dalla sua forma esavalente. Nonostante i valori di contenuto totale di Cromo in molti casi eccedano i limiti previsti dalle normative considerate, il quantitativo rilevato in prima fase non supera tali limiti e anche i valori di bioaccumulo rilevato nei diversi siti è molto basso ad indicare che non si rilevano forme persistenti di Cromo biodisponibile.

Rame

In tabella 14 sono riportati i valori di concentrazione di Rame riscontrati nelle varie fasi geochimiche e nel grafico di figura 19 sono invece illustrate le distribuzioni percentuali di metallo tra le varie forme geochimiche del sedimento.

Tabella 14 - valori medi di concentrazione di Cu riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg p.s. È riportata anche la resa della procedura di speciazione calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Cu riscontrato nei sedimenti appartenenti ai siti campionati nell'ambito del presente studio posti a confronto con i valori riscontrati *da Baccarani (2012) eBreda (2012).**

Cu	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	V fase	resa
A *	0,19	0,72	0,02	0,83	4,18	3,07	0,86
B *	0,46	1,01	0,03	0,78	8,90	2,87	0,90
H *	0,41	8,70	0,07	1,11	1,76	2,53	0,93
ZI *	5,54	23,3	5,30	2,68	42,8	5,24	0,80
C	1,30	3,00	0,20	0,40	6,20	4,10	0,83
D	1,10	1,10	0,10	0,90	4,20	3,20	0,86
MR *	1,05	2,15	0,93	1,48	3,85	4,64	0,95
VL *	0,83	1,18	0,61	1,79	2,04	3,23	1,14
SC *	1,85	5,51	2,49	1,91	9,25	8,68	1,10
UD16 **	0,39	2,84	0,62	0,93	8,98	7,36	1,00
UD15 **	0,18	2,26	0,09	0,82	3,76	4,59	1,02
CN A	0,09	0,17	0,17	2,29	3,58	3,11	0,87
ÌL A	0,33	0,65	0,25	0,69	14,29	9,67	0,79
TR A	0,08	0,09	0,10	0,17	0,15	0,90	0,84

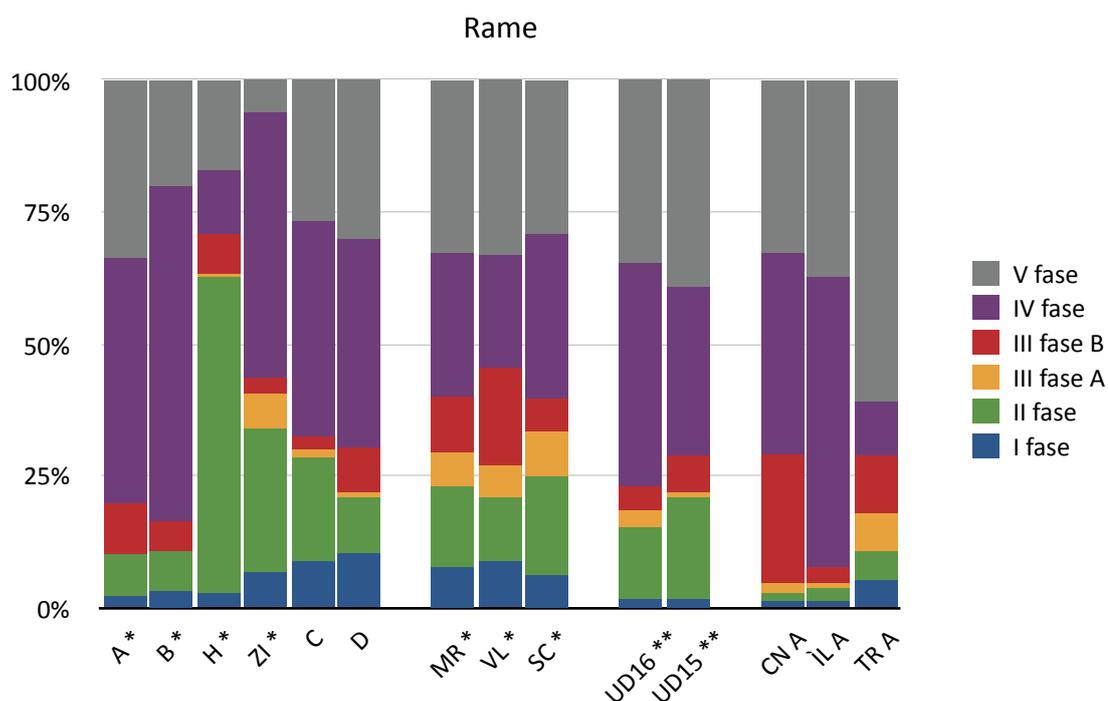


Figura 19 - Distribuzione percentuale del Cu nella varie fasi geochimiche

Come è possibile notare dai dati riportati, le principali fasi associative per il Rame sono la seconda e la quarta fase, per una percentuale che va dal 21 al 55%, fatta eccezione per i campioni H e TR A. Tale evidenza è conforme a quanto già evidenziato in letteratura (Argese e Bettiol, 2001; Argese et al., 2002) e si basa sulla forte affinità chimica che il metallo dimostra verso la materia organica, con la quale forma organo-complessi stabili in associazione con acidi umici e fulvici contenenti gruppi idrossilici e carbossilici in grado di chelare il metallo. La quarta fase si rende biodisponibile nel caso di condizioni del sedimento ossidanti.

È interessante che il Rame presenti una frazione più o meno significativa di metallo biodisponibile nella prima fase praticamente in tutti i siti testati contribuendo, in questo modo, a elevare sistematicamente nel tempo le concentrazioni di Rame nell'organismo e dando origine ai fattori di bioaccumulo riscontrati.

Anche la seconda fase riveste un ruolo di discreta importanza, soprattutto nei campioni del nord Adriatico, per una percentuale che oscilla dal 7 al 27%, con il campione H che arriva a percentuali del 60%. La frazione biodisponibile non raggiunge livelli di concentrazione vicini ai limiti di legge.

La fase residuale non è mai prevalente nei diversi siti, tranne che in TR A dove la distribuzione tra le fasi è piuttosto omogenea.

Le diversità nella distribuzione tra le fasi è dovuta alla presenza di diverse quantità di carbonati di calcio, ossidi/idrossidi di Ferro e Manganese, sostanza organica e solfuri differente per ogni area. Inoltre, la salinità, svolge in questo caso un ruolo di fondamentale importanza in quanto può

determinare il verificarsi di fenomeni associativi e dissociativi per effetto della sua capacità di schermare le cariche della sostanza organica e di aumentare la forza ionica.

Per esempio, nel sito IL A i bassi livelli di sostanza organica e di salinità probabilmente danno luogo a fenomeni di desorbimento meno significativi.

Ferro

In tabella 15 sono riportati i valori di concentrazione di Ferro riscontrati nelle varie fasi geochimiche e nel grafico di figura 20 sono invece illustrate le distribuzioni percentuali di metallo tra le varie fasi associative del sedimento.

Tabella 15 - valori medi di concentrazione di Fe riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg p.s. È riportata anche la resa della procedura di speciazione calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Fe riscontrato nei sedimenti appartenenti ai siti campionati nell'ambito del presente studio posti a confronto con i valori riscontrati *da Baccarani (2012) eBreda (2012).**

Fe	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	V fase	resa
A *	<LOD	267	662	6120	2100	6130	80%
B *	<LOD	694	859	6940	4620	4400	85%
H *	<LOD	556	559	3410	687	6100	88%
ZI *	0,35	107	1923	5651	4958	6100	85%
MR *	<LOD	1401	1930	8190	1120	13000	93%
VL *	<LOD	1060	1150	6440	930	9380	90%
SC *	<LOD	2090	2840	12100	1350	17800	106%
UD16 **	<LOD	1170	1400	4270	2070	4670	94%
UD15 **	<LOD	1030	886	4570	1085	2110	100%
CN A	0	518	1066	6286	2430	4810	95%
ÌL A	1,25	1055	1954	8000	4450	8120	98%
TR A	0	66,4	172	702	120	2390	98%

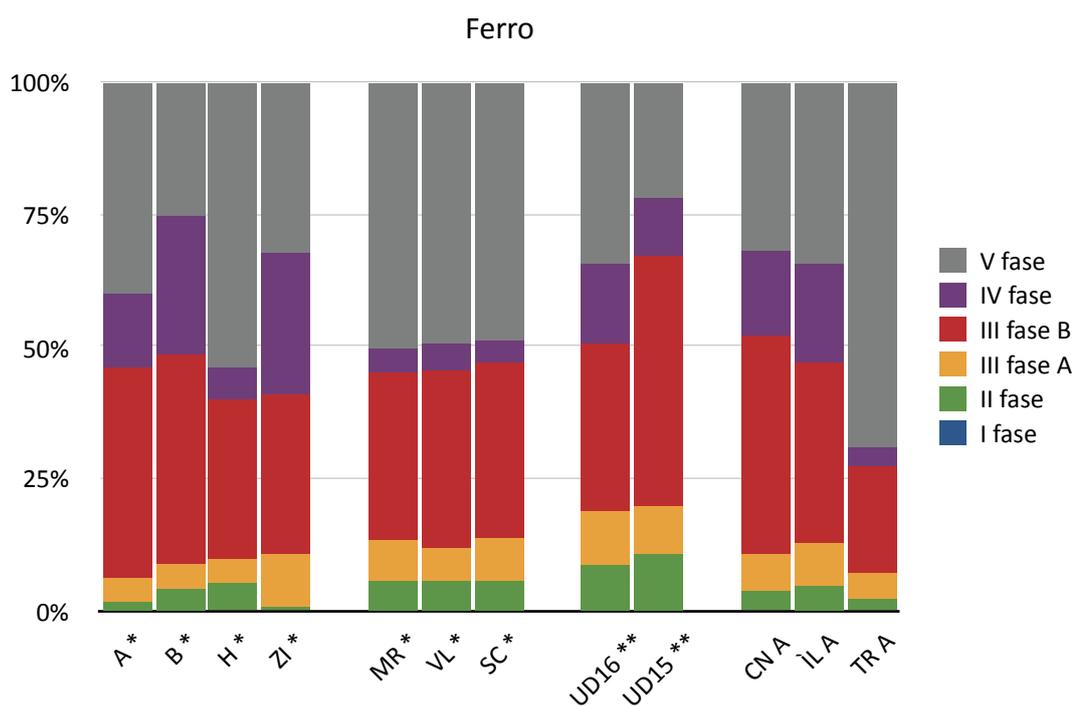


Figura 20 - Distribuzione percentuale del Fe nella varie fasi geochimiche

Le analisi effettuate nei siti di interesse dimostrano che il Ferro presente nei sedimenti è in forma di ossido/idrossido per una percentuale che va dal 25% al 44% (terza fase A e B) e in forma non biodisponibile per il 22 - 69%. La quarta fase ha un peso mediamente inferiore che va dal 3 al 26% e la seconda fase oscilla tra l'1 e l'11%.

I dati ottenuti dalla procedura di speciazione geochimica mostrano che non vi sono quote di Ferro direttamente biodisponibile e che le sue fasi preferenziali di associazione siano la terza A e B, sotto forma di ossidi e idrossidi e la fase residuale in cui si trova sotto forma di ossidi e idrossidi ad elevato grado di cristallinità o di elemento costitutivo del reticolo cristallino dei silicati. Il Ferro, dunque, può avere origini antropiche oppure trovarsi in forma reticolare

Nichel

In tabella 16 sono riportati i valori di concentrazione di Nichel riscontrati nelle varie fasi geochimiche e nel grafico di figura 21 sono invece illustrate le distribuzioni percentuali di metallo tra le varie fasi geochimiche del sedimento.

Tabella 16 - valori medi di concentrazione di Ni riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg p.s. È riportata anche la resa della procedura di speciazione calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Ni riscontrato nei sedimenti appartenenti ai siti campionati nell'ambito del presente studio posti a confronto con i valori riscontrati *da Baccarani (2012) eBreda (2012).**

Ni	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	V fase	resa
A *	0,46	3,30	2,25	2,45	1,51	3,06	0,99
B *	0,51	3,82	2,69	3,69	2,98	2,81	0,97
H *	0,67	2,60	2,57	3,13	1,57	5,84	1,15
ZI *	0,41	0,68	1,57	9,23	2,48	4,70	0,82
C	0,63	6,30	5,50	12,0	3,0	56,0	1,18
D	1,49	5,43	4,90	43,0	17,0	17,0	0,94
MR *	0,66	2,87	6,62	7,82	8,84	14,2	0,98
VL *	0,63	2,33	7,21	8,87	6,87	12,0	1,02
SC *	0,98	4,55	10,4	12,4	17,3	15,5	0,98
UD16 **	0,89	5,19	3,24	6,44	3,56	9,80	0,99
UD15 **	0,94	5,56	3,44	4,18	2,32	2,90	0,94
CN A	0,03	1,11	0,90	4,65	2,06	3,27	0,95
ÌL A	0,07	1,33	1,18	6,77	2,95	8,60	0,77
TR A	0,03	0,24	0,09	0,52	0,06	0,57	0,83

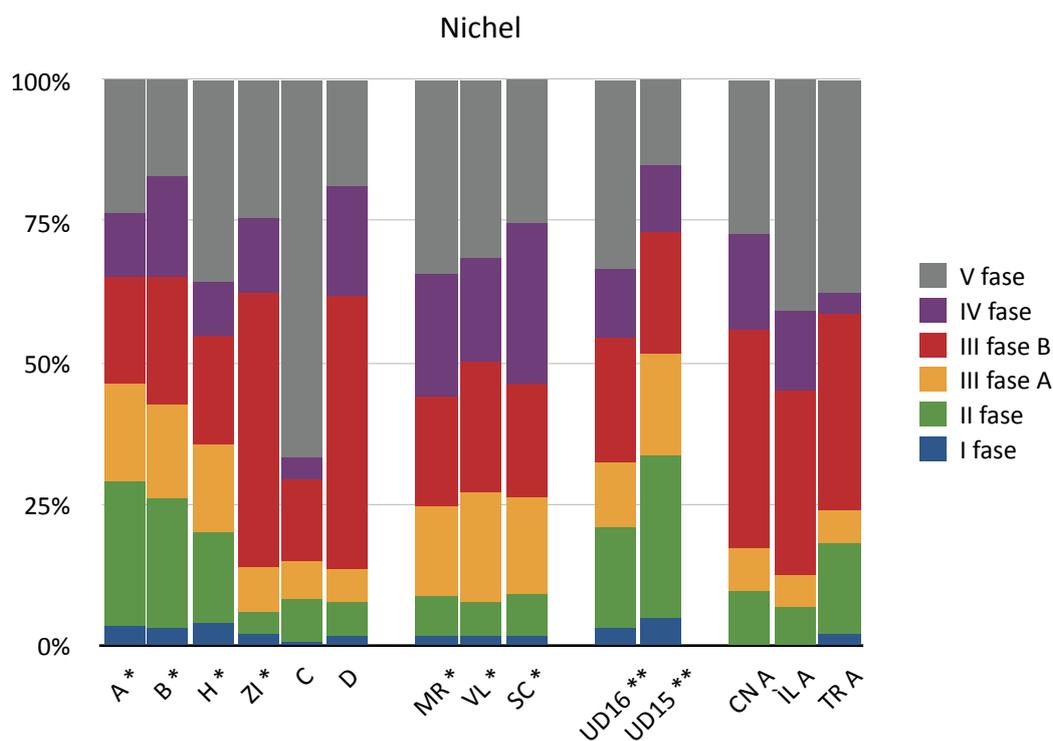


Figura 21 - Distribuzione percentuale del Ni nella varie fasi geochimiche

I dati relativi alla speciazione geochimica del Nichel mostrano come il metallo sia distribuito in maniera abbastanza omogenea in tutte le fasi, poiché infatti, mostra una affinità di base con le diverse forme associative. Tuttavia, la terza fase (A e B) risulta avere un peso significativo con percentuali che oscillano dal 21 al 54%. Sono frequenti, infatti, fenomeni di co-precipitazione che danno luogo a ossidi e idrossidi di Fe e Mn colloidali che con il tempo evolvono in forme a maggiore grado di cristallinità.

Una certa quota di metallo biodisponibile è presente quasi in tutti i campioni, ma non si raggiungono in nessun caso quantitativi vicini ai limiti di legge (30mg/kg p.s.).

Piombo

In tabella 17 sono riportati i valori di concentrazione di Piombo riscontrati nelle varie fasi geochimiche e nel grafico di figura 22 sono invece illustrate le distribuzioni percentuali di metallo tra le varie fasi associative del sedimento.

Tabella 17 - valori medi di concentrazione di Pb riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg p.s. È riportata anche la resa della procedura di speciazione calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Fe riscontrato nei sedimenti appartenenti ai siti campionati nell'ambito del presente studio posti a confronto con i valori riscontrati *da Baccarani (2012) eBreda (2012).**

Pb	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	V fase	resa
A *	0,28	3,38	1,18	0,96	2,23	6,35	1,01
B *	0,29	6,27	0,99	0,40	4,20	3,01	0,88
H *	0,17	2,16	0,53	0,23	0,36	4,55	1,12
ZI *	28,9	28,0	25,1	3,01	3,29	13,2	1,00
C	0,10	13,1	2,10	0,30	0,20	8,10	1,04
D	0,20	7,70	1,0	0,20	0,40	6,80	0,92
MR *	0,30	5,62	2,26	1,06	0,71	6,60	0,96
VL *	0,19	3,65	1,29	0,76	0,43	5,78	0,92
SC *	0,08	10,4	3,86	1,51	0,48	4,07	0,83
UD16 **	0,13	6,62	1,51	0,31	0,27	2,50	1,05
UD15 **	0,25	2,78	0,47	0,20	0,23	2,06	0,96
CN A	0,00	2,55	0,81	3,72	0,00	8,05	0,60
ÌL A	0,00	7,32	2,93	8,33	0,00	11,73	0,70
TR A	0,00	0,29	0,16	0,96	0,00	17,00	0,70

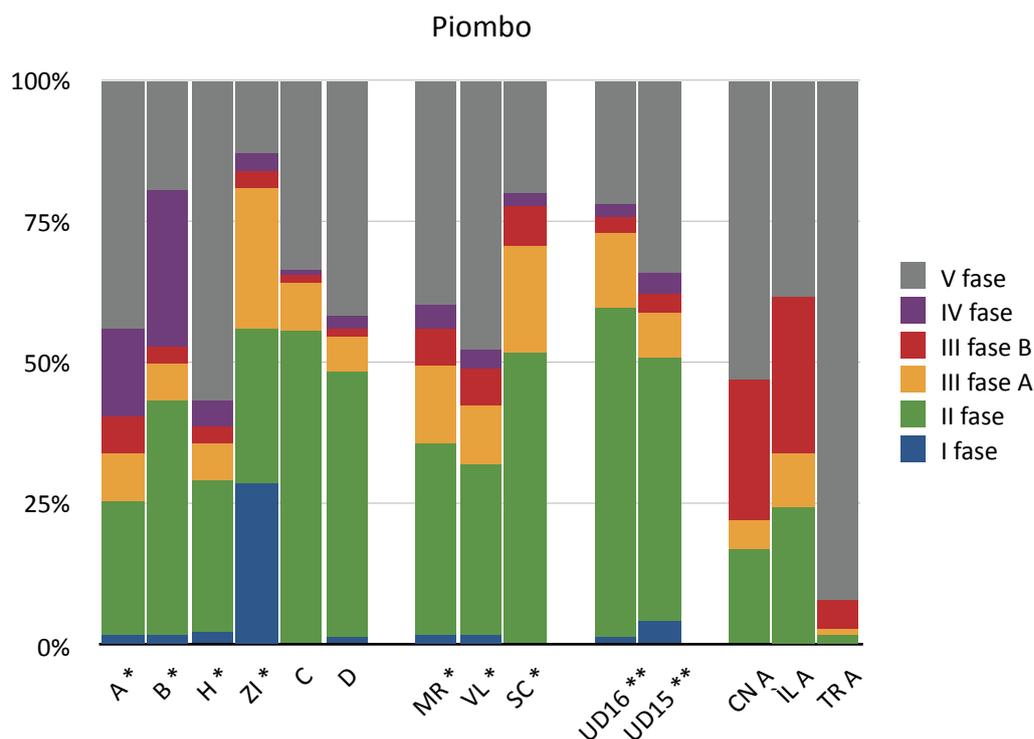


Figura 22 - Distribuzione percentuale del Pb nella varie fasi geochimiche

I dati raccolti dalla speciazione geochimica mostrano che la principale forma associativa del Piombo è quella con i carbonati rinvenuta in seconda fase. Il metallo, infatti, ha una particolare affinità con questi composti che a pH neutro co-precipitano il Pb. È interessante osservare che nel sito appartenente alla zona industriale, dove il quantitativo totale di Pb di 130 mg/kg p.s. è ben oltre i limiti di legge, la quota di metallo biodisponibile è molto elevata e, probabilmente, riguarda composti del Pb legati a molecole organiche come il Pb tetraetile di cui si è fatto largo uso nell'industria petrolchimica.

L'area di Aveiro si distingue dalle altre poiché le quote di Pb rinvenute in seconda fase sono più basse che altrove mentre è più elevata la quota di metallo presente in terza fase nei siti CN A e IL A, probabilmente legato a ossidi di grado più o meno cristallino. Nel sito TR A la quota maggioritaria è invece data dal metallo non biodisponibile. Si possono, in questo caso, ipotizzare anche fenomeni di sostituzione del metallo nel reticolo cristallino dei silicati dando luogo a forme mineralogiche autigeniche, per le quali, però, sono richiesti tempi molto lunghi.

Zinco

In tabella 18 sono riportati i valori di concentrazione di Zinco riscontrati nelle varie fasi geochimiche e nel grafico di figura 23 sono invece illustrate le distribuzioni percentuali di metallo tra le varie fasi geochimiche del sedimento.

Tabella 18 - valori medi di concentrazione di Zn riscontrati nelle varie fasi geochimiche, espressi in mg/kg p.s. È riportata anche la resa della procedura di speciazione calcolata come rapporto percentuale tra la somma delle fasi e la concentrazione totale di Zn riscontrato nei sedimenti appartenenti ai siti campionati nell'ambito del presente studio posti a confronto con i valori riscontrati *da Baccarani (2012) eBreda (2012).**

Zn	I fase	II fase	III fase A	III fase B	IV fase	V fase	resa
A *	9,12	25,1	24,6	32,1	16,8	<LOD	1,3
B *	10,2	37,4	12,9	25,8	22,9	12,0	1,2
H *	7,12	12,9	13,4	18,1	14,6	<LOD	1,3
ZI *	270	332	120	48,7	41,0	21,6	0,99
C	7,0	49,0	16,0	20,0	18,0	118	0,89
D	11,0	84,0	12,0	30,0	20,0	108	0,9
MR *	6,61	22,2	24,3	27,5	29,1	<LOD	0,9
VL *	7,31	17,4	20,7	26,8	13,5	<LOD	1,2
SC *	6,94	34,1	24,8	23,4	23,5	41,2	1,1
UD16 **	4,77	10,74	12,30	21,49	15,63	18,41	1,05
UD15 **	7,29	7,74	9,77	14,48	14,15	4,81	1,03
CN A	4,38	14,2	13,5	36,4	20,6	40,7	1,2
ÌL A	7,58	15,2	23,2	35,3	20,7	39,3	0,99
TR A	5,34	21,8	18,3	44,3	17,9	33,6	1,2

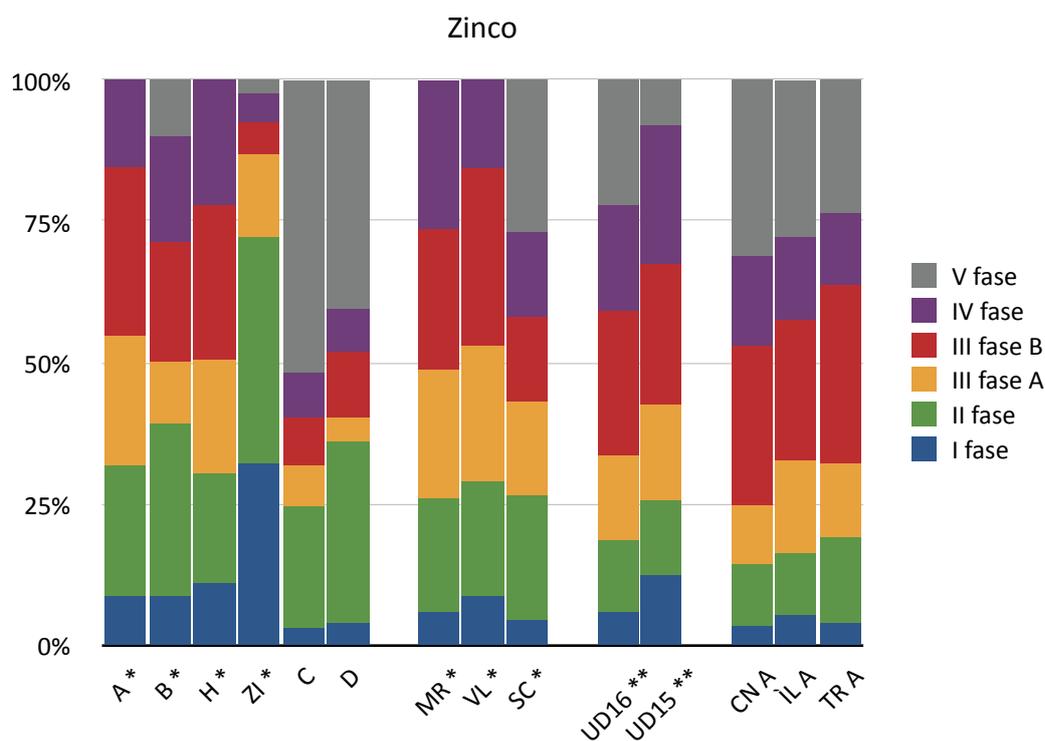


Figura 23 - Distribuzione percentuale dello Zn nella varie fasi geochimiche

Lo Zinco è un metallo ubiquitario, pertanto si trova associato a tutte le fasi geochimiche senza mostrare particolari fenomeni di affinità con una di queste in particolare.

Vi è, dunque, una quota di metallo biodisponibile che, tuttavia, non arriva mai a livelli di concentrazione vicini ai limiti di legge.

In generale, è possibile notare come la terza fase (A e B) sia il sito di accumulo preferenziale per metalli e metalloidi, cui fanno eccezione il Rame, che predilige la materia organica e i solfuri, e il Piombo, che si associa preferibilmente con i carbonati.

La fase residuale riveste una certa importanza per tutti i metalli analizzati e può essere utile per individuare la quota di metallo mai biodisponibile che costituisce il valore di background di una determinata area. Inoltre, il confronto tra i valori di concentrazione rinvenuti nella fase residuale per i vari metalli nei diversi siti può essere utile per capire se i sedimenti analizzati possono o meno avere un'origine comune.

Analisi di statistica multivariata

La complessità delle dinamiche analizzate e la presenza di numerosi e diversi equilibri in costante mutamento rende particolarmente difficile dare un'interpretazione univoca e certa dei fenomeni prevalenti in gioco soprattutto perché ciascun sito ha caratteristiche proprie che vanno considerate nel loro insieme.

Di base, molti sono i parametri che variano simultaneamente, il quantitativo di metallo presente cambia da sito a sito e variano anche i contributi dei differenti substrati associativi, come la sostanza organica o i carbonati. Oltretutto, variabili come la salinità non giocano un ruolo univoco e il loro effetto va considerato unitamente alle condizioni redox e al pH dei sedimenti.

Pertanto, l'interpretazione di questi fenomeni richiede un approccio multidisciplinare che può essere supportato dal trattamento dei dati raccolti mediante strumenti di statistica multivariata.

Al fine di condurre un'analisi statistica il più corretta possibile, è stato usato come input un dataset omogeneo che contenesse il maggior numero di variabili possibili disponibili per ciascun sito.

Quindi, sono stati scelti i nove siti campionati nella Ria di Aveiro, per i quali si dispone di una mole di informazioni maggiore.

Le variabili implementate nell'analisi sono state: parametri ambientali (potenziale redox, pH, granulometria, salinità), quantitativo di metallo totale, quantitativo di sostanza organica e contributo delle varie frazioni granulometriche.

Non è stato possibile includere in questa analisi i dati di speciazione geochimica, poiché si tratta di dati di tipo incrementale (i quantitativi di uno stesso metallo rinvenuti per ciascuna fase sono interdipendenti tra loro e sommano a 100%). Inoltre, alcuni dati sono stati raccolti come media dell'area e non per ogni singolo sito (es. si è in possesso di un campione di vongole provenienti da un solo sito per area) e utilizzarli avrebbe comportato di ripetere un valore medio per tre volte su ciascuna area portando a un errore concettuale evidente che avrebbe reso fuorviante il risultato.

Pertanto, tale analisi ha consentito di operare un approfondimento sulle dinamiche caratteristiche della Ria di Aveiro nel tentativo di sfruttare i dati raccolti per ottenere un modello concettuale che illustri la quantità e la qualità delle relazioni tra le variabili che intervengono nei cicli biogeochimici degli elementi.

La matrice di dati utilizzata è stata dapprima normalizzata e poi utilizzata dal software (Statistica 8.0) per calcolare le componenti principali.

A partire dallo scree plot è stato possibile determinare quante variabili multivariate prendere in considerazione. Il primo fattore riusciva a spiegare il 67% della varianza totale, mentre il secondo un ulteriore 11%. Il grafico fattori/varianza mostrava poi un flesso prima della terza variabile, pertanto si è scelto di prendere in considerazione le prime due variabili.

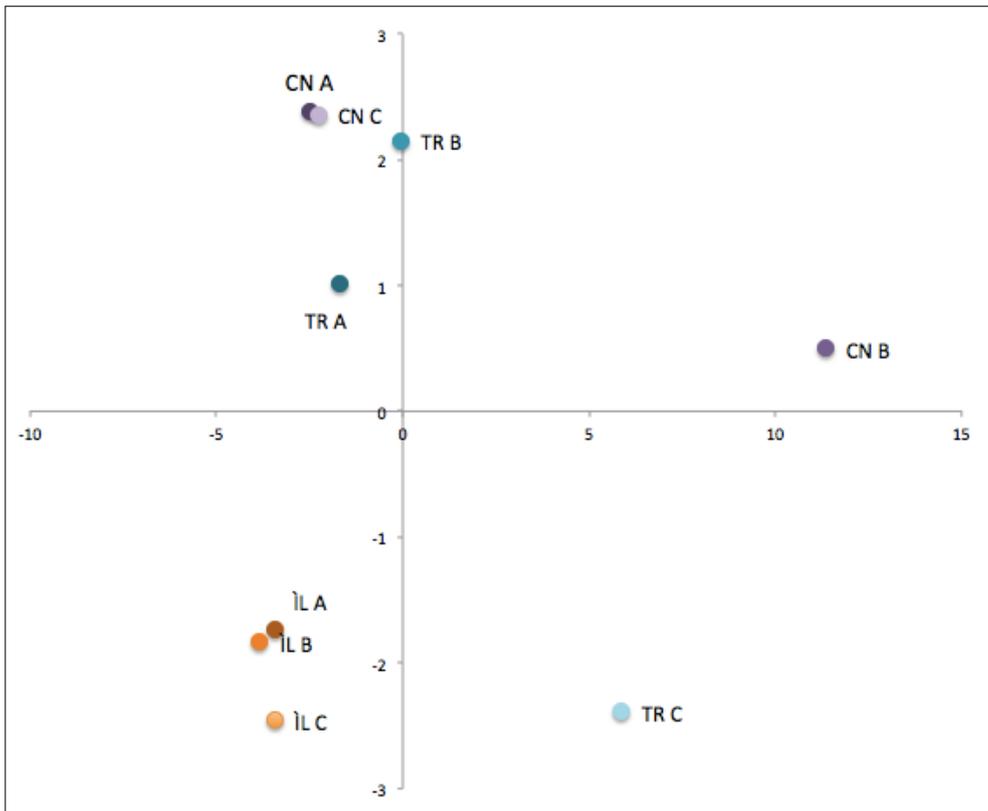


figura 24 PCA score plot. Grafico 2D dei casi nello spazio multivariato rappresentato dal piano cartesiano formato dalla prima e dalla seconda componente principale estratte nell'ambito dell'analisi statistica.

Dalla figura 24 è possibile notare come i siti analizzati risultino distribuiti nello spazio multivariato. È evidente una certa omogeneità nell'area di Ìlhavo, i cui campioni sono molto vicini tra loro e isolati rispetto agli altri. Anche i siti CN A e CN C sono molto simili tra loro tanto da essere quasi sovrapposti. Allo stesso modo i siti TR A e TR B risultano essere abbastanza vicini tra loro e, insieme ai due CN A e CN C vanno a costituire un unico gruppo nel quarto quadrante. Si differenziano nettamente i siti CN B e TR C che risultano essere molto diversi dagli altri e tra loro.

Tale configurazione rispecchia quanto già osservato dai dati relativi al contenuto di metalli e metalloidi nei sedimenti e dai parametri ambientali, ossia che, nonostante piccole oscillazioni di alcuni parametri e una diversità più marcata in termini di potenziale redox, i tre siti del canale di Ìlhavo sono molto simili tra loro. Si tratta infatti, di un canale di acqua piuttosto bassa che si trova ad una certa distanza dalle bocche di porto e caratterizzato da un notevole ritardo nella percezione dei fenomeni idrodinamici del moto ondoso e delle maree, tanto che il prisma tidale interessa quest'area solo per l'8%. Il canale di Mira, pur essendo un canale più lungo e vicino alla bocca a mare, ospita il 10% dell'intero prisma tidale, ragione per cui probabilmente, due dei suoi siti risultano molto simili tra loro. Il canale di S. Jacinto, si dimostra invece caratterizzato da una variabilità maggiore, qui infatti la forzante idrodinamica potrebbe giocare un ruolo più importante, visto che ospita il 38% del prisma tidale.

È interessante, a questo punto, analizzare come e quanto la varianza legata alle variabili in input sia stata pesata nei due fattori considerati. Dal loading plot (figura 25) è possibile rilevare come il quantitativo totale di metalli e metalloidi presenti nella matrice sia importante soprattutto nel primo fattore con valori di correlazione negativi che discrimina nel terzo e quarto quadrante i siti più contaminati dai meno contaminati. Insieme al metallo totale, ha un peso alto e negativo nel primo fattore il quantitativo di frazione fine presente nel sedimento, variabile rappresentata dalla quota di sedimento tra i 63 e i 25 μ m e inferiore ai 25 μ m. Queste due classi di variabili risultano quindi anche correlate tra loro: dove c'è un maggiore quantitativo di particolato fine, c'è anche una maggiore quota di metallo totale. Pesano in maniera significativa e positiva nel primo fattore variabili come il quantitativo di frazione sabbiosa, il potenziale redox e il pH. Nel primo e nel secondo quadrante quindi si troveranno i sedimenti dei siti meno contaminati, caratterizzati da elevata presenza di frazione sabbiosa, da un valore positivo di potenziale redox e da un valore più alto di pH.



figura 25 PCA loading plot. Grafico 2D che riporta le variabili distribuite nello spazio multivariato a seconda del peso relativo di ciascuna nei due fattori considerati.

Un peso inferiore, ma costante nel primo e secondo fattore, è a carico della sostanza organica (%S.O.) che, come già osservato a partire dai dati raccolti per la speciazione geochimica, può favorire da una parte fenomeni di assorbimento e portare i metalli a co-precipitare

incrementandone il quantitativo totale presente nella fase solida, ma dall'altra può portare anche a eventi di desorbimento e passaggio in colonna d'acqua in relazione anche ai livelli di salinità presenti. In questo caso, la sostanza organica riveste prevalentemente il ruolo di agente di assorbimento e co-precipitazione, trovandosi ad essere correlata maggiormente con le variabili relative al contenuto totale di metalli insieme al basso potenziale redox e alla di frazione fine.

La salinità ha peso soltanto nel primo fattore anche se non sembra avere un ruolo discriminante particolare.

Da questa analisi, si può osservare come vi sia una correlazione abbastanza forte tra le variabili che contribuiscono a definire le caratteristiche dei siti che mostrano il maggiore contenuto di accumulo di metalli e metalloidi.

Tale analisi contribuisce a individuare quelle che possono essere considerate le forzanti principali che vanno a determinare ambienti predisponenti per l'accumulo di metalli e che sono potenzialmente più rischiosi per la raccolta o la coltivazione di specie fossorie come la vongola verace filippina.

Molte delle variabili che hanno un peso significativo nel primo fattore sia in positivo che in negativo, sono determinate dall'idrodinamica. La granulometria prevalente, la frequenza dei fenomeni risospensivi che possono ossigenare il sedimento e fenomeni di trasporto di particellato, contaminanti o sostanza organica sono legati alle dinamiche prevalenti delle correnti, del moto ondoso e delle oscillazioni mareali che intervengono in maniera diversa in ciascuna sub-area.

Pertanto, l'idrodinamica è una forzante che sicuramente ha un peso molto significativo nel determinare il pattern di distribuzione e accumulo di metalli e metalloidi.

Il potenziale redox ha pure una discreta importanza, ma non è determinato solo dalla presenza di una quota consistente di frazione fine. Essa infatti, predispone l'instaurarsi di condizioni di scarsa diffusione dell'ossigeno in profondità, ma in tali condizioni di micro aerobiosi o anossia in presenza di sostanza organica è favorito il proliferare di comunità microbiche che degradano la sostanza organica portando a un ulteriore consumo dell'ossigeno e alla produzione di altri intermedi metabolici.

In ambienti ridotti la principale fase di accumulo di metalli e metalloidi, ossia la terza A e B, può venire intaccata per la riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} e del Mn^{4+} a Mn^{2+} con conseguente dissoluzione dei metalli e metalloidi ad essi associati. Inoltre, l'abbassamento di pH che può derivare da fenomeni di acidificazione dell'acqua interstiziale può portare alla dissoluzione dei carbonati che comporta il rilascio in soluzione dei metalli associati.

La quota di metalli che vengono ad essere solubilizzati possono restare biodisponibili in soluzione il tempo sufficiente per essere bioaccumulati, ma anche associarsi con altre fasi geochimiche in un costante equilibrio dinamico.

Le informazioni ricavate da questo studio hanno portato a stabilire la presenza di forzanti che rivestono un ruolo significativo nel determinare le dinamiche principali che regolano i cicli biogeochimici degli elementi negli ambienti di transizione.

Speciazione geochimica sulle differenti frazioni granulometriche

Per un ulteriore approfondimento e studio del ruolo svolto dalla composizione granulometrica del sedimento nel determinare condizioni più o meno rischiose per la presenza e la potenziale biodisponibilità di metalli e metalloidi, è stato condotto uno studio di speciazione geochimica sulle diverse frazioni granulometriche ottenute dalla setacciatura a secco del sedimento.

La setacciatura a secco ha permesso di alterare il meno possibile la configurazione granulometrica del sedimento evitando di sciogliere eventuali strutture saline o di intaccare il biofilm di sostanza organica che, come noto, è in grado di aderire al particellato più fine per affinità fisico-chimica e di formare aggregati anche di dimensioni variabili, anche fino a 1 mm (Zonta et al., 1994).

Tale studio è stato approfondito per alcuni dei siti della Ria di Aveiro appartenenti alle tre aree S. Jacinto, Mira e ìlhavo scelti sulla base dei risultati fin qui descritti e nella logica di includere il massimo di variabilità possibile. Sono state sottoposte alla procedura di speciazione geochimica le frazioni con diametro maggiore di 63µm e le frazioni con diametro compreso tra 63 e 25µm laddove presenti e sufficiente per ottenere tre repliche analitiche.

In tabella xx è riportato il dettaglio delle frazioni analizzate.

tabella 19. dettaglio dei campioni sui quali è stata condotta la speciazione geochimica con relativo potenziale redox.

	frazione > 63µm	intermedio 63µ÷25µm	Eh
CN B	CN B >63µm		-2
CN C	CN C >63µm	CN C 63µm÷25µm	-46
ìL C	ìL C >63µm	ìL C 63µm÷25µm	-378
TR A	TR A >63µm	TR A 63µm÷25µm	-163
TR C	TR C >63µm		+51,8

Come è possibile osservare dalla tabella 19, per il sito CN B si è potuto ricavare un solo campione poiché il quantitativo di sedimento recuperato dopo la vagliatura a 25µm non era sufficiente per ottenere tre repliche analitiche per la procedura di speciazione geochimica. Per i siti CN C, ìL C e TR A è stato possibile analizzare sia il campione >63µm sia quello di granulometria compresa tra 63 e 25µm. Il sito TR C è stato analizzato per la sua unica frazione presente, ovvero quella sabbiosa, non è stato possibile tramite la setacciatura a secco ottenere traccia di una quota di sedimento fine.

I risultati ottenuti per i diversi metalli e metalloidi analizzati (v. figg 26-30) portano ad alcune considerazioni che in parte confermano quanto già illustrato in precedenza, in parte portano alla luce alcune problematiche che necessiteranno di ulteriori approfondimenti.

In generale, per i siti CN C, IL C e TR A non si notano particolari differenze tra la distribuzione percentuale delle diverse forme chimiche di metalli e metalloidi tra la frazione grossolana e la frazione più fine e prevalgono le differenze sito-specifiche più che legate alle dimensioni del particolato. Le preferenze associative di ogni elemento si mantengono costanti e non si riscontrano variazioni dovute a esempio, alle caratteristiche chimico-fisiche particolari della frazione fine che, come noto dovrebbe dimostrare una particolare affinità per metalli e metalloidi.

I due siti a prevalenza sabbiosa, CN B e TR C, per i quali è stata trattata solo la frazione grossolana per i motivi già citati, si dimostrano ancora una volta molto simili tra loro e, allo stesso tempo, molto diversi dagli altri siti appartenenti alle due rispettive aree.

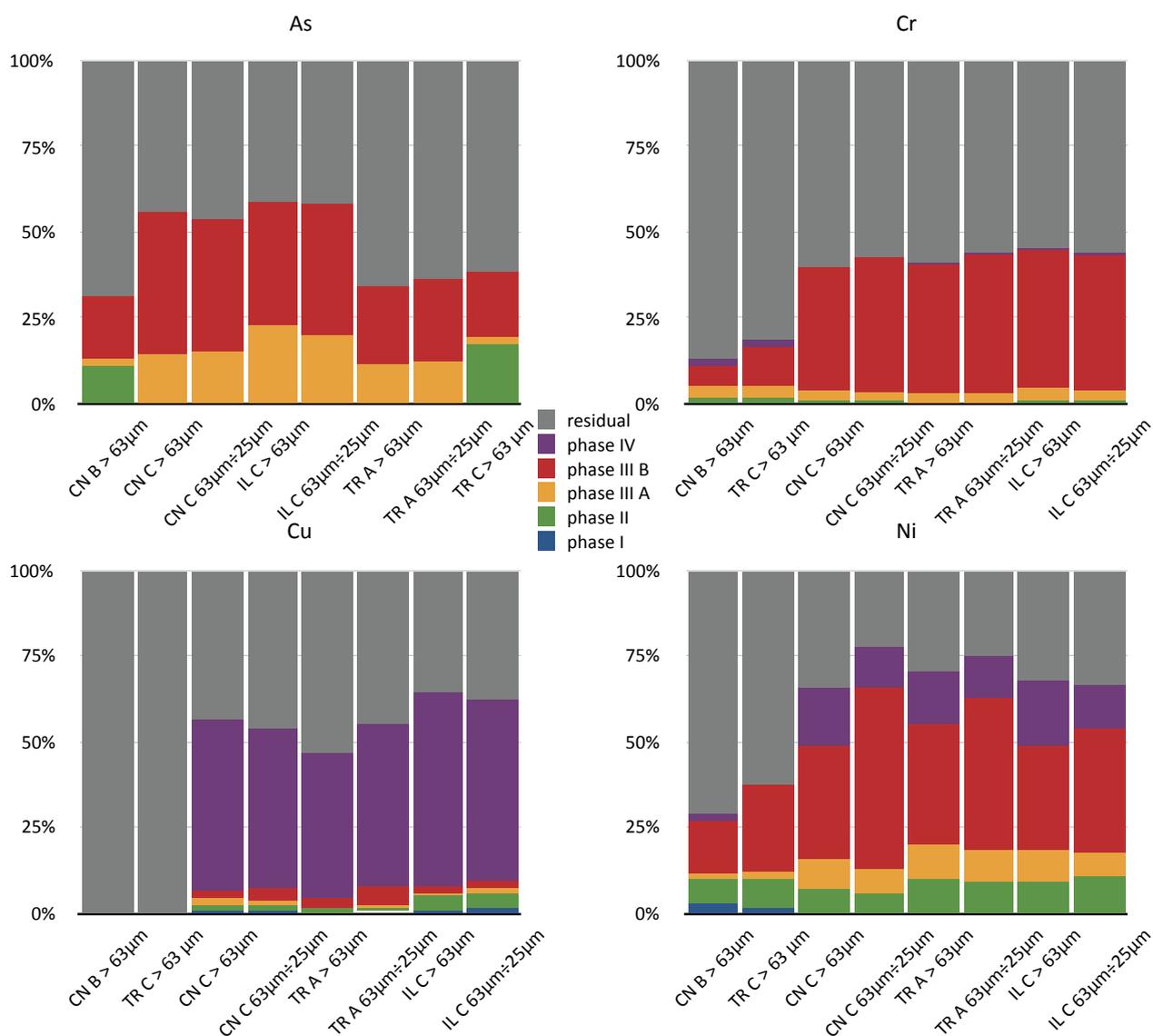
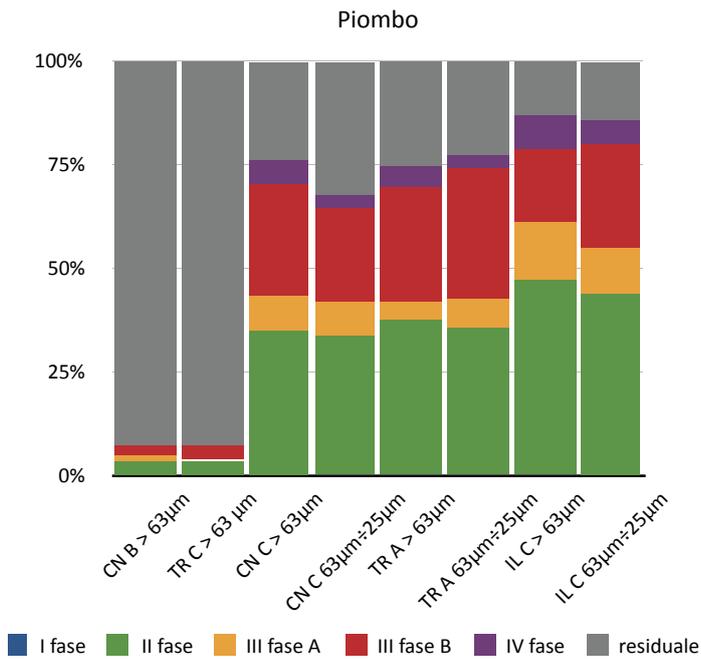


figure 26-30. Distribuzione percentuale di distribuzione di metalli e metalloidi nelle diverse frazioni granulometriche



Va ricordato che i due siti partono da un contenuto totale di metalli e metalloidi molto più basso rispetto agli altri e che, quindi, la distribuzione percentuale va interpretata anche sulla base di questo. In generale, i metalli e metalloidi presenti in questi sedimenti sono contenuti in prevalenza nella frazione residuale, quindi non sono biodisponibili. In questo caso, è possibile riscontrare che, nel caso della frazione sabbiosa, in effetti il contenuto di metalli è molto basso e distribuito

prevalentemente nelle forme chimiche di origine più antica e non attaccabili da parte di un sistema biologico.

Un'ipotesi che spieghi come mai questo fenomeno non si è potuto rilevare anche nel caso delle frazioni sabbiose degli altri siti si può formulare a partire dalla presenza in questi siti di una buona percentuale di sostanza organica e di un potenziale redox da mediamente a molto negativo.

La presenza di sostanza organica e di un ambiente anossico, oltre che di specie animali come le vongole stesse, favoriscono l'instaurarsi di condizioni di anaerobiosi in cui prevalgono nel sedimento batteri NO_3^- riduttori, Mn(IV) -riduttori, Fe(II) -riduttori, SO_3^- riduttori e metanogeni che competono tra loro per le fonti di carbonio disponibili (ARPAV, 2006).

Queste condizioni, anzitutto si riflettono inevitabilmente sulla forma chimica alla quale si trovano i metalli e i metalloidi nel sedimento determinando la loro ripartizione tra le fasi geochimiche presenti e influenzandone la loro mobilità, biodisponibilità e bioaccumulo nella componente biotica come già osservato in precedenza. Ma, soprattutto, determinano la continua formazione di prodotti organici di scarto anche in forma di colloidali, che aderiscono sul sedimento marino portando alla formazione di aggregati di particellato che, se non intaccati da sostanze ossidanti o che alterino la forza ionica o, ancora che agiscano direttamente come disaggreganti (es. ultrasuoni), si comportano dal punto di vista fisico, allo stesso modo della frazione sabbiosa.

Pertanto, la setacciatura a secco non è in grado di alterare queste forme aggregative con il risultato di trovare anche nella frazione sabbiosa, aggregati di particellato fine che, una volta sottoposti alla procedura di speciazione geochimica, vengono alterati e liberano il particellato prima agglomerato nelle strutture aggregative protette dal film di sostanza organica. Alterare tali strutture prima della setacciatura, potrebbe essere utile dal punto di vista puramente geochimico per facilitare lo studio

delle singole frazioni granulometriche, ma porterebbe a un potenziale errore di valutazione del rischio di ciascuna frazione dal punto di vista ecologico.

Infatti, va considerato che puramente per ragioni di ingombro fisico, al di sopra di certe dimensioni non potranno entrare nel sistema digerente di organismi come la vongola verace filippina che è dotata di sifoni recanti un foro l'uno per l'ingresso dell'acqua e di particellato e l'espulsione del materiale fecale.

Grazie a questa analisi è stato possibile ipotizzare, sotto un ulteriore aspetto, l'importanza rivestita dalla presenza della componente biotica del sedimento che include micro e macro organismi e la sostanza organica da essi utilizzata e prodotta.

Analisi dei geni mitocondriali

16Sr DNA

Per quanto concerne il dataset del 16Sr DNA, l'allineamento finale era composto da 146 sequenze, delle quali 133 sequenze originali di *R. philippinarum* (si veda la Tabella relativa ai campionamenti nella sezione Materiali e Metodi) e 13 sequenze ottenute dalla banca dati GenBank, sia per *R. philippinarum* che per gli outgroups. La lunghezza finale delle sequenze allineate era di 438 paia basi (bp).

Il numero complessivo delle mutazioni puntiformi individuate tra tutte le sequenze di *R. philippinarum* incluse nell'allineamento (137) era pari a 12, considerando sia le sequenze originali ottenute nel corso del presente lavoro (133), sia quelle di riferimento (4). Le mutazioni puntiformi sono state identificate alle posizioni 23, 35, 41, 46, 65, 82, 84, 181, 294, 408, 409, 424; in particolare, si trattava di 5 transizioni e 7 transversioni (si veda Chiesa et al., 2014).

Il numero di mutazioni identificate tra le sequenze di *R. philippinarum* e gli outgroups utilizzati come confronto era nettamente superiore: 75 con le due specie *R. variegatus* e *R. bruguieri* e 84 con *R. decussatus*. Inoltre, le sequenze di *R. variegatus* e di *R. bruguieri* presentavano una delezione di 33 bp, mentre quelle di *R. decussatus* presentavano una delezione di 31 bp (si veda Chiesa et al., 2014).

L'analisi di Minimum Spanning Network al 95% di confidenza ha identificato complessivamente 20 aplotipi, distribuiti in 5 distinti aplogruppi. In particolare, l'aplogruppo H1 comprendeva 12 aplotipi della specie *R. philippinarum* (denominati Rphap1, Rphap2, Rphap3, Rphap4, Rphap5, Rphap6, Rphap7, Rphap8, Rphap9, Rphap10, Rphap11, Rphap12); l'aplogruppo H2 comprendeva 4 aplotipi della specie *R. decussatus* (Rdhap1, Rdhap2, Rdhap3, Rdhap4); l'aplogruppo H3 includeva 1 aplotipo della specie *R. bruguieri* (hapRbru) e 1 aplotipo della specie *R. variegatus* (hapRvar); l'aplogruppo H4 comprendeva 1 aplotipo per la specie *C. fluminea* (hapCorbflum); ed infine l'aplogruppo H5 1 aplotipo della specie *G. rugosa* (hapGlaurug). Gli aplotipi denominati Rphap1-10 e Rphap12 includevano i campioni originali italiani, spagnoli e portoghesi; le sequenze sono state registrate in GenBank con gli Accession Numbers KF736199-211 (Chiesa et al., 2014). L'aplotipo Rphap11 includeva solo una sequenza di origine cinese ottenuta dalla banca dati (GenBank Accession Number DQ356383).

Per quanto riguarda nel dettaglio l'analisi delle sequenze di *R. philippinarum*, l'aplotipo più frequente risultava Rphap1 (0.174) mentre la frequenza degli altri aplotipi era compresa tra 0,0006 e 0,162 (Tabella 20 e Figura 31).

Tabella 20: Risultati dell'analisi degli aplotipi sulle sequenze di 16S rDNA di *R. philippinarum* (Modificato da Chiesa et al., 2014).

Acronimo Aplotipo	Aplogruppo	Frequenza (weight)
Rphap1	H1	0,174
Rphap2	H1	0,005
Rphap3	H1	0,162
Rphap4	H1	0,161
Rphap5	H1	0,162
Rphap6	H1	0,162
Rphap7	H1	0,006
Rphap8	H1	0,162
Rphap9	H1	6,6 E ⁻⁴
Rphap10	H1	6,6 E ⁻⁴
Rphap11	H1	6,6 E ⁻⁴
Rphap12	H1	0,001

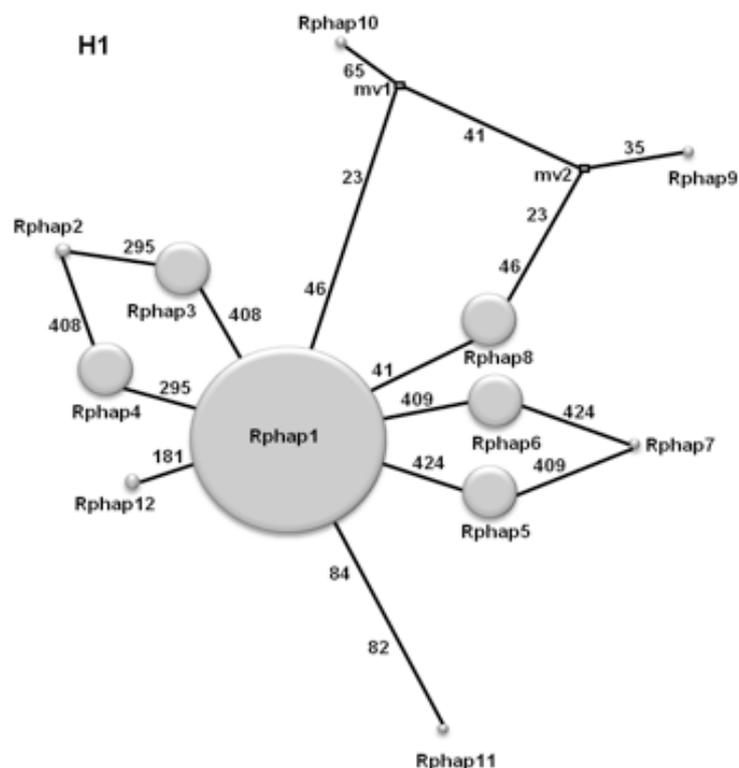


Figura 31: Minimum Spanning Network delle sequenze di 16S rDNA di *R. philippinarum* ottenuto con il software TCS. I cerchi indicano gli aplotipi più rappresentativi dell'aplogruppo H1. La dimensione è proporzionale alla frequenza di ciascun aplotipo. I numeri indicano le posizioni alle quale sono state identificate le mutazioni puntiformi (Figura modificata da Chiesa et al., 2014).

Da un punto di vista della distribuzione geografica, l'aplotipo Rphap1 risultava il più comune in tutte le popolazioni di *R. philippinarum* analizzate, sia a quelle dell'Alto Adriatico (Laguna di Marano, Venezia, Caleri, Marinetta e Sacca degli Scardovari), sia in quelle provenienti dalla Spagna (costa Galiziana) che dal Portogallo (Ria de Aveiro) con le frequenze più elevate in ciascuna popolazione analizzata, come indicato nella Figura 32. Pertanto, questo aplotipo del 16S rDNA potrebbe rappresentare l'aplotipo tipico dell'ancestore comune introdotto in Italia, Spagna e Portogallo.

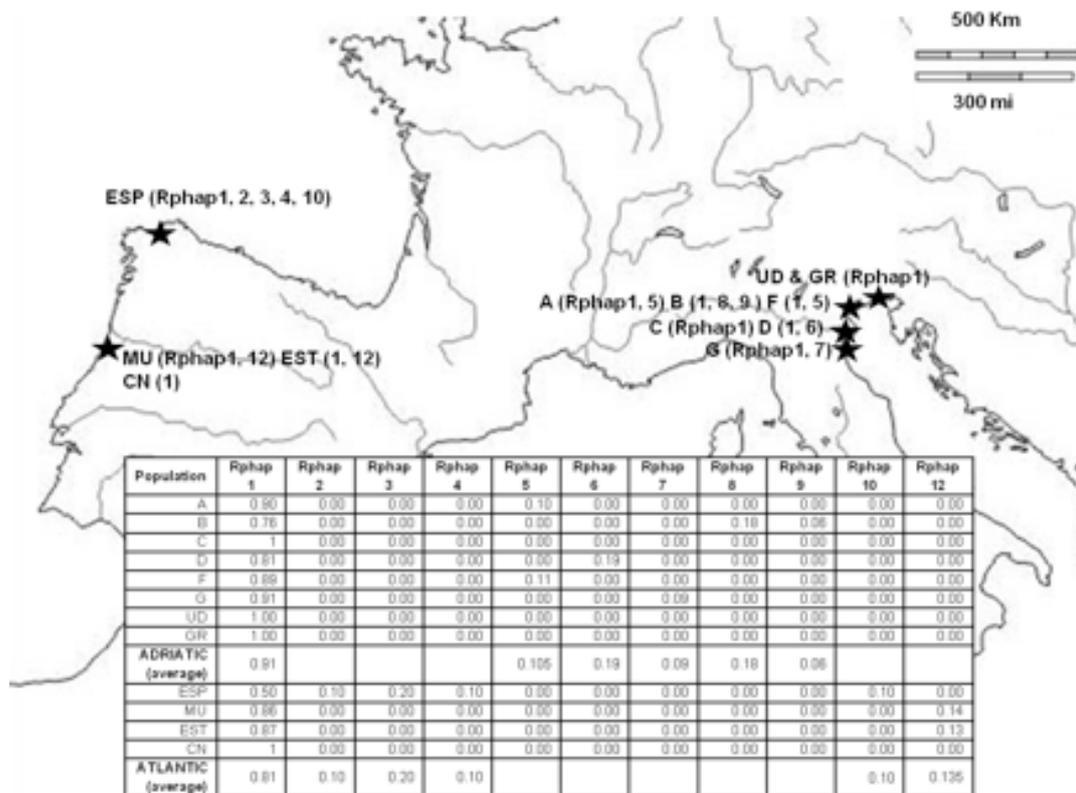


Figura 32: Distribuzione geografica e frequenza degli 11 aplotipi europei di *R. philippinarum* in ogni popolazione analizzata, e nelle due aree Adriatica/Atlantica (Figura tratta da Chiesa et al., 2014).

Il Tajima's Neutrality Test effettuato per tutti gli aplotipi di *R. philippinarum* ha confermato la presenza complessiva di 12 siti polimorfici, con Tajima test statistic D pari a -1,914 ($p < 0,05$).

Lo stesso test effettuato solo sugli aplotipi europei di *R. philippinarum*, escludendo quindi l'aplotipo Rphap11 (A.N. DQ356383) proveniente dalla Cina, ha indicato la presenza di 10 siti polimorfici e Tajima test statistic D pari a -1,789 ($p < 0,05$). Restringendo ulteriormente la scala geografica rispetto alle due aree di indagine dell'Adriatico e dell'Atlantico, è stato possibile osservare la presenza di 6 siti polimorfici e Tajima test statistic D pari a -1,755 nel caso dei soli

campioni dell'Adriatico, mentre il valore di D pari è a $-1,487$ nei soli campioni Atlantici ($p > 0,05$) (Chiesa et al., 2014).

Infine, il software Jmodeltest ha identificato JC come il miglior modello evolutivo ($-ln = 710,75$) e sulla base di questo modello sono stati costruiti gli alberi filogenetici di Neighbour Joining (NJ) e di Maximum Likelihood (ML), che hanno mostrato risultati convergenti (Figura 33). In entrambe le ricostruzioni filogenetiche, la vongola verace filippina *R. philippinarum* risultava nettamente distinta dalle altre specie congeneriche, e comunque più simile alle specie indo pacifiche che alla specie nativa europea *R. decussatus*. Inoltre, l'aplotipo Rphap11 di origine cinese risultava nettamente separato dagli altri aplotipi di *R. philippinarum* identificati nei campioni europei (Figura 33), con elevato valore di bootstrapp (99/100). Tre aplotipi (Rphap8, Rphap9, Rphap10) formavano un cluster distinto, così come gli aplotipi Rphap5, Rphap6, Rphap7. Gli aplotipi Rphap1, Rphap2, Rpha3, Rphap4 e Rphap12 clusterizzavano insieme, anche se con una differente topologia dei sotto clusters nei due alberi di NJ e ML (Figura xxx).

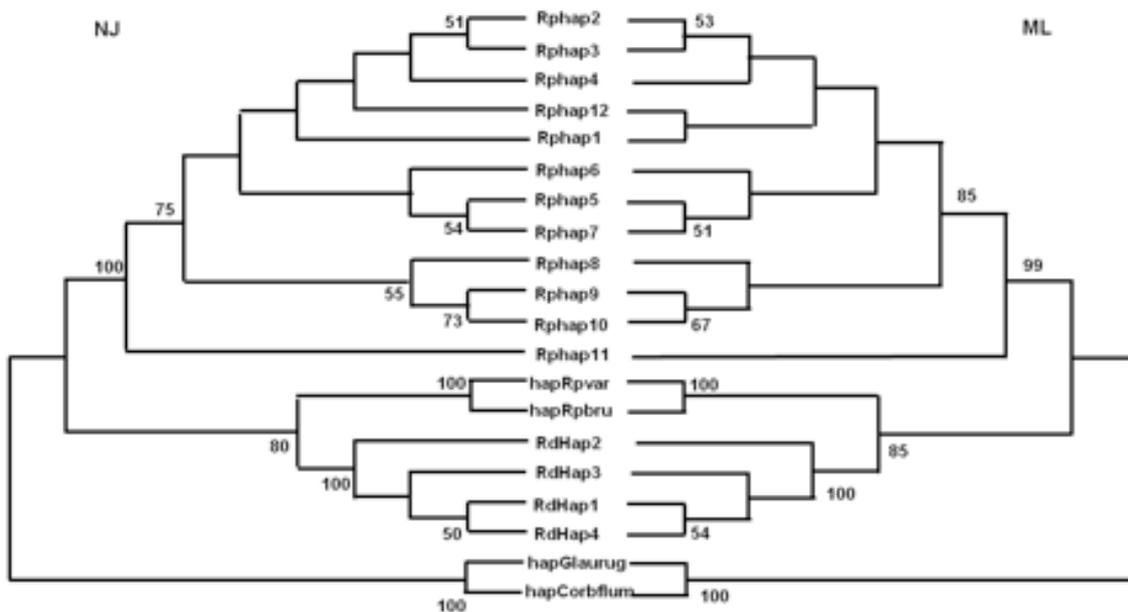


Figura 33: Alberi filogenetici di Neighbour-Joining (NJ) e di Maximum Likelihood (ML) degli aplotipi di 16S rDNA. Per ciascun nodo degli alberi è indicato il valore di bootstrapp (Figura tratta da Chiesa et al., 2014).

Gli alberi filogenetici hanno suggerito una possibile origine comune degli aplotipi Rphap2, Rphap3 e Rphap4, presenti solo nella popolazione spagnola; e degli aplotipi Rphap5, Rphap6, Rphap7 presenti solo in alcune popolazioni dell'Alto Adriatico (Fig. 31).

Al contrario, il legame tra gli aplotipi Adriatici Rphap8 e Rphap9 con l'aplotipo Atlantico Rphap10 potrebbe essere dovuto sia a fenomeni di convergenza (Rphap9 e Rphap10 differiscono solo per la mutazione alla posizione 41) oppure tenendo conto dei numerosi trasferimenti di materiale da semina tra i diversi paesi Europei (Chiesa et al., 2014).

I risultati del test di Tajima confermerebbero tale scenario: infatti, il D di Tajima è un buon indicatore del pattern di distribuzione allelica/aplotipica, ed il valore negativo di tale parametro per l'intero dataset ha suggerito l'elevata presenza di polimorfismi a bassa frequenza, indicando quindi una rapida espansione dopo un collo di bottiglia, un effetto del fondatore o un evento di deriva genetica. Inoltre, lo stesso test ha indicato una pattern demografico simile per entrambe le aree dell'Adriatico/Atlantico, che testimonia l'intensa attività di introduzione e transfaunazione della specie dovuta alle attività di pesca ed acquacoltura.

Considerando l'insieme dei dati forniti dal MSN, dal test di Tajima e dagli alberi filogenetici, nonché la storia della vongola verace filippina nelle lagune costiere europee, i risultati ottenuti tramite l'analisi del 16S rDNA suggeriscono l'ipotesi che a partire da una prima introduzione effettuata con un numero limitato di campioni, probabilmente caratterizzati dall'aplotipo Rphap1, si siano succedute altre introduzioni multiple con materiale da semina differente. Tale scenario è infatti compatibile con la presenza anche di numerosi aplotipi rari a bassa frequenza e caratterizzati da una limitata distribuzione geografica.

Per quanto riguarda l'analisi del gene COI, l'allineamento finale era composto da 465 sequenze, delle quali 223 sequenze originali di *R. philippinarum* (si veda la Tabella relativa ai campionamenti nella sezione Materiali e Metodi) e 242 sequenze ottenute dalla banca dati GenBank, relative a *R. philippinarum* ed agli outgroups. La lunghezza finale delle sequenze allineate era di 491 paia basi (bp).

Il numero complessivo delle mutazioni puntiformi individuate tra tutte le sequenze di *R. philippinarum* era pari a 105, considerando sia le sequenze originali che quelle di riferimento. Considerando nel dettaglio solo le sequenze ottenute dai campioni europei, sono state identificate 11 mutazioni puntiformi, 9 transizioni (alle posizioni 57, 96, 102, 126, 158, 321, 386, 426, 487) e 2 transversioni (alle posizioni 6 e 330, si veda Chiesa et al., 2014).

Includendo anche gli outgroups, l'analisi di Minimum Spanning Network al 95% di confidenza ha identificato 174 aplotipi, 166 considerando solo la specie *R. philippinarum*. Restringendo l'analisi ai soli campioni europei di *R. philippinarum*, sono stati identificati 13 aplotipi, denominati RpCOI1-RpCOI13, inclusi in un unico aplogruppo (H1) (Tabella yy e Figura SC). Le sequenze sono state registrate in GenBank con gli Accession Numbers KU252867- 78 (Chiesa et al., 2017).

Gli aplotipi più frequenti risultavano RpCOI1 (0,178), RpCOI2 (0,150) e RpCOI3 (0,229), mentre la frequenza degli altri aplotipi era molto più bassa, poiché rappresentati solo da una o poche sequenze (Tabella 21 e Figura 34).

Tabella 21: Risultati dell'analisi degli aplotipi sulle sequenze di COI di *R. philippinarum* ottenute dai campioni europei (Modificato da Chiesa et al., 2017).

Acronimo Aplotipo	Aplogruppo	Frequenza (weight)
<i>RpCOI1</i>	H1	0,178
<i>RpCOI2</i>	H1	0,150
<i>RpCOI3</i>	H1	0,229
<i>RpCOI4</i>	H1	0,024
<i>RpCOI5</i>	H1	0,001
<i>RpCOI6</i>	H1	0,137
<i>RpCOI7</i>	H1	0,004
<i>RpCOI8</i>	H1	0,001
<i>RpCOI9</i>	H1	0,001
<i>RpCOI10</i>	H1	0,003
<i>RpCOI11</i>	H1	0,001
<i>RpCOI12</i>	H1	0,134
<i>RpCOI13</i>	H1	0,134

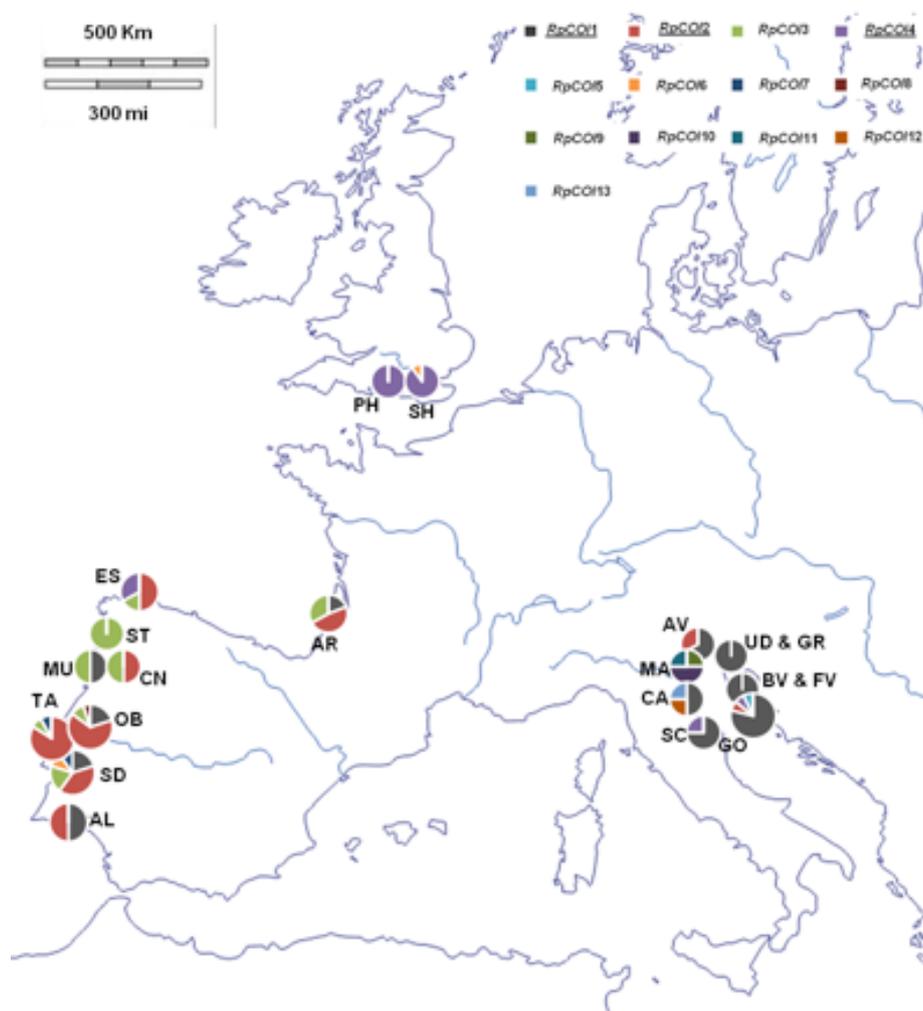


Figura 35: Distribuzione geografica dei 13 aplotipi europei del gene COI (Figura tratta da Chiesa et al., 2017).

Al contrario di quanto avvenuto per l'analisi del 16S rDNA, dove il numero di sequenze già disponibili in banca dati risultava molto esiguo, nel caso del gene COI è stato possibile confrontare le sequenze dei campioni europei con un numero molto elevato di sequenze già disponibili in GenBank, ottenute da popolazioni native della Cina e del Giappone. Ciò ha permesso di verificare che gli aplotipi più comuni nei campioni europei (RpCOI1-3) risultavano già identificati e descritti nelle popolazioni native dell'areale di distribuzione della specie.

In dettaglio, l'aplotipo RpCOI1 risultava analogo all'aplotipo h6 descritto da Kitada et al. (2013) in Giappone; RpCOI2 all'aplotipo h21 del Mar del Cina e del Giappone (Kitada et al., 2013; Mao et al., 2011); RpCOI3 all'aplotipo h32 del Mar della Cina Orientale e del Giappone (Kitada et al., 2013; Mao et al., 2011); RpCOI5 all'aplotipo h53 proveniente da Mikawa Bay (Giappone) ed infine RpCOI8 all'aplotipo h58, anch'esso già identificato in Giappone (Kitada et al., 2013). Gli altri 8 aplotipi invece sono stati descritti per la prima volta (Chiesa et al., 2017).

Il Tajima's Neutrality Test effettuato per tutti gli aplotipi di *R. philippinarum* ha confermato la presenza complessiva di 105 siti polimorfici, con Tajima test statistic D pari a -1,898 ($p < 0.05$).

Lo stesso test effettuato solo sugli aplotipi europei di *R. philippinarum* ha indicato la presenza di 11 siti polimorfici e Tajima test statistic D positivo, pari a 0,255 ($p < 0,05$). Restringendo ulteriormente la scala geografica rispetto alle due aree dell'Adriatico/Atlantico, è stato possibile osservare la presenza di 8 siti polimorfici e Tajima test statistic D pari a 0,965 per l'Adriatico; 10 siti polimorfici e Tajima test statistic D pari a -0,929 per l'Atlantico (Chiesa et al., 2017).

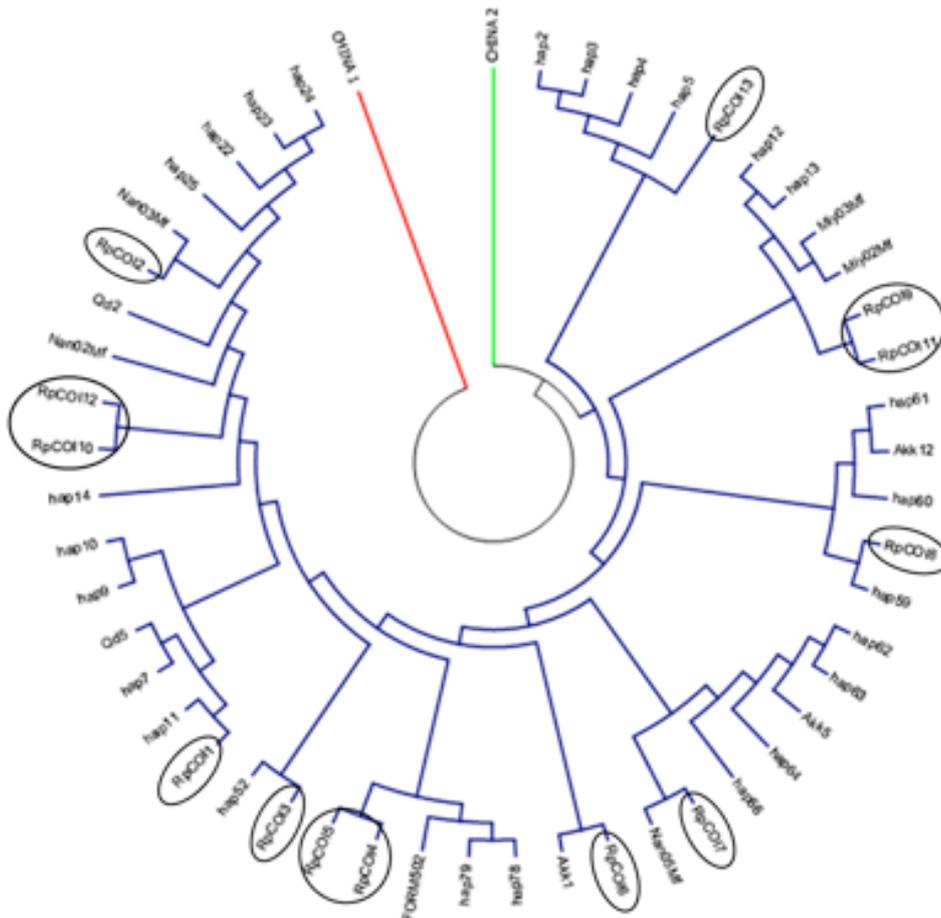
Il valore negativo del parametro D di Tajima calcolato per l'intero set di dati di *R. philippinarum*, insieme all'elevato numero di polimorfismi identificati nel suo complesso (>100) ed alla presenza di numerosi aplotipi a bassa frequenza indica un'espansione demografica della specie, presumibilmente nel suo areale di distribuzione primario, in Cina e Giappone. Al contrario, quando il test Tajima è stato eseguito solo sui campioni europei il parametro D ha indicato un valore positivo, dovuto alla presenza di alleli multipli con diversa frequenza, alcuni a bassa (<25%), ma molti altri ad alta frequenze (> 70%). Questa situazione di squilibrio nelle frequenze alleliche risulta frequente quando si verifichi un improvviso crollo demografico oppure un effetto del fondatore (Tajima, 1989). I dati provenienti dalle popolazioni Atlantiche sono in linea con la selezione equilibrata degli aplotipi dopo la prima introduzione di *R. philippinarum* in Europa. Per quanto riguarda invece le popolazioni Adriatiche, il valore negativo è coerente con introduzioni supplementari di nuovi aplotipi (Chiesa et al., 2017).

Questa interpretazione complessiva è rinforzata dai dati di frequenza dei diversi aplotipi nell'Adriatico e nell'Atlantico ottenuti nell'ambito di questa ricerca.

Anche nel caso del gene COI, il software Jmodeltest ha identificato JC come il miglior modello evolutivo ($-ln = 320042,66$) e sulla base di questo modello sono stati costruiti gli alberi filogenetici di Neighbour Joining (NJ) e di Maximum Likelihood (ML), che hanno mostrato la stessa topologia. Data la complessità dei dati (>100 aplotipi), per semplicità si è scelto di mostrare solo l'albero di ML.

Considerando tutti gli aplotipi di *R. philippinarum* (166) sono stati identificati tre clusters principali (Figura 36): uno comprensivo degli aplotipi europei, giapponesi e di alcuni aplotipi cinesi denominato "cluster A" e rappresentato con il colore blu; e due clusters ("cluster B" e "cluster C") comprensivi della maggior parte degli aplotipi cinesi (Chiesa et al., 2017), confermando sostanzialmente quanto descritto in precedenza da Mao et al. (2011) in un ampio studio effettuato sulle popolazioni del Pacifico Nord Occidentale.

Restringendo l'analisi nel dettaglio per i soli aplotipi europei, tutti e 13 aplotipi risultavano compresi nel "cluster A", e distribuiti in 9 differenti sub clusters (Fig. xxx).



È interessante notare come gli aplotipi più comuni nelle popolazioni europee appartenessero chiaramente al cosiddetto “cluster A”, composto principalmente da aplotipi giapponesi, ma anche da alcuni aplotipi cinesi. Così i risultati sin qui ottenuti per il gene COI suggeriscono l'ipotesi che le popolazioni europee di *R. philippinarum* derivino da popolazioni giapponesi e cinesi del “cluster A” (Chiesa et al., 2017).

I dati ottenuti dall'analisi del gene COI hanno permesso di ricostruire i pattern di introduzione e di diffusione della vongola verace filippina in Europa. I 3 aplotipi presenti con la più alta frequenza - RpCOI1, RpCOI2 e RpCOI3 – sono stati identificati in tutte le popolazioni analizzate, ad eccezione di quelle raccolte nel sud del Regno Unito. Questi risultati confermano l'ipotesi di un evento principale di introduzione a partire da un pool genetico comune tra i diversi paesi europei. Tuttavia, specialmente nelle popolazioni portoghesi, sono stati osservati molti aplotipi rari con distribuzione geografica limitata, supportando l'ipotesi di eventi di introduzione aggiuntivi, probabilmente condotti dai pescatori a scopo commerciale, con materiale da semina differente (Chiesa et al., 2017).

Per quanto riguarda il caso delle popolazioni britanniche, l'assenza degli aplotipi più comuni può essere spiegato da un effetto a collo di bottiglia. Infatti, le popolazioni britanniche si trovano all'estremità settentrionale dell'areale secondario di distribuzione della specie, che non rappresenta pertanto un ambiente ottimale (Chiesa et al., 2017). Questa ipotesi è coerente con le densità di popolazione segnalate, significativamente inferiori a quelle registrate nei siti del Sud Europa, ad esempio nell'Adriatico (Breber, 2002; Humphreys et al., 2007; 2015), e spiegherebbe la ridotta diversità aplotipica riscontrata in queste popolazioni (Chiesa et al., 2017).

Complessivamente, i risultati ottenuti tramite l'analisi del gene COI risultano convergenti con quanto già osservato attraverso l'analisi del 16Sr DNA. Entrambi i marcatori mitocondriali suggeriscono un effetto del fondatore principale, testimoniato da uno o più aplotipi dominanti a livello continentale, al quale però siano succedute altre introduzioni secondarie, determinate dall'inserimento di diversi stock produttivi differenti, come evidenziato dagli aplotipi rari a bassa frequenza e a limitata distribuzione geografica.

Tale scenario è del tutto plausibile con l'ipotesi formulata da Roman e Darling (2007) per le invasioni biologiche, secondo la quale le introduzioni di specie alloctone sono effettuate in maggioranza da multiple popolazioni “sorgente”, oppure da un pool di individui geneticamente differenti costituiti artificialmente. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che fenomeni di introduzione multipli possono essere individuati dalla presenza di linee mitocondriali differenti, che risultino geograficamente separate nell'areale primario di distribuzione (Kolbe et al., 2007; Taylor e Keller, 2007).

Genotipizzazione dei loci microsatelliti

L'analisi di 7 loci microsatelliti ha dimostrato che i locus scelti risultavano polimorfici in tutte le popolazioni analizzate. Nella Tabella 22 è riportata la statistica descrittiva relativa al numero di alleli osservati per ciascun locus e per ciascuna popolazione, i valori dell'eterozigosi attesa ed osservata, dell'indice di fissazione, i risultati del test di Hardy-Weinberg e quelli relativi ai test di drop-out allelico.

I valori medi dell'eterozigosi osservata (H_o) risultavano concordi a quelli riportati in letteratura per Asari16 (Yasuda et al., 2007; Mura et al., 2012; Kitada et al., 2013), ma mediamente inferiori per tutti gli altri loci (vedi Yasuda et al., 2007; An et al., 2012).

Il valore dell'indice di fissazione F variava per popolazione da -0,02 (popolazione del Delta del Po, locus Ktp8) a 0,93 (popolazione del Delta del Po, locus Ktp22) (Chiesa et al., in press).

Per quanto riguarda invece il test di Hardy-Weinberg (HW) i risultati delle analisi hanno sottolineato che il locus Asari16 era sempre in equilibrio, mentre gli altri loci erano in equilibrio, non in equilibrio o monomorfici a seconda delle popolazioni analizzate (Chiesa et al., in press).

Per quanto concerne invece i test di drop out allelico, quest'ultima verifica si è resa necessaria poiché molti campioni presentavano una mancata amplificazione del locus prescelto, anche dopo numerosi tentativi. Nel dettaglio, al locus Asari16 il 5% dei campioni non ha amplificato; tale percentuale è salita al 25% al locus Asari23, al 27% al locus Asari24, al 60% al locus Asari54, al 54% al locus Ktp5, al 35% al locus Ktp8, ed infine al 45% al locus Ktp22. Nessuna correlazione è stata osservata tra la qualità del DNA, le procedure di PCR e le mancate amplificazioni, suggerendo quindi come possibile causa la presenza di alleli nulli.

Tabella 22: Risultati relativi alla genotipizzazione di sette loci microsatelliti nelle popolazioni di *R. philippinarum* (modificata da Chiesa et al., 2016). (n) = Numero dei campioni analizzati escludendo le mancate amplificazioni; (Na) = numero di alleli; (H_o) = Eterozigosi attesa; (H_e) = Eterozigosi osservata; (F) Indice di Fissazione; (HWE) = test di Hardy Weinberg, per ciascun locus e ciascuna popolazione. F corrisponde a $(H_e - H_o) / H_e = 1 - (H_o / H_e)$. I valori di significatività statistica del Chi-Quadrato associati al test di Hardy Weinberg sono così indicati: Ns = non significativo; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,001$; Mn = monomorfico. La stima della presenza/assenza degli alleli nulli e della loro frequenza per ogni locus e per ogni popolazione sono stati ottenuti tramite FreeNA e Micro-checker. In quest'ultimo caso, la frequenza degli alleli nulli è stata stimata attraverso 4 diversi algoritmi: Oosterhout, Chakraborty, Brookfield 1, Brookfield 2. DD: dato mancante.**

Popolazione		Asari16	Asari23	Asari24	Asari54	Ktp5	ktp8	ktp22
MARANO	n	29	22	14	2	6	26	9
	Na	8,00	6,00	6,00	2,00	7,00	5,00	7,00
	Ho	0,69	0,27	0,14	0,00	0,33	0,73	0,22
	He	0,79	0,56	0,74	0,50	0,81	0,69	0,85
	F	0,13	0,52	0,80	1,00	0,59	-0,06	0,73
	HWE	0,05 ns	0,00***	0,00***	Mn	0,02 *	0,72 ns	0,01***
	FreeNA	0,06	0,21	0,35	0,33	0,26	0,00	0,34
	Alleli nulli	DD						
	Oosterhout	DD						
	Chakraborty	DD						
VENEZIA	n	32	29	34	24	19	19	20
	Na	10,0	4,00	5,00	6,00	9,00	5,00	14,00
	Ho	0,84	0,24	0,76	0,50	0,16	0,37	0,30
	He	0,86	0,49	0,63	0,53	0,80	0,72	0,90
	F	0,02	0,50	-0,20	0,05	0,80	0,49	0,67
	HWE	0,62ns	0,00**	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0,00	0,18	0,02	0,08	0,35	0,22	0,32
	Alleli nulli	no	si	no	si	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,22	-0,14	-0,02	0,38	0,28	0,33
	Chakraborty	0,01	0,34	-0,09	0,03	0,67	0,32	0,5
DELTA DEL PO	n	32	26	25	15	14	22	17
	Na	8,00	8,00	5,00	6,00	8,00	6,00	8,00
	Ho	0,84	0,53	0,16	0,40	0,29	0,77	0,06
	He	0,82	0,68	0,73	0,56	0,82	0,76	0,85
	F	-0,02	0,21	0,78	0,29	0,65	-0,02	0,93
	HWE	0,95 ns	0,03*	0,00***	0,14 ns	0,00***	0,67 ns	0,00***
	FreeNA	0	0,1	0,33	0,06	0,3	0,06	0,43
	Alleli nulli	no	no	si	no	si	no	si
	Oosterhout	-0,013	0,09	0,38	0,16	0,3	0	0,44
	Chakraborty	-0,08	0,11	0,7	0,15	0,46	0	0,86
SPAGNA	n	14	10	10	6	10	7	13
	Na	7,00	5,00	5,00	3,00	6,00	5,00	9,00
	Ho	0,93	0,50	1,00	0,17	0,30	0,14	0,31
	He	0,84	0,54	0,66	0,62	0,77	0,62	0,89
	F	-0,11	0,08	-0,51	0,73	0,61	0,77	0,62
	HWE	0,11 ns	0,32 ns	0,04*	0,08ns	0,01**	0,002**	0,00***
	FreeNA	0	0,07	0	0,28	0,28	0,3	0,28
	Alleli nulli	no	no	no	si	si	si	si
	Oosterhout	-0,06	0,04	-0,3	0,32	0,26	0,31	0,28
	Chakraborty	-0,05	0,08	-0,19	0,53	0,39	0,51	0,4
RIA	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,43 ns	0,44 ns	0,21 ns	0,82 ns	0,00***	0,29 ns	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
DE AVEIRO	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,43 ns	0,44 ns	0,21 ns	0,82 ns	0,00***	0,29 ns	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
MEDIA DI TUTTE LE POPOLAZIONI	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,48 ns	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
MEDIA DI TUTTE LE POPOLAZIONI	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,48 ns	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
MEDIA DI TUTTE LE POPOLAZIONI	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,48 ns	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
MEDIA DI TUTTE LE POPOLAZIONI	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,48 ns	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
MEDIA DI TUTTE LE POPOLAZIONI	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,48 ns	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
MEDIA DI TUTTE LE POPOLAZIONI	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,48 ns	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
MEDIA DI TUTTE LE POPOLAZIONI	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,48 ns	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
MEDIA DI TUTTE LE POPOLAZIONI	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,48 ns	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10	0,41	0,14	0,29
	Chakraborty	0,08	0	0,19	-0,05	0,8	0,2	0,42
MEDIA DI TUTTE LE POPOLAZIONI	n	22	14	15	6	13	13	12
	Na	9,00	6,00	2,00	2,00	7,00	4,00	9,00
	Ho	0,77	0,50	0,33	0,17	0,078	0,38	0,33
	He	0,82	0,59	0,49	0,15	0,80	0,58	0,82
	F	0,06	0,15	0,32	-0,09	0,90	0,34	0,59
	HWE	0,48 ns	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***	0,00***
	FreeNA	0	0,05	0,1	0	0,4	0,14	0,26
	Alleli nulli	no	no	no	no	si	si	si
	Oosterhout	0,01	0,03	0,15	-0,10			

I risultati ottenuti con i differenti algoritmi prescelti suggeriscono infatti che tutti i loci, ad eccezione di Asari16, sono caratterizzati dalla presenza di alleli nulli in tutte le popolazioni (Tabella 22). In particolare, la popolazione della laguna di Marano è risultata quella maggiormente affetta da questo problema: nel 49% dei campioni analizzati è stato impossibile ottenere una corretta amplificazione, indipendentemente dal locus scelto. Ciò ha impedito l'analisi con il software MICRO-CHECKER ma non quella tramite FREENA (Tabella 22), e tale frequenza di mancate amplificazioni e dati mancanti ha comunque interferito con la correzione delle frequenze alleliche (Chiesa et al., 2016).

Il test di linkage disequilibrium è risultato significativo ($p < 0,05$) per 17 su 21 confronti. Lo stesso test è stato eseguito per ogni coppia di loci, rimuovendo i campioni affetti da alleli nulli: i risultati sottolineano in ogni caso la mancanza di linkage tra loci differenti (Chiesa et al., in press).

Attraverso il metodo ENA ("Esclusione degli Alleli Nulli") -implementato nel software FREENA- è stato possibile correggere le frequenze alleliche rispetto alle originali. Il test di Wilcoxon ha mostrato quindi differenze molto significative ($p < 0,001$) tra le frequenze alleliche corrette e quelle non corrette, e tra i valori dell'eterozigosi osservata con e senza correzione delle frequenze alleliche ($P < 0,001$). Inoltre, per la maggior parte dei loci, è stata osservata un'evidente correlazione negativa tra la frequenza degli alleli nulli e la complessiva diversità allelica (Chiesa et al., 2016).

E' importante sottolineare che i valori di F_{st} calcolati con o senza la correzione delle frequenze alleliche tramite ENA non sono risultati significativamente differenti, e che gli alberi filogenetici ottenuti sulla base dei dati corretti e non corretti risultavano del tutto sovrapponibili (Figura 37).

In entrambi i casi, i valori di F_{st} per confronti a coppie indicano comunque un differenziamento genetico limitato tra le popolazioni analizzate, con valori sempre inferiori a 0,05 (bassa diversità).

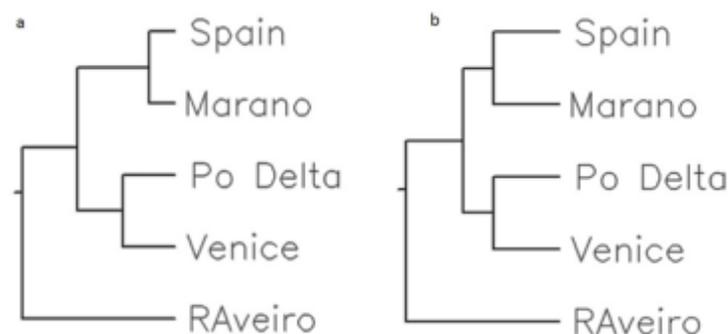


Figura 37: Alberi filogenetici di Neighbour Joining (NJ) basati sui valori di F_{st} calcolati (a) con correzione delle frequenze alleliche (b) senza correzione delle frequenze alleliche (Figura tratta da Chiesa et al., 2016) .

Anche se è stato possibile correggere le frequenze alleliche tramite il metodo ENA, l'elevata frequenza di alleli nulli presenti nel dataset ha comunque determinato un'evidente alterazione nella successiva analisi di assegnazione dei genotipi. Infatti, una discrepanza è emersa durante il trattamento con Structure Harvester per la determinazione del valore più probabile di K, ottenuto tramite $Pr(X/K)$, corrispondente a $\ln P(D)$, e tramite il metodo del delta K. Secondo il primo metodo, il valore più probabile è pari a 5, mentre il metodo del delta K ha chiaramente indicato 2 come numero più probabile. Pertanto, la successiva analisi di assegnazione tramite Structure è stata effettuata sia con $K = 2$ che con $K = 5$ (Figura 38).

In entrambi i casi non è stato possibile identificare alcun pattern geografico nelle popolazioni analizzate. Per $K = 2$ quasi tutti gli individui sono stati assegnati a entrambi i cluster genetici; analogamente, per $K = 5$ quasi tutti gli individui sono stati assegnati a tre o più gruppi (Figura 38). Ripetendo l'analisi rimuovendo l'intera popolazione di Marano, e tutti i campioni affetti da alleli nulli a tre o più loci, il risultato è rimasto comunque invariato.

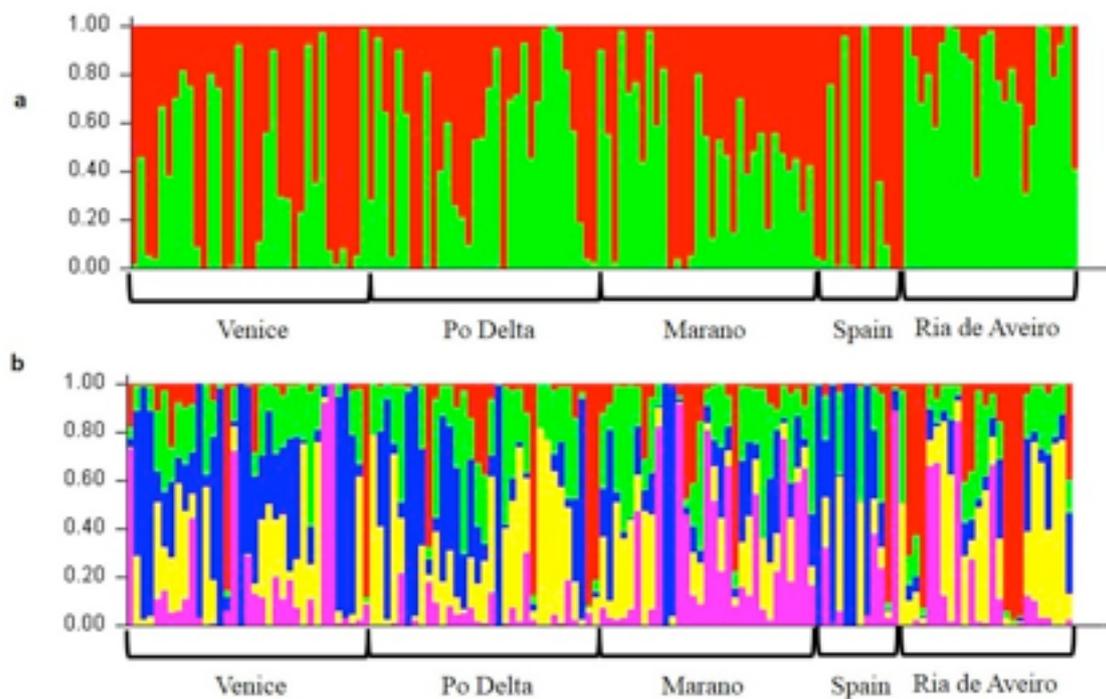


Figura 38: Analisi di assegnazione delle popolazioni di *R. philippinarum* ottenuta attraverso l'analisi di 7 marcatori microsatelliti ed elaborata per (a) $K = 2$ e (b) $K = 5$. Ogni barra verticale rappresenta un singolo individuo e ciascun colore rappresenta uno specifico cluster genetico (K). (Figura tratta da Chiesa et al., in press).

I risultati sin qui ottenuti hanno dimostrato chiaramente che le amplificazioni mancanti e gli alleli nulli rappresentano punti critici nella genotipizzazione di *R. philippinarum*, soprattutto quando si confrontano popolazioni diverse (Chiesa et al., in press). La presenza di alleli nulli era già emersa come possibile fenomeno responsabile del deficit di eterozigosi in studi pregressi di genetica di

popolazione, condotti sulla specie con loci microsatelliti (Chiesa et al., 2011; Mura et al., 2012; An et al., 2012, Kitada et al., 2013; Nie et al; 2014). Tuttavia, le analisi specifiche di drop-out allelico, effettuate con Micro-checker e/o FreeNA, erano in gran parte mancanti.

La presenza di alleli nulli è un fenomeno comune nelle popolazioni animali, in particolare negli invertebrati marini, quali i molluschi (si veda come esempio Arias-Pérez et al., 2012; Marin et al., 2012), ed è particolarmente frequente in quelle specie che presentano un'elevata dimensione effettiva delle popolazioni, ed un tasso elevato di mutazioni nelle regioni fiancheggianti i loci microsatelliti (Chapuis & Estoup, 2007).

Esistono sistemi di correzione delle frequenze alleliche in caso di alleli nulli, come ad esempio il metodo ENA da noi applicato, tuttavia la correzione può non essere sufficiente a garantire la totale affidabilità dei dati, soprattutto se gli alleli nulli presentano un'elevata frequenza nel dataset. In particolare, le informazioni disponibili circa gli effetti degli alleli nulli sui test genetici di assegnazione bayesiana sono a tutt'oggi piuttosto limitate e discordanti, ma va ricordato come Carlsson (2008) abbia sottolineato che la presenza di alleli nulli può compromettere la corretta assegnazione degli individui a ciascun cluster genetico.

CONCLUSIONI

La relazione tra scienza e politiche di gestione è un aspetto delicato, ma necessario al fine di rispondere adeguatamente alle diverse problematiche ambientali attuali (Dietz et al., 2003; Luoma e Rainbow, 2008).

I risultati ottenuti dalle diverse analisi messe a punto ed eseguite sulle matrici prelevate nelle zone di interesse hanno permesso di approfondire le conoscenze a disposizione sulla specie *R. philippinarum* sia dal punto di vista della qualità ambientale dei siti di coltivazione e raccolta, sia dal punto di vista della tracciabilità molecolare.

L'approccio olistico utilizzato ha favorito l'impiego di diverse tecnologie e l'interpretazione multidisciplinare dei risultati ha consentito di sviluppare ulteriormente un modello concettuale che consenta di mettere in luce quali siano le forzanti principali che determinano gli equilibri di metalli e metalloidi negli ambienti di transizione.

ANALISI AMBIENTALI

Le analisi condotte nei diversi siti delle tre aree di indagine hanno contribuito in maniera complementare ad approfondire lo studio sulla qualità ambientale delle zone di crescita dei molluschi bivalvi, ma hanno anche permesso di condurre uno studio sulle dinamiche principali che regolano i cicli biogeochimici negli ecosistemi di transizione.

I siti studiati hanno mostrato una certa variabilità nella composizione granulometrica e nei pattern di contaminazione da metalli e metalloidi e grazie alla speciazione geochimica è stato possibile distinguere la quota di metallo biodisponibile da quella potenzialmente biodisponibile e mai biodisponibile.

Complessivamente, si è potuto rilevare un buono stato di qualità ambientale nei siti di studio poiché, infatti, laddove dal confronto con i limiti previsti dalla normativa si registrava un superamento della concentrazione ammissibile di metallo/metalloide totale presente nel sedimento, la speciazione geochimica ha evidenziato che la quota effettivamente biodisponibile non andava oltre tali limiti (eccezion fatta per la Zona Industriale di Porto Marghera).

Attraverso i dati relativi al bioaccumulo si è potuto anche ipotizzare quali siano, integrate nel tempo, le dinamiche che possono provocare il de-adsorbimento e/o solubilizzazione degli elementi rispetto alla fase cui sono associati. In particolare, nei siti a maggiore componente granulometrica fine vi sono le condizioni favorevoli per l'instaurarsi di potenziali redox da mediamente a molto negativi, tali da portare alla riduzione del Fe e del Mn con conseguente solubilizzazione dei metalli

e metalloidi ad essi associati. Questi ultimi, hanno costanti di solubilità diverse e differenti caratteristiche chimiche, pertanto potranno associarsi ad altre fasi, oppure, passare alla colonna d'acqua ed essere trasferiti alla catena trofica. Si è osservato, infatti, che i metalli più facilmente bioaccumulati nei siti di indagine sono quelli già per loro natura piuttosto solubili (Cadmio) e che presentano una discreta quota di metallo biodisponibile (Zinco), oppure quelli che dimostrano particolare affinità per la terza fase (Arsenico). Non vengono bioaccumulati i metalli che per la maggior parte sono associati alla frazione residuale (Cromo, Piombo).

Queste considerazioni, unitamente alle analisi statistiche condotte sui dati ambientali disponibili e omogenei hanno portato alla definizione di un modello concettuale che rappresenta le principali forzanti che agiscono in maniera determinante nel complesso sistema sedimento-acqua-biota (figura 39).

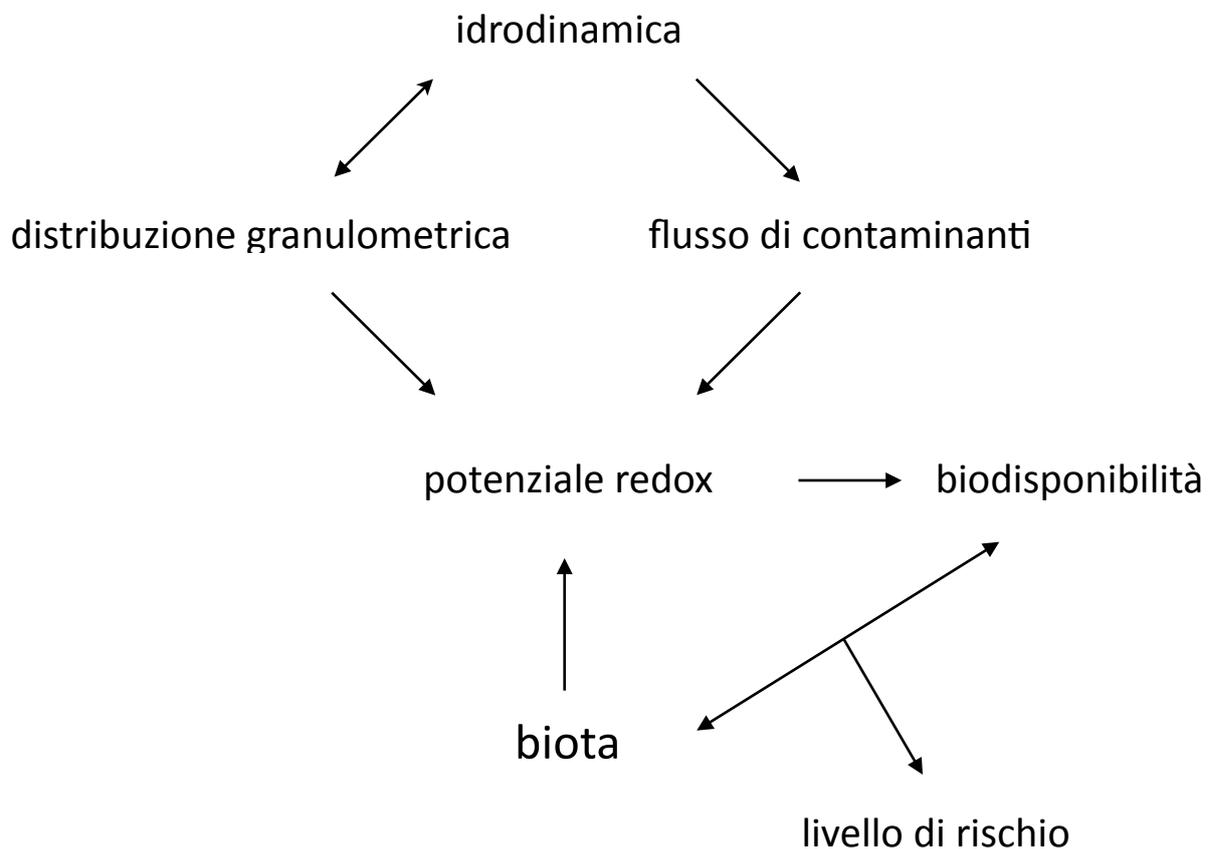


figura 39. Modello concettuale riportante le principali relazioni che intercorrono tra le diverse forzanti e i processi ivi insistenti che determinano i livelli di rischio sito-specifici in ambiente marino.

Il modello sottolinea il peso significativo che l'insieme dei fenomeni idrodinamici ha nel determinare delle situazioni favorevoli o meno all'accumulo di contaminanti e all'instaurarsi di

condizioni redox negative. Da una parte, infatti, è responsabile dei fenomeni di direccionamento dei flussi idrici, dall'altra determina la presenza di zone dove prevalgono fenomeni di accumulo di sedimento dove prevalgono le frazioni fini e di ablazione dove prevalgono le frazioni sabbiose.

A sua volta, il potenziale redox è condizionato allo stesso tempo dalla granulometria, che determina per l'ossigeno la possibilità di diffondersi con maggiore o minore facilità, dall'altra dalla biota che contribuisce sia con fenomeni di consumo dell'ossigeno per effetto del metabolismo microbico, sia per la presenza di specie bioturbatrici che contribuiscono ora all'ossigenazione, ora alla compattazione del sedimento in cui vivono. L'azione congiunta di queste forzanti porta a determinare, per i diversi contaminanti, diversi livelli di biodisponibilità con conseguenze più o meno significative a seconda dell'ecologia della specie target considerata.

Gli approfondimenti condotti sulla speciazione geochimica di metalli e metalloidi nelle diverse frazioni granulometriche ha portato a ipotizzare che i film di sostanza organica prodotti dagli organismi che abitano il sedimento (es. pseudo-feci), abbiano un ruolo significativo nel determinare la formazione di aggregati di particellato fine che, in ambiente acquatico, si comportano come le frazioni a diametro maggiore con conseguenze sul reale potenziale di entrare in contatto con gli organismi target.

Tali considerazioni, però, richiedono di essere vagliate ulteriormente al fine di approfondire dal punto di vista quali-quantitativo il reale peso di questi fenomeni nel bilancio dei livelli di rischio sito-specifici legati agli ambienti di transizione, luogo di crescita dei molluschi eduli.

Le indagini condotte finora consentono di stabilire quali siano le principali forzanti da tenere sotto controllo per determinare i livelli di rischio nei complessi ambienti di transizione. Inoltre, si è dimostrato che per una corretta gestione delle problematiche relative a questi contesti, sia necessario adottare un approccio olistico al fine di ottenere una valutazione di rischio integrata che possa essere realmente affidabile e predittiva.

ANALISI GENETICHE

Nel presente lavoro di tesi di Dottorato è stata indagata anche la variabilità genetica delle popolazioni di vongola verace filippina *R. philippinarum* in cinque paesi europei (Italia, Portogallo, Spagna, Francia e Regno Unito) ove la specie è stata introdotta a scopo di pesca e/o acquacoltura.

Le popolazioni introdotte e oramai naturalizzate sono state caratterizzate geneticamente attraverso un approccio molecolare integrato, tramite il sequenziamento diretto di un frammento del 16S rDNA e del gene *COI*, ed alla genotipizzazione di 7 loci microsatelliti altamente polimorfici. I risultati sin qui ottenuti tramite le analisi dei due marcatori mitocondriali hanno permesso di

svelare uno scenario complesso dal punto di vista biogeografico e filogenetico, dominato da un primo, evidente effetto del fondatore testimoniato da pochi aplotipi dominanti, ma anche da introduzioni multiple successive all'evento principale, come evidenziato dalla discreta variabilità aplotipica riscontrata in entrambi i marcatori, e dalla presenza di numerosi aplotipi con una bassa frequenza e limitata distribuzione geografica (Chiesa et al., 2014; 2017).

La genotipizzazione attraverso i marcatori microsatelliti ha evidenziato invece l'elevato livello di introgressione a livello nucleare presente tra le popolazioni europee, e la mancanza di una struttura genetica su base geografica; oltre a sottolineare l'elevata presenza di alleli nulli, fenomeno da tenere in considerazione negli studi futuri (Chiesa et al., 2016).

Infine, entrambe le classi di marcatori hanno fornito un'importante informazione riguardo la limitata perdita di diversità genetica nelle popolazioni di *R. philippinarum* introdotte in Europa, a dispetto dell'origine alloctona e della forte pressione antropica dovuta alle intense attività di pesca ed acquacoltura. Tale variabilità genetica costituisce una garanzia di resilienza della specie rispetto allo sfruttamento commerciale ed ai cambiamenti ambientali, evidenziando come la conoscenza della struttura genetica delle popolazioni di molluschi bivalvi sia fondamentale per pianificarne lo sfruttamento sostenibile nelle aree costiere europee.

Le informazioni ottenute riguardanti le origini, la qualità dei siti di coltivazione/raccolta e le caratteristiche genetiche costituiscono un patrimonio di conoscenze di fondamentale importanza sia per i produttori che per i consumatori della vongola verace filippina. Il modello delle forzanti che intervengono nei complessi equilibri biogeochimici negli ambienti di transizione consente di porre le basi per stabilire i potenziali rischi, presenti e futuri, per i siti di coltivazione. Pertanto, il tool multidisciplinare messo a punto risponde all'obiettivo di progredire nello studio dell'autenticità del prodotto ittico e può costituire la base per poterlo valorizzare sul mercato internazionale .

BIBLIOGRAFIA

AA.VV. 2012 I.S.I.S. "Bonaldo Stringher" La Laguna di Marano, Edizioni della Laguna 157 pp, Udine.

Acquavita, A., Covelli, S., Emili, A., Berto, D., Faganeli, J., Giani, M., ... Rampazzo, F. (2012). Mercury in the sediments of the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea): Sources, distribution and speciation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 113, 20–31. <http://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.012>

Amorosi, A., Sammartino, I., 2002. Geochemical and mineralogical variations as indicators of provenance changes in Late Quaternary deposits of SE Po Plain. *Sedimentary Geology* 15 (3e4), 273-292.

An H.S., Park K.J., Cho K.C., Han H.S. and Myeong J.I., 2012: Genetic structure of Korean populations of the clam *Ruditapes philippinarum* inferred from microsatellite marker analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44, 186-195.

Argese, E., Bettiol, C., Cedolin, A., Bertini, S., & Delaney, E. (2003). Speciation of heavy metals in sediments of the lagoon of Venice collected in the industrial area. In *Annali di Chimica* (Vol. 93, pp. 329–336). Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0141789760&partnerID=tZOtx3y1>

Argese, E., Cogoni, G., Zaggia, L., Zonta, R., & Pini, R. (1992). Study on redox state and grain size of sediments in a mud flat of the Venice Lagoon. *Environmental Geology and Water Sciences*, 20(1), 35–42. <http://doi.org/10.1007/BF01736108>

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

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

- Astorga, A., Death, R., Death, F., Paavola, R., Chakraborty, M., & Muotka, T. (2014). Habitat heterogeneity drives the geographical distribution of beta diversity: the case of New Zealand stream invertebrates. *Ecology and Evolution*, 4(13), 2693–702. <http://doi.org/10.1002/ece3.1124>
- Bald, J., Sinquin, A., Borja, A., Cail-Milly, N., Duclercq, B., Dang, C., de Montadouin, X., 2009. A system dynamics model for the management of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in the Bay of Arcachon (France). *Ecol. Model.* 220, 2828–2837.
- Bartoli, M., Castaldelli, G., Nizzoli, D., Fano, E.A., Viaroli, P.G. Manila clam introduction in the Sacca di Goro Lagoon (Northern Italy): ecological implications. *Bull. Fish. Res. Ag. Jap.*, accepted, in press.
- Batley, G. E., & Gardner, D. (1977). Sampling and storage of natural waters for trace metal analysis. *Water Research*, 11(9), 745–756. [http://doi.org/10.1016/0043-1354\(77\)90042-2](http://doi.org/10.1016/0043-1354(77)90042-2)
- Bebiano M.J., Serafim M.A. (2003). Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 53–66.
- Bidegain, G., Juanes, J.S., 2013. Does expansion of the introduced Manila clam *Ruditapes philippinarum* cause competitive displacement of the European native clam *Ruditapes decussatus*? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 445, 44–52.
- Blaise, C., Gagne, F., Pellerin, J., Hansen, P.D., Trottier, S., 2002. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Environmental Toxicology* 17, 170e186.
- Boscolo Brusà R., Cacciatore, F., Ponis, E., Molin, E., Delaney E., 2013. Clam culture in the Venice lagoon: stock assessment of Manila clam (*Venerupis philippinarum*) populations at a nursery site and management proposals to increase clam farming sustainability. *Aquat. Living Resour.* 26, 1–10
- Breber, P. (1985). On-growing of the carpet-shell clam (*Tapes decussatus* (L.)): Two years' experience in Venice Lagoon. *Aquaculture*, 44(1), 51–56. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90041-9](http://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90041-9)

Breber, P., 2002. Introduction and acclimatisation of the Pacific carpet clam *Tapes philippinarum*, to Italian waters. In: Leppakoski, E., Gollasch, S., Olenin, S. (Eds.) *Invasive Aquatic Species of Europe Distribution Impacts and Management*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 120–126

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

Callaway, J.C., Delaune, R.D., Patrick, W.H., 1998. Heavy metal chronologies in selected coastal wetlands from Northern Europe. *Marine Pollution Bulletin* 36, 82-96.

Carlsson J., 2008: Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *Journal of Heredity*, 99, 616-623.

Chainho, P., 2014. Portuguese report. In: Report of the Working Group on Introduction and Transfers of Marine Organisms (WGITMO), 19-21 March, 2014, Palanga, Lithuania. ICES CM 2014/ACOM: 32, 259 pp.

Chainho, P., Fernandes, A., Amorim, A., et al., 2015. Non-indigenous species in Portuguese coastal areas, coastal lagoons, estuaries, and islands. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, DOI: 10.1016/j.ecss.2015.06.019.

Chapuis M.P. and Estoup A., 2007: Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621-631.

Chester, R., 2003. *Marine Geochemistry*. Wiley-Blackwell, Malden, MA, 520 pp. Comans, R.N.J., Van Dijk, C.P.J., 1988. Role of complexation processes in cadmium mobilization during estuarine mixing. *Nature* 336, 151–154.

Chiesa, S., Nonnis Marzano, F., Minervini, G., De Lucrezia, D., Baccarani, G., Bordignon, G., ... Argese, E. (2011). The invasive Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in Northern Adriatic Sea: Population genetics assessed by an integrated molecular approach. *Fisheries Research*, 110(2), 259–267. <http://doi.org/10.1016/j.fishres.2011.04.013>

Chiesa S., Lucentini L., Freitas R., Nonnis Marzano F., Minello F., Ferrari C., Filonzi L., Figueira E., **Breda S.**, Baccarani G., Argese E. (2014) Genetic diversity of introduced Manila clam *Ruditapes philippinarum* populations inferred by *16S rDNA*. *Biochemical Systematics And Ecology* 57, 52-59.

Chiesa S., Lucentini L., Freitas R., Nonnis Marzano F., Ferrari C., Filonzi L., **Breda S.**, Minello F., Figueira E., Argese E. (2016) Null alleles of microsatellites for Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Animal Genetics* 47, 135-136.

Chiesa S., Lucentini L., Freitas R., Nonnis Marzano F., **Breda S.**, Figueira E., Caill-Milly N., Herbert R., Soares A.M.V.M., Argese E. (2017) A history of invasion: *COI* phylogeny of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Europe. *Fisheries Research* 186, 25-35.

Chiesa S., Lucentini L., Freitas R., Nonnis Marzano F., **Breda S.**, Figueira E., Caill-Milly N., Herbert R., Soares A.M.V.M., Argese E. Mapping the stranger: genetic diversity of Manila clam in European coastal lagoons. *Bulletin of the Fisheries Research Agency of Japan*. Accepted, in press.

Chong, K., & Wang, W. X. (2000). Bioavailability of sediment-bound Cd, Cr and Zn to the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 255(1), 75-92.

Covelli, S., Langone, L., Acquavita, A., Piani, R., & Emili, A. (2012). Historical flux of mercury associated with mining and industrial sources in the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 113, 7–19. <http://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.12.038>

Dallinger R. (1995). Mechanisms of metal incorporation into cells. *Cellular Biology in Environmental Toxicology*, pp. 135-154.

De Bono, E. (1976). *Teaching Thinking*. BOOK, Penguin Books. Retrieved from <https://books.google.it/books?id=4H5kPgAACAJ>

De Pol, R. "Inquinamento da metalli pesanti in relazione ai processi metabolici: importanza dei metodi di speciazione". Tesi di dottorato in Scienze Ambientali, XXII ciclo, Università Ca' Foscari, Venezia 2009.

Dias, J. M., Lopes, J. F., & Dekeyser, I. (1999). Hydrological characterisation of Ria de Aveiro, Portugal, in early summer. *Oceanologica Acta*, 22(5), 473–485. [http://doi.org/10.1016/S0399-1784\(00\)87681-1](http://doi.org/10.1016/S0399-1784(00)87681-1)

Dias, J. M., Lopes, J. F., & Dekeyser, I. (2000). Tidal propagation in Ria de Aveiro lagoon, Portugal. *Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere*, 25(4), 369–374. [http://doi.org/10.1016/S1464-1909\(00\)00028-9](http://doi.org/10.1016/S1464-1909(00)00028-9)

Dias J.M, Fernandes E.H. (2006) Tidal and subtidal propagation in two Atlantic estuaries: Patos lagoon (Brazil) and Ria de Aveiro lagoon (Portugal). *Journal Of Coastal Research*. SI39, 1423-1427.

Du Laing, G., Vanthuyne, D. R. J., Vandecasteele, B., Tack, F. M. G., & Verloo, M. G. (2007). Influence of hydrological regime on pore water metal concentrations in a contaminated sediment-derived soil. *Environmental Pollution*, 147(3), 615–625. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.004>

Du Laing, G., Meers, E., Dewispelaere, M., Vandecasteele, B., Rinklebe, J., Tack, F. M. G., & Verloo, M. G. (2009). Heavy metal mobility in intertidal sediments of the Scheldt estuary: Field monitoring. *The Science of the Total Environment*, 407(8), 2919–30. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.024>

Du Laing, G. (2010). Analysis and Fractionation of element in Soils. In P. S. Hooda (Ed.), *Trace Elements in Soils*. Wiley.

Eggleton, J., & Thomas, K. V. (2004). A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment International*, 30(7), 973–80. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2004.03.001>

Fan W, Wang W-X, Chen J, Li X, Yen Y-F. (2002). Cu, Ni and Pb speciation in surface sediments from a contaminated bay of northern China. *Mar Pollut Bull.*; 44:816–32.

Figueira, E., Lima, A., Branco, D., Quintino, V., Rodrigues, A. M., & Freitas, R. (2011). Health concerns of consuming cockles (*Cerastoderma edule* L.) from a low contaminated coastal system. *Environment International*, 37(5), 965–72. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.018>

Flassch, J.P., Leborgne, Y., 1992. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. *ICES J. Mar. Sci.* 194, 92e96.

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek, 1994 DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 3: 294–299.

Fontolan, G., Pillon, S., Bezzi, A., Villalta, R., Lipizer, M., Triches, A., & D'Aiotti, A. (2012). Human impact and the historical transformation of saltmarshes in the Marano and Grado Lagoon, northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 113(null), 41–56. <http://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.007>

Forstner U. and Wittmann GTW. (1981) Metal pollution in the aquatic environment. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; [486 pp.]

Gaspar, M.B., 2010. Distribuição, abundância e estrutura demográfica da amêijoia Japonesa (*Ruditapes philippinarum*) no Rio Tejo. Relatório do IPIMAR, 6 pp.

Grimwood C, McGhee TJ. Prediction of pollutant release resulting from dredging. *J-Water Pollut Control Fed.* 51:1811–5 (1979).

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

Guerra, R., Pasteris, A., Ponti, M., 2009. Impacts of maintenance channel dredging in a northern Adriatic coastal lagoon. I. Effects on sediment properties, contamination and toxicity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85, 134-142

Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1111e1118.

Horowitz A. J., Elrick K. A. and Hooper R. P. (1989) The prediction of aquatic sediment-associated trace element concentrations using readily obtainable geochemical factors. Proc. Int. Conf. Heavy Metals in the Environment pp. 493--496.

Humphreys, J., Caldow, R.W.G., McGrorty, S., West, A.D., Jensen, A.C., 2007. Population dynamics of naturalised Manila clams in British coastal waters. *Marine Biology* 151, 2255–2270.

Humphreys, J., Harris, M.R.C., Herbert, R.J.H., Farrell, P., Jensen, A., Cragg, S.M., 2015. Introduction, dispersal and naturalization of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in British estuaries. *Journal of the Marine Biology Association UK*, 1980–2010, <http://dx.doi.org/10.1017/s0025315415000132>

Jean G. E. and Bancroft, G. M. 1986. Heavy metal adsorption by sulphide mineral surfaces. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 55, 1455-1463.

Jung, Y.S., Qian, Y., Chen, X., 2010. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell. Signal.* 22, 1003–1012

Kalnejs, L. H., Martin, W. R., & Bothner, M. H. (2015). Science of the Total Environment Porewater dynamics of silver , lead and copper in coastal sediments and implications for benthic metal fluxes. *Science of the Total Environment*, The, 517, 178–194. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.011>

Kanaya, G., Nobata, E., Toya, T., Kikuchi, E., 2005. Effects of different feeding habits of three bivalve species on sediment characteristics and benthic diatom abundance. *Marine Ecology Progress-Series* 299, 67e78.

Kerndorff H. and Schnitzer M., 1980. *Sorption of metals on humic acid*. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 44: 1701-1708.

Kitada S., Fujiake C., Asakura Y., Yuki H., Nakajima K., Vargas K.M., Kawashima S., Hamasaki K. and Kishino H., 2013: Molecular and morphological evidence of hybridization between native *Ruditapes philippinarum* and the introduced *Ruditapes* form in Japan. *Conservation Genetics*, 14, 717–733.

Kolbe, J.J., Glor, R.E., Schettino, L.R.G., Lara, A.D., Larson, A., Losos, J.B., 2007. Multiple sources, admixture, and genetic variation in introduced *Anolis* lizard populations. *Conservation Biology* 21, 1612–1625

Ji, J., Choi, H. J., & Ahn, I.-Y. (2006). Evaluation of Manila clam *Ruditapes philippinarum* as a sentinel species for metal pollution monitoring in estuarine tidal flats of Korea: effects of size, sex, and spawning on baseline accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, 52(4), 447–53. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.12.012>

Laing, G. Du. (2011). *Redox Metal Processes and Controls in Estuaries. Treatise on Estuarine and Coastal Science* (Vol. 4). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374711-2.00406-X>

Li X., Shen Z., Wai O., Li Y-S. (2000). Chemical partitioning of heavy metal contaminants in sediments of the Pearl River Estuary. *Chem Speciat Bioavailab*; 12(1):17–25.

Li, Y., Yu, Z., Song, X., & Mu, Q. (2006). Trace metal concentrations in suspended particles, sediments and clams (*Ruditapes philippinarum*) from Jiaozhou Bay of China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 121(1–3), 491–501. <http://doi.org/10.1007/s10661-005-9149-6>

Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring e use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 57, 195-211.

Luoma, S. N., & Rainbow, P. S. (2008). *Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management.* (Cambridge University Press, Ed.). New York: Cambridge University Press.

Luther III, G. W., Meyerson, A. L., Krajewski, J. J., & Hires, R. (1980). Metal sulfides in estuarine sediments. *J. SEDIMENT. PETROL.*, 50(4), 1117–1120. JOUR.

Mao Y.L., Gao T.X., Yanagimoto T. and Xiao Y.S., 2011: Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on COI gene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407, 171–181.

Marin A., Fujimoto T. and Arai K., 2012: Isolation and characterization of 12 microsatellite loci in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* and cross-species amplification in other scallop species (family Pectinidae). *Conservation Genetic Resources* 4, 179-182.

Mayer, L. M. & Kenneth Fink, L. Granulometric dependence of chromium accumulation in estuarine sediments in Maine. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 11, 491–503 (1980).

Matozzo, V., Binelli, A., Parolini, M., Previato, M., Masiero, L., Finos, L., Bressan, M., Marin, M.G., 2012. Biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* and contamination levels in sediments from seaward and landward sites in the lagoon of Venice. *Ecological Indicators* 19, 191-205.

MAV, Ufficio di Piano per le Attività di salvaguardia di Venezia e della sua laguna: lo stato ecologico della laguna. Rapporto Tematico (2004).

Mikkelsen, P.M., Bieler, R., Kappner, I., Rawlings, T., 2006. Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zool. J. Linn. Soc. Lond.* 148, 439–521. Moore, Morse J. W., Millero F. J., Cornwell J. C. and Rickard D., 1987. The chemistry of hydrogen sulphide and iron sulphide systems in natural waters. *Earth-Sci. Rev.*, 24: 1-42.

Molinaroli, E., Sarretta, A., Ferrarin, C., Masiero, E., Specchiulli, A., & Guerzoni, S. (2014). Sediment grain size and hydrodynamics in Mediterranean coastal lagoons: Integrated classification of abiotic parameters. *Journal of Earth System Science*, 123(5), 1097–1114. <http://doi.org/10.1007/s12040-014-0445-9>

Moschino, V., Delaney, E., & Da Ros, L. (2012). Assessing the significance of *Ruditapes philippinarum* as a sentinel for sediment pollution: bioaccumulation and biomarker responses. *Environmental Pollution*, 171(null), 52–60. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.024>

Mura L., Cossu P., Cannas A., Scarpa F., Sanna D., Dedola G.L., Floris R., Lai T., Cristo B., Curini-Galletti M., Fois N. and Casu M., 2012: Genetic variability in the Sardinian population of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 41, 74–82

Nie H.T., Zhu D.P., Yang F., Zhao L.Q. and Yan X.W., 2014: Development and characterization of EST-derived microsatellite markers for Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Conservation Genetics Resources* 6, 25-27.

Paul Pont, I., de Montaudouin, X., Gonzalez, P., Soudant, P., Baudrimont, M., 2010. How life history contributes to stress response in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Science and Pollution Research* 17, 987-998.

Pellizzato M. 1990 - La venericoltura in Italia. Stato attuale in Alto Adriatico. In: *Tapes philippinarum* - Biologia e Sperimentazione. *Regione Veneto - E.S.A.V.*, pagg. 197-200.

Pellizzato M. 1990 - La venericoltura in Italia. La laguna di Venezia. In: *Tapes philippinarum* - Biologia e Sperimentazione. *Regione Veneto - E.S.A.V.*, pagg. 206-208.

Perez-Camacho, A., Cuna M., 1985. First data on raft culture of Manila clam in the Ria de Arosa. *ICES Conferences & Meetings*, F: 43, 22 pp.

Petersen W, Willer E, Willamowski C. Remobilization of trace elements from polluted anoxic sediments after resuspension in oxic water. *Water Air Soil Pollut.* 99:515–22 (1997).

Ramieri, E., Barbanti, A., Picone, M., Menchini, G., Bressan, E., Dal Forno, E., 2011. Integrated plan for the sustainable management of the Lagoon of Marano and Grado. *Littoral*. doi:10.1051/litt/201105008

Ravera, O., 2000. The Lagoon of Venice: the result of both natural factors and human influence. *Journal of Limnology* 59 (1).

Robert, R., Sánchez, J.L., Pérez-Parallé, Luz, Ponis, E., Kamermans, P., O' Mahoney, M. 2013. A glimpse on the mollusc industry in Europe. *Aquac. Eur.* 38, 5-11.

Roman J., Darling J.A., 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 454–464

Rinklebe, J., Differenzierung von Auenböden der Mittleren Elbe und Quantifizierung des Einflusses von deren Bodenkennwerten auf die mikrobielle Biomasse und die Bodenenzymaktivitäten von b-Glucosidase, Protease und alkalischer Phosphatase. Ph.D. Thesis. With English summary. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Germany, 2004, 113

Rivera-Duarte, I. e Flegal, A., 1994. Benthic lead fluxes in San Francisco Bay, California, USA. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 3307–3313.

Rivera-Duarte, I., Flegal, A., 1997a. Pore-water silver concentration gradients and benthic fluxes from contaminated sediments of San Francisco Bay, California, USA. *Mar. Chem.* 56, 15–26.

Ruano, F., Sobral, D.V., 2000. Marine non-indigenous species current situation in Portugal. Pp. 58-63, In: Rodrigues, L., Reino, L., Godinho, L.O., Freitas, H. (Eds.), *Proceedings of the 1st Symposium on Non-indigenous Species: Introduction, Causes and Consequences*. Liga para a Protecção da Natureza, Lisbon.

Salomons, W. I. (1985). Sediments and water quality. *Environmental Technology Letters*, 6(1–11), 315–326. JOUR. <http://doi.org/10.1080/09593338509384349>

Salomons, W. and Förstner, U. (1984). *Metals in the Hydrocycle*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Saulnier I, Mucci A. (2000). Trace metal remobilization following the resuspension of estuarine sediments: Saguenay Fjord, Canada. *Appl Geochem*; 15:191–210.

Silva, J. F. (1994). *Circululaçao da água ne Ria de Aveiro - contribuição-para o estudo da qualidade da água*, PhD Thesis, Universidade de Aveiro, Portugal.

Tagliapietra D. e Volpi Ghirardini A. (2006). Notes on coastal lagoon typology in the light of the EU Water Framework Directove: Italy as a case study; *Aqautic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 16 457–467.

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

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

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

- Tessier, A., Campbell, P. G. C., & Bisson, M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51(7), 844–851. <http://doi.org/10.1021/ac50043a017>
- Usero, J., Gonzalez-Regalado, E., Garcia, I., (1997). Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic coast of Southern Spain. *Environ. Int.* 23, 291-298.
- Van den Berg GA, Meijers GGA, van der Heijdt LM, Zwolsman JJG. (2001). Dredging-related mobilization of trace metals: a case study in the Netherlands. *Water Res.*; 35(8):1979–86.
- Van Ryssen R, Leermakers M, Baeyens W. (1999) The mobilisation potential of trace metals in aquatic sediments as a tool for sediment quality classification. *Environ Sci Policy*;2:75–86.
- Vaz, N., Dias, J. M., Leito, P., & Martins, I. (2005). Horizontal patterns of water temperature and salinity in an estuarine tidal channel: Ria de Aveiro. *Ocean Dynamics*, 55(5–6), 416–429. <http://doi.org/10.1007/s10236-005-0015-4>
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A., & Freitas, R. (2015). Spatial distribution and bioaccumulation patterns in three clam populations from a low contaminated ecosystem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 155, 114–125. <http://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.01.004>
- Velez, C., Leandro, S., Figueira, E., Soares A.M.V.M., Freitas, R., 2015b. Biochemical performance of native and introduced clam species living in sympatry: The role of elements accumulation and partitioning. *Mar. Environ. Res.* 109, 81-94.
- Windom, H.L., Schropp, S.J., Calder, F.O., Ryan, J.D., Smith Jr., R.G., Burney, L.C., Lewis, F.G., Rawlinson, C.H., 1989. Natural trace metal concentrations in estuarine and coastal marine sediments of the southeastern United States. *Environ. Sci. Technol.* 23, 314–320.
- Yasuda N., Nagai S., Yamaguchi S., Lian C.L. and Hamaguchi M., 2007: Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Molecular Ecology Resources*, 7, 43-45.

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

Zonta R., Cochran J. K., Collavini F., Costa F., Scattolin M. and Zaggia L., 2005. Sediment and heavy metal accumulation in a small canal, Venice, Italy. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 8, 63-71.

Zonta R., Collavini F., Zaggia L., Zuliani A., 2005. The effect of floods on the transport of suspended sediments and contaminants: a case study from the estuary of the Dese River (Venice Lagoon, Italy). *Environment International*, 31, 948-958.

Zoumis T, Schmidt A, Grigorova L, Calmano W. (2001). Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. *Sci Total Environ.*; 266: 195–202.