

UNIVERSITÀ CA' FOSCARI DI VENEZIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE AMBIENTALI

XXVII CICLO

A.A. 2013 - 2014



**STUDIO SULLE POTENZIALITÀ DI BIOACCUMULO DI
METALLI TOSSICI IN AMBIENTE LAGUNARE**

TESI DI DOTTORATO DI

ALESSANDRA ZUIN

COORDINATORE: PROF. GABRIELE CAPODAGLIO

TUTOR: PROF. GIAMPIETRO RAVAGNAN

CO-TUTOR: DR. SABRINA MANENTE

a Ivonne e Tiziano
*per avermi insegnato tanto,
ma soprattutto,
l'amore*

SOMMARIO

ABSTRACT	6
ACRONIMI UTILIZZATI	7
1. PREMESSE	9
1.1 OBIETTIVI.....	10
1.2 STRUTTURA DELLA TESI.....	11
2. INTRODUZIONE	12
2.1 ELEMENTI CHIMICI.....	13
2.1.1 Elementi come nutrienti e inquinanti.....	13
2.1.2 Elementi nell'ambiente marino e di transizione.....	14
2.2 MOLLUSCHI BIVALVI	17
2.2.1 Caratteristiche essenziali	17
2.2.2 Bivalvi come bioindicatori.....	17
2.3 CONCHIGLIA.....	21
2.3.1 Struttura e composizione.....	22
2.3.2 Conchiglie come indicatori.....	23
3. PARTE PRIMA.....	25
3.1 ASPETTI GENERALI E INTRODUTTIVI.....	26
3.1.1 Piano sperimentale.....	27
3.1.2 Metodi di trattamento e analisi delle conchiglie	28
3.1.3 L'influenza della specie-specificità.....	31
3.2 CONFRONTO FRA SITI	38
3.2.1 Le aree di studio.....	38
3.2.2 Materiali e metodi.....	41
3.2.3 Risultati e discussione	46
3.3 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	72
4. PARTE SECONDA	94
4.1 ASPETTI INTRODUTTIVI	95
4.1.1 La laguna di Venezia	95
4.1.2 <i>Venerupis philippinarum</i> in laguna di Venezia	97
4.1.3 Piano sperimentale.....	101
4.2 MATERIALI E METODI.....	104
4.2.1 Campionamento.....	104

4.2.2	Determinazione degli indici di condizione	110
4.2.3	Analisi elementale sui tessuti e la conchiglia di <i>V. philippinarum</i>	115
4.2.4	Caratterizzazione del sedimento.....	119
4.2.5	Analisi elementale del sedimento.....	119
4.2.6	Speciazione geochimica del sedimento	120
4.3	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	123
4.3.1	Soft tissue di <i>Venerupis philippinarum</i> : analisi elementale	123
4.3.2	Conchiglie di <i>Venerupis philippinarum</i> : analisi elementale.....	135
4.3.3	Sedimento: caratterizzazione	144
4.3.4	Sedimento: analisi elementale.....	148
4.3.5	Fasi geochimiche del sedimento.....	152
4.4	ELABORAZIONE DATI.....	166
4.4.1	Fattori di bioaccumulo	166
4.4.2	Cluster Analysis e Principal Component Analysis.....	180
4.4.3	Correlazioni.....	195
4.5	CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	204
5.	PARTE TERZA.....	217
5.1	ASPETTI INTRODUTTIVI	218
5.1.1	Scarto da venericoltura.....	218
5.1.2	Proposta di utilizzo	222
5.1.3	Piano sperimentale.....	225
5.1.4	Scelta della batteria di test ecotossicologici.....	228
5.2	MATERIALI E METODI.....	232
5.2.1	Campionamento.....	232
5.2.2	Analisi qualitativa dello scarto	235
5.2.3	Analisi elementale dello scarto	237
5.2.4	Test di cessione sullo scarto	238
5.2.5	Test ecotossicologici: fasi preliminari.....	239
5.2.6	Test di inibizione della bioluminescenza con <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)	240
5.2.7	Test di inibizione della crescita algale con <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	242
5.2.8	Test di embriotossicità con <i>Mytilus galloprovincialis</i>	245
5.3	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	248
5.3.1	Scarto: analisi qualitativa.....	248
5.3.2	Scarto: analisi elementale	258
5.3.3	Scarto: test di cessione	267

5.3.4	Esecuzione della batteria di test ecotossicologici sugli elutriati dello scarto.....	271
5.3.5	Confronto dei risultati della batteria di test ecotossicologici	285
5.3.6	Prototipo di bio-burga.....	287
5.4	CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	290
6.	CONCLUSIONI	294
6.1	CONCLUSIONI GENERALI	295
6.2	RISULTATI OTTENUTI	297
6.3	RIPERCUSSIONI APPLICATIVE.....	300
6.4	PRESENTAZIONE DEI RISULTATI.....	302
7.	BIBLIOGRAFIA.....	304
ALLEGATO A	321

ABSTRACT

Nell'ambito degli studi rivolti all'approfondimento dei meccanismi che regolano l'accumulo di metalli all'interno dei tessuti di Molluschi Bivalvi caratteristici degli ecosistemi lagunari si è voluto approfondire l'aspetto legato all'incorporazione di questi elementi all'interno delle conchiglie. Il lavoro di ricerca è stato condotto considerando la composizione elementale delle valve (1) di diverse specie prelevate nello stesso luogo, (2) di un'unica specie prelevata in diversi siti di campionamento, (3) per un'unica specie in riferimento alla composizione nei tessuti molli e nell'ambiente, (4) in una matrice proveniente da diversi punti di campionamento (lo scarto da venericoltura) composta dall'insieme di conchiglie di specie differenti.

Il design sperimentale è risultato funzionale all'ottenimento di risultati significativi che hanno permesso di chiarire i fattori ambientali e biologici che regolano il processo di bioaccumulo nelle conchiglie, le diversità esistenti tra i meccanismi che operano a livello dei tessuti molli e delle conchiglie dei Bivalvi, l'esistenza di una "impronta" riconoscibile, in termini di tipologia e quantità di elementi presenti nelle conchiglie di organismi della stessa specie cresciuti in ambienti diversi e, con una quota ancora maggiore, nello scarto da venericoltura, dove a questa impronta si somma la particolarità data dalla tipologia di specie dotate di esoscheletro che contribuiscono alla sua differenziazione.

Le conoscenze acquisite, il coinvolgimento degli attori coinvolti nel territorio e l'approfondimento bibliografico hanno portato a individuare un possibile utilizzo del materiale di scarto da venericoltura che risponde alle esigenze e problematiche emerse nel territorio e valorizza contemporaneamente le proprietà caratterizzanti il materiale conchigliare. L'ultima fase del lavoro è stata perciò dedicata allo studio dell'efficacia e la fattibilità dell'utilizzo dello scarto da venericoltura per la costruzione di opere di consolidamento e difesa idraulica delle strutture morfologiche caratterizzanti la laguna di Venezia.

ACRONIMI UTILIZZATI

(in ordine alfabetico)

A: Area della Busa, punto di campionamento in laguna di Venezia da dove provengono le conchiglie di *Venerupis philippinarum* analizzate nella Parte Prima e da dove sono stati prelevati i campioni di *V. philippinarum*, sedimento e scarto analizzati nella Parte seconda e nella Parte Terza.

B: Palude del Monte, punto di campionamento in laguna di Venezia da dove provengono le conchiglie di *V. philippinarum* analizzate nella Parte Prima e da dove sono stati prelevati i campioni di *V. philippinarum*, sedimento e scarto analizzati nella Parte seconda e nella Parte Terza.

CA: Cluster Analysis.

DW: Dry Weight, valore di peso riportato al peso secco del campione.

E: Canale della Perognola, punto di campionamento in laguna di Venezia da dove provengono le conchiglie di *V. philippinarum* analizzate nella Parte Prima e coincidente con il punto di campionamento EC da dove sono stati prelevati i campioni di *V. philippinarum*, sedimento e scarto analizzati nella Parte seconda e nella Parte Terza.

EC: Canale di Perognola dentro alla Concessione, punto di campionamento da cui sono stati prelevati i campioni di *V. philippinarum*, sedimento e scarto analizzati nella Parte seconda e nella Parte Terza.

EF: Canale della Perognola Fuori dalla concessione, punto di campionamento da cui sono stati prelevati i campioni di *V. philippinarum*, sedimento e scarto analizzati nella Parte seconda e nella Parte Terza.

EP: Epatopancreas, ghiandola digestiva di *V. philippinarum*.

FASI BIODISP: Fasi della speciazione geochimica il cui contenuto può essere considerato biodisponibile (date dalla somma di GPH1 + GPH2 + GPH3).

GPH: Geochemical Phase, fase della speciazione geochimica.

H: Valle delle Dolce, punto di campionamento in laguna di Venezia da dove provengono le conchiglie di *V. philippinarum* analizzate nella Parte Prima.

MR: Porto di Levante – laguna di Marinetta, punto di campionamento nel delta del Po da dove provengono le conchiglie di *V. philippinarum* analizzate nella Parte Prima.

PCA: Principal Component Analysis.

s15: sito 15, punto di campionamento in laguna di Marano e Grado da dove provengono le conchiglie di *V. philippinarum* analizzate nella Parte Prima.

s16: sito 16, punto di campionamento in laguna di Marano e Grado da dove provengono le conchiglie di *V. philippinarum* analizzate nella Parte Prima.

SC: Sacca degli Scardovari, punto di campionamento nel delta del Po da dove provengono le conchiglie di *V. philippinarum* analizzate nella Parte Prima.

SED: Sedimento.

SH: Shell, conchiglia di *V. philippinarum*.

ST: Soft Tissue, tessuti molli di *V. philippinarum*.

ST-EP: Soft Tissue privati di Epatopancreas, tessuti molli di *V. philippinarum* a cui è stata asportata la ghiandola digestiva.

V: Verto, punto di campionamento da cui sono stati prelevati i campioni di *V. philippinarum*, sedimento e scarto analizzati nella Parte seconda e nella Parte Terza.

VL: Area della Vallona – laguna di Caleri, punto di campionamento nel delta del Po da dove provengono le conchiglie di *V. philippinarum* analizzate nella Parte Prima.

WW: Wet Weight, valore di peso riportato al peso umido del campione.

ZI: Zona Industriale, punto di campionamento in laguna di Venezia da dove provengono le conchiglie di *V. philippinarum* analizzate nella Parte Prima.

1. PREMESSE

1.1 OBIETTIVI

Il progetto di ricerca è incentrato sullo studio delle influenze ambientali e biologiche sull'uptake di metalli da parte di Molluschi Bivalvi in un sistema di transizione come quello lagunare: l'ampia bibliografia esistente sull'argomento ha fornito il substrato conoscitivo per una riflessione che si è concentrata in particolare sulle caratteristiche delle valve e sulla loro composizione al fine di migliorare la comprensione dei meccanismi alla base dell'incorporazione dei metalli nel carbonato biogenico.

L'obiettivo principale del lavoro è dunque quello di approfondire la conoscenza dei fattori che regolano la presenza di metalli tossici nelle conchiglie dei Bivalvi caratteristici degli ecosistemi lagunari e di valutare la possibilità di spendere tale conoscenza in ambito applicativo. Senza perdere di vista tale obiettivo, si è voluto sviluppare un progetto che sapesse coniugare la ricerca scientifica di base con le esigenze e le problematiche applicative del contesto di riferimento, nell'ottica di multidisciplinarietà che deve caratterizzare il Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali.

Per questa ragione il percorso parte da un necessario approfondimento delle conoscenze nello specifico ambito di studio e si sviluppa intorno a un disegno sperimentale finalizzato alla verifica delle ipotesi precedentemente formulate; le evidenze sperimentali sono quindi utilizzate per individuare un possibile ambito di applicazione delle conoscenze acquisite, di cui viene valutata la fattibilità tecnica e organizzativa anche attraverso il confronto con le diverse realtà coinvolte nel territorio.

Nel percorso si possono individuare dunque le seguenti fasi:

- analisi bibliografica incentrata in particolare su alcuni aspetti quali la struttura della valva e la sua composizione; i meccanismi di incorporazione dei metalli nella struttura carbonatica, le relazioni intercorrenti tra le concentrazioni di metalli presenti nelle valve e quelle rilevabili nell'ambiente;
- formulazione di un design sperimentale opportuno ed efficace atto alla valutazione dell'influenza delle caratteristiche specie-specifiche e sito-specifiche sui meccanismi di incorporazione degli elementi nelle valve;
- approfondimento di evidenze sperimentali emerse nel corso della fase precedente tramite la messa a punto di un nuovo impianto sperimentale mirato a esaminare le relazioni intercorrenti tra i meccanismi di bioaccumulo che coinvolgono i tessuti molli e la struttura carbonatica dei Bivalvi;
- definizione del quadro conoscitivo emerso e valutazione dei possibili risvolti applicativi delle conoscenze acquisite sulla base delle esperienze reperibili in letteratura e delle caratteristiche della realtà territoriale di riferimento;
- coinvolgimento di Enti e imprese del territorio per l'individuazione delle problematiche tecniche, gestionali e operative connesse alla messa in opera dei manufatti costruiti con l'impiego delle conchiglie di Bivalvi provenienti dalla laguna di Venezia;

- messa a punto ed esecuzione di test specifici atti a valutare la fattibilità del progetto applicativo e la sua congruità rispetto alla normativa vigente.

1.2 STRUTTURA DELLA TESI

La tesi è organizzata in una sequenza di tre parti precedute da un'**Introduzione** generale riguardante alcuni aspetti di primaria importanza nell'insieme delle conoscenze acquisite fino ad oggi dalla comunità scientifica sul comportamento degli elementi chimici e in particolare dei metalli tossici sia nell'ambiente esterno (marino e lagunare in particolare) sia all'interno dei sistemi biologici.

La **Parte prima** riguarda in primo luogo l'approfondimento del tema riguardante la composizione elementare delle conchiglie, conseguentemente la definizione e la messa in atto del disegno sperimentale finalizzato alla verifica dell'influenza della componente ambientale e biologica sul livello di incorporazione degli elementi all'interno della matrice cristallina delle conchiglie di Bivalvi prelevati in ambienti di transizione del Nord Adriatico: i risultati ottenuti sono presentati nel capitolo **Confronto fra siti**.

Sulla base delle considerazioni conclusive che chiudono la prima parte e considerando le problematiche emerse dallo studio della realtà territoriale di riferimento, è stato possibile sviluppare un secondo piano sperimentale finalizzato al raggiungimento di due obiettivi principali:

- approfondire lo studio dei processi di bioaccumulo dei metalli nelle conchiglie dei Bivalvi attraverso (1) l'analisi della composizione elementare dei tessuti molli e delle conchiglie delle vongole filippine prelevate nella laguna di Venezia e (2) il confronto di tali composizioni con la concentrazione rilevabile nei sedimenti (**Parte seconda**);
- esaminare le caratteristiche dello scarto da venericoltura, una matrice costituita prevalentemente da materiale carbonatico biogenico, alla luce delle conclusioni emerse dalla seconda parte e a verificarne le possibilità di impiego come materia prima seconda nell'ambito del contesto lagunare (**Parte terza**).

A chiusura del lavoro sono riportate le **Conclusioni** e la **Bibliografia**; Nell'allegato sono invece riportati, per facilitarne la consultazione, i dati ottenuti (**Allegato A**) suddivisi per matrice considerata.

2. INTRODUZIONE

ELEMENTI, BIVALVI E CONCHIGLIE

2.1 ELEMENTI CHIMICI

2.1.1 Elementi come nutrienti e inquinanti

Gli elementi della tavola periodica che non appartengono al gruppo comprendente O, Si, Al, Ca, Na, K, Mg, Ti e P, che insieme costituiscono circa il 99% della crosta terrestre, vengono definiti come elementi in traccia; tra questi vi sono i cosiddetti *metalli pesanti* (come Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, V) che sono invece definiti come quei metalli che presentano una densità atomica superiore a 5 g cm^{-3} , che tendono a comportarsi come cationi e che hanno una spiccata attitudine a formare complessi (ad essi vengono infatti normalmente associati alcuni metalloidi che presentano proprietà simili, come As e Se). Sono particolarmente noti perché, nonostante molti di essi risultino essenziali a basse concentrazioni per gli esseri viventi, sono generalmente correlati a problemi di inquinamento e tossicità.

Nei minerali primari delle rocce ignee, gli elementi in traccia (e tra questi i metalli pesanti) presenti sono stati incorporati a seguito di sostituzioni del reticolo cristallino avvenute durante la fase di cristallizzazione; conseguentemente essi possono essere ritrovati nelle rocce sedimentarie e metamorfiche. Tuttavia, nonostante i metalli siano naturalmente presenti in ambiente, la loro mobilitazione a seguito di attività umane e l'alterazione dei ritmi di rilascio mediante attività industriali o di combustione, ne ha causato l'accumulo in diversi comparti della biosfera e il successivo ingresso nella catena alimentare determinando, in qualche caso, effetti tossici particolarmente rilevanti per gli esseri viventi.

Tutti i metalli pesanti, a causa della loro persistenza, tendono ad accumularsi negli organismi viventi, determinando una varietà di effetti sul breve e sul lungo periodo, caratteristici a seconda del metallo considerato. In generale la tossicità di un metallo o di un suo composto in un sistema biologico dipende da diversi fattori: (1) la dose di metallo, (2) la tossicità intrinseca, (3) la capacità del metallo di legare/legarsi, (4) la specificità del sistema biologico per il trasporto del metallo attraverso un organo target, (5) la biotrasformazione del metallo in una forma derivata e spesso più tossica, (6) l'abilità dell'organismo vivente di sequestrare o espellere il metallo (Zatta *et al.*, 1992).

Nonostante ciò, tutte le specie viventi necessitano di sali metallici nella propria dieta per la propria sopravvivenza e per il funzionamento delle principali attività biologiche. Negli organismi viventi i metalli sono spesso i principali responsabili dell'avanzamento di molte reazioni enzimatiche e metaboliche e sono in grado di assolvere importanti funzioni biologiche, al punto che in molti casi risultano essere essenziali (necessari e non sostituibili) per la crescita e lo sviluppo degli organismi viventi.

Il risultato di una crescente diversificazione evolutiva nell'utilizzo degli elementi in traccia a livello biochimico si rispecchia oggi nella suddivisione dei metalli in "essenziali" e "non essenziali" (Philips & Rainbow, 1989). In generale vengono considerati essenziali per gli organismi viventi gli elementi per cui è stato verificato un ruolo funzionale: tra questi vi sono tradizionalmente elementi costituenti i principali minerali biogenici (Na, Mg, K, Ca...), elementi necessari in tracce (come Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo...) ed elementi necessari solo per alcuni gruppi di organismi o per svolgere funzioni particolari (tra questi I, V, Si, Sn, Se, As, F, Cr, Ni). A seconda del fabbisogno

medio degli organismi è possibile distinguerli in macronutrienti (necessari in quantità superiori a 100 mg al giorno) come Ca, Mg, K, Na; e micronutrienti (necessari in pochi mg o µg al giorno) come Al, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Sn, V, Zn.

2.1.2 Elementi nell'ambiente marino e di transizione

Poiché in assenza di fenomeni significativi di inquinamento, la maggior parte dei metalli pesanti è introdotta nelle acque di mare all'interno dei reticoli cristallini dei minerali silicatici, si suppone che quando la concentrazione di un elemento nel sedimento marino è superiore a quella normalmente trovata nei minerali silicatici da cui esso è composto, la sua presenza in eccesso sia da imputare ad attività antropiche.

Nell'acqua di mare, una soluzione caratterizzata da elettroliti, i metalli sono prevalentemente presenti come ioni positivi, ma possono presentarsi sotto molte forme diverse. Le sostanze immesse nell'ambiente acquatico possiedono infatti dei complessi cicli di trasferimento che possono essere di tipo convettivo, diffusivo, chimico e biologico. A seconda dell'intensità e dell'ampiezza di questi processi si creano delle concentrazioni variabili di metalli nelle diverse componenti dell'ecosistema acquatico.

Una caratteristica dell'ecosistema marino è certamente l'esistenza di una ripartizione dei metalli tra la fase disciolta e quella particellata: nella fase disciolta gli elementi si trovano associati a leganti organici ed inorganici presenti nella soluzione; mentre nella fase particellata gli elementi si possono legare mediante adsorbimento (insieme di reazioni dovute ad attrazioni elettrostatiche deboli che dipendono dalla carica elettrica dello ione, dalla superficie disponibile del particellato e dal coefficiente di distribuzione tra la fase disciolta e quella sospesa) o assimilazione (assunzione da parte di organismi marini di dimensioni microscopiche).

La deposizione del particellato sospeso contribuisce all'arricchimento del sedimento che si comporta come sito di accumulo, ma nello stesso tempo come sorgente di metalli a causa di fenomeni di rimobilizzazione che possono portare a un rilascio nella colonna d'acqua sovrastante. Questi processi sono particolarmente favoriti da variazioni delle condizioni ambientali e da processi biologici e possono costituire un potenziale pericolo di tossicità per gli organismi bentonici detritivori e conseguentemente per altri organismi lungo la catena alimentare.

Gli organismi acquatici mostrano un controllo delle concentrazioni intracellulari di metalli in traccia che differisce completamente da quello delle forme di vita terrestri. Le problematiche che questi organismi si trovano ad affrontare comprendono:

- l'uptake di quantità sufficienti di metalli in traccia essenziali a partire da basse concentrazioni presenti in ambiente;
- la bassa solubilità di alcuni metalli come il Fe(III);
- la necessità di evitare le reazioni indesiderate tra i metalli essenziali e target non specifici che darebbe origine ad effetti tossici;

- la presenza di flussi di metalli in tracce essenziali che superano la richiesta metabolica o di metalli non essenziali che possono avere effetti tossici anche a basse concentrazioni.

Lo sviluppo di sistemi di regolazione negli organismi acquatici ha permesso di superare questi problemi. Questi sistemi comprendono meccanismi specifici per l'uptake, il trasporto, il sequestro e l'escrezione degli elementi. Tra questi vi sono l'esclusione dei metalli nell'uptake; l'escrezione, la produzione di agenti chelanti per ridurre la biodisponibilità del metallo; la sintesi di metallotioneine inducibile per legare i metalli a livello intracellulare; l'incorporazione dei metalli in granuli insolubili di diversi tipi; l'evoluzione di meccanismi per espellere sufficienti quantità di metalli per equilibrare il loro ingresso.

Conseguentemente gli organismi possono venire classificati sulla base delle loro strategie per la gestione dei flussi dei metalli in tracce (Philips & Rainbow, 1989):

- *Regolatori*: organismi che tendono a mantenere le concentrazioni dei metalli nei tessuti all'interno di precisi intervalli pur in un'ampia varietà di concentrazioni ambientali;
- *Regolatori parziali*: specie come la maggior parte dei Molluschi Bivalvi in grado di accumulare metalli in tracce in modo direttamente proporzionale alla concentrazione ambientale;
- *Non regolatori*: organismi come i cirripedi che sequestrano elevate quantità di Zn in forme granulari nelle cellule.

In ogni caso i principali meccanismi con cui gli elementi in traccia sono concentrati nella biosfera marina sono (1) l'ingestione di particolato sospeso dall'acqua, (2) l'ingestione di elementi tramite la loro pre-concentrazione nel cibo, (3) la complessazione dei metalli tramite legami di coordinazione con molecole organiche appropriate, (4) l'incorporazione di ioni metallici in sistemi importanti dal punto di vista fisiologico, (5) l'uptake tramite scambio diretto (Brooks & Rumsby, 1965).

Williams *et al.* (1994) sottolineano come l'accumulo, la mobilità e la biodisponibilità dei metalli nell'ambiente dipenda da un certo numero di processi fisico-chimici: tuttavia il ruolo di questi processi nel governare le dinamiche delle lagune è ancora poco compreso, mentre maggiore è la conoscenza di ciò che avviene negli ambienti marini o di estuario. Certamente uno dei fattori più importanti nel regolare la disponibilità dei metalli in tracce è l'idrologia delle lagune che ne regola altresì la disponibilità di sedimenti, la zonazione della vegetazione e tutta una serie di processi fisici, chimici e biologici.

Un'indicazione sui processi che coinvolgono i metalli in ambienti marini si possono trovare nello studio di Tankéré *et al.* (2000) che mettono a punto un bilancio di primo ordine dei metalli in traccia (Mn, Fe, Pb, Zn, Cu, Ni) nel mare Adriatico seguendo la loro distribuzione durante il progetto EURO-MARGE-AS. Essi osservano come le acque della piattaforma continentale ricevano gli input dai fiumi, nei quali le concentrazioni dei metalli in traccia sono generalmente più alte che nelle acque costiere; inoltre rilevano come la rimobilizzazione operata dal benthos e gli input eolici siano fattori importanti nel determinare la distribuzione dei metalli in tracce nelle acque marine.

Lo studio rileva che il bacino del Nord Adriatico mostra le caratteristiche delle masse d'acqua poco profonde e può essere considerato indipendente dai bacini Centrale e Sud che sono più influenzati dalla variazione stagionale di temperatura e salinità (Tankéré *et al.* 2000). Qui gli input di metalli in tracce provengono principalmente dai fiumi, dall'atmosfera e dalla rimobilizzazione del sedimento; in particolare gli input fluviali sono maggiori degli input atmosferici per tutti i metalli e sono principalmente associati con le particelle. Inoltre la rigenerazione di Mn, Fe, Pb, Zn, Cu e Ni dai sedimenti depositati rappresenta la maggior quota del flusso sedimentario.

Il carbonio organico che raggiunge il fondale viene ossidato successivamente da O_2 , nitrato, MnO_2 e Fe_2O_3 e la rimobilizzazione del Fe e del Mn avviene nei sedimenti (Sundby *et al.*, 1986). Metalli come Pb, Zn, Cu e Ni, che possono essere assorbiti negli ossidi di Fe e Mn, possono essere simultaneamente rilasciati durante la dissoluzione delle fasi solide oppure direttamente dalla decomposizione della materia organica. Questo fenomeno sembra spiegare la elevata concentrazione di metalli in tracce nelle acque profonde in particolare nel periodo estivo.

2.2 MOLLUSCHI BIVALVI

2.2.1 Caratteristiche essenziali

Il *phylum Mollusca* è uno dei più ampi e diversi tra i gruppi tassonomici e comprende oltre 50000 specie di cui circa 30000 vivono in acque salate o salmastre (Gosling, 2008). Gli organismi di queste specie hanno come caratteristica comune originaria il presentarsi con un corpo molle circondato da una sorta di conchiglia secreta dal mantello che può essere esterna, interna o esser stata persa in un secondo momento.

I Lamellibranchi, detti anche Bivalvi o Pelecipodi, contano circa 7500 specie e sono i più tipici Molluschi sessili: in gran parte popolano i fondi sabbiosi o fangosi, talvolta nello spessore delle rocce o del legno, oppure si attaccano al substrato mediante il bisso, che è il secreto filamentoso prodotto dalla ghiandola del bisso, situata in prossimità del piede, e che coagula a contatto con l'acqua (Manente, 2004).

I Bivalvi sono caratterizzati dalla presenza di una conchiglia formata da due valve, da cui il nome, unite dorsalmente e secrete dai due lobi del mantello che a loro volta coprono gli organi interni; l'apertura e chiusura delle valve è controllata dalla presenza di due muscoli adduttori. La scomparsa della radula e del capo, evento evolutivo che ha fondamentalmente portato al delinarsi della classe dei Bivalvi, hanno portato allo spostamento della funzione di trattenere il cibo dalla bocca alle due branchie che insieme ai sifoni (inalante e esalante) costituiscono l'apparato filtrante caratteristico.

2.2.2 Bivalvi come bioindicatori

Con il termine *bioaccumulo* si fa riferimento al fenomeno risultante dall'uptake (assunzione) di composti chimici da parte di un organismo in seguito all'avvenuta esposizione sia attraverso l'acqua (processo definito *bioconcentrazione*) sia attraverso il cibo (Manente, 2004): si tratta dunque della fase finale del meccanismo attraverso il quale una sostanza (solitamente in riferimento a una sostanza inquinante e dunque potenzialmente tossica, nociva o stressante) si concentra all'interno di un organismo.

Nel determinare la cinetica di assunzione che porta al bioaccumulo assumono particolare importanza i rapporti che si instaurano tra il tipo di organismo, la sostanza e i comparti ambientali coinvolti: in quest'ottica diventa fondamentale nello studio di questo tipo di processi considerare le caratteristiche chimico-fisiche dell'elemento/composto coinvolto, la sua biodisponibilità nella matrice ambientale in cui è presente (intesa come la presenza in una forma capace di attraversare le membrane biologiche) oltre che la sua bioaccessibilità (intesa come la somma dei processi che rendono un elemento/composto disponibile per l'assorbimento).

D'altra parte le caratteristiche intrinseche dell'organismo risultano determinanti nel regolare l'instaurarsi di un equilibrio dinamico tra la fase di uptake e la fase di rilascio e/o perdita e/o escrezione in cui a uno stabilizzarsi delle concentrazioni della sostanza nelle matrici ambientali corrisponde parallelamente uno stabilizzarsi delle concentrazioni nei tessuti dell'organismo, in risposta a meccanismi tossico-cinetici. E' proprio in virtù di questi

meccanismi che è possibile utilizzare alcuni organismi (quelli rispondenti a una serie di caratteristiche essenziali) come bioindicatori di contaminazione ambientale.

Si definisce, infatti, *bioindicatore* qualsiasi organismo, anche eventualmente considerato per una sua singola parte o funzione, in grado di fornire una risposta e/o un'indicazione sulla qualità dell'ambiente in cui vive e di cui fa parte (Manente, 2004): la condizione essenziale perché un organismo possa essere considerato un indicatore di un avvenuto mutamento della qualità dell'ambiente o di una parte di esso è che lo studio di certe sue reazioni, siano esse morfologiche, fisiologiche o biochimiche, possano essere identificate quali parametri significativi, in quanto sensibili a un avvenuto inquinamento. La diffusione nell'utilizzo di questi strumenti è legata al fatto che da sole le tecniche di monitoraggio di parametri chimico-fisici non offrono una visione completa del livello di inquinamento o di stress dell'ecosistema e non prendono in considerazione le interazioni che hanno luogo tra i vari comparti ambientali e che possono influire sul biota.

La recente legislazione europea per la protezione dell'ambiente marino, in particolare la Marine Strategy Framework Directive (MSFD, 2008/56/EC), fa proprio questo concetto nel richiedere un approccio basato non solo sulla chimica analitica, ma anche sulla valutazione degli effetti sull'ecosistema; anche la Decisione della Commissione (2010/477/EU) sui criteri e sugli standard metodologici per un *Good Environmental Status* per le acque marine, enfatizza la necessità di valutare e di mantenere all'interno di limiti accettabili gli effetti biologici dei contaminanti. Queste indicazioni sottolineano la necessità di prevedere un utilizzo integrato delle analisi chimiche e delle tecniche biologiche, in modo da stabilire il legame tra i livelli di inquinanti e i loro effetti dannosi sugli ecosistemi marini (Bellas *et al.*, 2014).

I Molluschi Bivalvi, e in particolare le specie tipiche degli ambienti di transizione, risultano particolarmente adatti a svolgere tale funzione grazie alla loro distribuzione universale, alle loro abitudini sedentarie e da filtratori, alla loro abbondanza e all'elevata capacità di accumulare metalli (Girón-Pérez, 2010); le concentrazioni che si rilevano nei tessuti dei Bivalvi, inoltre, possono essere considerate misure integrate nel tempo della biodisponibilità dei metalli analizzati nell'ambiente naturale, anche se possono essere sensibili a fluttuazioni stagionali (Weng & Wang, 2014). Come è riportato da Zatta *et al.* (1992), la potenzialità del monitoraggio biologico sta nel fatto che l'accumulo di metalli tossici negli organismi acquatici è talora 10^3 - 10^6 volte più alto rispetto all'ambiente acquatico dove gli animali sono raccolti, condizione rispettata nel caso dei Bivalvi.

Cambiamenti sia a livello dell'ambiente esterno sia nelle condizioni biologiche degli organismi possono tuttavia determinare una variazione dei metalli presenti nei loro tessuti; è noto, ad esempio, che le condizioni idrodinamiche e fisico-chimiche negli ambienti di transizione hanno un effetto sulle dinamiche biogeochimiche dei metalli in traccia: uno degli aspetti da tenere in considerazione, tra gli altri, è la distribuzione dei metalli tra la fase disciolta e la fase particolata. D'altra parte, i processi biologici contribuiscono alle variazioni delle concentrazioni di metalli nei Bivalvi: in particolare l'assimilazione è influenzata dal ciclo riproduttivo e dalle fluttuazioni di peso degli organismi.

Ne risulta che per comprendere appieno i meccanismi di incorporazione dei metalli nei tessuti dei Bivalvi è importante studiare specie differenti e provenienti da ambienti caratterizzati da diversi livelli di contaminazione ambientale in modo da capire l'influenza dei fattori ambientali e biologici nel determinare le concentrazioni dei metalli nei tessuti dei Bivalvi (Weng & Wang, 2014); l'identificazione di una specie sentinella diffusa in contesti geografici differenti può d'altra parte essere utile nel fornire un pattern geografico della frazione biodisponibile degli inquinanti, contribuendo all'identificazione dei trend temporali nell'inquinamento costiero (Bellas *et al.*, 2014).

Gli invertebrati marini che sono esposti a un range di concentrazioni di metalli in tracce in fase disciolta e particolata nel loro ambiente presentano livelli di uptake e accumulo di questi metalli nei differenti tessuti che dipendono da un certo numero di fattori come la speciazione dei metalli e la biodisponibilità e dalle differenti strategie adottate dagli organismi per affrontare l'esposizione ai metalli, incluso l'accumulo tramite proteine che legano i metalli o l'escrezione (Koschinsky *et al.*, 2014). Si è altresì verificato (Paul-Pont *et al.*, 2010) come organismi che vivono in ambienti contaminati possono modificare le loro caratteristiche fisiologiche e biochimiche che a loro volta interferiscono con la capacità di "gestire" i metalli, portando a modifiche nei livelli di bioaccumulo in questi organismi rispetto a quelli che vivono in ambienti non inquinati.

E' importante sottolineare che le differenze specie specifiche nell'accumulo di metalli non caratterizzano solo le specie di Molluschi Bivalvi: Boalt *et al.* (2014), ad esempio, le mettono in luce in due specie di pesci (l'aringa e il pesce persico) e sottolineano come le differenze tra le specie possono essere dovute a una serie di fattori quali i differenti processi di uptake e di eliminazione, la diversa posizione nella catena trofica, il comportamento e/o l'utilizzo dell'habitat. Inoltre l'importanza dei fattori biotici intrinseci, come i diversi tassi con cui avvengono i processi fisiologici tra cui la crescita o un tasso di uptake maggiore come conseguenza del tasso di filtrazione, è considerata uno dei fattori che spiegano come il contenuto di metalli vari tra specie appartenenti allo stesso habitat.

C'è un sostanziale accordo nel mondo scientifico sul fatto che gli andamenti nei tessuti molli degli organismi Bivalvi possono essere utili per capire come avviene l'accumulo di metalli nei comparti biologici marini e per definire il livello di contaminazione dell'ambiente: prova ne sia che continuano ad essere pubblicati moltissimi studi che prendono in esame il livello di concentrazione dei metalli nei tessuti molli (si citano a titolo di esempio tra gli studi più recenti Alfonso *et al.*, 2013; Belabed *et al.*, 2013; Besada *et al.*, 2014; Bogdanovic *et al.*, 2013; Bosse *et al.*, 2014; Dahms *et al.*, 2014; Di Salvatore *et al.*, 2013).

Tuttavia Demina (2011) sottolinea come, mentre la maggior parte degli studi consideri, nel caso dello studio degli elementi in traccia nei Molluschi Bivalvi, solo i tessuti molli, una corretta stima dell'accumulo di elementi in traccia nella biomassa dell'organismo dovrebbe essere basata sul contenuto di elementi in traccia nell'intero organismo. Uno studio che coinvolga anche la conchiglia deve però certamente tenere presente che questo comparto tende ad accumulare i metalli più lentamente in quanto l'incorporazione del metallo può avvenire attraverso il legame con il periostraco (strato esterno organico) o attraverso il sequestro del metallo nella struttura cristallina carbonatica mediato dal fluido extrapalleale (Mauri & Baraldi, 2003).

Ciò nonostante anche l'incorporazione attiva di differenti tipi e concentrazioni di elementi minori o in traccia durante la crescita della conchiglia del Bivalve è influenzata da una serie di fattori che includono differenze tassonomiche e stadio ontogenetico, concentrazione degli elementi nelle matrici ambientali e variazioni di queste in seguito a cambiamenti ambientali o stagionali, salinità e temperatura dell'ambiente acquatico e mineralogia della conchiglia (Huanxin *et al.*, 2000): ne risulta che anche la conchiglia può essere considerata una matrice interessante per la valutazione dei livelli di bioaccumulo.

2.3 CONCHIGLIA

La conchiglia è depositata per tutto l'arco della vita di un Mollusco e la deposizione intermittente di pigmenti che ne determina la colorazione e il disegno è dunque una sorta di diario biochimico del singolo organismo *from the cradle to the grave*. In particolare il disegno delle conchiglie è una rappresentazione grafica, nel tempo, dell'attività secretoria di una serie di cellule poste sul bordo del mantello. Il colore di fondo è prodotto dall'intero insieme di cellule, le bande dall'attività specifica di gruppi di cellule spesso accuratamente localizzate. Dove l'attività di questi gruppi è ciclica ne risultano delle macchie; dove l'attività si propaga in alto e in basso sul bordo del mantello o dove si diffonde da un punto risultano disegni a zig-zag o incavi a forma di V (Comfort, 1959).

I pattern di pigmentazione di solito riguardano uno o due colori (oltre il bianco), almeno alla luce del sole; i pigmenti includono melanina, pirroli e porfirine, ma non sono stati ancora identificati tutti. I pattern di pigmentazione sulle conchiglie di mare variano da molto semplici a estremamente complessi: alcune conchiglie appaiono completamente bianche (il colore naturale del carbonato di calcio) o completamente colorate, altre mostrano delle strisce (parallele o perpendicolari all'asse di crescita), forme a V, triangoli, onde, punti, macchie o alcune combinazioni di queste. Alcuni pigmenti possono non essere visibili alla luce del sole ma solo, per esempio, con la luce UV: così le specie non pigmentate o completamente colorate potrebbero presentare un pattern più complesso di quanto non appaia ad occhio nudo.

Molti autori hanno accettato l'idea che i pattern di pigmentazione non abbiano una funzione primaria e che l'elevato polimorfismo intra- e inter-specifico sia un segnale della bassa pressione evolutiva; tuttavia l'idea che i pattern di pigmentazione non siano funzionali sembra strana se si pensa alla loro complessità e l'investimento energetico che richiedono (Bauchau, 2001).

Un'ipotesi è che i pigmenti siano prodotti di scarto del metabolismo, secreti nella conchiglia per smaltirli. Quest'idea popolare sembra aver origine da Comfort (1959) che afferma che nella maggior parte dei Molluschi primitivi, i pigmenti della conchiglia sono quasi certamente secreti con lo scopo di smaltimento, che essi derivino dalla dieta o da residui metabolici non processabili; ma non sono forniti né altri dettagli né riferimenti bibliografici. Ciò nonostante l'ipotesi della pigmentazione come strumento per lo smaltimento dei rifiuti metabolici non spiega il motivo per cui la pigmentazione è spesso così complessa. Inoltre i Molluschi sono dotati di un sistema escretorio ben sviluppato e non è chiaro come mai alcuni prodotti metabolici debbano essere, ciò nonostante, depositati nella conchiglia.

In alcune specie la concentrazione di pigmenti nella conchiglia risulta correlata con la concentrazione di clorofilla nel cibo disponibile nell'habitat; tuttavia anche se i pigmenti sono ottenuti dal cibo la loro funzione primaria non è necessariamente di scarto. Al contrario, la loro presenza nella conchiglia (opposta al rilascio nell'ambiente) implica che debba esistere qualche altra funzione: ciò è in linea con la tendenza generale negli animali che è quella di ottenere i pigmenti dalla dieta, qualsiasi sia la funzione del loro pattern di pigmentazione. Un'altra ipotesi è che la pigmentazione serva per rafforzare la conchiglia; alcuni pigmenti sono effettivamente associati alla conchiolina, componente della matrice organica del materiale della conchiglia.

La diversità dei pattern di pigmentazione all'interno di una popolazione può essere spiegata, data la natura complessa del processo di pigmentazione, da piccole variazioni nelle condizioni iniziali, nelle regole e/o nei parametri. Nel caso dei Bivalvi inoltre, la frequente simmetria a specchio dei complessi pattern di pigmentazione tra le due valve necessita di una spiegazione: senza nessun tipo di meccanismo di controllo ci si aspetterebbe che i pattern delle due valve divergessero a causa di piccole, inevitabili fluttuazioni. Infine i Molluschi potrebbero non avere nessun controllo sui dettagli dei pattern finali, ma solo sulla loro presenza e struttura generale.

Bauchau (2001) formula l'ipotesi che il pattern di pigmentazione sia intimamente collegato al processo di crescita e più specificatamente al meccanismo che controlla la crescita della conchiglia con l'obiettivo di ottenere una forma ottimale (ad esempio la simmetria nei Bivalvi). Il mantello risulta in grado di regolare la deposizione di nuovi pigmenti in maniera continua rispetto a quelli precedentemente depositati sulla conchiglia attraverso un sistema che si presume sfrutti la "memoria" cellulare o la "lettura" del pattern di pigmentazione precedente mediante un sistema chemorecettivo; il pattern di pigmentazione sarebbe inoltre collegato alla regolazione dello sviluppo della crescita della conchiglia stessa (Bauchau, 2001).

Il processo di formazione della conchiglia dei Molluschi coinvolge processi fisiologici, biochimici e cristallografici che determinano la formazione di una struttura altamente organizzata di carbonato di calcio inserita in una matrice organica. Gli ioni utilizzati nella calcificazione (soprattutto Ca^{2+} , HCO_3^-) sono trasportati verso il fluido extrapalleale (EPF) attraverso vie attive e passive e la loro incorporazione nella matrice dipende direttamente dalla concentrazione nell'EPF all'altezza del sito di cristallizzazione, concentrazione che è a sua volta controllata dall'emolinfa, dai tessuti del mantello e in alcuni casi dall'equilibrio diretto con il mezzo esterno (Puente *et al.*, 1996; Beer *et al.*, 2011).

2.3.1 Struttura e composizione

Per capire qual è il meccanismo con cui gli elementi si dispongono nelle conchiglie dei Bivalvi è necessario comprendere la differenza tra l'incorporazione dei metalli nel carbonato inorganico e in quello biogenico: una delle differenze più importanti è data dal fatto che i processi di biomineralizzazione sono generalmente mediati da matrici organiche solubili e insolubili che producono una mineralogia specie-specifica e strutture della conchiglia caratteristiche a scala micro- e nano- metrica (Shirai *et al.*, 2014).

Le conchiglie dei Bivalvi, oltre al CaCO_3 , contengono tra l'1 e il 5% in peso di materiale organico: il carbonato dunque si deposita in una matrice organica costituita da conchiolina, un insieme di proteine complesse. La conchiglia è costituita da 3 strati: 1) uno strato sottile e corneo, il periostraco, costituito da conchiolina, spesso molto ridotto a causa dell'abrasione meccanica, della presenza di organismi incrostati, parassiti o malattie; 2) uno strato prismatico intermedio di aragonite o calcite, una forma cristallina del carbonato di calcio; 3) uno strato calcareo interno, che può presentarsi opaco o madreperlaceo a seconda della specie (Gosling, 2008).

I Bivalvi costruiscono le loro conchiglie a partire da carbonato di calcio amorfo che costituisce il precursore dell'aragonite (e talvolta vaterite). Il trasporto di materiali al sito di biomineralizzazione avviene attraverso vescicole (molto probabilmente prodotte da cellule specializzate) che racchiudono il calcio carbonato e le

molecole organiche idrofiliche che inducono attivamente la mineralizzazione. Altre molecole organiche sono secrete e vanno a formare un'ampia rete tra le vescicole che probabilmente fornisce il materiale grezzo per la formazione dei foglietti intralamellari. La cristallizzazione del carbonato di calcio avviene rapidamente all'interno delle vescicole ricoperte dalla membrana organica, seguita dall'istantaneo allineamento cristallografico dei nanocristalli attraverso le membrane della vescicola. Durante questo processo tali membrane sono conservate e incorporate all'interno dei cristalli (Jacob *et al.*, 2008).

Il fluido extrapalleale contiene tutti i componenti coinvolti nella biomineralizzazione, ma anche altri costituenti inclusi i metalli in tracce assimilati mediante l'ingestione o direttamente dalla colonna d'acqua: per questa ragione è possibile che un metallo assimilato dall'organismo possa essere incorporato nella conchiglia durante la crescita. Esistono potenzialmente due siti per il legame dei metalli in tracce: il primo è l'assorbimento nella matrice organica risultante dal processo di assorbimento passivo dal fluido extra-palleale; il secondo è dato dalla sostituzione isomorfica in cui i metalli pesanti sostituiscono il calcio e sono attivamente incorporati nella struttura cristallina negli strati annuali (Lingard *et al.*, 1992).

2.3.2 Conchiglie come indicatori

La presenza di metalli nel fluido extra-palleale può dipendere sia da processi passivi sia da processi attivi come il trasporto mediato da pompe ioniche: nel primo caso è possibile individuare una correlazione tra il contenuto di ioni metallici nell'acqua di mare e i livelli incorporati nelle conchiglie (Bourgoin, 1990). Nel caso in cui le relazioni tra le condizioni ambientali e le concentrazioni di elementi nei Bivalvi sono poco consistenti, sono probabili gli effetti dovuti alla specie o al singolo organismo, per esempio mediante l'attività metabolica (Putten *et al.*, 2000); gli effetti indiretti delle condizioni ambientali possono essere altresì importanti, influenzando ad esempio sullo stato di salute complessivo dell'organismo.

Secondo Al-AAsm *et al.* (1998) i Molluschi incorporano nelle conchiglie i metalli in tracce presenti in ambiente a causa della loro elevata tolleranza biologica e/o della limitata eliminazione di questi metalli e per questa ragione essi affermano che le conchiglie possono essere considerate degli integratori temporali e dei registratori della presenza di metalli, addirittura migliori dei tessuti molli. L'analisi delle conchiglie sembra presentare, inoltre, una serie di vantaggi pratici rispetto all'analisi dei tessuti (Cravo *et al.*, 2002):

- le conchiglie sono facilmente identificabili e sono facili da raccogliere, pulire e conservare;
- i metodi analitici sono standardizzati più facilmente;
- le concentrazioni dei metalli sono più basse e la varianza è più piccola, permettendo una più precisa inferenza statistica;
- le conchiglie integrano la concentrazione degli elementi per tutta la vita dell'animale;
- la conservazione dei metalli dopo la morte dell'animale può essere utilizzata per capire quale fosse la concentrazione nel passato.

In particolare, se le conchiglie dei Molluschi incorporano elementi in traccia durante la vita dell'organismo e li conservano anche dopo la loro morte è dovuto al fatto che gli elementi incorporati nella matrice cristallina

possono essere rimossi solo tramite dissoluzione o diffusione e quest'ultima avviene troppo lentamente per cambiare significativamente le concentrazioni dopo l'incorporazione nella conchiglia (Dermott & Lum, 1986). Stureson (1978) osserva, a questo proposito, che la perdita di metalli dalla conchiglia si può considerare trascurabile dato che una volta incorporati nella matrice cristallina o nella struttura organica i metalli potrebbero essere eliminati da una sorta di processo diffusivo nello stato solido, un processo troppo lento per poter essere di qualche significato durante la vita di un organismo bivalve, ma che certamente in seguito determina una perdita estremamente lenta nell'arco del tempo.

Inoltre, poiché la conchiglia riflette l'accumulo sul lungo periodo (Yap *et al.*, 2003), è più probabile che il contenuto di elementi rappresenti un valore integrato del livello di contaminazione sopportato dall'organismo nel tempo (Ravera *et al.*, 2003). Questo aspetto potrebbe far ritenere la conchiglia un indicatore maggiormente affidabile rispetto ai soft tissue del livello di inquinanti biodisponibili in un determinato ambiente, oltre che del complessivo livello di stress ambientale cui è sottoposto l'organismo.

Gli studi in laboratorio hanno confermato che, nonostante il contenuto nelle conchiglie sia solitamente inferiore a quello che si rinviene nei tessuti molli, è possibile considerare l'aumento di alcuni metalli nelle conchiglie una risposta all'aumento delle concentrazioni del metallo nei mezzi di crescita (Cravo *et al.*, 2004). D'altra parte sembra possibile mettere in relazione la composizione della conchiglia in termini di metalli in tracce anche con le variazioni che si registrano nei diversi siti di campionamento (Huanxin *et al.*, 2000).

3. PARTE PRIMA

LA COMPOSIZIONE ELEMENTALE DELLE CONCHIGLIE

3.1 ASPETTI GENERALI E INTRODUTTIVI

Nell'ottica di sviluppare il progetto riguardante lo studio della capacità di bioaccumulo di metalli nelle valve di Molluschi, la prima fase del lavoro è stata dedicata all'approfondimento delle tematiche riguardanti:

- la struttura della valva e la sua composizione;
- le modalità di inclusione dei metalli all'interno della struttura cristallina;
- le relazioni intercorrenti tra le concentrazioni rinvenibili nell'ambiente e quelle determinabili nelle valve.

In particolare, dopo aver preso in esame le caratteristiche generali dei Bivalvi, sono state approfondite le differenze di struttura e composizione tra lo strato interno madreperlaceo costituito da aragonite e lo strato esterno della valva generalmente composto di calcite, a sua volta ricoperto dallo strato protettivo esterno (periostraco); inoltre, si è cercato di reperire informazioni riguardo la matrice organica all'interno della quale si accrescono i cristalli di carbonato di calcio, nonché sui composti organici che fungono da pigmenti e che vanno a costituire le complesse decorazioni della valva.

In seguito, la raccolta di lavori riguardanti lo studio del contenuto di metalli nelle valve di diversi organismi appartenenti alla classe dei Molluschi Bivalvi ha permesso di evidenziare le tipologie di elementi e le quantità presenti nei tessuti delle diverse specie prese in esame. Si è notato come le concentrazioni possano variare a seconda del tipo di matrice che si va ad analizzare (tessuti molli, epatopancreas, valve, branchie, bisso etc.), della tipologia di organismo (specie, habitat, dimensioni) e delle condizioni ambientali cui è sottoposto.

Quindi si è cercato di delineare le relazioni esistenti tra le concentrazioni di specie inorganiche presenti in ambiente (in particolare nella colonna d'acqua e nei sedimenti) e le quantità che si rinvenivano nelle conchiglie sulla base dei risultati ottenuti da altri gruppi di ricerca. È emerso che, in molti casi, tali relazioni sussistono in ambiente (sia di acqua dolce che di acqua salata) e sono significative per diverse tipologie di organismi e di elementi. Inoltre, in alcuni casi, tali relazioni sono state evidenziate da prove di laboratorio messe a punto con il preciso scopo di meglio comprendere il meccanismo di accumulo nelle valve e nei tessuti molli di organismi esposti a concentrazioni elevate di inquinanti.

I numerosi studi esaminati, dunque, hanno messo in luce come le caratteristiche tipiche dei Molluschi Bivalvi li rendano adatti ad essere utilizzati come bioindicatori. In particolare, il fatto che le valve siano in grado di registrare e conservare nella loro struttura i livelli di inquinanti presenti in ambiente e alcuni parametri geochimici, come sottolineato dagli studi paleoclimatici (Jacob *et al.*, 2008), essendo tra l'altro meno soggette alla variabilità intrinseca che si registra invece nei tessuti molli, suggerisce che le caratteristiche di questa matrice di carbonato di calcio possano anche permettere di "bloccare" per lungo tempo gli inquinanti all'interno del reticolo cristallino evitando il rischio di rilasci.

D'altra parte, si nota che in generale le concentrazioni rilevabili a livello di tessuti molli, considerati sia nella loro totalità che per singolo tessuto, sono più elevate rispetto a quelle che si registrano nelle valve: ciò evidenzia una maggiore affinità dei metalli per i tessuti molli e la necessità di approfondire quali siano le condizioni fisiologiche e ambientali che favoriscono l'accumulo a livello delle conchiglie. Inoltre, si è visto come all'interno delle valve alcuni ioni metallici tendono ad accumularsi preferenzialmente nell'aragonite o nella calcite per ragioni legate principalmente alle loro dimensioni e alla tipologia di legami che vanno a creare.

Non si deve dimenticare però che gli ioni metallici, oltre a sostituirsi al calcio nella struttura dell'aragonite o della calcite, si possono anche legare alle proteine nella matrice organica (Markich *et al.*, 2002): per questo motivo si deve porre particolare attenzione alla scelta del metodo di trattamento dei campioni, affinché la disgregazione permetta la completa dissoluzione dei composti organici e la liberazione degli ioni metallici complessati.

3.1.1 Piano sperimentale

Alla luce delle informazioni raccolte è stato messo a punto un piano sperimentale quanto più possibile efficace nell'intento di determinare, in questa prima fase, l'influenza delle forzanti biologiche e di quelle ambientali nel determinare la composizione elementale delle conchiglie dei Bivalvi. In questa fase, infatti, si è proceduto all'analisi delle concentrazioni dei metalli pesanti Cr, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd e Pb a cui sono stati aggiunti altri elementi (quali Li, Mg, Al, V, Mn, Ga, Sr, Ba e U) che si ritiene possano risultare utili per la comprensione dei processi e delle dinamiche che coinvolgono la conchiglia dei Bivalvi.

Tra le specie tipiche dell'ambiente lagunare veneziano, è stata scelta quella maggiormente adatta allo sviluppo delle fasi successive della ricerca: *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). Questo Bivalve risulta ampiamente distribuito nelle acque della laguna, sia nelle zone naturali che coltivate e supporta una produzione di pescato commerciabile di particolare rilievo; inoltre, è stata già oggetto di studio per quanto riguarda la valutazione del bioaccumulo di inquinanti sia organici che inorganici.

Si è stabilito di confrontare la composizione elementale delle valve della specie *V. philippinarum*, relative a campioni provenienti dalla laguna di Venezia e da altre due aree vicine in cui avviene la coltivazione di questa specie, quali il delta del Po e la laguna di Marano e Grado, con l'obiettivo di verificare se le caratteristiche ambientali sito-specifiche abbiano un'influenza sulla bioaccessibilità e sulla biodisponibilità degli elementi per la specie considerata e se questa influenza si rifletta sulla composizione delle conchiglie.

L'assunto di partenza per questo confronto tra individui della stessa specie provenienti da aree diverse è che la variabilità intraspecifica dovuta a fattori biogeografici sia sufficientemente bassa da non mascherare il contributo dato dai fattori ambientali alla diversificazione della composizione della conchiglia: esso si può ritenere rispettato dal momento che le popolazioni di *V. philippinarum* provenienti dall'Alto Adriatico presentano una bassa variabilità genetica e derivano da una prima introduzione volontaria effettuata con un numero limitato di campioni che hanno molto probabilmente dato luogo al cosiddetto "effetto fondatore" (Chiesa *et al.*, 2011).

La combinazione dei risultati di questa indagine con quelli riportati in letteratura e derivanti da lavori precedentemente svolti permetterà di avere una prima conferma riguardo l'influenza delle forzanti biologiche e ambientali sulla composizione della conchiglia dei Bivalvi riportata in letteratura ed eventualmente, sull'entità di questa influenza. Sulla base di queste informazioni verrà delineata una seconda fase di lavoro incentrata sull'approfondimento del processo di bioaccumulo nelle conchiglie rispetto a quello caratterizzante i tessuti molli dei Bivalvi e ai livelli di contaminazione rilevabili nelle matrici ambientali.

3.1.2 Metodi di trattamento e analisi delle conchiglie

L'individuazione dei metodi di trattamento e analisi dei campioni più opportuni da utilizzare nell'esecuzione delle prove in laboratorio è stata operata mettendo a confronto le metodiche utilizzate nei lavori reperibili in letteratura ed evidenziandone i punti di forza e gli aspetti da migliorare.

In particolare sono stati selezionati i lavori aventi obiettivi simili a quelli di questa prima fase del presente progetto di ricerca (Dermott & Lum, 1986; Fuge *et al.*, 1993; Al Aasm *et al.*, 1998; Giusti & Zhang, 2002; Markich *et al.*, 2002; Lazareth *et al.*, 2003; Ravera *et al.*, 2003; Wepener *et al.*, 2008; Takesue *et al.*, 2008) e sono stati esaminati con attenzione i diversi metodi di pulizia del campione, la procedura di frantumazione delle valve, le differenti tipologie di attacco acido in relazione alle caratteristiche dello strumento utilizzato.

La fase di determinazione del metodo più adatto per la rottura delle valve è stata particolarmente delicata: in primo luogo perché è stato necessario porre particolare attenzione alle problematiche legate alla contaminazione dei campioni; in secondo luogo perché nessuno degli studi precedenti esaminati descrivevano con sufficiente precisione la tecnica utilizzata per ridurre il campione alle dimensioni ottimali per la successiva fase di disgregazione. Per queste ragioni è stato fondamentale il confronto con il personale dell'officina dell'Università Ca' Foscari di Venezia che ha collaborato alla messa a punto e si è occupato della costruzione dello strumento in teflon presentato in **Figura 1**.

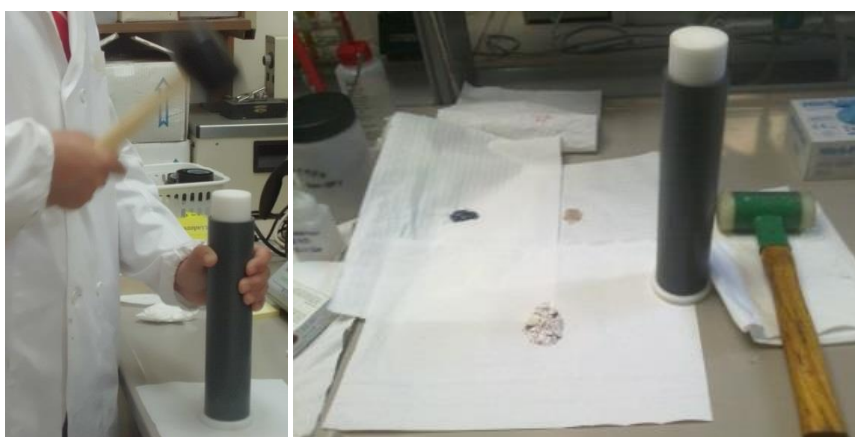


Figura 1: Il sistema di frantumazione della valva tramite lo strumento in teflon progettato appositamente per questo lavoro.

Si tratta di un sistema che si può definire “a pistone” o “a stantuffo” consistente in un cilindro a battente in teflon poggiante su un cursore, che viene azionato tramite un martello; il sistema è dotato di tappo sul fondo in

modo da evitare la perdita del campione durante la frantumazione e tale da permettere la raccolta dello stesso una volta che è stata raggiunta la granulometria desiderata. Lo strumento è lavabile facilmente sotto il getto corrente e poi sciacquato con acqua Milli-Q, acqua deionizzata con il sistema Milli Q (Millipore, Milano) d'ora in avanti indicata solamente come "acqua Milli-Q"; particolare attenzione deve essere posta nell'eliminare le particelle più fini che possono rendere difficoltoso il movimento del sistema a pistone.

Sulla base delle informazioni raccolte e considerando le esigenze specifiche dello studio, è stato individuato un protocollo operativo per il processamento delle valve sia nella fase di campionamento e stoccaggio (*e.g.* distacco di eventuali parassiti, mantenimento in ghiaccio, acquisizione parametri ambientali sito-specifici), che di preparativa (*e.g.* pulitura superficiale, strofinamento profondo delle valve, stato di umidità, diametro massimo delle particelle di frantumazione, tipologia di attacco acido più adatta e meno interferente), così come di procedura analitica più idonea (*e.g.* verifica delle concentrazioni degli elementi chimici selezionati e scelta dello strumento).

Il metodo di trattamento e analisi dei campioni messo a punto a seguito di questa fase di approfondimento prevede le fasi seguenti:

1. scongelamento dei campioni conservati in frigo a -20 °C;
2. determinazione delle dimensioni dei campioni con calibro;
3. separazione delle parti molli dalla valva con bisturi;
4. pulitura delle valve con una spazzola con setole di plastica ed eventuale rimozione di organismi epibionti tramite bisturi, sotto getto d'acqua;
5. risciacquo delle valve con acqua deionizzata;
6. essiccazione delle valve in stufa a 80 °C per 48 ore;
7. determinazione del peso secco con bilancia analitica;
8. separazione delle due valve e conservazione della valva destra;
9. frantumazione della valva sinistra tramite lo strumento a battente in teflon in modo da ottenere un campione di granulometria non superiore ai 3 mm (**Figura 2**);
10. prelievo di un'aliquota di circa 0,15 g di campione;
11. disgregazione dell'aliquota tramite digestore a microonde dopo l'aggiunta di 4 mL di acqua Milli-Q, 4 mL di HNO₃ suprapur, 4 mL di H₂O₂ suprapur;
12. analisi multi elementale mediante spettrometria di massa con sorgente al plasma accoppiato induttivamente (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS).



Figura 2: Esempio di campioni di valve dopo la fase di frantumazione.

In particolare la procedura di pulizia descritta al punto 4 è stata svolta con particolare cura, cercando di evitare il distacco di scaglie di periostraco nelle parti più vecchie della conchiglia (vicino all'ombone), come suggerito dalla letteratura (Dermott & Lum, 1986).

I contenitori utilizzati per lo stoccaggio, la conservazione e l'estrazione dei campioni e delle soluzioni sono in vetro Pirex, polietilene ad alta densità (HDPE, High-Density PolyEthylene) e teflon e sono stati trattati prima dell'uso con soluzione 0,1 M di HNO_3 per 48 ore e sciacquati con acqua Milli-Q al fine di solubilizzare e eliminare i contaminanti eventualmente presenti.

Tale procedura è stata quindi utilizzata per il trattamento e l'analisi di campioni prelevati in precedenti campagne di campionamento nelle aree del delta del Po, della laguna di Venezia e della laguna di Marano e Grado (specie: *V. philippinarum*) i cui risultati sono presentati nella sezione **3.2 Confronto tra siti**.

3.1.3 L'influenza della specie-specificità

Al fine di dimostrare il grado di influenza delle caratteristiche specie-specifiche sui meccanismi di incorporazione degli elementi nella valva e come questa influenza si riflette sulla sua composizione elementare si è scelto di riportare qui il confronto tra due specie, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) e *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (**Figura 3**), operato dallo stesso gruppo di ricerca in cui si è sviluppato questo progetto di dottorato, nel corso di uno studio atto a verificare gli esiti del trattamento di BIO₂REMEDIATION, una innovativa tecnologia di trattamento *in situ* di sedimenti contaminati mediante aerazione forzata, che è stato applicato nell'area del bacino vecchio dell'Arsenale di Venezia (**Figura 4**).



Figura 3: Esempio di campioni di *M. galloprovincialis* e *C. gigas* dopo la fase di pulizia.

La tecnica agisce tramite l'introduzione di una grande quantità di ossigeno all'interfaccia superficiale tra sedimento e colonna d'acqua allo scopo di stimolare la crescita delle comunità batteriche aerobiche e di creare un ambiente adatto alla biodegradazione degli inquinanti organici, al fine di costituire, tra l'altro, un nuovo "primo" anello della catena trofica (Manente & Ravagnan, 2012). Nell'ambito del progetto di ricerca coordinato dal Prof. Ravagnan in collaborazione con il CORILA (Consorzio per il coordinamento delle ricerche inerenti al sistema lagunare veneziano), è stato verificato il grado di contaminazione presente nelle conchiglie di *M. galloprovincialis* e *C. gigas* al termine del trattamento, mediante una procedura sviluppata e messa in opera dalla scrivente di cui si riporta qui una parte dei risultati già pubblicati nel Rapporto di ricerca "Progetto Arsenale: gli esiti della BIO₂REMEDIATION" nel 2012.

Nonostante esistano molti dati reperibili in letteratura riguardanti le differenze nell'accumulo e nella distribuzione degli elementi nei vari tessuti dei mitili e delle ostriche, infatti, in pochi casi si mettono a confronto le concentrazioni in individui cresciuti nella stessa stazione e dunque nelle medesime condizioni fisico-chimiche. I risultati dello studio qui riportati invece, permettono di comprendere i diversi livelli di bioaccumulo tra le due specie e forniscono un mezzo per verificare l'esistenza di vie biochimiche diverse che caratterizzano il metabolismo degli elementi all'interno degli organismi (Martincic *et al.*, 1984).

Le analisi sono state condotte sui campioni di *C. gigas* e *M. galloprovincialis* prelevati nel luglio 2010 nel bacino dell'Arsenale Vecchio, situato nell'estremità orientale della città di Venezia (**Figura 4**). I campioni sono stati preparati per la successiva fase di analisi secondo una procedura analoga a quella descritta in **3.1.2 Metodi di trattamento e analisi** e le analisi sono state condotte tramite spettrometria di massa con sorgente al plasma accoppiato induttivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS, Perkin Elmer).



Figura 4: Posizione del bacino dell'Arsenale Vecchio rispetto alla città di Venezia (immagine da Google Earth).

Nel grafico di **Figura 5**, dove si riportano i valori medi delle concentrazioni degli elementi analizzati nelle conchiglie delle due specie, emerge con chiarezza come gli elementi maggiormente presenti in entrambi i campioni siano Sr e Mg: ciò è facilmente comprensibile dal momento che entrambi questi elementi sono in grado di sostituire il calcio nella struttura cristallina della valva. La stessa cosa non accade con altri elementi come il Ba che, pur essendo anch'esso affine al calcio, è presente in acqua di mare con una concentrazione troppo bassa per competere con gli altri elementi.

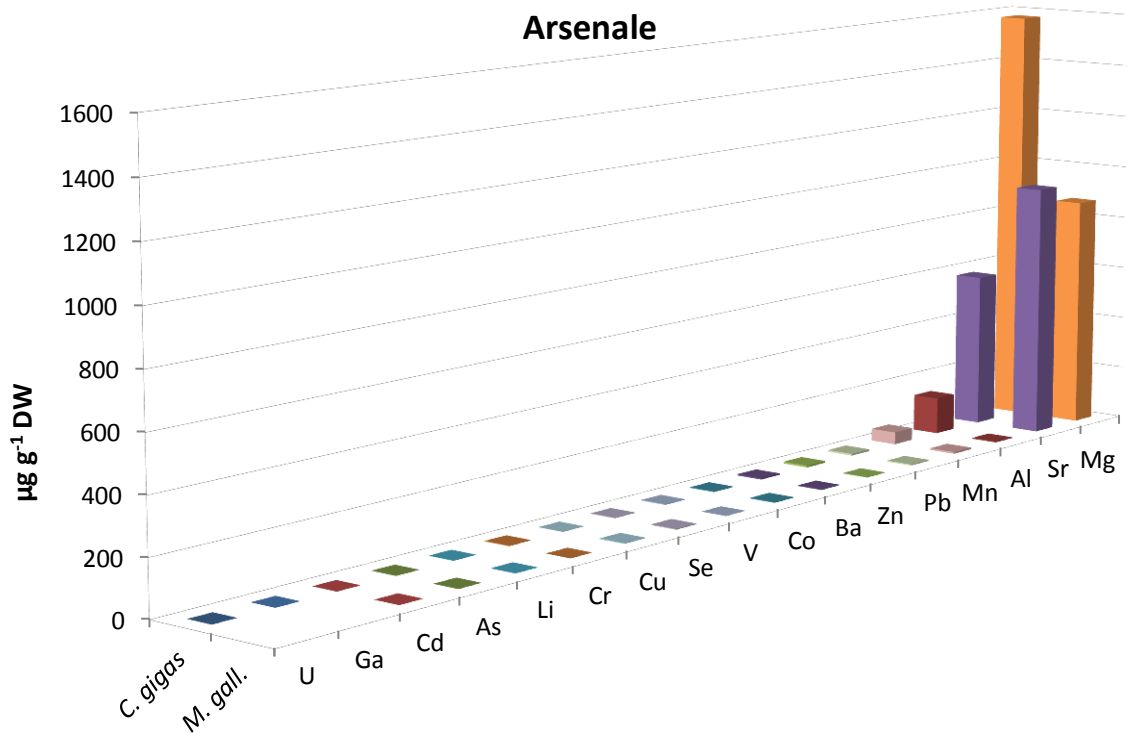


Figura 5: Valori medi delle concentrazioni degli elementi analizzati nelle due specie considerate (*C. gigas* e *M. galloprovincialis*) prelevati nel bacino dell'Arsenale vecchio di Venezia.

Le differenti caratteristiche in termini di composizione generale della conchiglia tra le due specie sono evidenti in **Figura 6** e in **Figura 7**, dove si riporta il contenuto totale degli elementi in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW e la composizione percentuale, rispettivamente, suddivisi per lo stronzio, il magnesio e tutti gli altri elementi: per *C. gigas* il 91% in peso sul totale degli elementi analizzati è dato dalla somma di Sr e Mg, percentuale che si alza al 99% per *M. galloprovincialis*.

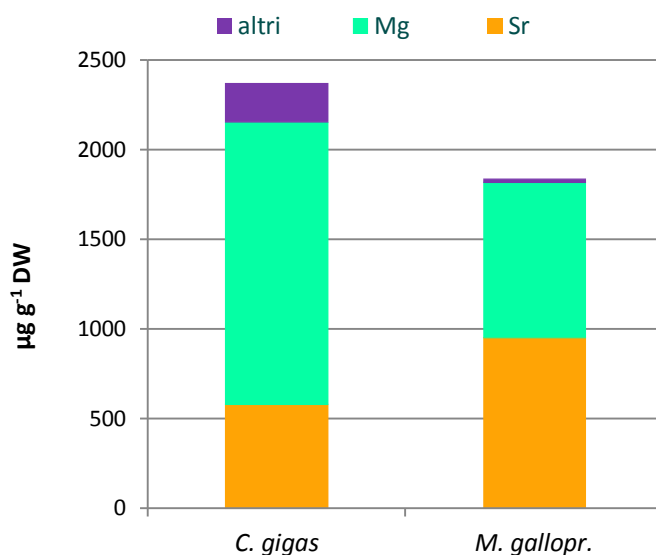


Figura 6: Il contenuto totale di elementi nelle due specie suddiviso per lo Sr, il Mg e gli altri elementi.

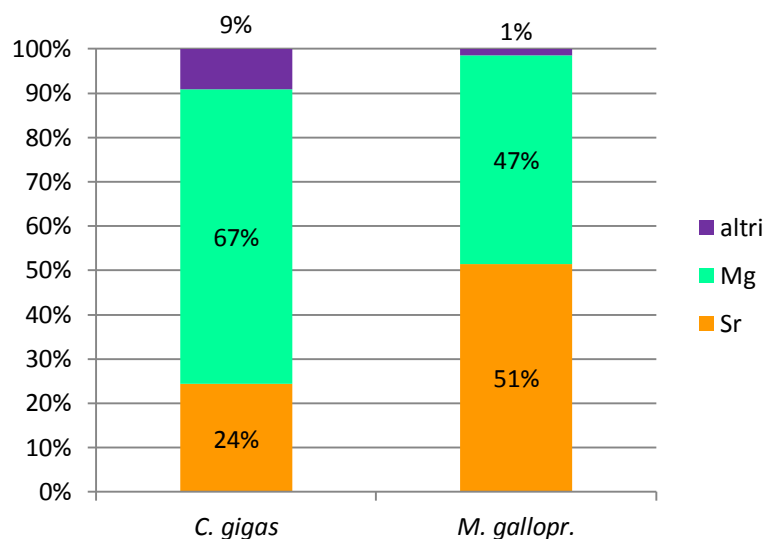


Figura 7: La percentuale media di Sr, Mg e degli altri elementi rispetto al totale degli elementi quantificati nelle conchiglie delle due specie considerate.

Si può notare osservando la **Figura 7** come lo stronzio presenti una percentuale più alta in *M. galloprovincialis* (51% rispetto al 24% in *C. gigas*). Dalla letteratura (Schöne *et al.*, 2010; Cravo *et al.*, 2002; Markich *et al.*, 2002; Sturesson, 1978) è noto che gli ioni metallici divalenti che hanno un raggio ionico maggiore

del Ca^{2+} (e.g., Sr^{2+}) generalmente lo sostituiscono con maggiore facilità nella struttura ortorombica dell'aragonite piuttosto che nella struttura romboedrica della calcite, che invece ospita più facilmente lo ione Mg^{2+} , più piccolo.

Ciò accade perché il Ca^{2+} nella calcite si posiziona in una struttura con 6 ossigeni coordinati, mentre nell'aragonite, trovandosi in una struttura con 9 atomi di O coordinati, si posiziona a maggiore distanza dagli ossigeni (maggiore lunghezza dei legami Ca-O). Il raggio ionico del Ca^{2+} (9,9 nm) è tale da permettere al carbonato di calcio di assumere entrambe le forme (e per questo viene considerato come valore limite); lo ione Sr^{2+} , invece, che presenta un raggio ionico maggiore (11,2 nm) può sostituire il Ca^{2+} solamente formando un carbonato con 9 atomi coordinati, isostrutturale all'aragonite.

Nei casi in cui il raggio ionico è minore rispetto a quello del Ca^{2+} , come accade per lo ione Mg^{2+} (7,2 nm), la calcite è la forma preferita in quanto più stabile. Queste condizioni fanno sì che l'aragonite possa arrivare a contenere fino a 100 volte più stronzio della calcite (Schöne *et al.*, 2010) e che la concentrazione di questo elemento sia maggiore nelle conchiglie che presentano un rapporto aragonite/calcite elevato, come accade in *M. galloprovincialis* (Li *et al.*, 2014; Sturesson, 1978).

D'altro canto è possibile che la maggiore percentuale di Sr in *M. galloprovincialis* sia legata a un tasso di crescita più elevato: il tasso di crescita dei cristalli, infatti, ha un effetto sull'incorporazione di questo elemento in quanto influisce sul potenziale elettrochimico che guida gli ioni nei canali del calcio, attraverso i quali lo ione Sr^{2+} può passare a causa della sua affinità con lo ione Ca^{2+} . Maggiore è il potenziale, minore è la selettività del canale e ciò permette agli ioni Sr^{2+} di passare la membrana più facilmente (Carré *et al.*, 2006).

Inoltre, osservando **Figura 6**, risulta evidente come il contenuto totale di elementi sia maggiore in *C. gigas* che in *M. galloprovincialis* (2323,34 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW vs 1845,94 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW): questo dato è in accordo con quanto è riportato in letteratura, dove le ostriche sono descritte come organismi aventi una maggiore capacità di accumulare metalli rispetto ai mitili (Reinfelder *et al.*, 1997; Baudrimont *et al.*, 2005). In particolare Martincic *et al.* (1984) sottolineano come le ostriche (*Ostrea edulis* nel loro caso) siano accumulatori di metalli più efficienti rispetto ai mitili e riconducono questo fatto alle diverse caratteristiche fisio-morfologiche delle due specie.

In **Figura 8** e in **Figura 9** si riporta il contributo dei singoli elementi minori alla porzione definita come "altri" in **Figura 6** e **Figura 7**, rispettivamente per *C. gigas* e *M. galloprovincialis*: risultano evidenti delle sostanziali differenze nella distribuzione percentuale degli elementi nelle due specie, in particolare per quanto riguarda la prevalenza di Al nelle valve di *C. gigas*. Considerata la medesima provenienza dei campioni, si deve supporre che le due specie abbiano una diversa capacità di incorporare questi elementi nella struttura cristallina della valva a causa di differenti caratteristiche specie-specifiche.

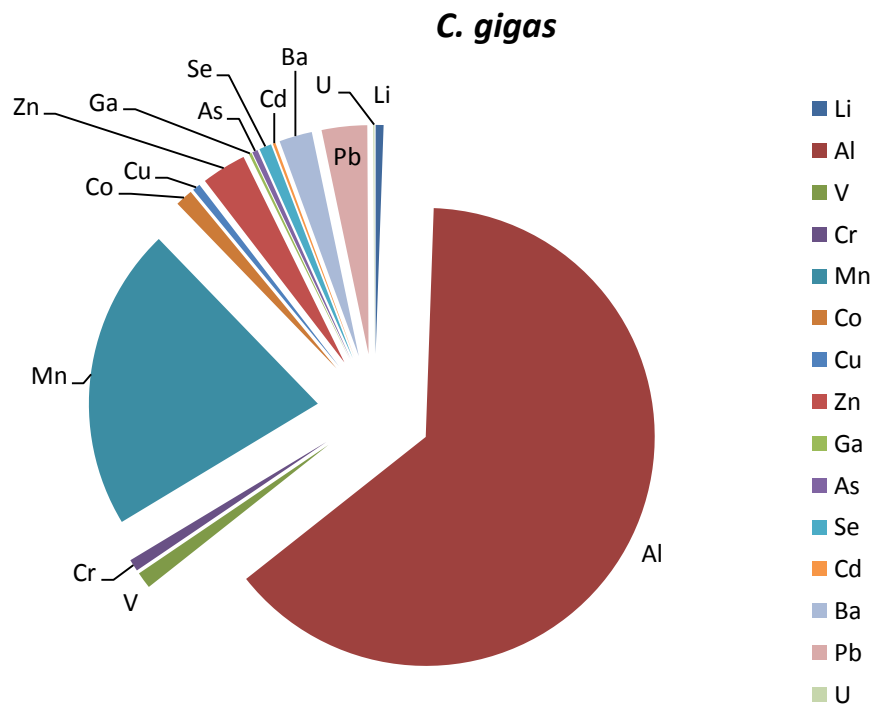


Figura 8: La distribuzione percentuale degli elementi definiti come “altri” in **Figura 6** per *C. gigas*.

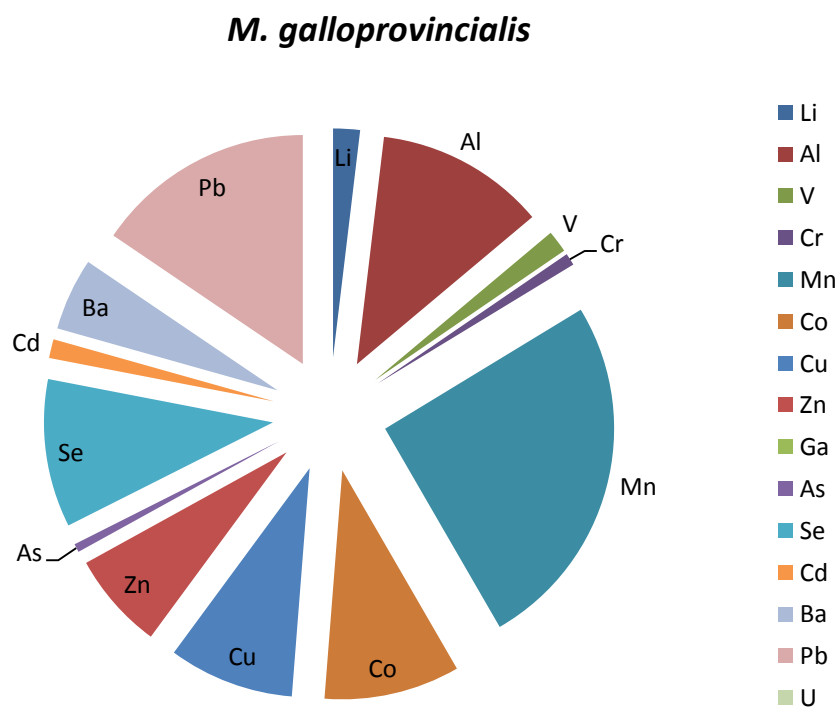


Figura 9: La distribuzione percentuale degli elementi definiti come “altri” in **Figura 6** per *M. galloprovincialis*.

Per quanto riguarda *C. gigas*, possiamo confrontare i risultati riportati con l’unico lavoro relativo alle concentrazioni di metalli nei tessuti molli di questa specie in laguna di Venezia rinvenibile in letteratura: Orban *et*

al. (2004) riportano i valori relativi a Zn, Cr, Co e Se per campioni prelevati in Valle Dogà (laguna nord) in $\mu\text{g g}^{-1}$ WW. I valori registrati per i prelievi effettuati in giugno 2001 e luglio 2002 (Se>Zn>Cr>Co) non sono confrontabili con quelli rilevati nelle conchiglie in questo studio (Zn>Co>Se>Cr).

I livelli di Pb, Cd, Cr, Cu, Mn, Zn nelle conchiglie di *M. galloprovincialis*, invece, possono essere rapportati con quelli determinati da Nesto *et al.* (2007) nei *soft tissue* (espressi in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) in laguna di Venezia per i siti di San Giuliano e Sacca Sessola nel mese di aprile, dove si registrano concentrazioni decrescenti secondo l'ordine Zn>Mn>Cu>Cd>Pb>Cr; nelle conchiglie le concentrazioni sono molto più basse per lo zinco (due ordini di grandezza di differenza), più basse per Cd, Cr, Cu (un ordine di grandezza di differenza) e comparabili per Pb e Mn. Questo aspetto, unito al diminuire della concentrazione secondo l'ordine Mn>Pb>Zn>Cu>Cd>Cr, fa pensare a una buona affinità di Pb e Mn per le conchiglie di *M. galloprovincialis*.

Tale osservazione è da ritenersi puramente indicativa dato che le relazioni intercorrenti tra le concentrazioni rinvenibili nei *soft tissue* e nelle conchiglie dei Bivalvi sono molto complesse e non possono essere esaminate approfonditamente tramite il confronto di dati relativi a campioni, siti e procedure di analisi diversi, pur facenti riferimento alla stessa specie. Per tale motivo si ritiene di non approfondire qui quest'aspetto che verrà trattato specificatamente nella seconda parte del presente lavoro per la specie *V. philippinarum* (cfr. **4. Parte seconda**).

D'altro canto, se si confrontano i risultati del progetto qui discusso con quelli del lavoro di Martincić *et al.* (1984) che determinano la concentrazione in $\mu\text{g g}^{-1}$ WW di Zn, Cd, Pb e Cu presenti nei vari tessuti, tra cui le valve, di *M. galloprovincialis* e *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) prelevati nello stesso sito di campionamento (canale di Leme in Istria, Croazia), pur tenendo conto del fatto che il risultato viene espresso in termini di peso umido, i valori risultano comparabili per quanto riguarda Zn e Cu, decisamente più elevati i dati di Venezia nel caso di Cd e Pb. Tali osservazioni vanno probabilmente a confermare l'ipotesi di una influenza dei livelli di contaminazione ambientale sulla composizione delle valve, aspetto che verrà approfondito in **3.2 Confronto fra siti**.

Ciò che i risultati di questo studio mettono in luce è che le due specie considerate mostrano differenti risposte dal punto di vista dell'incorporazione degli elementi nella struttura cristallina delle valve, nonostante le medesime condizioni ambientali cui sono esposte durante il loro ciclo di vita e, dunque, nonostante la medesima concentrazione degli elementi e variabilità dei parametri chimico-fisici esterni che possono avere un effetto sui processi biologici delle specie e conseguentemente sulle concentrazioni di metalli presenti nelle conchiglie dei Bivalvi.

Le condizioni ambientali, infatti, anche quando non determinano stress, possono interferire a livello cellulare, sia sui processi tossico-cinetici, che hanno effetti sull'uptake, sulla distribuzione interna, sulla biotrasformazione e sull'eliminazione degli elementi, sia sui processi tossico-dinamici, che determinano il risultato derivante dal raggiungimento del sito target da parte dell'elemento ossia l'effetto tossico (Fischer *et al.*, 2013). Se le condizioni ambientali applicate sono le stesse, ciò che può variare sono le risposte biologiche degli organismi: esse

dipenderanno certamente da variabili individuali quali la taglia, il sesso e l'età, ma soprattutto dalla specie di appartenenza.

In questo caso, poiché il campione prelevato è piuttosto omogeneo in termini di taglia e di età, è possibile imputare il risultato sperimentale alla specie-specificità delle vie biochimiche di incorporazione degli elementi nelle valve e dei processi metabolici che li coinvolgono una volta entrati nell'organismo. In particolare emerge come la differente composizione della conchiglia in termini di proporzione tra calcite e aragonite, regolata a livello genetico e diversa per le due specie, è importante nel determinare la composizione elementare della conchiglia in quanto le due fasi polimorfe del carbonato di calcio hanno differenti affinità per alcuni elementi (Almeida *et al.*, 1998). Inoltre è probabile che le differenze tra le due specie in termini di composizione siano dovute a caratteristiche metaboliche differenti tra cui il tasso di filtrazione, la selettività nell'assorbimento, l'efficienza dei meccanismi detossificanti, nonché alla diversa sensibilità all'inquinamento (Ravera *et al.*, 2003).

Ne risulta che le ragioni per cui un determinato elemento entra a far parte della struttura cristallina della valva dipendono anche dalle caratteristiche proprie dell'organismo e della specie considerata e non solamente dalla sua disponibilità nell'ambiente di crescita dell'organismo. Conchiglie appartenenti a specie diverse potranno essere caratterizzate dalla presenza di elementi in quantità anche molto differenti, sia per quanto riguarda la proporzione di elementi maggiori, sia per quanto concerne gli elementi presenti in quantità molto più basse.

3.2 CONFRONTO FRA SITI

La determinazione della composizione elementale delle conchiglie di *V. philippinarum* mediante la procedura precedentemente individuata e descritta in **3.1.2 Metodi di trattamento e analisi delle conchiglie**, ha interessato campioni provenienti da siti destinati a venericoltura in laguna di Venezia, nel delta del Po e in laguna di Marano. L'ipotesi di partenza è che le diverse caratteristiche ambientali di queste aree, descritte brevemente di seguito, possano essere la causa di una diversificazione nella composizione delle valve della specie considerata: i risultati presentati in questa sezione e il loro trattamento tramite opportuni strumenti statistici mirano a verificare questa ipotesi.

3.2.1 Le aree di studio

Le aree lagunari salmastre ad elevata trofia dell'Alto Adriatico, tra tutte quelle in cui è stata sperimentata l'introduzione della vongola filippina, sono quelle in cui si registrano le produttività più elevate e costituiscono oggi la fonte della quasi totalità della produzione italiana (Turolla, 2008). Nel delta del Po le produzioni derivano per la maggior parte da pratiche di allevamento (circa il 90%); percentuali elevate si registrano anche nella laguna di Marano (65-70% di produzione di *V. philippinarum* da allevamento), mentre in laguna di Venezia la lenta conversione da un regime di libero accesso a un sistema basato su pratiche colturali fa sì che la percentuale di produzione derivante da queste ultime si attesti attorno al 50% (a questo proposito si veda **4.1.2 *Venerupis philippinarum* in laguna di Venezia**).

In queste aree l'allevamento viene svolto "a fondale" attraverso una pratica che prevede la predisposizione del fondale, il reperimento del seme, la semina, il monitoraggio e la gestione delle aree seminate e infine la raccolta e la selezione del prodotto destinato alla commercializzazione. Le zone destinate all'allevamento vengono divise in "orti" al fine di diversificare nel tempo la gestione delle semine e dei raccolti; tale suddivisione non deve però ostacolare il normale flusso dell'acqua che garantisce la sopravvivenza e la crescita della specie. Ne consegue che i valori dei parametri chimico-fisici che si registrano nelle zone deputate alla venericoltura sono assolutamente dipendenti dalle condizioni ambientali delle aree in cui sono inseriti.

Delta del Po

Il bacino del fiume Po, il più importante fiume italiano, lungo 691 km, si estende da est ad ovest nella pianura Padana e, sfociando nel mare Adriatico, alimenta il suo delta che si estende oggi per un'area complessiva di circa 400 km². Nel delta il corso d'acqua maggiore (Po di Venezia) si divide in 5 bracci attivi a cui corrisponde un sistema complesso di piane alluvionali e fronti deltizi; a questi si aggiungono il Po di Levante che non è più considerabile come realmente attivo (Simeoni & Corbau, 2009).

Il complesso sistema deltizio del fiume Po comprende sette lagune e due sacche: le prime sono caratterizzate dall'essere bacini di acqua salmastra, in alcuni punti profondi solo pochi centimetri, delimitati verso il mare da cordoni di dune sabbiose o scanni e, dalla parte del fiume, da barene (banchi di limo o sabbia sommersi periodicamente dalle maree) e da bonelli (isolotti fangosi di origine sedimentaria); le seconde si formano nei

punti dove il mare riesce a penetrare con le sue onde e sono uniformi distese d'acqua salata a fondale basso delimitate da bracci di fiume. Sia nelle lagune che nelle sacche si allevano cozze e vongole, si pratica la pesca in genere e si cattura il "novellame", il piccolo pesce che viene allevato in valle.

In questo contesto si inseriscono la laguna di Caleri, la laguna di Marinetta e la Sacca di Scardovari, aree di provenienza dei campioni qui analizzati.

Le lagune di Caleri e di Marinetta si caratterizzano da un lato per ampi scambi con il mare attraverso le bocche di porto, che rendono marinizzate le porzioni più orientali, ma mantengono sostanzialmente isolate le porzioni più distanti dalle bocche dove è più difficoltoso il ricambio idrico; d'altro canto giungono gli apporti d'acqua dolce (il fiume Adige nella laguna di Caleri e il Po di Levante nella laguna di Marinetta). Nella laguna di Caleri le zone adibite a venericoltura sono situate in prossimità della bocca di porto e dei principali canali adduttori, dove è più efficiente il ricambio idrico; nella laguna di Marinetta gli orti a venericoltura sono posti nella porzione più settentrionale compresa tra lo sbocco del Po di Levante e la bocca di porto.

La sacca di Scardovari si presenta come una profonda insenatura nella parte meridionale del delta, facente parte di un esteso complesso di bacini e strutture morfologiche formatosi in seguito al continuo rimodellamento della linea di costa dovuto all'evoluzione del delta. Essa comunica con il mare attraverso una bocca artificiale situata sullo scanno litoraneo vicino alla foce del ramo del Po di Tolle e attraverso una bocca più ampia orientata a sud-est; per quanto riguarda gli apporti fluviali, essi risultano importanti in regime di piena del fiume Po in particolare nella porzione meridionale della sacca, interessano molto meno la porzione settentrionale in cui il ricambio idrico è minore e talvolta sostanzialmente assente. Sono inoltre presenti apporti di acque dolci derivanti dall'irrigazione agricola.

Sulla base delle peculiarità morfologiche appena descritte, non è difficile comprendere l'estrema variabilità di parametri come la salinità, la temperatura delle acque e il carico di nutrienti e inquinanti, fattori che dipendono dall'importanza reciproca dei flussi mareali e fluviali. Le possibili fonti di inquinamento inorganico dell'area sono date principalmente dagli apporti fluviali (comprendenti scarichi civili e industriali) e dalle attività agricole prospicienti che vanno ad inserirsi nel quadro di un ambiente caratterizzato da un background geochimico particolare in cui i livelli di alcuni elementi sono già abbastanza elevati a causa di fattori legati alle dinamiche deposizionali.

Laguna di Venezia

La laguna di Venezia è situata tra la foce del fiume Sile a nord-est e quella del Brenta-Bacchiglione a sud-ovest, per una lunghezza complessiva di circa 51 km ed una larghezza che va dai 10 ai 12 km in media. Presenta una superficie di 549 km² di cui circa il 67% è costituito da specchi d'acqua, il 25% da barene, l'8% da isole. I cordoni litoranei, il Lido di Sottomarina, il Litorale di Pellestrina, il Litorale del Lido e il Litorale del Cavallino, fungono da spartiacque con il mare e raggiungono una larghezza che va da poche decine di metri a circa mezzo chilometro.

L'acqua del mare Adriatico entra in laguna dalle tre bocche di porto denominate (da nord a sud) di Lido (scambio idrico con il mare Adriatico circa 40%), di Malamocco (altro 40%) e di Chioggia (restante 20%) per un totale di circa 40 milioni di metri cubi al giorno. Seguendo il flusso delle acque che entrano da ognuna delle bocche si determinano tre differenti bacini idraulici di competenza, rispettivamente Laguna Nord, Centrale e Sud, la cui profondità è variabile da qualche decina di metri presso i porti a qualche decina di centimetri nelle paludi interne.

L'ecosistema della laguna di Venezia appare costituito da tre zone collegate l'una con l'altra attraverso scambi d'acqua reciproci: il bacino scolante, ossia la parte di terraferma che convoglia le proprie acque di drenaggio nella laguna, la laguna stessa e il mare Adriatico, i cui cicli di marea influiscono sulla laguna con il flusso e riflusso attraverso le bocche di porto. Per una trattazione riguardo l'influenza dei flussi di marea e della morfologia lagunare sull'idrodinamica del bacino si rimanda al capitolo **4.1.1 La laguna di Venezia**.

I maggiori impatti derivanti dall'attività antropica sono dovuti alla presenza nel territorio prospiciente la laguna di una molteplicità di fonti di inquinamento, tra cui:

- la terraferma veneziana da un lato e le città di Venezia e Chioggia, i litorali e le isole lagunari dall'altro, con una popolazione che supera complessivamente i 300'000 abitanti;
- le due zone industriali e il sito energetico di Porto Marghera che ha visto il suo momento di maggiore attività tra il 1950 e il 1970 e che comprende imprese siderurgiche, industrie chimiche e raffinerie;
- il territorio del bacino scolante, di cui il 62% è sede di attività agricola e zootecnica con connesso impiego di fertilizzanti organici ed inorganici, pesticidi *etc.*, le cui acque di scolo confluiscono in laguna attraverso i corsi d'acqua naturali e i collettori di bonifica;
- il transito di natanti e di navi nonché il traffico veicolare automobilistico.

Laguna di Marano

La laguna di Marano e Grado è situata nella parte settentrionale del mare Adriatico e ricopre un'area di circa 169 km² compresa tra i delta dei fiumi Isonzo e Tagliamento e separata dal mare da una serie di cordoni litoranei divisi tra loro da 6 bocche di porto. Dal lato del mare si sono formati più di recente alcuni isolotti litoranei che si estendono da Porto Buso alla bocca di porto di Grado, che hanno creato un nuovo piccolo bacino parallelo al maggiore e in rapida evoluzione (Fontolan *et al.*, 2012).

La laguna di Marano è sostanzialmente separata da quella di Grado dalla foce del fiume Ausa e dall'omonimo canale navigabile; è inoltre caratterizzata da un importante apporto di acque dolci dovuto ai fiumi di risorgiva della bassa pianura friulana, tra cui in particolare lo Stella, il Cormor, il Turgnano, lo Zellina, il Corno e dal già citato Ausa. Essa comprende i bacini di Lignano, di S. Andrea e di Buso (quest'ultimo appartenente per metà alla laguna di Grado) a cui corrispondono altrettante bocche di porto.

I principali impatti sull'area derivano dallo sviluppo antropico lungo la fascia costiera e, in particolare, da importanti eventi di contaminazione legati a processi industriali o di estrazione mineralogica situati all'interno del bacino idrografico della laguna e che hanno coinvolto suoli, acque di falda, acque e sedimenti fluviali e lagunari. Nei reflui sversati nel bacino è stata verificata la presenza di composti organici come diossine, furani e idrocarburi policiclici aromatici, oltre che metalli pesanti e in particolare mercurio.

3.2.2 Materiali e metodi

I campioni di *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) utilizzati per le analisi delle valve provengono da tre aree di transizione della costa occidentale del Nord Adriatico, indicate in **Figura 10**, e sono stati prelevati in due distinte campagne di campionamento:

- la prima risale al 2009 nei 3 siti di campionamento del delta del Po (**Figura 11**) e nei 5 siti posti nella laguna di Venezia (**Figura 12**);
- la seconda è stata condotta nel 2012 e ha coinvolto i due siti posti nella laguna di Marano (**Figura 13**).



Figura 10: Le tre aree dell'Alto Adriatico da cui provengono i campioni di *V. philippinarum* utilizzati per le analisi sulle conchiglie (immagine da Google Earth).

Le aree considerate sono state oggetto di precedenti studi (Baccarani, 2012, su laguna di Venezia e delta del Po; Breda, 2012, sulla laguna di Marano e Grado) riguardanti la relazione tra gli aspetti ambientali e il bioaccumulo di metalli nei *soft tissue* di *Venerupis philippinarum*, eseguiti dal gruppo di ricerca del Prof. E. Argese (DSMN – Università Ca' Foscari di Venezia) con cui si è collaborato nelle prime fasi di questo progetto.



Figura 11: I 3 siti di campionamenti nell'area del delta del Po (immagine da Google Earth).



Figura 12: I 5 siti di campionamento nell'area della laguna di Venezia (immagine da Google Earth).



Figura 13: I 2 siti di campionamento nella laguna di Marano (immagine da Google Earth).

Per facilitare la lettura delle pagine seguenti e in particolare dei grafici si riporta in **Tabella 1** il prospetto riassuntivo dei siti di campionamento con le sigle utilizzate, comunque rinvenibile nella sezione **Acronimi utilizzati**.

Tabella 1: I punti di campionamento suddivisi nelle varie aree e sigle corrispondenti.

	Area della Busa	A
	Palude del Monte	B
laguna di Venezia	Canale della Perognola	E
	Valle delle Dolce	H
	Zona industriale	ZI
	Porto di Levante – laguna di Marinetta	MR
delta del Po	Area della Vallona – laguna di Caleri	VL
	Sacca degli Scardovari	SC
laguna di Marano	sito 16	s16
	sito 15	s15

I singoli campioni sono stati processati secondo la metodica appositamente messa a punto e descritta in **3.1.2 Metodi di trattamento e analisi delle conchiglie**, le analisi sono state condotte in ICP-MS (Perkin Elmer); per ogni sito sono state considerate più repliche in numero diverso a seconda del numero di campioni prelevati (a questo proposito si veda la **Tabella 2**).

Tabella 2: Numero di repliche per sito per i campioni di valve di *V. philippinarum*.

sito	repliche
A	9
B	6
E	6
H	6
ZI	3
MR	9
VL	9
SC	9
s16	6
s15	6

Dopo la fase di essiccazione in stufa sono stati determinati:

- il peso delle due valve in g Dry Weight tramite bilancia analitica (A & N Instruments LTD);
- l'altezza lungo l'asse umbo-ventrale (**L1**), la lunghezza lungo l'asse antero-posteriore (**L2**) e lo spessore (**L3***) in cm sulla valva sinistra tramite un calibro (**Figura 14**).

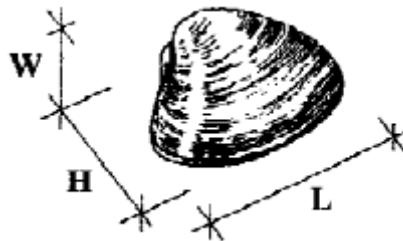


Figura 14: Visualizzazione dell'altezza (**H** in figura, **L1** nel testo), della lunghezza (**L** in figura, **L2** nel testo) e dello spessore complessivo (**W** in figura, **L3** nel testo). Da Gaspar *et al.*, 2002.

Si noti in particolare come per questo ultimo parametro (**L3***) si è voluto determinare lo spessore della singola valva, a differenza di ciò che sarà fatto nella seguente sezione del lavoro di tesi (**4. Parte seconda**), dove per **L3** (senza asterisco!) si intenderà lo spessore complessivo delle due valve chiuse (indicato con **W** in **Figura 14**), misura necessaria per procedere poi con il calcolo degli indici di condizione che qui non sono stati determinati (non sono stati presi in considerazione i tessuti molli). Lo spessore della valva è stato determinato

sulla parte terminale della valva in corrispondenza dell'asse che divide a metà l'umbone. Questa scelta è stata dettata dall'esigenza di prendere in considerazione lo spessore della singola conchiglia come indicatore potenziale di uno stress ambientale influente sul livello di robustezza della valva come già evidenziato in altri lavori (Bonato *et al.*, 2002; Manente *et al.*, 2003; Manente, 2007).

I valori medi ottenuti sono riportati in **Figura 15**, **Figura 16**, **Figura 17** e **Figura 18** per tutte le aree considerate.

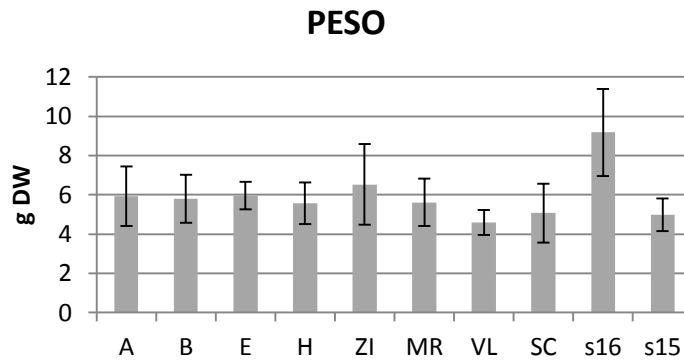


Figura 15: Valori medi e deviazione standard del peso delle due valve di *V. philippinarum* nei diversi siti considerati.

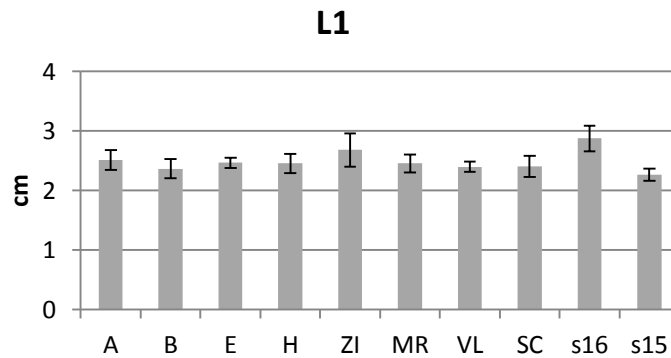


Figura 16: Valori medi e deviazione standard dell'altezza lungo l'asse umbo-ventrale della valva sinistra di *V. philippinarum* nei diversi siti considerati.

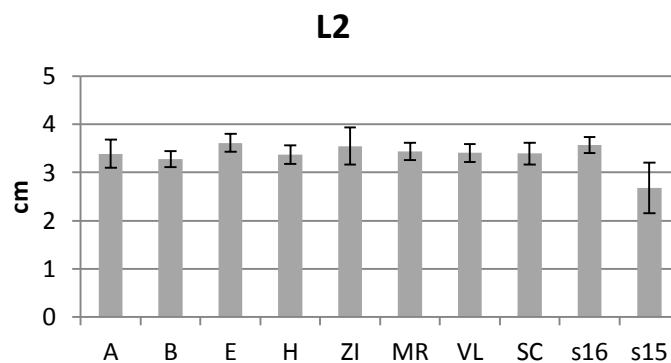


Figura 17: Valori medi e deviazione standard della lunghezza lungo l'asse antero-posteriore della valva sinistra di *V. philippinarum* nei diversi siti considerati.

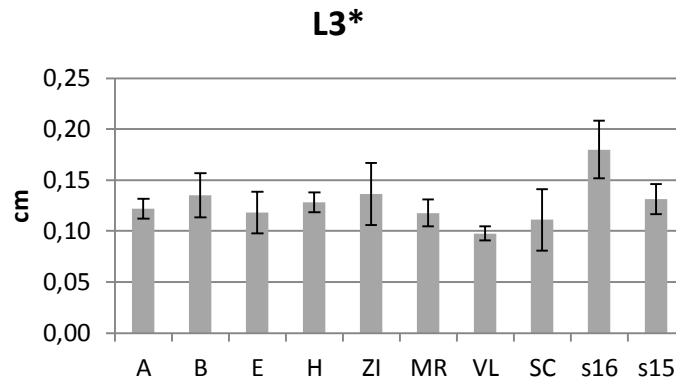


Figura 18: Valori medi e deviazione standard dello spessore della valva sinistra di *V. philippinarum* nei diversi siti considerati.

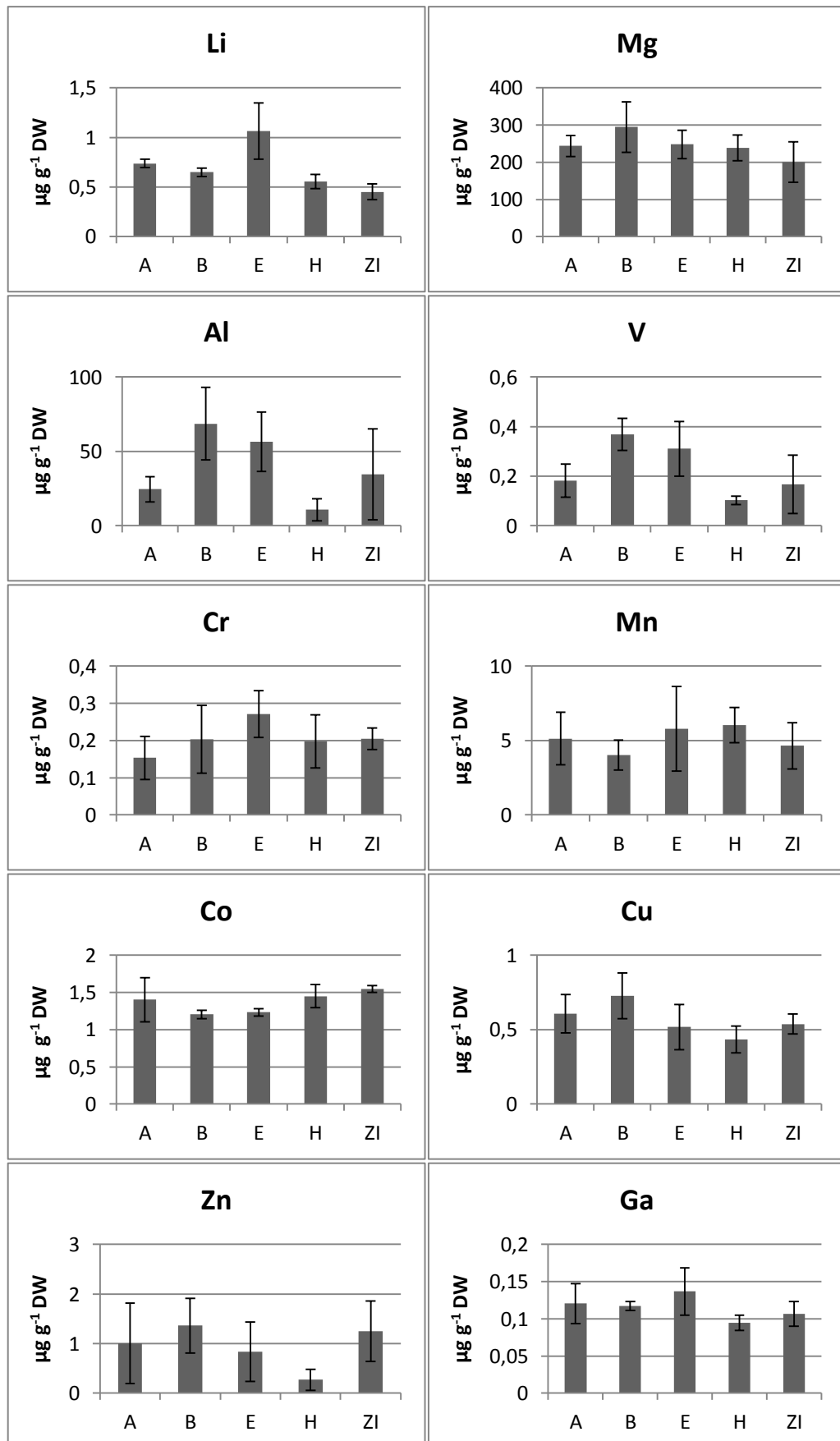
Si noti come i campioni prelevati nel delta del Po e nella laguna di Venezia presentino una variabilità confrontabile, con valori di peso che oscillano tra i 3,5 e i 7,5 g DW per il delta del Po e tra i 4 e gli 8 g DW per la laguna di Venezia (con un unico valore prossimo ai 9 g DW). I campioni della laguna di Marano e Grado invece, mostrano una variabilità in peso differente tra i due siti: il sito 16 è caratterizzato da valori decisamente più alti (da 7 a 12,7 g DW) rispetto a quelli del sito 15 (da 4 a 6,5 g DW).

Per quanto riguarda le dimensioni, i valori di L1 e L2 sono pressoché omogenei nella laguna di Venezia e nel delta del Po; si nota invece la diversità tra i campioni provenienti dalla laguna di Marano e Grado per i quali il sito s15 presenta sempre i valori inferiori. Questa differenza emerge ancora più chiaramente se si esaminano i valori relativi a L3*; qui inoltre, si notano valori leggermente più bassi per i campioni del delta del Po, in particolare per il sito VL (laguna di Caleri).

3.2.3 Risultati e discussione

Le analisi condotte in ICP-MS hanno prodotto i risultati presentati in **Figura 19**, **Figura 20** e **Figura 21** per i siti della laguna di Venezia, del delta del Po e della laguna di Marano rispettivamente: i risultati sono riportati in termini di media della concentrazione del singolo elemento analizzato rispetto all'unità di peso secco della valva ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW). Si noti che dove la barra nel grafico è assente i valori sono al di sotto del limite di rilevabilità dello strumento.

In questo modo è possibile apprezzare l'andamento delle concentrazioni degli elementi tra i diversi siti appartenenti alle medesime aree e mettere in luce la variabilità che emerge all'interno della laguna di Venezia e tra i due siti considerati della laguna di Marano; i siti del delta del Po, al contrario, appaiono decisamente più omogenei tra loro.



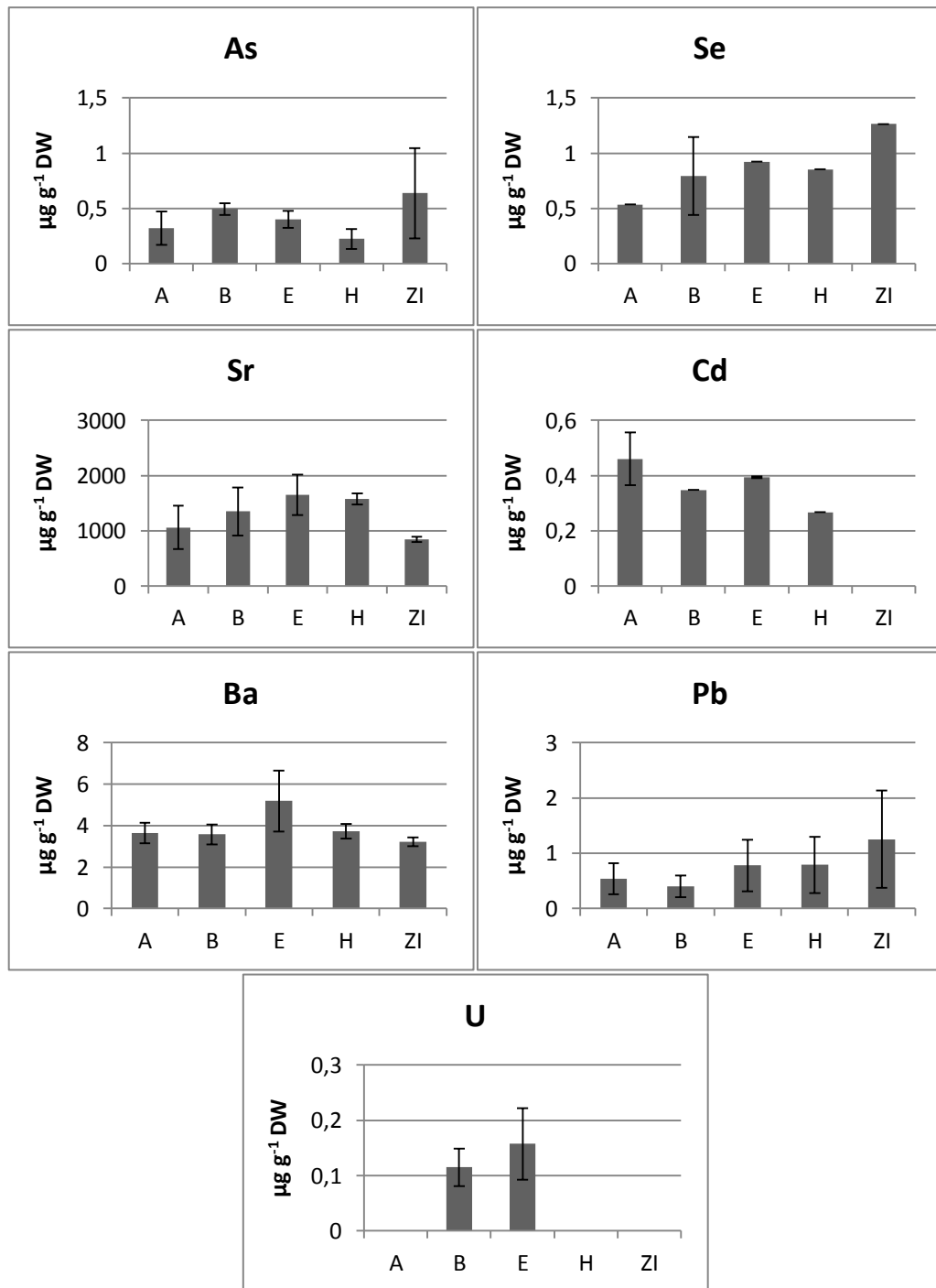
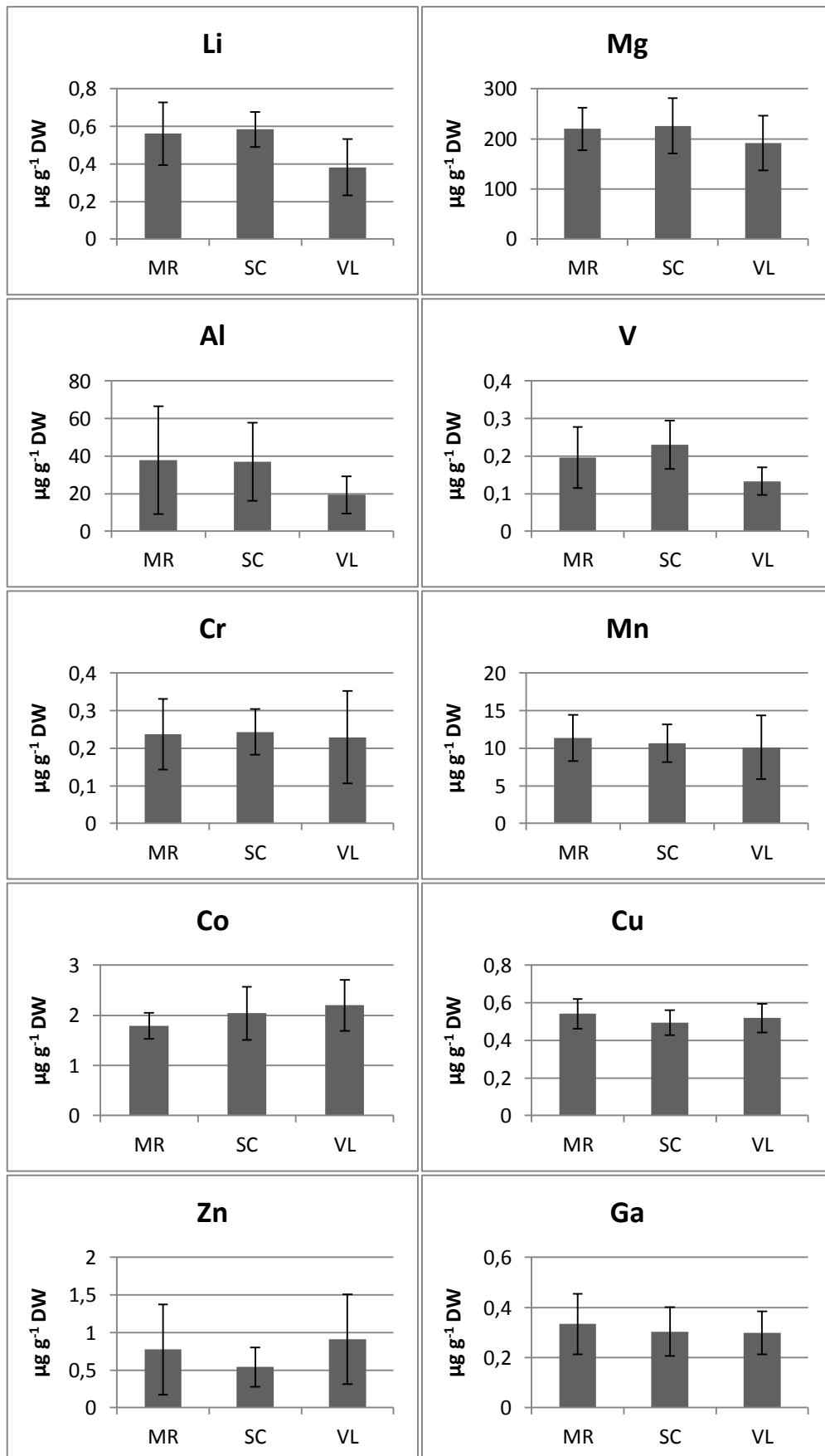


Figura 19: Valori medi e deviazione standard (numero di repliche in **Tabella 2**) della concentrazione in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW degli elementi considerati per le conchiglie provenienti dai siti della laguna di Venezia.



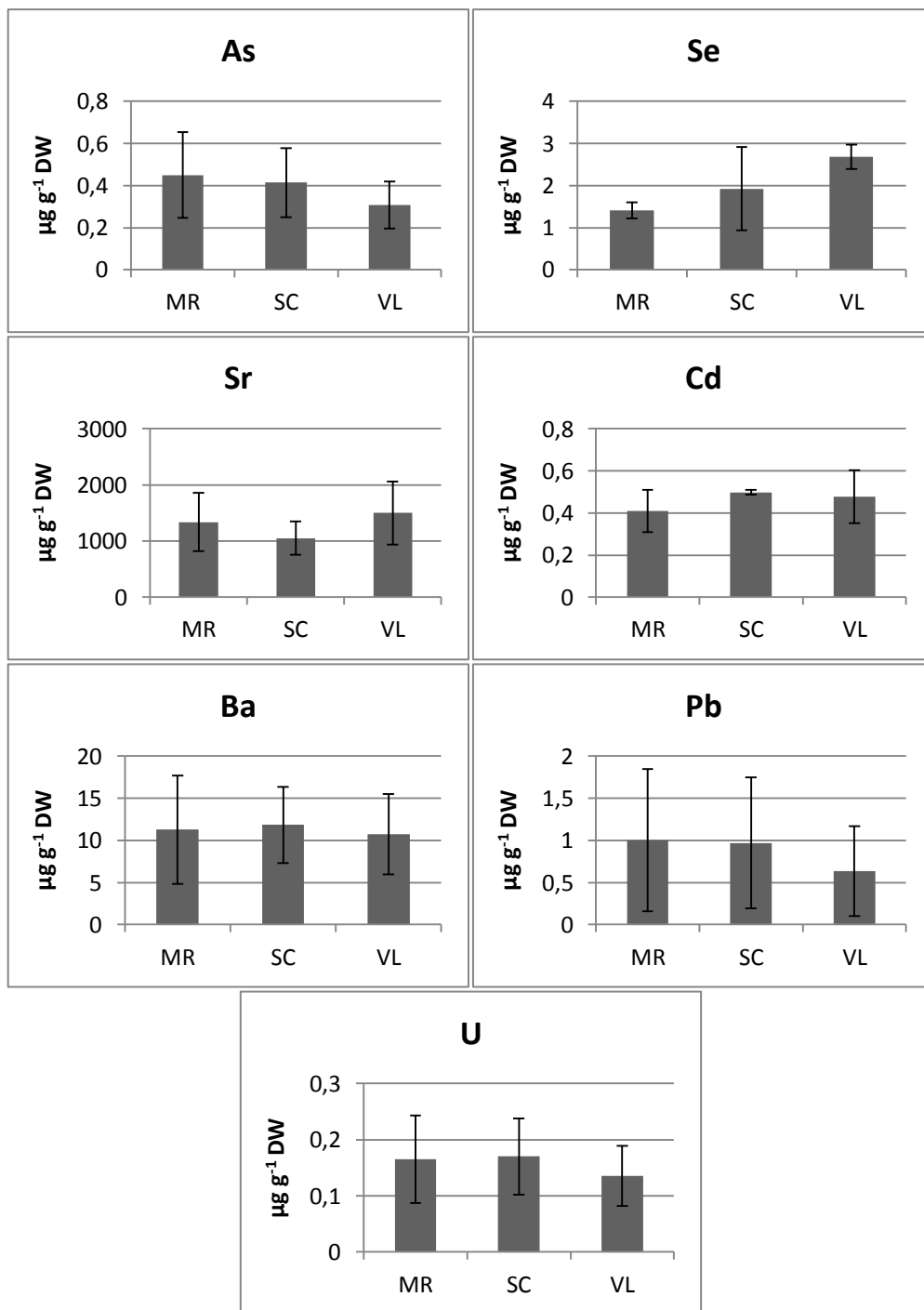
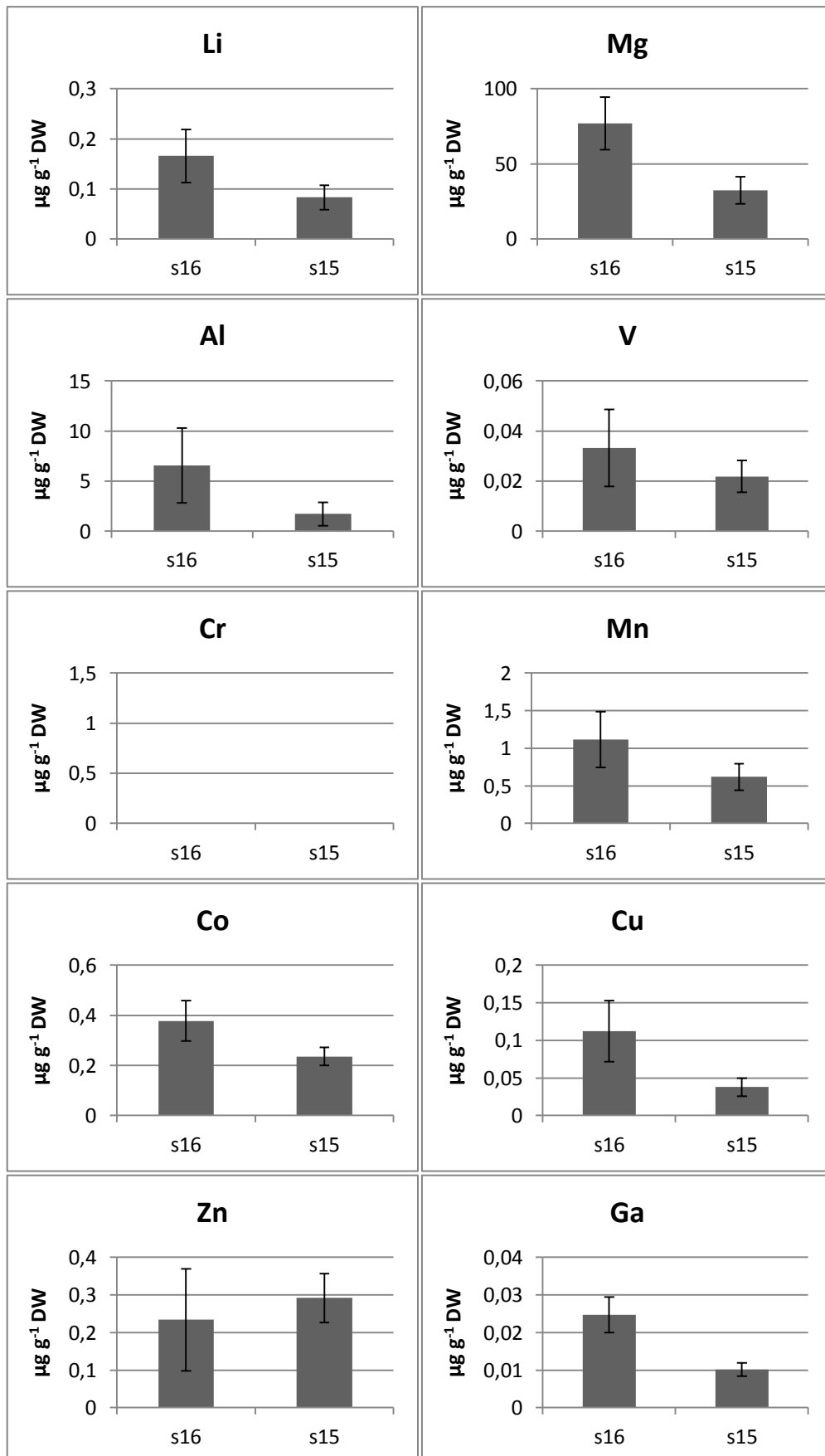


Figura 20: Valori medi e deviazione standard (numero di repliche in **Tabella 2**) della concentrazione in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW degli elementi considerati per le conchiglie provenienti dai siti del delta del Po.



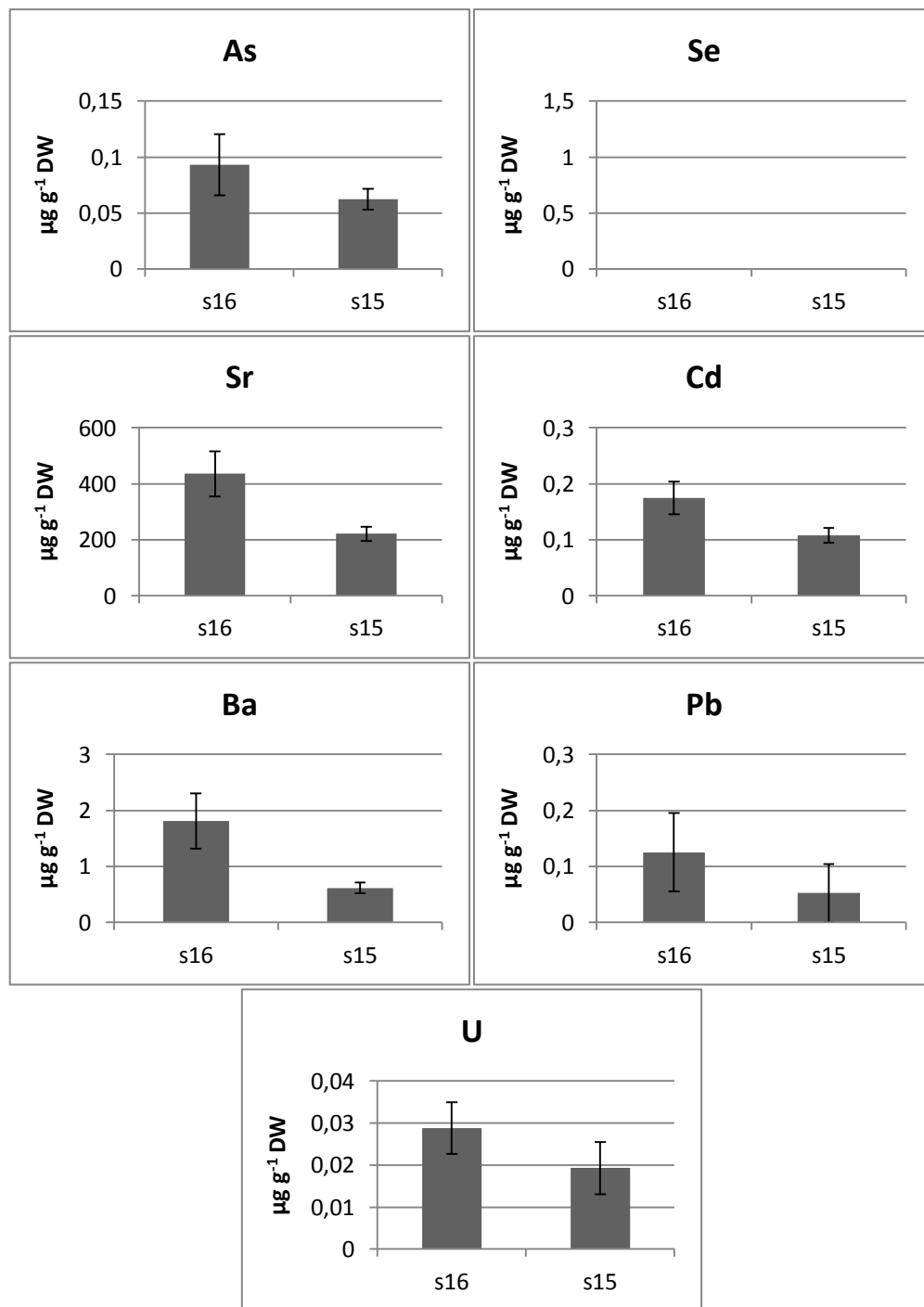
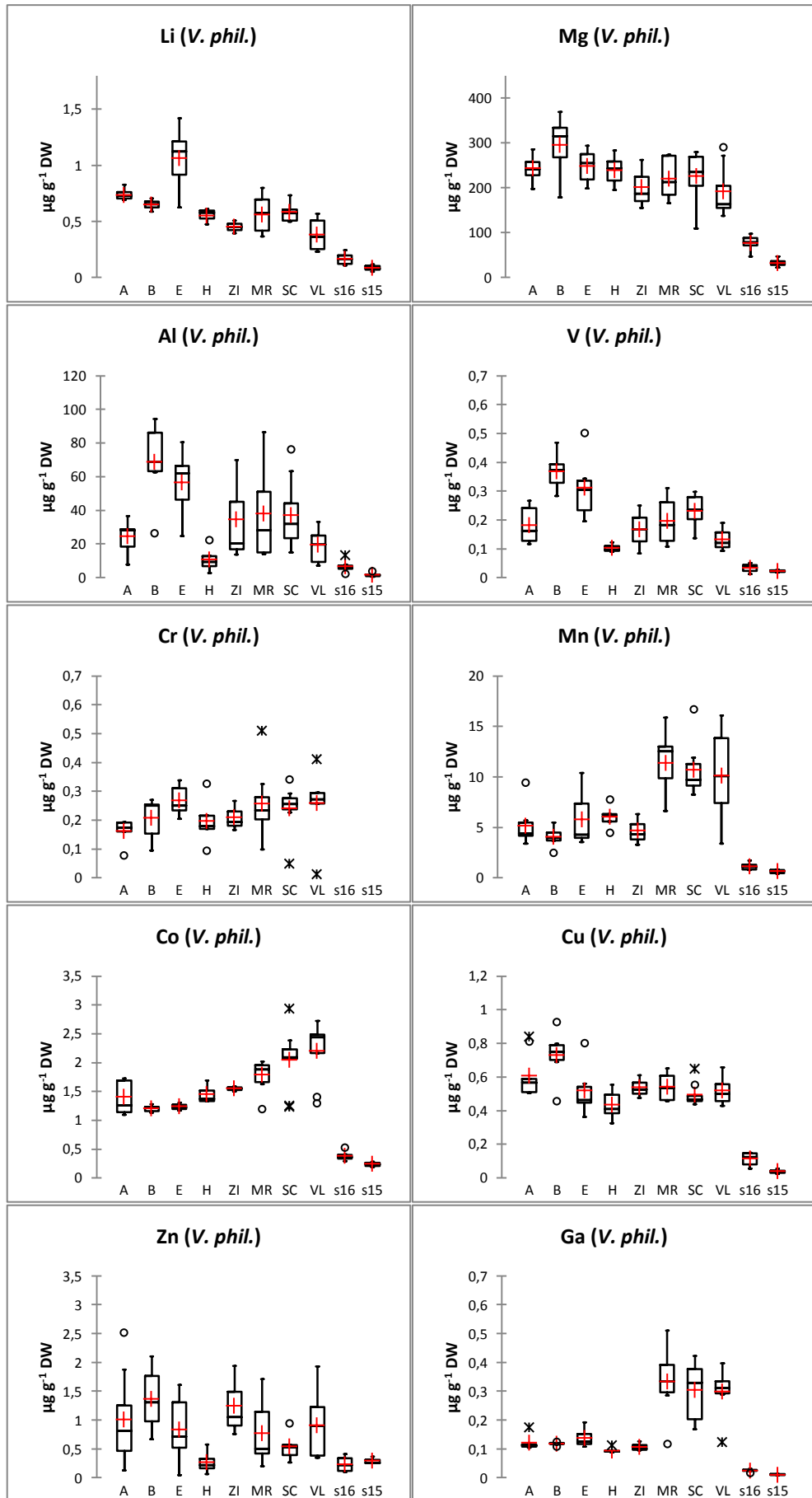


Figura 21: Valori medi e deviazione standard (numero di repliche in **Tabella 2**) della concentrazione degli elementi considerati in $\mu\text{g g}^{-1}\text{ DW}$ per le conchiglie provenienti dai siti della laguna di Marano.

Al fine di rendere più agevole il confronto dei risultati ottenuti in tutti i punti di campionamento di tutte e 3 le aree considerate (laguna di Venezia, delta del Po e laguna di Marano) sono stati riportati in **Figura 22** i box-plot relativi alle concentrazioni dei diversi elementi analizzati nei punti di campionamento considerati.



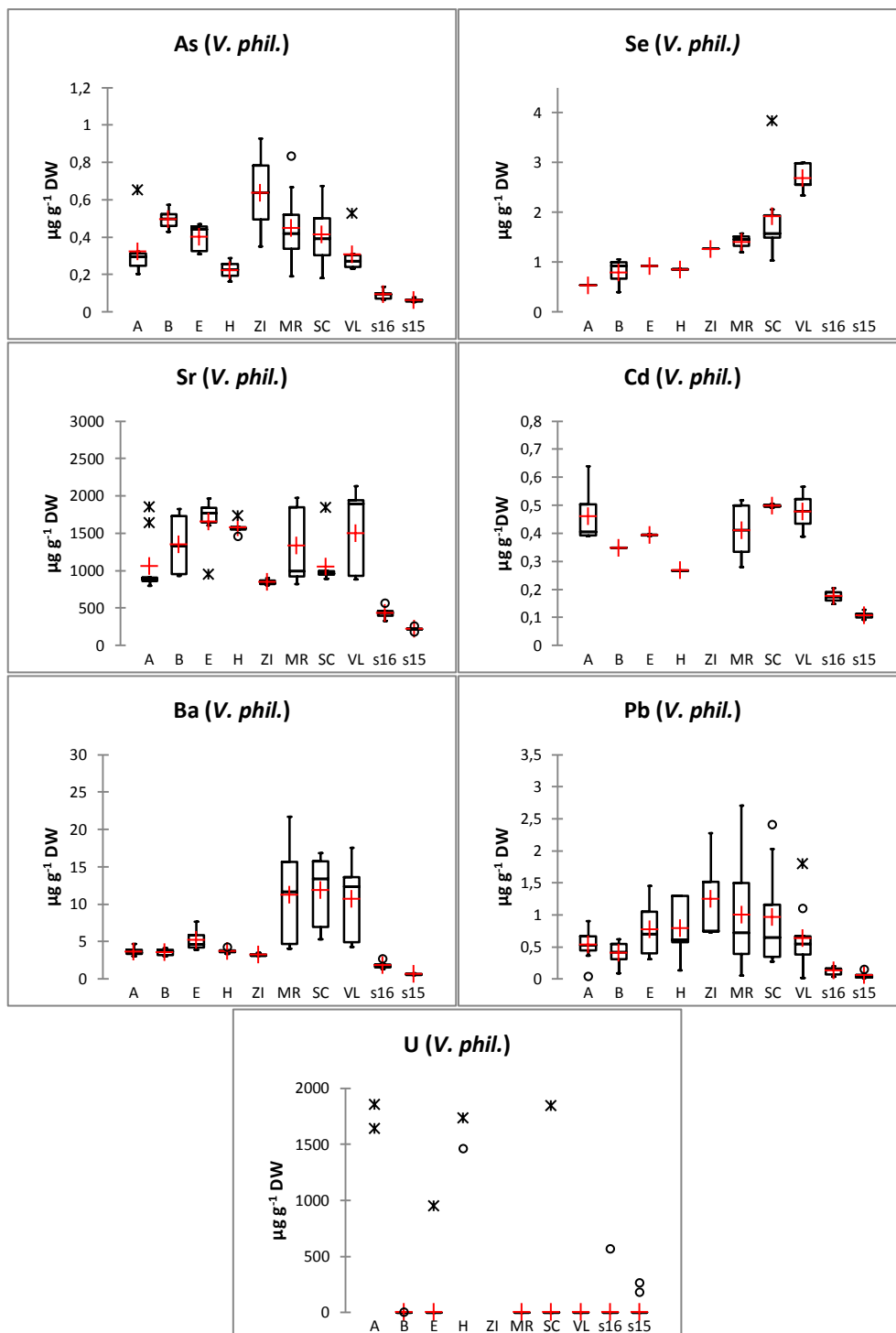


Figura 22: Box plot relativi ai valori di concentrazione in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW degli elementi considerati nelle conchiglie di *V. philippinarum* in tutti i siti delle 3 aree considerate (laguna di Venezia: siti A, B, E, H, ZI; delta del Po: siti MR, SC, VL; laguna di Marano e Grado: siti s16 e s15). [Il rettangolo è delimitato dal primo e dal terzo quartile e diviso al suo interno dalla mediana; i segmenti sono delimitati dal minimo e dal massimo dei valori. In rosso è indicato il valore medio, mentre gli asterischi e i cerchi corrispondono agli outliers].

Dai box-plot di **Figura 22** emerge chiaramente come tutti gli elementi presentino i valori più bassi di concentrazione nei siti della laguna di Marano e Grado; inoltre si nota come i valori relativi ai siti del delta del Po presentino una variabilità maggiore rispetto agli altri nel caso di Mn, Ga e Pb. Si registrano delle somiglianze

negli andamenti di Cr, Co, Se; Li e Mg; Al, V, Zn e As; per alcuni elementi (Cr, Mn, Cu ad esempio) è elevato il numero degli outliers (indicati nel grafico come cerchi o asterischi).

Come emerso nel caso di *M. galloprovincialis* e *C. gigas*, anche nel caso di *V. philippinarum* gli elementi presenti in maggior quantità sono Sr e Mg, con una prevalenza notevole in questo caso del primo rispetto al secondo, come si evidenzia nei grafici di **Figura 23** e **Figura 24** che riportano il contenuto totale di elementi e la percentuale in peso rispetto al totale, rispettivamente, suddivise in contenuto di Sr, Mg e "ALTRI" elementi per tutti i siti considerati.

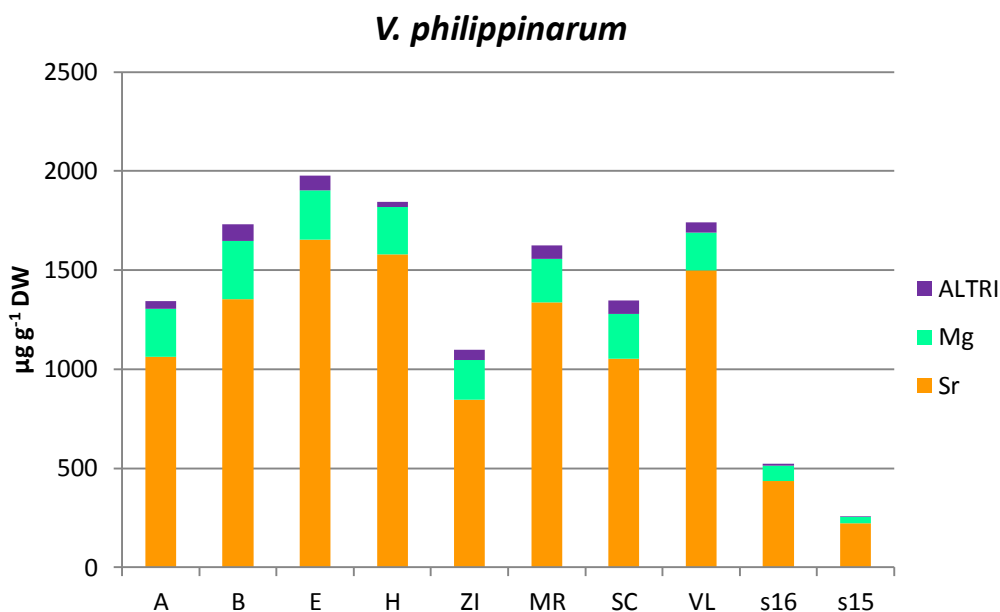


Figura 23: La media del contenuto totale in *V. philippinarum* di elementi nei diversi siti suddiviso per Sr, Mg e gli altri elementi in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW.

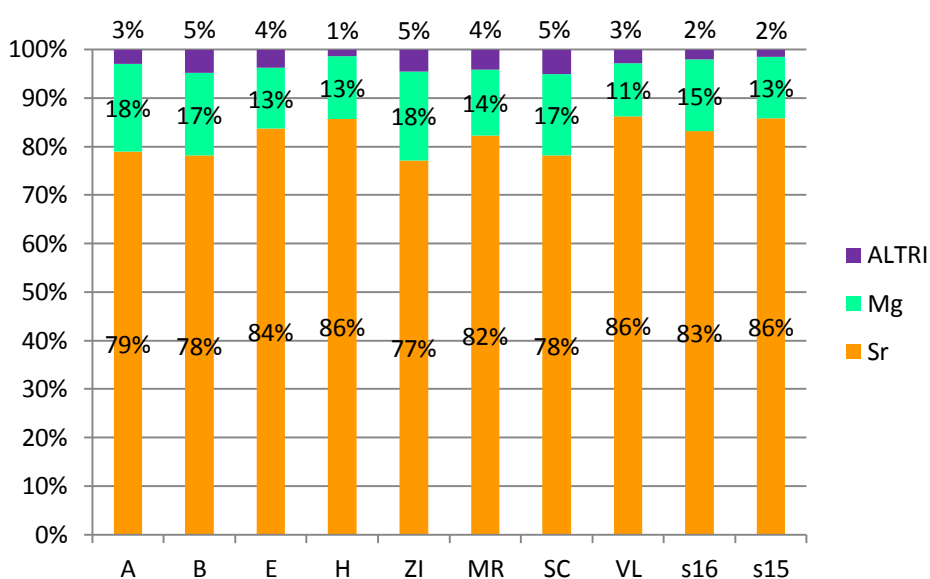
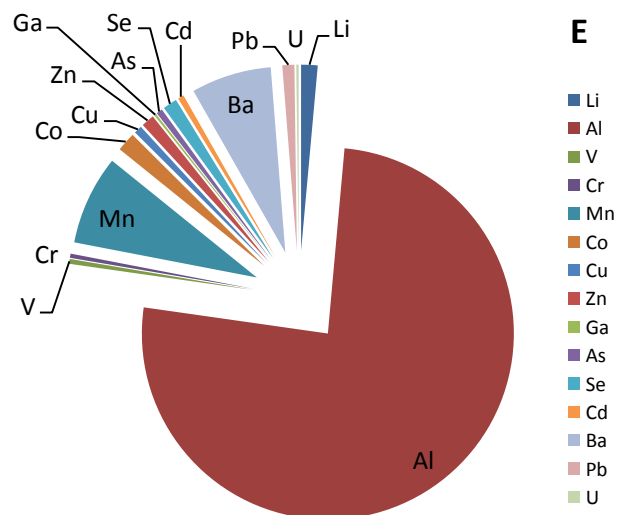
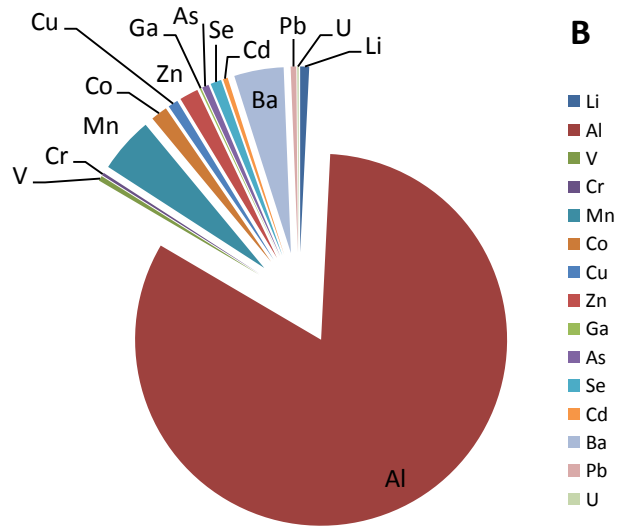
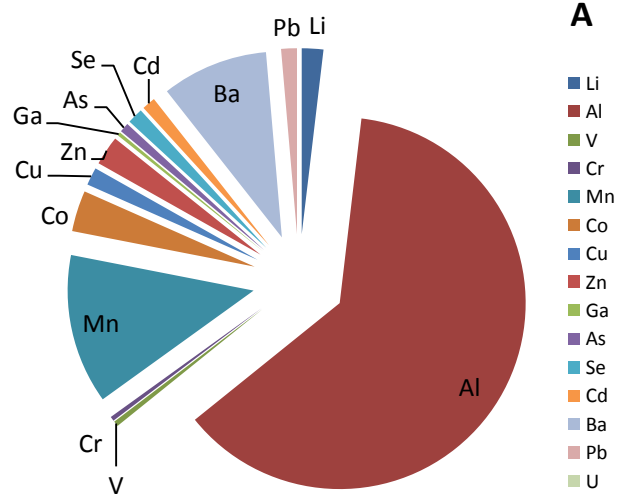


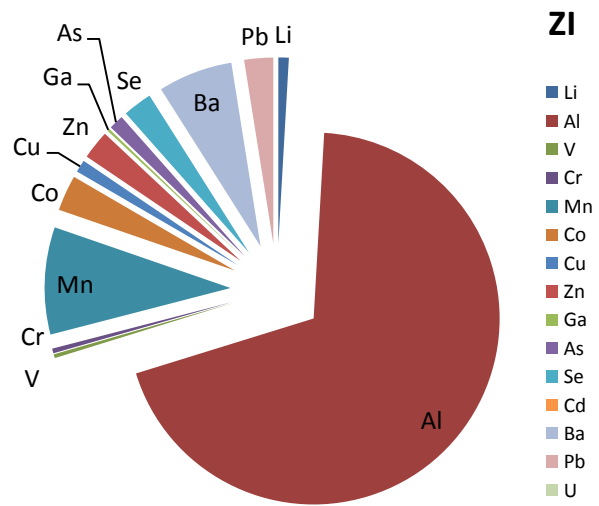
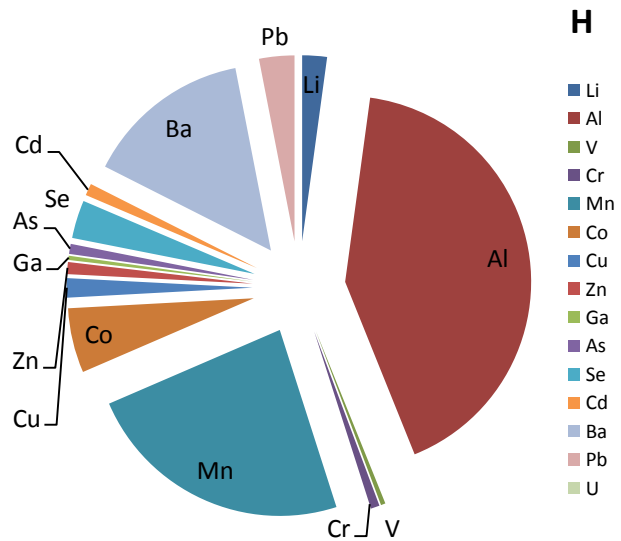
Figura 24: La percentuale media di Sr, Mg e degli altri elementi rispetto al totale degli elementi quantificati nelle conchiglie di *V. philippinarum* nei siti di campionamento considerati.

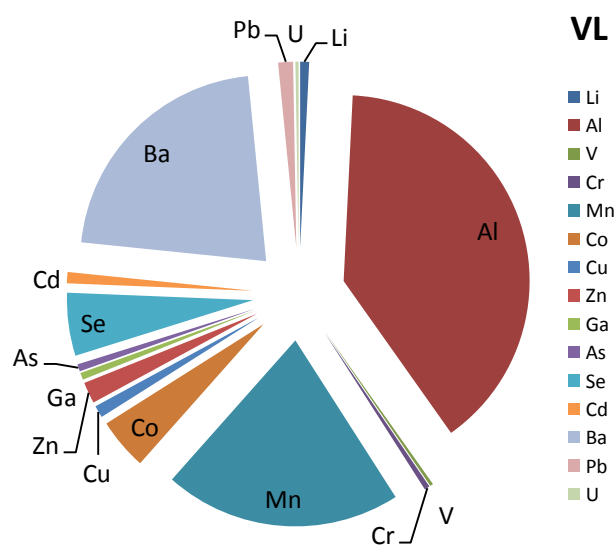
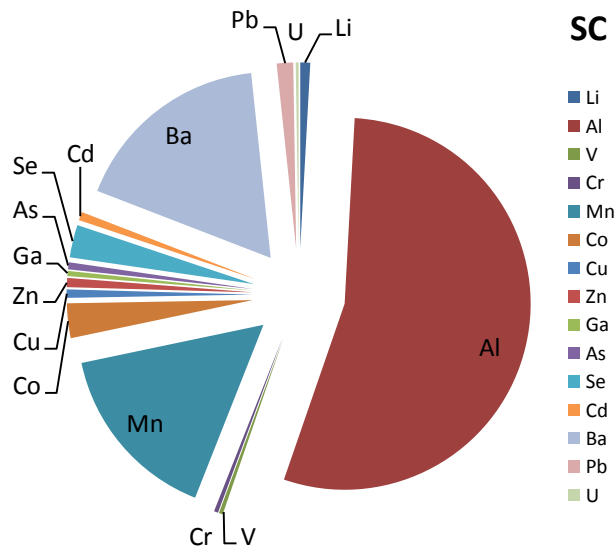
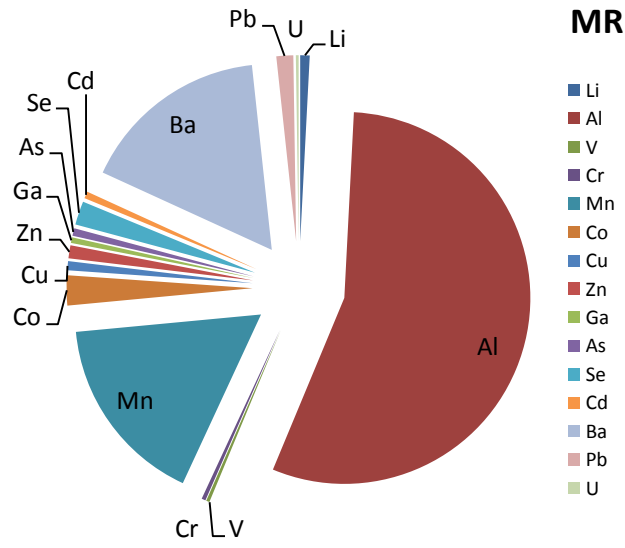
In particolare si nota come la percentuale di elementi minori, ossia diversi da Sr e Mg, non superi il 5% del totale degli elementi determinati (si ricorda che anche in questo caso, come per *M. galloprovincialis* e *C. gigas*, non si sta ragionando in termini di composizione percentuale della conchiglia dato che non sono stati considerati molti elementi che senza dubbio ne costituiscono la maggior parte quali, ad esempio, il calcio).

Al fine di mettere in luce il contributo dei singoli elementi alla porzione "ALTRI" e come tale contributo possa dipendere dal sito di provenienza delle conchiglie, sono stati preparati i grafici a torta presentati in **Figura 25**. Dal confronto di questi grafici emergono una serie di evidenze:

- in generale si evince che l'alluminio è l'elemento maggiormente presente dopo Sr e Mg con percentuali molto variabili che vanno dal 39% (VL) all'83% (B), seguito da Mn (5-23%) e Ba (4-22%);
- nei campioni dell'area della laguna di Venezia, la percentuale di Al è sempre superiore al 60% (per arrivare addirittura all'83% nel sito B) tranne che per il sito H (che si ferma al 42%); i siti A – ZI da un lato e i siti B – E dall'altro presentano composizioni confrontabili in termini percentuali che si differenziano da quella del sito H che fa gruppo a sé;
- i siti H e ZI presentano percentuali di Pb e Se maggiori rispetto agli altri siti della laguna di Venezia;
- per l'area del delta del Po si evidenzia una composizione percentuale sostanzialmente identica nei siti MR e SC (con percentuali di Al del 54%); il sito VL ha una percentuale di Al minore (Al: 39%), e ciò determina la distribuzione degli altri elementi in percentuali maggiori, ma analoghe a quelle degli altri due siti del delta del Po;
- anche nel caso dei due siti della laguna di Marano e Grado si osservano composizioni analoghe anche se differenziate in percentuale dal diverso apporto dell'alluminio (che nel caso di s16 supera il 60% mentre in s15 si attesta al 44%).







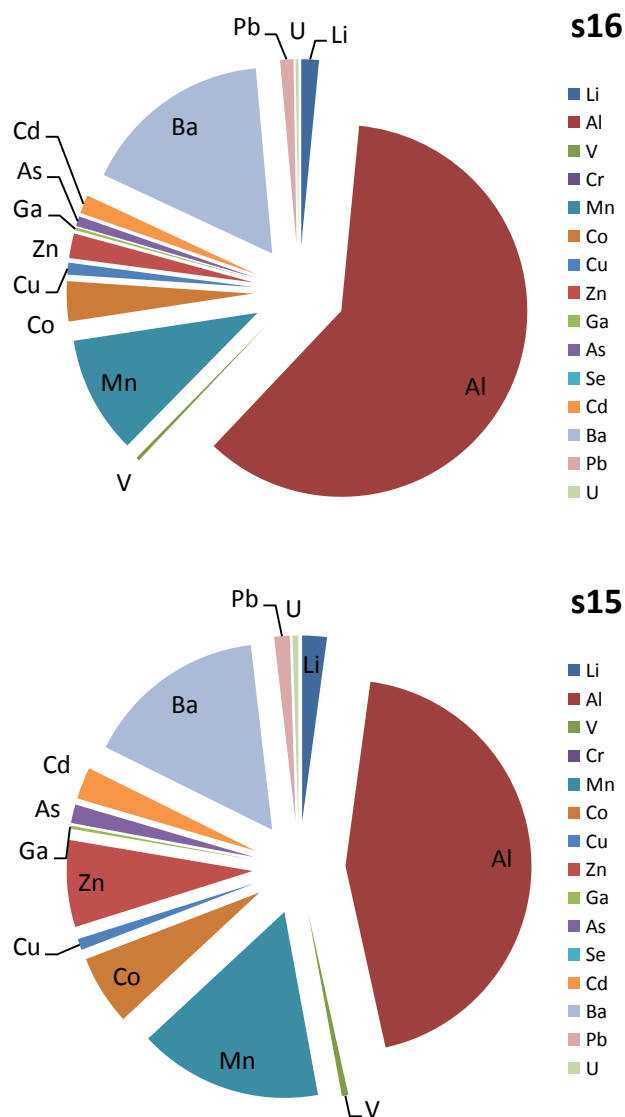
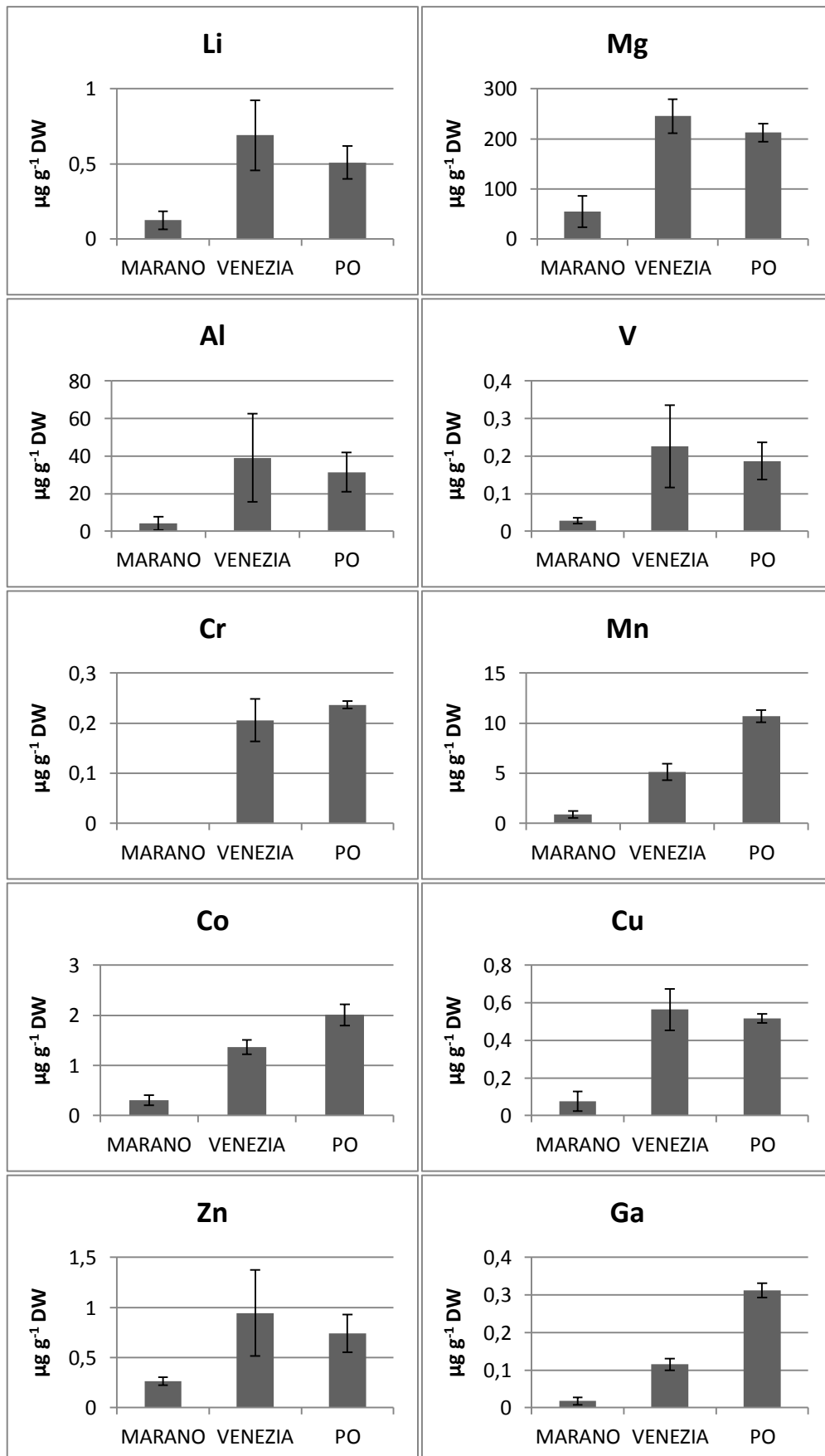


Figura 25: La distribuzione percentuale degli elementi definiti come “altri” in **Figura 23** e **Figura 24** nelle conchiglie di *V. philippinarum* nei differenti siti.

In generale, osservando il contenuto medio per sito degli elementi presenti nelle valve esclusi Sr e Mg (**Figura 25**), si nota come la composizione della valva nei diversi siti di campionamento sia sostanzialmente confrontabile in termini qualitativi.

Se si vuole, invece, fare un confronto in termini quantitativi tra le diverse aree è conveniente osservare i grafici che confrontano il contenuto medio per area relativamente a ogni elemento analizzato (**Figura 26**); a eccezione di Mn, Ba, Ga e Se, in generale le concentrazioni si presentano più simili per l’area del delta del Po e della laguna di Venezia rispetto a quelle della laguna di Marano e Grado.



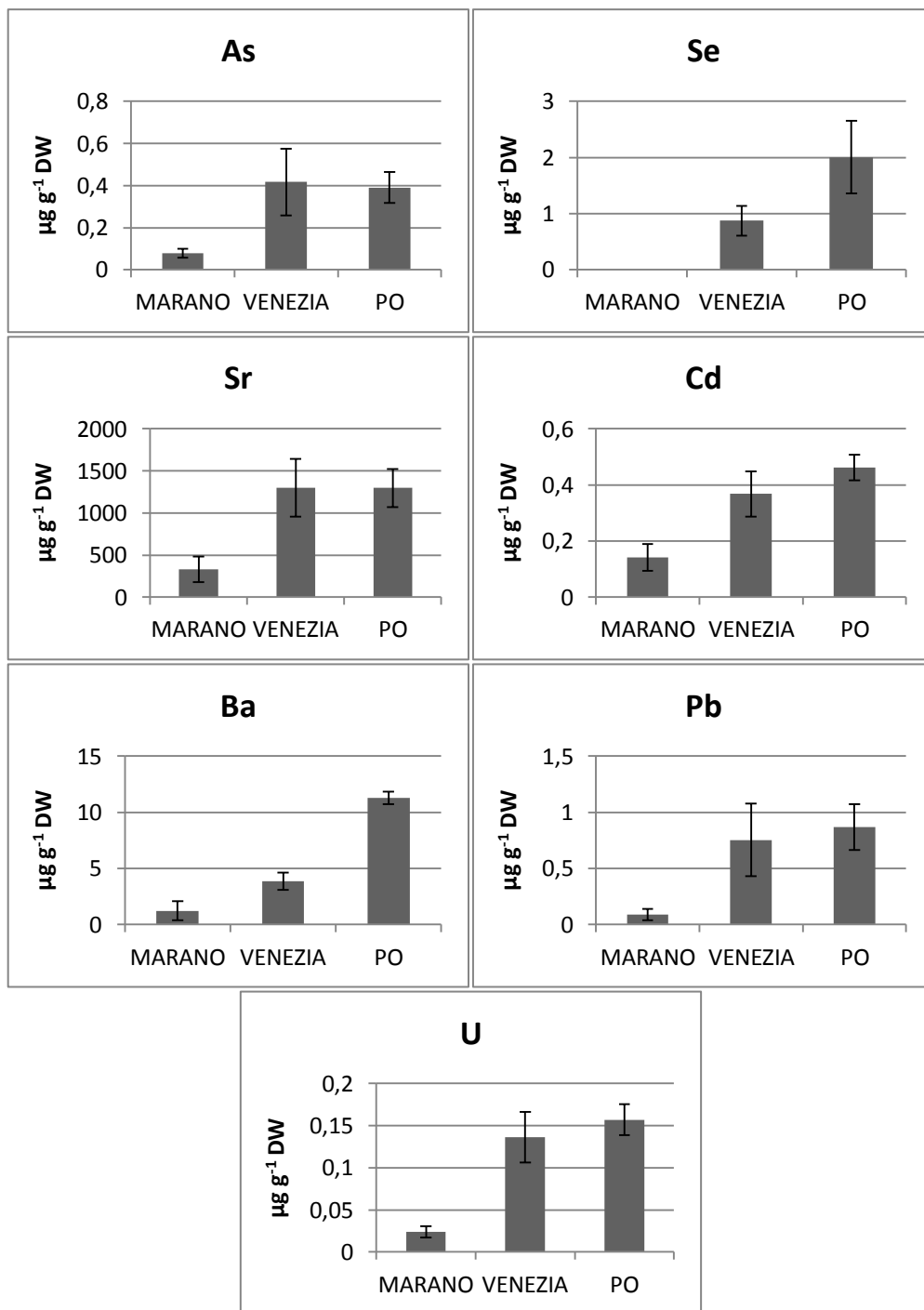


Figura 26: Confronto dei valori medi (con deviazione standard) per area della concentrazione in $\mu\text{g g}^{-1}\text{ DW}$ degli elementi considerati per le conchiglie di *V. philippinarum*.

Il contenuto più elevato sia in termini percentuali (**Figura 25**) sia in termini assoluti (**Figura 26**) di Mn e Ba nei siti VL, SC e MR (area del delta del Po) potrebbe essere legato al fatto che questi sono caratterizzati da una minore salinità dovuta agli importanti apporti fluviali: è noto, infatti, che le acque dolci sono più ricche di Mn e Ba a causa del fatto che la bassa salinità favorisce il rilascio di questi elementi dai sedimenti (Huanxin *et al.*, 2000, Beer *et al.*, 2011). D'altra parte è stato rilevato come le concentrazioni di Ba e Mn siano solitamente correlate e direttamente legate alle proprietà idrodinamiche e agli input di cibo dei vari siti (Lazareth *et al.*,

2003): in particolare Putten *et al.*, 2000 osservano che i periodici aumenti di Ba e Mn nelle conchiglie sembrano essere legati a processi simili, ossia all'aumento della concentrazione di particolato associata al bloom fitoplanctonico.

Al fine di comprendere se le variabili analizzate (le concentrazioni degli elementi nelle conchiglie di *V. philippinarum* misurate in tre areali differenti per apporto dal rispettivo bacino scolante e per idrodinamicità – pur appartenendo a un unico contesto geografico – e con caratteristiche sito-specifiche molto definite) sono in grado di discriminare e conseguentemente individuare degli insiemi di elementi (campioni) omogenei si è scelto di applicare due metodi statistici di raggruppamento, la *Cluster Analysis* e la *Principal Component Analysis*.

Per procedere con il trattamento statistico dei dati, in primo luogo sono stati eliminati gli *outliers*; quindi i dati mancanti presenti nella matrice di dati contenente le concentrazioni degli elementi nelle valve di *V. philippinarum* sono stati stimati tramite il metodo NIPALS (*Non-linear Iterative Partial Least Squares*). L'algoritmo NIPALS è una procedura iterativa utilizzata per stimare gli elementi dell'analisi delle componenti principali di un vettore casuale a dimensioni finite; una volta applicato su un dataset può fornire, sulla base del modello di PCA ottenuto, un algoritmo di calcolo per i dati mancanti (Preda *et al.*, 2010)

Sui dati opportunamente normalizzati (auto-scaling) sono state applicate, tramite il software XLStat Addinsoft™, la Cluster Analysis (metrica: distanza euclidea, metodo di agglomerazione: metodo di Ward) in *Q-mode* (raggruppamento dei campioni) e in *R-mode* (raggruppamento delle variabili) e la Principal Component Analysis (PCA). In particolare si sottolinea come in tutti i grafici seguenti riportanti i risultati della Cluster Analysis, la linea tratteggiata indica il livello di troncamento scelto per l'individuazione dei gruppi nel dendrogramma: in questo lavoro è stato utilizzato il criterio automatico di troncamento integrato nel software XLStat che determina il numero ottimale di gruppi tramite un approccio basato sull'entropia, come suggerito anche dalla letteratura (Sadaoui *et al.*, 2012).

Per quanto riguarda la Cluster Analysis, il dendrogramma risultante in Q-mode è riportato in **Figura 27**: emergono quattro raggruppamenti di cui il più dissimile è quello formato dai campioni provenienti dalla laguna di Marano e Grado (in verde); a seguire il raggruppamento in rosa costituito quasi esclusivamente dai campioni del delta del Po e i due raggruppamenti in marrone e blu che comprendono la quasi totalità dei campioni provenienti dalla laguna di Venezia.

La Cluster Analysis conferma in prima battuta la maggiore somiglianza tra i campioni provenienti dalla laguna di Venezia e quelli provenienti dal delta del Po, rispetto ai campioni della laguna di Marano e Grado come era già emerso dal confronto dei dati relativi alle concentrazioni medie dei vari elementi nelle tre aree considerate.

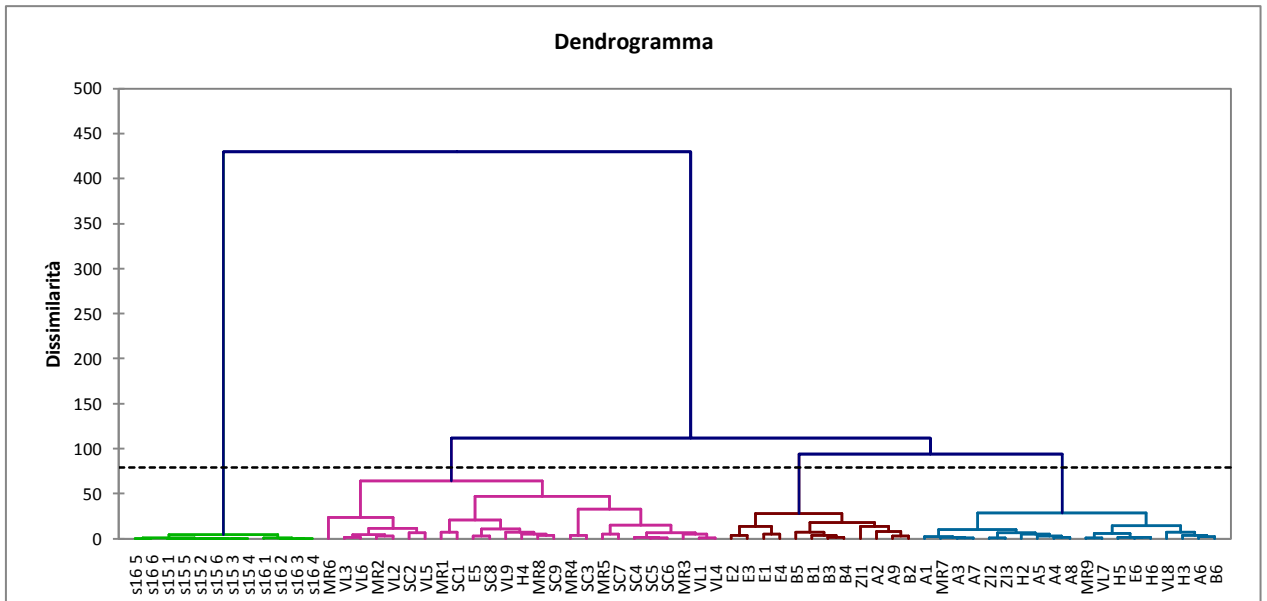


Figura 27: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle valve di *V. philippinarum*.

Al fine di mettere in luce il grado di correlazione tra le variabili e la loro importanza relativa è stata condotta la Cluster Analysis in R-mode: il dendrogramma risultante è riportato in **Figura 28**. La stessa analisi è stata condotta per le matrici di dati relative alle singole aree e i dendrogrammi risultanti sono riportati in **Figura 29**, **Figura 30**, **Figura 31**.

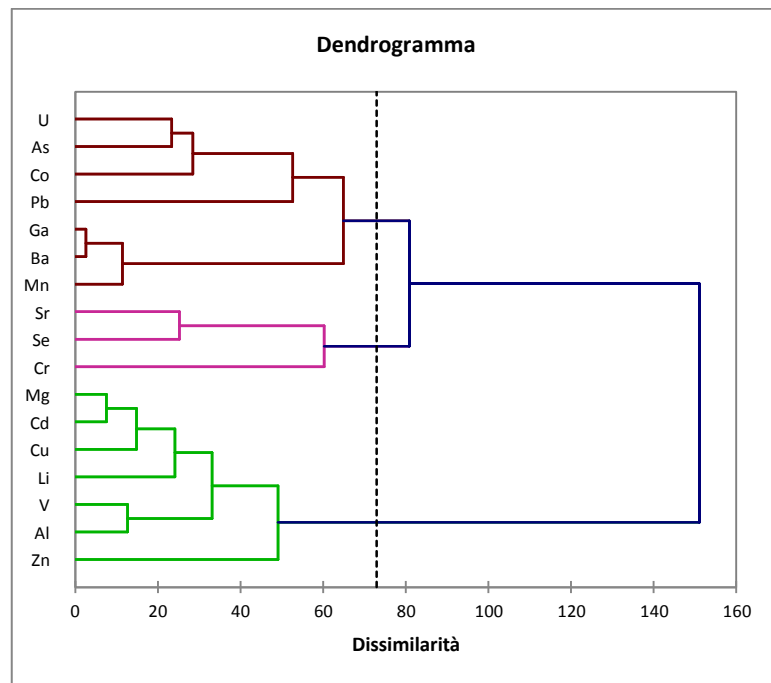


Figura 28: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle valve di *V. philippinarum* in tutte e tre le aree considerate.

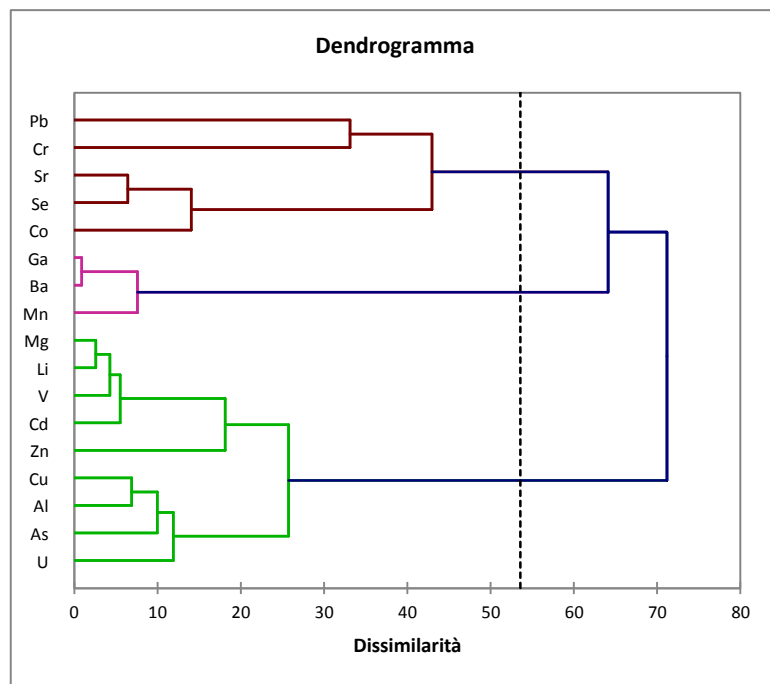


Figura 29: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle valve di *V. philippinarum* dell'area del delta del Po.

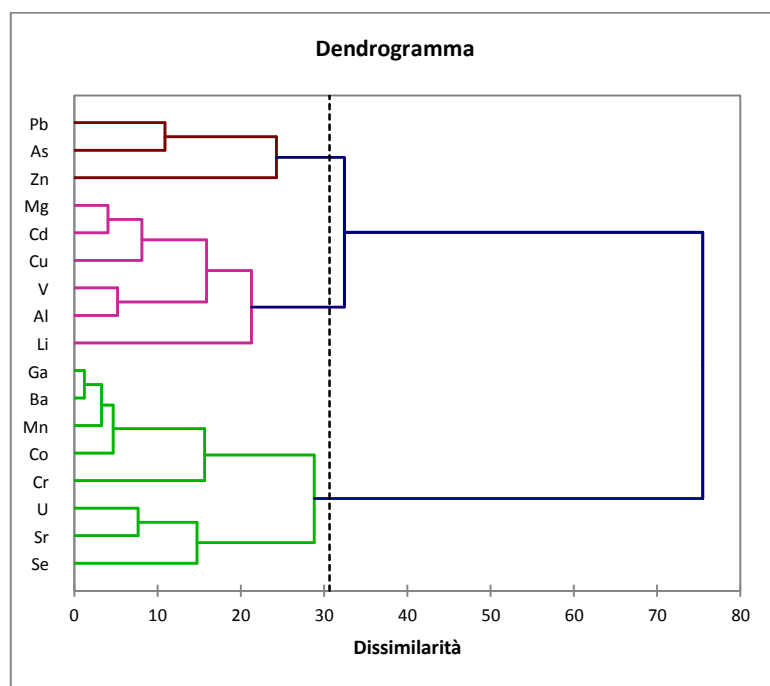


Figura 30: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle valve di *V. philippinarum* dell'area della laguna di Venezia.

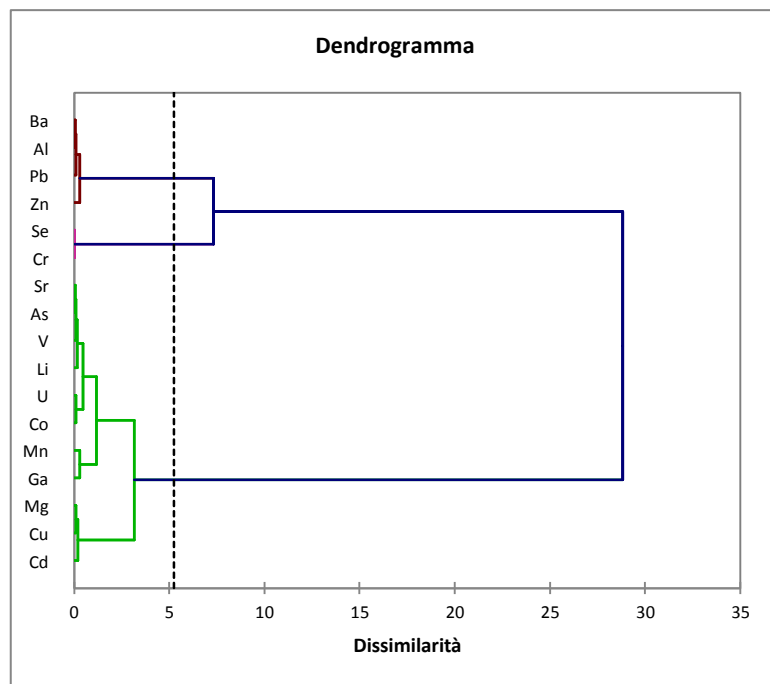


Figura 31: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle valve di *V. philippinarum* dell'area della laguna di Marano e Grado.

Dal confronto di **Figura 29**, **Figura 30**, **Figura 31** emerge come le variabili (gli elementi analizzati) si associno in maniera simile nelle aree della laguna di Venezia e del delta del Po e presentino un comportamento sostanzialmente diverso nei campioni di Marano e Grado. Questo aspetto è certamente legato sia alle particolari vie metaboliche seguite dagli elementi all'interno degli organismi Bivalvi (in particolare riguardo all'incorporazione nella valva), sia alle dinamiche e agli equilibri che coinvolgono questi elementi negli ambienti presi in esame e nelle matrici che li caratterizzano (acqua e sedimento).

Al fine di approfondire il contributo delle singole variabili alla descrizione dei dati è stata condotta una Principal Component Analysis (PCA) sulla medesima matrice utilizzata per la Cluster Analysis. Come si può osservare nello *score plot* riportato in **Figura 32**, anche in questo caso i campioni si suddividono nello spazio delle componenti principali secondo l'appartenenza alle 3 aree geografiche, confermando quanto già evidenziato dalle precedenti analisi statistiche. In particolare tra il secondo e il terzo quadrante ben definito è il gruppo dei campioni della laguna di Marano e Grado, nel primo quadrante è disposto il gruppo dei campioni del delta del Po e nel quarto quadrante quello dei campioni della laguna di Venezia.

determinate (L1, L2 e L3*) delle valve, anch'essi normalizzati: i risultati della Cluster Analysis sono riportati in **Figura 34** dove di nuovo si conferma la suddivisione in quattro gruppi dei quali il più dissimile è quello di Marano e Grado (a sua volta ben distinto tra i due siti), mentre gli altri comprendono

- solo i campioni del delta del Po (in rosa);
- campioni sia della laguna di Venezia, principalmente dei siti A e H, che del delta del Po (in marrone);
- prevalentemente campioni della laguna di Venezia (in blu).

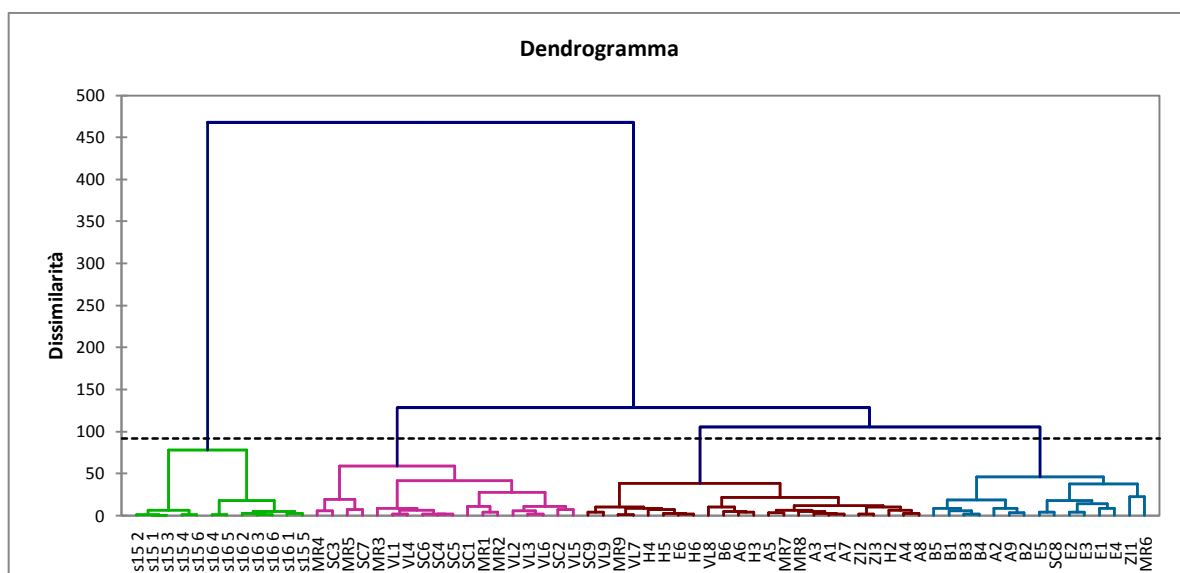


Figura 34: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode sulla matrice di dati avente come variabili gli elementi contenuti nelle valve e le caratteristiche dimensionali delle valve.

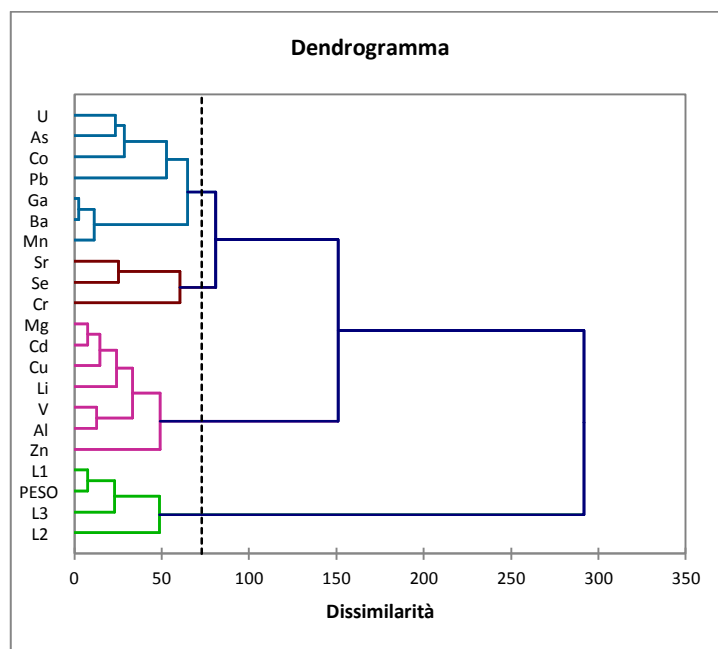


Figura 35: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode sulla matrice di dati avente come variabili gli elementi contenuti nelle valve e le caratteristiche dimensionali delle valve.

Anche in questo caso è stata eseguita la Cluster Analysis anche in R-mode (**Figura 35**): qui è evidente come le caratteristiche dimensionali delle valve, che sono raggruppate insieme in verde, siano decisive nell'operare la prima suddivisione tra i campioni della laguna di Marano e Grado e gli altri, mentre i livelli di concentrazione degli elementi intervengono successivamente nel suddividere i campioni della laguna di Venezia e del delta del Po.

Sulla stessa matrice è stata condotta la PCA che ha prodotto lo score plot di **Figura 36** in cui si nota come i campioni siano ben distinti nei quattro quadranti: nel secondo quadrante si trovano i campioni del sito 16, nel terzo quelli del sito 15, nel quarto i campioni del delta del Po e nel primo quelli della laguna di Venezia, anche se questi due ultimi gruppi si separano progressivamente, senza soluzione di continuità.

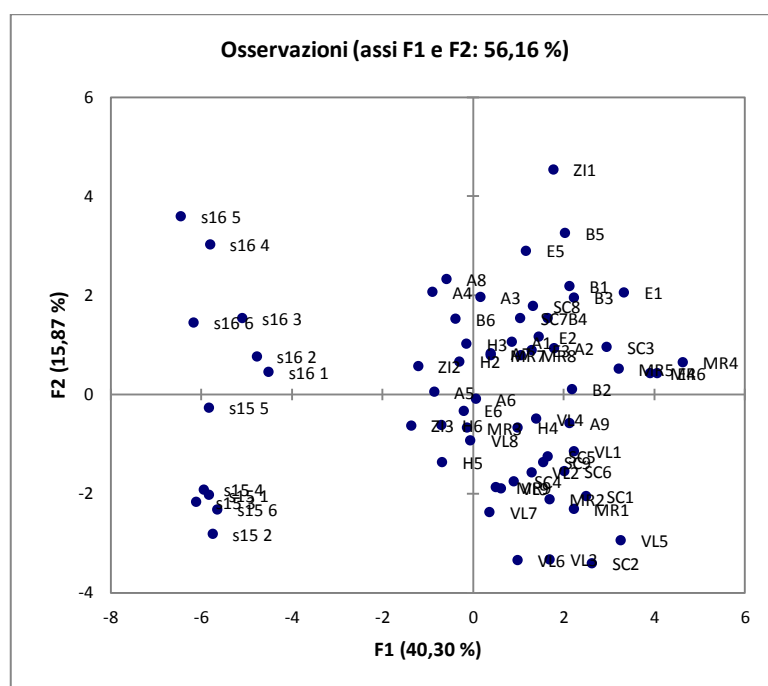


Figura 36: Score plot risultante dalla PCA applicata alla matrice avente come variabili gli elementi contenuti nelle valve e le caratteristiche dimensionali delle valve.

Come emerge dal loading plot di **Figura 37**, in questo caso la prima componente principale estratta, che spiega oltre il 40% della varianza, discrimina i siti sulla base delle caratteristiche dimensionali oltre che sulla base del contenuto totale di elementi presenti nella conchiglia.

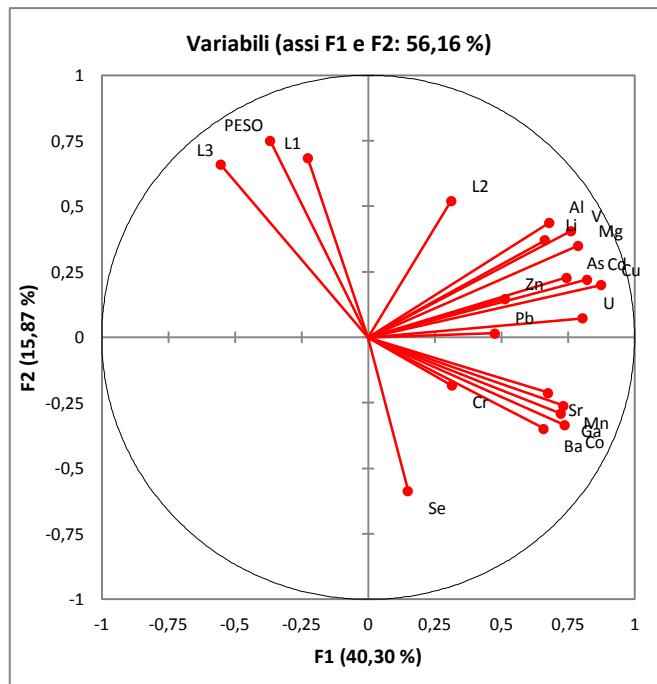


Figura 37: Loading plot risultante dalla PCA applicata alla matrice avente come variabili gli elementi contenuti nelle valve e le caratteristiche dimensionali delle valve.

Dall'osservazione dello score plot e del loading plot di **Figura 36** e **Figura 37** risulta che:

- i siti della laguna di Marano e Grado presentano un basso contenuto di elementi nelle valve;
- il sito 16 è caratterizzato da campioni con dimensioni (L1 e L3*) e peso più elevati rispetto a quelli del sito 15;
- i siti del delta del Po sono caratterizzati da dimensioni e peso più bassi e un contenuto relativamente più alto di elementi quali Se, Cr, Ba, Co, Ga, Mn e Sr nelle valve;
- i siti della laguna di Venezia sono anch'essi caratterizzati da dimensioni e peso elevati (in particolare L2) e in generale da un più elevato contenuto di Al, Li, V, As, Cd, Cu, Zn nelle valve;
- elementi come Pb e U non sono rilevanti ai fini della descrizione della variabilità dei siti.

Dal confronto delle due analisi statistiche condotte si può affermare che le caratteristiche dimensionali delle valve sono certamente importanti nel discriminare i campioni della laguna di Marano e Grado dai rimanenti, ma tale distinzione è operabile anche sulla base dei soli dati relativi alle concentrazione di elementi nelle valve.

Un'osservazione analoga si può fare per i campioni provenienti dalla laguna di Venezia e dal delta del Po che, pur non presentando una netta separazione, sono individuabili in entrambi gli score plot risultanti dalla PCA come due insiemi distinti, seppur in minima parte sovrappONENTI: questo risultato è confermato dalla Cluster Analysis che individua in entrambi i casi (con o senza l'inclusione delle variabili dimensionali) tre raggruppamenti, di cui uno contiene i campioni che presentano un comportamento "intermedio" tra quello degli altri due gruppi formati esclusivamente da campioni del delta del Po e della laguna di Venezia.

Questi risultati ci permettono di dire che è possibile discriminare i campioni sulla base della concentrazione di elementi presenti nelle valve (oltre che per le loro caratteristiche dimensionali): i gruppi individuati sono statisticamente significativi come si può vedere dai grafici di **Figura 34** e di **Figura 36** e trovano una corrispondenza con le aree di provenienza degli organismi.

Poiché le caratteristiche dimensionali non sono indispensabili per la suddivisione in gruppi, si può considerare che i fattori ambientali caratterizzanti le aree di studio influiscano, insieme alle caratteristiche fisiologiche degli organismi, sull'incorporazione degli elementi nelle conchiglie. Tali fattori sono dunque in grado di modificare la bioaccessibilità e la biodisponibilità degli elementi e conseguentemente il loro livello di assimilazione da parte dei Bivalvi, in particolare per quelli elementi presenti in quantità minori.

3.3 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Sulla base dei risultati ottenuti in questa prima parte relativi alle analisi condotte sui campioni di *Venerupis philippinarum* provenienti dalle aree del delta del Po, della laguna di Venezia e della laguna di Marano, e delle osservazioni riscontrabili nella letteratura e derivabili da lavori precedentemente svolti si possono effettuare le seguenti considerazioni:

- la concentrazione di elementi presenti all'interno delle valve di Bivalvi appartenenti a specie diverse dipende dalle caratteristiche specie-specifiche degli organismi considerati, ponderabile non solamente per un fattore di bioaccumulo degli stessi da parte del singolo organismo a breve termine (riscontrabile tipicamente nei soft tissue - dati non presentati), ma pure per il bioaccumulo a lungo termine nelle valve;
- la variabilità delle concentrazioni di elementi nelle valve di diverse popolazioni di una singola specie è riconducibile alle caratteristiche specifiche del sito di provenienza;
- la composizione della valva in termini di elementi in traccia è frutto dell'interazione di due forzanti principali date dalle specifiche tipologie di uptake, processazione e accumulo degli elementi da parte dell'organismo, da un lato, e dagli equilibri e le dinamiche che coinvolgono il singolo elemento nell'ambiente di crescita dell'organismo, dall'altro.

Questi risultati sono in linea con quelli reperibili in letteratura e confermano che è possibile considerare la conchiglia dei Bivalvi come un record chimico incrementale che è, per una certa quota, legato all'ambiente: l'interpretazione di questo record dipende dalla comprensione di come la composizione elementare della conchiglia sia influenzata dai parametri ambientali di interesse, nonché dalla comprensione di come i fattori biologici come la crescita e la fisiologia dell'organismo influenzino la composizione elementare della valva (Carroll & Romanek, 2008).

Secondo Al-Aasm *et al.* (1998), ad esempio, i fattori dominanti che determinano la composizione in particolare in termini di elementi in traccia nei minerali scheletrici sono da un lato la mineralogia, la temperatura, la salinità, la concentrazione di metalli e le loro dinamiche nell'acqua e dall'altro fattori biologici quali i tassi di crescita, lo stadio riproduttivo e la fisiologia, primariamente. In particolare i ricercatori osservano come la bassa salinità tenda ad aumentare la concentrazione degli elementi minori che si trovano nelle conchiglie e il tasso di crescita elevato provochi un aumento nella concentrazione degli elementi minori (in quanto la crescita rapida dei cristalli fa sì che vengano intrappolate impurità).

Quest'ultimo aspetto è emerso anche nel progetto di ricerca riguardante gli esiti della BIO₂REMEDIATION (*cfr.* **3.1.3 L'influenza della specie-specificità**) dove i più alti livelli di elementi minori evidenziati in *C. gigas*, rispetto a quelli registrati in *M. galloprovincialis*, sono stati ricondotti alla maggiore capacità di filtrazione dell'ostrica. Altri studi, tuttavia, pur concordando nel ritenere che la ritenzione degli elementi in traccia differisce tra le specie e gli elementi, riconducono questa differenza alla specie-specificità e elemento-specificità del

processo digestivo o alle differenze interspecifiche nelle strategie di accumulo dei metalli dalla fase disciolta tra i Bivalvi (Reinfelder *et al.*, 1997; Wang & Fisher, 1999).

D'altro canto è stata osservata una differenza sostanziale nei livelli di incorporazione degli elementi maggiori analizzati, Sr e Mg, nelle due specie provenienti dallo stesso sito: la differenza nella percentuale di Sr rilevato rispetto al totale degli elementi analizzati, molto più elevata nel mitilo rispetto a quella determinata dell'ostrica, dipende dalla diversa struttura microcristallina delle due conchiglie che vedono, nel caso del mitilo, il prevalere della forma aragonitica (che può ospitare ioni con raggio ionico maggiore a quello del Ca^{2+}) rispetto a quella calcitica (preferita dagli ioni come Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} che hanno raggio inferiore a quello del Ca^{2+}).

Il sostanziale accordo in letteratura rispetto a questo legame (Schöne *et al.*, 2010; Cravo *et al.*, 2002; Markich *et al.*, 2002; Sturesson, 1978) unito alla consapevolezza che la struttura microcristallina della valva è controllata direttamente dalle cellule del mantello tramite la sintesi della matrice organica, portano ad affermare l'esistenza di un'influenza genetica sull'incorporazione di Sr e Mg nella conchiglia dei Bivalvi. Carré *et al.* (2006) ritengono che si possa considerare la conchiglia il risultato di un processo di mineralizzazione "controllato biologicamente e programmato geneticamente" e sottolineano come questa affermazione sia supportata dalle importanti differenze nelle concentrazioni che si rinvencono tra i gruppi tassonomici e dal fatto che le variazioni di Sr e Mg nelle conchiglie non riflettono quelle nell'acqua di mare.

È interessante notare, tuttavia, come tra gli effetti ambientali meglio documentati sulla composizione chimica delle conchiglie, si riporti l'influenza della temperatura e della salinità sul contenuto di Sr e Mg (Fuge *et al.*, 1993; Almeida *et al.* 1998a), a significare che a seconda del disegno sperimentale utilizzato nello studio e dunque del punto di vista adottato è possibile mettere in luce, di volta in volta e per uno stesso elemento, la dipendenza da fattori biologici o ambientali.

Per questa ragione è stato necessario associare all'approfondimento bibliografico un lavoro sperimentale (*cf.* **3.2 Confronto fra siti**) riguardante il confronto della composizione di valve appartenenti alla medesima specie caratterizzate, però, da diverse aree di provenienza. Questa scelta, già adottata da altri gruppi di ricerca (Almeida *et al.* 1998a; Cravo *et al.*, 2002; Blackmore & Wang, 2003; Nuñez *et al.*, 2012 a titolo di esempio), permette di evidenziare l'influenza dei siti di raccolta sulla composizione finale della conchiglia.

Ad influire sui diversi meccanismi di uptake e sulle vie biochimiche che permettono la trasformazione degli elementi all'interno degli organismi e sul loro eventuale accumulo o escrezione, possono essere una varietà di fattori: tra questi la diversa salinità e temperatura dei siti, il loro regime idrico e in generale tutte le condizioni fisico-chimiche caratterizzanti, i livelli di concentrazione degli elementi rinvenibili nei vari siti, la maggiore biodisponibilità dell'elemento disciolto rispetto all'elemento associato al particolato nell'acqua. In questa fase si è scelto di non approfondire questi aspetti, ma di concentrarsi sulla possibilità di distinguere i campioni sulla base della loro provenienza basandosi esclusivamente sulla composizione elementare delle valve.

Ciò è stato possibile grazie all'utilizzo di tecniche statistiche di raggruppamento (Cluster Analysis e Principal Component Analysis) che hanno permesso di evidenziare come le variabili costituite dalle concentrazioni degli

elementi nelle valve siano significative nel suddividere i campioni in gruppi corrispondenti alle aree di provenienza. Tuttavia, l'inclusione delle variabili dimensionali nelle analisi statistiche ha messo in luce come anche le dimensioni e il peso delle valve siano determinanti nel separare i gruppi.

Quest'ultimo aspetto, evidenziato anche da Cravo *et al.* (2002), potrebbe sembrare collegato esclusivamente a fattori biologici, ma in realtà alcuni studi hanno dimostrato che anche il livello di inquinamento può determinare cambiamenti nel peso secco dei tessuti molli e nello spessore, nel peso secco, nella forma, nella microstruttura e nella composizione elementale della conchiglia dei Bivalvi: Nuñez *et al.* (2012), in particolare, notano che mentre le conchiglie provenienti da un'area altamente inquinata sono più spesse di quella meno inquinata, il peso secco delle conchiglie indica l'opposto, a significare che la robustezza nelle zone inquinate diminuisce.

D'altra parte, anche se è noto che le popolazioni di *V. philippinarum* della laguna di Venezia e in generale dell'Alto Adriatico presentano tra loro elevati valori di similarità dal punto di vista genetico, per quanto riguarda le popolazioni della laguna di Marano e Grado esaminate anche in questo studio, sono stati rilevati da Chiesa *et al.* (2011) e Breda (2012) valori di similarità (in termini genetici) maggiori con campioni della stessa specie provenienti dalla Spagna: ciò potrebbe aver influito sulla maggiore separazione di questo gruppo di campioni, in termini di composizione elementale delle conchiglie, rilevabile sia dai risultati della Cluster Analysis che della PCA qui presentati.

Questa ipotesi sembra confermare l'interpretazione di Putten *et al.* (2000) che rilevano come la variabilità intra- e inter-popolazione nella composizione chimica della conchiglia dei Molluschi Bivalvi sia controllata anche da fattori biologici, al punto che i record ambientali possono essere oscurati dagli andamenti ontogenetici così come dalle variazioni stagionali della fisiologia dell'organismo. Ciò nonostante i fattori sia ambientali che biologici confermano il loro ruolo centrale nella determinazione della composizione elementale delle valve.

4. PARTE SECONDA

BIOACCUMULO IN *Venerupis philippinarum*

4.1 ASPETTI INTRODUTTIVI

4.1.1 La laguna di Venezia

Numerosi sono i fattori che hanno fatto sì che la laguna di Venezia sia divenuta uno degli oggetti di studio più interessanti per le discipline scientifiche legate allo studio dell'ambiente, sia nel contesto nazionale che internazionale: tra questi certamente l'unicità della città di Venezia e i problemi legati alla sua salvaguardia, i poderosi interventi messi in atto sin dai tempi della Serenissima per conservare le funzionalità dell'ecosistema lagunare, gli impatti delle attività installate nell'ampia area industriale di Porto Marghera e la straordinaria ricchezza di eccellenze archeologiche, architettoniche, naturalistiche, paesaggistiche e culturali che convivono intersecandosi in un delicato e fragile equilibrio.

Si ritiene dunque poco funzionale ai fini della presentazione di questo lavoro riproporre qui la descrizione delle caratteristiche essenziali dell'ecosistema lagunare veneziano facilmente reperibili in tutti gli studi inerenti quest'area e peraltro già brevemente accennate in **3.2.1. Le aree di studio**: si preferisce in questa sede mettere l'accento su alcuni aspetti particolari che risultano utili alla comprensione dei risultati ottenuti in questo studio.

Il primo aspetto riguarda la complessa idrodinamicità che caratterizza la laguna veneziana in cui ampie aree di bassofondo sono collegate da una rete di canali che si ramificano gradualmente e si restringono in direzione delle aree parzialmente sommerse, quali le velme e le barene, e si approfondiscono e allargano in direzione delle tre bocche di porto (Lido, Malamocco e Chioggia) che garantiscono la connessione e il ricambio mareale proveniente dal mare Adriatico.

La circolazione delle acque all'interno del bacino è influenzata principalmente dall'oscillazione di marea, determinata da fattori astronomici ma influenzata dagli eventi meteorologici, e dai regimi ventosi che caratterizzano l'area geografica quali lo scirocco e la bora provenienti rispettivamente da sud-est e nord-est. Tali fattori interagiscono nel determinare un'elevata differenziazione dei tempi di residenza e di transito delle acque, delle direzioni di flusso prevalenti, dei valori di amplificazione o di smorzamento e rallentamento della marea sia tra aree differenti che nella medesima area in condizioni meteorologiche diverse.

Nonostante sia stato possibile fare luce su questa complessità mediante lo sviluppo sempre maggiore di capacità nel campo della modellistica numerica che hanno consentito di mettere a punto modelli idrodinamici efficaci e mappature dettagliate dell'area, la lenta e costante mutazione delle caratteristiche morfologiche della laguna richiede il continuo aggiornamento delle conoscenze acquisite in materia.

Anche questo secondo aspetto, la morfologia lagunare, è a sua volta legato a un insieme di fattori sia di origine naturale (l'apporto dei corsi d'acqua del bacino scolante, i processi di subsidenza ed eustatismo, l'idrodinamica del bacino e la forza delle correnti e delle maree, i processi biogeochimici che coinvolgono i sedimenti, gli effetti della componente biologica) sia di origine antropica (moto ondoso derivante dai natanti, le attività di pesca su bassi fondali, le attività di dragaggio lungo i canali e in generale le modifiche apportate dall'uomo al territorio lagunare).

Il peso di ciascuno di essi concorre nel determinare la tendenza complessiva del sistema e l'entità dei fenomeni che hanno luogo: in questa fase si assiste all'accentuarsi degli effetti legati all'azione antropica e all'instaurarsi di una serie di cambiamenti che stanno portando nella direzione di una "marinizzazione" della laguna che si traduce in una progressiva perdita delle strutture morfologiche, quali barene e velme, e in un sostanziale appiattimento della laguna che perde la sua complessa canalizzazione e assiste alla sempre maggiore erosione dei fondali.

Questi due aspetti, la complessa idrodinamica e morfologia lagunare e i mutamenti in atto, rendono difficile individuare delle aree omogenee all'interno del bacino e stabilirne le caratteristiche in maniera univoca. Ciò nonostante si ritiene possa essere valida la suddivisione della laguna proposta da Solidoro *et al.* (2004) che individuano quattro sottobacini (**Figura 38**):

- il bacino a sud (*Southern Basin, SB*) che risponde principalmente agli scambi con la bocca di porto di Chioggia;
- il bacino centrale (*Central Basin, CB*) che afferisce alla bocca di porto di Malamocco;
- il bacino a nord che può essere suddiviso a sua volta in due settori (*far-Northern Basin, NBn*, e *central Northern Basin, NBc*) influenzati dagli scambi con la bocca di porto del Lido che attraversano il canale di Treporti e il canale di san Nicolò rispettivamente.

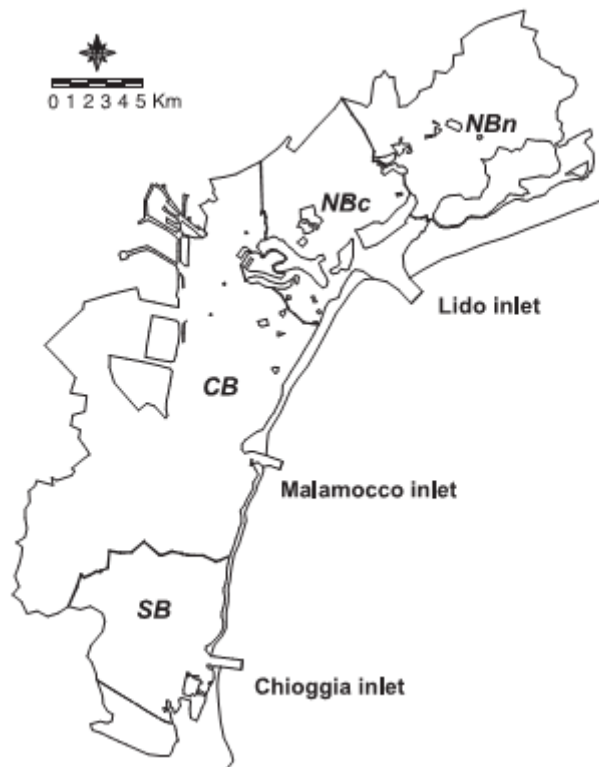


Figura 38: Suddivisione della laguna di Venezia in quattro sottobacini (da Solidoro *et al.*, 2004).

Questa suddivisione è risultata particolarmente utile nella scelta dei punti di campionamento per il presente lavoro e nell'approcciarsi all'approfondimento delle caratteristiche più salienti dell'ambiente lagunare e in

particolare agli studi che riguardano la contaminazione da parte di metalli (Donazzolo, 1981; Zatta *et al.*, 1992; Argese *et al.*, 1997; Bellucci *et al.*, 2002; Giusti e Zhang, 2002; Carrer *et al.*, 2005, Bernardello *et al.*, 2006) e il livello di trofia del sistema (Facca *et al.*, 2011).

Gli studi esaminati mettono in luce come le principali fonti di inquinanti antropogenici, tra cui i metalli pesanti, nella laguna di Venezia sono

- i corsi d'acqua che scorrono dal bacino scolante;
- l'area industriale di Porto Marghera;
- gli scarichi e il runoff proveniente dalle aree urbane (Venezia, Mestre e Chioggia principalmente);
- i prodotti di scarto dell'industria del vetro di Murano;
- l'intenso traffico marittimo.

In particolare l'area industriale di Porto Marghera è stata individuata come la fonte primaria di alcuni metalli (Zn, Cd, Pb, Cu, Co, Hg) che sono stati determinati nella zona centrale della laguna, riuscendo talvolta a connettere gli elementi a particolari produzioni industriali e a legare l'incremento temporale della contaminazione allo sviluppo dell'area industriale stessa (Bernardello *et al.*, 2006).

Tali fonti concorrono nel determinare il contenuto totale di metalli pesanti presente nell'acqua che si suddivide nella frazione solubile e nella frazione assorbita sulle particelle sospese: ciò nonostante la maggior parte dei metalli introdotti nella laguna precipitano come composti insolubili a causa del pH alcalino dell'acqua e si depositano conseguentemente nei sedimenti (Zatta *et al.*, 1992) con una distribuzione diversificata a seconda delle correnti di marea e delle proprietà geominalogiche del sedimento stesso (Bernardello *et al.*, 2006). La determinazione del contenuto in questo comparto risulta perciò particolarmente adatta per la valutazione del livello di contaminazione che caratterizza le diverse aree lagunari.

4.1.2 *Venerupis philippinarum* in laguna di Venezia

La laguna di Venezia è da oltre vent'anni uno dei più importanti siti per la pesca e l'allevamento di *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), meglio nota con il nome comune di vongola filippina o di *caparossolo*, come viene chiamata nel dialetto locale. La specie è stata introdotta nel 1983 (Cesari & Pellizzato, 1985), nell'ambito di alcuni allevamenti sperimentali con l'obiettivo di valutare la possibilità di diversificare il settore produttivo della molluschicoltura limitato, fino a quel momento, essenzialmente alla mitilicoltura.

La vongola di origine indo-pacifica si è dimostrata maggiormente resistente alle variazioni di temperatura e salinità, meno selettiva rispetto al substrato e dotata di un tasso di crescita più elevato rispetto alla specie autoctona *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758), caratteristiche che le hanno permesso di soppiantare la vongola nostrana e di formare, in breve tempo, banchi naturali adatti allo sfruttamento commerciale in quasi tutte le lagune e le zone estuarine dell'Alto Adriatico (Boatto & Pellizzato, 2005).

Il tratto di costa compreso tra Grado e la parte meridionale del delta del Po (canali adduttori delle Valli di Comacchio) è ricco di ambienti votati per lo sviluppo di questa specie grazie alla presenza di acque salmastre, fondali poco profondi e a tessitura mista (sabbia-silt), ma soprattutto dalla ricchezza di fitoplancton (Cautadella & Spagnolo, 2012) che insieme a cianobatteri, diatomee, batterioplancton e microzooplancton costituisce l'ampio range di cibo utilizzato da questo *filter-feeder* (Sorokin & Giovanardi, 1995).

Gli avvenimenti succedutisi hanno portato l'Italia, a partire dagli anni Novanta, a essere il primo produttore europeo di vongole filippine e il secondo al mondo dopo la Cina (FAO, 2010); nel contesto nazionale la produzione della laguna di Venezia costituisce la quota maggioritaria, almeno fino alla contrazione registrata nel 2009 che ha segnato l'inizio della crisi per il settore veneziano e ha determinato la diminuzione anche del valore nazionale, seppur in controtendenza rispetto agli andamenti mondiali (G.R.A.L., 2013).

In **Figura 39** si riporta la tabella pubblicata dal G.R.A.L. (2013) con il valore delle produzioni della laguna di Venezia, italiane e mondiali a partire dal 1990, dove si nota la drastica diminuzione del valore di produzione del comparto veneziano e nazionale a partire dal 2009. Bisogna sottolineare tuttavia che questo andamento è certamente esasperato dalla diversa origine dei dati che, a partire dal 2009, si riferiscono ai soli numeri ufficiali pubblicati dalla ASL competente, mentre in precedenza questi venivano integrati con stime esperte al fine di valutare anche la consistente quota di prodotto immessa sul mercato illegalmente.

Anno	Produzione Laguna di Venezia [t]	Produzione Nazionale [t]	Produzione Mondiale (t)*
1990	1.300	16.709	315.129
1991	2.400	27.116	403.981
1992	3.000	26.434	660.396
1993	4.500	21.448	952.069
1994	16.000	32.723	1.169.381
1995	38.000	56.045	1.149.278
1996	40.000	59.100	1.156.947
1997	39.000	58.401	1.236.624
1998	40.000	62.960	1.342.809
1999	40.000	63.970	1.672.999
2000	35.000	58.635	1.504.291
2001	24.400	46.188	1.847.836
2002	17.700	40.200	2.074.651
2003	25.500	> 40863 **	2.287.787
2004	23.800	> 44981**	2.511.186
2005	21.500	40.000	2.590.759
2006	25.000	56731**	2.719.941
2007	27.500	61724**	3.045.708
2008	22.000	61700**	3.110.037
2009	5.619	50000****	3.249.213
2010	4.762	nd	3.604.246
2011	2.926	33000 °	non disponibile
2012	1.794	non disponibile	non disponibile

Tabella 1: valori delle produzioni della Laguna di Venezia, Italiane e Mondiali a partire dal 1990. * Fonte FAO Fish statistic 2013; ** Fonte Veneto Agricoltura 2010; *** Fonte ISMEA 2008; **** Fonte ISMEA 2010; ° Fonte IRES 2012; ** dati relativi alle sole produzioni Alto Adriatiche da Fonte Veneto Agricoltura 2010; dati 1990-2002 fonte: Boatto e Pellizzato 2005.

Figura 39: Tabella pubblicata da G.R.A.L. (2013) riguardante la produzione di *V. philippinarum* in laguna di Venezia, in Italia e nel mondo a partire dal 1990.

Ciò nonostante la diminuzione della produzione lagunare a partire dai primi anni 2000 è certamente un fenomeno reale che può essere ricondotto a due fattori principali:

- l'eccessivo prelievo di seme nelle aree *nursery* (aree che hanno la vocazione per l'insediamento e lo sviluppo delle forme giovanili della specie) che non consente il ripopolamento;
- l'esaurirsi del fenomeno a feed-back definito come "Tapes paradox" (Libralato *et al.*, 2002; Pranovi *et al.*, 2003) secondo cui il sovrasfruttamento della risorsa mediante tecniche di raccolta che sospendono ingenti quantità di sedimento e rimettono in circolo nella colonna d'acqua nutrienti altrimenti intrappolati e non disponibili, ha avuto effetti positivi sulla risorsa stessa determinando un aumento della biomassa della vongola, nonostante il bilancio energetico del sistema sembrasse non essere in grado di fornire l'energia necessaria a tale produzione. (Magistrato alle Acque, 2008).

Questi effetti sono riconducibili al fatto che la pesca di *V. philippinarum* in laguna di Venezia è stata condotta, sin dal momento della sua diffusione, in assenza di alcuna forma di gestione determinando l'instaurarsi di un regime di libero accesso in cui la risorsa è stata sfruttata da parte di chiunque (esperto o meno del settore) sia riuscito a inserirsi nel mercato (Granzotto *et al.*, 2003; Boatto & Pellizzato, 2005); questa modalità di sfruttamento ha evidenziato fin da subito i suoi limiti in termini di sostenibilità, sollevando

- problemi ambientali: erosione e alterazioni granulometriche del sedimento con perdita della frazione fine a causa delle tecniche di raccolta (Pranovi *et al.*, 2003), mobilizzazione di nutrienti e inquinanti a variazione dei cicli biogeochimici, modificazione delle comunità bentoniche, diminuzione del livello trofico medio del sistema (Granzotto *et al.*, 2001 e 2003);
- problemi di ordine pubblico dovuti al susseguirsi di abusi e reati di diverso tipo;
- problemi igienico-sanitari legati alla vendita di prodotto insalubre;
- problemi socio-culturali tra cui l'abbandono dei tradizionali mestieri di pesca lagunare, e la conflittualità all'interno della categoria per la suddivisione del territorio (G.R.A.L., 2013).

Queste problematiche hanno avuto un impatto ben inferiore nella altre realtà produttive alto-adriatiche (come la laguna di Marano e il delta del Po) che, poco dopo l'introduzione della vongola filippina, hanno attuato la conversione a un sistema di acquicoltura su fondali in concessione raggiungendo, tra l'altro, un livello di equilibrio della produzione nel tempo, fatta eccezione per eventi di moria straordinaria.

Sulla base di queste esperienze la Provincia di Venezia, ente competente per la pesca e l'acquicoltura lagunare, ha ritenuto opportuno a partire dal 1999 promuovere il graduale passaggio a una gestione della risorsa basata sulla concessione ai singoli pescatori/allevatori delle aree in cui è possibile effettuare la raccolta di *V. philippinarum* in modo controllato, sulla base della valutazione competente del Magistrato alle Acque. La Provincia ha elaborato a proposito un *Piano di gestione* che suddivide la laguna in aree deputate alla semina, all'accrescimento e alla raccolta, normando l'attività di pesca con la determinazione di tempi, quantità di semina e prelievo e strumentazione da impiegare con l'obiettivo di promuovere il passaggio verso un regime di allevamento della vongola basato su cicli di semina dei giovanili, accrescimento e raccolta del prodotto maturo.

Tutti gli organi competenti ritengono questa strada l'unica percorribile per garantire un futuro stabile e duraturo alla categoria, nel rispetto dei delicati equilibri lagunari e dei processi di filiera produttiva controllata (G.R.A.L., 2006). In quest'ottica è stata costituita nel 2005 la società consortile "Gestione Risorse Alieutiche Lagunari" (G.R.A.L.) a cui il Magistrato alle Acque assegna, di anno in anno e sulla base di attente valutazioni, la concessione provvisoria di determinate aree per l'esercizio delle attività di venericoltura e pesca gestita; essa si pone come obiettivi (G.R.A.L., 2006):

- la gestione razionale del seme selvatico nelle aree *nursery* con l'obiettivo di poter garantire nel tempo le produzioni da allevamento;
- il controllo della filiera produttiva al fine di garantire un prodotto salubre e di qualità a tutela del consumatore;
- la riduzione degli effetti della raccolta di *V. philippinarum*, tramite la valutazione dei fattori e processi che hanno impatti rilevanti sull'ambiente e l'introduzione di accorgimenti atti a diminuire tali impatti;
- la gestione mirata al contenimento delle aree destinate a venericoltura e del numero di operatori coinvolti;
- la verifica dei livelli produttivi delle aree in concessione sulla base della capacità portante dell'ambiente e dei quantitativi seminati;
- la riduzione del fenomeno dell'abusivismo, la repressione di condotte illecite e l'introduzione di pratiche virtuose tra gli operatori del settore.

La costante verifica dell'utilizzo e dell'idoneità dei 3500 ettari che il Magistrato alle Acque aveva inizialmente concesso a G.R.A.L. nel 2005 ha portato alla progressiva riduzione delle superfici, una riduzione che giunge al 43,6% della quota originaria nel dicembre 2012, con una superficie complessiva destinata a venericoltura pari a 1975,71 ettari (si veda **Figura 40**). Le aree in concessione ammontano a 567,08 ettari nella zona a nord della città di Venezia, 705,8 ettari in laguna centrale, 36,88 ettari nella zona antistante a Pellestrina e 665,9 ettari nella zona di Chioggia.

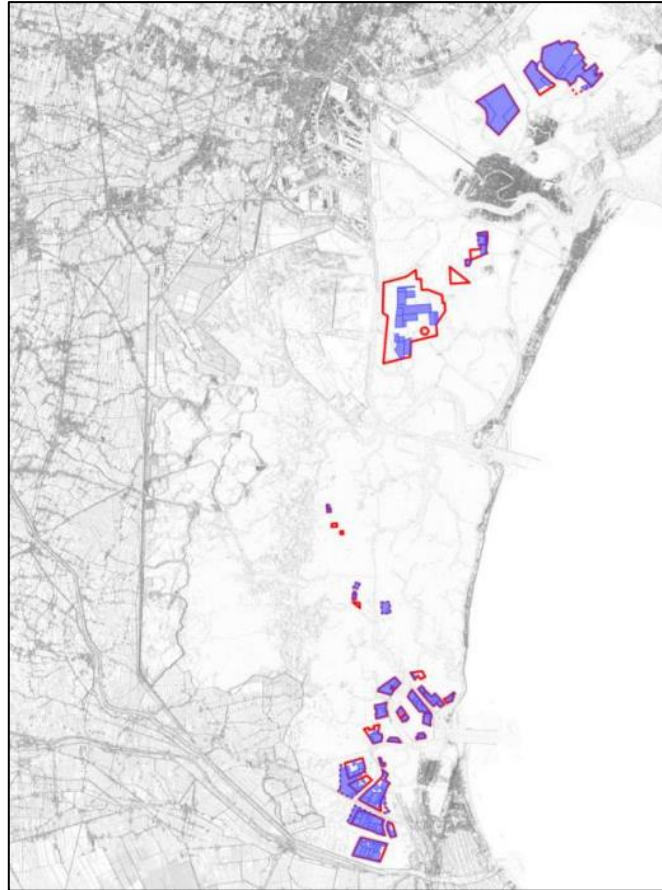


Figura 40: Limiti delle aree concesse dal Magistrato alle Acque a G.R.A.L. (in rosso) e aree sub-concesse da G.R.A.L. agli operatori dell'venericoltura (in blu) aggiornate al dicembre 2012 (G.R.A.L., 2013).

4.1.3 Piano sperimentale

Il profondo livello di conoscenza dell'ecosistema lagunare veneziano e della fisiologia ed ecologia della specie *V. philippinarum*, che in esso ha saputo stabilirsi con così tanto successo da essere oggi diffusa in tutti i sottobacini lagunari, ha suggerito l'opportunità di approfondire lo studio dei processi di bioaccumulo dei metalli nelle conchiglie dei Bivalvi attraverso la comparazione della composizione elementare dei diversi comparti delle vongole filippine prelevate nella laguna di Venezia.

Inoltre, poiché *V. philippinarum*, oltre ad essere un'importante risorsa economica per la pesca nelle lagune del Nord Adriatico dove questa specie è pescata e coltivata, è considerata un buon indicatore del livello di contaminazione (Berto *et al.*, 2012; Maggi *et al.*, 2012; Boscolo Papo *et al.*, 2014) è stata qui utilizzata anche con l'obiettivo di mettere a confronto popolazioni prelevate in diverse aree per verificare il livello di contaminazione ambientale da metalli.

Al fine di raggiungere questi obiettivi è stato ritenuto opportuno associare alle analisi degli organismi, quelle relative al sedimento: è noto infatti che il contestuale monitoraggio dei sedimenti e del biota può fornire utili indicazioni rispetto alle modalità di bioaccumulo e può essere utilizzato per descrivere lo stato generale di contaminazione, per confrontare il livello di contaminazione in aree diverse e per identificare possibili fonti di

contaminazione. In particolare nell'ottica del monitoraggio degli andamenti ambientali, il sedimento e il biota sono le matrici più indicate in quanto capaci di integrare l'inquinamento di un determinato corpo d'acqua nel tempo e nello spazio; i cambiamenti nel livello di inquinamento in questi comparti non sono così veloci come nella colonna d'acqua e dunque è possibile fare dei confronti a lungo termine (Maggi *et al.*, 2012).

Il piano sperimentale (la parte cerchiata in giallo in **Figura 41**) è stato perciò messo a punto in modo da prevedere il prelievo nelle medesime stazioni di campioni di *V. philippinarum* e di sedimento su cui effettuare una prima caratterizzazione (determinazione degli indici di condizione nel caso delle vongole e determinazione della granulometria, umidità e contenuto di sostanza organica per i sedimenti) e la successiva determinazione della composizione elementare (per entrambe le matrici); nel caso del sedimento è stato ritenuto opportuno associare a queste analisi una valutazione della biodisponibilità degli elementi analizzati nel sedimento attraverso una procedura di speciazione geochemica come suggerito da Perin *et al.* (1997).

L'approfondimento delle problematiche connesse alla diffusione della venericoltura in laguna di Venezia e il confronto con le realtà operanti nel settore e/o direttamente coinvolte nella gestione dell'ambiente lagunare e nella sua salvaguardia ha portato alla luce la possibilità di completare lo studio riguardante le capacità di bioaccumulo da parte delle conchiglie di Bivalvi attraverso una serie di analisi focalizzate alla determinazione delle caratteristiche del materiale di risulta derivante dalla raccolta della vongola filippina composto principalmente di conchiglie vuote di Bivalvi e Gasteropodi.

Lo studio delle caratteristiche di questo materiale, che si configura come uno scarto di lavorazione, ha permesso, da un lato, di proseguire l'indagine riguardante lo stoccaggio di metalli pesanti nelle matrici carbonatiche e l'influenza data dai fattori ambientali e specifici, e, dall'altro lato, di implementare le conoscenze acquisite tramite l'individuazione di possibili modalità di utilizzo di materiale costituito essenzialmente da conchiglie di Molluschi. La procedura sperimentale che è stata sviluppata allo scopo è presentata in **Figura 41** nella parte non cerchiata in giallo e verrà trattata estesamente nella **Parte terza** del presente lavoro di tesi.

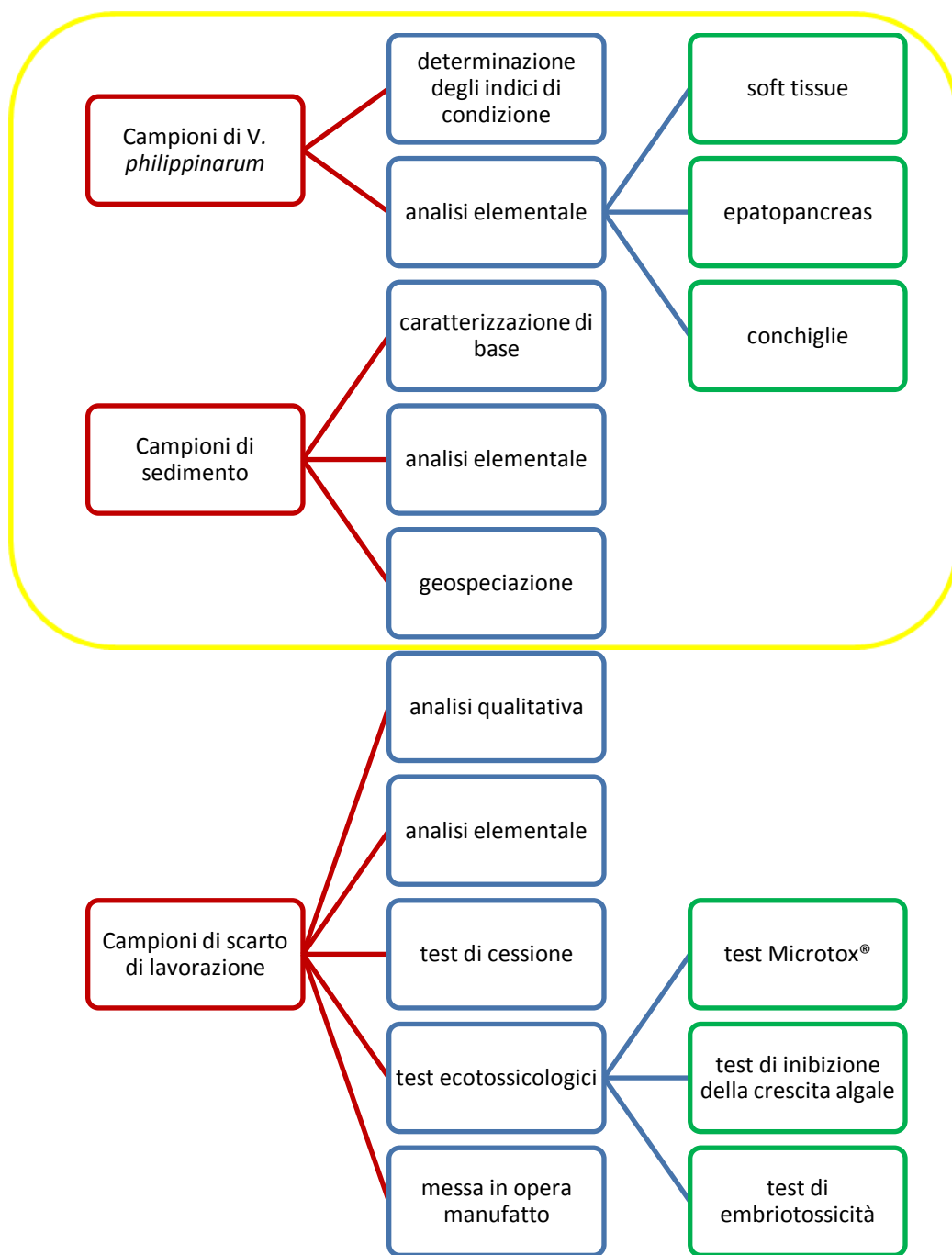


Figura 41: Schema della procedura sperimentale; cerchiare in giallo le fasi prese in esame in questo capitolo (Parte seconda).

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Campionamento

I punti di campionamento utilizzati per il prelievo dei campioni di *V. philippinarum*, sedimento e scarto di lavorazione sono stati individuati in accordo con il G.R.A.L., l'Ente Gestore delle Risorse Alieutiche Lagunari, e sulla base delle conoscenze precedentemente acquisite tramite l'approfondimento bibliografico. Le stazioni di campionamento individuate in laguna di Venezia sono elencate in **Tabella 3**, dove sono riportate anche le coordinate GPS (Sistema WGS 84, World Geodetic System 1984) e gli identificativi che verranno utilizzati d'ora in avanti; la posizioni delle stazioni sono visibili in **Figura 42** dove sono indicate con le sigle identificative: B, V, A, EC e EF.

Tabella 3: Stazioni di campionamento in laguna di Venezia.

Stazione	ID	latitudine	longitudine
Palude del Monte	B	45°28'40.98"N	12°20'23.48"E
Verto	V	45°24'24.35"N	12°15'18.62"E
Area della Busa	A	45°23'54.51"N	12°15'57.27"E
Perognola (concessione)	EC	45°15'14.32"N	12°15'48.97"E
Perognola (fuori concessione)	EF	45°15'18.11"N	12°15'37.19"E



Figura 42: Disposizione dei punti di campionamento in laguna di Venezia (immagine da Google Earth).

In dettaglio:

- in laguna nord si trova il punto di campionamento B (Palude del Monte, al limite dell'area in concessione a GRAL, di fronte all'aeroporto di Tessera, si vedano **Figura 43** e **Figura 44**);



Figura 43: Punto di campionamento B in laguna centrale (immagine da Google Earth).

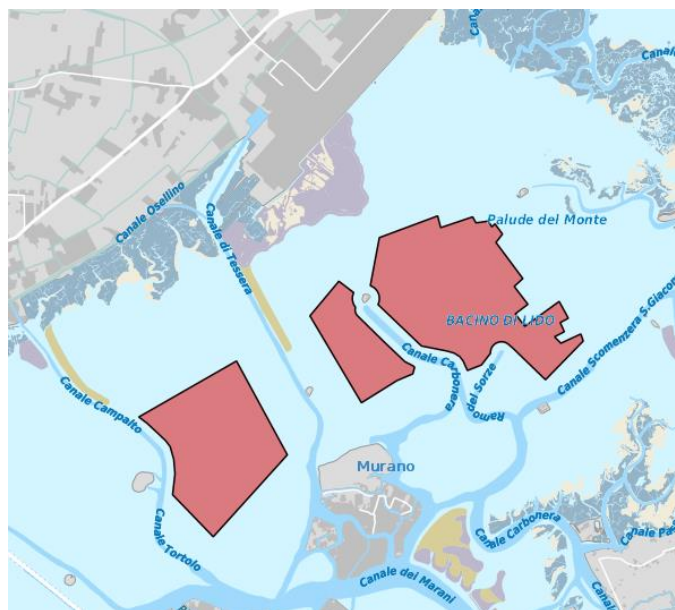


Figura 44: In rosso, le aree destinate a venericoltura in laguna centrale a nord di Venezia, gestite dal GRAL (Atlante della laguna, 2006).

- in laguna centrale si trovano i punti di campionamento V (Verto, area a sud della zona industriale di Porto Marghera) e A (area “della Busa”, in concessione a GRAL) - si vedano **Figura 45** e **Figura 46**;



Figura 47: Punti di campionamento EC e EF in laguna sud (immagine da Google Earth).

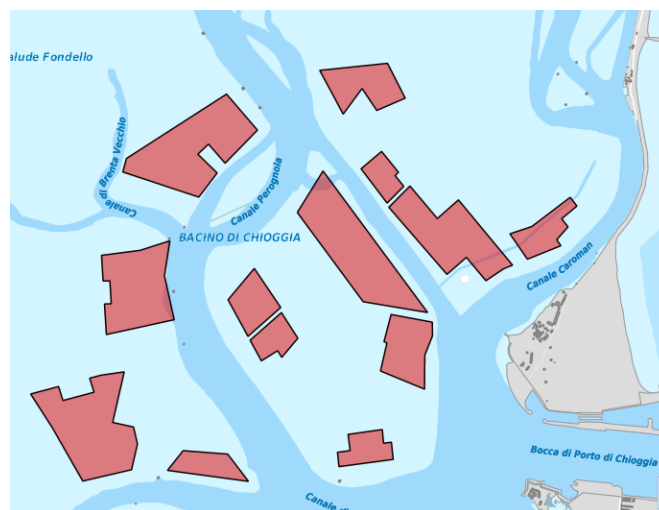


Figura 48: In rosso, le aree destinate a venericoltura gestite dal GRAL in laguna sud (Atlante della laguna, 2006).

Ogni stazione (ad esclusione di EF) è stata caratterizzata durante il campionamento attraverso la determinazione di parametri chimico-fisici e meteorologici riportati in **Tabella 4**.

Tabella 4: Parametri chimico-fisici e meteorologici determinati durante il campionamento.

	data	orario	cond. meteo	pH	OD (%)	OD (mg L ⁻¹)	T (°C)
A	10/04/2013	07:30	buone	8,18	95,1	10,38	11,1
B	15/04/2013	09:15	buone	8,43	96,8	11,47	17,2
EF	11/04/2013	09:00	buone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EC	11/04/2013	09:15	buone	8,20	93,8	9,80	12,4
V	10/04/2013	07:00	buone	8,13	92,3	10,12	11,7

Si noti (cfr. **3.2.2 Materiali e metodi**) che i punti di campionamento B, A ed EC/EF corrispondono a quelli della campagna 2009 di Baccarani (2012) per i quali si è già proceduto, nella prima parte del presente lavoro, all'analisi elementale nelle conchiglie: ciò evidentemente costituisce un notevole vantaggio per poter evidenziare anche eventuali evoluzioni temporali.

Il campionamento ha avuto luogo nel mese di aprile e le uscite sono state condotte con due tipologie diverse di imbarcazioni normalmente utilizzate per la raccolta di *V. philippinarum* in laguna di Venezia: le operazioni di raccolta sono state condotte dagli operatori professionisti mediante l'utilizzo di due diverse tecniche entrambe basate sul principio di penetrare il sedimento per recuperare il bivalve infossato:

- nei punti di campionamento B, V, A, è stata impiegata la "rusca" chioggiotta, una gabbia metallica costituita da un'intelaiatura con due aperture, una provvista alla base di una lama e di due pattini che le impediscono di sprofondare e l'altra, più piccola, collegata alla rete di raccolta; l'intera struttura opera in vicinanza di un motore fuoribordo ausiliario (15-20 HP) posto su un lato dell'imbarcazione la cui azione consente di rimuovere il sedimento del fondo e spingere il pescato all'interno del telaio; il tutto è caricato su imbarcazioni di modeste dimensioni, i cosiddetti "barchini" (**Figura 49**). Questa tecnica si è particolarmente diffusa in laguna centrale in seguito all'abbandono della turbosoffiante (si veda paragrafo successivo) a causa dell'aumento della pesca illegale e della necessità di avere un mezzo veloce e un attrezzo facilmente manovrabile che può essere utilizzato anche dove l'acqua è più bassa; oggi è tuttavia utilizzata regolarmente dai pescatori/allevatori che operano regolarmente nelle aree date in concessione dal G.R.A.L.



Figura 49: Prelievi effettuati nei punti di campionamento B, V e A mediante "rusca" chioggiotta montata su barchini: la rusca (a), tipologia di imbarcazione utilizzata per questo tipo di pesca (b), il prelievo nel punto B (c) – foto G. Cipolato.

- nei punti di campionamento EC e EF, è stata utilizzata la draga vibrante, una sorta di grosso rastrello trainato su un fondo sabbioso che setaccia e trattiene i Bivalvi senza l'ausilio di getti d'acqua ad alta pressione, utilizzati invece nella draga idraulica, la cosiddetta "turbosoffiante" il cui uso è proibito ai sensi del D.M. 29 maggio 1992 per la pesca della vongola filippina e comunque in acque con profondità inferiori ai 3 m; l'attrezzo è montato a prua su imbarcazioni dedicate, chiamate "vongolare", particolarmente diffuse nell'area di Chioggia, specificatamente adattate per l'utilizzo in laguna, e viene

trainato in linea retta grazie al verricello che riavvolge il cavo dell'ancora precedentemente calata (**Figura 50**).

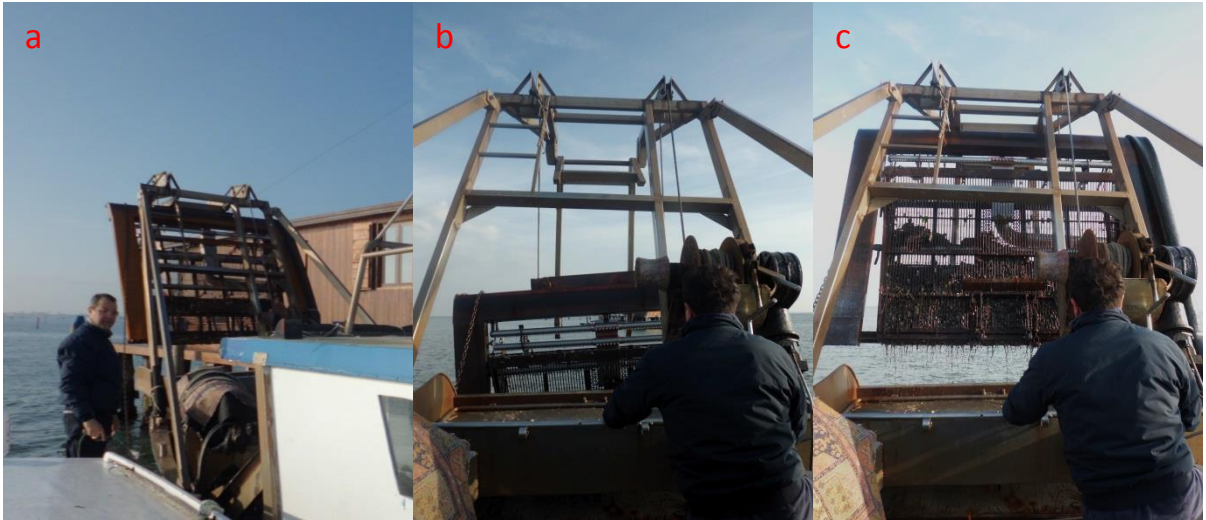


Figura 50: Prelievi effettuati nei punti di campionamento EC e EF mediante draga vibrante montata sulla prua di una vongolara: particolare della prua dell'imbarcazione (a), la cala della draga (b), la draga issata con il pescato (c) – foto G. Cipolato.

Nel primo caso (punti di campionamento B, V e A), il pescato viene vagliato al fine di separare le specie di interesse commerciale dal resto tramite strumenti azionati dagli operatori (*cf.* **5.2.1 Campionamento**) e, infine, tramite la cernita manuale che si avvale, ovviamente, delle capacità maturate dagli operatori con l'esperienza, che consentono, tra l'altro, di riconoscere velocemente le diverse specie di Bivalvi nonostante siano ancora coperte dal sedimento (**Figura 51**).



Figura 51: Cernita effettuata a mano dagli operatori dopo il prelievo nel punto V – foto G. Cipolato.

Nel secondo caso (punti di campionamento EC e EF), una volta terminata la cala, il pescato viene issato a bordo, sciacquato con acqua corrente e selezionato per taglia attraverso il vaglio meccanico a motore, dotato di una serie di vassoi vibranti con fori di diametri diversi (*cf.* **5.2.1 Campionamento**). Questo sistema è in grado di selezionare con elevata precisione gli individui di *V. philippinarum* di taglia commerciale; tuttavia anche in questo

caso la cernita finale viene effettuata a mano dagli operatori prima che le vongole finiscano nelle cassette (Figura 52).



Figura 52: Cernita effettuata a mano dagli operatori in zona canale Perognola prima di porre le vongole nelle cassette – foto G. Cipolato.

Nei siti di campionamento prescelti sono stati prelevati

- campioni di *V. philippinarum* destinati alla commercializzazione sui quali valutare l'indice di condizione e il contenuto elementale (nelle valve, nell'epatopancreas e nei tessuti molli), posti in sacchetti di plastica sigillati e successivamente in freezer a -20 °C per l'opportuna conservazione;
- campioni di sedimento (in tutti i siti tranne EF) per analizzare la composizione elementale, oltre che il contenuto nelle diverse fasi ottenute tramite la procedura di estrazioni sequenziali per la speciazione geochimica, al fine di procedere, tra l'altro, al calcolo del fattore di bioaccumulo;
- campioni di materiale conchigliare costituente lo scarto dalle fasi di vagliatura successiva alla raccolta di *V. philippinarum*, al fine di valutarne la composizione qualitativa e quantitativa (in termini di concentrazione di elementi), per sottoporlo successivamente a test di cessione e test ecotossicologici come descritto in **5. Parte terza**.

In particolare i campioni di sedimento superficiale, due per ogni stazione di campionamento, sono il risultato dell'omogenazione *in situ* di 3 prelievi diversi effettuati mediante benna a barca ferma e a motore spento in punti vicini. I campioni sono stati conservati in contenitori di HDPE a -20 °C; uno dei due campioni è stato utilizzato per l'analisi elementale e la geospeciazione, l'altro è stato utilizzato per le analisi granulometriche.

4.2.2 Determinazione degli indici di condizione

Sulla base di quanto emerso nel corso dell'approfondimento bibliografico, è stato ritenuto opportuno determinare gli indici di condizione per i campioni di *V. philippinarum*: è noto, infatti, che tali indici, sia quelli che

considerano il rapporto tra pesi che quelli che considerano il rapporto tra peso e volume, sono utili per accertare lo stato nutritivo dei bivalvi o per determinare se l'animale si trova sottoposto a condizioni di stress (Crosby & Gale, 1990). Questa capacità è legata al fatto che gli indici di condizione evidenziano i cambiamenti a lungo termine degli individui e in particolare del loro stato di nutrizione (Boscolo *et al.*, 2003).

Per la determinazione degli indici di condizione sono stati utilizzati 30 campioni di *V. philippinarum* per ogni sito considerato; dopo aver separato i tessuti molli dalla conchiglia tramite bisturi, aver atteso lo scongelamento dei campioni e averli asciugati con carta assorbente, sono stati determinati:

- il peso dei tessuti molli, in g WW, tramite bilancia analitica (A & N Instruments LTD);

e, dopo essiccazione in stufa a 80 °C per 48 ore e raffreddamento

- il peso delle due valve e dei tessuti molli, in g DW, tramite bilancia analitica (A & N Instruments LTD);
- l'altezza lungo l'asse umbo-ventrale (**L1**), la lunghezza lungo l'asse antero-posteriore (**L2**) e lo spessore (**L3**), in cm, delle due valve tramite calibro come indicato in **Figura 14** (in **3.2.2 Materiali e metodi**).

In questo caso il parametro L3 è riferito allo spessore complessivo delle due valve chiuse a differenza di quanto descritto in **3. Parte prima**, dove il parametro L3* si riferisce allo spessore della sola valva sinistra. Si riportano di seguito i risultati relativi al peso delle conchiglie (SH, **Figura 53**) e dei tessuti molli (ST, **Figura 54**) in g DW e alle tre lunghezze L1 (**Figura 55**), L2 (**Figura 56**), L3 (**Figura 57**).

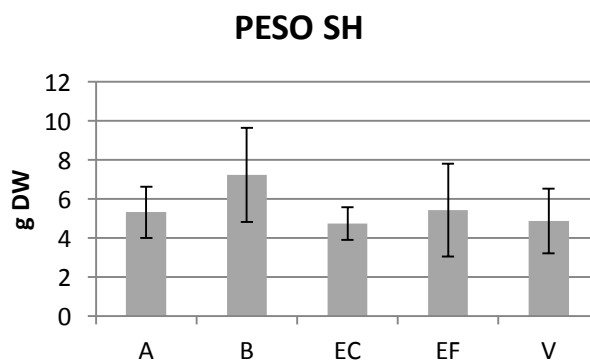


Figura 53: Peso medio in g DW e deviazione standard (n= 30) delle due valve di *V. philippinarum* nei siti considerati.

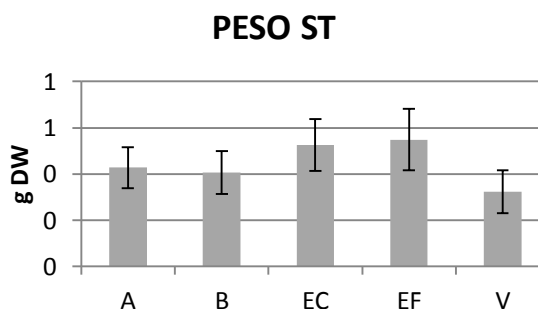


Figura 54: Peso medio in g DW e deviazione standard (n= 30) dei soft tissue di *V. philippinarum* nei siti considerati.

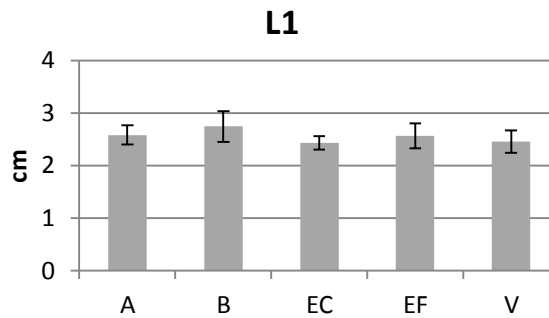


Figura 55: Altezza media in cm e deviazione standard (n= 30) delle valve di *V. philippinarum* nei siti considerati.

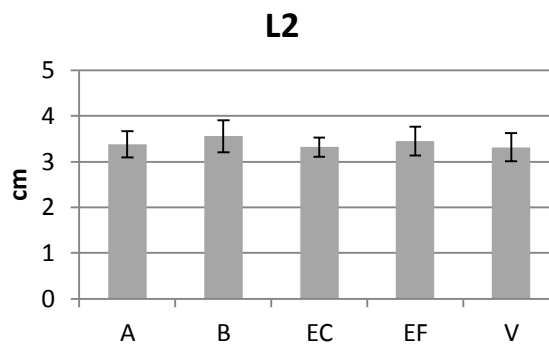


Figura 56: Lunghezza media in cm e deviazione standard (n= 30) delle valve di *V. philippinarum* nei siti considerati.

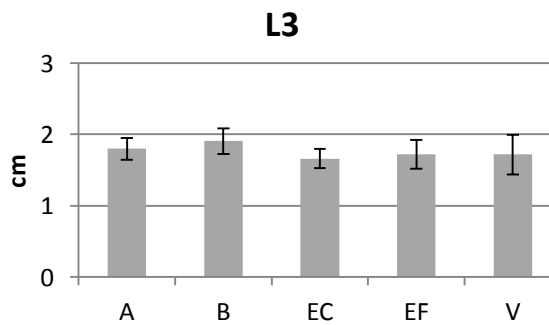


Figura 57: Spessore medio in cm e deviazione standard (n= 30) delle valve di *V. philippinarum* nei siti considerati.

Sulla base dei dati ottenuti è stato possibile calcolare tre tipologie di indici (*Condition index*, CI) riportati in letteratura:

- l'indice elaborato da Walne (1976) calcolato secondo la formula

$$CI = \frac{\text{soft tissue dry weight (g)}}{\text{shell dry weight (g)}} \times 100$$

ottenendo i valori riportati in **Figura 58**;

- l'indice elaborato da Mann & Glomb (1978), calcolato secondo la formula

$$CI = \frac{\text{soft tissue fresh weight (g)}}{\text{shell dry weight (g)}} \times 100$$

ottenendo i valori riportati in **Figura 59**;

- l'indice elaborato da Lobel et al. (1991), calcolato secondo la formula

$$CI = \frac{\text{soft tissue dry weight (mg)}}{\text{shell volume (cm}^3\text{)}}$$

dove *shell volume* è misurato come prodotto di L1 x L2 x L3, ottenendo i valori riportati in **Figura 60**.

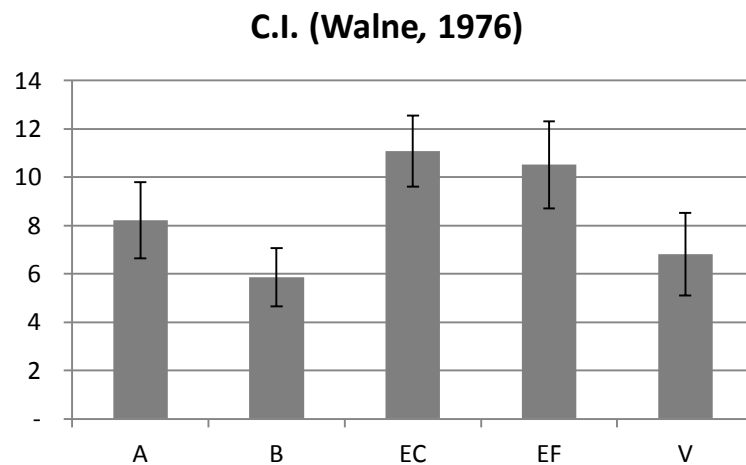


Figura 58: Valore medio e deviazione standard (n= 30) dell'indice di condizione per i campioni di *V. philippinarum* calcolato secondo Walne (1976).

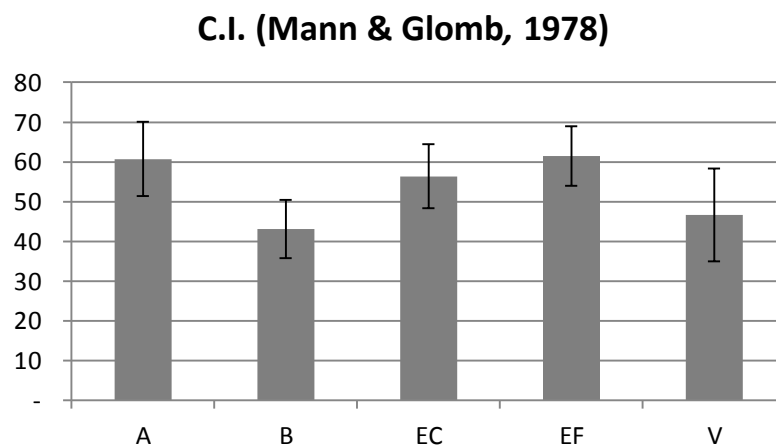


Figura 59: Valore medio e deviazione standard (n= 30) dell'indice di condizione per i campioni di *V. philippinarum* calcolato secondo Mann & Glomb (1978).

C.I. (Lobel *et al.*, 1991)

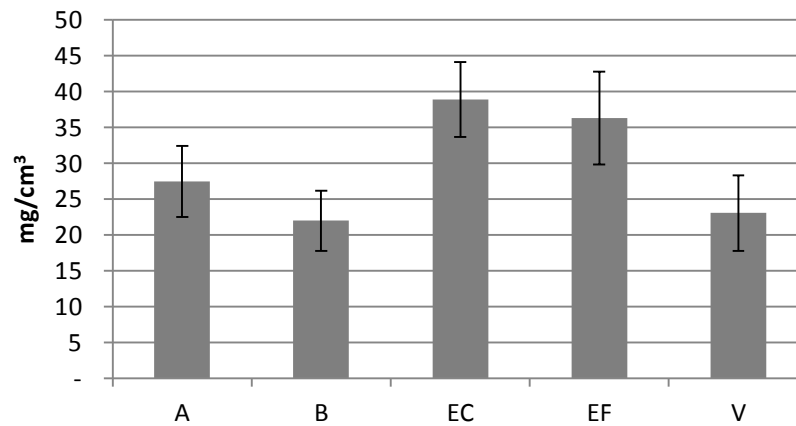


Figura 60: Valore medio e deviazione standard (n= 30) dell'indice di condizione per i campioni di *V. philippinarum* calcolato secondo Lobel *et al.* (1991).

In generale si osserva come tutti e tre gli indici siano concordi nell'identificare i campioni relativi al sito B e al sito V come quelli aventi valori di CI più bassi; inoltre, nel caso degli indici di Walne (1976) e Lobel *et al.* (1991), il sito EC risulta avere i campioni con valori di CI più elevati (nel caso dell'indice di Mann & Glomb la media per il sito A e per il sito EF superano leggermente quella del sito EC).

È possibile confrontare i valori ottenuti per l'indice di Walne (1976) con quelli calcolati da Da Ros *et al.* (2005) per *V. philippinarum* in laguna di Venezia nelle stazioni di S. Angelo (laguna centrale) e Chioggia (laguna sud) campionate tra luglio 2000 e luglio 2001: i valori oscillano per entrambe le stazioni tra il 3 e 8 con i valori più alti registrati tra aprile e giugno 2001. Questi dati sono in accordo con quelli qui presentati e mettono in risalto la buona condizione registrata da questo lavoro per i campioni del sito EC nei pressi di Chioggia (con valore medio che si attesta a 11).

I valori dell'indice di Lobel *et al.* (1997) per i siti A, B e EC sono confrontabili con quelli determinati da Baccarani (2012) per gli stessi siti negli anni 2009 e 2011; in particolare l'andamento secondo cui i valori più elevati sono registrati nel sito E (si ricorda che i campioni EC e EF possono essere confrontati con il sito E del lavoro di Baccarani, 2012) e quelli più bassi nel sito B si confermano in entrambi i lavori per tutti gli anni.

4.2.3 Analisi elementale sui tessuti e la conchiglia di *V. philippinarum*

I campioni di *V. philippinarum* sono stati utilizzati per determinare, oltre all'indice di condizione (cfr. **4.2.2 Determinazione degli indici di condizione**), la concentrazione di Li, Na, Mg, Al, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Sr, Cd, Ba, Pb, U nei tessuti molli (*soft tissue*, **ST**), nei tessuti molli privati di epatopancreas (**ST-EP**), nell'epatopancreas (**EP**) e nelle conchiglie (*shell*, **SH**).

Prima di procedere alle analisi, sui campioni ancora congelati si è proceduto a separare le valve dai tessuti molli; su questi ultimi si è proceduto alla separazione tramite bisturi dello stomaco e dell'intestino dal resto in modo da eliminare il materiale ingerito e non ancora assimilato (**Figura 61**). Questa procedura è stata eseguita su entrambi i pool: sia sugli organismi destinati all'analisi dei tessuti molli totali (ST) sia su quelli su cui è stata dissezionata la ghiandola digestiva (epatopancreas) per l'analisi di EP e ST-EP.



Figura 61: Separazione tramite bisturi dello stomaco e dell'intestino dal resto dei tessuti molli di *V. philippinarum* – foto G. Cipolato.

Per la determinazione del contenuto totale degli elementi selezionati nei *soft tissue* (**ST**) sono stati utilizzati 18 individui per ogni sito (divisi in 3 repliche da 6 individui ciascuna): gli esemplari di *V. philippinarum* sono stati aperti, separando le due valve, scarnificati, privati dello stomaco ed eventualmente sciacquati dalla presenza della sabbia con acqua Milli-Q. I tessuti molli sono stati posti in un contenitore in HDPE e quindi in freezer per almeno 48 ore; i campioni così congelati sono stati liofilizzati, successivamente omogenati con mortaio e pestello di ceramica (**Figura 62**) e quindi riposti nuovamente in un contenitore in HDPE fino al momento della disgregazione in microonde.



Figura 62: Omogenazione con mortaio e pestello dei campioni di soft tissue (ST) liofilizzati – foto G. Cipolato.

Per la disgregazione sono stati prelevati circa 0,10 g di campione, pesati e posti in bombe di teflon; sono stati aggiunti 1 mL di Milli-Q, 6 mL di HNO₃ suprapur (Fluka Analytical), 2 mL di H₂O₂ suprapur (Fluka Analytical) e le bombe sono state poste in microonde (ETHOS 1600, Milestone) per 13 minuti (potenza massima 600 W). I campioni disgregati sono stati portati a volume (25 mL) con acqua Milli-Q e posti in contenitori in HDPE fino al momento delle analisi.

La medesima procedura è stata seguita anche per l'epatopancreas (EP) e per i soft tissue privati di epatopancreas (ST-EP): in questo caso dopo aver aperto gli esemplari (anche in questo caso 18 esemplari per sito suddivisi in 3 repliche da 6 individui ciascuna), aver rimosso i tessuti molli *in toto* e averli privati dello stomaco, l'epatopancreas e il resto dei tessuti sono stati separati.

Le analisi di ST, EP e ST-EP sono state eseguite, previa opportuna diluizione, tramite uno spettrometro di massa a quadrupolo con sistema di ionizzazione al plasma accoppiato induttivamente (Agilent 7500I), dotato di cella di collisione antecedente il quadrupolo.

Le conchiglie di *V. philippinarum* derivanti da entrambi i pool (sia quello per ST che quello per ST-EP e EP) sono state pre-trattate secondo la procedura individuata nella prima parte del lavoro (*cf.* **3.1.2 Metodi di trattamento e analisi delle conchiglie**). In **Figura 63**, **Figura 64**, **Figura 65**, **Figura 66** e **Figura 67** sono riportate le immagini relative ai campioni del primo pool suddivisi per sito dopo la fase di pulizia al fine di evidenziare la diversità di colorazione tra le conchiglie dei vari siti.



Figura 63: Conchiglie degli esemplari di *V. philippinarum* prelevati nel sito A.



Figura 64: Conchiglie degli esemplari di *V. philippinarum* prelevati nel sito B.



Figura 65: Conchiglie degli esemplari di *V. philippinarum* prelevati nel sito EC.

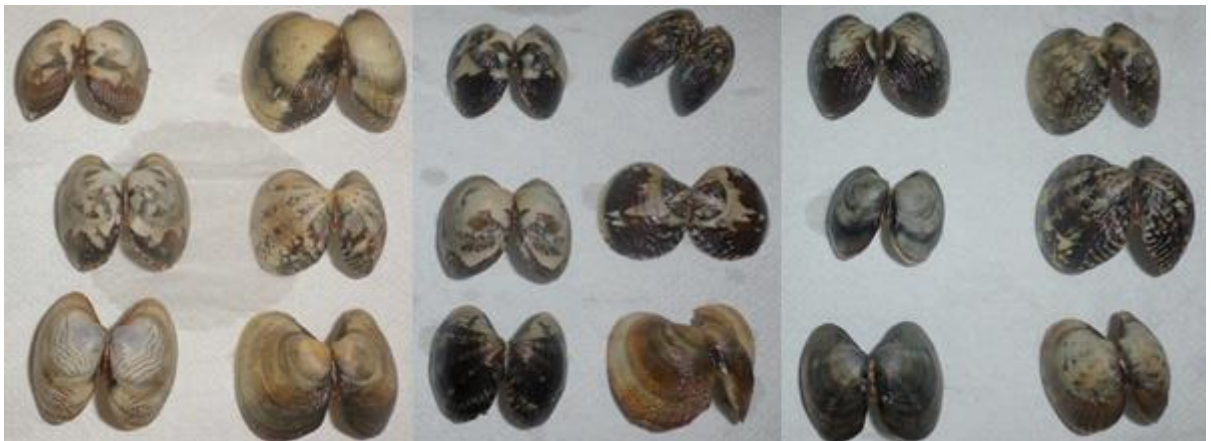


Figura 66: Conchiglie degli esemplari di *V. philippinarum* prelevati nel sito EF.

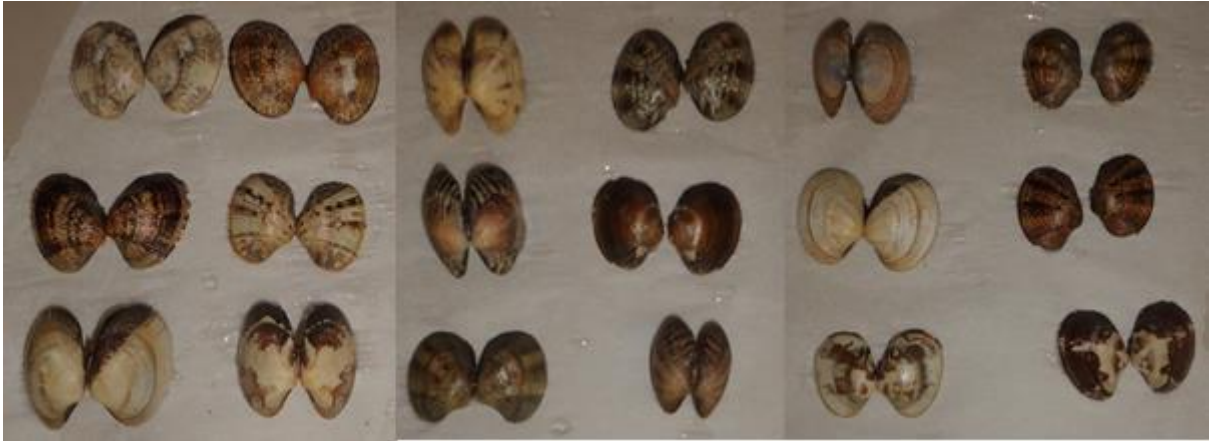


Figura 67: Conchiglie degli esemplari di *V. philippinarum* prelevati nel sito V.

Per la determinazione del contenuto totale degli elementi selezionati nelle conchiglie sono state utilizzate per ogni sito le conchiglie appartenenti ai 18 individui utilizzati per i campioni di soft tissue (SH-ST) e quelle appartenenti ai 18 individui utilizzati per i campioni di epatopancreas e di soft tissue privati di epatopancreas (SH-EP) suddivisi in 6 repliche da 6 individui ciascuna. Le conchiglie sono state lavate sotto getto d'acqua, risciacquate con Milli-Q e sono state messe in forno per 48 ore a 80 °C. In seguito sono state separate le valve destre dalle valve sinistre: le prime sono state conservate mentre le seconde sono state poste nel cilindro in teflon per la frantumazione e l'omogenizzazione. Il frantumato (**Figura 68**) è stato posto in provetta fino al momento della disgregazione in microonde.



Figura 68: Esempio di conchiglie dopo la fase di frantumazione con il cilindro in teflon descritto in **3.1.2 Metodi di trattamento delle conchiglie**.

Per la disgregazione in microonde sono stati prelevati circa 0,15 g di campione, pesati e posti in bombe di teflon; sono stati aggiunti 4 mL di Milli-Q, 4 mL di HNO₃ suprapur (Fluka Analytical), 4 mL di H₂O₂ suprapur (Fluka Analytical) e le bombe sono state poste in microonde (ETHOS 1600, Milestone) per 12 minuti (potenza massima 600 W). I campioni disgregati sono stati portati a volume (25 mL) con acqua Milli-Q e posti in contenitori in HDPE fino al momento delle analisi.

Le analisi sono state eseguite, previa opportuna diluizione, tramite uno spettrometro di massa a quadrupolo con sistema di ionizzazione al plasma accoppiato induttivamente (Agilent 7500I), dotato di cella di collisione antecedente il quadrupolo.

4.2.4 Caratterizzazione del sedimento

Per quanto riguarda i sedimenti sui campioni prelevati nei quattro siti considerati per questa matrice (A, B, EC e V), oltre all'analisi elementare e alla speciazione geochimica che ha riguardato gli stessi elementi analizzati nei tessuti di *V. philippinarum*, sono stati determinati la granulometria, l'umidità e la frazione organica

Per la determinazione della granulometria (effettuata secondo la procedura utilizzata da Losso *et al.*, 2004) è stata prelevata e pesata un'aliquota di circa 20 g di campione umido omogenato ed è stata rimossa la materia organica mediante trattamento con H₂O₂ 20 volumi (A.C.E.F. S.p.A.) fino a fine reazione e il campione è stato quindi essiccato in forno a 45 °C. I campioni secchi sono stati setacciati a umido al fine di separare le varie frazioni granulometriche: gravel (>1 mm), sabbia (63 µm – 1 mm), silt grossolano (20 µm – 63 µm) e silt medio-fine e argilla (< 20 µm) secondo la classificazione di Wentworth. Le componenti granulometriche sono state quantificate come valore di peso secco su peso secco totale della frazione clastica < 1 mm.

Per il calcolo dell'umidità del sedimento sono state prelevate e pesate tre aliquote di 4 g circa per ogni campione di sedimento, previo scongelamento e omogenazione; queste sono state poste in stufa a 105 °C per almeno 18 ore in crogioli tarati. Dopo 2 giorni di raffreddamento in stufa spenta per la stabilizzazione, i crogioli sono stati pesati per la determinazione dell'umidità percentuale.

Il contenuto di sostanza organica presente nel sedimento è stato determinato per confronto tra il peso secco del sedimento e il peso secco del sedimento dopo reazione con acqua ossigenata. Il campione di sedimento è stato seccato in stufa a 80 °C e successivamente sono state prelevate e pesate sei aliquote da 1 g ciascuna; a tre di queste sono stati aggiunti 10 mL di acqua Milli Q e 10 mL di H₂O₂ (Applichem GmbH) al 30%. Dopo aver agitato vigorosamente a freddo per 4 ore, atteso il tempo necessario per una completa rideposizione, è stata sifonata via la soluzione. La procedura è stata quindi ripetuta una seconda volta. Tutti e sei i campioni sono stati quindi essiccati in stufa a 105 °C per 18 ore e stabilizzati per due giorni a stufa spenta per procedere alla determinazione della frazione organica media del campione.

4.2.5 Analisi elementare del sedimento

Per l'analisi elementare del sedimento (SED) è stata prelevata un'aliquota del campione previo scongelamento, posta in un contenitore in HDPE e lasciata in freezer per almeno 48 ore. I campioni così congelati sono stati liofilizzati, omogenati con mortaio e pestello di ceramica e dunque riposti nei contenitori di HDPE fino al momento della disgregazione in microonde.

Per la disgregazione in microonde sono stati prelevati e pesati circa 0,15 g di campione (analisi eseguita in 3 repliche) e posti in bombe di teflon; sono stati aggiunti 5 mL di Milli-Q, 1,5 mL di HF suprapur (Fluka Analytical), 3 mL di acqua regia, preparata con HNO₃ suprapur (Fluka Analytical) e HCl suprapur (J. T. Baker) in rapporto 1:3, e

le bombe sono state poste in microonde (ETHOS 1600, Milestone) per 28 minuti (potenza massima 650 W). I campioni disagiati sono stati portati a volume (50 mL) con acqua Milli-Q e posti in contenitori in HDPE fino al momento delle analisi.

Anche in questo caso le analisi sono state condotte sui campioni opportunamente diluiti tramite uno spettrometro di massa a quadrupolo con sistema di ionizzazione al plasma accoppiato induttivamente (Agilent 7500I), dotato di cella di collisione antecedente il quadrupolo.

4.2.6 Speciazione geochemica del sedimento

La speciazione geochemica è stata eseguita secondo la procedura di Chester & Hughes (1967) leggermente modificata da Sager (1989), Rubio *et al.* (1993) e Perin *et al.* (1997). La procedura prevede l'estrazione di 5 fasi mediante l'utilizzo di gradienti positivi (dunque crescenti) di energia chimica in grado di estrarre gli elementi legati in maniera sempre più stabile alla matrice. Dunque la procedura permette di determinare 5 diverse concentrazioni per ogni elemento considerato corrispondenti ad altrettante fasi estrattive denominate fasi geochemiche (GPH).

Le frazioni maggiormente biodisponibili, ossia quella scambiabile ionicamente e quella legata principalmente ai carbonati, corrispondono rispettivamente alla prima (GPH1) e alla seconda (GPH2) fase geochemica. La componente meno biodisponibile è rappresentata da una frazione moderatamente riducibile di elementi legati a ossidi di ferro e manganese (GPH3); sostanzialmente non biodisponibili sono la frazione legata agli acidi umici e ai solfuri (GPH4) e quella difficilmente riducibile legata agli ossidi di ferro e manganese (GPH5). Di seguito si riportano le procedure estrattive utilizzate per le 5 fasi.

- *GPH1: Estrazione di metalli presenti nel sedimento con legame blando e scambiabile ionicamente*

Sono stati pesati circa 10 g di sedimento umido, collocati poi in un becker aggiungendovi 40 mL di $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (J.T. Baker) 1 M; il sedimento così trattato è stato posto in agitatore per 1,5 ore e lasciato sedimentare per una notte. Il campione è stato quindi filtrato con filtri di carta a banda bianca (cut off 0,45 μm , \varnothing 125 mm; Whatman Schleicher & Schuell) e la soluzione raccolta in un matraccio da 100 mL; sul sedimento raccolto nel filtro di carta sono stati fatti più lavaggi con acqua Milli-Q prima di portare a volume. I campioni così ottenuti ed il bianco sono stati analizzati in ICP-MS (Agilent 7500I).

Il sedimento residuo è stato lasciato seccare per una notte sul filtro stesso, quindi recuperato e rimesso in stufa per 18 ore a 105 °C; dopo due giorni a stufa spenta per la stabilizzazione, il campione è stato pesato.

- *GPH2: Estrazione dei metalli presenti nei sedimenti legati alla frazione dei carbonati*

Dopo aver portato a secco il sedimento rimasto sul filtro dopo la prima fase di estrazione, 3 g di quest'ultimo sono stati prelevati e trattati con 40 mL di CH_3COONa (J.T. Baker) 1 M e 1 mL di CH_3COOH (Sigma), aggiustando l'acidità della soluzione ottenuta a pH 5. Il campione è stato successivamente mescolato in agitatore per 2 ore, lasciato sedimentare per due notti, quindi filtrato con filtri di carta a

banda bianca (cut off 0,45 μm , \varnothing 125 mm; Whatman Schleicher & Schuell). La soluzione è stata raccolta in un matraccio da 100 mL, facendo più lavaggi del sedimento raccolto sul filtro di carta prima di portare a volume con acqua Milli-Q. I campioni così ottenuti ed il bianco sono stati analizzati in ICP –MS (Agilent 7500I).

Il sedimento residuo è stato lasciato seccare per una notte sul filtro stesso, quindi recuperato e rimesso in stufa per 18 ore a 105 °C; dopo due giorni a stufa spenta per la stabilizzazione, il campione è stato pesato.

- *GPH3: Estrazione dei metalli presenti nei sedimenti e legati alla frazione degli ossidi di ferro e manganese facilmente riducibili*

Il sedimento secco proveniente dall'estrazione della seconda fase, accuratamente pesato, è stato trattato con 40 mL di $\text{NH}_2\text{OH HCl}$ (Fluka) 0,1 M in HNO_3 (Romil) 0,01 M, posto in agitatore per 45 minuti e lasciato sedimentare per due notti. Il campione è stato quindi filtrato con filtri di carta a banda bianca (cut off 0,45 μm , \varnothing 125 mm; Whatman Schleicher & Schuell) e il filtrato raccolto in un matraccio da 100 mL; sono stati fatti più lavaggi del sedimento raccolto sul filtro di carta, prima di portare a volume con acqua Milli-Q. I campioni così ottenuti ed il bianco sono stati analizzati in ICP –MS (Agilent 7500I).

Il sedimento residuo è stato lasciato seccare per una notte sul filtro stesso, quindi recuperato e rimesso in stufa per 18 ore a 105 °C; dopo due giorni a stufa spenta per la stabilizzazione, il campione è stato pesato.

- *GPH4: Estrazione dei metalli presenti nei sedimenti legati alla frazione organica (acidi umici) ed ai solfuri*

Al sedimento secco accuratamente pesato, proveniente dall'estrazione della terza fase, sono stati aggiunti 6 mL di HNO_3 (Romil) 0,02 M e 10 mL di H_2O_2 (Applichem GmbH) al 30% aggiustando il valore di pH a 2. I campioni sono stati introdotti in un bagno termostato a 80 °C per 2 h, allo scadere delle quali sono stati aggiunti 3 mL di H_2O_2 al 30% (pH = 2), e lasciati per altre 3,5 h in bagno termostato a 80 °C.

Una volta tolti i campioni e lasciati raffreddare, sono stati aggiunti 15 mL di acetato di ammonio $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (J.T. Baker) 3,2 M in HNO_3 concentrato (Romil, 20% volume) e messi in agitatore per 30 minuti, al termine dei quali vengono lasciati sedimentare per due notti. Il campione è stato quindi filtrato con filtri di carta a banda bianca (cut off 0,45 μm , \varnothing 125 mm; Whatman Schleicher & Schuell) e il filtrato è stato raccolto in un matraccio da 100 mL; sono stati fatti più lavaggi con acqua Milli-Q del sedimento raccolto sul filtro di carta prima di portare a volume. I campioni così ottenuti ed il bianco sono stati analizzati in ICP –MS (Agilent 7500I).

Il sedimento residuo è stato lasciato seccare per una notte sul filtro stesso, quindi recuperato e rimesso in stufa per 18 ore a 105 °C; dopo due giorni a stufa spenta per la stabilizzazione, il campione è stato pesato.

- *GPH5: Estrazione dei metalli presenti nel sedimento legati agli ossidi di ferro e manganese (fase resistente alla riduzione)*

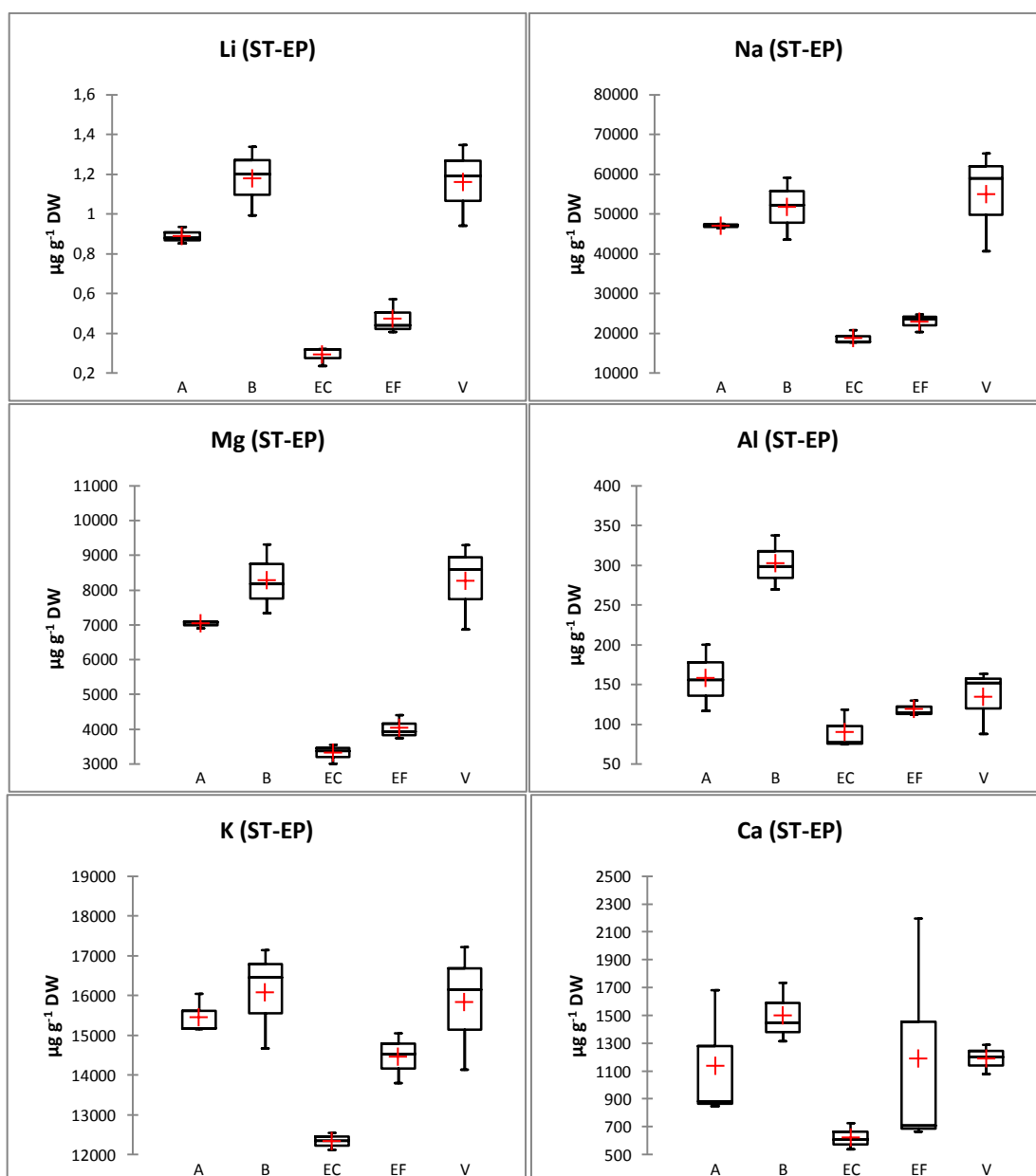
Al sedimento secco accuratamente pesato proveniente dall'estrazione della quarta fase, sono stati aggiunti 40 mL di $\text{NH}_2\text{OH HCl}$ (Fluka) 0,04 M in CH_3COOH (Sigma) al 25 % in volume; i campioni sono stati immersi in un bagno termostato a 98 °C per 5 ore e lasciati sedimentare per due notti; sono stati quindi filtrati con filtri di carta a banda bianca (cut off 0,45 μm , \varnothing 125 mm; Whatman Schleicher & Schuell) e il filtrato è stato raccolto in un matraccio da 100 mL; sono stati fatti più lavaggi con acqua Milli-Q del sedimento raccolto sul filtro di carta, prima di portare a volume. I campioni così ottenuti ed il bianco sono stati analizzati in ICP – MS (Agilent 7500I).

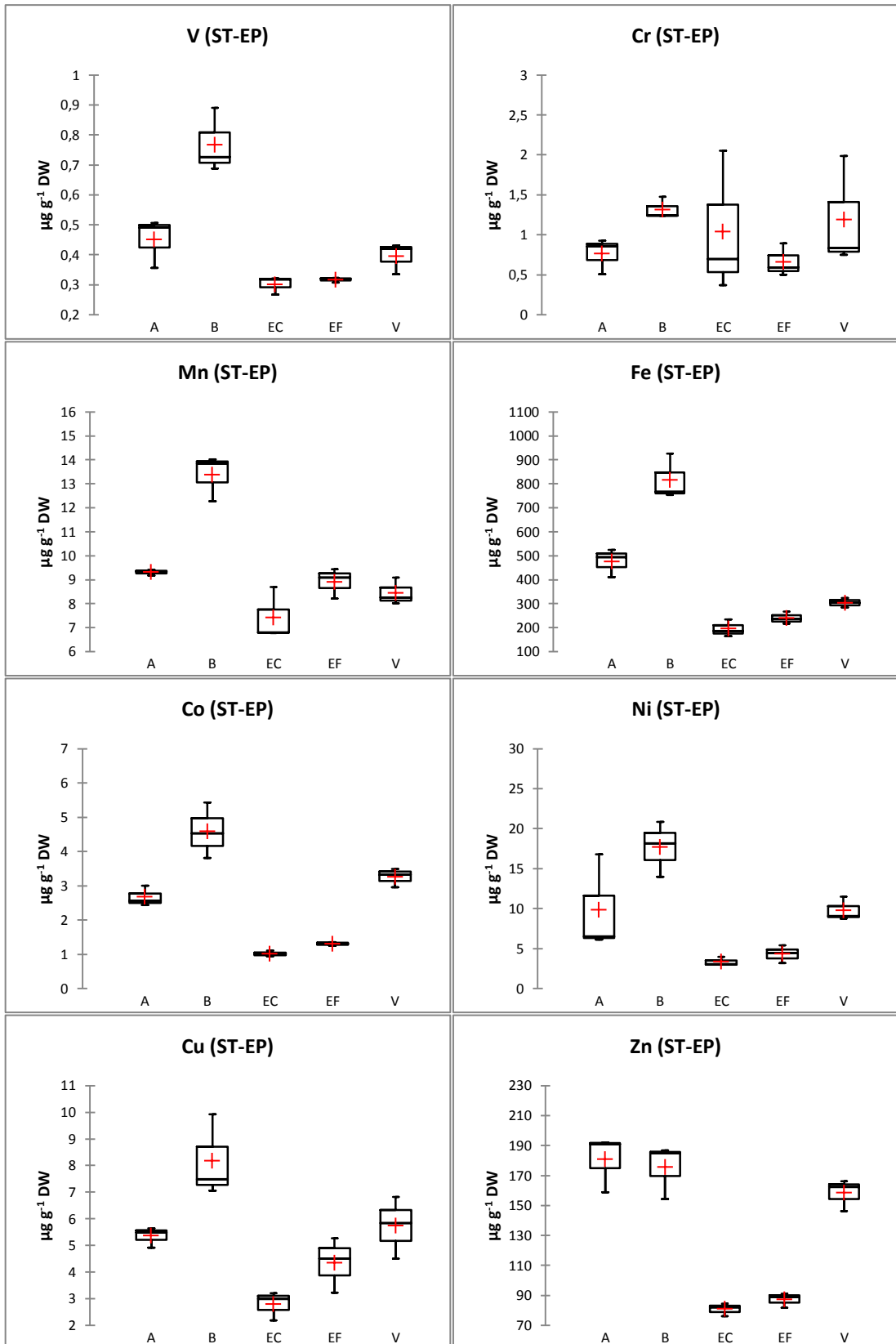
4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

In questa fase si presentano i risultati ottenuti e si procede ad una prima discussione che verrà approfondita nel capitolo dedicato all'**Elaborazione dati (4.4)** e infine nelle **Considerazioni conclusive (4.5)** dove, tra l'altro, si commenteranno i risultati ottenuti per singolo elemento esaminato.

4.3.1 Soft tissue di *Venerupis philippinarum*: analisi elementale

I risultati ottenuti espressi in $\mu\text{g g}^{-1}$ (DW, Dry Weight) sono presentati tramite box-plot in **Figura 69**, **Figura 70** e **Figura 71** per ST-EP, EP e ST rispettivamente.





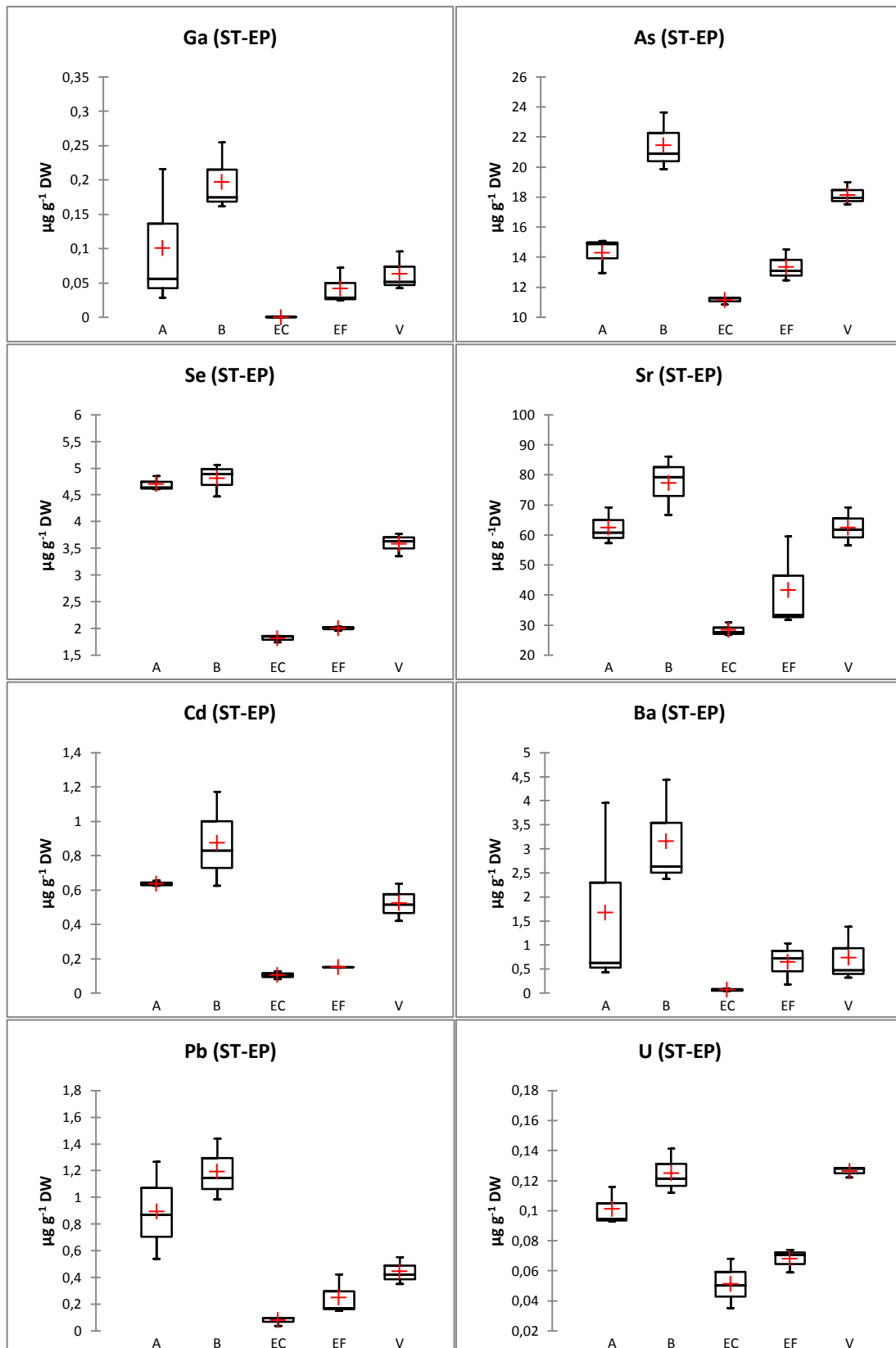
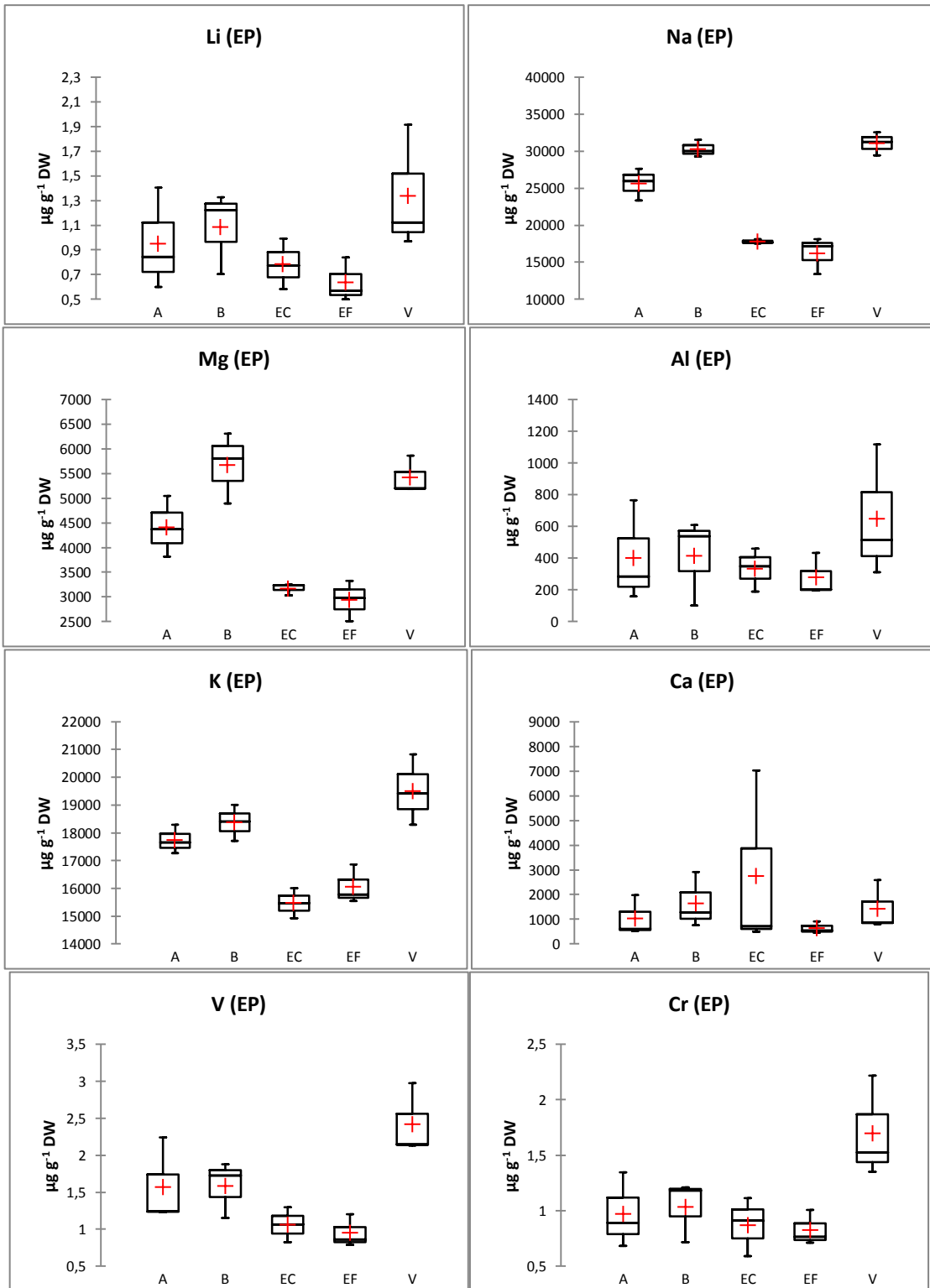
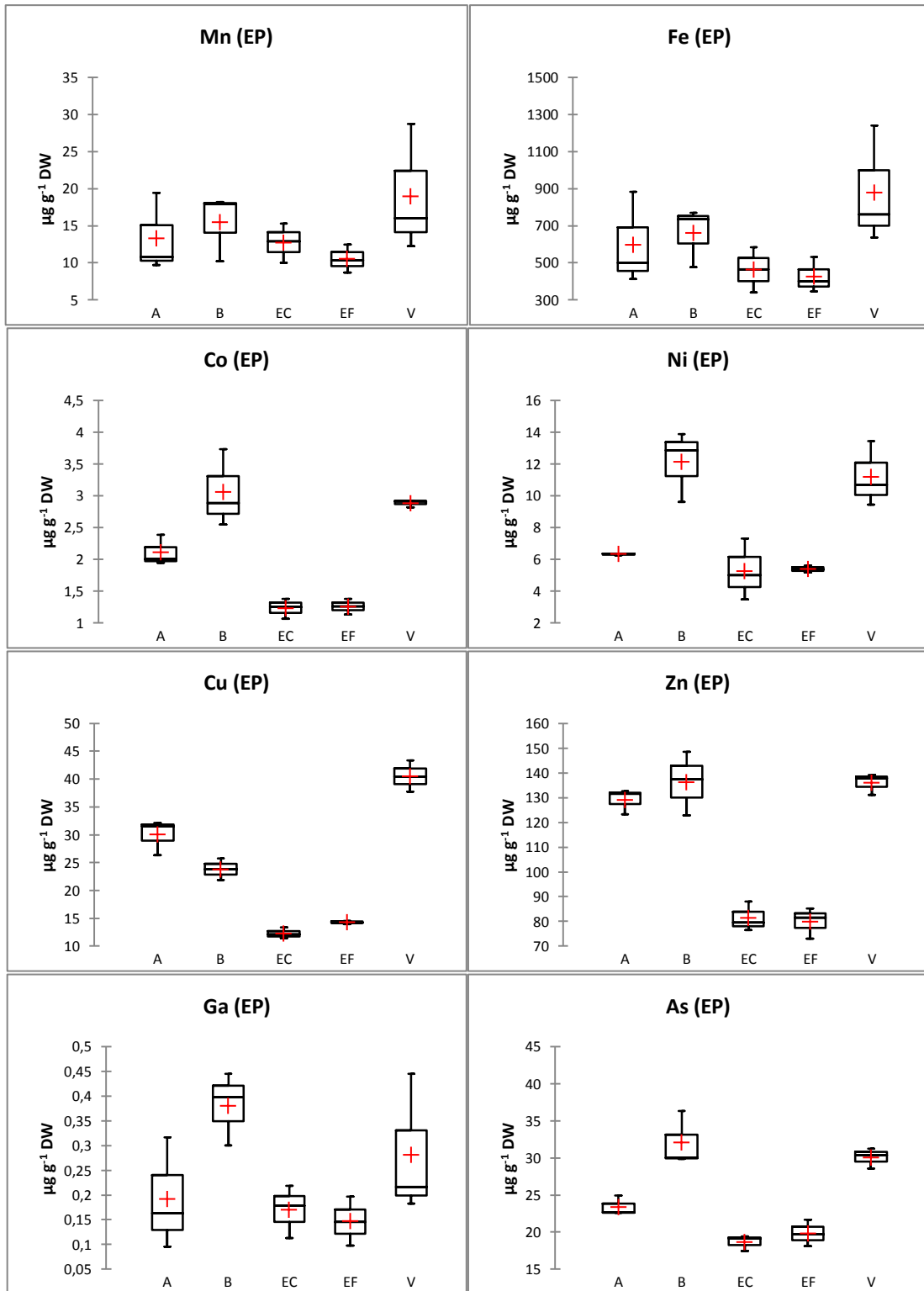


Figura 69: Box plot relativi ai valori di concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* privati di epatopancreas (ST-EP) di *V. philippinarum* per i 5 siti. [Il rettangolo è delimitato dal primo e dal terzo quartile e diviso al suo interno dalla mediana; i segmenti sono delimitati dal minimo e dal massimo dei valori. In rosso è indicato il valore medio, mentre gli asterischi e i cerchi corrispondono agli outliers].





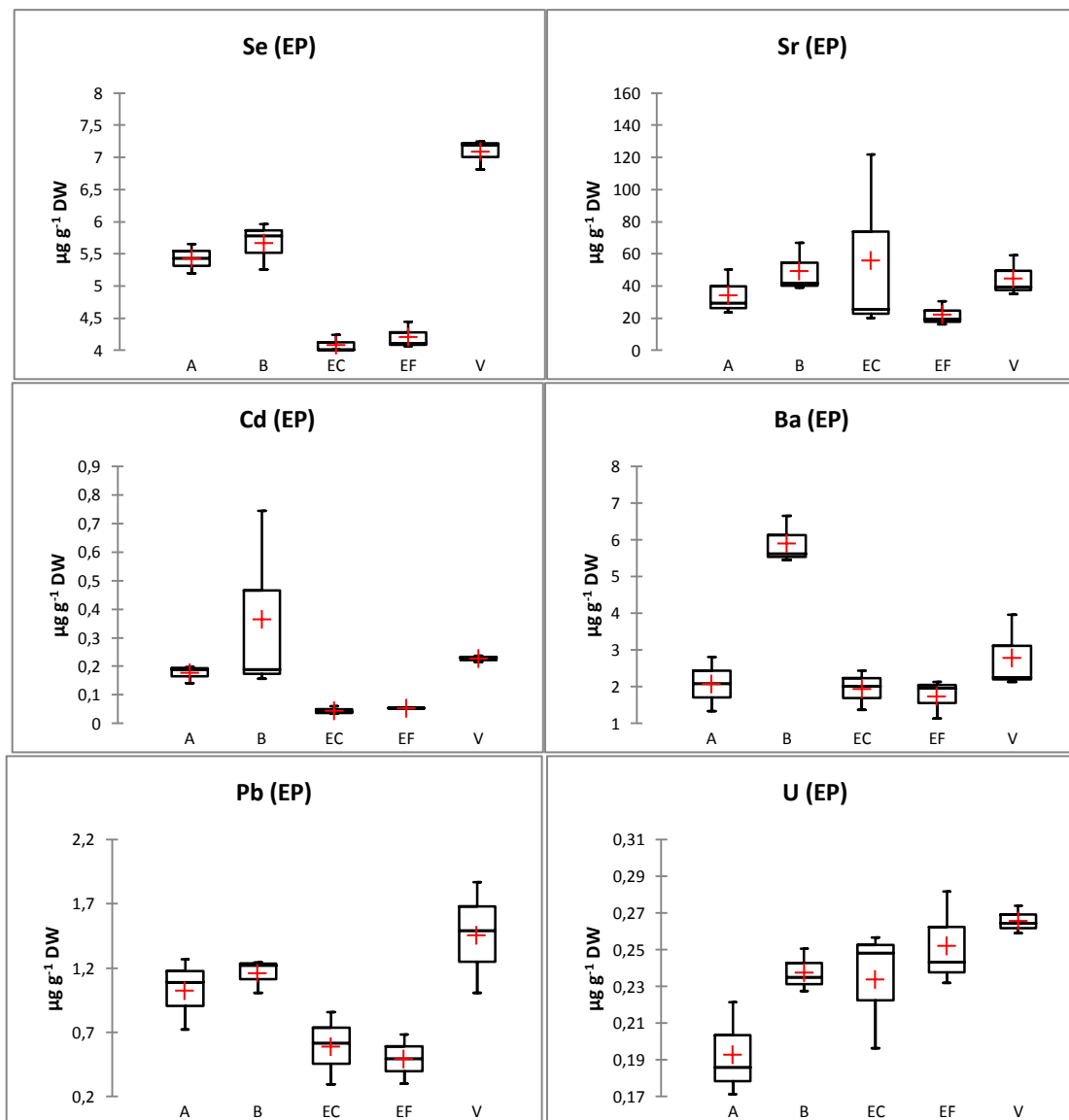
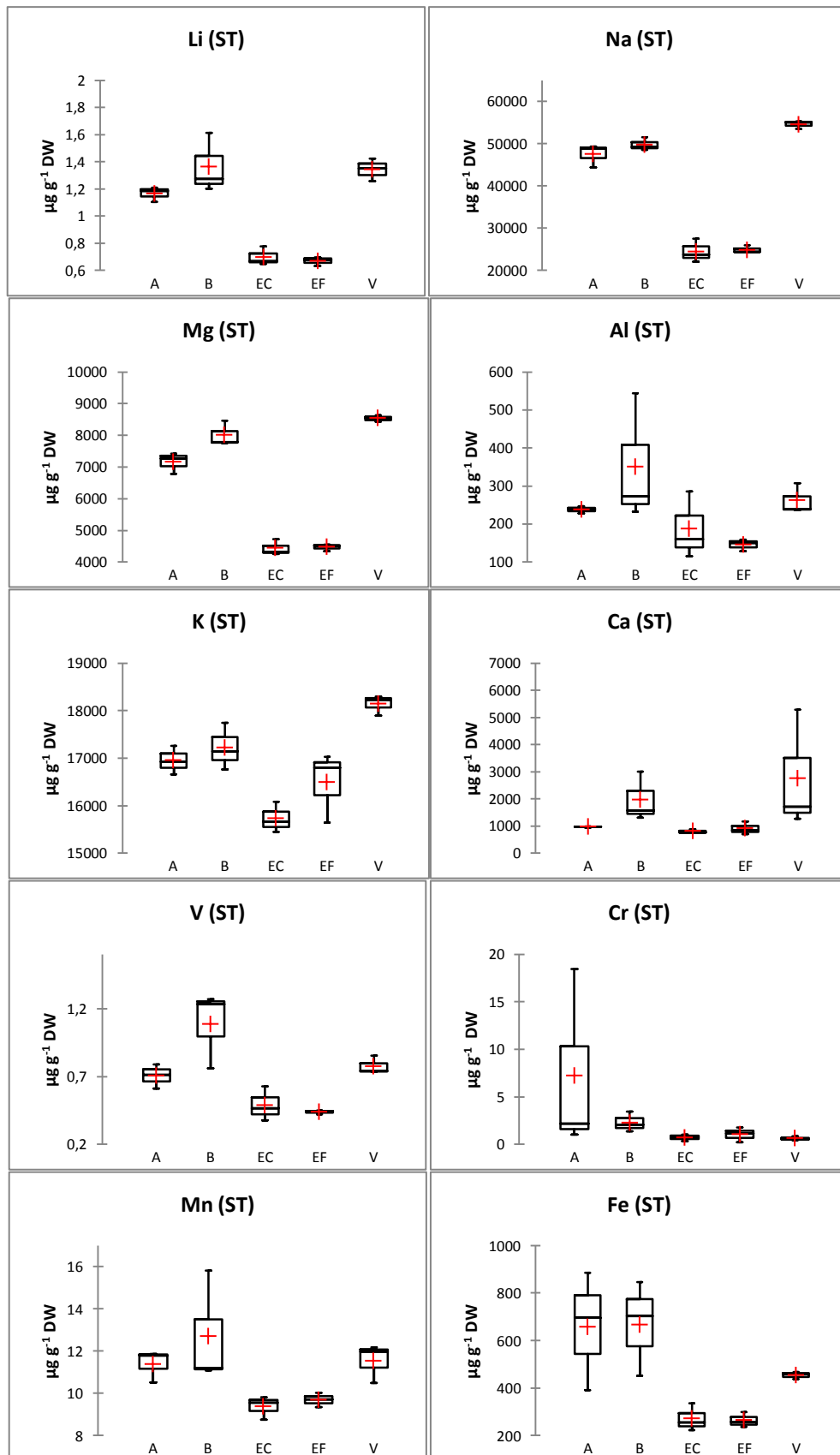
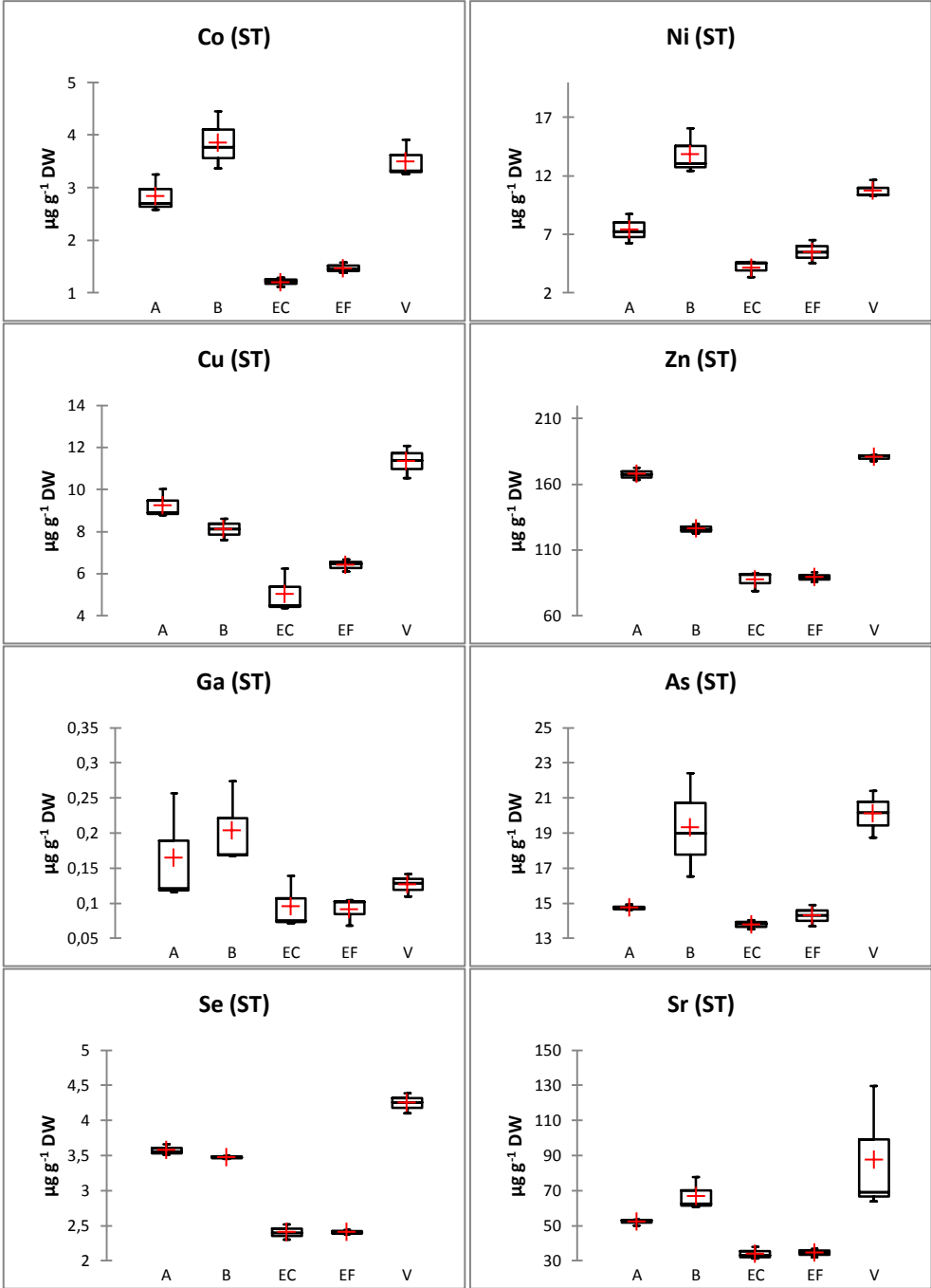


Figura 70: Box plot relativi ai valori di concentrazione degli elementi considerati nell'epatopancreas (EP) di *V. philippinarum* per i 5 siti. [Il rettangolo è delimitato dal primo e dal terzo quartile e diviso al suo interno dalla mediana; i segmenti sono delimitati dal minimo e dal massimo dei valori. In rosso è indicato il valore medio, mentre gli asterischi e i cerchi corrispondono agli outliers].





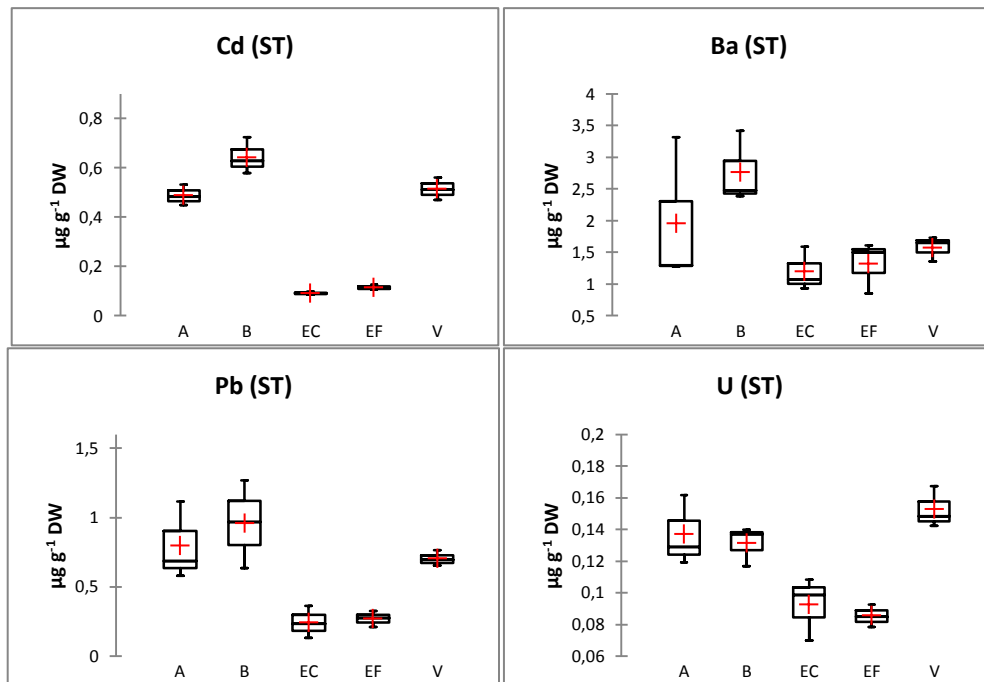


Figura 71: Box plot relativi ai valori di concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* totali (ST) di *V. philippinarum* per i 5 siti. [Il rettangolo è delimitato dal primo e dal terzo quartile e diviso al suo interno dalla mediana; i segmenti sono delimitati dal minimo e dal massimo dei valori. In rosso è indicato il valore medio, mentre gli asterischi e i cerchi corrispondono agli outliers].

Dai risultati presentati nei box-plot di **Figura 69**, **Figura 70** e **Figura 71** si rileva che l'andamento dei valori di concentrazione degli elementi considerati nei 5 siti è diverso nel caso delle tre matrici considerate per quanto riguarda i tessuti molli di *V. philippinarum*.

In particolare per quanto riguarda le concentrazioni rilevate nei tessuti molli privati di epatopancreas (ST-EP, **Figura 69**) i valori più elevati si registrano, in quasi tutti i casi, per il sito V e/o per il sito B, mentre quelli più bassi per i siti EC e EF; ciò nonostante si possono riconoscere alcune differenze:

- per gli elementi Li, Na, Mg, K, Ca, e U i valori medi più elevati si registrano per i campioni del sito V e/o B, seguono poi i campioni del sito A, del sito EF e infine del sito EC;
- nel caso di Al, V, Fe, Co, Ni, Cu, Ga, As, Sr, Cd, Ba e Pb i campioni che presentano i valori medi più elevati sono quelli del sito B, seguono con valori comparabili il sito A e il sito V, quindi il sito EF e infine il sito EC;
- gli elementi Zn e Se presentano valori medi decrescenti secondo l'ordine A/B > V > EF > EC;
- per Cr e Mn il sito che presenta il valore medio più alto è il B, ma l'andamento non corrisponde a nessuno dei casi precedenti.

Anche nel caso delle concentrazioni misurate nell'epatopancreas di *V. philippinarum* (EP, **Figura 70**) i valori medi più elevati si registrano nei campioni del sito V e/o del sito B, tuttavia gli andamenti sono differenti rispetto a quelli descritti per ST-EP:

- nel caso di Li, Na, Mg, K, Co, Ni, Zn, Ga, As, Se, Cd, Ba, Pb i campioni dei siti V e B presentano i valori più alti ma comparabili tra loro, seguono i campioni del sito A e, con i valori inferiori, i campioni dei siti EC e EF;
- le concentrazioni medie per gli elementi Al, V, Cr, Mn e Fe nei siti A, B, EC e EF sono abbastanza omogenee e molto inferiori rispetto a quelle rilevate nel sito V;
- per gli elementi Ca e Sr è il sito EC a presentare i valori più alti, seguono $B > V > A > EF$;
- andamenti differenti si registrano nel caso di Cu ($V > A > B > EF > EC$) e U ($V > EF > B > EC > A$).

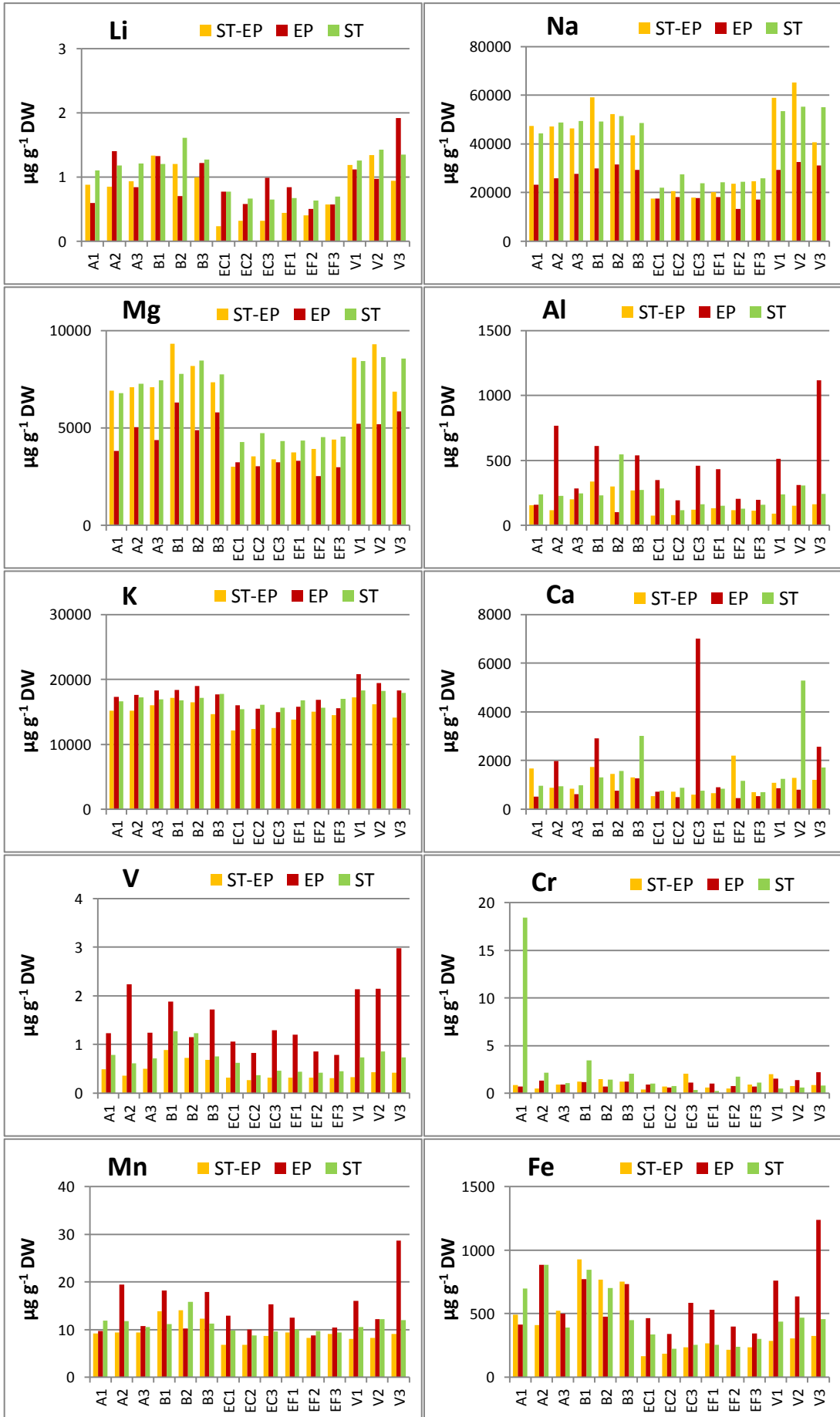
Non sorprende il fatto che le concentrazioni medie determinate per i tessuti molli totali (ST, **Figura 71**) presentino degli andamenti tra i siti che non si discostano molto da quelli rilevati nel caso di ST-EP dato che il contributo in peso dato dall'epatopancreas ai soft tissue totali è minore rispetto a quello dei restanti tessuti molli. Si riscontrano tuttavia alcune differenze:

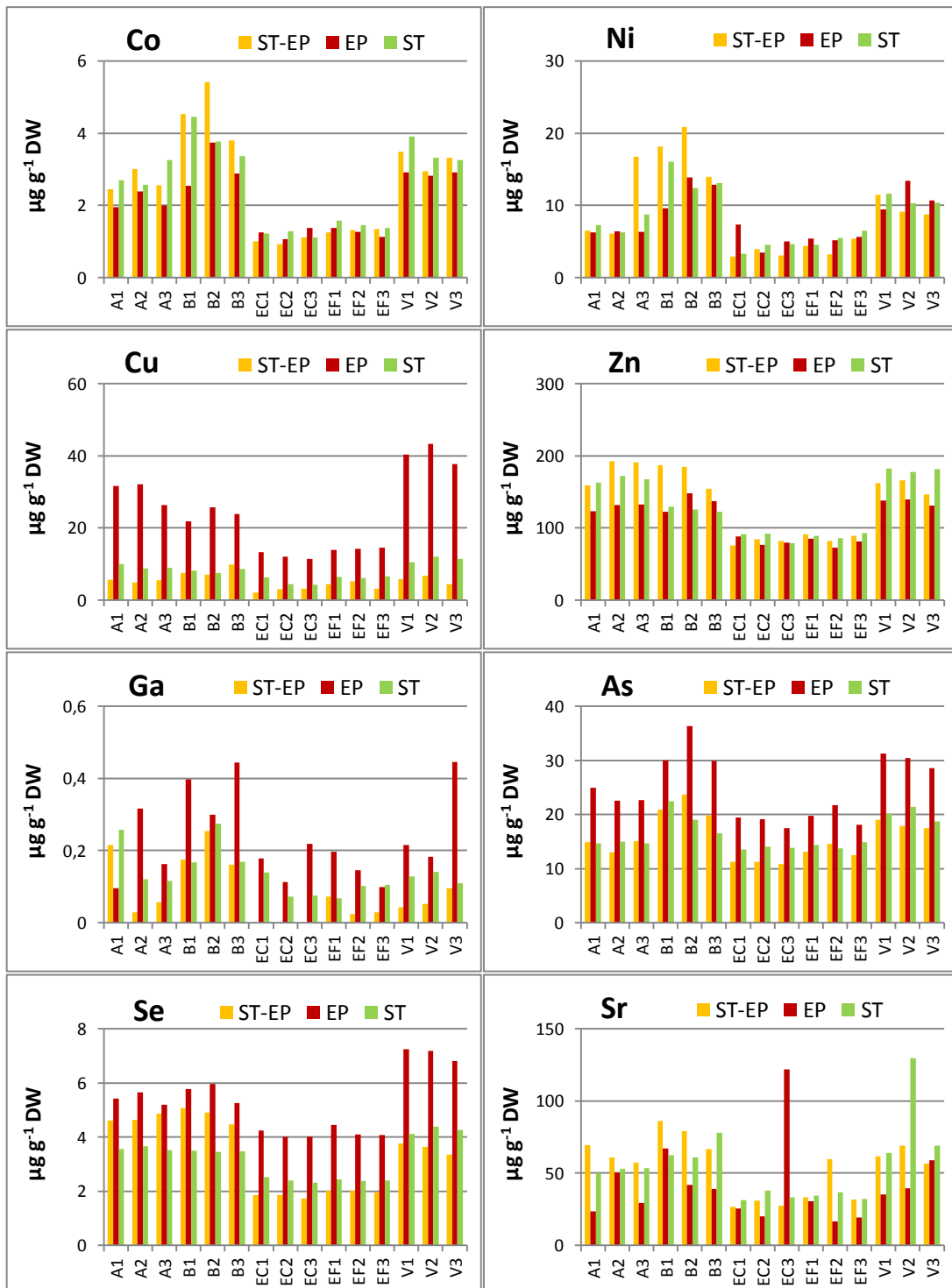
- il valore medio di concentrazione per il Cr risulta molto più elevato nel sito A rispetto agli altri, ma ciò è molto probabilmente legato alla presenza di un valore anomalo (non identificabile come outlier a causa del limitato numero di rilevazioni);
- gli elementi Mn, Se e Sr assumono un andamento simile a quello degli elementi Li, Na, Mg, K, Ca, e U, con i valori più elevati che si registrano nei siti B, V e A;
- Cu e Zn, a differenza di quanto accade con ST-EP presentano i valori più elevati nei siti V e A, a seguire B, EF e EC.

Per operare più agilmente un confronto tra i livelli di concentrazione dei diversi elementi nei tre comparti esaminati (ST-EP, EP e ST) è utile esaminare i grafici di **Figura 72**: Si noti che il confronto è operato sulle concentrazioni e non sulle quantità assolute presenti nei diversi comparti analizzati, al fine di evidenziare dove si concentra maggiormente l'elemento considerato.

- per alcuni elementi come Al, V, Mn, Cu, Ga, As, Se, Ba e U le concentrazioni rilevate in EP sono più elevate rispetto a quelle di ST-EP e ST, a significare che questi elementi tendono ad accumularsi preferenzialmente nell'epatopancreas;
- nel caso di Pb e Fe l'accumulo preferenziale nell'epatopancreas è riscontrabile solo nei siti EC, EF e V a indicare con ogni probabilità che l'assunzione di questo elemento è avvenuta in tempi più recenti rispetto al campionamento;
- elementi come Li e K presentano gli stessi livelli di concentrazione in tutte e tre le matrici;
- gli altri elementi presentano livelli di concentrazione più elevati in ST-EP e ST rispetto a EP.

Si deve rilevare, inoltre, che i pattern di accumulo possono essere confrontati tra loro pur riferendosi a individui diversi (quelli utilizzati per la determinazione di ST, da un lato, e quelli utilizzati per la determinazione di EP e ST-EP, dall'altro) in quanto per ogni replica è stato considerato un numero sufficientemente alto di individui (6); il numero di repliche (3) per ogni campione, tuttavia, non permette di valutare come outliers i valori che possono sembrare anomali in una prima fase di confronto, come precedentemente indicato.





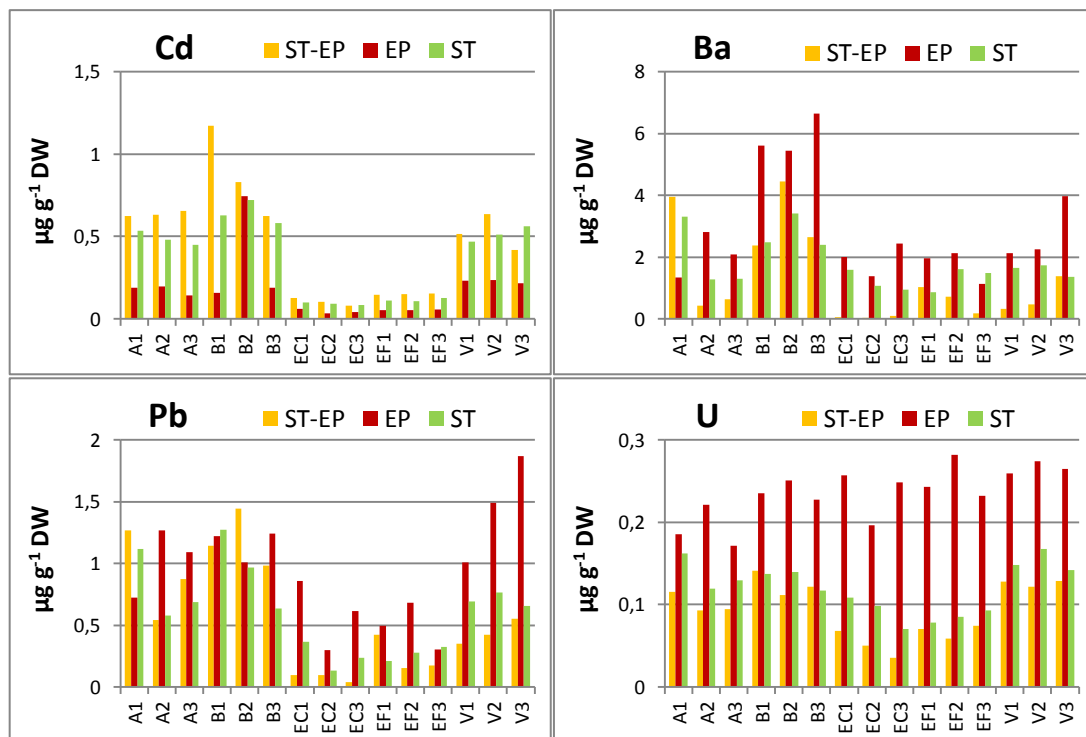
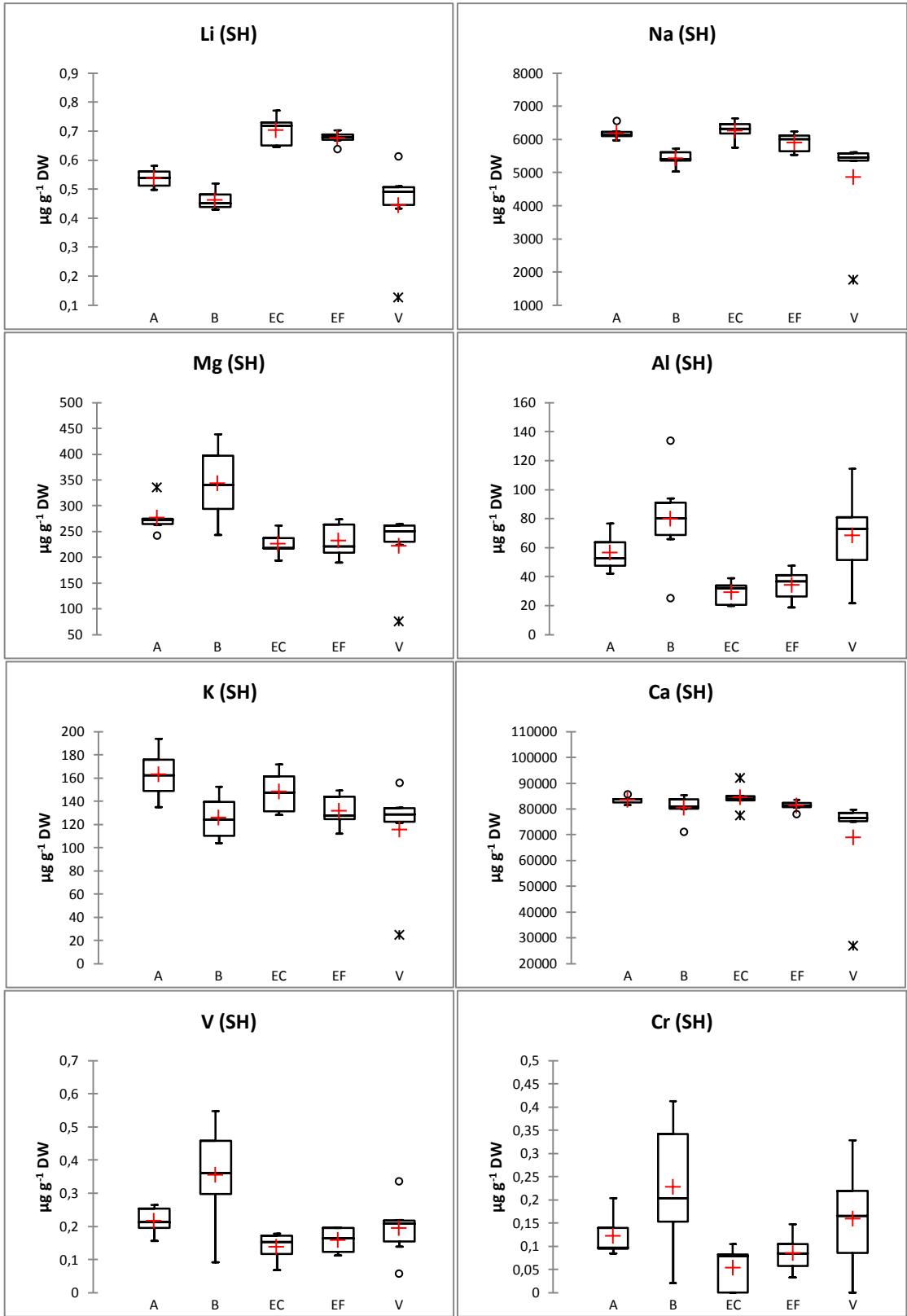


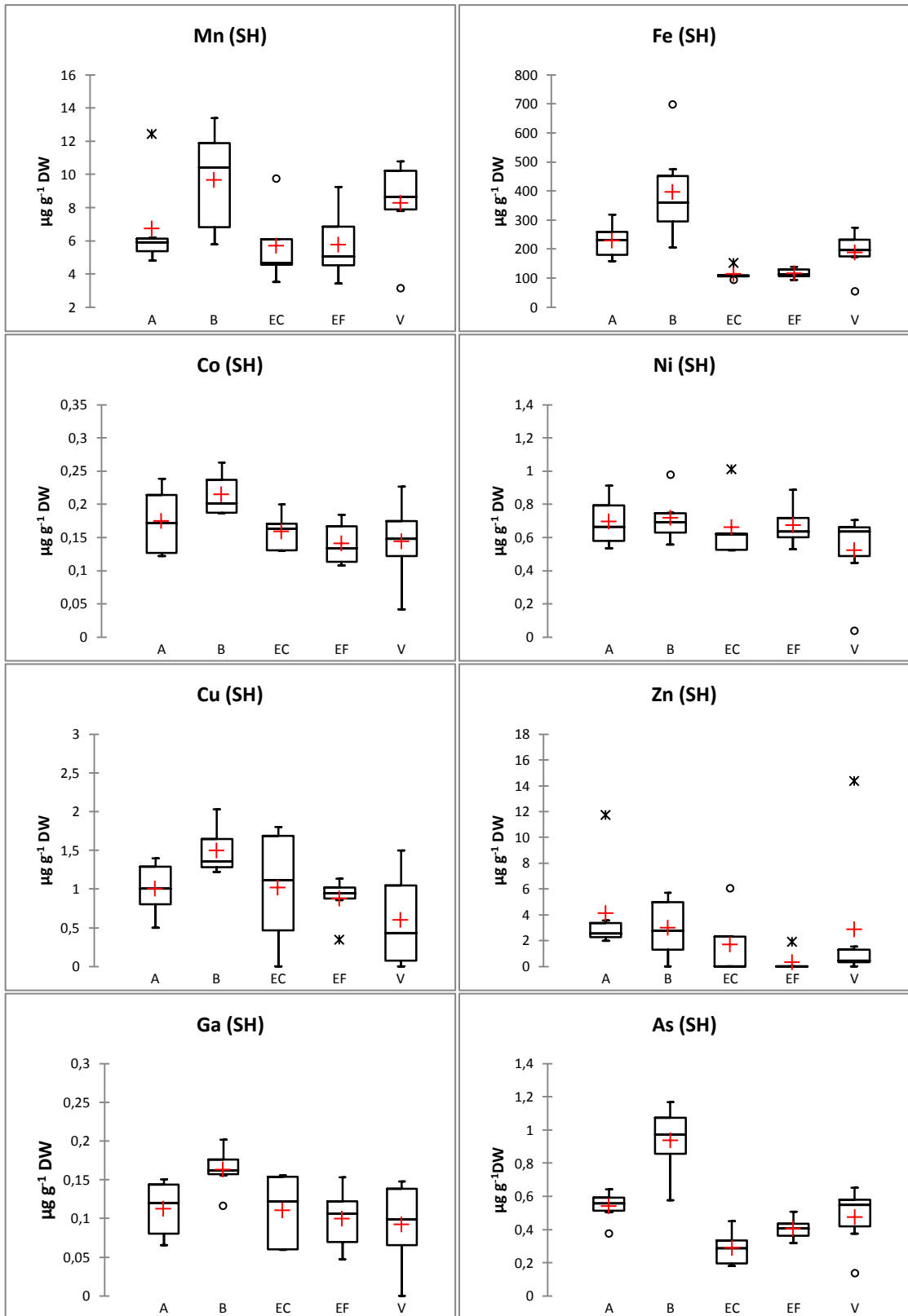
Figura 72: Concentrazione rilevata in ogni campione (3 repliche da 6 individui), per ciascuno degli elementi considerati, nei *soft tissue* privati di epatopancreas (ST-EP), nell'epatopancreas (EP) e nei *soft tissue* totali (ST).

I risultati ottenuti per Cd e Pb nei *soft tissue* totali (ST) possono essere confrontati con i valori limite stabiliti dal Reg. CE 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari: tenendo presente che i valori sono espressi in $\mu\text{g g}^{-1}\text{ WW}$ nel Regolamento e che il peso secco di *V. philippinarum* è circa l'85% del peso umido dell'animale, i risultati ottenuti in questo studio confermano la salubrità di questi organismi destinati al consumo umano.

4.3.2 Conchiglie di *Venerupis philippinarum*: analisi elementale

In **Figura 73** sono riportati i box-plot relativi alle concentrazioni espresse in $\mu\text{g g}^{-1}$ (DW, *Dry Weight*) di tutte le conchiglie (SH) analizzate per sito.





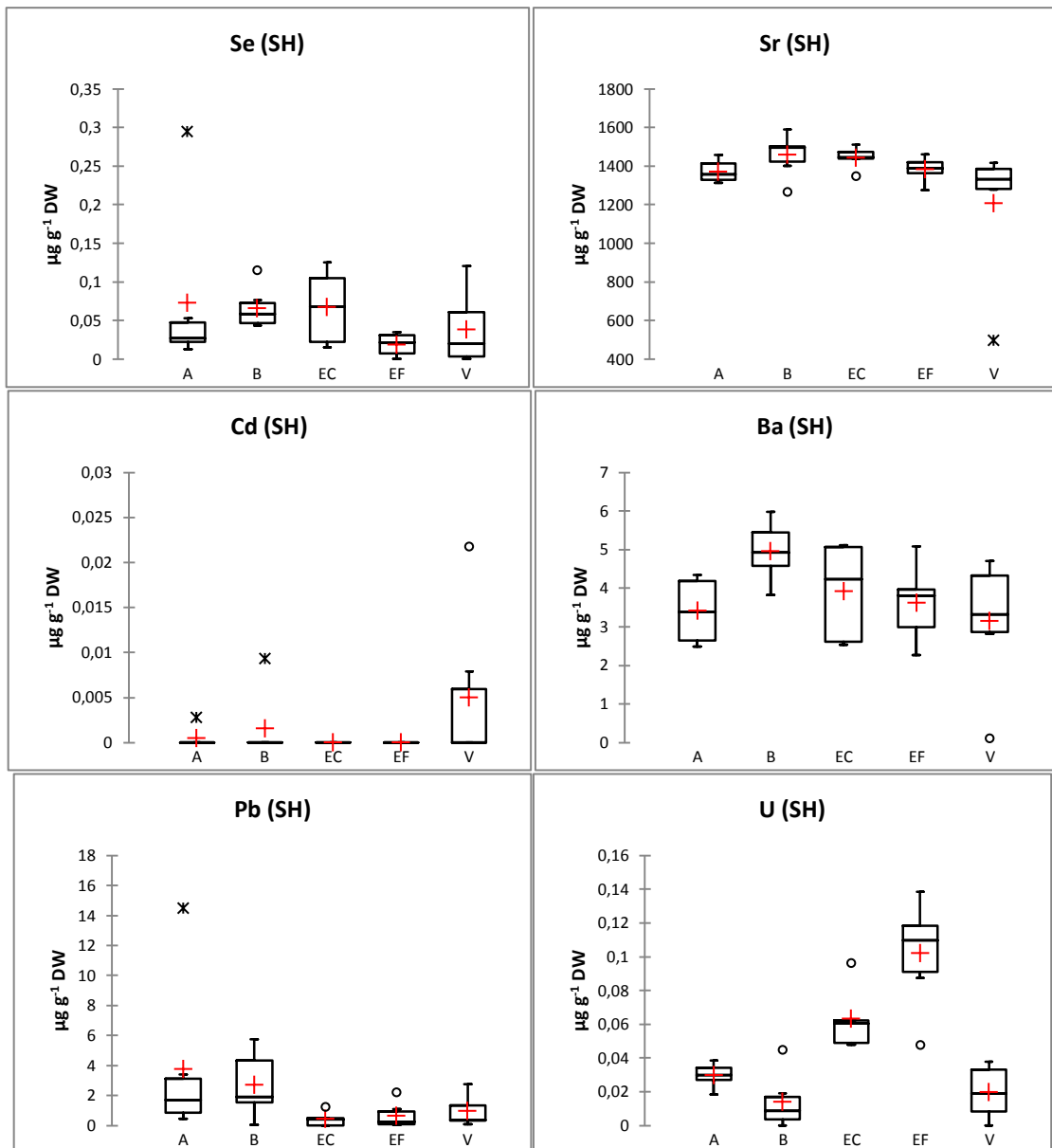


Figura 73: Box plot relativi ai valori di concentrazione degli elementi considerati nelle conchiglie (SH) di *V. philippinarum* per i 5 siti misurate in 6 repliche. [Il rettangolo è delimitato dal primo e dal terzo quartile e diviso al suo interno dalla mediana; i segmenti sono delimitati dal minimo e dal massimo dei valori. In rosso è indicato il valore medio, mentre gli asterischi e i cerchi corrispondono agli outliers].

I box-plot di **Figura 73** mettono in luce come gli andamenti rilevati nelle conchiglie di *V. philippinarum* per i diversi elementi considerati siano sostanzialmente diversi rispetto a quelli registrati nei soft tissue e nell'epatopancreas. In particolare:

- i valori di concentrazione più elevati si riscontrano per Ca, Na e Sr, con valori medi simili tra i vari siti;
- il Cd è presente in bassissime concentrazioni, addirittura inferiori al limite di rivelabilità dello strumento per molti campioni;

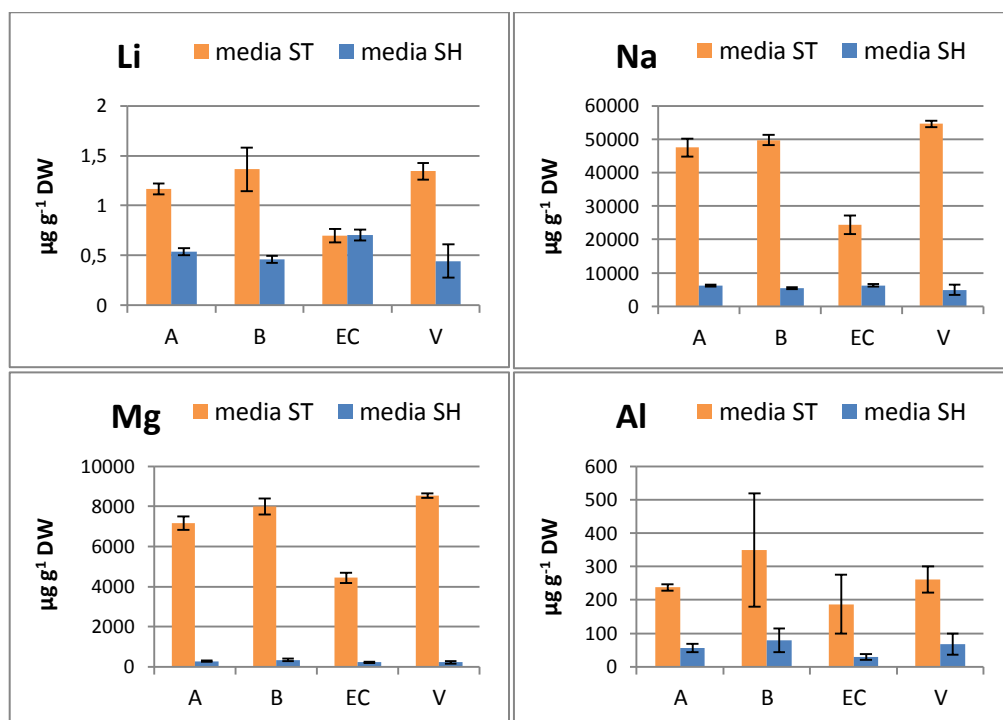
- elementi come Mg, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Ga, As, Ba e Pb presentano andamenti comparabili, con le concentrazioni medie più elevate riscontrate nel sito B, V e A.

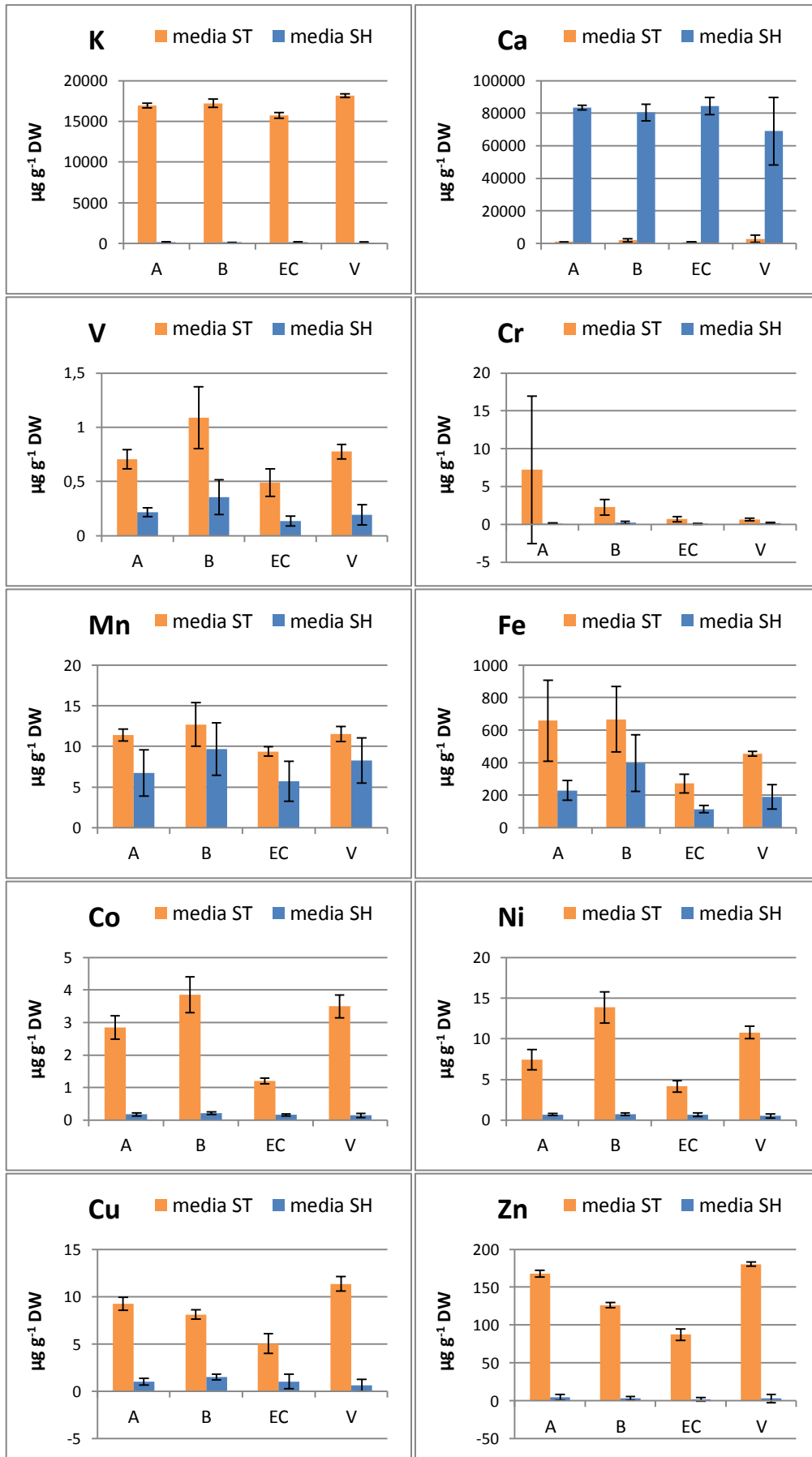
Per mettere in evidenza come gli elementi si distribuiscono all'interno degli organismi Bivalvi selezionati, in **Figura 74** sono stati messi a confronto i valori medi di concentrazione determinati nei soft tissue con quelli misurati nelle conchiglie. Nella maggior parte dei casi (Li, Na, Mg, Al, K, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Cd, U) i valori nei soft tissue superano quelli determinati nelle valve seppur tuttavia con delle differenze:

- nel caso di Na, Mg, K, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, i valori registrati nei soft tissue sono estremamente più elevati rispetto a quelli riscontrati nelle conchiglie;
- per altri elementi come Li, Al, V, Mn, Fe, Ga e U i valori per le due matrici sono nello stesso ordine di grandezza e sostanzialmente più vicini.

Gli unici elementi che presentano le concentrazioni più elevate nelle conchiglie sono Ca, Sr, Ba e Pb: mentre i primi due sono noti per essere i costituenti principali della matrice cristallina della valva – e pertanto il dato di per se non stupisce – l'informazione è particolarmente interessante per Ba e Pb che evidentemente tendono ad accumularsi preferenzialmente nella matrice carbonatica.

L'accumulo in una matrice rispetto all'altra di questi elementi potrebbe essere dovuto al fatto che il tessuto del mantello prende tali elementi direttamente dall'acqua di mare insieme al calcio per l'incorporazione nella conchiglia, senza il coinvolgimento dei tessuti molli e che il tasso di uptake e di bioaccumulo è più alto di quello nei restanti soft tissue come proposto nel caso del Mn per *Patella aspera* da Cravo *et al.* (2004).





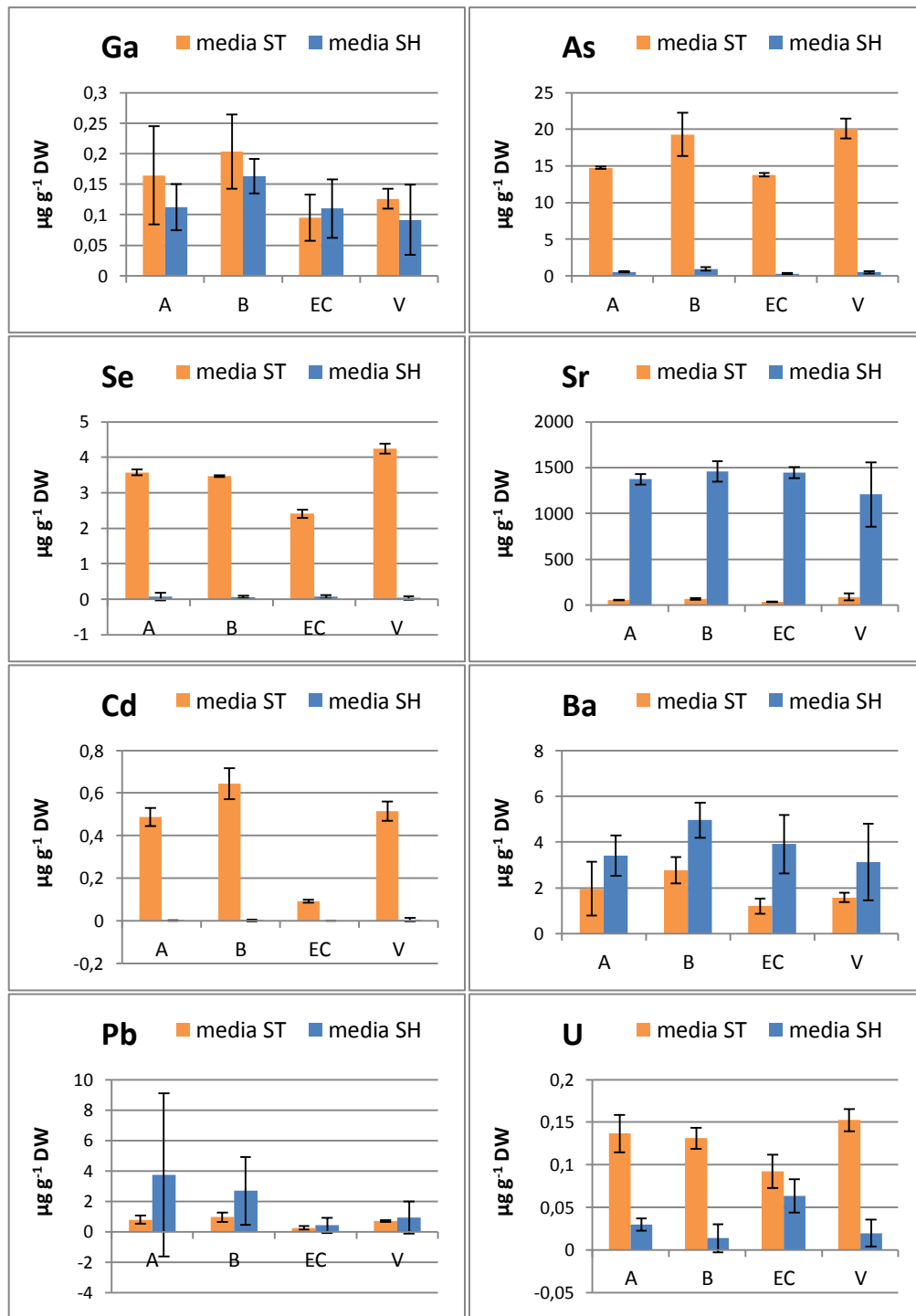
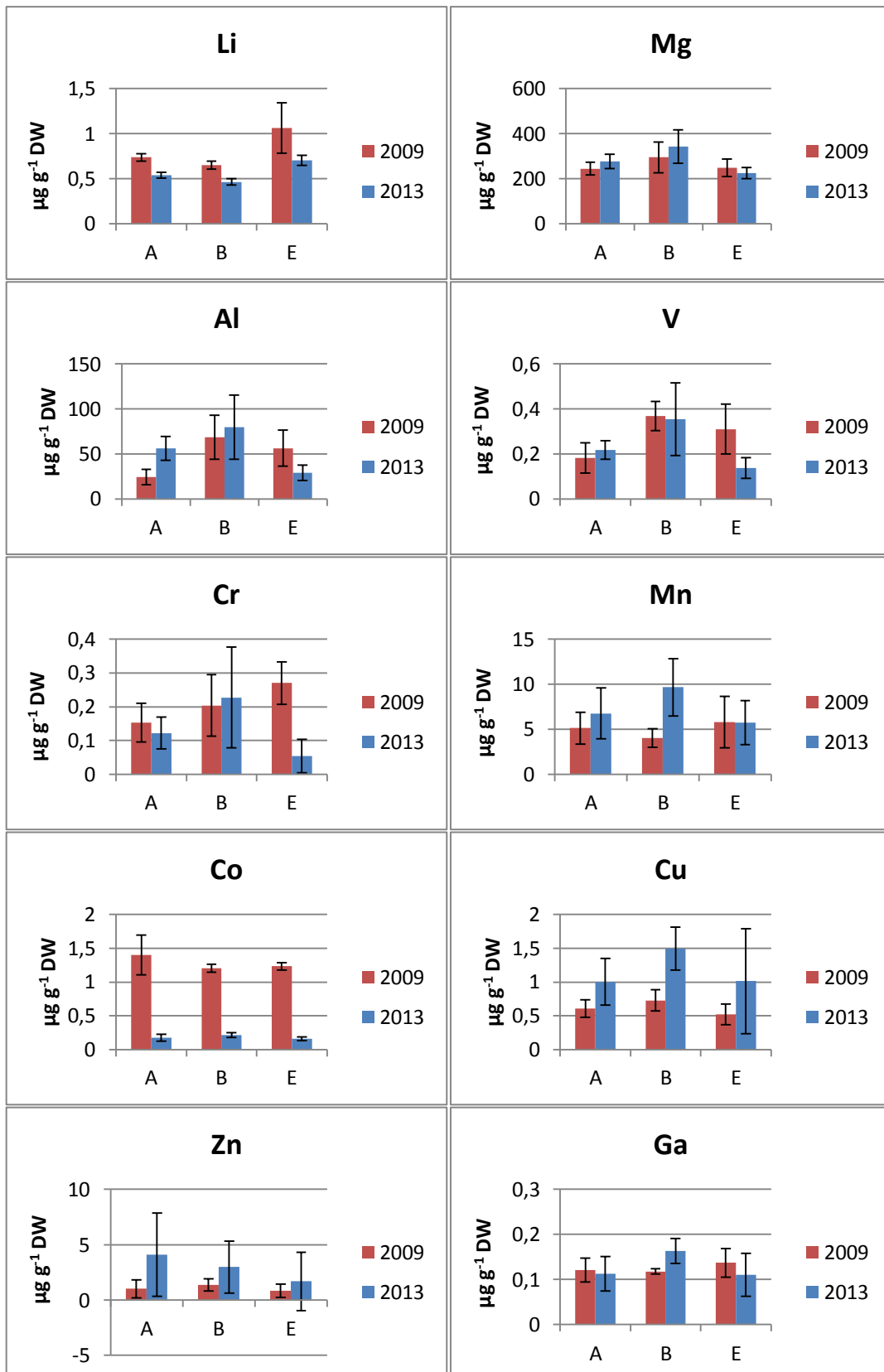


Figura 74: Confronto tra concentrazione media (n=3) nei *soft tissue* totali (ST) e concentrazione media (n= 6) nelle conchiglie di *V. philippinarum* per ogni elemento considerato nei 5 siti di campionamento, con indicazione della deviazione standard.

Ricordando che alcuni dei siti considerati in questa seconda parte del lavoro coincidono con quelli scelti da Baccarani (2012) e che i campioni di conchiglie di *V. philippinarum* analizzati nella prima parte di questo lavoro provengono proprio dal pool di organismi dell'epoca, è possibile operare un confronto delle concentrazioni rilevate nei campioni relativi alla campagna 2009 e quelli della campagna 2013 per i siti A, B e E (che corrisponde al sito EC per la campagna 2013). I grafici relativi sono riportati in **Figura 75**.



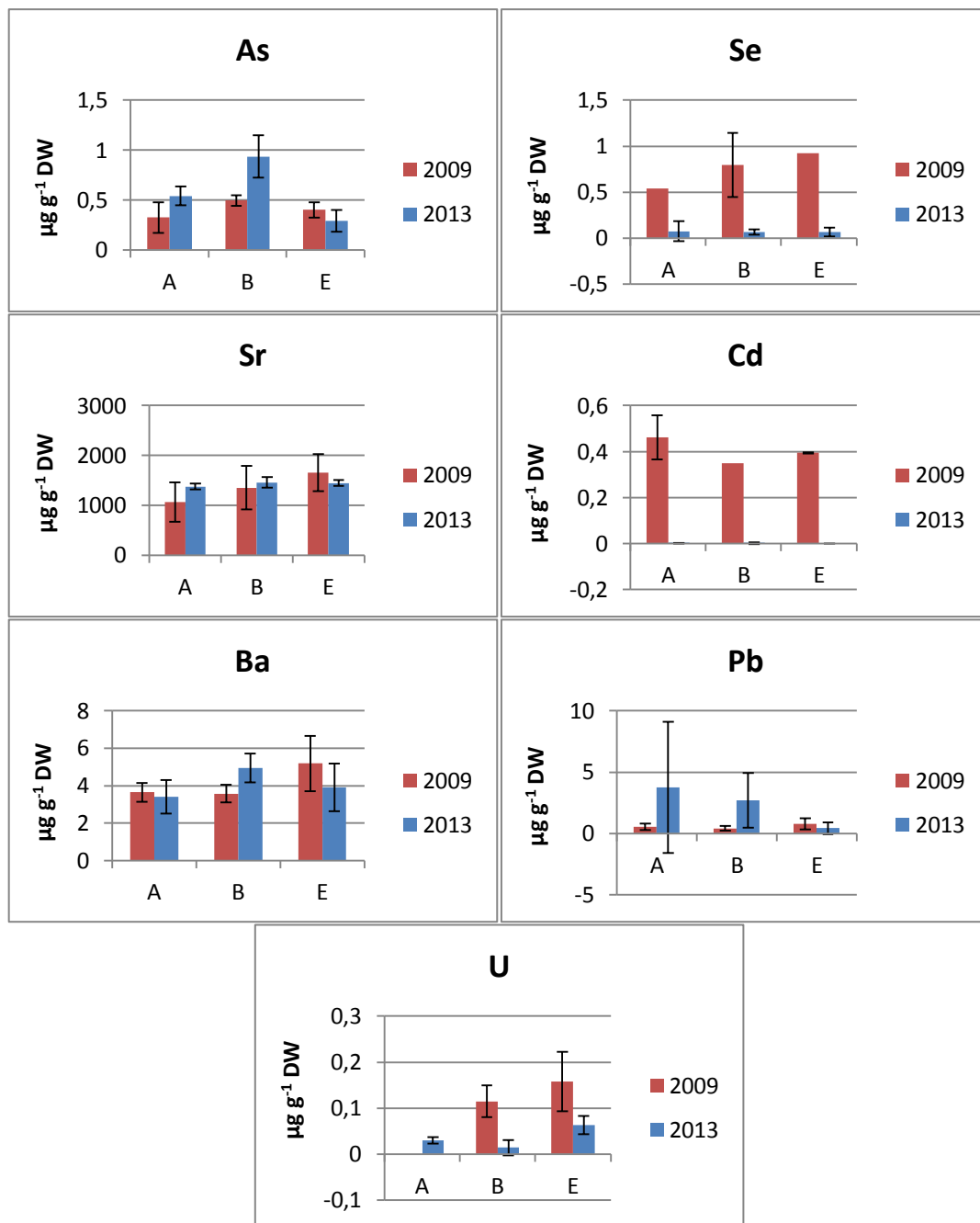


Figura 75: Confronto tra i valori medi (con deviazioni standard) delle concentrazioni degli elementi considerati nelle conchiglie di *V. philippinarum* relative al campionamento 2009 e al campionamento 2013. Si ricordi che il sito E della campagna 2009 corrisponde al sito EC della campagna 2013.

Osservando i grafici di **Figura 75** si rileva che:

- per gli elementi Mg, Al, Mn, As, Sr e Pb le concentrazioni medie determinate sono maggiori per i campioni del 2013 per i siti A e B, inferiori per il sito E;
- nel caso di Cr, Ga e Ba si registra una diminuzione dei valori medi dal 2009 al 2013 per i siti A e E, un aumento per il sito B;
- per Cu e Zn si registra un aumento delle concentrazioni dal 2009 al 2013 in tutti e 3 i siti considerati;

- nel caso di Li e U il trend è negativo per tutti e tre i siti dal 2009 al 2013;
- solo nel caso del vanadio si registra un aumento della concentrazione media per il sito A dal 2009 al 2013 e una diminuzione per i siti B e E.

In generale per il sito E la concentrazione degli elementi considerati, ad eccezione di Cu e Zn, presenta un trend negativo dal 2009 al 2013: ciò potrebbe essere legato alla diversa età degli organismi campionati, dato che sembra supportato dal fatto che il peso medio delle conchiglie è inferiore per i campioni del 2013 rispetto a quelli del 2009 (peso medio 5,96 g DW nel 2009 vs. 4,74 g DW nel 2013, si vedano **Figura 15** e **Figura 53** rispettivamente). Una lieve diminuzione del peso medio si registra tuttavia anche nel sito A (peso medio 5,94 g DW nel 2009 vs. 5,33 g DW nel 2013), mentre il sito B presenta valori molto più elevati nel 2013 (peso medio 5,80 g DW nel 2009 vs. 7,23 g DW nel 2013) come si può evincere da **Figura 15** e **Figura 53** rispettivamente.

Per entrambi i siti A e B molti elementi presentano un andamento crescente nel tempo a livello di concentrazioni medie degli elementi nelle conchiglie (Cu, Zn, Mg, Al Mn, As, Sr, Pb, V per il sito A; Cu, Zn, Mg, Al, Mn, As, Sr, Pb, Cr, Ga e Ba per il sito B); non si ritiene tuttavia che questo dato dipenda da una diversa età degli organismi stessi. Nel sito B la concentrazione aumenta dal 2009 al 2013 in accordo con un leggero aumento del peso e delle dimensioni delle conchiglie: se si considerano questi ultimi parametri come possibili indicatori dell'età dell'organismo, ciò potrebbe far pensare a una dipendenza della concentrazione dall'età. Ma nel sito A la concentrazione aumenta dal 2009 al 2013 pur non essendoci una variazione nelle dimensioni e nel peso: se ne deduce che in questo caso l'andamento crescente è molto probabilmente dovuto aumento delle concentrazioni ambientali degli elementi considerati, fattore che si considera ragionevolmente abbia influito anche sul trend registrato nel sito B.

Un discorso a parte bisogna effettuare per gli elementi Co, Se e Cd per i quali si registrano valori decisamente più bassi nel 2013 rispetto a quelli determinati per i campioni del 2009: questa differenza sostanziale nei livelli di concentrazione potrebbe essere dovuta al fatto che nelle due fasi del lavoro sono stati utilizzati per l'analisi in ICP-MS due strumenti differenti. In particolare lo strumento utilizzato per analizzare i campioni del 2009 non è dotato di camera di collisione e per tale ragione è più sensibile alle interferenze.

Per tale ragione è possibile che i valori di concentrazione determinati per questi elementi nei campioni del 2009 siano falsati dalla presenza di interferenze proprie del campione (ossia dovute alla particolare composizione della matrice) che hanno portato lo strumento a misurare concentrazioni decisamente più elevate rispetto a quelle determinate con lo strumento utilizzato nella seconda parte del lavoro. Sulla base di questo confronto si ritengono i valori relativi agli elementi Co, Se e Cd misurati nei campioni di conchiglie di *V. philippinarum* prelevati nella campagna 2009 non affidabili.

4.3.3 Sedimento: caratterizzazione

La caratterizzazione del sedimento è stata svolta mediante la determinazione in primo luogo della granulometria: le classi granulometriche considerate sono sabbia (63 µm – 1 mm), silt grossolano (20 µm – 63

μm) e silt medio-fine e argilla ($< 20 \mu\text{m}$), dopo la separazione del gravel ($> 1 \text{ mm}$); i risultati ottenuti sono riportati in **Figura 76**.

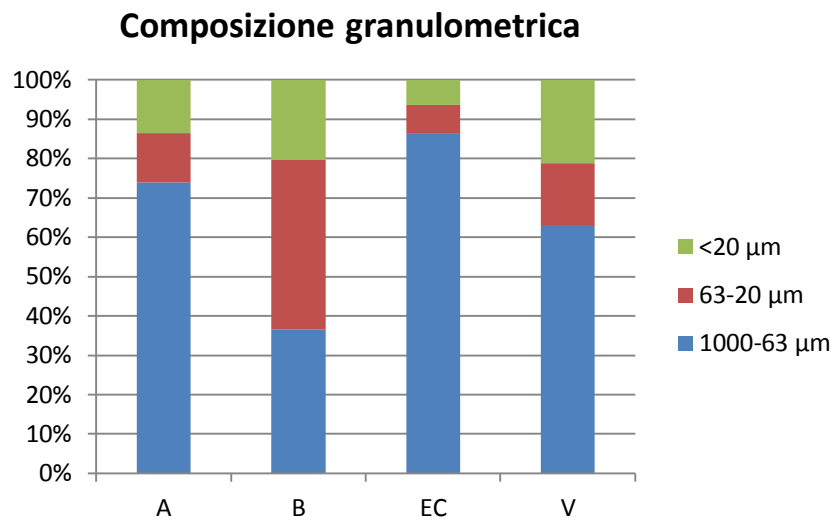
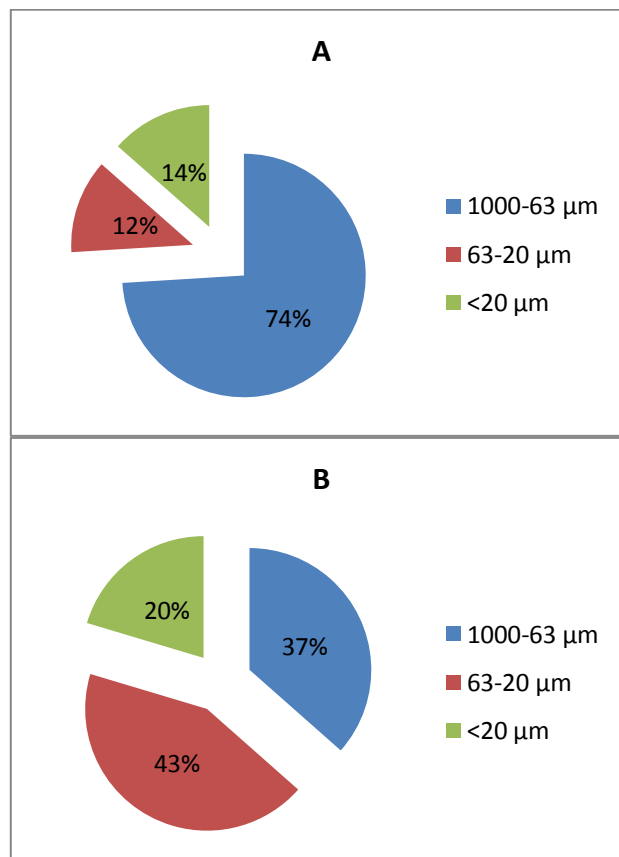


Figura 76: Composizione granulometrica del sedimento (in termini di silt medio fine, silt grossolano e sabbia) proveniente dai 4 siti considerati.

Per facilitare il confronto tra i vari siti i risultati sono riportati anche nei grafici a torta di **Figura 77** e nel diagramma ternario di **Figura 78**.



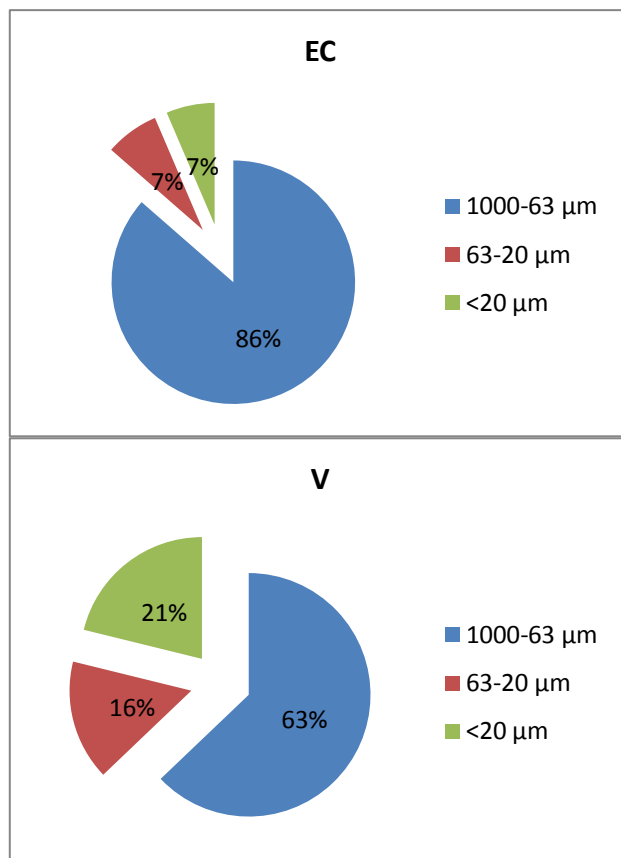


Figura 77: Grafici a torta della composizione granulometrica dei sedimenti delle stazioni considerate suddivisa nelle porzioni sabbia (63 μm – 1 mm), silt grossolano (20 μm – 63 μm) e silt medio-fine e argilla (< 20 μm).

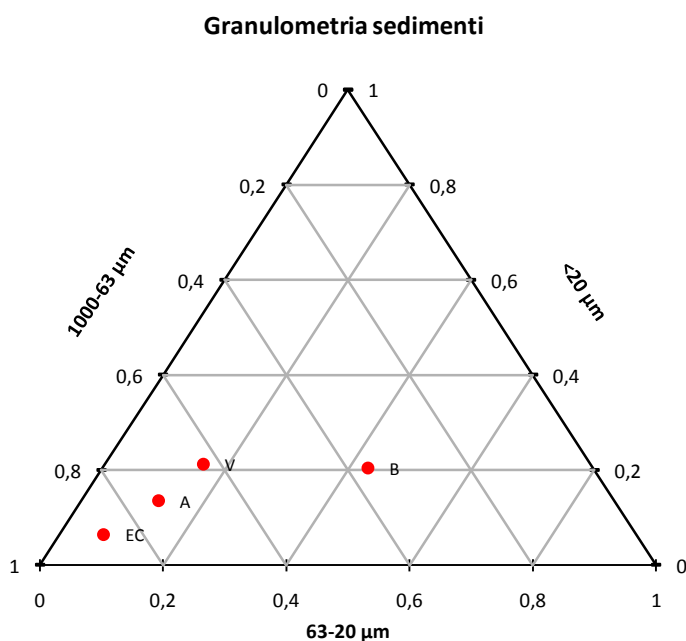


Figura 78: Diagramma ternario che riporta la composizione granulometrica dei 4 siti considerati rispetto alle classi granulometriche sabbia (63 μm – 1 mm), silt grossolano (20 μm – 63 μm) e silt medio-fine e argilla (< 20 μm).

Dal confronto emerge una progressiva diminuzione della granulometria a partire dal sito EC, che presenta una percentuale di sabbia molto elevata (86%), passando per i siti A e V, che presentano una composizione simile con una percentuale di sabbia del 74% e 63%, rispettivamente), per finire con il sito B, dove la sabbia scende al 37% e prevale la componente di silt grossolano con un valore pari al 43%. Il risultato è in accordo con quanto rilevato da Maggi *et al.* (2012) che, in particolare, indicano come le percentuali più elevate di sabbia si rilevino nella zona meridionale del bacino lagunare, oltre che nei siti più vicini alle bocche di porto.

Inoltre, è possibile confrontare i dati ottenuti in questo lavoro con quelli riportati sull'Atlante della laguna (Guerzoni & Tagliapietra, 2006) pur tenendo presente che la classificazione viene effettuata dagli autori suddividendo in sabbia (1000-63 μm), silt (62-4 μm) e argilla (< 4 μm). Secondo tale classificazione i siti B e EC presentano una prevalenza di silt e sabbia rispettivamente, mentre i siti A e V risultano classificati come "silt argilloso": appare evidente come i risultati di questo lavoro siano in accordo con quelli dell'Atlante solo per i siti B e EC. Per quanto riguarda i siti A e V si assiste qui a un aumento del contenuto di sabbia che è molto probabilmente legato a un cambiamento delle condizioni idrodinamiche dell'area che hanno determinato la rimobilizzazione della parte più fina dei sedimenti.

La porzione maggiore di 1 mm è costituita quasi unicamente da frammenti di conchiglie: si riporta il contenuto di questa frazione sul totale rispetto alla frazione sabbiosa (63 μm – 1 mm) e a quella argillosa-siltosa (< 63 μm) in **Figura 79**. Tale porzione (gravel, > 1 mm) è particolarmente rilevante nel sito B.

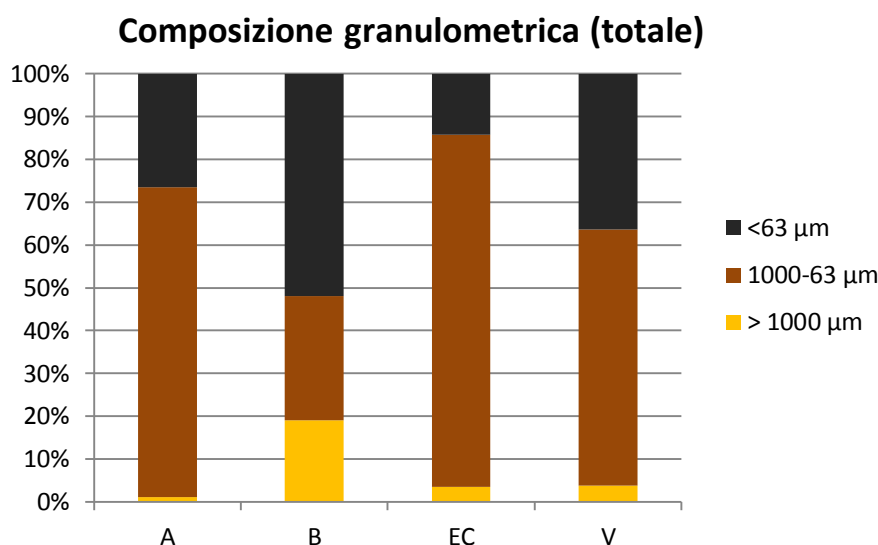


Figura 79: Composizione granulometrica del sedimento (in termini di silt/argilla, sabbia e gravel) proveniente dai 4 siti considerati.

Per quanto riguarda il calcolo dell'umidità del sedimento, i risultati ottenuti in termini di valore medio per sito sono riportati in **Figura 80**.

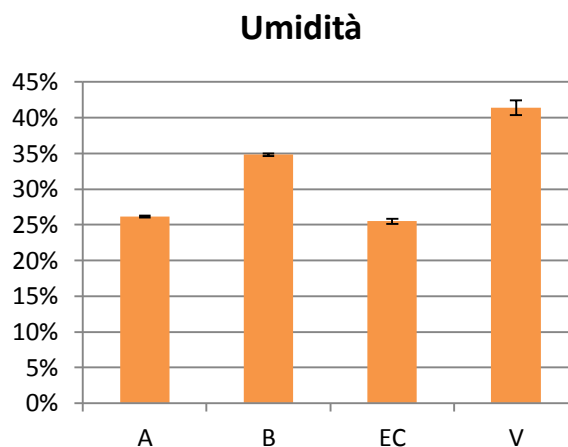


Figura 80: Umidità percentuale media, con deviazione standard (n= 3) del sedimento proveniente dai 4 siti considerati.

I valori ottenuti relativamente al contenuto di sostanza organica nel sedimento sono invece riportati in **Figura 81**.

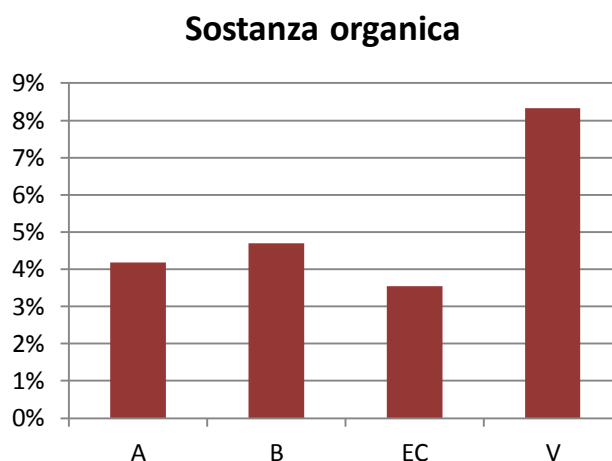
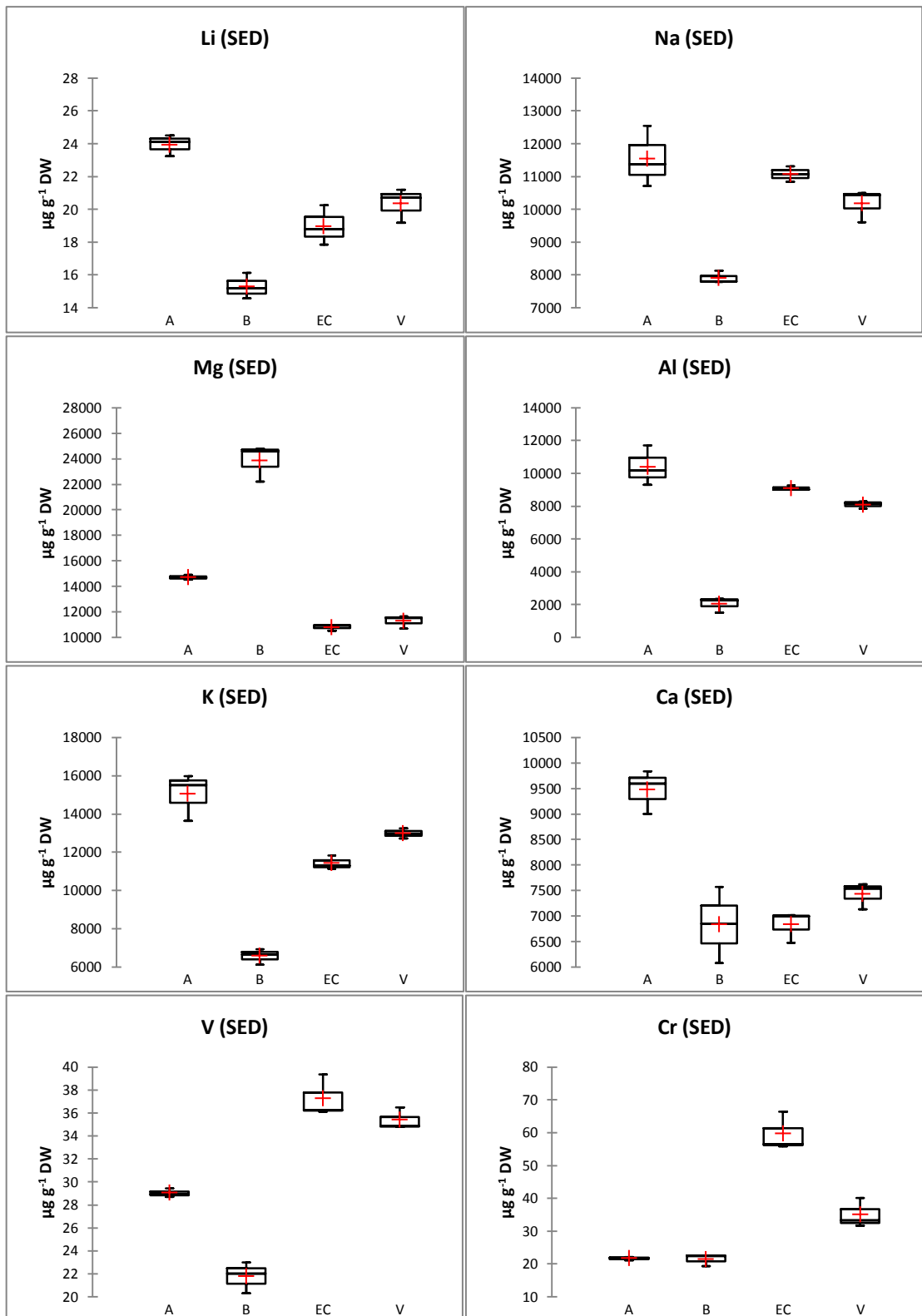


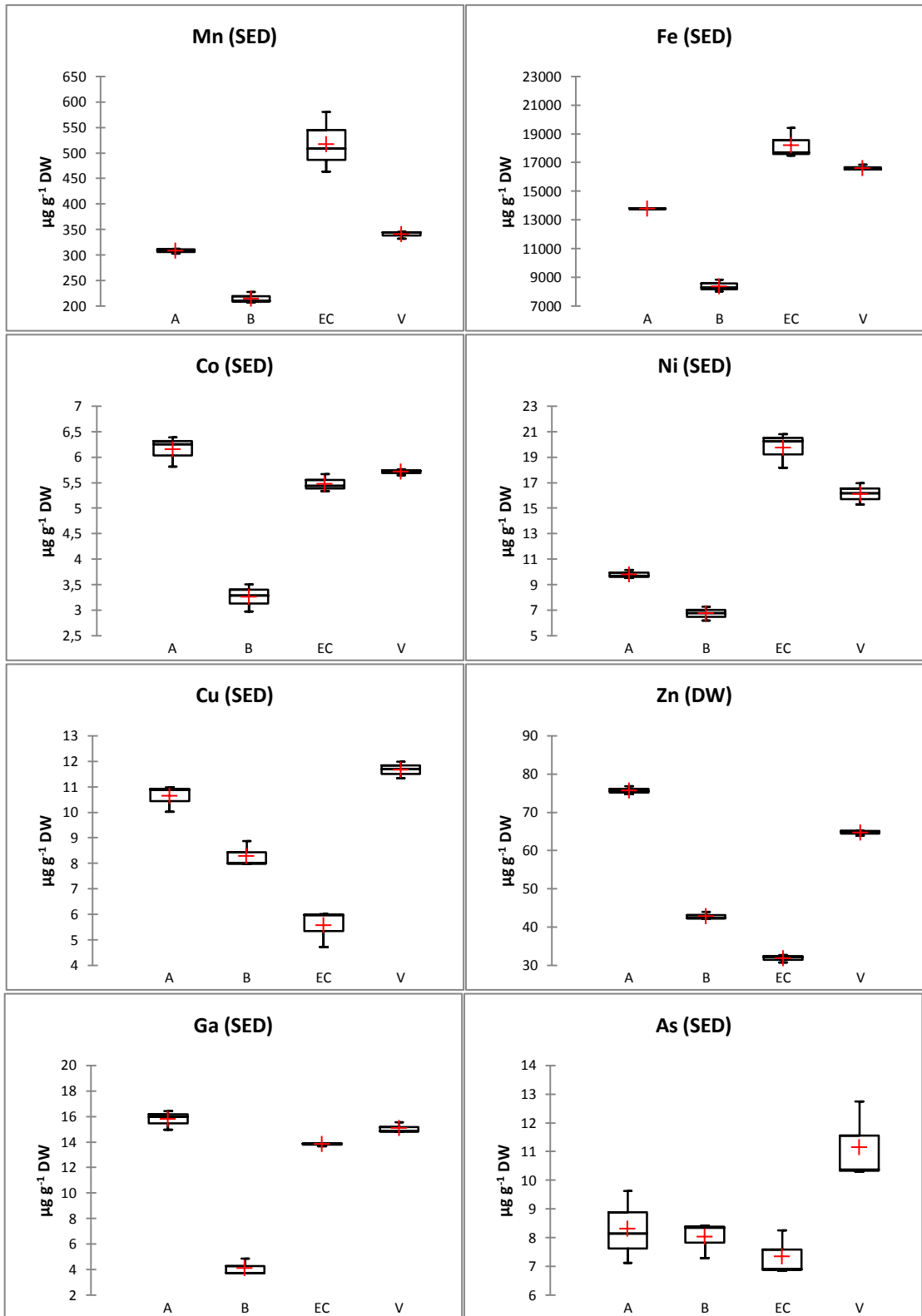
Figura 81: Percentuale di sostanza organica rispetto al peso secco del sedimento nei 4 siti considerati.

Osservando i risultati ottenuti in **Figura 80** e in **Figura 81** si nota che il sito che presenta i valori più elevati di umidità e sostanza organica è il sito V; seguono poi il sito B e, con i valori più bassi, il sito A e il sito EC. In particolare, per quanto riguarda la sostanza organica rilevata nel sito V, che supera l'8% del totale, il dato è in accordo con quello relativo allo scarto che sarà presentato in **5.3.1 Scarto: analisi qualitativa**.

4.3.4 Sedimento: analisi elementale

In **Figura 82** si riportano i box-plot relativi alle concentrazioni espresse in $\mu\text{g g}^{-1}$ (DW, *Dry Weight*) per i quattro siti considerati.





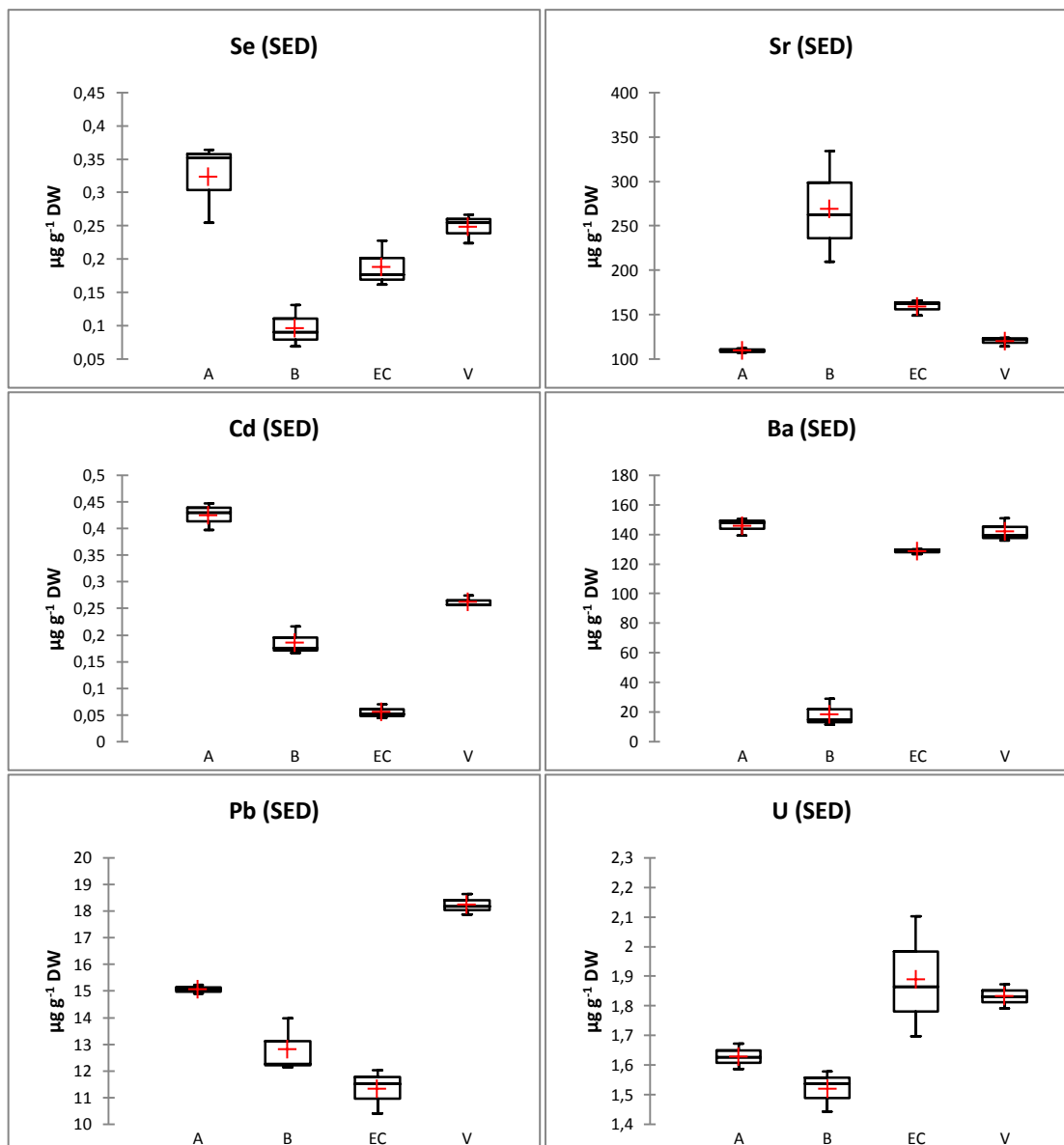


Figura 82: Box-plot relativi ai valori di concentrazione degli elementi considerati nei sedimenti per i 4 siti. [Il rettangolo è delimitato dal primo e dal terzo quartile e diviso al suo interno dalla mediana; i segmenti sono delimitati dal minimo e dal massimo dei valori. In rosso è indicato il valore medio, mentre gli asterischi e i cerchi corrispondono agli outliers].

Esaminando i box-plot riportati in **Figura 82** si possono riconoscere degli andamenti simili per più elementi:

- nel caso di Li, K, Ca, Co, Ga, Se, Ba i valori medi di concentrazione decrescono a partire dal sito A e a seguire con il sito V, EC e B;
- anche nel caso degli elementi Na, Al, Zn e Cd il sito che presenta il valore di concentrazione maggiore è il sito A, ma gli andamenti sono differenti dal precedente e specificatamente $A > EC > V > B$ per Na e Al, $A > V > B > EC$ per Zn e Cd;
- le concentrazioni medie di V, Cr, Mn, Fe, Ni e U presentano i valori maggiori per il sito EC che precede nell'ordine i siti V, A e B;
- per Cu, As e Pb i valori medi più alti si registrano nel sito V (andamento $V > A > B > EC$);

- solo nel caso di Mg e Sr i valori più elevati si registrano nel sito B.

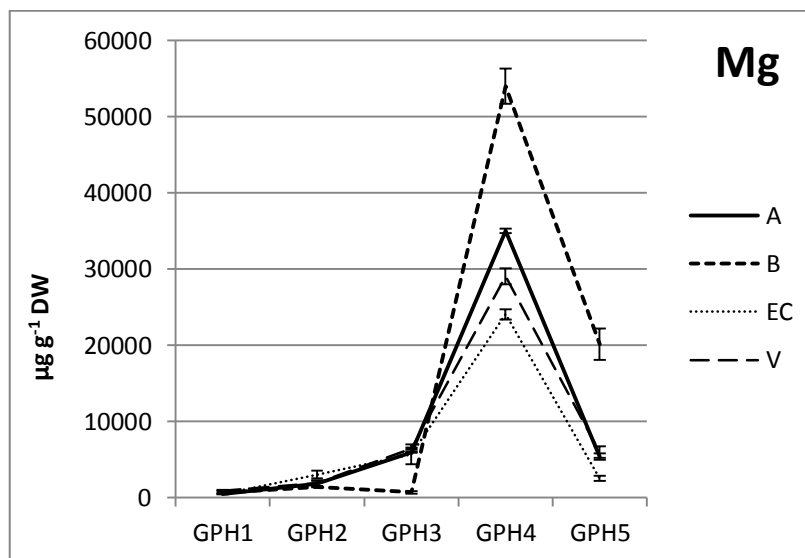
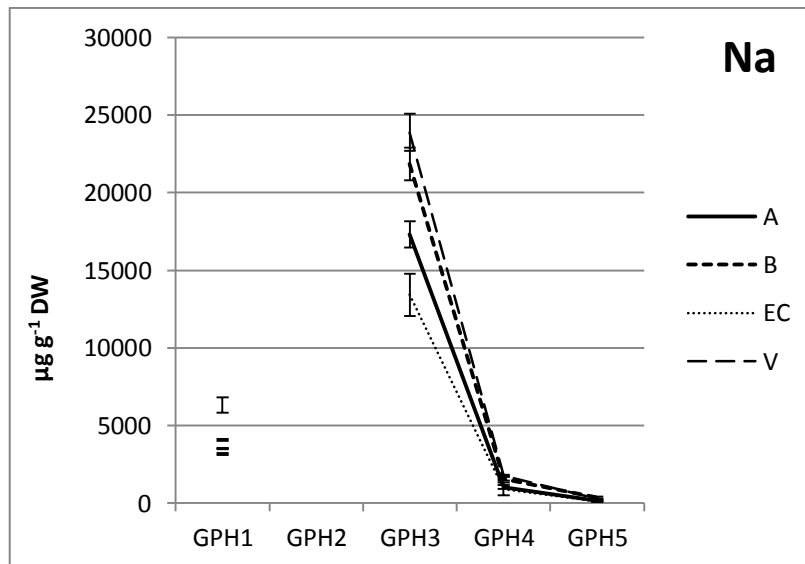
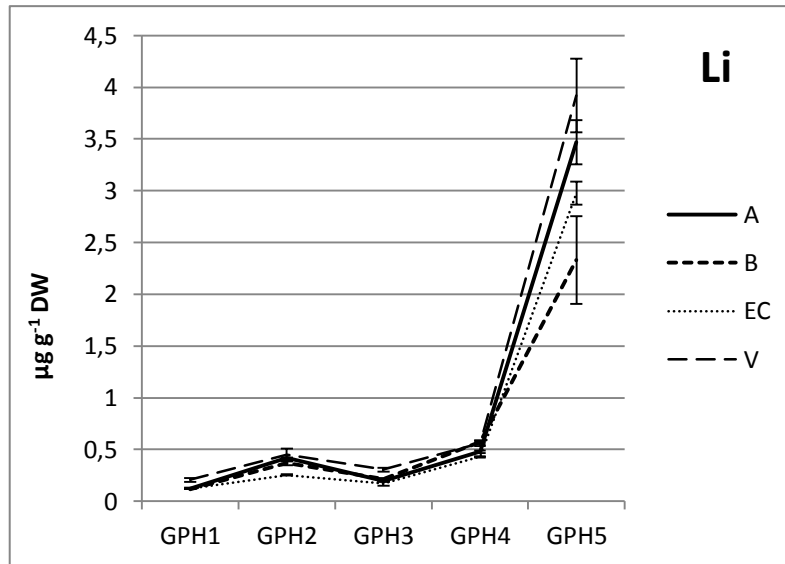
Per alcuni elementi è possibile riferire i valori di concentrazione ottenuti in questo lavoro agli Standard di Qualità Ambientale (SQA) stabiliti dal D.Lgs. 219/2010 per le sostanze pericolose prioritarie e non prioritarie nei sedimenti: le concentrazioni rilevate rispettano gli SQA stabiliti per gli elementi Cd, Ni, Pb, As e Cr, fatta eccezione per i valori relativi al Cd nel sito A (valore medio pari a $0,42 \mu\text{g g}^{-1}$ DW rispetto a uno SQA di $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) e al Cr nel sito EC (valore medio pari a $59,6 \mu\text{g g}^{-1}$ DW rispetto a uno SQA di $50 \mu\text{g g}^{-1}$ DW). Se nel caso del valore di Cd nel sito A è probabile una contaminazione derivante dagli scarti delle lavorazioni dell'area industriale di Porto Marghera, per quanto riguarda il valore di Cr nel sito EC si ipotizza la presenza in quest'area di un livello di fondo piuttosto elevato, secondo le indicazioni di Apitz *et al.* (2007).

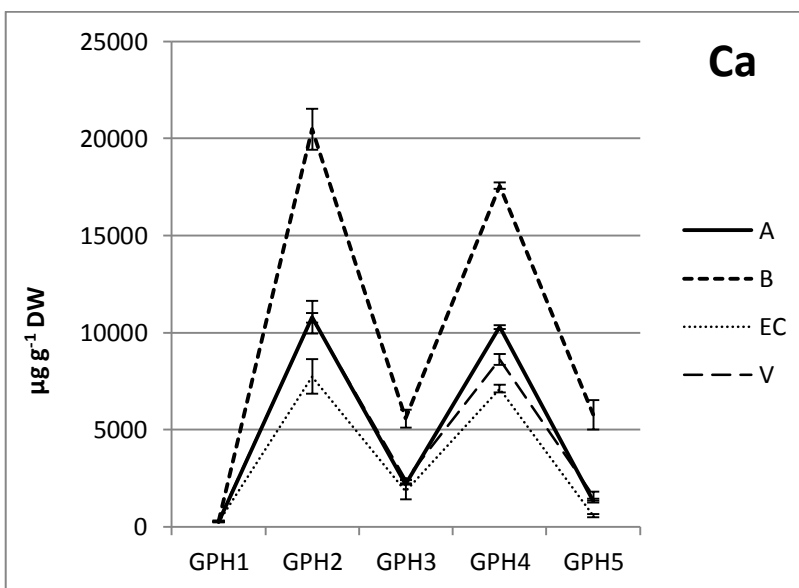
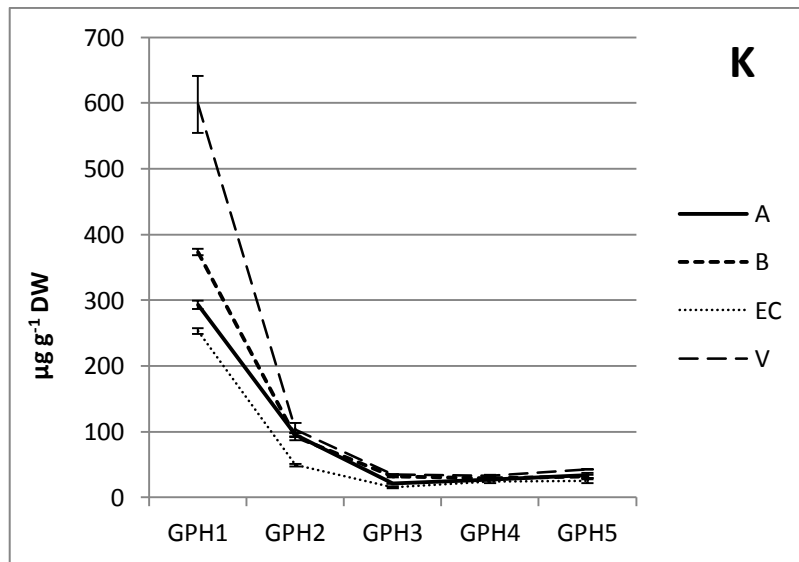
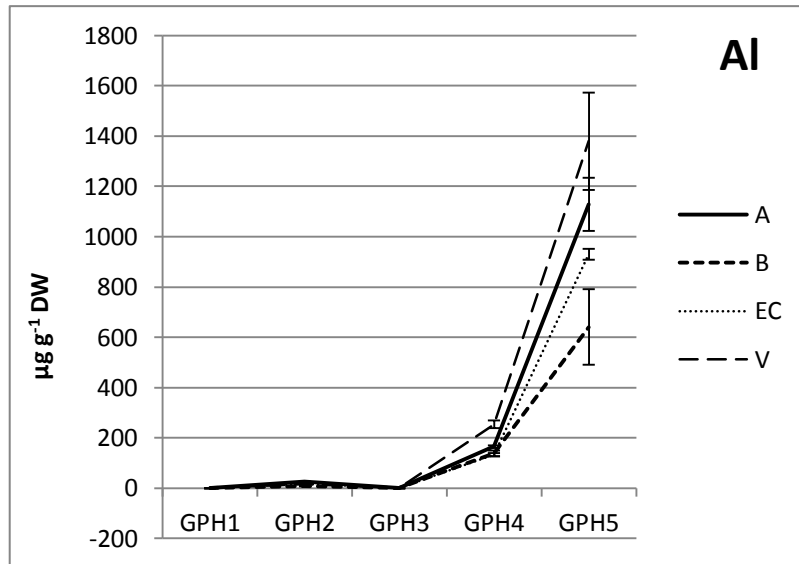
Si ritiene utile, inoltre, comparare i risultati ottenuti con i valori indicati nel cosiddetto "Protocollo Fanghi" del 1993 recante i "Criteri di sicurezza ambientale per gli interventi di escavazione, trasporto e impiego dei fanghi estratti dai canali di Venezia", che stabilisce una classificazione dei sedimenti in quattro classi (A, B, C, D con livelli qualitativi decrescenti e differenti possibili destinazioni del materiale) sulla base del superamento di predefiniti limiti di concentrazione da parte di almeno una sostanza tra quelle indicate. Per i campioni analizzati in questo studio è stato possibile confrontare le concentrazioni rilevate di Pb, Cd, Ni, Zn, Cr e Cu rispetto ai limiti tabellati nel Protocollo, giungendo a classificare tutti i sedimenti campionati di categoria B, a causa del superamento da parte del Cr dei limiti fissati per la classe A.

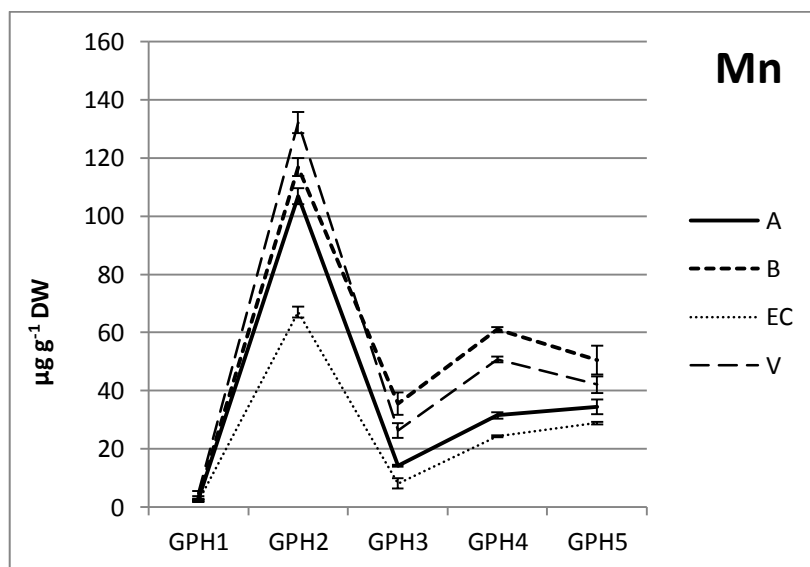
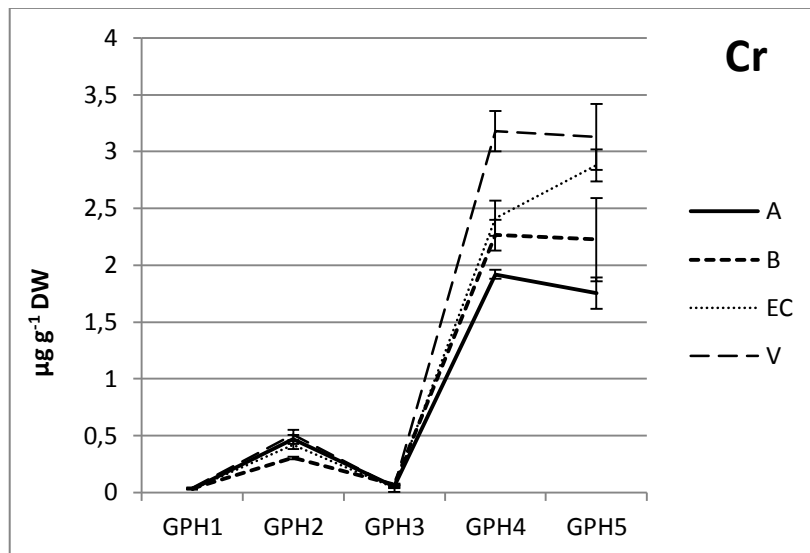
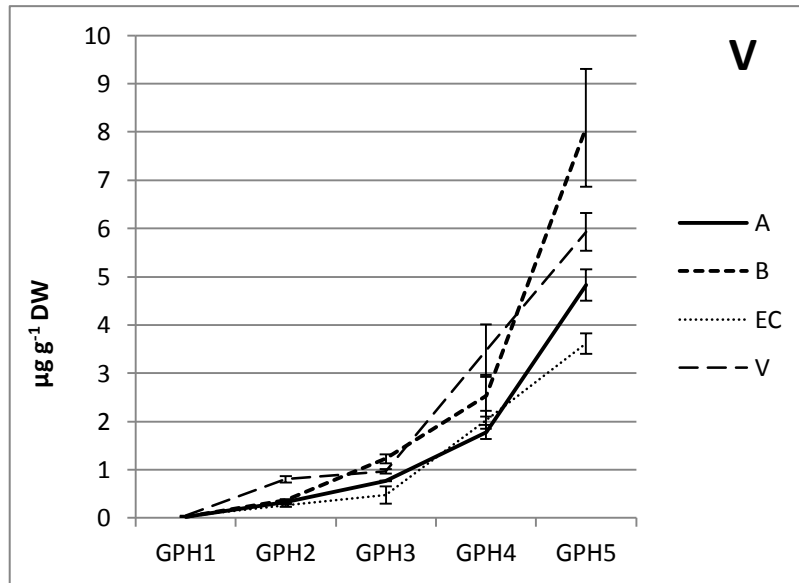
Tuttavia, come suggerito da Apitz *et al.* (2007) è possibile escludere il Cr dalla valutazione per l'assegnazione della classe di appartenenza ai sedimenti considerati dato che i limiti per la classe A (20 g g^{-1} DW) sono superati dalla maggior parte dei siti lagunari a causa del valore di fondo naturale. In questo modo tutti i campioni prelevati per il presente studio si possono considerare di classe A, ossia sedimenti "utilizzabili in interventi di ripristino di morfologie lagunari comportanti il contatto diretto o indiretto di questi fanghi con le acque della laguna" (Ministero dell'Ambiente, 1993).

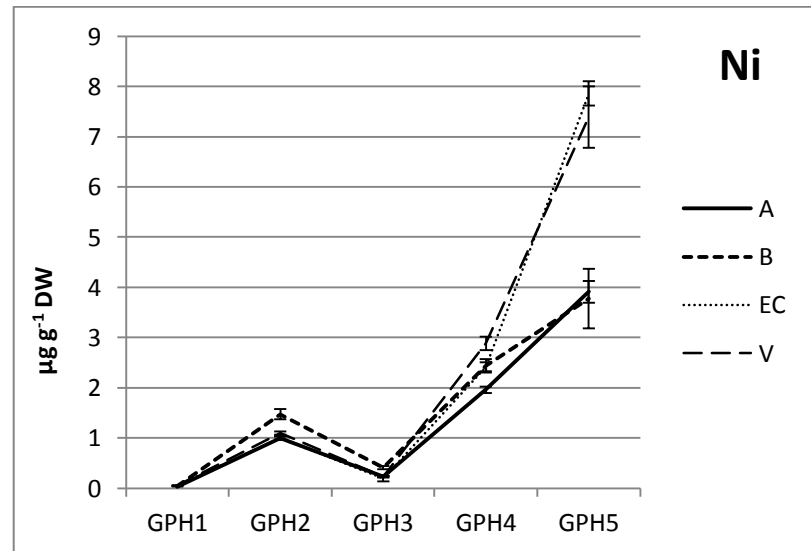
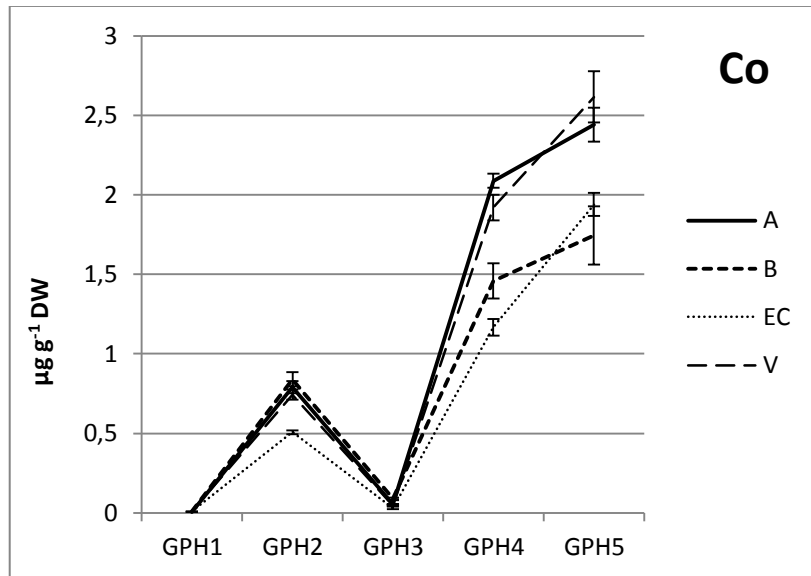
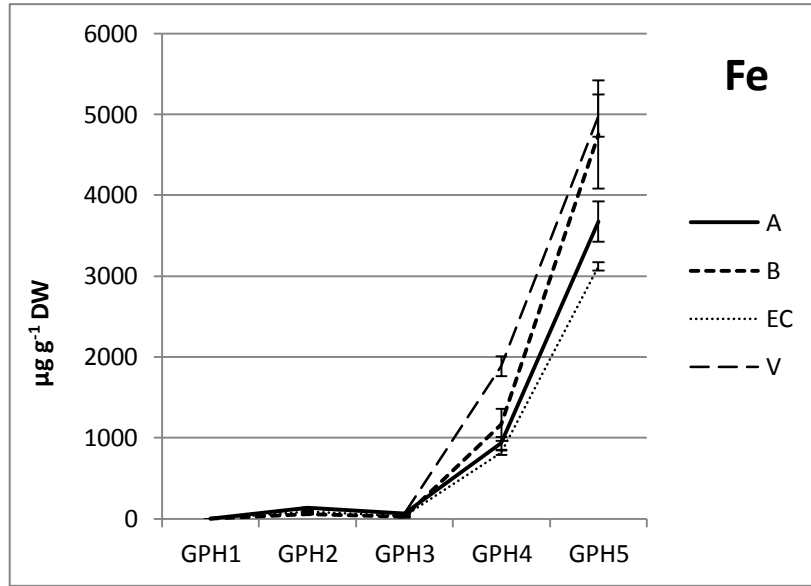
4.3.5 Fasi geochimiche del sedimento

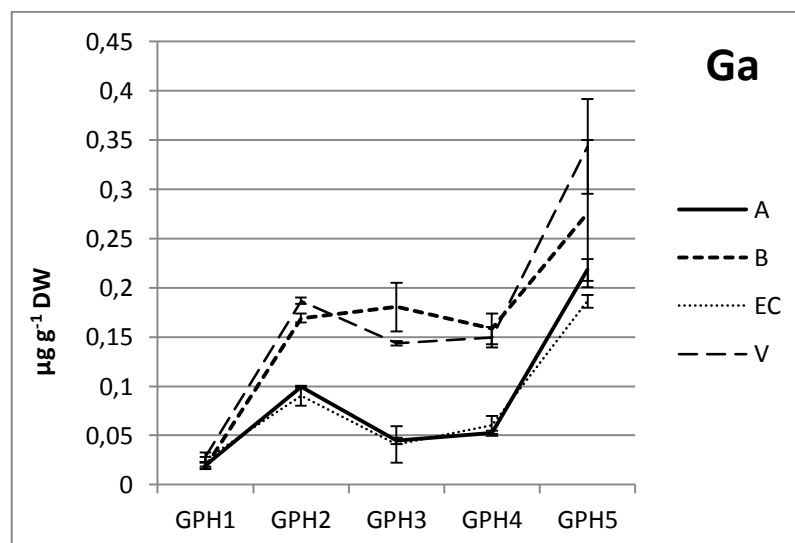
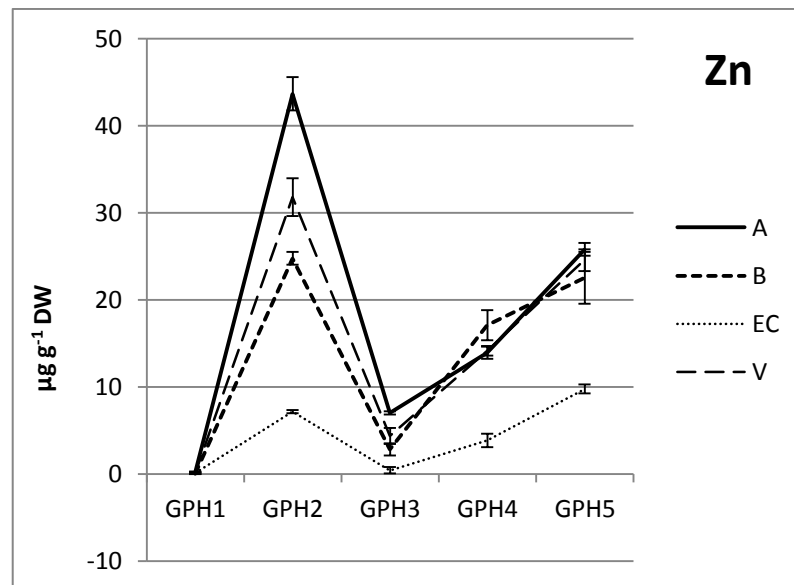
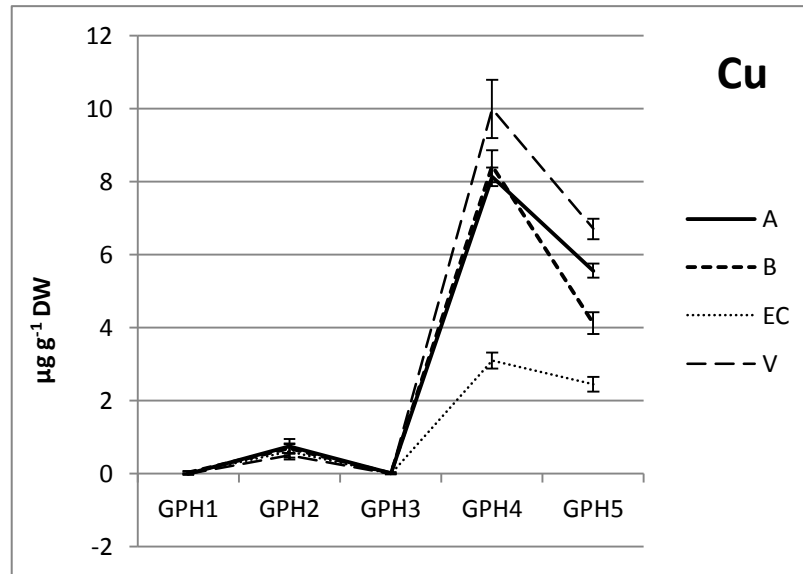
I risultati ottenuti relativi alle concentrazioni di ciascun elemento considerato, espresse in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, per ogni fase considerata (GPH1, GPH2, GPH3, GPH4, GPH5) sono riportati in **Figura 83**. Si noti che nel caso del Na non è riportato il valore per la GPH2 in quanto il contenuto è troppo elevato per essere rilevato con l'ICP-MS.

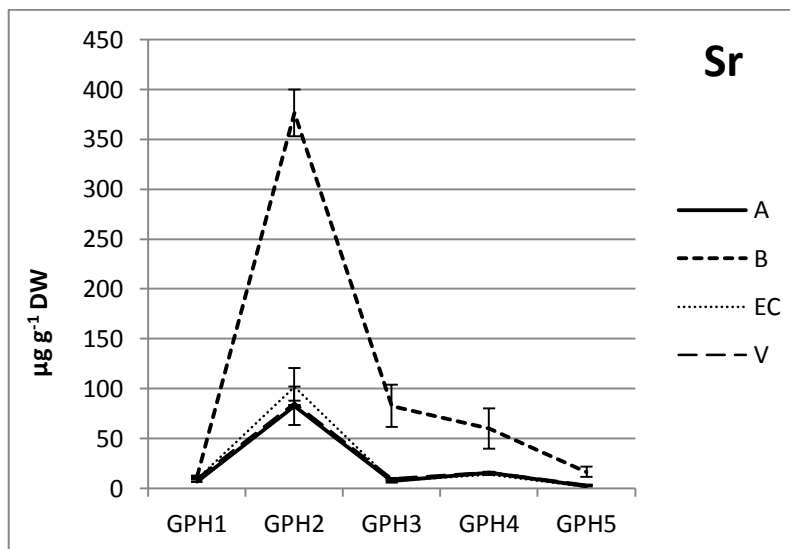
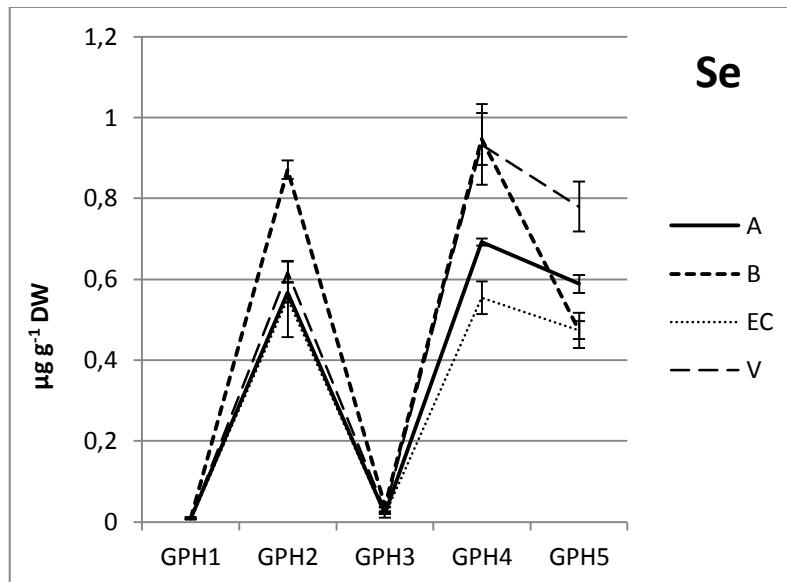
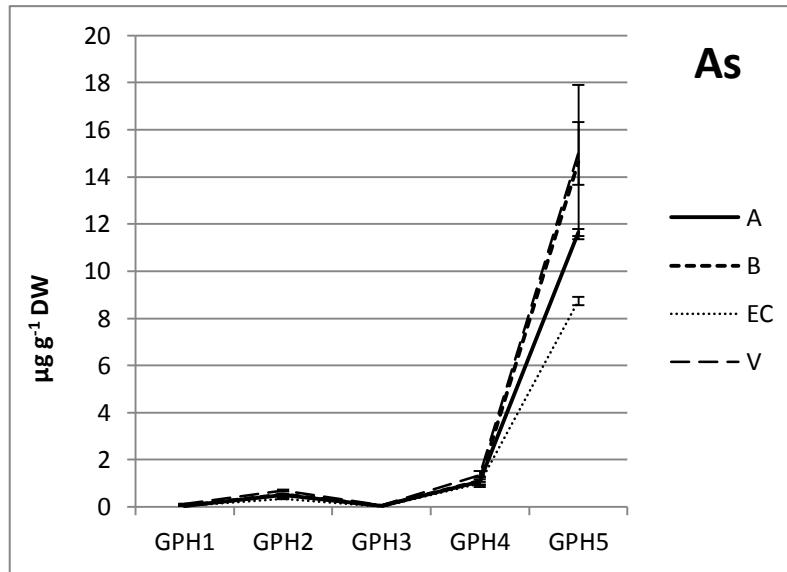


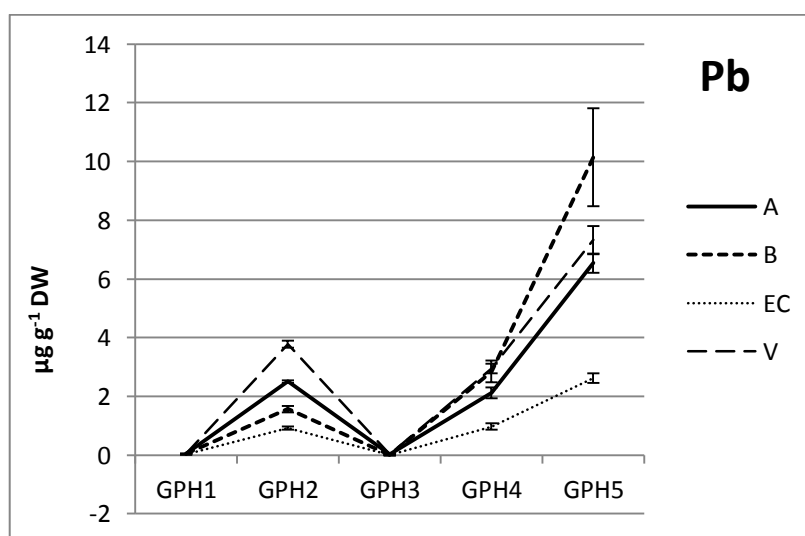
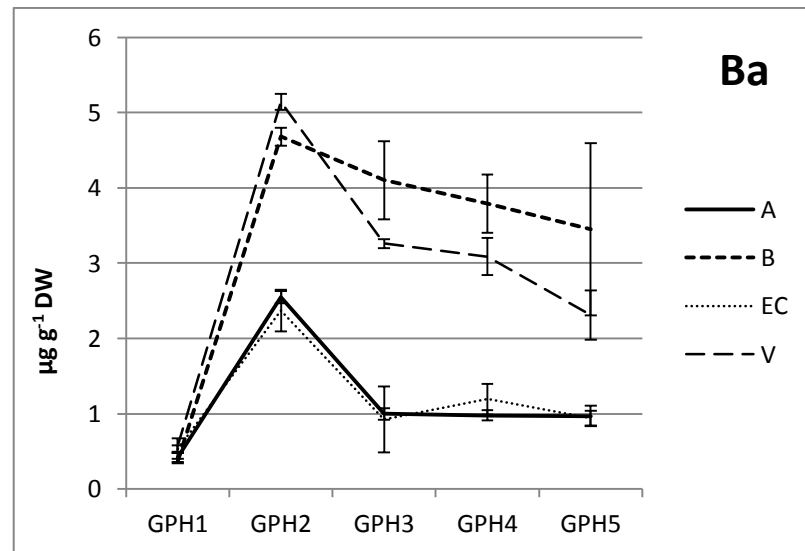
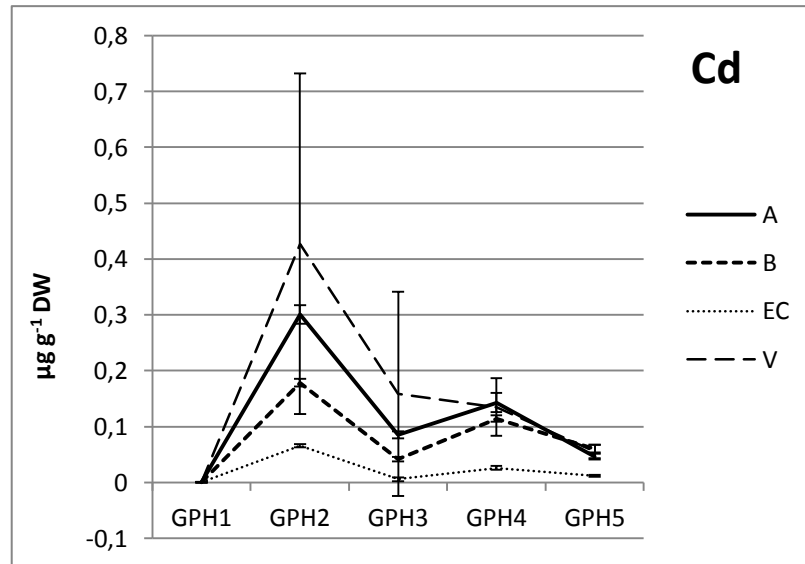












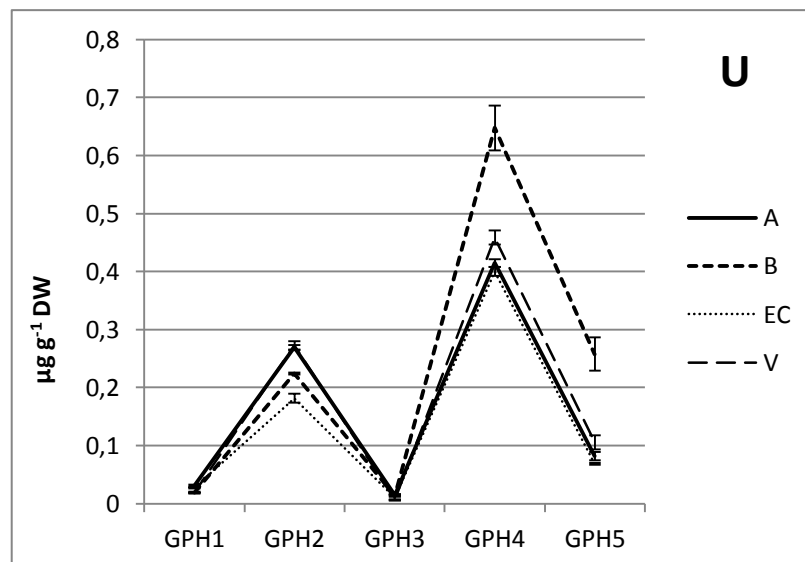
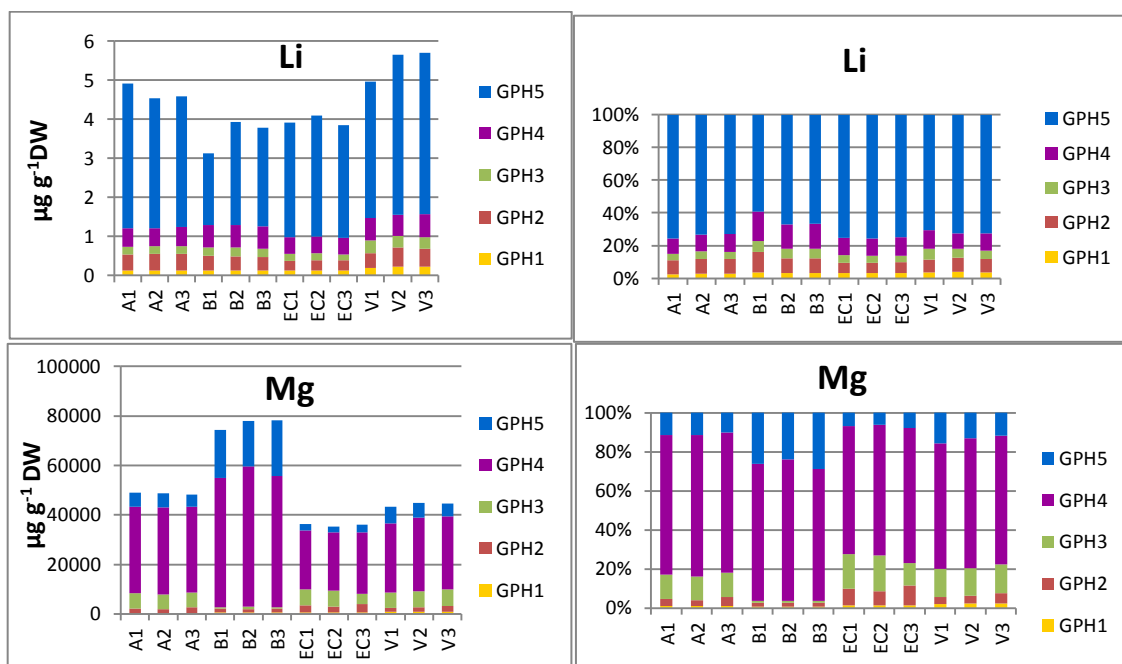
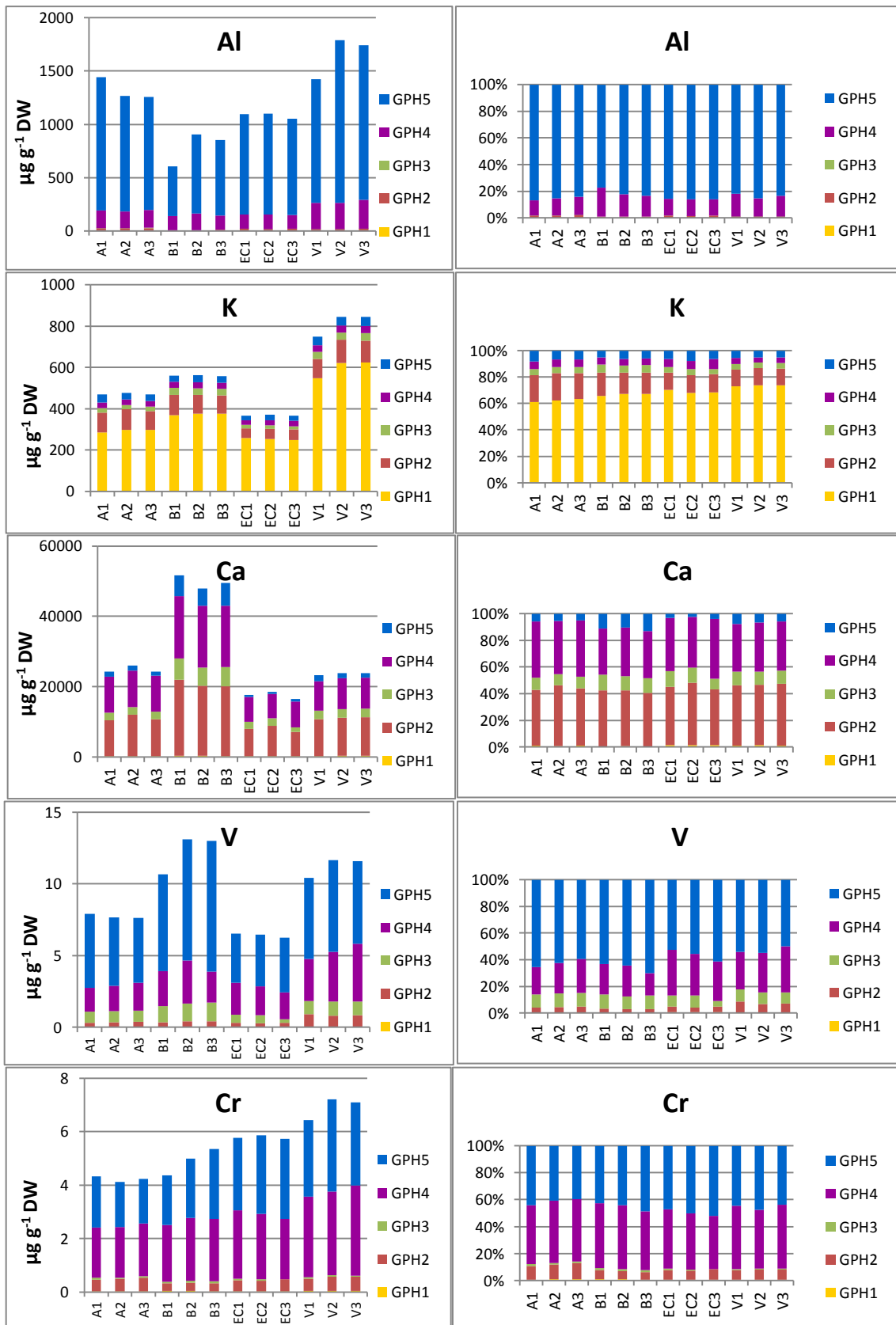
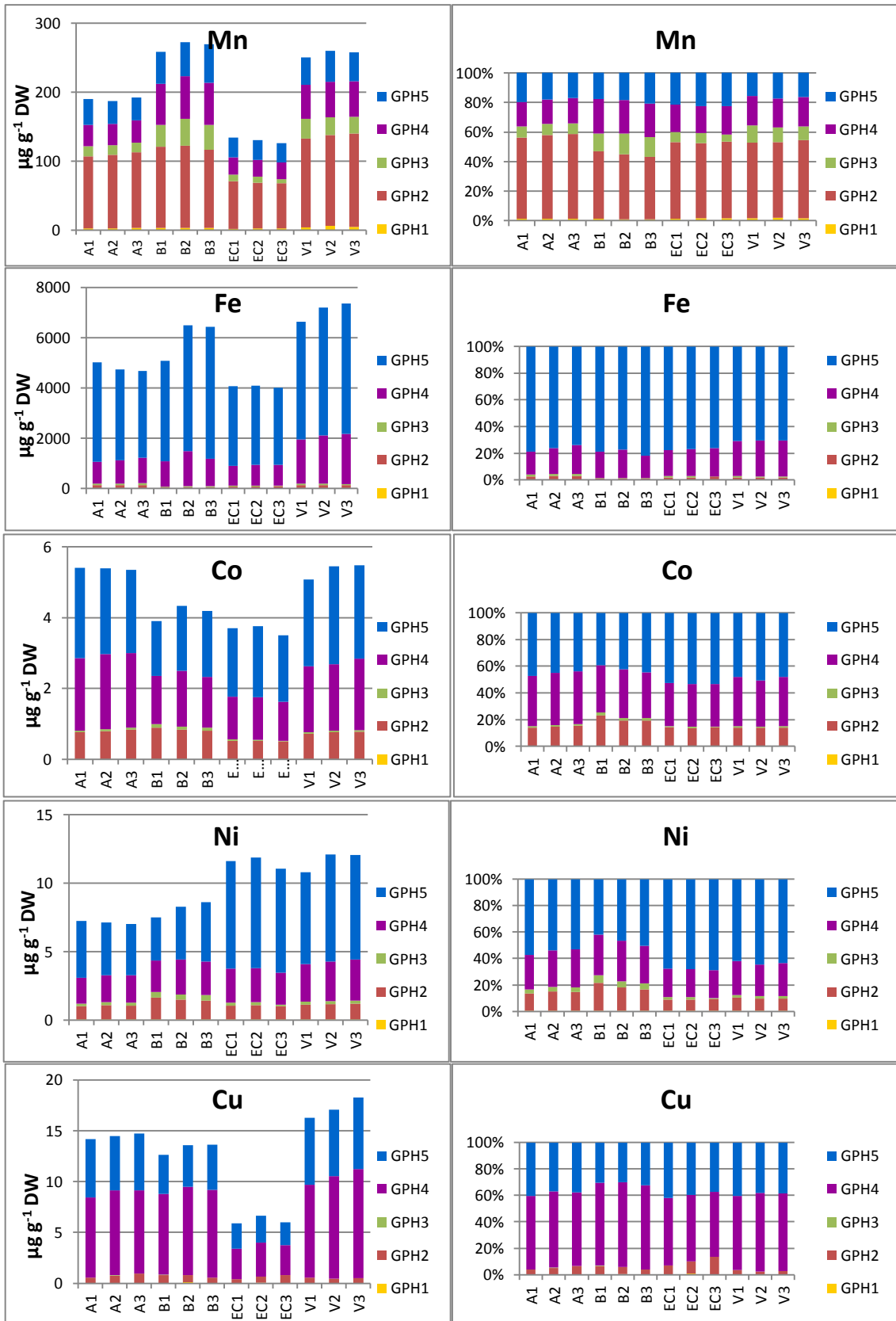


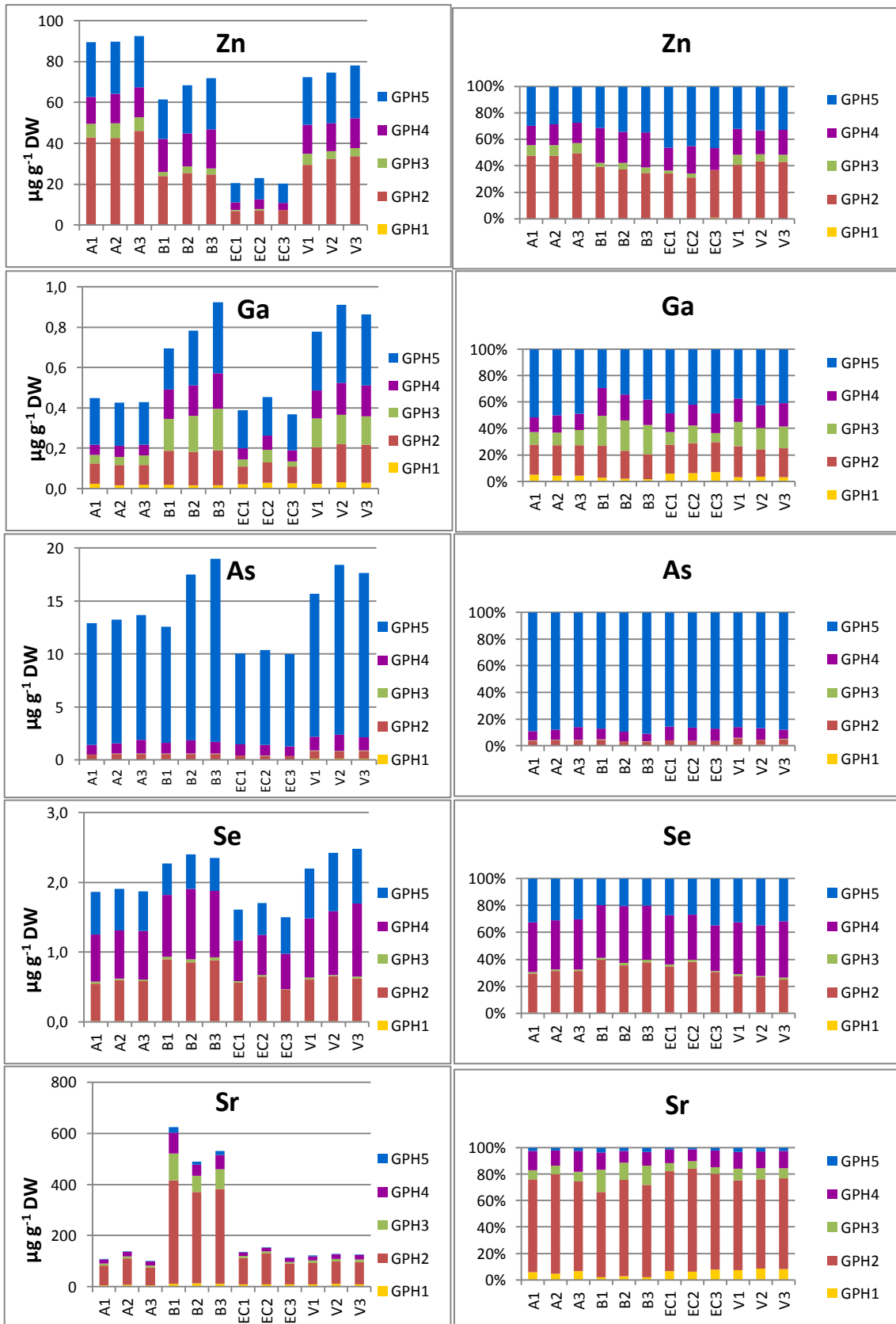
Figura 83: Andamento medio e deviazione standard (n= 3) della concentrazione degli elementi considerati nelle 5 fasi geochemiche relativamente ai 4 siti campionati.

Al fine di permettere un confronto più completo dei risultati relativi ai singoli elementi esaminati si riportano in **Figura 84** i grafici relativi al contenuto cumulativo nelle 5 fasi (nella colonna a sinistra) e la sua suddivisione in termini percentuali (nella colonna di destra) per ogni elemento, a eccezione del Na, per il quale non è stato possibile determinare la GPH2.









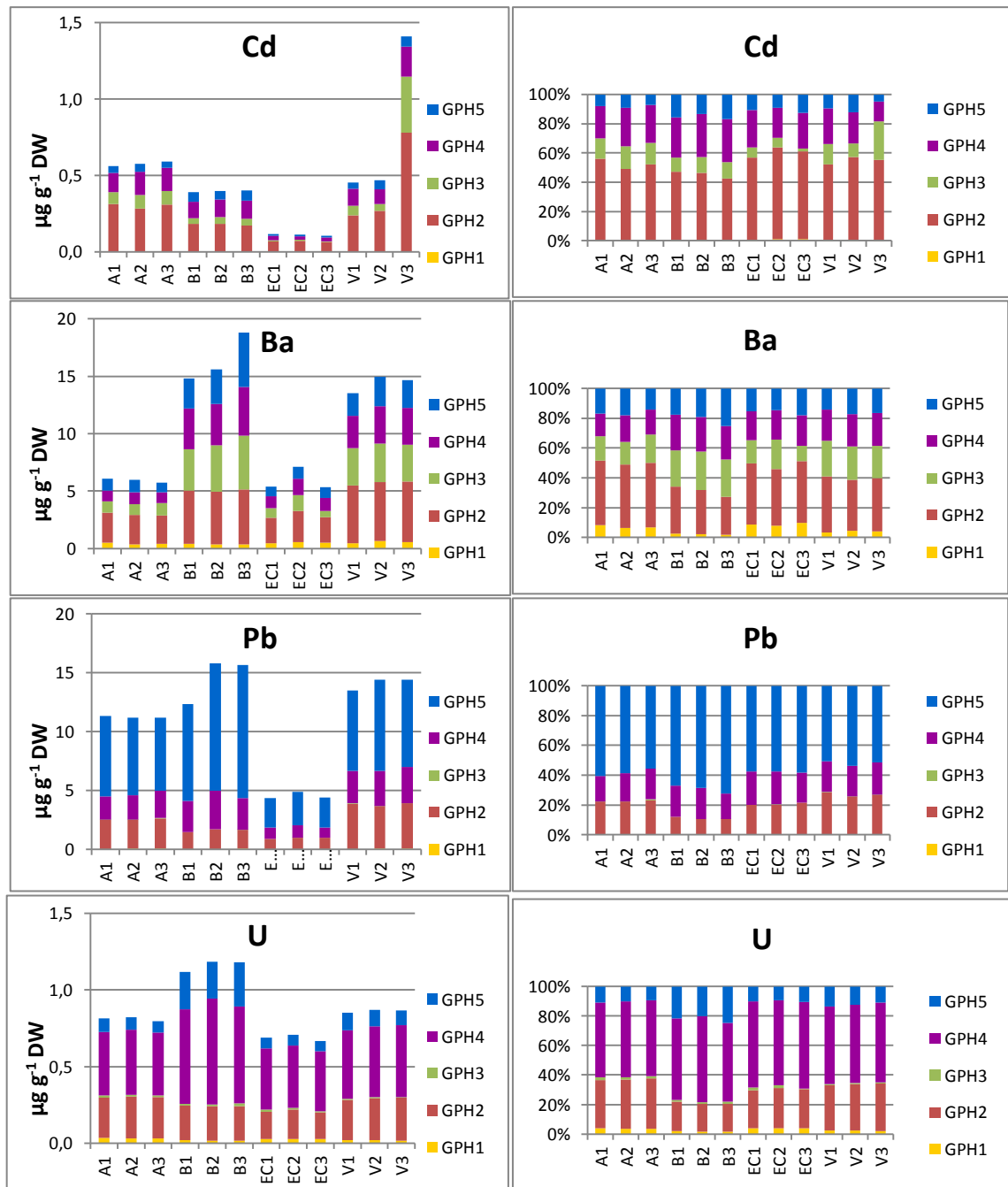


Figura 84: Suddivisione nelle 5 fasi geochimiche (GPH) del contenuto degli elementi analizzati per ogni campione di sedimento in termini assoluti in $\mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ (colonna a sinistra) e percentuali (colonna a destra).

Da un primo esame dei risultati ottenuti e riportati in **Figura 83** e **Figura 84**, si possono rilevare alcuni aspetti significativi:

- la frazione di elementi scambiabili ionicamente è sostanzialmente assente nei sedimenti analizzati, con l'unica eccezione del potassio, presente in tutti i siti con una quota superiore al 60% in GPH1;
- l'altra frazione altamente biodisponibile, quella legata ai carbonati, è rilevante per una quota significativa di elementi (Ca, Mn, Co, Ni, Zn, Ga, Se, Sr, Cd, Ba, Pb e U), ma assente per gli altri non citati;

- in generale la quota di elementi legata agli ossidi di ferro e manganese più facilmente riducibili (GPH3) è molto bassa (nella maggior parte dei casi la GPH3 è assente);
- per la maggior parte degli elementi la quota più rilevante estratta mediante la speciazione geochimica appartiene alle fasi poco biodisponibili, ossia la GPH4 e la GPH 5.

4.4 ELABORAZIONE DATI

4.4.1 Fattori di bioaccumulo

Sulla base dei risultati ottenuti relativamente alle concentrazioni degli elementi selezionati nei soft tissue (ST) e nelle conchiglie (SH) di *V. philippinarum*, nel sedimento totale (SED) e nella speciazione geochimica del sedimento si è proceduto al calcolo dei fattori di bioaccumulo (*BioAccumulation Factors*, **BAFs**), indici utili per confrontare la relazione intercorrente tra il valore medio di concentrazione di un dato elemento nel sedimento e il valore medio di concentrazione determinato nei tessuti dell'organismo oggetto di studio.

In questo lavoro si è scelto di calcolare questo indice in riferimento sia al contenuto nei tessuti molli che al contenuto nelle conchiglie, come già sperimentato in studi analoghi reperibili in letteratura; si citano a titolo di esempio:

- Huanxin *et al.* (2000) per descrivere l'accumulo di metalli pesanti in *Crassostrea virginica* utilizzano un fattore di concentrazione CF rapportando la concentrazione dei metalli nei tessuti molli o nelle conchiglie dell'ostrica con quella determinata nei sedimenti;
- Yap *et al.* (2003) determinano un fattore di bioconcentrazione (BioConcentration Factor BCF) al termine dello studio sull'accumulo di metalli in laboratorio, per mettere in evidenza quanto la conchiglia e i tessuti molli di *Perna viridis* si siano arricchiti di metallo in riferimento alla concentrazione presente nell'acqua di mare ricostruita.

In questo caso si è scelto di utilizzare i BAF con due precisi obiettivi

- in primo luogo, confrontare il rapporto intercorrente tra i livelli di concentrazione nel sedimento e quelli nell'organismo considerandone sia i tessuti molli (ST) che la conchiglia (SH): per tale ragione sono stati calcolati per ogni elemento

$$BAF_{ST-SED} = \left(\frac{\text{conc. media nei ST}}{\text{conc. media nel SED}} \right)_{\text{elemento}}$$

$$BAF_{SH-SED} = \left(\frac{\text{conc. media nella SH}}{\text{conc. media nel SED}} \right)_{\text{elemento}}$$

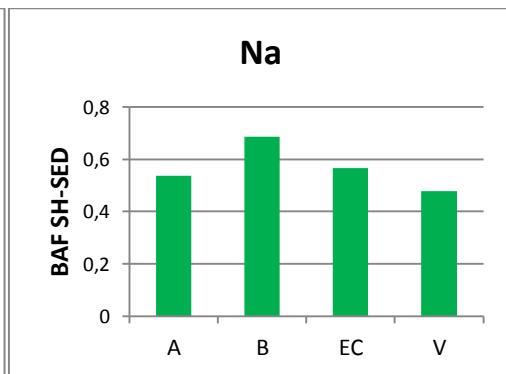
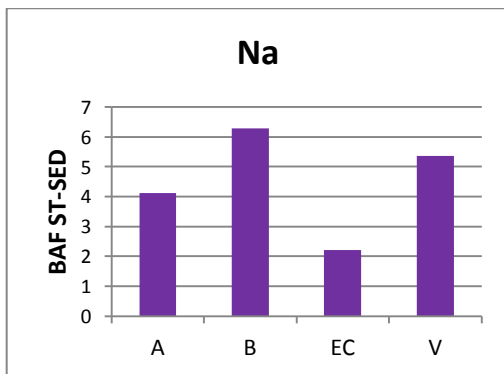
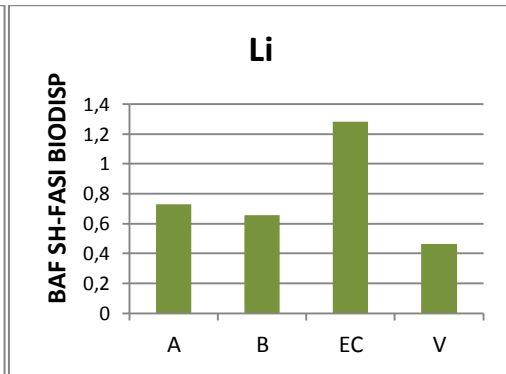
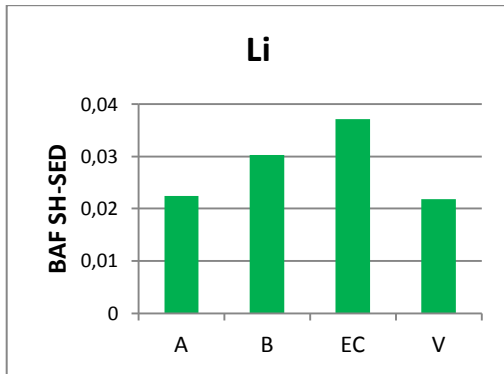
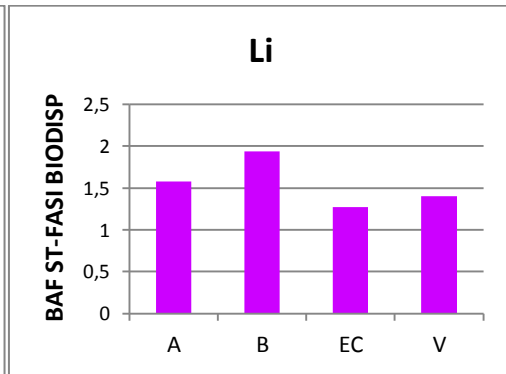
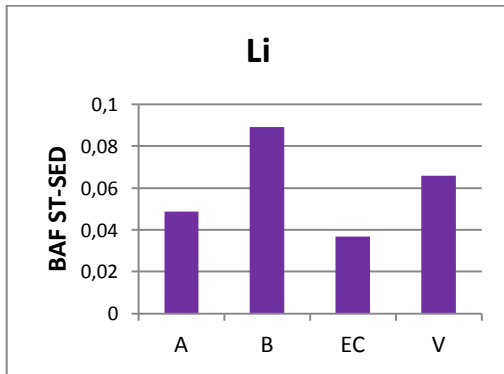
- in secondo luogo, confrontare la significatività dell'indice calcolato considerando la concentrazione media dell'elemento nel sedimento (si vedano le formule riportate al punto precedente) e dello stesso indice calcolato considerando il valore medio di concentrazione dell'elemento presente nelle prime 3 fasi della speciazione geochimica (GPH1 + GPH2 + GPH3) considerate come quelle maggiormente indicatrici di biodisponibilità dello stesso nei confronti dei bioti: perciò si è proceduto al calcolo per ogni elemento anche di

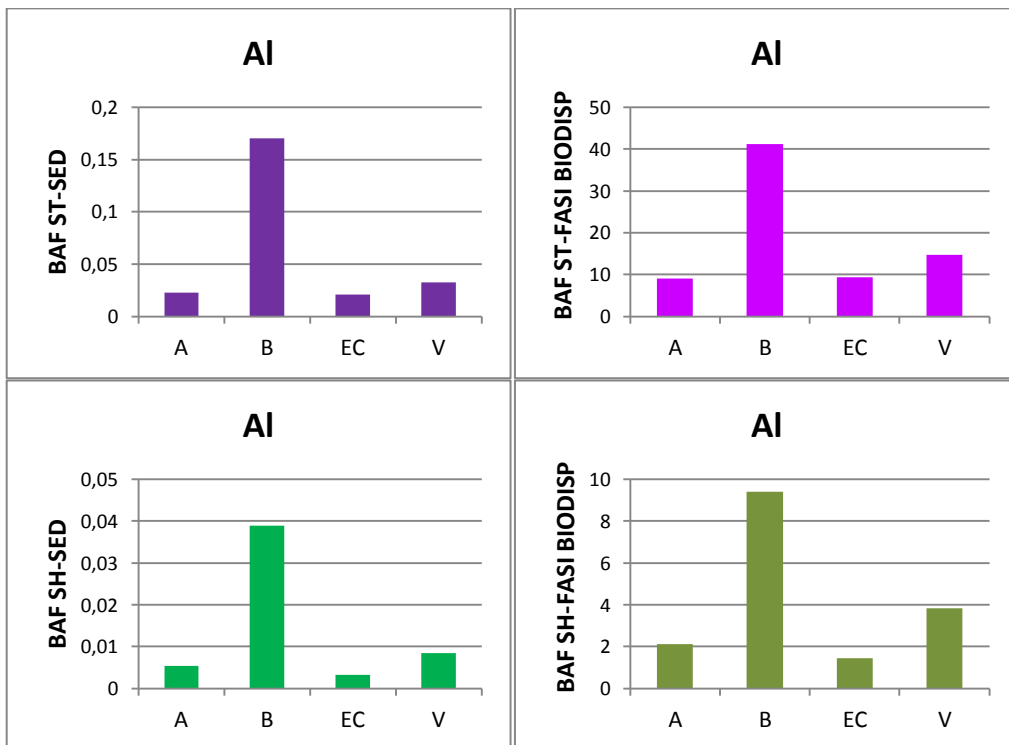
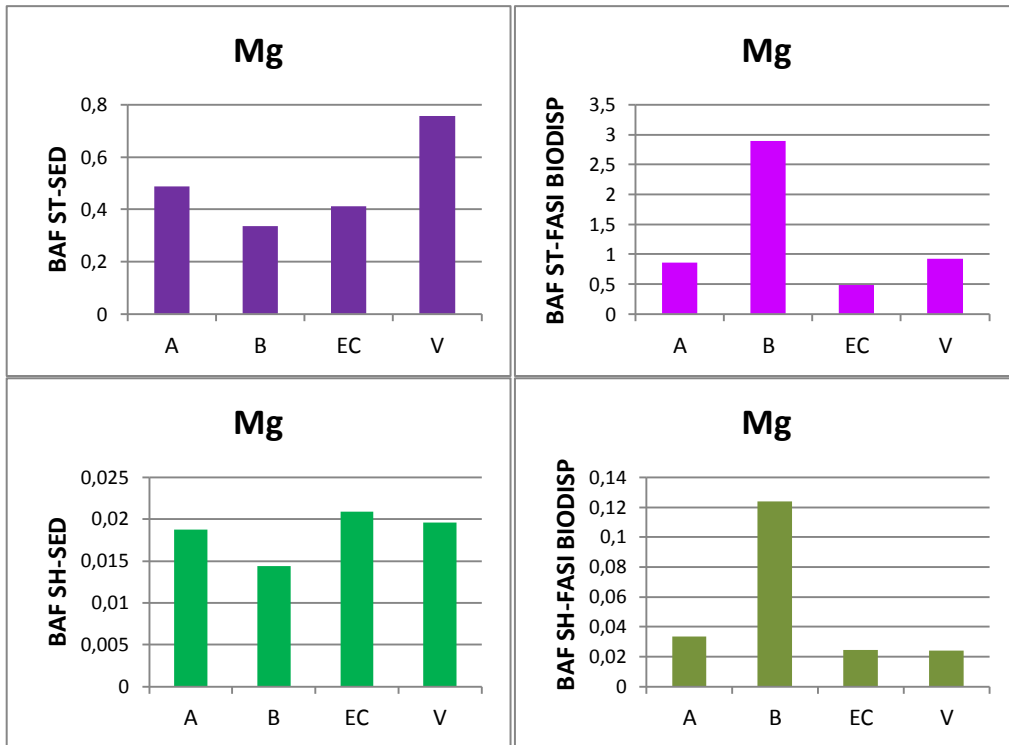
$$BAF_{ST-FASI\ BIODISP} = \left(\frac{\text{conc. media nei ST}}{\text{conc. media GPH1,2,3}} \right)_{\text{elemento}}$$

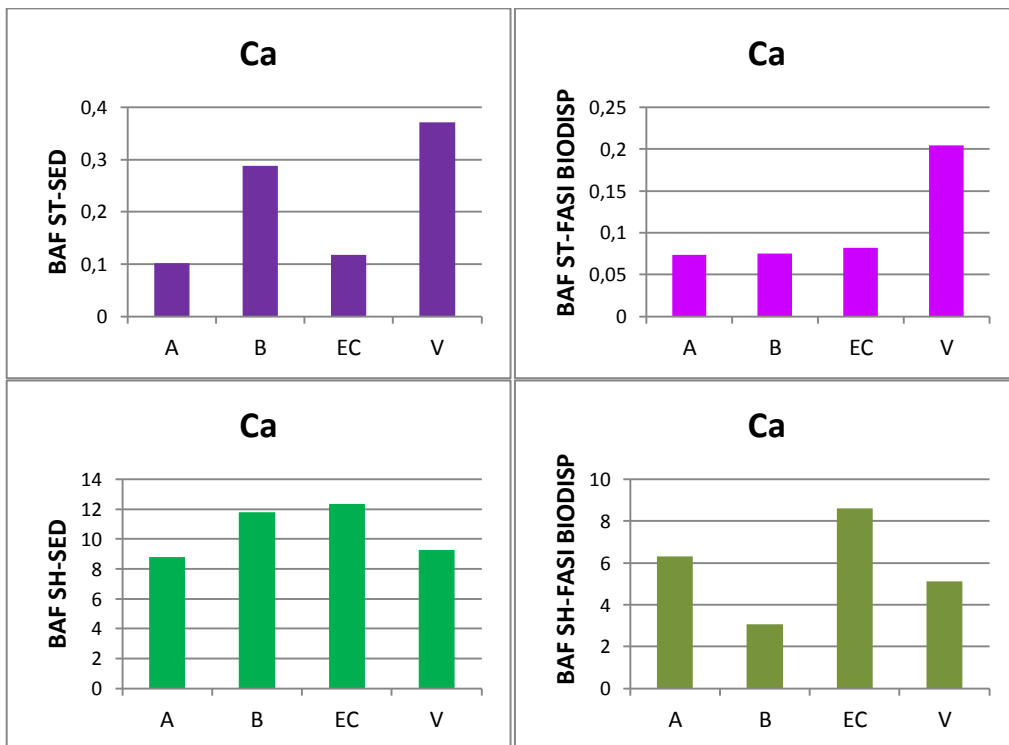
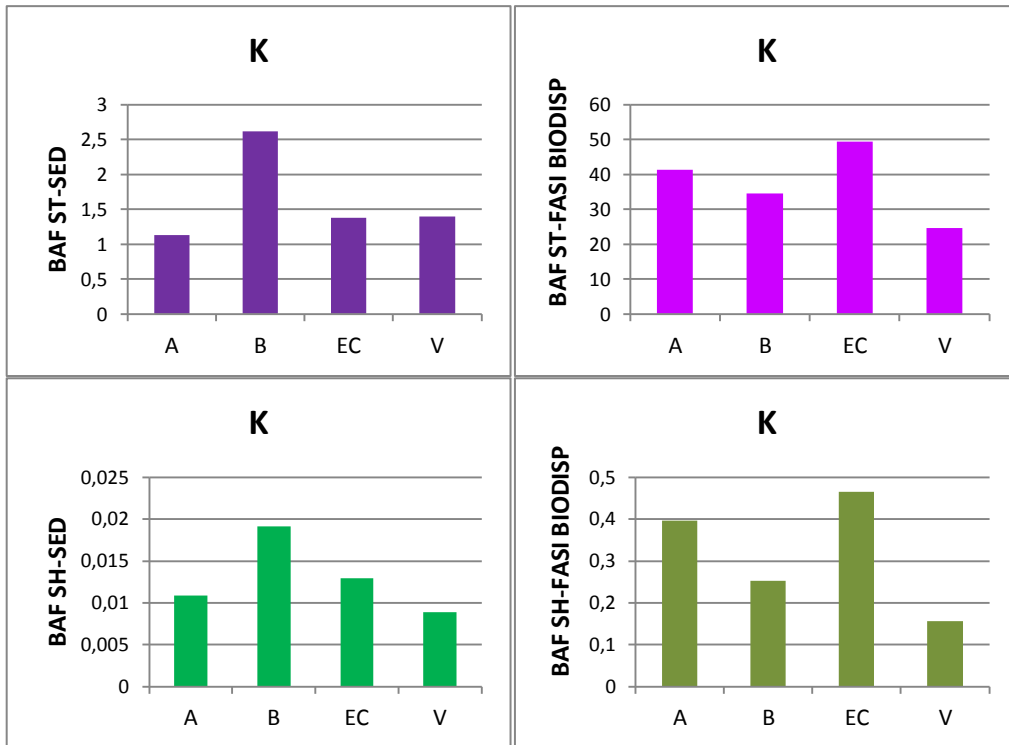
$$BAF_{SH-FASI\ BIODISP} = \left(\frac{\text{conc. media nella SH}}{\text{conc. media GPH1,2,3}} \right)_{\text{elemento}}$$

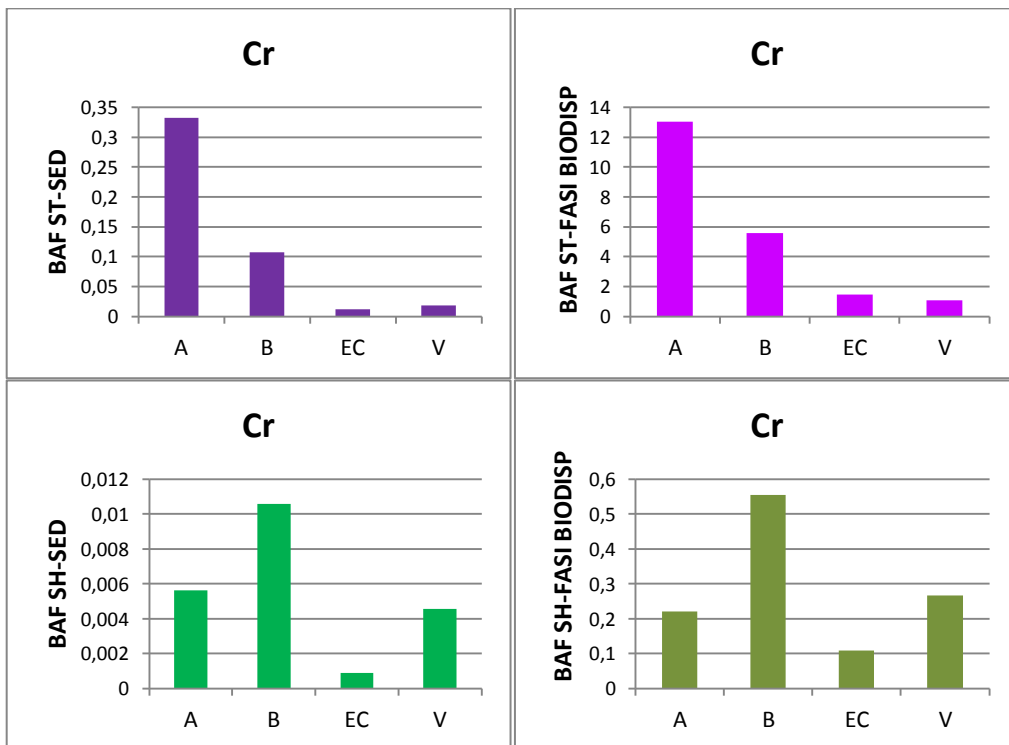
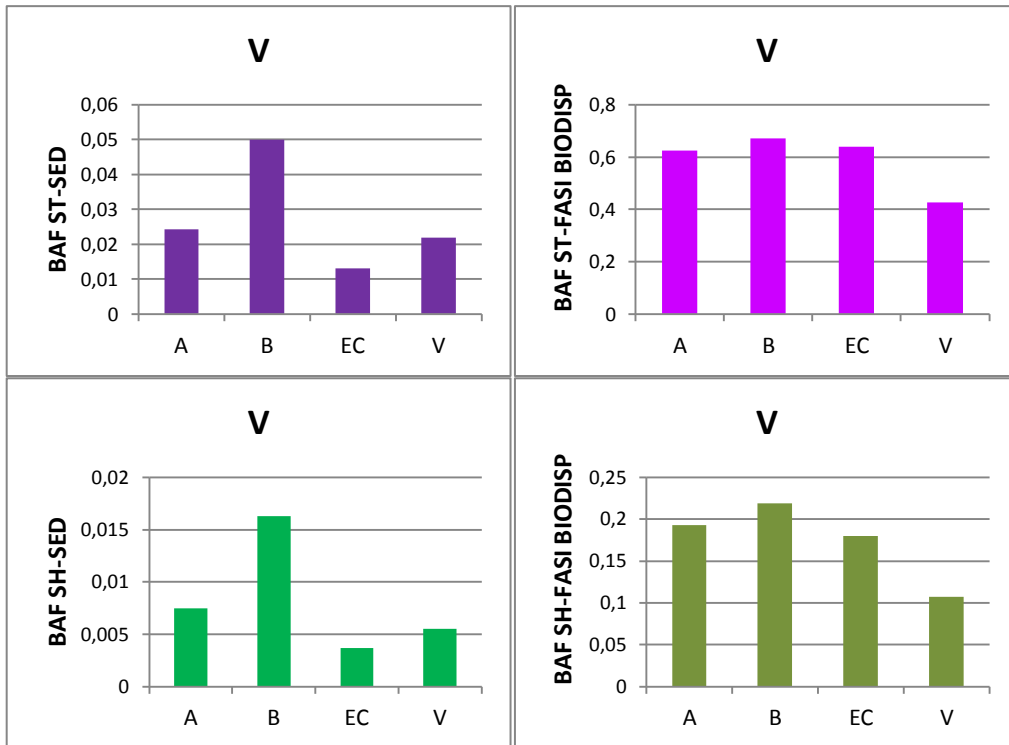
Ne consegue che per ogni elemento sono stati calcolati quattro BAF: i valori corrispondenti per ogni sito di quelli riguardanti la concentrazione nei soft tissue, BAF_{ST-SED} e $BAF_{ST-FASI\ BIODISP}$, sono riportati in viola in **Figura 85**; quelli riguardanti la concentrazione nelle conchiglie, BAF_{SH-SED} e $BAF_{SH-FASI\ BIODISP}$, sono riportati in verde in **Figura 85**. Poiché i BAF sono riferiti alle concentrazioni totali e delle fasi disponibili nel sedimento, per il quale sono stati prelevati solo 4 campioni (siti A, B, EC e V), i valori sono stati calcolati solo per questi siti.

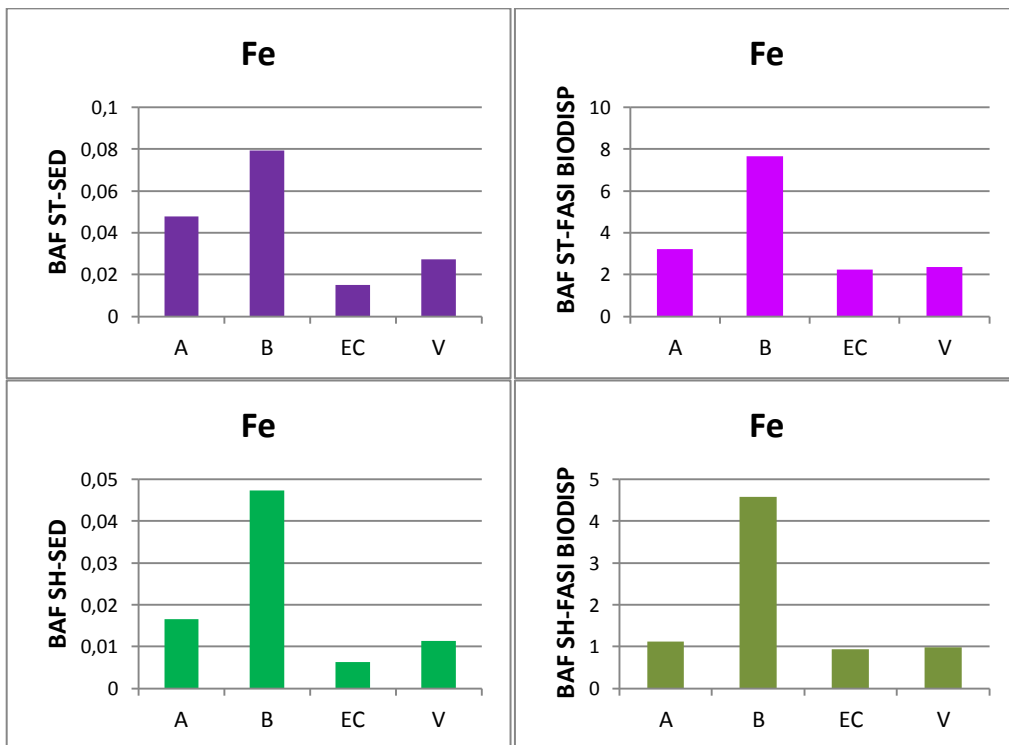
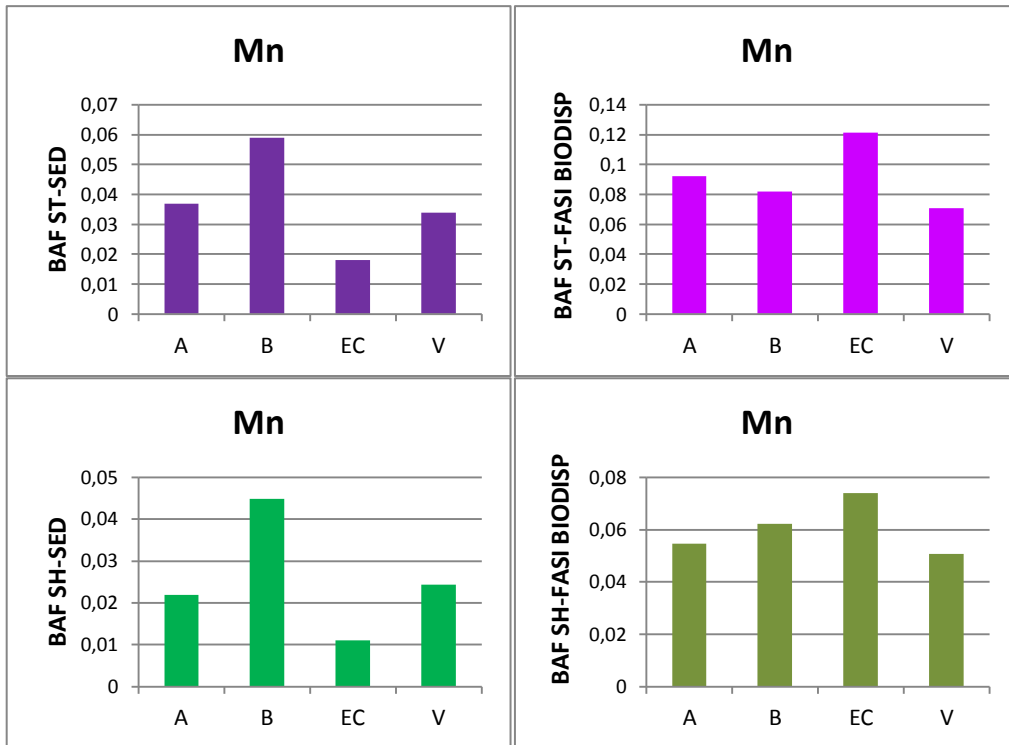
In **Figura 85** i grafici sono raggruppati per elemento: sono posizionati nella colonna di sinistra gli indici calcolati facendo riferimento alla concentrazione totale nel sedimento (BAF_{ST-SED} e BAF_{SH-SED}) e nella colonna di destra gli indici calcolati facendo riferimento alla concentrazione di elemento presente nelle prime tre fasi della speciazione geochimica ($BAF_{ST-FASI\ BIODISP}$ e $BAF_{SH-FASI\ BIODISP}$), fatta eccezione per il Na per il quale si è proceduto al calcolo solo degli indici riferiti alla concentrazione totale nel sedimento a causa della mancanza del dato relativo alla GPH2.

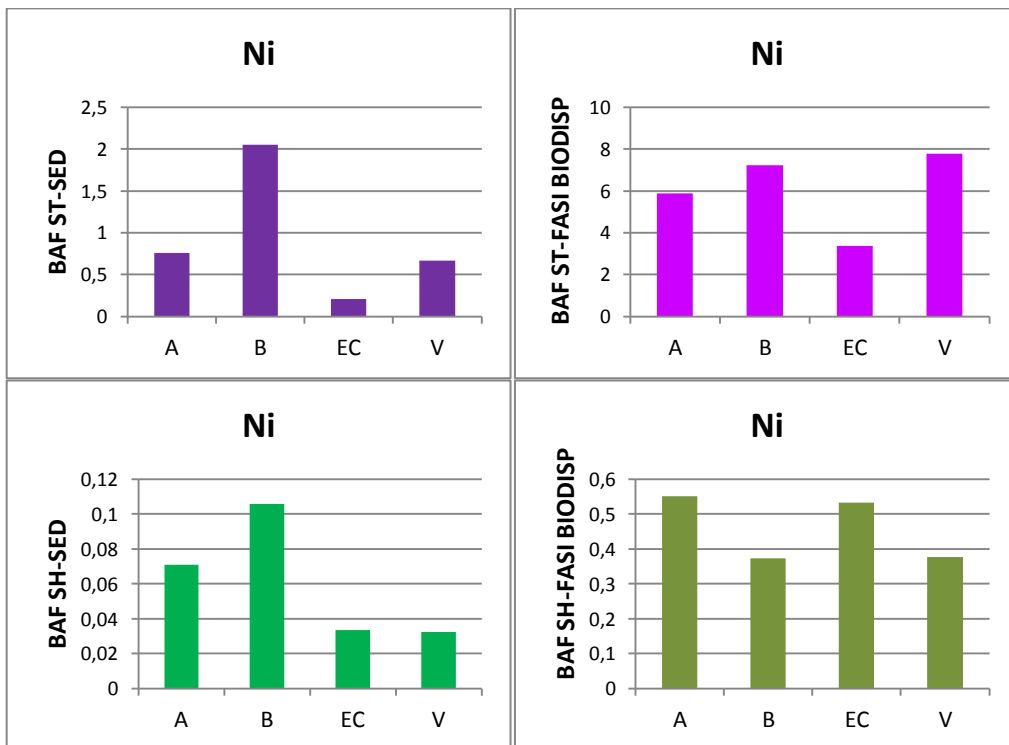
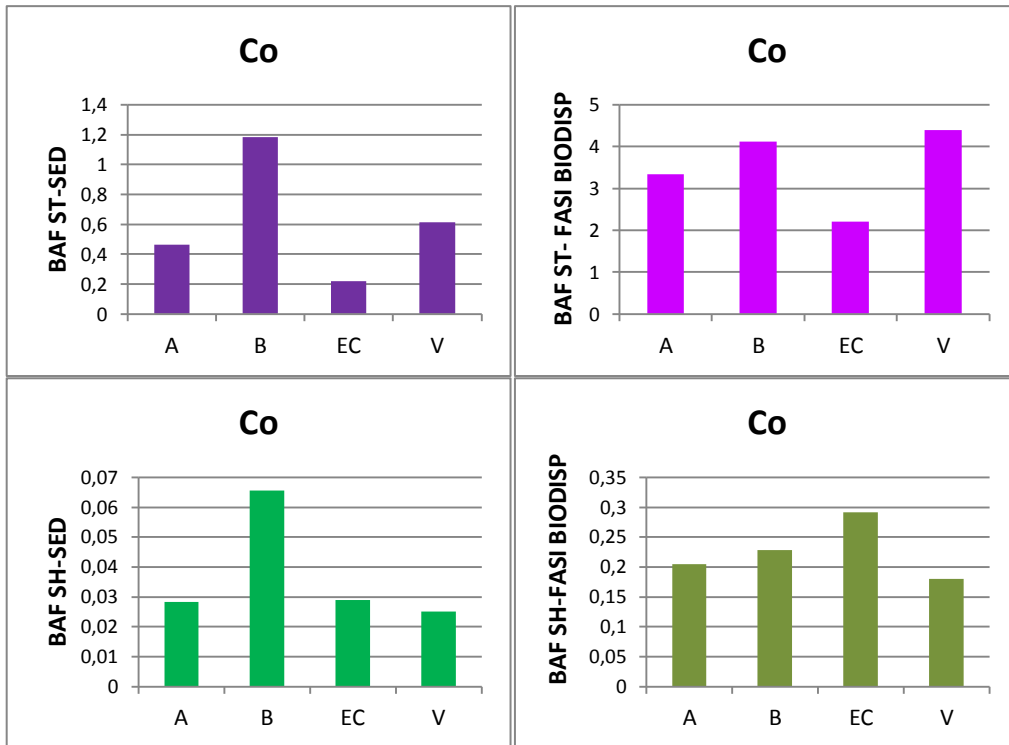


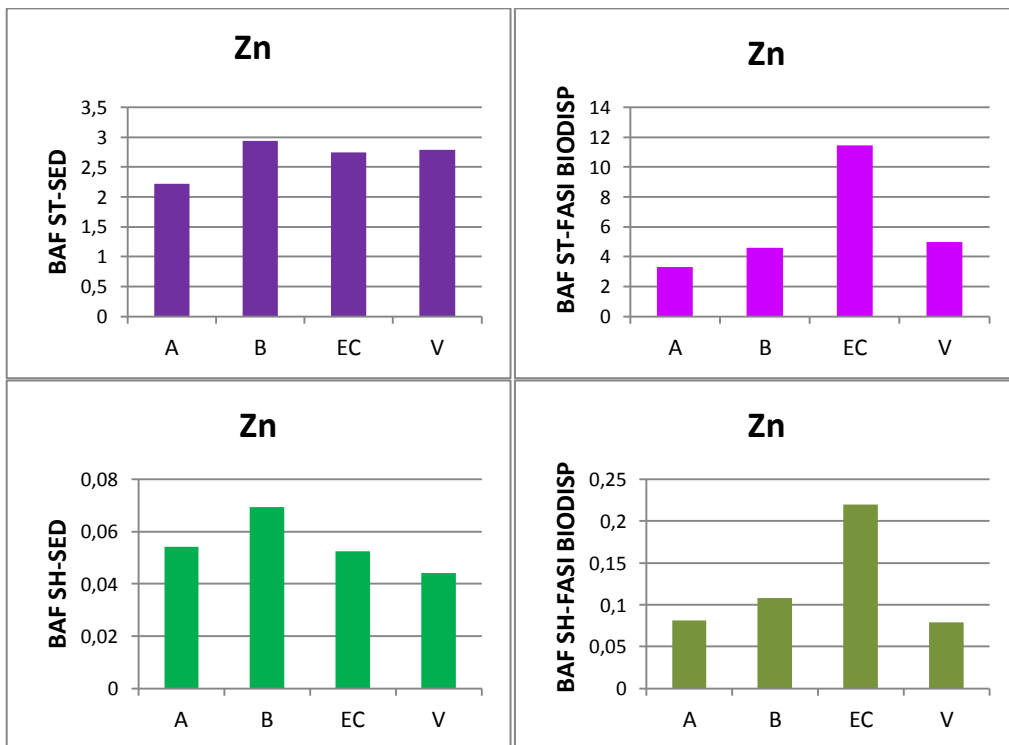
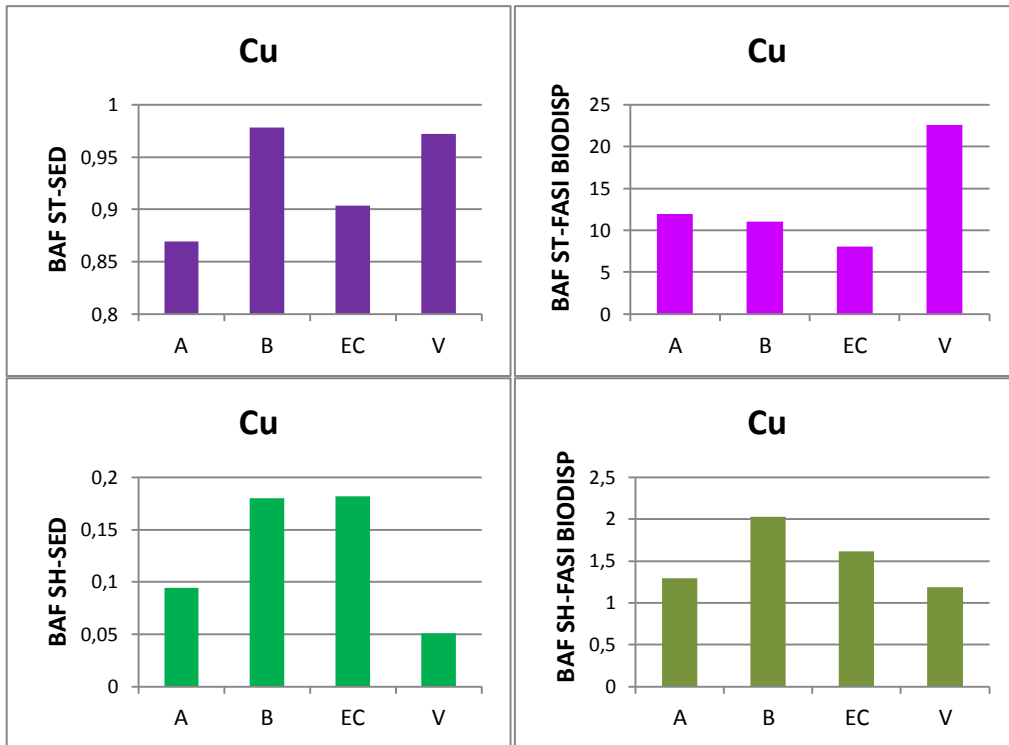


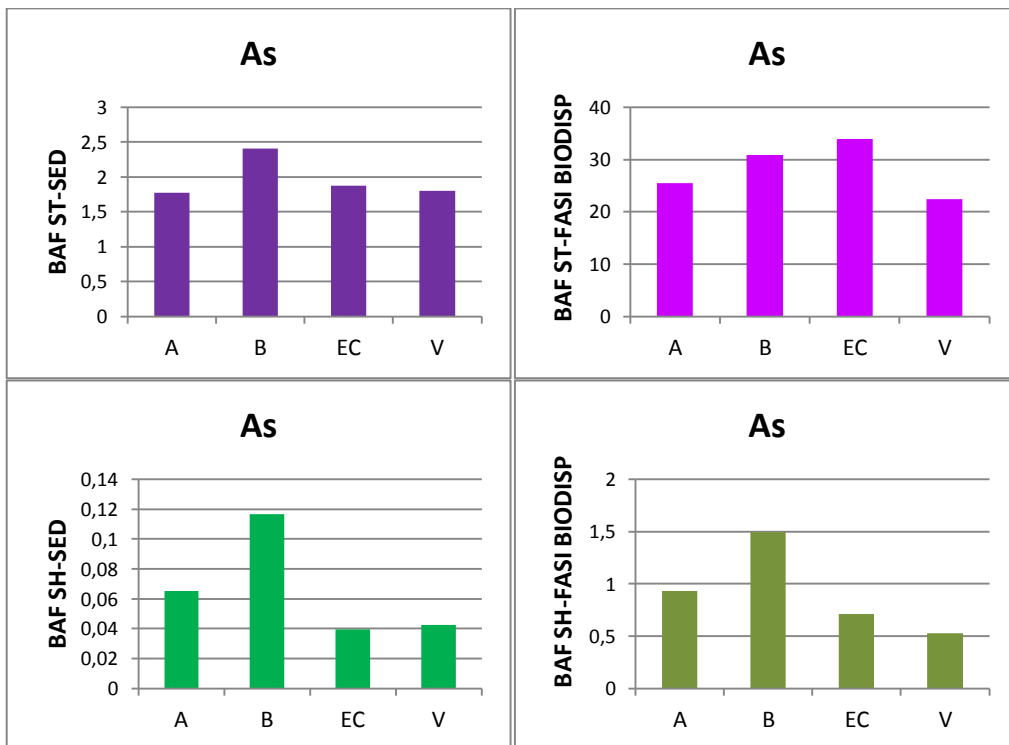
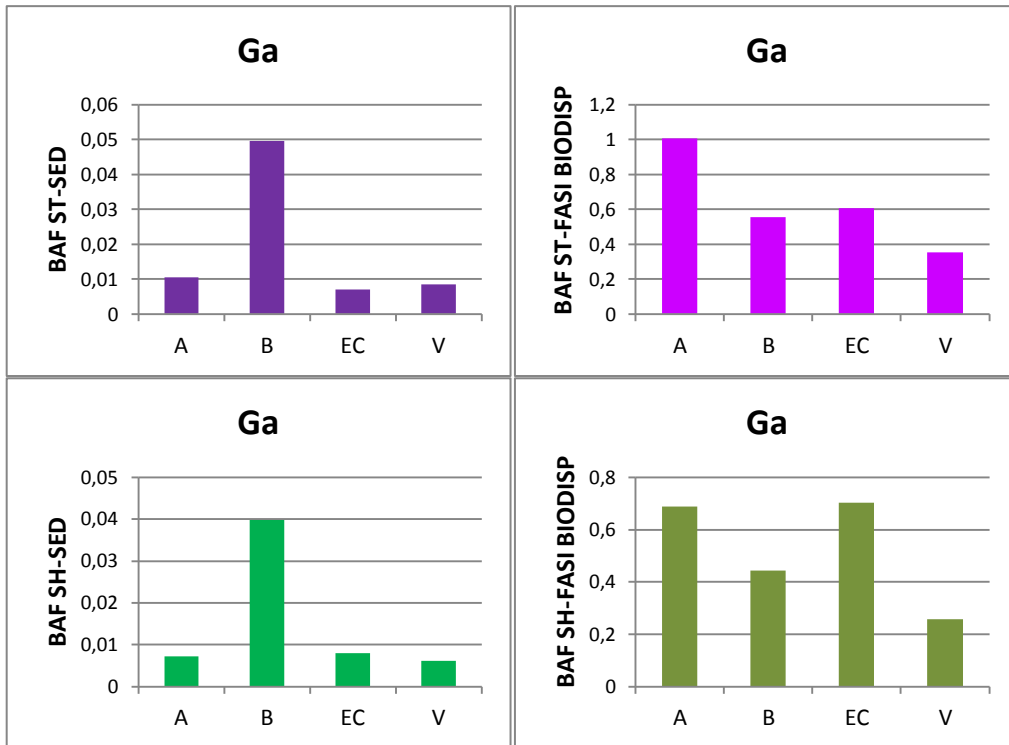


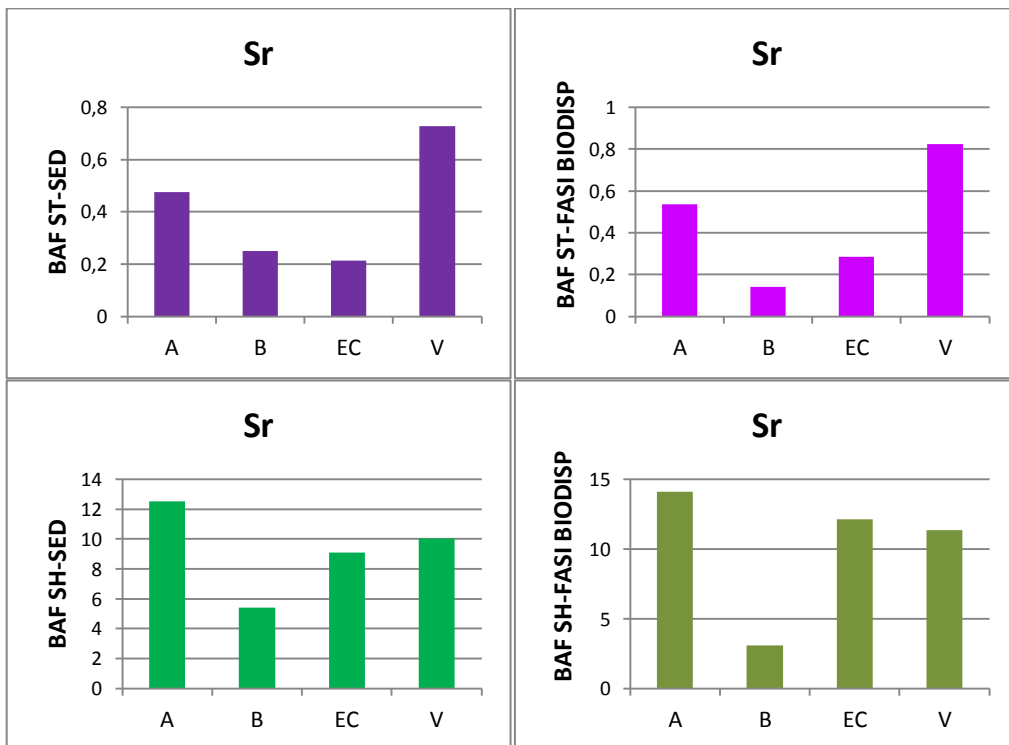
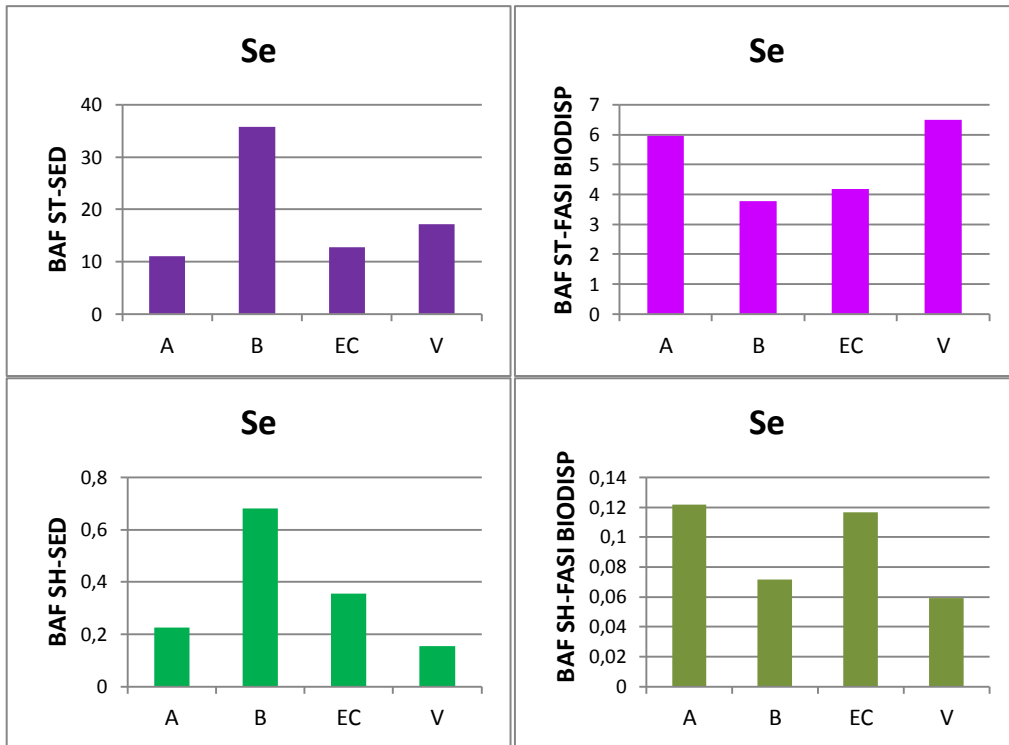


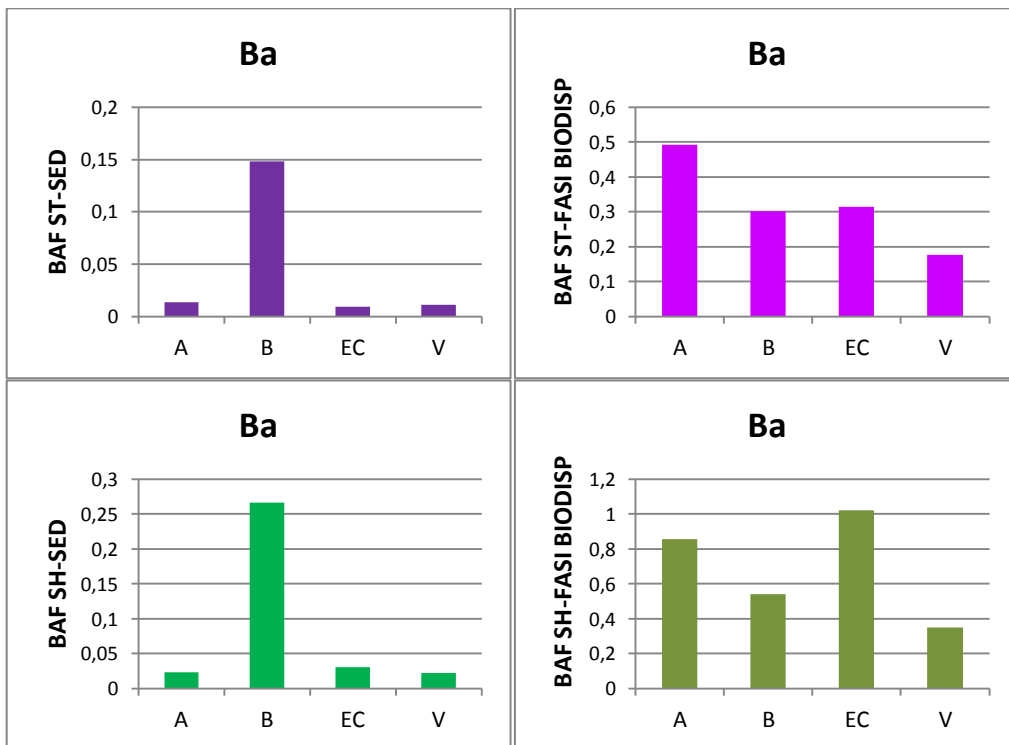
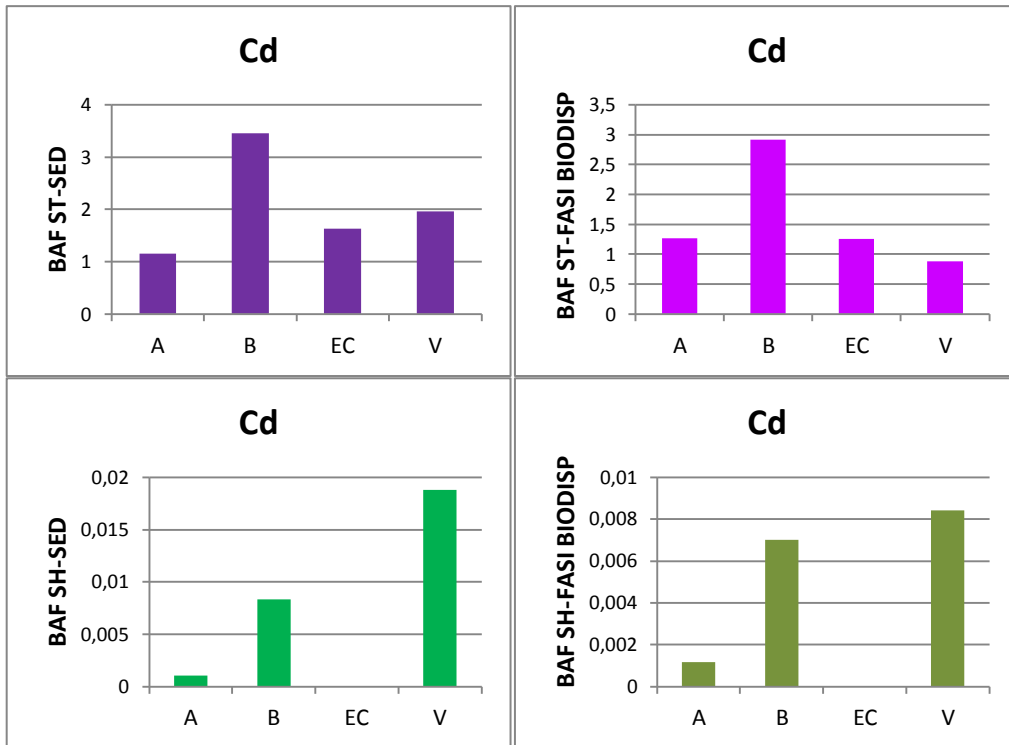












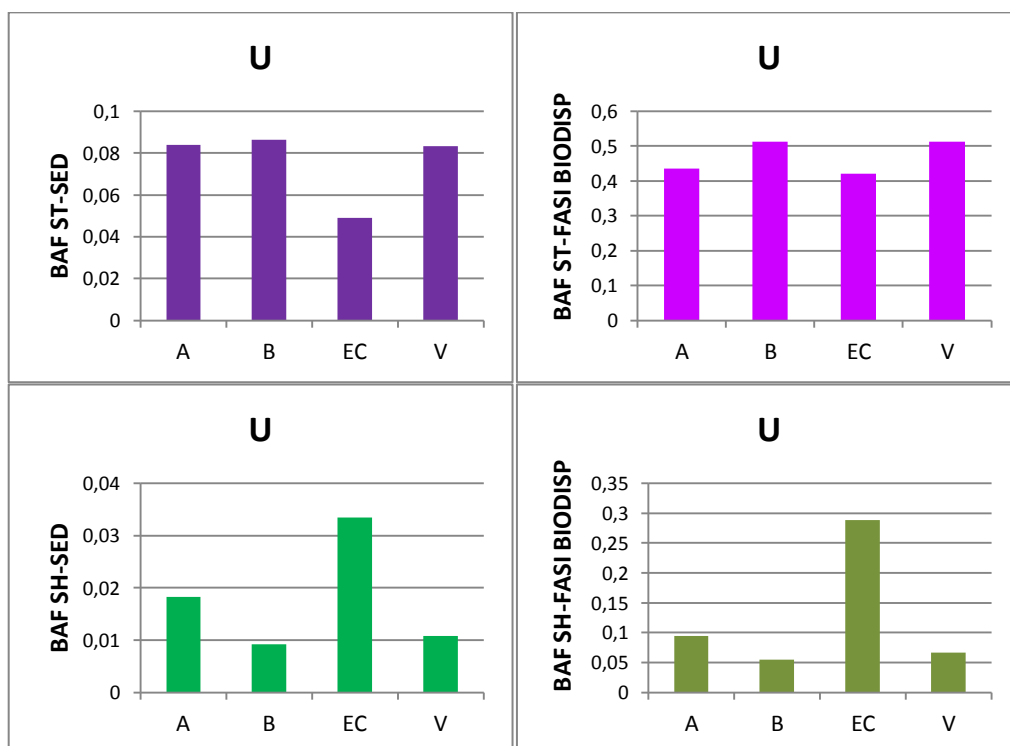


Figura 85: Valori dei fattori di bioaccumulo (BAF) calcolati rapportando per ogni elemento la concentrazione media nei *soft tissue* totali (ST, *in viola*) e nelle conchiglie (SH, *in verde*) sia rispetto alla concentrazione media nel sedimento (SED, *a sinistra*), sia rispetto alla media della somma delle prime tre fasi geochimiche (FASI BIODISP, *a destra*) nei 4 siti considerati.

Se si confrontano gli andamenti dei BAF calcolati considerando il sedimento totale (SED) e quelli calcolati considerando le fasi biodisponibili (FASI BIODISP) si nota che essi sono molto simili per molti elementi quali Li, Al,

Cr, Fe, Sr, Cd, Pb, sia nel caso dei fattori calcolati per i soft tissue (ST) che per le conchiglie (SH): dopo opportuno riesame dei grafici di **Figura 84**, è possibile ricondurre questo risultato al fatto che

- per gli elementi Li, Al, Cr, Fe la percentuale delle fasi biodisponibili è molto bassa e sostanzialmente costante in tutti i siti;
- nel caso di Sr e Cd la percentuale delle fasi biodisponibili è molto alta, arrivando fino all'80% rispetto al totale delle 5 fasi estratte.

Tuttavia non si deve sottovalutare l'importanza di utilizzare anche il BAF riferito alle fasi biodisponibili, oltre a quello "tradizionale" riferito al sedimento totale: se quest'ultimo permette di fare delle valutazioni rispetto al livello di contaminazione globale del sedimento, il BAF riferito alle fasi biodisponibili mette in luce la capacità dell'organismo di assumere gli elementi presenti in ambiente sotto forme biodisponibili e bioaccessibili una volta che l'organismo sia esposto, mettendo in luce aspetti fisiologici non rilevabili altrimenti.

Elementi come il K e il Mn, ad esempio, presentano i valori di BAF_{ST-SED} e BAF_{SH-SED} più elevati nel sito B e i valori più elevati di $BAF_{ST-FASI\ BIODISP}$ e $BAF_{SH-FASI\ BIODISP}$ nel sito EC: ciò indica che il campione di *V. philippinarum* del sito EC ha un'elevata capacità di bioaccumulare questi elementi all'interno dei propri tessuti solo se questi sono biodisponibili, mentre gli esemplari prelevati in B riescono ad accumulare questi elementi pur essendo meno biodisponibili.

In alcuni casi, come ad esempio per il Co, si rileva e si dà evidenza scientifica ad una diversificazione nella capacità di bioaccumulare l'elemento presente nelle fasi biodisponibili nei due compartimenti, i tessuti molli e la conchiglia, che non si rileva nel confronto tra i BAF calcolati per il sedimento totale, a testimonianza della complessità che regola il processo di bioaccumulo e l'importanza di considerare entrambe le tipologie di indici.

D'altra parte confrontando i dati relativi ai BAFs calcolati per i soft tissue e le conchiglie rispetto al contenuto nel sedimento totale, si nota che per Al, K, V, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Ga, Ba si registrano gli stessi andamenti per BAF_{ST-SED} e BAF_{SH-SED} ; per quasi tutti questi elementi la stessa somiglianza si riscontra pure negli andamenti di $BAF_{ST-FASI\ BIODISP}$ e $BAF_{SH-FASI\ BIODISP}$, a significare che quando uno di questi elementi è bioaccessibile e biodisponibile, *V. philippinarum* è in grado di assimilarlo e accumularlo nell'organismo, sia nei tessuti molli che nella struttura cristallina della valva in modo proporzionale tra i due compartimenti.

E' importante notare, inoltre, che per la maggior parte degli elementi considerati il sito B presenta il valore più elevato di BAF: se si collega questo risultato con l'informazione derivante dagli Indici di Condizione riportati in **4.2.2 Determinazione degli indici di condizione**, secondo cui il sito B presenta la popolazione con il valore più basso dell'indice, è possibile che il più alto livello di bioaccumulo sia legato alla condizione di stress che colpisce gli organismi nel sito B modificandone il metabolismo e conseguentemente la fisiologia, come rilevato nello studio di Matozzo *et al.* (2012).

In generale si deve sottolineare come i valori di BAF siano più elevati per i soft tissue, indicando che la maggior parte degli elementi si accumulano preferenzialmente in questo comparto; tuttavia, nel caso di Ca, Sr e

Pb si registrano i valori più elevati per i BAF calcolati per le conchiglie: se il dato non sorprende per i primi due elementi, noti per essere tra i maggiori costituenti della matrice cristallina, l'informazione è particolarmente interessante per il Pb che evidentemente tende ad accumularsi preferibilmente nella conchiglia, probabilmente per un processo di sostituzione isomorfa a danno del calcio (Almeida *et al.* 1998b) che potrebbe far pensare a un meccanismo di detossificazione adottato dal Bivalve.

4.4.2 Cluster Analysis e Principal Component Analysis

Con l'obiettivo di comprendere se le variabili analizzate (le concentrazioni degli elementi in ST, ST-EP, EP e SH di *V. philippinarum* e le concentrazioni degli elementi nei sedimenti) siano in grado di discriminare e conseguentemente individuare degli insiemi di elementi (campioni) omogenei, sono stati applicati anche in questa seconda parte del lavoro due metodi statistici di raggruppamento quali la *Cluster Analysis* e la *Principal Component Analysis*.

Nel caso delle concentrazioni degli elementi in ST-EP, EP e ST di *V. philippinarum*, i dati sono stati opportunamente normalizzati (*auto-scaling*) e quindi sono state applicate, tramite il software XLStat Addinsoft™, la Cluster Analysis (metrica: distanza euclidea, metodo di agglomerazione: metodo di Ward) in *Q-mode* (raggruppamento dei campioni) e in *R-mode* (raggruppamento delle variabili), oltre alla Principal Component Analysis (PCA).

I risultati ottenuti sono riportati nelle figure presentate di seguito: le prime quattro riguardano i dati di concentrazione nei soft tissue privati di epatopancreas (ST-EP) e presentano i risultati della Cluster Analysis in *Q-mode* (**Figura 86**), i risultati della Cluster Analysis in *R-mode* (**Figura 87**), lo *score plot* della PCA (**Figura 88**) e il *loading plot* della PCA (**Figura 89**). Anche in questo caso in tutti i grafici seguenti riportanti i risultati della Cluster Analysis, la linea tratteggiata indica il livello di troncamento per l'individuazione dei gruppi nel dendrogramma individuato secondo il criterio automatico integrato nel software XLStat, come già spiegato in **3.2.3 Risultati e discussione**.

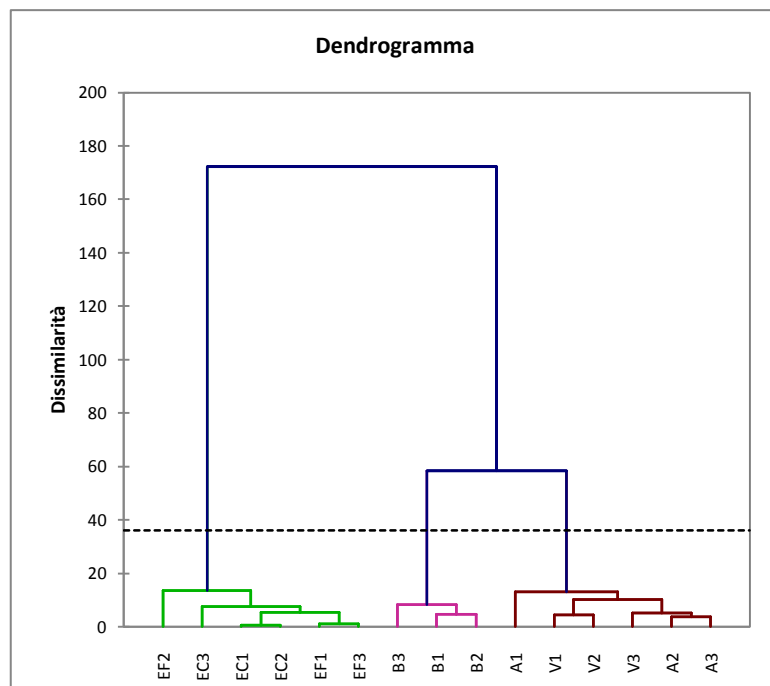


Figura 86: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode (raggruppamento dei campioni) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* privati di epatopancreas (ST-EP) di *V. philippinarum*.

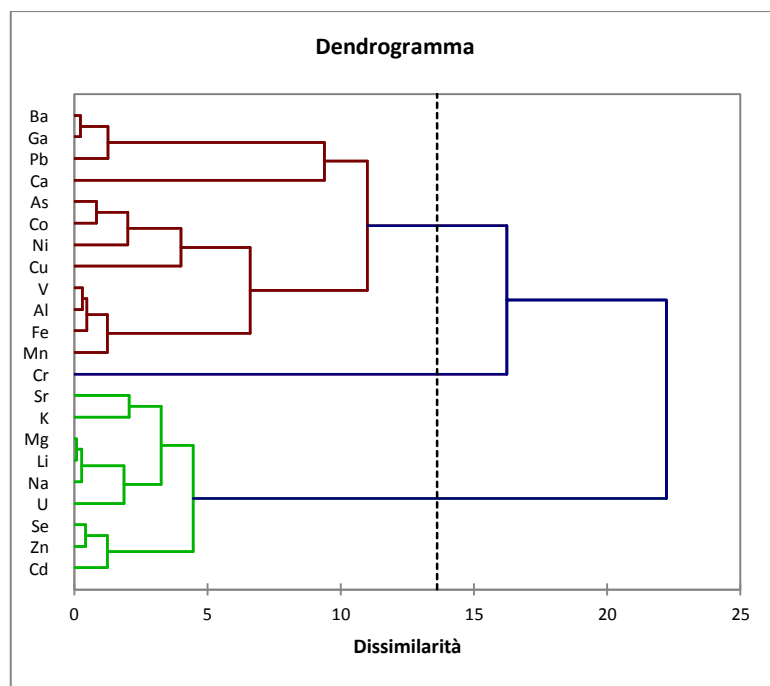


Figura 87: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode (raggruppamento delle variabili) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* privati di epatopancreas (ST-EP) di *V. philippinarum*.

Osservando il dendrogramma di **Figura 86**, si nota che la Cluster Analysis in Q-mode condotta utilizzando i valori di concentrazione in ST-EP è in grado di discriminare i campioni in tre gruppi principali sulla base del sistema di troncamento automatico di XLSTAT: quello comprendente i campioni provenienti dai siti EC e EF (in verde) si differenzia per primo dall'altro gruppo, a sua volta suddiviso in due sotto-gruppi comprendenti,

rispettivamente, i campioni del sito B (in rosa) e i campioni dei siti A e V (in marrone). D'altra parte, il dendrogramma di **Figura 87** (ottenuto mediante Cluster Analysis in R-mode condotta sui dati di ST-EP) individua due raggruppamenti principali di variabili in relazione tra loro (escluso il Cr) e in grado di discriminare i campioni: è molto interessante mettere in luce come tali raggruppamenti siano in linea con quelli individuati in **4.3.1 Soft tissue di *Venerupis philippinarum*: analisi elementare** nel corso del commento ai dati riportati nei box-plot di **Figura 69**.

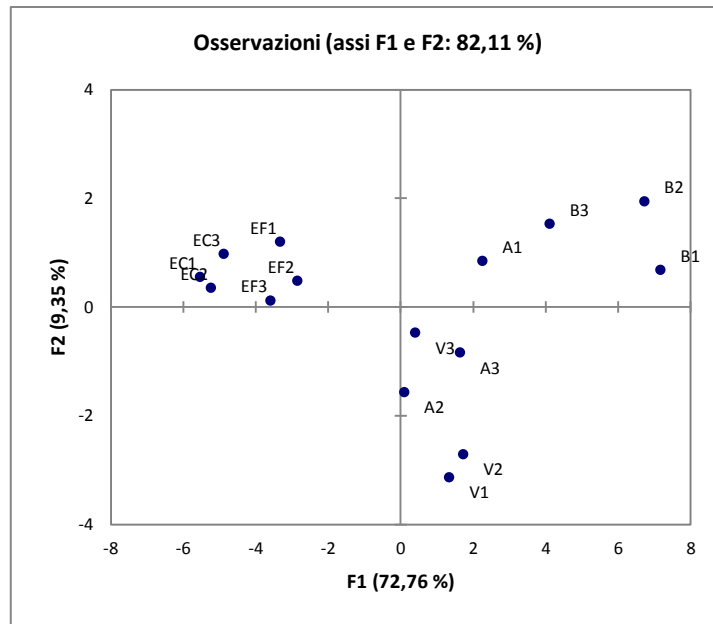


Figura 88: Score plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* privati di epatopancreas (ST-EP).

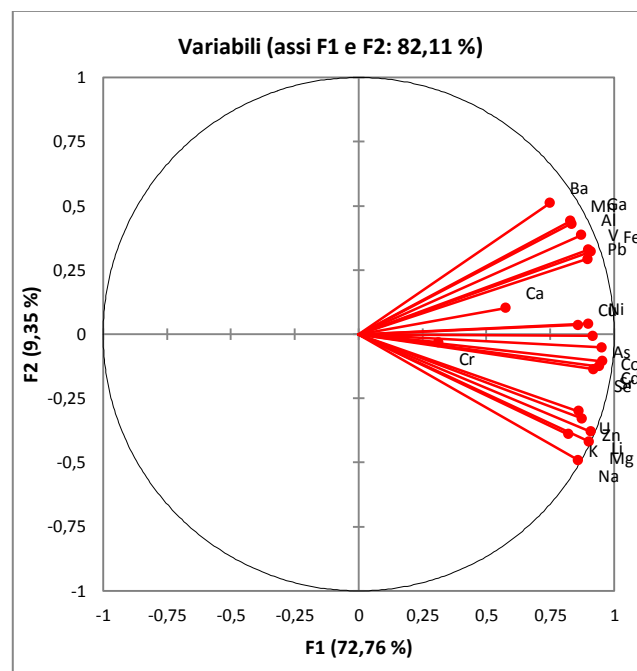


Figura 89: Loading plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* privati di epatopancreas (ST-EP).

I risultati della PCA (score plot in **Figura 88** e loading plot in **Figura 89**, sopra riportate) confermano la capacità delle variabili selezionate (concentrazione degli elementi in ST-EP) di suddividere i campioni in tre gruppi principali comprendenti rispettivamente i campioni del sito B e A1 (nel primo quadrante dello score plot), i campioni dei siti EC e EF (nel secondo quadrante), i campioni provenienti dai siti A e V, ad esclusione di A1 (nel quarto quadrante). Integrando le informazioni derivanti dallo score plot con quelle del loading plot, si può affermare che i campioni del sito B e A1 si caratterizzano per concentrazioni più elevate di molti elementi e in particolare di Ba, Mn, Ga, Al, V, Fe, Pb; viceversa i campioni dei siti EC e EF presentano in generale i valori di concentrazione degli elementi più bassi.

Di seguito si riportano i grafici relativi ai risultati della Cluster Analysis in Q-mode (**Figura 90**) e in R-mode (**Figura 91**) e della PCA (score plot in **Figura 92** e loading plot in **Figura 93**) applicate ai dati relativi alle concentrazioni degli elementi determinate nell'epatopancreas (EP) degli esemplari di *V. philippinarum* campionati nei diversi siti.

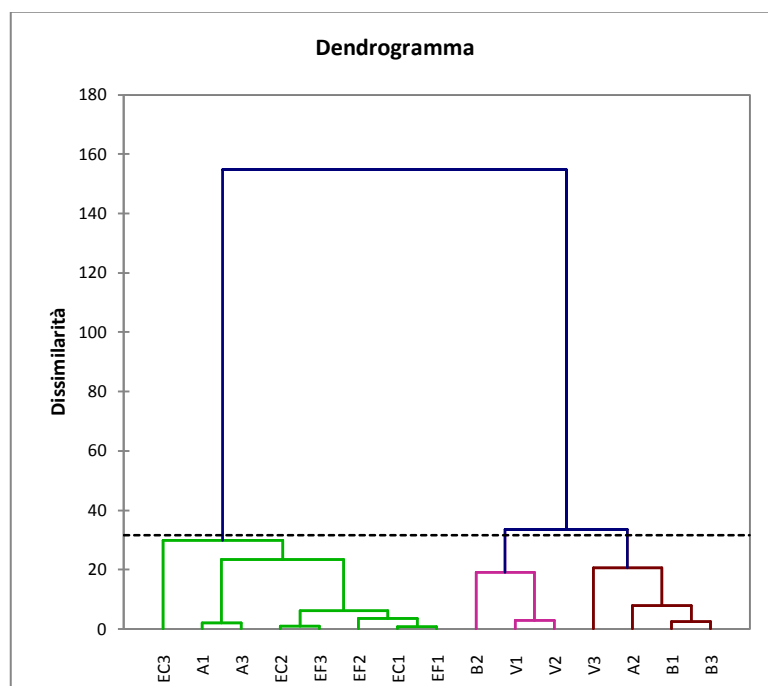


Figura 90: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode (raggruppamento dei campioni) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nell'epatopancreas (EP) di *V. philippinarum*.

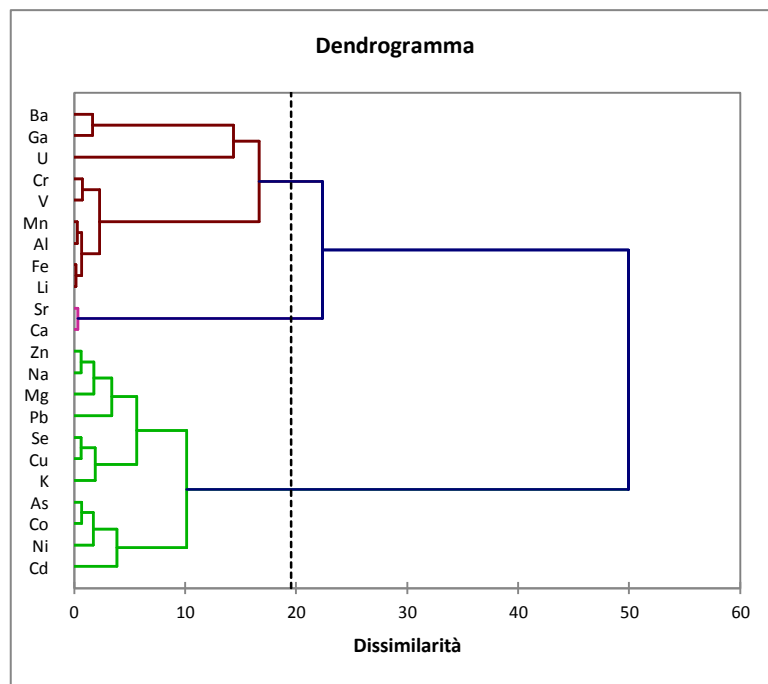


Figura 91: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode (raggruppamento delle variabili) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nell'epatopancreas (EP) di *V. philippinarum*.

I dendrogrammi di **Figura 90** e di **Figura 91** mettono in luce una serie di fattori:

- le variabili costituite dalle concentrazioni degli elementi nell'epatopancreas di *V. philippinarum* non sono altrettanto efficaci di quelle relative a ST-EP nel discriminare i campioni in gruppi corrispondenti al sito di provenienza;
- ciò nonostante si individuano due gruppi principali, il primo comprendente tutti i campioni dei siti EC e EF e i campioni A1 e A3 (in verde), il secondo che contiene tutti i restanti campioni;
- questo secondo gruppo è a sua volta suddivisibile in due sotto-gruppi, uno comprendente 2/3 dei campioni del sito V (in rosa) e uno comprendente i 2/3 dei campioni del sito B (in marrone);
- gli elementi Sr e Ca, che presentano un andamento molto simile in EP, come già rilevato in **4.3.1 Soft tissue di *Venerupis philippinarum*: analisi elementare** appaiono in relazione e importanti nel discriminare i gruppi;
- alcune similitudini individuate in **4.3.1** trovano corrispondenza anche nei risultati della Cluster Analysis in R-mode (ad esempio per gli elementi Al, V, Cr, Mn e Fe).

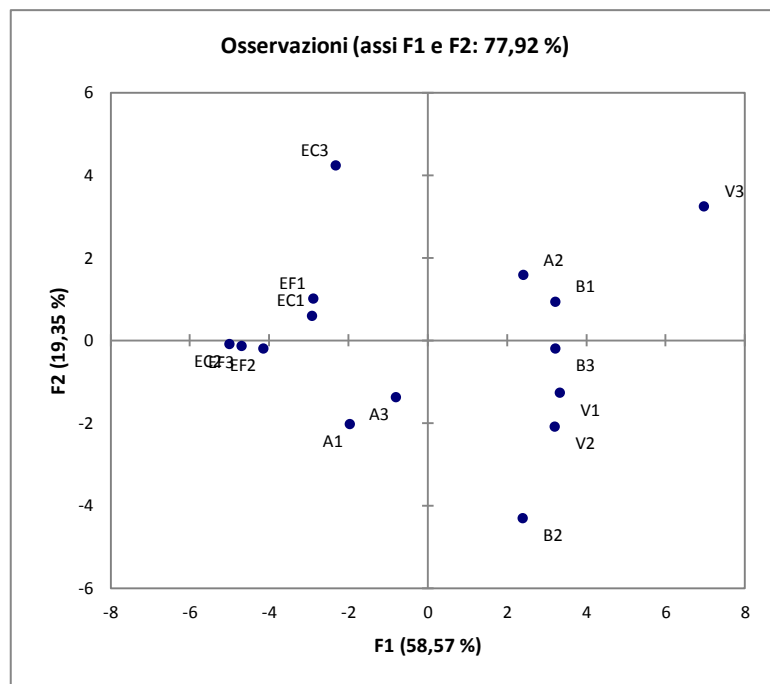


Figura 92: Score plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nell'epatopancreas (EP).

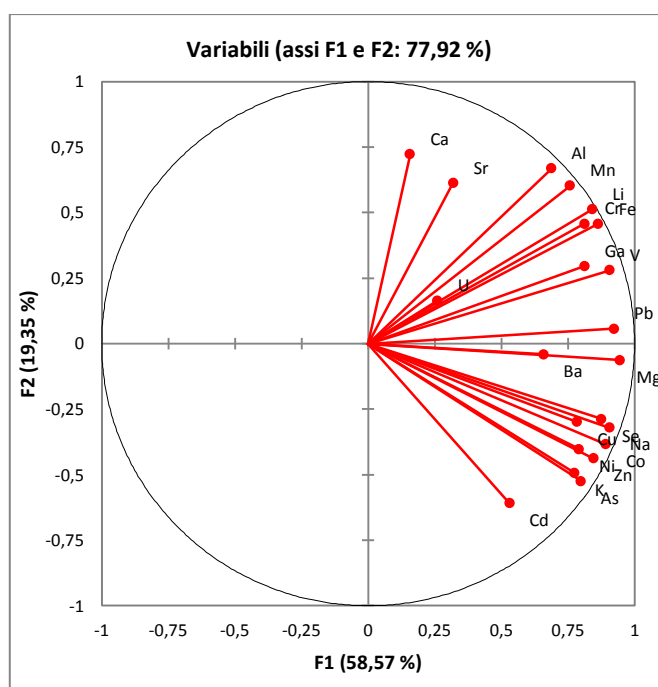


Figura 93: Loading plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nell'epatopancreas (EP).

Dallo score plot di **Figura 92** emerge la distinzione tra due gruppi principali di campioni già rilevata tramite la Cluster Analysis: i campioni dei siti EC e EF, A1 e A3, da un lato, e tutti gli altri campioni dall'altro; questi due gruppi si distinguono principalmente mediante la disposizione lungo la prima componente principale che tiene conto dei livelli di concentrazione di tutti gli elementi considerati (**Figura 93**). Tuttavia i campioni provenienti dai

siti EC e EF sono distinti da tutti gli altri anche grazie alla seconda componente principale che ne sottolinea il basso contenuto di elementi come Se, Cu, Na, Co, Ni, Zn, K, As e Cd.

In **Figura 94** e in **Figura 95** sono riportati i dendrogrammi risultanti dall'applicazione della Cluster Analysis (in Q-mode e R-mode rispettivamente) ai dati relativi alla concentrazione degli elementi nei soft tissue totali (ST); in **Figura 96** e in **Figura 97** sono riportati invece lo score plot e il loading plot, rispettivamente, derivanti dall'applicazione della PCA agli stessi dati sui ST.

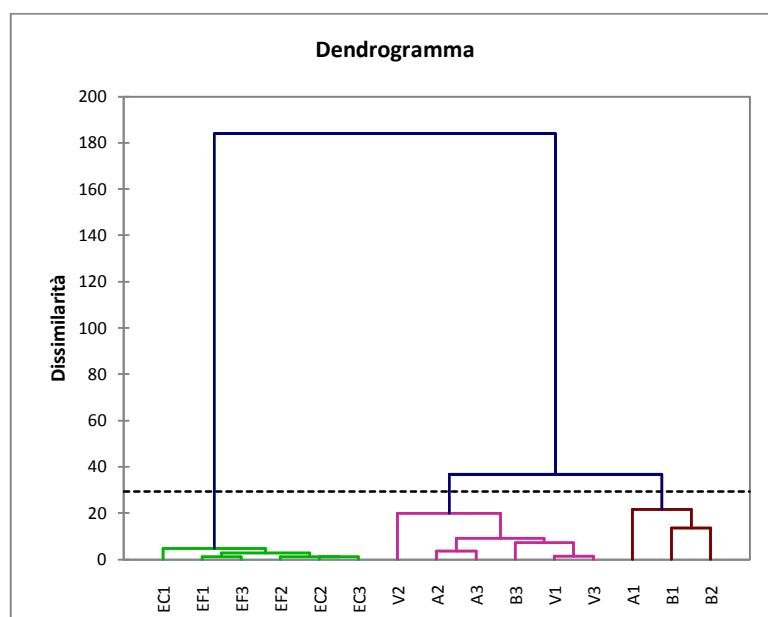


Figura 94: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode (raggruppamento dei campioni) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* (ST) di *V. philippinarum*.

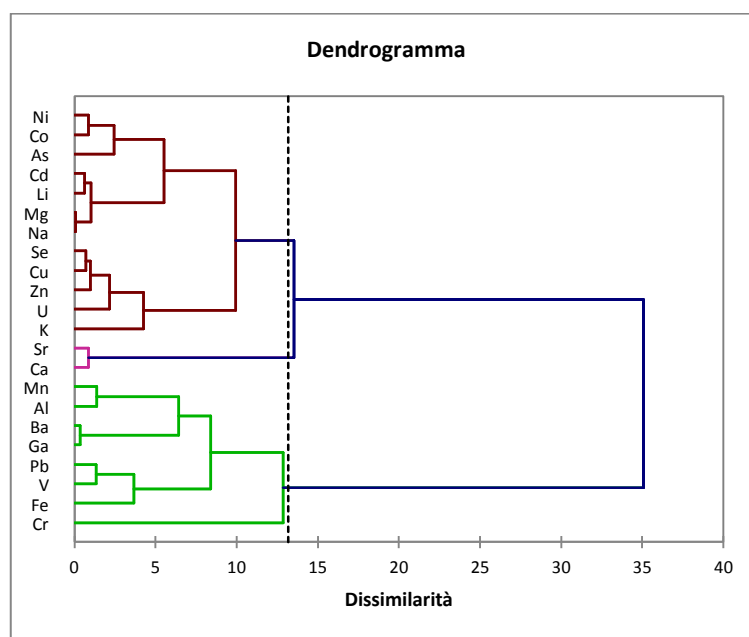


Figura 95: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode (raggruppamento delle variabili) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* (ST) di *V. philippinarum*.

I risultati della Cluster Analysis relativa ai dati sulle concentrazioni nei soft tissue totali, integrano in un modo che si può considerare prevedibile, i risultati ottenuti per ST-EP e EP:

- anche in questo caso il dendrogramma risultante dall'analisi in Q-mode (**Figura 94**) individua un primo gruppo ben separato dagli altri (in verde) comprendente i campioni dei siti EC e EF;
- gli altri due gruppi, più simili tra loro, comprendono i campioni dei siti V e A (prevalenti nel gruppo in rosa) e B (prevalenti nel gruppo in marrone);
- per quanto riguarda le variabili (**Figura 95**) si mantiene la distinzione in 3 gruppi principali, una delle quali comprende i soli elementi Sr e Ca.

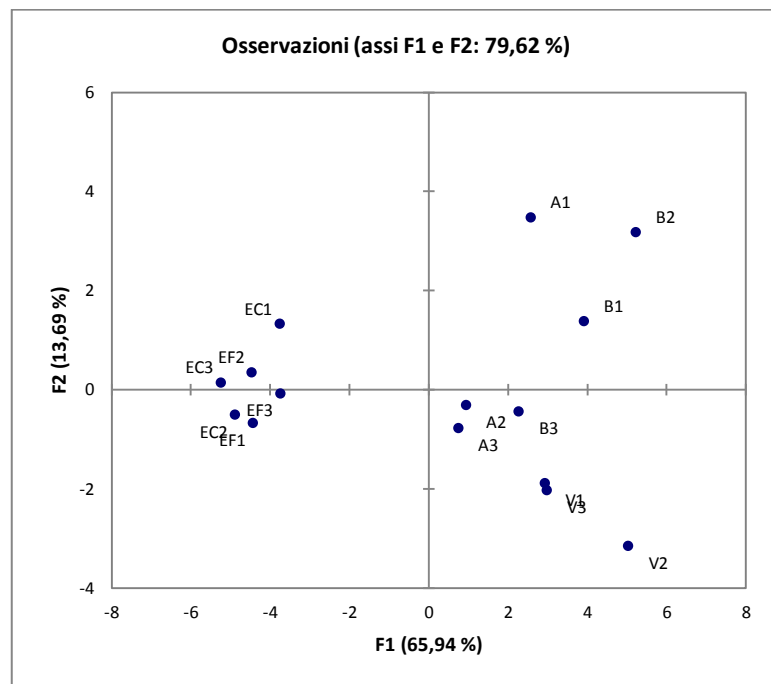


Figura 96: Score plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* (ST).

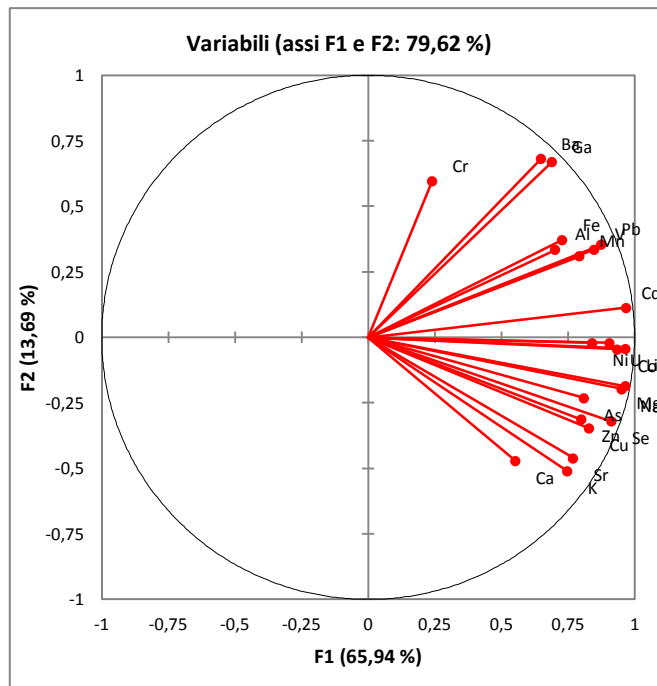


Figura 97: Loading plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei *soft tissue* (ST).

Osservando lo score plot di **Figura 96** appare ben compatto e separato dal resto il gruppo dei campioni EC e EF; anche i campioni del sito V risultano raggruppati nel quarto quadrante, mentre ciò non accade per i campioni dei siti A e B che si dispongono sparsi tra il primo e il quarto quadrante. Se i campioni EC e EF si caratterizzano in generale per le più basse concentrazioni rilevate per tutti gli elementi, i campioni del sito V si differenziano sulla base del più alto contenuto di Ca, K, Sr, Cu, Zn, As e Se (**Figura 97**).

I metodi statistici di raggruppamento applicati ai dati relativi ai *soft tissue* (ST-EP, EP e ST) sono stati utilizzati anche nel caso della matrice di dati contenente le concentrazioni degli elementi considerati nelle valve di *V. philippinarum*, dopo opportuno trattamento. In particolare dalla matrice sono stati eliminati gli *outliers* (a causa della presenza di un numero elevato di *outliers*, si è scelto di eliminare completamente dalla matrice completamente il campione "V3" e la variabile "Cd"); quindi sono stati stimati i dati mancanti con il metodo NIPALS (si veda **3.3.2 Risultati e discussione**) e infine i dati sono stati normalizzati.

I risultati relativi all'applicazione della Cluster Analysis e della PCA tramite il software XLStat Addinsoft™ sulla matrice di dati relativi alle concentrazioni di elementi nelle conchiglie sono riportati in **Figura 98** e **Figura 99** (dendrogrammi risultanti dalla CA in Q-mode e R-mode, rispettivamente) e in **Figura 100** e **Figura 101** (score plot e loading plot tra la prima e la seconda componente estratta dalla PCA) e in **Figura 102** e **Figura 103** (score plot e loading plot tra la prima e la terza componente estratta dalla PCA).

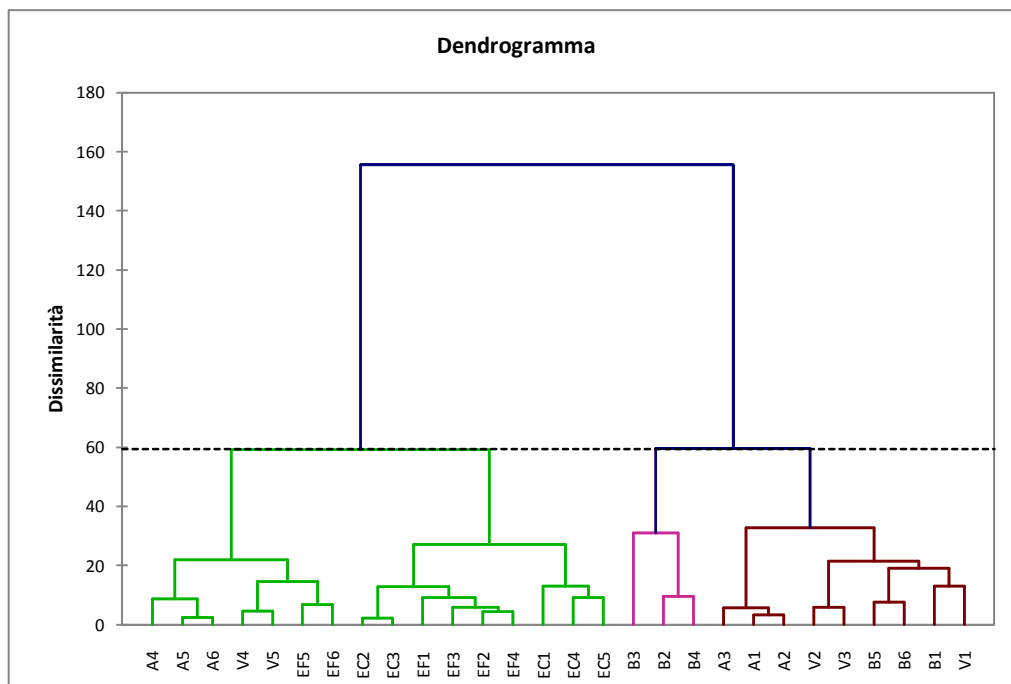


Figura 98: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode (raggruppamento dei campioni) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle conchiglie (SH) di *V. philippinarum*.

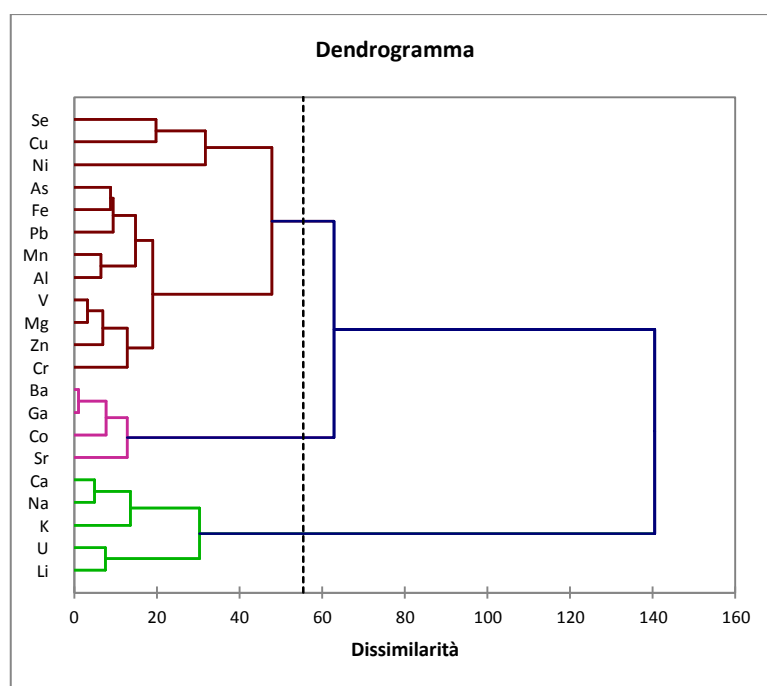


Figura 99: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode (raggruppamento delle variabili) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle conchiglie (SH) di *V. philippinarum*.

I risultati della Cluster Analysis mettono in evidenza come le variabili relative alle concentrazioni degli elementi nelle conchiglie suddividano i campioni in due gruppi principali, il primo comprendente tutti i campioni provenienti dai siti EC e EF (in verde), il secondo contenente tutti i campioni del sito B (in rosa e marrone): in entrambi i gruppi sono presenti campioni provenienti dai siti A e V. Per quanto riguarda il raggruppamento delle

variabili (**Figura 99**) si nota come esistano sostanzialmente tre gruppi, di cui il primo che si differenzia è quello composto da Ca, Na, K, U e Li, responsabile della separazione del gruppo di campioni che fanno riferimento ai siti EC e EF.

Si tratta di un risultato interessante confermato dalla PCA: esaminando contestualmente lo score plot (**Figura 100**) e il loading plot (**Figura 101**) tra la prima e la seconda componente estratta, che spiegano complessivamente quasi il 57% della variabilità dei dati, si nota come i campioni dei siti EC e EF si dispongono tutti tra il secondo e il terzo quadrante. A separarli dai restanti campioni è la prima componente estratta che da sola spiega circa il 39,5% della variabilità dei dati, e che evidenzia per questi campioni un elevato contenuto degli elementi Na, Ca, K, U e Li accompagnato da un basso contenuto di Mn, Cr, Al, Fe, As, Pb.

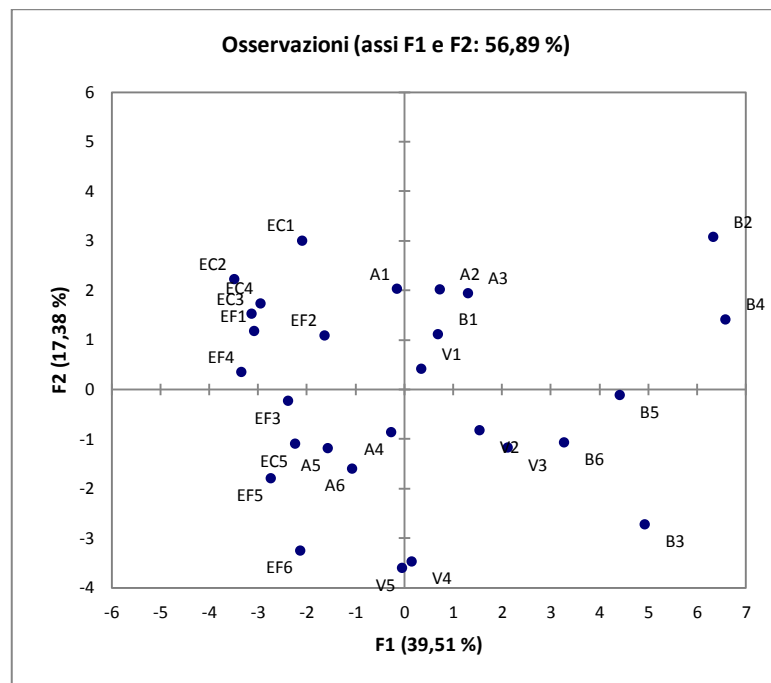


Figura 100: Score plot tra la prima e la seconda componente estratta, risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle conchiglie (SH).

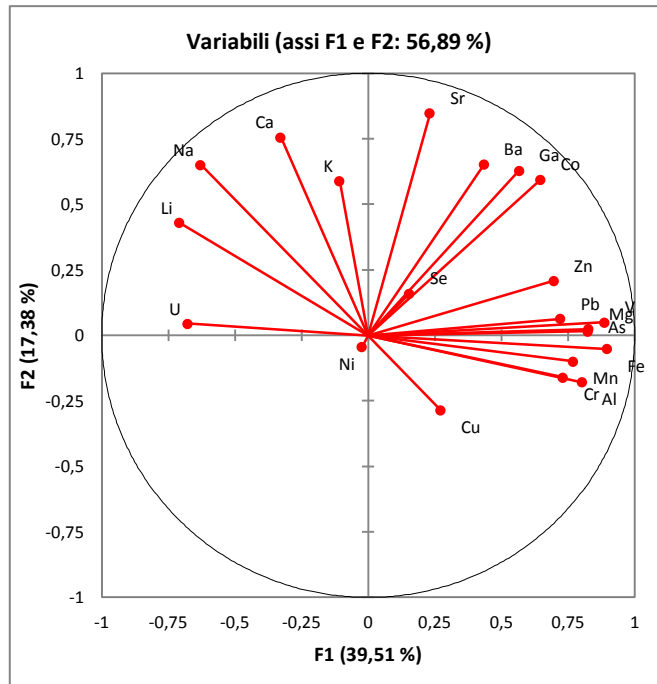


Figura 101: Loading plot tra la prima e la seconda componente estratta, risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle conchiglie (SH).

Per comprendere meglio quali sono le variabili che contribuiscono a differenziare i campioni si possono esaminare lo score plot (**Figura 102**) e il loading plot (**Figura 103**) tra la prima e la terza componente estratta che complessivamente spiegano il 48,5% della variabilità dei dati: in questo caso è più facile evidenziare come i campioni provenienti dai siti A e V si dispongano in una posizione intermedia tra i campioni dei siti EC e EF (a sinistra) e i campioni del sito B (nella parte a destra), confermando un risultato già evidenziato dall'esame del dendrogramma in Q-mode della CA. Tale distribuzione nello spazio formato dalla prima e la terza componente estratta rivela una diversa composizione delle conchiglie provenienti dai diversi siti, come si evince dal loading plot, e rispecchia in un certo modo la distribuzione geografica dei siti di prelievo, a partire dal sito B più a nord fino a i siti EC e EF in laguna sud, passando per i siti A e V in laguna centrale.

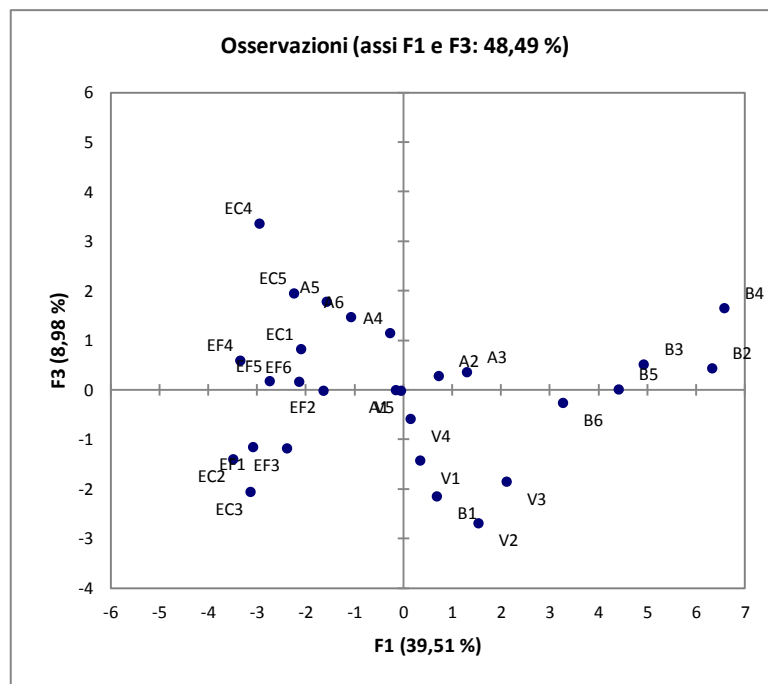


Figura 102: Score plot tra la prima e la terza componente estratta, risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle conchiglie (SH).

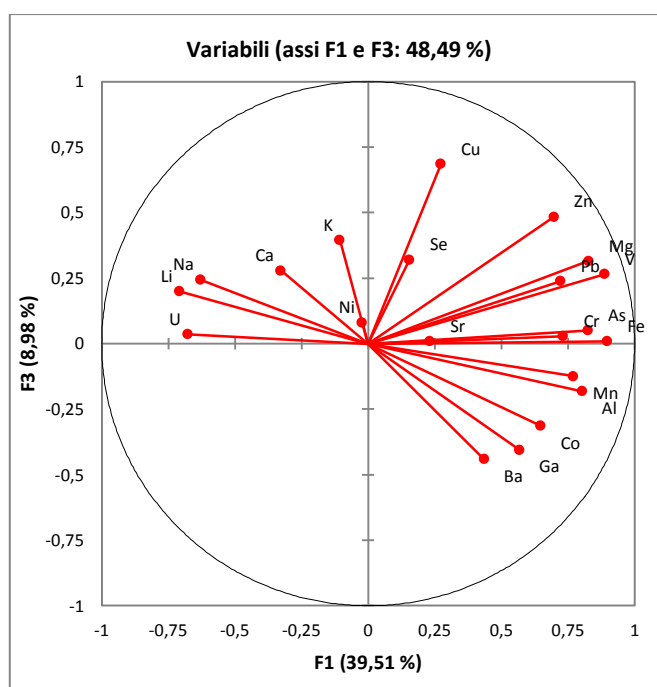


Figura 103: Loading plot tra la prima e la terza componente estratta, risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nelle conchiglie (SH).

Dopo l'opportuna normalizzazione anche la matrice di dati relativa alle concentrazioni di elementi nei sedimenti totali è stata sottoposta a Cluster Analysis e PCA tramite il software XLStat Addinsoft™. I dendrogrammi risultanti dalla CA sono riportati in **Figura 104** (Q-mode) e in **Figura 105** (R-mode); lo score plot e il loading plot risultanti dalla PCA sono riportati in **Figura 106** e **Figura 107** rispettivamente.

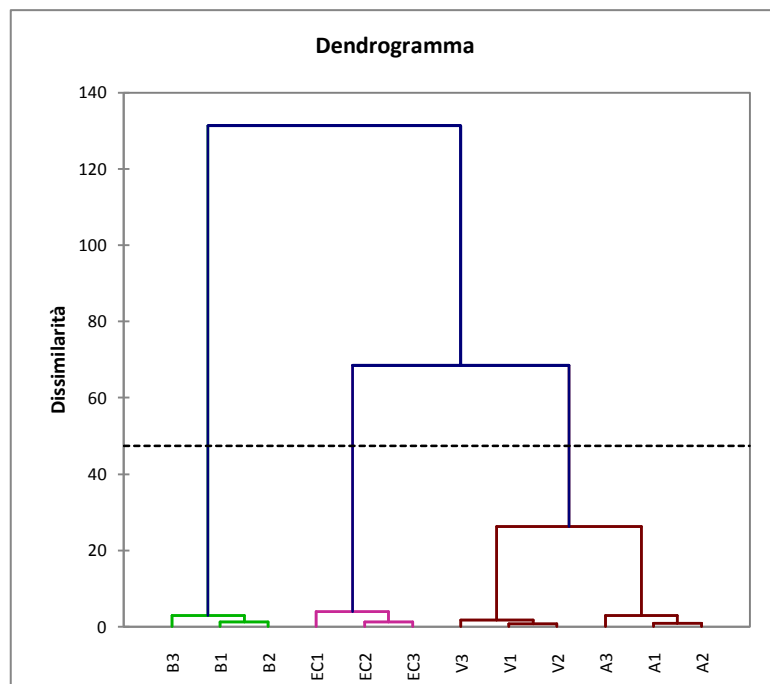


Figura 104: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode (raggruppamento dei campioni) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nel sedimento (SED).

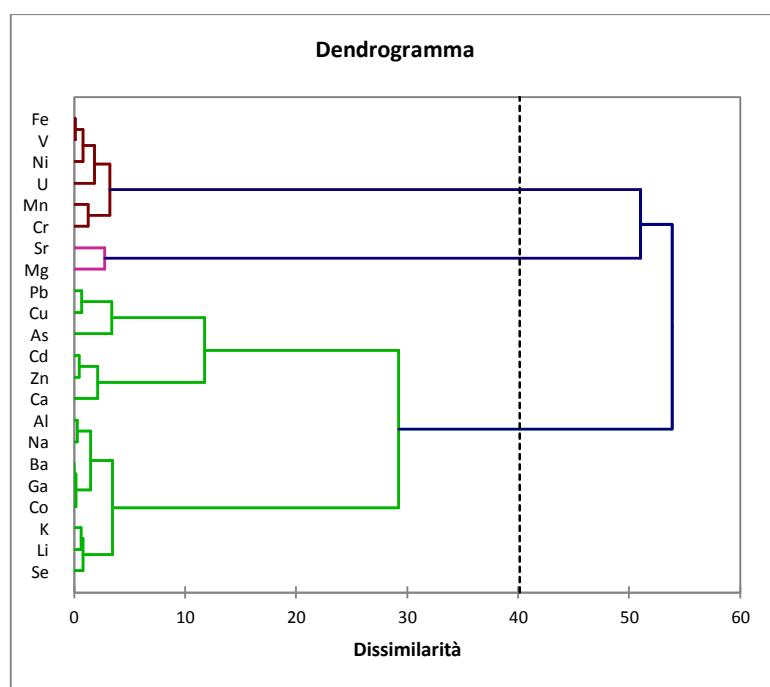


Figura 105: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode (raggruppamento delle variabili) sulla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nel sedimento (SED).

Dal dendrogramma in Q-mode di **Figura 104** appare molto evidente come i campioni si suddividano in quattro gruppi esattamente corrispondenti al sito di provenienza: la gerarchia del dendrogramma indica come i più diversi i campioni del sito B, seguiti da quelli del sito EC e infine dai campioni dei siti A e V, i più simili tra loro. Il dendrogramma in R-mode (**Figura 105**) d'altra parte, conferma i raggruppamenti tra le variabili già individuati

in **4.3.4 Sedimento: analisi elementale** sulla base dell'andamento delle concentrazioni nei vari siti : in particolare conferma il raggruppamento per Cr, Mn, U, Ni, V e Fe, e per Sr e Mg.

La netta suddivisione in gruppi è confermata dai risultati della PCA che dispone, nello score plot di **Figura 106**, i campioni relativi al sito A e al sito V nel primo quadrante (seppur suddivisi tra loro), quelli del sito B nel secondo quadrante e quelli relativi al sito EC nel quarto. Questa suddivisione rispecchia le differenze evidenziate rispetto alla composizione granulometrica, che indicava il sito EC con una prevalenza di sabbia, il sito B con una prevalenza di silt e i siti A e V come i più simili tra loro con una composizione intermedia, e rafforza l'ipotesi dell'esistenza di una forte correlazione tra la granulometria e la composizione del sedimento.

I raggruppamenti di variabili evidenziati dal dendrogramma in R-mode sono confermati dalla posizione delle variabili nello spazio delle componenti principali (che, si noti, spiegano l'86,5% della variabilità dei dati): in particolare i campioni del sito B sono caratterizzati da alti valori di Sr e Mg, mentre i campioni provenienti dal sito EC presentano elevate concentrazioni di Cr, Mn, U, Ni, V e Fe.

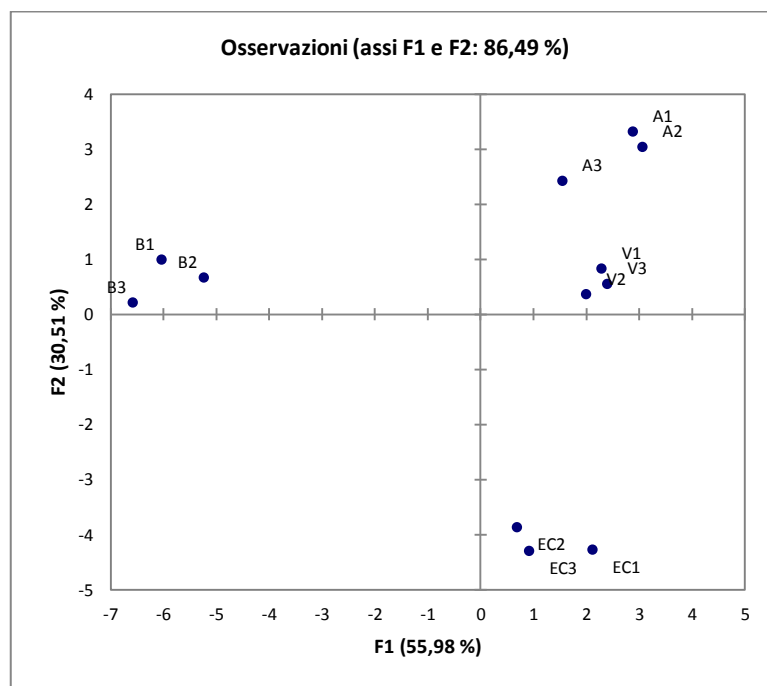


Figura 106: Score plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei sedimenti.

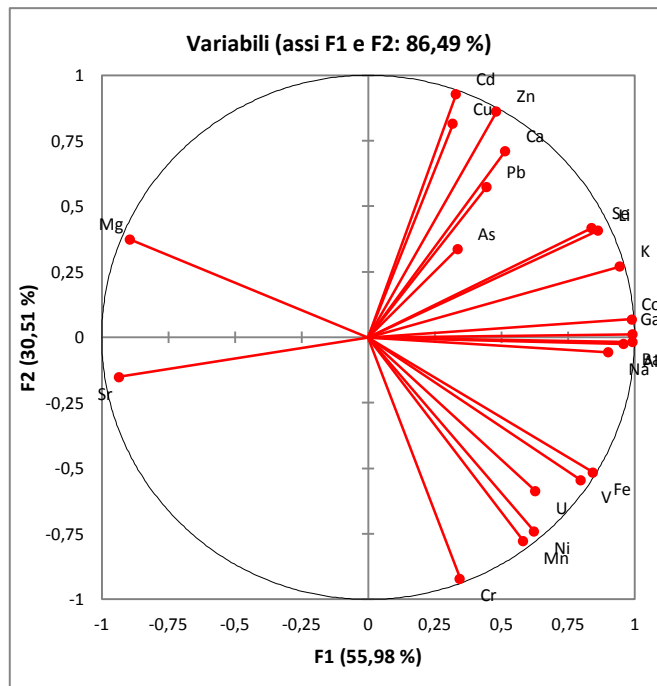


Figura 107: Loading plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nei sedimenti.

Riassumendo, i risultati ottenuti dall'applicazione dei metodi statistici di raggruppamento alle matrici di dati relative alle concentrazioni di elementi nei soft tissue (considerati come ST-EP, EP e ST) e nelle valve di *V. philippinarum* e nei sedimenti mettono in evidenza i seguenti aspetti:

- le composizioni elementali dei sedimenti provenienti dai diversi punti di campionamento sono un fattore caratterizzante in grado di distinguere i campioni rispetto all'area di provenienza;
- la suddivisione in gruppi omogenei rispetto alla composizione elementale si riscontra anche nel caso della valve di *V. philippinarum*, seppur con una separazione in generale meno netta rispetto a quanto evidenziato nei sedimenti;
- i valori di concentrazione degli elementi considerati in ST-EP, EP e ST distinguono in maniera evidente solo i campioni provenienti dai siti EC e EF sulla base di una valutazione quantitativa rispetto agli elementi presenti (la prima componente estratta dalla PCA in tutti e tre i casi dà un'informazione unicamente quantitativa);
- le composizioni elementali delle conchiglie sono maggiormente differenziate rispetto ai soft tissue dipendentemente dal sito di provenienza, tanto che si può riconoscere un mutamento nella composizione che rispecchia la distribuzione geografica dei siti da nord a sud della laguna.

4.4.3 Correlazioni

Al fine di evidenziare possibili relazioni esistenti tra le variabili indagate nelle diverse matrici considerate si è scelto in un primo momento di procedere a un'analisi di regressione; questa scelta è stata dettata dal fatto che in letteratura si riportano casi in cui c'è una buona correlazione lineare tra le concentrazioni in diversi comparti:

ad esempio Bourgoin (1990) riporta una buona correlazione lineare ($R^2 = 0,95$) tra la concentrazione di Pb nella conchiglia (in particolare nello strato di madreperla) e la concentrazione nei soft tissue di *Mytilus edulis*.

I risultati ottenuti non sono particolarmente significativi fatta eccezione per i casi di cui si riportano gli scatter plot nelle figure seguenti; in particolare:

- per il Cu esiste una buona correlazione lineare ($R^2 = 0,93$) tra la concentrazione dell'elemento nell'epatopancreas e quella rilevata nei sedimenti (**Figura 108**) e una buona correlazione lineare ($R^2 = 0,87$) tra la concentrazione nei soft tissue totali, ST, e quella nel sedimento (**Figura 109**);
- significativa ($R^2 = 0,85$) è la correlazione lineare tra la concentrazione dello Zn nei soft tissue (ST) rispetto alla concentrazione dello stesso elemento nei sedimenti (**Figura 110**);
- non si evidenziano esempi di correlazione lineare tra la concentrazione di elementi nelle conchiglie e quella in altri tessuti di *V. philippinarum*, fatta eccezione per la correlazione tra il contenuto di As nelle conchiglie rispetto al contenuto dello stesso elemento nell'epatopancreas che presenta tuttavia un valore del coefficiente di determinazione piuttosto basso ($R^2 = 0,64$) (**Figura 111**);
- alcuni esempi di correlazione lineare significativa si hanno considerando le concentrazioni di K, Co, Ni e Zn nei soft tissue (ST) rispetto alla concentrazione degli stessi elementi nelle fasi biodisponibili del sedimento (GPH1 + GPH2 + GPH3) come riportato in **Figura 112** per il K ($R^2 = 0,77$), in **Figura 113** per il Co ($R^2 = 0,82$), in **Figura 114** per il Ni ($R^2 = 0,70$) e in **Figura 115** per lo Zn ($R^2 = 0,78$).

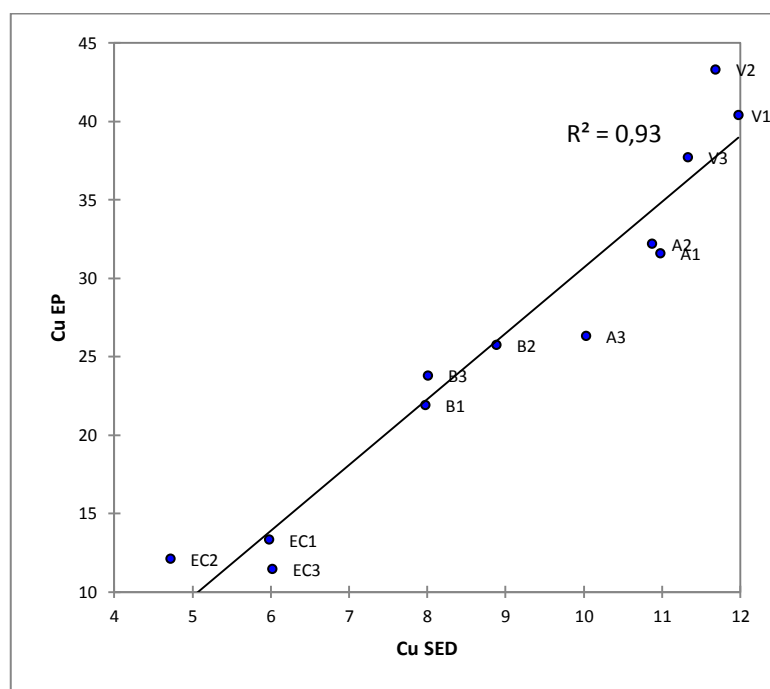


Figura 108: Scatter plot della concentrazione di Cu nell'epatopancreas rispetto a quella nel sedimento per i campioni esaminati (con linea di tendenza e bontà della regressione).

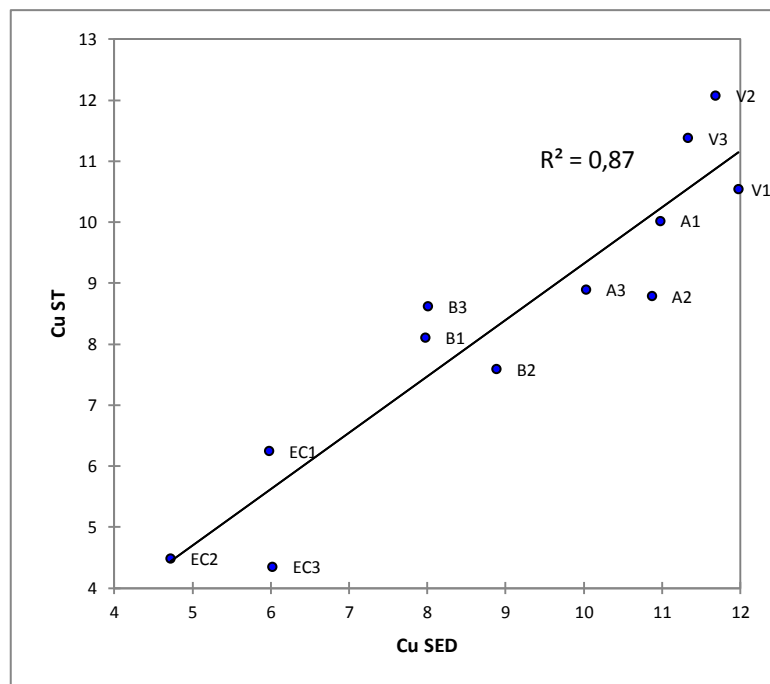


Figura 109: Scatter plot della concentrazione di Cu nei *soft tissue* rispetto a quella nel sedimento per i campioni esaminati (con linea di tendenza e bontà della regressione).

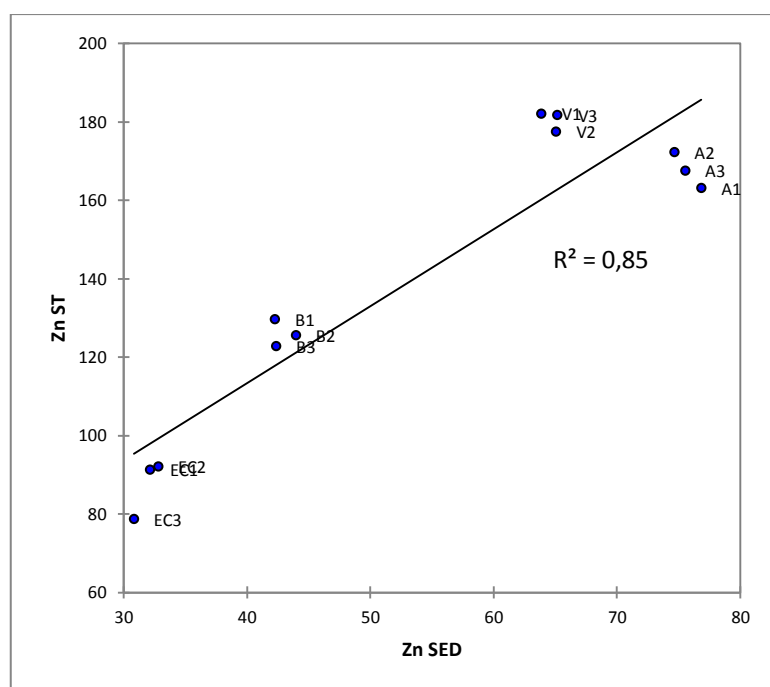


Figura 110: Scatter plot della concentrazione di Zn nei *soft tissue* rispetto a quella nel sedimento per i campioni esaminati (con linea di tendenza e bontà della regressione).

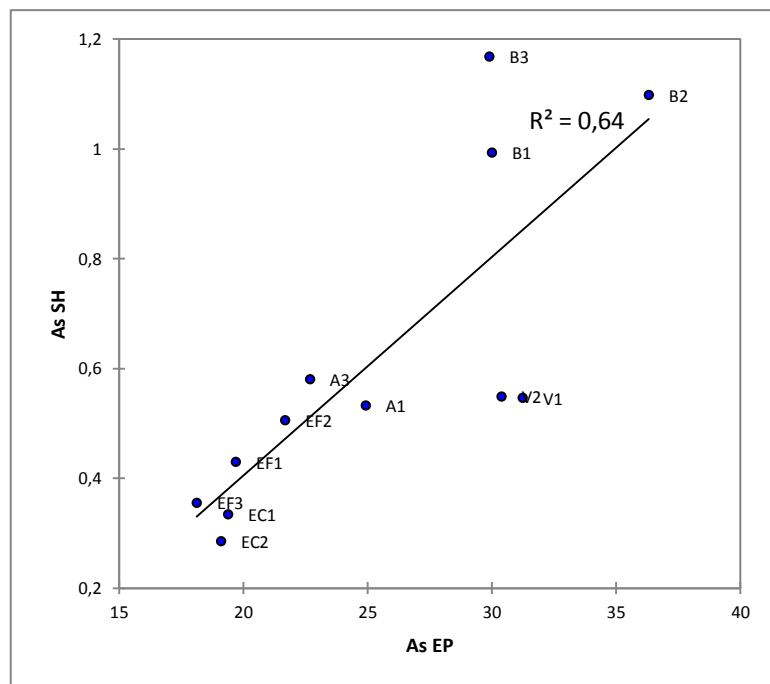


Figura 111: Scatter plot della concentrazione di As nelle conchiglie rispetto a quella nell'epatopancreas per i campioni esaminati (con linea di tendenza e bontà della regressione).

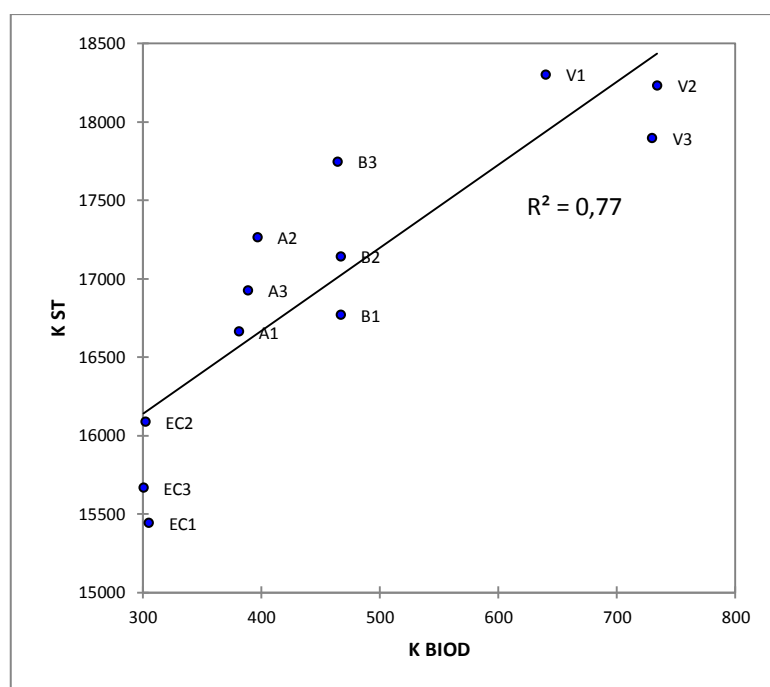


Figura 112: Scatter plot della concentrazione di K nei *soft tissue* rispetto a quella nelle fasi biodisponibili del sedimento per i campioni esaminati (con linea di tendenza e bontà della regressione).

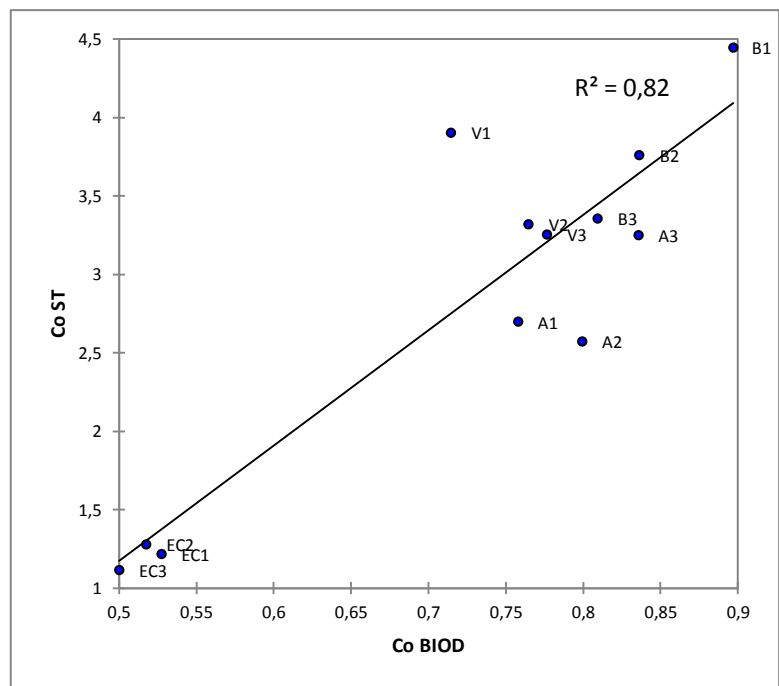


Figura 113: Scatter plot della concentrazione di Co nei *soft tissue* rispetto a quella nelle fasi biodisponibili del sedimento per i campioni esaminati (con linea di tendenza e bontà della regressione).

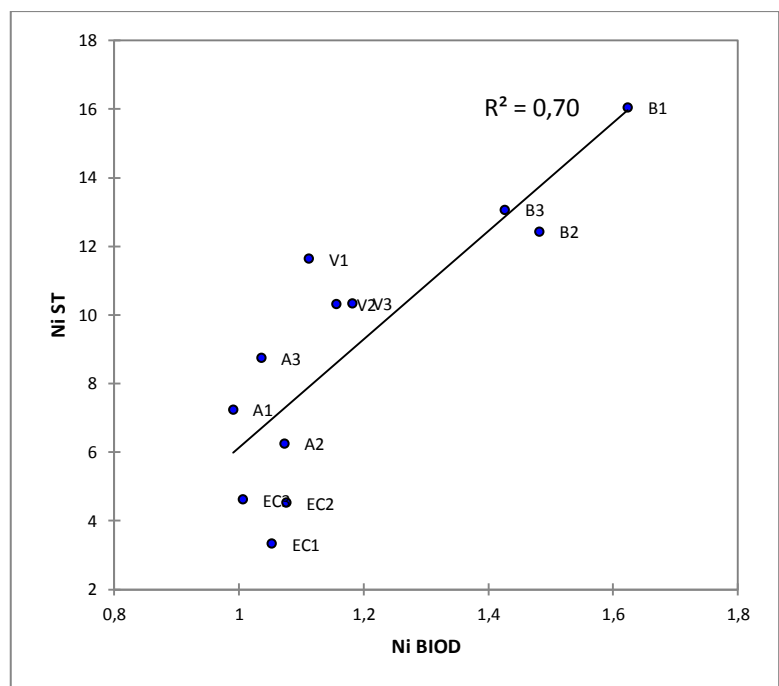


Figura 114: Scatter plot della concentrazione di Ni nei *soft tissue* rispetto a quella nelle fasi biodisponibili del sedimento per i campioni esaminati (con linea di tendenza e bontà della regressione).

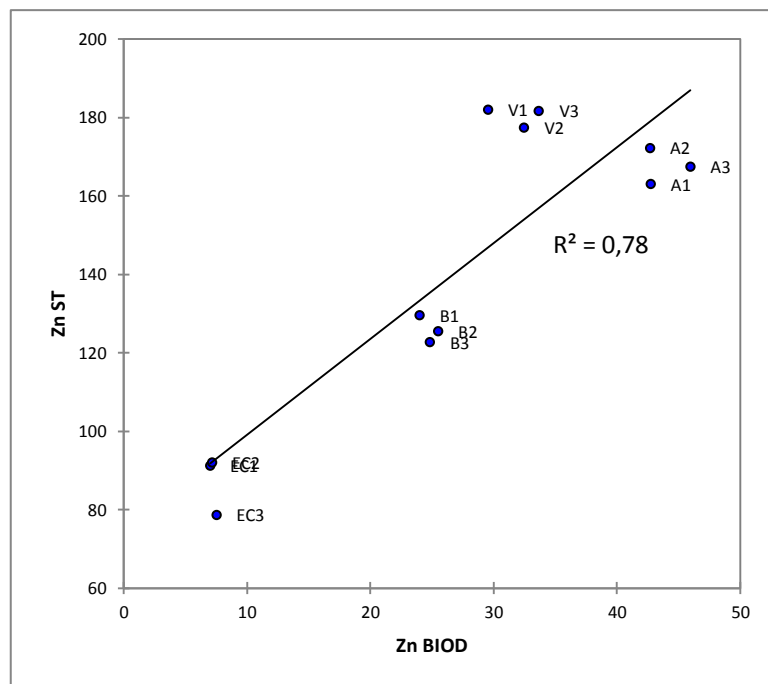


Figura 115: Scatter plot della concentrazione di Zn nei *soft tissue* rispetto a quella nelle fasi biodisponibili del sedimento per i campioni esaminati (con linea di tendenza e bontà della regressione).

Il fatto che non si evidenzino semplici relazioni lineari tra la concentrazione degli elementi nelle conchiglie e nei sedimenti e solo in pochi casi tra i *soft tissue* e i sedimenti può essere dovuto al fatto che gli elementi accumulati da *V. philippinarum* potrebbero non derivare dal sedimento per via diretta. Molto probabilmente risultano più rilevanti altre fonti quali ad esempio il particolato sospeso e i metalli disciolti nell'acqua come suggeriscono Huanxin *et al.* (2000) nel caso delle ostriche: i Bivalvi possono assorbire elementi dalle particelle sospese che possono derivare dal sedimento, ma poiché il rilascio di elementi è controllato dal comportamento degli elementi stessi oltre che dalle condizioni chimico-fisiche dell'ambiente circostante, è possibile che non ci siano relazioni chiare tra le concentrazioni di elementi nei tessuti molli e nella conchiglia dei Bivalvi e quelle nei sedimenti (Huanxin *et al.*, 2000).

L'indagine è proseguita per verificare l'esistenza di correlazioni non lineari tra coppie di elementi nella stessa matrice (Koschinsky *et al.*, 2014) mediante il calcolo dei coefficienti di correlazione di Spearman, come suggerito da Liu *et al.*, (2014). Le matrici di correlazione ottenute per le variabili determinate nell'epatopancreas, nei *soft tissue* totali, nelle conchiglie e nei sedimenti sono riportate rispettivamente in **Figura 116**, **Figura 117**, **Figura 118** e **Figura 119**.

Variabili	Li EP	Na EP	Mg EP	Al EP	K EP	Ca EP	V EP	Cr EP	Mn EP	Fe EP	Co EP	Ni EP	Cu EP	Zn EP	Ga EP	As EP	Se EP	Sr EP	Cd EP	Ba EP	Pb EP	U EP	
Li EP	1																						
Na EP	0,604	1																					
Mg EP	0,854	0,871	1																				
Al EP	0,900	0,275	0,639	1																			
K EP	0,468	0,864	0,779	0,232	1																		
Ca EP	0,879	0,439	0,675	0,821	0,221	1																	
V EP	0,918	0,700	0,850	0,768	0,618	0,732	1																
Cr EP	0,871	0,554	0,739	0,864	0,554	0,750	0,889	1															
Mn EP	0,943	0,407	0,721	0,950	0,300	0,882	0,775	0,843	1														
Fe EP	0,971	0,646	0,868	0,886	0,571	0,861	0,943	0,921	0,904	1													
Co EP	0,639	0,882	0,850	0,368	0,871	0,504	0,721	0,636	0,471	0,718	1												
Ni EP	0,500	0,836	0,768	0,264	0,843	0,350	0,543	0,532	0,418	0,557	0,832	1											
Cu EP	0,454	0,732	0,664	0,232	0,832	0,132	0,696	0,546	0,275	0,546	0,732	0,664	1										
Zn EP	0,464	0,850	0,714	0,136	0,850	0,257	0,575	0,468	0,300	0,511	0,861	0,864	0,789	1									
Ga EP	0,857	0,593	0,775	0,779	0,443	0,861	0,711	0,754	0,839	0,864	0,704	0,593	0,254	0,432	1								
As EP	0,393	0,875	0,771	0,129	0,957	0,193	0,536	0,436	0,207	0,496	0,893	0,846	0,757	0,846	0,450	1							
Se EP	0,579	0,871	0,825	0,350	0,939	0,364	0,743	0,657	0,429	0,689	0,886	0,825	0,886	0,836	0,507	0,907	1						
Sr EP	0,832	0,621	0,718	0,646	0,375	0,925	0,757	0,671	0,750	0,821	0,639	0,475	0,246	0,411	0,846	0,361	0,482	1					
Cd EP	0,429	0,818	0,696	0,150	0,886	0,214	0,607	0,489	0,282	0,525	0,864	0,875	0,882	0,900	0,414	0,875	0,929	0,393	1				
Ba EP	0,721	0,636	0,746	0,586	0,550	0,704	0,643	0,629	0,632	0,743	0,754	0,664	0,286	0,500	0,911	0,582	0,518	0,789	0,489	1			
Pb EP	0,757	0,771	0,829	0,571	0,761	0,496	0,836	0,736	0,618	0,789	0,764	0,811	0,746	0,725	0,679	0,686	0,779	0,600	0,764	0,725	1		
U EP	0,050	0,139	0,054	0,179	0,300	0,132	0,164	0,450	0,104	0,200	0,254	0,293	0,132	0,046	0,243	0,239	0,318	0,150	0,254	0,257	0,196	1	

Figura 116: Matrice di correlazione che riporta i valori del coefficiente di Spearman per le variabili misurate nell'epatopancreas (EP) di *V. philippinarum* (in rosso i valori maggiori di 0,9; in arancione quelli compresi tra 0,8 e 0,9; considerati in valore assoluto).

Variabili	Li ST	Na ST	Mg ST	Al ST	K ST	Ca ST	V ST	Cr ST	Mn ST	Fe ST	Co ST	Ni ST	Cu ST	Zn ST	Ga ST	As ST	Se ST	Sr ST	Cd ST	Ba ST	Pb ST	U ST	
Li ST	1																						
Na ST	0,861	1																					
Mg ST	0,893	0,979	1																				
Al ST	0,829	0,514	0,550	1																			
K ST	0,786	0,821	0,814	0,407	1																		
Ca ST	0,786	0,800	0,868	0,571	0,614	1																	
V ST	0,811	0,654	0,721	0,775	0,457	0,689	1																
Cr ST	0,132	0,079	0,136	0,143	-0,100	0,211	0,375	1															
Mn ST	0,846	0,732	0,768	0,739	0,589	0,750	0,796	0,329	1														
Fe ST	0,725	0,629	0,657	0,586	0,511	0,532	0,814	0,561	0,850	1													
Co ST	0,807	0,811	0,857	0,504	0,686	0,821	0,814	0,289	0,704	0,700	1												
Ni ST	0,779	0,768	0,839	0,504	0,646	0,786	0,814	0,393	0,632	0,657	0,918	1											
Cu ST	0,782	0,843	0,800	0,557	0,789	0,657	0,643	0,154	0,754	0,675	0,696	0,618	1										
Zn ST	0,768	0,893	0,829	0,468	0,796	0,589	0,586	0,139	0,664	0,682	0,696	0,618	0,936	1									
Ga ST	0,704	0,461	0,539	0,786	0,307	0,571	0,893	0,596	0,725	0,779	0,657	0,675	0,511	0,457	1								
As ST	0,800	0,846	0,893	0,432	0,796	0,707	0,775	0,189	0,671	0,743	0,889	0,868	0,718	0,750	0,568	1							
Se ST	0,775	0,832	0,786	0,561	0,732	0,650	0,636	0,121	0,764	0,721	0,671	0,539	0,954	0,946	0,507	0,696	1						
Sr ST	0,829	0,893	0,932	0,518	0,779	0,936	0,689	0,132	0,729	0,589	0,854	0,825	0,771	0,750	0,518	0,818	0,771	1					
Cd ST	0,821	0,711	0,796	0,593	0,596	0,757	0,850	0,543	0,850	0,854	0,871	0,875	0,661	0,614	0,782	0,825	0,621	0,750	1				
Ba ST	0,561	0,421	0,521	0,589	0,221	0,611	0,800	0,593	0,575	0,582	0,664	0,700	0,404	0,332	0,896	0,550	0,339	0,479	0,732	1			
Pb ST	0,743	0,696	0,718	0,671	0,425	0,636	0,943	0,486	0,768	0,825	0,811	0,789	0,718	0,686	0,857	0,746	0,689	0,639	0,825	0,807	1		
U ST	0,800	0,839	0,825	0,650	0,607	0,689	0,793	0,254	0,786	0,729	0,729	0,650	0,882	0,879	0,714	0,729	0,893	0,743	0,707	0,646	0,864	1	

Figura 117: Matrice di correlazione che riporta i valori del coefficiente di Spearman per le variabili misurate nei soft tissue totali (ST) di *V. philippinarum* (in rosso i valori maggiori di 0,9; in arancione quelli compresi tra 0,8 e 0,9; considerati in valore assoluto).

Variabili	Li SH	Na SH	Mg SH	Al SH	K SH	Ca SH	V SH	Cr SH	Mn SH	Fe SH	Co SH	Ni SH	Cu SH	Zn SH	Ga SH	As SH	Se SH	Sr SH	Ba SH	Pb SH	U SH	
Li SH	1																					
Na SH	0,689	1																				
Mg SH	-0,483	-0,356	1																			
Al SH	-0,732	-0,634	0,630	1																		
K SH	0,413	0,663	0,154	-0,163	1																	
Ca SH	0,197	0,622	0,090	-0,283	0,443	1																
V SH	-0,536	-0,530	0,802	0,795	0,027	-0,204	1															
Cr SH	-0,418	-0,424	0,484	0,567	-0,050	-0,262	0,615	1														
Mn SH	-0,509	-0,589	0,445	0,704	-0,140	-0,297	0,654	0,431	1													
Fe SH	-0,551	-0,464	0,656	0,710	0,094	-0,090	0,760	0,549	0,516	1												
Co SH	-0,260	-0,086	0,381	0,452	0,218	0,314	0,438	0,344	0,479	0,557	1											
Ni SH	-0,129	-0,049	0,095	0,153	-0,015	-0,101	0,027	0,263	0,064	0,015	0,011	1										
Cu SH	-0,287	-0,295	0,408	0,120	-0,201	-0,088	0,264	0,214	0,023	0,127	-0,205	0,185	1									
Zn SH	-0,365	-0,178	0,560	0,453	0,288	0,063	0,652	0,495	0,298	0,497	0,360	0,227	0,301	1								
Ga SH	-0,283	-0,065	0,319	0,219	0,121	0,372	0,248	0,272	0,190	0,495	0,756	-0,026	-0,080	0,123	1							
As SH	-0,752	-0,511	0,691	0,734	-0,055	-0,076	0,645	0,466	0,506	0,746	0,410	0,181	0,288	0,488	0,429	1						
Se SH	-0,162	-0,132	0,291	0,173	0,031	-0,002	0,287	-0,009	0,231	0,299	0,071	-0,194	0,471	0,304	0,119	0,347	1					
Sr SH	0,162	0,306	0,114	-0,078	0,253	0,438	-0,008	0,003	0,012	0,111	0,576	-0,040	0,095	0,096	0,679	0,128	0,371	1				
Ba SH	-0,153	-0,011	0,142	0,083	0,090	0,328	0,057	0,097	0,115	0,325	0,627	-0,088	-0,167	-0,078	0,946	0,320	0,146	0,708	1			
Pb SH	-0,426	-0,372	0,556	0,487	0,116	-0,176	0,740	0,616	0,505	0,622	0,291	0,125	0,309	0,705	0,238	0,643	0,405	0,059	0,073	1		
U SH	0,775	0,459	-0,440	-0,729	0,071	0,078	-0,509	-0,397	-0,451	-0,638	-0,493	-0,233	-0,235	-0,486	-0,310	-0,676	-0,230	-0,028	-0,145	-0,352	1	

Figura 118: Matrice di correlazione che riporta i valori del coefficiente di Spearman per le variabili misurate nelle conchiglie (SH) di *V. philippinarum* (in rosso i valori maggiori di 0,9; in arancione quelli compresi tra 0,8 e 0,9; in giallo quelli compresi tra 0,7 e 0,8; considerati in valore assoluto).

Variabili	Li SED	Na SED	Mg SED	Al SED	K SED	Ca SED	V SED	Cr SED	Mn SED	Fe SED	Co SED	Ni SED	Cu SED	Zn SED	Ga SED	As SED	Se SED	Sr SED	Cd SED	Ba SED	Pb SED	U SED	
Li SED	1																						
Na SED	0,734	1																					
Mg SED	-0,161	-0,378	1																				
Al SED	0,790	0,923	-0,308	1																			
K SED	0,944	0,664	-0,231	0,769	1																		
Ca SED	0,818	0,476	0,210	0,594	0,797	1																	
V SED	0,259	0,476	-0,888	0,301	0,259	-0,077	1																
Cr SED	-0,182	0,175	-0,825	-0,021	-0,161	-0,587	0,811	1															
Mn SED	0,280	0,573	-0,846	0,392	0,210	-0,091	0,923	0,811	1														
Fe SED	0,266	0,559	-0,853	0,385	0,189	-0,154	0,909	0,846	0,986	1													
Co SED	0,937	0,685	-0,245	0,755	0,972	0,769	0,336	-0,133	0,238	0,217	1												
Ni SED	0,217	0,524	-0,888	0,406	0,217	-0,154	0,916	0,860	0,991	0,958	0,231	1											
Cu SED	0,517	-0,098	0,049	0,000	0,615	0,538	-0,042	-0,259	-0,175	-0,182	0,545	-0,168	1										
Zn SED	0,713	0,196	0,315	0,364	0,741	0,776	-0,280	-0,594	-0,378	-0,357	0,706	-0,364	0,748	1									
Ga SED	0,958	0,657	-0,182	0,748	0,951	0,783	0,266	-0,126	0,252	0,259	0,923	0,266	0,608	0,755	1								
As SED	0,238	-0,266	0,182	-0,294	0,238	0,378	0,056	-0,133	-0,070	-0,091	0,224	-0,084	0,755	0,434	0,357	1							
Se SED	0,930	0,678	-0,238	0,706	0,930	0,776	0,322	-0,140	0,266	0,245	0,944	0,203	0,559	0,671	0,888	0,252	1						
Sr SED	-0,916	-0,587	0,245	-0,734	-0,951	-0,755	-0,273	0,168	-0,182	-0,182	-0,958	-0,210	-0,566	-0,769	-0,930	-0,217	-0,874	1					
Cd SED	0,741	0,231	0,308	0,378	0,769	0,860	-0,231	-0,650	-0,350	-0,371	0,762	-0,378	0,755	0,930	0,741	0,462	0,734	-0,762	1				
Ba SED	0,846	0,531	-0,301	0,643	0,867	0,650	0,329	0,000	0,287	0,315	0,825	0,350	0,650	0,692	0,944	0,406	0,762	-0,874	0,671	1			
Pb SED	0,538	-0,112	0,049	-0,014	0,587	0,531	-0,042	-0,287	-0,161	-0,168	0,538	-0,196	0,972	0,734	0,587	0,720	0,552	-0,573	0,769	0,636	1		
U SED	0,336	0,392	-0,818	0,301	0,280	-0,105	0,846	0,776	0,895	0,916	0,294	0,895	0,077	-0,217	0,371	0,126	0,294	-0,301	-0,217	0,469	0,112	1	

Figura 119: Matrice di correlazione che riporta i valori del coefficiente di Spearman per le variabili misurate nei sedimenti (SED) (in rosso i valori maggiori di 0,9; in arancione quelli compresi tra 0,8 e 0,9; considerati in valore assoluto).

Osservando i risultati riportati in **Figura 116** relativamente all'epatopancreas tra gli elementi che presentano livelli di correlazione elevati tra di loro sono particolarmente interessanti le coppie Mn/Fe, Sr/Ca comprendenti elementi noti per la loro affinità.

Nel caso delle variabili misurate nei soft tissue totali (ST) il coefficiente di Spearman (si veda **Figura 117**) indica l'esistenza di una correlazione significativa nelle coppie Na/Mg, Ni/Co, Sr/Mg e Sr/Ca, Pb/V e nella terna Cu, Zn e Se.

La matrice di correlazione calcolata sulla base dei valori di concentrazione degli elementi riscontrati nelle conchiglie (**Figura 118**) non evidenzia correlazioni particolarmente significative dal punto di vista statistico, fatta eccezione per la coppia Ga/Ba e Mg/V, la prima già evidenziata nell'epatopancreas. Per quanto riguarda i

sedimenti (**Figura 119**) si trova, tra le altre, la presenza di una correlazione elevata tra Mn e Fe, Ga e Ba, già individuata in altre matrici.

4.5 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

I risultati ottenuti in questa seconda parte del lavoro confermano che la distribuzione subcellulare degli elementi è elemento-specifica (He & Wang, 2013): questa osservazione suggerisce di rivedere i risultati relativi alle analisi elementali organizzandoli schematicamente per ciascun elemento esaminando in particolare i valori medi per ogni sito oltre che i risultati delle elaborazioni eseguite.

- *Litio*

I valori più elevati nei soft tissue e nell'epatopancreas si registrano nei siti A, B e V; nell'epatopancreas i valori sono abbastanza elevati, superando in qualche caso i valori determinati in ST e ST-EP. Le concentrazioni determinate nei soft tissue e nelle conchiglie hanno il medesimo ordine di grandezza; i valori risultano circa uguali nelle due matrici per il sito EC.

L'andamento generale è sostanzialmente diverso nelle conchiglie, dove i valori più elevati si registrano nel caso dei siti EC e EF, e nei sedimenti, che presentano i valori più elevati nel sito A e quelli più bassi nel sito B. In tutti i siti il Li si trova prevalentemente nella fase legata agli ossidi di Fe e Mn più resistente alla riduzione (GPH5) con percentuali che si attestano intorno al 50% del totale delle fasi estratte, tranne nel caso del sito B dove il valore scende al 40%.

I fattori di bioaccumulo sono più elevati nel caso dei soft tissue indicando un accumulo preferenziale dell'elemento in questo comparto. Non si registrano correlazioni lineari significative tra i diversi comparti analizzati, mentre presentano valori del coefficiente di Spearman particolarmente elevati le relazioni con K, Co, Ga, Se e Sr nei sedimenti e le relazioni con Al, V, Mn e Fe nell'epatopancreas.

- *Sodio*

Le concentrazioni determinate nei soft tissue (ST) risultano più elevate rispetto a quelle registrate nell'epatopancreas, ma gli andamenti sono comparabili con i valori più elevati registrati nei siti A, B e V. Diverso l'andamento evidenziato nelle conchiglie dove i siti B e V presentano i valori più bassi.

Nel caso del sedimento si registrano valori particolarmente bassi nel sito B, mentre gli altri siti (A, EC e V) presentano valori più vicini tra loro. Nonostante non sia stato possibile determinare il valore di concentrazione in quanto superiore al valore massimo determinabile con lo strumento (ICP-MS) è evidente come il Na si presenti per la maggior quota legato ai carbonati (GPH2).

La particolare abbondanza nei tessuti molli di *V. philippinarum* non sorprende dato che l'elemento svolge un ruolo importante nel regolare le funzioni cellulari e vista la sua elevata affinità per l'acqua (le concentrazioni in acqua di mare si attestano su valori di circa 10 g L^{-1}) che lo rende particolarmente disponibile per gli organismi marini e delle acque di transizione.

I dati non sembrano evidenziare una correlazione con i valori di salinità riportati nell'Atlante della laguna (2006) che indica i siti EC e EF come quelli a salinità maggiore e i siti B e V quelli che presentano i valori più bassi. Bisogna tuttavia tenere presente che i valori di concentrazione così elevati rendono il dato determinato tramite ICP-MS in generale poco affidabile.

- *Magnesio*

Gli andamenti nei tessuti molli e nell'epatopancreas sono sostanzialmente concordi con i valori più elevati registrati nei siti V/B e a seguire in A; le concentrazioni risultano maggiori in ST rispetto a EP. Anche nelle conchiglie il valore più elevato si registra nel sito B, tuttavia le concentrazioni sono più basse rispetto a quelle dei tessuti molli: ciò è certamente legato al fatto che il Mg è essenziale nel regolare l'attività di molti enzimi e si trova negli acidi nucleici per affinità con il fosfato.

Il sito B presenta il valore di concentrazione più elevato anche nei sedimenti; tuttavia la speciazione geochimica mette in luce come, nonostante in tutti i siti l'elemento sia legato principalmente alla frazione organica (GPH4) con una percentuale del 60% sul totale delle fasi estratte, nel caso del sito B la situazione si distingue da quella degli altri siti a causa della sostanziale assenza della frazione biodisponibile.

Ciò determina che i valori dei BAF calcolati sulle fasi biodisponibili risultino più elevati per il sito B, a conferma del fatto che, nonostante l'elemento sia poco disponibile, gli organismi di questo sito sono ugualmente in grado di approvvigionarsene per far fronte alle richieste metaboliche. Per quanto riguarda le correlazioni, esse risultano significative solo con il Na e lo Sr nei soft tissue totali.

- *Alluminio*

I soft tissue presentano i valori più elevati nei siti B, V e A; l'epatopancreas presenta valori di concentrazione maggiori rispetto a ST e tra i siti il valore maggiore si registra nel sito V. Le conchiglie rispecchiano l'andamento dei soft tissue anche se con concentrazioni in generale più basse.

Nel sedimento non si registra lo stesso andamento: i siti A, EC e V presentano valori comparabili e decisamente maggiori rispetto a quelli del sito B. L'alluminio è per la maggior parte legato agli ossidi di Fe e Mn resistenti alla riduzione con una frazione che in tutti i siti supera l'80% del totale delle fasi estratte.

I fattori di bioaccumulo mettono in luce come le vongole prelevate nel sito B presentino una capacità di bioaccumulare l'Al decisamente superiore a quella registrata per gli organismi provenienti dagli altri siti. L'analisi di correlazione di Spearman individua rapporti significativi con Li e Mn nell'epatopancreas, con lo Sr nei soft tissue e con il Na nei sedimenti.

- *Potassio*

Data l'importanza fondamentale di questo elemento nel funzionamento cellulare non sorprende che la concentrazione rilevata nei soft tissue sia molto superiore a quella presente nelle conchiglie. I soft tissue e

l'epatopancreas presentano valori di concentrazione comparabili e un andamento simile ($V > B > A > EF > EC$).

Nel caso del sedimento i siti A e V presentano i valori maggiori, mentre il sito B assume il valore più basso. La speciazione geochimica indica come questo elemento sia presente per la maggior parte in GPH1 (con una quota che supera il 60% del totale delle fasi estratte) in quanto legato ai sedimenti con un legame blando che lo porta ad essere scambiabile ionicamente.

Questa elevata biodisponibilità è certamente il motivo per cui si registra una buona correlazione lineare tra la concentrazione rilevata nei soft tissue e quella rilevata nelle fasi biodisponibili dei sedimenti ($R^2 = 0,77$). Per quanto riguarda l'indice di correlazione di Spearman si registrano valori significativi rispetto alla relazione con il Se sia nell'epatopancreas che nei sedimenti.

- *Calcio*

Tutte le concentrazioni determinate sono molto elevate: nei soft tissue il valore medio più elevato raggiunge i $3000 \mu\text{g g}^{-1}$ per il sito V, seguito dal sito B, mentre nelle conchiglie i valori medi si attestano sugli $80000 \mu\text{g g}^{-1}$; si tratta di concentrazioni ragionevoli vista l'importanza dell'elemento nella regolazione cellulare e nell'essere uno dei costituenti principali della matrice cristallina delle conchiglie.

Nel sedimento il valore medio massimo si registra nel sito A (circa $9500 \mu\text{g g}^{-1}$); la speciazione geochimica mette in luce la sua affinità per i carbonati (GPH2) e per la frazione organica (GPH4), in accordo con quanto affermato nel paragrafo precedente.

Il coefficiente di Spearman mette in luce la correlazione tra le concentrazioni di Ca e Sr sia in EP che in ST già osservata nei dendrogrammi in R-mode della Cluster Analysis e certamente legata all'elevata affinità tra questi due elementi che come si è visto nella Prima parte di questo lavoro possono sostituirsi l'un l'altro nell'aragonite.

- *Vanadio*

I soft tissue e l'epatopancreas presentano andamenti simili ($B > V > A > EC > EF$ nel primo caso e $V > B > A > EC > EF$ nel secondo), ma le concentrazioni sono più elevate in EP. Nelle conchiglie si evidenzia un andamento simile a quello dei soft tissue.

Al contrario nel sedimento il sito B presenta i valori più bassi : tuttavia in questo sito le fasi estratte contengono più del 50% del totale presente nel sedimento (il valore più alto tra tutti i siti) a indicare che nel sito B l'elemento è maggiormente biodisponibile per gli organismi.

I BAF calcolati per i ST e le conchiglie sono comparabili e mettono in luce come non vi sia un accumulo preferenziale di questo elemento in uno dei due compartimenti, molto probabilmente a causa del suo scarso valore biologico.

Sia nell'epatopancreas che nei sedimenti si registra una buona correlazione con il ferro: è possibile che questo sia dovuto al fatto che buona parte di questo elemento proveniente da fonti antropiche deriva da leghe ferro-vanadio.

- *Cromo*

Nel caso dei soft tissue i valori medi più elevati si registrano nei siti A e B, quelli più bassi nel sito V; al contrario quest'ultimo sito presenta il valore più elevato nell'epatopancreas. Le conchiglie fanno registrare valori più bassi rispetto a quelli trovati nei tessuti molli con un andamento discordante ($B > V > A > EF > EC$).

Nei sedimenti invece il Cr è presente con un valore particolarmente elevato (che come si è già visto supera gli Standard di Qualità Ambientale fissati dalla normativa) nel sito EC; tuttavia i BAF confermano che non avviene un bioaccumulo di questo elemento da parte di *V. philippinarum* in questo sito. Il livello di contaminazione non viene generalmente considerato preoccupante a causa del fatto che risulta poco biodisponibile e la sua distribuzione conferma la prevalente origine naturale di questo elemento in laguna di Venezia (Apitz *et al.*, 2007).

La speciazione geochimica indica come il Cr si trovi preferibilmente nella quarta e quinta fase estratta (frazione organica, solfuri e ossidi di Fe e Mn resistenti alla riduzione) che complessivamente contengono oltre l'80% del totale delle fasi estratte in tutti i siti considerati.

- *Manganese*

Le concentrazioni medie nei soft tissue risultano più elevate nel sito B (seguono il sito V e A), nell'epatopancreas risultano più elevate in V (seguono B e A); i valori sono comparabili tra i due comparti, leggermente superiori nell'epatopancreas. Le conchiglie mostrano lo stesso andamento registrato nei ST anche se con concentrazioni leggermente più basse.

Apparentemente questi andamenti sono in contrasto con quello dei sedimenti, che registra il valore più alto nel sito EC: ciò nonostante in questo sito il totale delle cinque fasi estratte corrisponde a circa il 25% della concentrazione nel sedimento totale, mentre nel caso del sito B tutto il Mn determinato nel sedimento totale viene estratto dalla speciazione geochimica. La maggior biodisponibilità del Mn nel sito B ne spiega il maggiore bioaccumulo negli organismi di questo sito (evidenziato anche dai BAF calcolati rispetto al sedimento totale).

In ogni caso in tutti i siti la quota maggiore nel sedimento è associata ai carbonati: questo dato non sorprende visto che il Mn è uno degli elementi presenti con quote rilevanti anche nei carbonati biogenici e in particolare nelle conchiglie dei Bivalvi (*cfr. Parte prima*). Anche l'associazione con il Fe registrata dai coefficienti di correlazione di Spearman nell'epatopancreas e nel sedimento è spiegato dalla nota affinità tra questi due elementi.

- *Ferro*

Il confronto tra le concentrazioni registrate in ST e EP indicano un accumulo preferenziale di questo elemento nell'epatopancreas; gli andamenti nei due comparti sono diversi con i siti A e B che presentano i valori maggiori in ST e V, B e A che presentano i valori più alti in EP. Le concentrazioni rilevate nelle conchiglie sono leggermente inferiori rispetto a quelle determinate nei ST, con un andamento $B > V > A > EF/EC$.

Al contrario nei sedimenti, dove il Fe risulta prevalente nella GPH5 con oltre l'80% del totale delle fasi estratte, si registrano i valori più elevati nel sito EC (e a seguire V, A e B): confrontando la somma delle fasi geochimiche con il sedimento totale si nota tuttavia che solo il 20% del contenuto di Fe presente nel sedimento del sito EC viene estratto tramite la geospeciazione, contro un 70% estratto per il sito B. La maggiore biodisponibilità nel sito B influisce sui valori del BAF che risultano più alti in questo sito.

Si può notare, inoltre, come i siti dove il rapporto tra le concentrazioni in EP e in ST è più elevato (EC e V) sono quelli in cui si registrano i valori più alti nei sedimenti. Ciò è certamente legato al fatto che l'epatopancreas è il sito dove il materiale ingerito (tra cui le particelle di sedimento risospeso) viene processato e destinato alla digestione intracellulare e l'assorbimento o all'escrezione. A ulteriore prova di ciò sono i valori assunti dal coefficiente di Spearman che sia nel sedimento che nell'organo digestivo indicano una legame tra le concentrazioni di Fe e quelle di V, Cr e Mn che non si registrano negli altri comparti analizzati.

- *Cobalto*

L'andamento delle concentrazioni è simile in ST e EP ($B > V > A > EC > EF$), con le concentrazioni più elevate registrate nei soft tissue. L'andamento è simile nelle conchiglie, ma il range di variazione delle concentrazioni tra i vari siti è minore rispetto a quello registrato nei tessuti molli.

Per quanto riguarda il sedimento l'andamento è $A > V > EC > B$ e la quota maggiore si trova associata alle fasi meno biodisponibili tra quelle estratte (GPH4 e GPH5 con una quota maggiore o uguale all'80% rispetto al totale dell'elemento estratto). Tuttavia si nota che tutto il Co presente nei sedimenti del sito B è estraibile con la geospeciazione, a differenza di quanto avviene negli siti: questo spiega le sue concentrazioni nei tessuti di *V. philippinarum* e l'elevato valore dei BAF calcolati per entrambi le matrici rispetto al sedimento totale relativamente al sito B.

Si registra una buona correlazione lineare ($R^2 = 0,82$) tra la concentrazione di Co nei soft tissue e quella nelle fasi biodisponibili del sedimento; il coefficiente di correlazione di Spearman mette in luce il legame significativo tra Co e Ni sia nei ST che nell'EP che si evidenzia anche dai dendrogrammi in R-mode risultanti dalla Cluster Analysis e che certamente dipende dall'elevata affinità tra questi due elementi.

- *Nichel*

L'andamento nei soft tissue e nell'epatopancreas per questo elemento è simile ($B > V > A > EF > EC$) e le concentrazioni sono a livelli comparabili; molto più bassi sono i valori registrati nelle conchiglie dove il range di variazione è più limitato. (tra 0,5 e 0,9 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Nei sedimenti la situazione si capovolge e l'andamento è del tipo $EC > V > A > B$; i valori registrati sono comparabili con quelli riportati nell'Atlante della laguna (2006) fatta eccezione per il valore relativo al punto A che in questo studio risulta più alto rispetto a quello indicato (circa 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ rispetto a 3/5 $\mu\text{g g}^{-1}$).

In tutti i casi la frazione prevalente è quella legata agli ossidi di Fe e Mn resistenti alla riduzione, ma con quote che vanno da valori superiori al 60% nei siti EC e V, superiori al 50% per il sito A e tra il 40% e il 50% nel sito B (percentuali riferite al totale estratto dalle fasi geochimiche). Anche in questo caso, come per il Co, tutto il Ni presente nei sedimenti del sito B è estratto dalle 5 fasi geochimiche a conferma della sua maggiore biodisponibilità in questo sito (confermata dai valori di BAF calcolati per i sedimenti totali).

A conferma della forte affinità con il Co, anche nel caso del Ni si registra una buona correlazione lineare tra la concentrazione nei soft tissue e quella nelle fasi biodisponibili dei sedimenti con un valore di R^2 pari a 0,70. Per quanto riguarda la correlazione di Spearman si conferma quanto già evidenziato relativamente al Co nei soft tissue e nell'epatopancreas.

- *Rame*

Le concentrazioni rilevate nella vongola filippina denotano un accumulo preferenziale nell'epatopancreas con concentrazioni che sono circa 3 volte quelle misurate nei ST. In ogni caso entrambi le matrici presentano lo stesso andamento con i siti V, A e B che presentano i valori maggiori in successione. Tale andamento non si registra nelle conchiglie dove il sito B presenta il valore più alto e il sito V quello inferiore; in questa matrice inoltre, le concentrazioni risultano molto più basse (circa un decimo) di quelle determinate nei ST.

L'andamento delle concentrazioni nei sedimenti è lo stesso registrato nei tessuti molli del Bivalve, anche se i fattori di bioaccumulo sono differenti per i due comparti (soft tissue e conchiglia) nei diversi siti. La quota maggiore di Cu si trova associata alla quarta fase (materia organica e solfuri), cosa che non stupisce data l'affinità di questo elemento per la materia organica e in particolare con il materiale umico (Argese & Bettiol, 2001; Argese *et al.*, 2003). In generale la somma della quarta e quinta fase costituiscono circa il 90% del totale delle fasi estratte; inoltre la totalità della concentrazione di Cu presente nel sedimento viene estratta dalla geospecazione a significare che la quota di elemento presente nella fase residuale è sostanzialmente trascurabile.

A conferma dell'esistenza di una relazione tra il Cu presente nei sedimenti e la quantità assimilata dalle vongole, si registra una buona correlazione lineare tra la concentrazione dell'elemento nell'epatopancreas e quella rilevata nel sedimento ($R^2 = 0,93$). I valori del coefficiente di Spearman mettono in luce, inoltre, il

legame tra Cu e Zn nei soft tissue dell'animale che dipende certamente dalla loro affinità e relativa importanza biologica.

- *Zinco*

Le concentrazioni che si evidenziano nei soft tissue e nell'epatopancreas, leggermente inferiori in quest'ultimo, presentano andamenti diversi, ma in entrambi i casi i valori più bassi si registrano nei siti EC e EF. Questo fatto si registra anche nelle conchiglie dove peraltro i valori sono decisamente più bassi.

Per quanto riguarda il sedimento, dove le concentrazioni medie hanno andamento $A > V > B > EC$, le quote maggiori di Zn si trovano, per tutti i siti, nella fase legata ai carbonati (circa il 40% del totale estratto dalla geospeciazione) e in quella legata agli ossidi di Fe e Mn resistenti alla riduzione. Ciò nonostante è importante notare come la procedura di geospeciazione sia in grado di estrarre tutto lo Zn presente nei sedimenti dei siti A, B e V, ma non del sito EC in cui circa il 30% del totale presente si trova evidentemente nella fase residuale. A conferma di ciò i valori dei BAF calcolati per i due comparti (soft tissue e conchiglia) rispetto alle fasi biodisponibili sono particolarmente alti per il sito EC.

Il rapporto tra organismi e sedimento è confermato dal fatto che le concentrazioni che si registrano nei soft tissue correlano positivamente sia con la concentrazione totale determinata nel sedimento ($R^2 = 0,85$) sia con la somma delle fasi con biodisponibili ($R^2 = 0,78$). Inoltre il coefficiente di Spearman mette in luce una relazione tra Zn e Cd sia nei sedimenti che nell'epatopancreas, oltre al legame con il Cu già messo in luce al punto precedente.

- *Gallio*

Gli andamenti di questo elemento nell'epatopancreas e nei soft tissue sono concordi nell'identificare il sito B come quello che presenta i valori più elevati e i siti EC e EF con i valori più bassi. Le concentrazioni nell'epatopancreas sono più elevate rispetto a quelle in ST, mentre quelle registrate nelle conchiglie sono leggermente più basse fatta eccezione per il sito EC; in questa matrice, inoltre, il sito B si conferma quello che presenta i valori maggiori.

Molto diversa la situazione nei sedimenti dove le concentrazioni rilevate nel sito B sono decisamente più basse rispetto a quelle misurate negli altri siti: ciò che è necessario sottolineare però, è che nonostante le prime tre fasi della speciazione geochimica costituiscano circa il 40% del totale delle fasi estratte per tutti i siti, nel caso dei sedimenti del sito B la speciazione geochimica è in grado di estrarre il 20% del totale dell'elemento presente nella matrice mentre per gli altri siti questa percentuale si ferma attorno al 5%. La maggiore biodisponibilità dell'elemento nel sito B spiega il livello di concentrazione registrato nei tessuti della vongola e gli alti valori del BAF per entrambe le matrici rispetto alla concentrazione nei sedimenti.

I valori assunti dall'indice di correlazione di Spearman mettono in luce il legame tra Ga e Ba in tutte le matrici analizzate (in particolare si tratta dell'unica relazione particolarmente significativa tra gli elementi analizzati nella conchiglia di *V. philippinarum*).

- *Arsenico*

I risultati mettono in luce un accumulo preferenziale dell'elemento nella ghiandola digestiva e un andamento comparabile tra ST e EP, con i valori più alti nei siti V e B e quelli più bassi nei siti EF e EC. I valori nelle conchiglie sono decisamente inferiori a quelli determinati nei soft tissue.

Per quanto riguarda i sedimenti le concentrazioni sono leggermente inferiori a quelle indicate nell'Atlante della laguna (2006), in particolare nel sito A; l'andamento tra i siti è $V > A > B > EC$ molto probabilmente a causa dell'influenza dell'area industriale di Porto Marghera come fonte di questo elemento rispetto ai siti più prossimi (A e V). La quota maggiore si trova associata agli ossidi di Fe e Mn difficilmente riducibili.

I fattori di bioaccumulo evidenziano una maggiore capacità da parte degli organismi prelevati nel sito B di accumulare As sia nelle conchiglie che nei soft tissue. L'analisi di regressione evidenzia una correlazione lineare abbastanza significativa ($R^2 = 0,64$) tra il contenuto di As nelle conchiglie e il contenuto dello stesso elemento nell'epatopancreas.

- *Selenio*

Le concentrazioni rilevate nell'epatopancreas hanno lo stesso andamento di quelle rilevate nei soft tissue ($V > B/A > EF/EC$), ma valori più elevati in particolare nei siti V, EC e EF. Molto inferiori risultano i valori determinati nelle conchiglie che tra l'altro presentano un andamento discordante rispetto a quello dei soft tissue.

Le concentrazioni nei sedimenti seguono l'andamento $A > V > EC > B$ e la maggior quota risulta associata alle fasi poco biodisponibili (GPH4 e GPH5).

- *Stronzio*

I valori determinati nelle conchiglie sono molto più elevati rispetto a quelli che si registrano nei soft tissue e nell'epatopancreas (nell'ordine di $1400 \mu\text{g g}^{-1}$ vs. $30-40 \mu\text{g g}^{-1}$): è noto infatti che questo elemento è uno dei maggiori costituenti della matrice cristallina delle conchiglie dove può sostituire il calcio nel carbonato (confermato dall'elevato valore del coefficiente di Spearman per la relazione tra Sr e Ca sia in EP che in ST).

L'andamento registrato nelle conchiglie è sostanzialmente in accordo con quello che si evidenzia nei sedimenti ($B > EC > V > A$), dove lo Sr è presente principalmente nella fase associata ai carbonati con una percentuale che in tutti i siti si attesta all'80% del totale delle fasi estratte. È interessante notare che i BAF calcolati per il sito B sia rispetto al sedimento totale che alle fasi biodisponibili, presentano il valore più alto per i ST e il valore più basso per le conchiglie, a prova di un accumulo preferenziale nei soft tissue per gli organismi di questo sito.

- *Cadmio*

I valori registrati nei soft tissue sono generalmente più alti di quelli determinati nell'epatopancreas, ma gli andamenti nei due compartimenti sono simili con i siti B, V e A che presentano i valori più elevati. I valori registrati nelle conchiglie sono molto bassi.

L'andamento che si registra nel sedimento è del tipo $A > V > B > EC$; la quota maggiore si trova associata ai carbonati (GPH2) con valori che vanno dal 40% al 60% del totale delle fasi estratte. I BAF per i ST indicano che gli organismi del sito B tendono a bioaccumulare questo elemento più degli altri.

Si registra una correlazione significativa con la concentrazione di Zn sia nell'epatopancreas che nei sedimenti.

- *Bario*

Sia i soft tissue che l'epatopancreas presentano il valore medio di concentrazione più alto nel sito B e quelli più bassi nei siti EC e EF; tra i vari compartimenti di *V. philippinarum* analizzati le concentrazioni più alte si registrano nelle conchiglie, segue l'epatopancreas e infine i soft tissue. Anche nelle conchiglie il sito B presenta il valore più elevato.

Al contrario nei sedimenti si registra un andamento del tipo $A > V > EC > B$, con la percentuale delle fasi biodisponibili (GPH1 + GPH2 + GPH3) che si attesta al 60% del totale delle fasi estratte; tuttavia, mentre nel caso dei siti A, V e EC la quota estratta dalla geospeciazione è del 5-10% rispetto alla concentrazione totale presente nel sedimento, nel caso del sito B questo valore sale a circa il 90% dimostrando che il Ba è molto più disponibile in questo sito (si vedano i BAF per il sedimento totale).

Come indicato precedentemente risulta particolarmente significativa la relazione con il Ga che si registra in tutti i compartimenti analizzati, sia nella vongola che nel sedimento.

- *Piombo*

Si nota un accumulo preferenziale di questo elemento nell'epatopancreas in particolare nei siti V e EC; l'andamento in EP ($V > B > A > EC > EF$) non concorda con quello che si registra nei soft tissue ($B > A > V > EF > EC$). Anche le conchiglie sono particolarmente arricchite di questo elemento con concentrazioni che superano di circa 4 volte quelle che si registrano in St; in questo comparto i siti che mostrano i livelli di concentrazione più alti sono il sito B e il sito A.

L'andamento nei sedimenti è del tipo $V > A > B > EC$ e nel caso dei due siti che presentano le concentrazioni più elevate si può pensare a una contaminazione legata alla vicinanza con l'area industriale di Porto Marghera (Apitz *et al.*, 2007). Il Pb si trova associato preferibilmente alla fase legata ai carbonati (GPH2) e a quella legata agli ossidi di Fe e Mn resistenti all'ossidazione con percentuali rispettivamente del 20% e 60% (tranne nel sito B dove la GPH2 è più alta e la GPH5 più bassa). Una differenza significativa si registra nella quantità di elemento non estratto dalla geospeciazione che nel caso del sito B è sostanzialmente nulla (maggiore biodisponibilità come testimoniato dai BAF), pari al 30% nei siti A e V e del 60% nel sito EC.

Per quanto riguarda le relazioni tra elementi, risulta di una certa significatività il legame tra Pb e V che si evidenzia sia nei soft tissue che nelle conchiglie di *V. philippinarum*.

- *Uranio*

I valori registrati nell'epatopancreas sono molto più alti rispetto a quelli misurati nei soft tissue a testimoniare un accumulo preferenziale in questo comparto; gli andamenti sono diversi tra EP e ST, ma in entrambi i casi il valore di concentrazione più elevato si registra nel sito V e i più bassi nei siti EC e EF. Nelle conchiglie i valori determinati sono molto più bassi e indicano la presenza delle concentrazioni maggiori nei siti EC e EF.

L'andamento delle concentrazioni nei sedimenti ($EC > V > A > B$) appare in sostanziale accordo con quello evidenziato nelle conchiglie, ma non con quello in ST e EP. L'elemento è presente in particolare nella fase legata ai carbonati e alla materia organica (GPH2 e GPH4) con percentuali che oscillano tra il 20-40% e tra il 50-60% rispettivamente. Nonostante il sito B presenti la concentrazione più bassa, è quello dove l'U appare più biodisponibile (la geospecazione estrae il 76% circa del totale presente nel sedimento contro il 40-50% degli altri siti).

Dal riesame dei risultati ottenuti per ciascun elemento emergono alcuni aspetti particolarmente interessanti che si ritiene opportuno mettere in luce.

Per molti elementi (V, Mn, Fe, Co, Ni, Ga, Ba, Pb e U) a valori elevati registrati per il sito B nei soft tissue (spesso i più alti tra tutti i siti) corrispondono contenuti particolarmente bassi nei sedimenti che, tuttavia, risultano maggiormente estraibili mediante la procedura di speciazione geochimica: questa maggiore biodisponibilità compensa la minore concentrazione determinando valori dei fattori di bioaccumulo particolarmente alti nel sito B.

Questo fatto appare in contrasto con il dato sulla granulometria del sedimento nel sito B che, come si è visto in **4.3.3 Sedimento: caratterizzazione**, è molto diversa rispetto a quella degli altri siti, con una percentuale di silt che si attesta al 43%, superando quella della frazione sabbiosa che rimane al 37% (l'unico caso tra quelli osservati in cui la sabbia non è prevalente): la prevalenza della frazione medio-fine è, infatti, generalmente correlata a un contenuto maggiore di elementi in traccia a causa della maggiore area superficiale e capacità di scambio cationico (Zhang *et al.*, 2014).

Tuttavia è possibile che questo impoverimento del sedimento a fronte di un maggiore arricchimento da parte degli organismi Bivalvi sia legato a una maggiore risospensione (Chong & Wang, 2000) causata sia dalle intense attività di raccolta delle vongola filippina effettuate tramite la "rusca" (si ricorda che il punto di campionamento è situato al limitare di una vasta area in concessione al G.R.A.L. attualmente tra le più sfruttate insieme a quelle della laguna sud) sia dal moto ondoso generato dall'elevato traffico di natanti che interessa il vicino canale di Tesserà. Questi fattori potrebbero essere altresì fonte diretta di alcuni inquinanti sospesi o disciolti (Adami *et al.*,

1997; Caliceti *et al.*, 2002) ai quali si deve aggiungere la possibilità di un contributo derivante dai corsi d'acqua che si immettono in laguna nord (Zatta *et al.*, 1992), dai residui delle attività di lavorazione del vetro nella vicina Murano (Giusti & Zhang, 2002), dal particolato sospeso proveniente dall'adiacente zona urbana e dal vicino aeroporto Marco Polo (Stortini *et al.*, 2009).

In particolare, la possibilità da parte degli organismi di bioaccumulare elementi che si rendono accessibili e disponibili dal sedimento determina una sottrazione che sposta l'equilibrio dinamico e favorisce un ulteriore rilascio da parte del comparto sedimentario. Questo aspetto unito alla presenza di input continui derivanti dagli impatti antropici è molto probabilmente il fattore principale nel determinare l'elevato livello di inquinanti che si riscontra nei campioni di *V. philippinarum* prelevati nel sito B.

Tali aspetti mettono in luce come sia necessario considerare altri fattori oltre alla concentrazione nel sedimento totale per comprendere le dinamiche coinvolte nel processo di bioaccumulo; tra questi risulta certamente utile l'indicazione che deriva dalla speciazione geochimica che, pur con i suoi limiti, consente di ottenere un'indicazione rispetto alla biodisponibilità dell'elemento di interesse nel sedimento e di sopperire per una certa quota alla talvolta scarsa capacità dei sedimenti di spiegare i livelli di concentrazione degli elementi bioaccumulati negli organismi bivalvi che, come nota El-Shenawy (2004), sembrano talvolta addirittura essere maggiormente correlati con i metalli nelle acque di superficie piuttosto che con i livelli di metalli nei sedimenti.

Anche nel presente lavoro sembra non evidenziarsi una correlazione diretta tra le concentrazioni determinate nei sedimenti e quelle registrate nei tessuti molli, fatta eccezione per Cu e Zn per i quali l'analisi di regressione mette in luce una buona correlazione lineare tra il contenuto in ST e nel sedimento totale e per K, Co, Ni e Zn per i quali si evidenzia una correlazione lineare significativa tra il contenuto nei soft tissue e quello nelle fasi biodisponibili del sedimento. Si evidenzia tuttavia il persistere anche nell'epatopancreas (il sito deputato al processamento, all'assimilazione o escrezione del materiale ingerito, tra cui le particelle di sedimento risospeso) di relazioni tra elementi evidenziate nei sedimenti in particolare per alcuni elementi (Fe-V, Fe-Mn, Fe-Cr e Zn-Cd) che hanno caratteristiche geochimiche simili.

In alcuni casi l'assenza di relazioni significative tra i due comparti è legata alle particolari condizioni fisico-chimiche che caratterizzano il sito: è il caso, ad esempio, dei campioni prelevati nei siti EC e EF per i quali i bassi valori di concentrazione registrati nei tessuti molli, che sembrano contrastare in molti casi con i valori elevati che si registrano nei sedimenti, sono molto probabilmente determinati dalla maggiore salinità che caratterizza questi siti (Atlante della laguna, 2006), nota per essere in grado di diminuire la concentrazione di cationi liberi (Sacchi *et al.*, 2013) a causa di processi come la cloro-complessazione. E' anche possibile, come suggerito da Weng & Wang (2014), che la co-esposizione a più metalli contemporaneamente possa interferire sul bioaccumulo di un determinato metallo e che quindi mascheri la relazione tra la concentrazione di metallo nell'ambiente e quella nei tessuti del Bivalve.

D'altro canto, è possibile un'influenza dell'età degli organismi sul livello di bioaccumulo degli elementi nei soft tissue: se si considerano i parametri dimensionali e ponderali misurati sulle conchiglie di *V. philippinarum* un

indicatore grezzo dell'età degli organismi, si può dedurre che i campioni provenienti dal sito B sono mediamente più vecchi rispetto agli altri (in particolare rispetto a quelli del sito EC che risultano i più giovani), un ulteriore elemento che potrebbe spiegare, oltre agli altri già elencati, i più elevati livelli di concentrazione che si registrano per molti elementi in questo sito (e i livelli generalmente molto bassi che caratterizzano invece il sito EC).

Il livello di crescita sembra tuttavia non avere alcun peso nel determinare il livello di incorporazione degli stessi elementi nella conchiglia che, in generale, sembra presentare una variabilità più contenuta rispetto a quella dei soft tissue (come già evidenziato da Almeida *et al.*, 1998b) e non registra un livello di correlazione significativo con la grandezza, il peso della conchiglia e l'indice di condizione, a conferma di quanto già evidenziato da Giusti e Zhang (2002) nel caso dei mitili. L'indice di condizione, al contrario, è certamente legato al livello di accumulo di inquinanti all'interno dei tessuti molli delle vongole che, se elevato come nel caso del sito B, determina una minore efficienza del processo di assimilazione, uno sforzo metabolico per la gestione di questi elementi e dunque un maggiore livello di stress.

Nemmeno nel caso delle concentrazioni nelle conchiglie di *V. philippinarum* si evidenzia una relazione con le concentrazioni determinate nei sedimenti; tuttavia in alcuni casi (Al, V, Mn, Fe, As, Ba, Pb) si registra un andamento confrontabile tra i valori nelle conchiglie e quelli nei tessuti molli: la mancanza di relazioni significative tra le matrici analizzate in *V. philippinarum* e il sedimento sembra dimostrare l'esistenza di un controllo biologico preciso nell'assimilazione degli elementi essenziali (come, ad esempio, Mg e K nei tessuti molli e Ca e Sr nelle valve) che ne regola l'assunzione (Reinfelder *et al.*, 1997) e la distribuzione tra i vari comparti sulla base delle esigenze metaboliche e strutturali. Tuttavia, solo per taluni elementi, tendenzialmente quelli che hanno uno scarso ruolo biologico e/o quelli per cui l'organismo non ha sviluppato un efficiente meccanismo di controllo e di eventuale segregazione, avviene una distribuzione proporzionale tra la matrice cristallina e i soft tissue a sua volta probabilmente dipendente dall'efficienza di assunzione dall'ambiente esterno.

Ciò nonostante, come messo in luce dai risultati dell'analisi statistica mediante i metodi di raggruppamento, la composizione elementale delle conchiglie ha una maggiore capacità rispetto a quella dei soft tissue di differenziare i campioni dipendentemente dal sito di provenienza, a tal punto che è possibile riconoscere un mutamento nella composizione a seconda dell'area geografica della laguna da cui provengono i campioni. Questo risultato è molto probabilmente legato al fatto che la composizione elementale dei soft tissue è maggiormente influenzata da alcuni fattori (il tasso di crescita, le condizioni chimico-fisiche, il livello di inquinamento) che tendono a confondere "l'impronta" data dal sito di provenienza: in particolare le variabili ambientali che controllano le attività biochimiche, metaboliche o fisiologiche possono agire come fattori confondenti che alterano la risposta dell'organismo all'inquinamento (Moriarty, 1988).

Anche se le conchiglie di *V. philippinarum* risultano meno arricchite rispetto ai soft tissue di tutti gli elementi analizzati ad eccezione di Ca, Sr e Pb, in accordo con i risultati reperibili in letteratura (si vedano Fuge *et al.*, 1993 e Giusti & Zhang, 2002 a titolo di esempio) e non presentino una correlazione significativa con la composizione del sedimento, presentano una composizione diversificata a seconda delle condizioni ambientali tipiche a cui

sono esposte e dunque possono essere considerate un indicatore affidabile del sito di provenienza dell'organismo.

5. PARTE TERZA

SCARTO DA VENERICOLTURA

5.1 ASPETTI INTRODUTTIVI

5.1.1 Scarto da venericoltura

Lo scarto da venericoltura, talvolta indicato con il termine *capulerio*, è costituito dall'insieme del materiale di risulta non commercializzabile derivante dalla fase di vagliatura che segue la raccolta della vongola filippina (*V. philippinarum*); esso si compone principalmente di conchiglie vuote di Molluschi Bivalvi e Gasteropodi, bioclasti e in piccola parte di organismi vivi non di interesse (**Figura 120**).



Figura 120: Scarto derivante dalla produzione di Molluschi nel bacino Sud della laguna di Venezia: il materiale è lavato e suddiviso meccanicamente per classi di dimensione direttamente a bordo – foto G. Cipolato.

Da un'analisi qualitativa preliminare svolta immediatamente dopo il campionamento sul materiale di scarto prelevato nei diversi siti posti all'interno o nelle vicinanze delle aree adibite a venericoltura/pesca gestita in laguna di Venezia, è stata riscontrata una certa variabilità specifica; risultano ad ogni modo predominanti in biomassa le conchiglie vuote di specie tipiche delle zoocenosi bentiche lagunari quali *Venerupis philippinarum* (vongola verace), *Cerastoderma glaucum* (*capa tonda*), *Crassostrea gigas* (ostrica portoghese), *Hexaplex trunculus* (murice) e in alcune zone *Musculista senhousia* (mitilo alloctono che cresce su fondali sabbioso/fangosi). In piccola parte è stata riscontrata una quantità di materiale vegetale sia legnoso che algale, quantità che sono da ritenersi presumibilmente soggette a variazioni stagionali.

In generale la quantità disponibile di scarto è da considerarsi in rapporto variabile col commercializzato a seconda della stagione e del luogo. Sulla base del giudizio esperto degli operatori che hanno collaborato alle fasi di campionamento e delle osservazioni in campo si può ragionevolmente indicare un dato medio di produzione di scarto in rapporto 1:1 con il volume del commercializzato nelle aree più produttive che può arrivare fino a un rapporto 2:1 nelle aree immediatamente esterne alle concessioni (ad esempio nel sito EF).

Questa differenza è legata al fatto che l'attuale destino dello scarto consiste nel venire rigettato in laguna al termine delle operazioni di cernita, pur con modalità leggermente differenti a seconda dell'area di raccolta della vongola:

- nei siti in cui i pescatori utilizzano la rusca trainata da imbarcazioni di piccole/medie dimensioni e sistemi di vagliatura a mano con setacci di diverso tipo (si veda **5.2.1 Campionamento**), lo scarto viene rigettato in acqua tal quale (sporco di sedimento) nel luogo di raccolta;
- nelle aree in concessione in cui operano grandi imbarcazioni e attrezzi a grande efficienza (draghe vibranti) il materiale, che subisce un'azione di pulizia sommaria durante le operazioni di vagliatura meccanizzata a bordo, è invece trattenuto nell'imbarcazione e gettato in acqua all'esterno dell'appezzamento di allevamento con un effetto di costante pulizia del fondale all'interno dell'area di pesca e un accumulo di materiale nel perimetro esterno.

Il G.R.A.L., l'Ente gestore delle risorse alieutiche lagunari, ha sottolineato negli ultimi tempi la necessità di gestire il materiale conchigliifero che si accumula in alcune zone all'interno delle aree in concessione per la venericoltura e che rappresenta una percentuale importante dei volumi raccolti con i metodi di pesca comunemente utilizzati in laguna, determinando una diminuzione dell'efficienza di pesca.

La persistenza sulla superficie dei sedimenti lagunari di questo materiale, la cui degradazione in tali condizioni può richiedere anche milioni di anni, determina un mutamento dell'aspetto del fondale e offre un substrato duro su cui possono aderire organismi sessili troficamente in competizione con *V. philippinarum* e fonte di impedimento per le condizioni colturali; l'abbondante presenza di gusci di conchiglie, inoltre, disturba o addirittura può impedire ai giovani esemplari di vongole seminate di penetrare nel sedimento (G.R.A.L., 2013).

L'emergere di questa problematica ha contribuito alla decisione di includere nel presente lavoro di ricerca l'approfondimento delle caratteristiche del materiale di scarto da venericoltura e la valutazione di possibili strategie di utilizzo sulla base degli studi reperibili in letteratura e delle conoscenze maturate all'interno di questo percorso di studio sulle conchiglie dei Bivalvi. Tale settore di ricerca è stato valutato positivamente anche dalla Regione del Veneto che ha ritenuto opportuno concedere un assegno di ricerca nell'ambito dei finanziamenti del Fondo Sociale Europeo (FSE).

Il materiale costituito dalle conchiglie di scarto provenienti sia dalle attività di raccolta di Molluschi che dal consumo umano ha attirato negli ultimi anni l'attenzione della comunità scientifica che ne ha individuato il possibile impiego come materia prima secondaria nell'ottica di riduzione degli impatti derivanti dal suo accumulo e smaltimento. Tra le alternative proposte si ritiene interessante elencarne alcune che sembrano riscontrare particolare successo.

- *Utilizzo delle conchiglie di scarto per il trattamento di acque di scarico*

Liu *et al.*, 2009 verificano la possibilità di utilizzare conchiglie di Bivalvi polverizzate per rimuovere metalli da soluzioni acquose: in particolare utilizzano la polvere grezza e la polvere trattata con acido sia su soluzioni acquose preparate in laboratorio che su acque di scarico inquinate da metalli. In entrambi i casi osservano una buona capacità di rimozione, anche se con le acque di scarico le efficienze di rimozione sono più basse a causa delle interferenze tra i diversi ioni presenti.

Osservano, inoltre, che il pretrattamento con acido (H_2SO_4) aumenta la capacità di rimozione grazie al fatto che esso tende a sfaldare la superficie carbonatica e conseguentemente a rendere più esposti un maggior numero di gruppi funzionali che possono legare ioni metallici e ad aumentare la capacità del materiale di rilasciare ioni Ca^{2+} che possono essere evidentemente sostituiti da altri ioni metallici attraverso processi di scambio ionico.

Poiché il materiale dimostra di non essere sensibile alla temperatura, di poter lavorare in un ampio range di pH e di poter essere riutilizzato per almeno 12 cicli di assorbimento-deassorbimento, i ricercatori affermano che si può ritenere adatto per la rimozione di metalli da acque inquinate.

Lo studio di El Haddad *et al.* (2014), invece, si concentra sulla possibilità di utilizzare le conchiglie di molluschi dopo calcinazione (2 ore a $900\text{ }^\circ\text{C}$) per l'assorbimento di coloranti dalla soluzione acquosa. Conducono un test in batch utilizzando come sostanze di prova Rhodamine B, Alizarin Red S e Orange II. Sulla base dei parametri cinetici e termodinamici analizzati dimostrano una buona capacità assorbente, in particolare per Rhodamine B, e ne consigliano l'utilizzo per la rimozione dei coloranti trattandosi di un assorbente biologico e *eco-friendly*. Studi sulla capacità delle conchiglie di mitili sia grezze che dopo calcinazione di rimuovere inquinanti (in particolare mercurio) sono riportati anche da Peña-Rodriguez *et al.*, 2013.

Tudor *et al.*, 2006 valutano la capacità di esoscheletri di Molluschi e Crostacei di estrarre ioni metallici dalle soluzioni acquose rispetto ad altri tipi di materiali; i materiali di origine biologica, quando frantumati ed esposti a soluzioni contenenti ioni metallici, dimostrano un'eccezionale capacità di estrarre ioni metallici dalla soluzione: in particolare la loro capacità di sequestrare i metalli nella prima ora di esposizione risulta di 4 ordini di grandezza superiore a quella dei materiali geologici o organici.

Nonostante le somiglianze chimiche e morfologiche, le conchiglie di vongola (*Mercenaria mercenaria*) e di ostrica (*Crassostrea virginica*), che costituiscono i materiali biologici testati, mostrano delle differenze sostanziali nella loro capacità di uptake dei metalli a seconda del tipo di ione, della sua concentrazione iniziale e del tempo di contatto. In ogni caso questi esoscheletri si dimostrano in definitiva molto più efficaci del materiale calcareo geologico o del chitosano nell'estrarre Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{1+} , Au^{3+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} dimostrando efficienze comparabili sia nell'estrazione di un unico metallo che nell'estrazione contemporanea di più metalli e una maggiore compattezza dopo l'assorbimento.

Un lavoro analogo è quello di Du *et al.*, 2011 che si pongono l'obiettivo di esplorare il potenziale di utilizzo della polvere delle conchiglie dei molluschi nelle fasi sia aragonitiche che calcitiche per rimuovere metalli divalenti quali Pb, Cd e Zn dalla soluzione acquosa. In particolare questi 3 metalli sono stati selezionati considerando la loro vasta presenza nelle acque di fiume superficiali e nelle acque di scarico, le loro diverse dimensioni ioniche rispetto al Ca^{2+} e la presenza di loro precipitati metallo-carbonato in diverse strutture cristalline. Lo studio dimostra che calcite e aragonite biogeniche derivate dalla polvere delle conchiglie

possono effettivamente rimuovere Pb, Cd e Zn dalle soluzioni acquose (ad eccezione del Cd sulla polvere delle conchiglie delle ostriche).

Tuttavia le cinetiche di assorbimento (che qui viene inteso come l'insieme di tutti i processi che intervengono nel trasferimento di uno ione dalla fase acquosa a quella solida, incluso l'assorbimento superficiale, il complessamento, la precipitazione superficiale e lo scambio ionico) del metallo sull'assorbente biogenico mostrano una fase iniziale di assorbimento rapido seguita da un processo lento di parziale equilibrio, che si raggiunge quando il solido inizialmente reattivo si isola dalla soluzione acquosa da uno strato di solidi secondari. I ricercatori legano l'iniziale elevato tasso di assorbimento dei metalli alla presenza di ampi siti attivi dell'assorbente disponibili per l'assorbimento; con la copertura data dagli ioni metallici assorbiti e precipitati sulla superficie della polvere di conchiglie, i siti disponibili e il carbonato a disposizione diminuiscono e così rallenta l'assorbimento.

- *Utilizzo di conchiglie di scarto come supporto per la crescita di comunità batteriche*

Negli ultimi anni una sempre maggiore quantità di studi si sta concentrando sulla possibilità di utilizzare batteri, funghi e alghe come biosorbenti per la rimozione di inquinanti dalle acque (si veda Wang & Cheng, 2009 per un'approfondita review); in questo quadro la possibilità di immobilizzare i microrganismi su supporti rigidi può migliorare le caratteristiche del prodotto in termini di resistenza meccanica e porosità, aumentando la commerciabilità del prodotto. In quest'ottica si stanno conducendo molti esperimenti testando diverse tipologie di supporti: tra questi silice (Vijayaraghavan & Yun, 2008), idrossiapatite (Piccirillo *et al.*, 2013), letti di alginato di calcio (Kacar *et al.*, 2002).

Luo *et al.* (2013), invece, rilevano come le conchiglie di ostriche, a strati e ricche di inclusioni, cavità e impurità, possono essere utilizzate come riempitivo attivo di una vasca di ossigenazione (bio-contact oxidation tank) per il trattamento di acque provenienti da una zona di estuario variamente inquinata e a salinità variabile.

Gli autori rilevano come i biofilm adesi alle conchiglie di ostrica, nelle condizioni di ossigenazione della vasca, svolgono un ruolo chiave nella degradazione dei contaminanti presenti nelle acque. In particolare la rimozione di COD si attesta a 80%, il BOD a 85%, l'azoto ammoniacale a 86,5%, il fosforo totale 50,5%; quella dei solidi sospesi totali raggiunge il 96%. Il processo di rimozione può essere suddiviso in due fasi: la prima vede l'adesione degli inquinanti sulla superficie delle conchiglie e la seconda la degradazione, l'assorbimento e la metabolizzazione di queste sostanze da parte della comunità microbica componente il biofilm.

Questo processo risulta favorito dalla composizione della conchiglia che dimostra una elevata capacità di assorbimento e di supporto per la formazione di un film gelatinoso da parte dei microbi e dal fatto che, trattandosi di un rifiuto proveniente dal mare, le comunità adese sono adattate anche a elevati livelli di salinità. Altri vantaggi sono legati al fatto che il materiale non si corrode, è poco costoso e duraturo, carico

idraulico elevato e bassa area necessaria, facile gestione, valori dei parametri misurati nell'acqua in uscita stabili.

- *Utilizzo di conchiglie di scarto come catalizzatori per la produzione di biodiesel:*

Il biodiesel consiste in esteri alchilici di acidi grassi disposti in catene lunghe lineari che sono ottenute attraverso la reazione di transesterificazione di oli vegetali e grassi animali con un alcol in presenza di un catalizzatore adatto (nello specifico essa consiste in una reazione tra trigliceridi e alcool in presenza di un catalizzatore per formare esteri e glicerolo). I catalizzatori utilizzati si dividono in omogenei e eterogenei; questi ultimi sono stati sviluppati in quanto meno sensibili alla presenza di acidi grassi liberi e acqua e per il fatto di essere facilmente separabili dal miscuglio di reazione per essere rigenerati e riutilizzati (Rezaei *et al.*, 2013; Niju *et al.*, 2014).

L'ossido di calcio (CaO) è uno dei catalizzatori di base eterogenei più promettenti che presenta molti vantaggi tra cui il basso costo, la facile reperibilità e capacità di riutilizzo; tra le risorse naturali che possono essere utilizzate per ricavarlo vi sono gusci d'uovo e conchiglie di molluschi: per questa ragione esso può risultare un catalizzatore poco costoso e *environment-friendly*. Negli ultimi anni sono molti infatti gli studi che si concentrano sulla possibilità di impiegare le conchiglie di scarto come catalizzatori per la produzione di biodiesel (si veda la review di Boro *et al.*, 2012 e Hu *et al.*, 2011; Viriya-Empikul *et al.*, 2010).

In particolare Niju *et al.* (2014) presentano la possibilità di incrementare l'attività catalitica di conchiglie di vongole bianche attraverso un trattamento di calcinazione-idratazione-calcinazione, un processo che genera un CaO altamente reattivo con un'area superficiale maggiore e un potere basico maggiore rispetto all'ossido di calcio ottenuto mediante altri processi.

- *Altre possibilità di utilizzo*

Li *et al.* (2014) propongono di utilizzare conchiglie di mitili di scarto dopo calcinazione come reattivo di supporto per l'argento per la formazione di materiali con attività anti batterica.

Asha *et al.* (2014), inoltre, riportano che sulle coste dell'India le ostriche sono pescate primariamente per il loro utilizzo nell'industria delle costruzioni per la produzione di cemento, di carburo di calcio, di mattoni di sabbia e limo e per il limo stesso: può sembrare strano, ma lo studio si propone proprio di promuovere il consumo della parte edibile dell'ostrica dato che in queste zone il mollusco è gettato via e viene utilizzata solo la conchiglia.

5.1.2 Proposta di utilizzo

I risultati ottenuti nella prima fase di lavoro e le conoscenze acquisite mediante l'analisi bibliografica, unite alla consapevolezza riguardo la problematica gestione del volume di conchiglie che costituiscono materiale di scarto delle prime fasi di lavorazione dei Bivalvi, in particolare *Venerupis philippinarum*, raccolti nella laguna di Venezia, hanno portato all'individuazione di una possibile strategia di intervento che coniughi le esigenze del

territorio in termini di sostenibilità e compatibilità ambientale con la necessità di risolvere efficacemente la questione relativa allo smaltimento di questa tipologia di materiale.

In particolare ci si è posti come obiettivo di valutare la capacità dello scarto da venericoltura di fungere da riempitivo, in sostituzione totale o parziale del materiale attualmente utilizzato, per manufatti come le burghe e le barriere soffolte da utilizzare per la protezione e il consolidamento idraulico delle rive e dei bassi fondali nell'area della laguna di Venezia. Tali strutture, costituite nella maggior parte dei casi da sacchi di rete plastica o da geosintetico riempiti con materiale inerte, sono impiegate come opere di difesa dei bordi delle barene e delle isole per contrastare o ridurre la sollecitazione del moto ondoso (**Figura 121**) o come strutture sommerse atte a smorzare la forza delle onde, poste al largo per favorire la deposizione del sedimento e mitigare l'azione erosiva sulla costa.

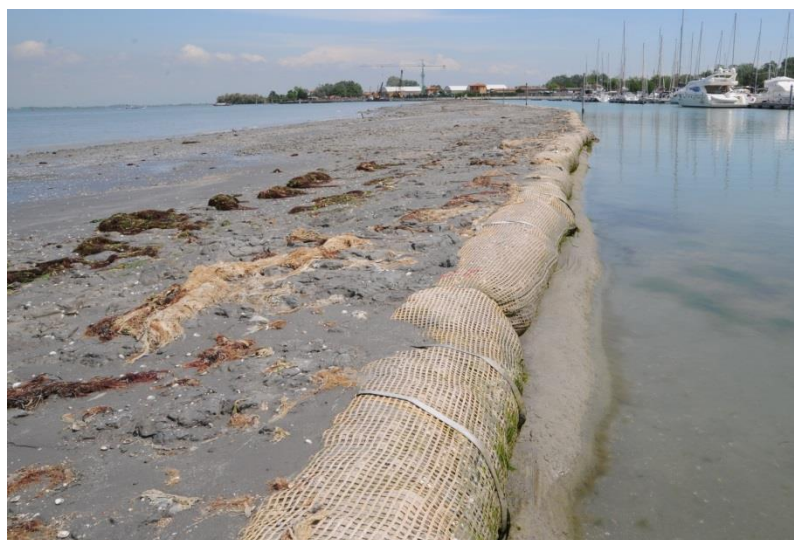


Figura 121: Burghe poste a difesa della barena artificiale che delimita la darsena presso l'isola della Certosa (Venezia) – *foto G. Cipolato.*

Questa tipologia di soluzioni si può presentare con diverse unità di contenimento che si differenziano per geometria, volume e metodi di riempimento e si possono suddividere sostanzialmente in contenitori cilindrici, sacchi o tappeti (Aminti & Cappuccini, 2012); in generale si possono considerare una buona alternativa a alle strutture tradizionali in termini di riduzione dei costi, reversibilità e impatto ambientale (Fantini & Simini, 2008).

I vantaggi dei geosintetici tubolari rispetto ai metodi tradizionali utilizzati in ambiente marino (roccia, elementi prefabbricati in calcestruzzo *etc.*) sono notevoli e tra questi vi sono la riduzione delle lavorazioni necessarie all'esecuzione dell'opera, dei tempi di esecuzione e del costo oltre che la possibilità di utilizzo di materiali già presenti nel sito (Fantini & Simini, 2008). Nel contesto lagunare le burghe sono considerate strutture che consentono una migliore dissipazione dell'energia delle onde rispetto alle palizzate in legno comunemente utilizzate; esse, inoltre, presentano una maggiore durata e un costo minore, possono essere rimosse facilmente (se necessario) e si integrano in poco tempo nel paesaggio lagunare grazie alla colonizzazione da parte di alghe e vari organismi (Fletcher & Spencer, 2005).

Secondo Pilarczyk (2000) la diffusione di geosintetici come elementi filtro nelle costruzioni marittime e in opere di fondazione in presenza di acqua ha evidenziato la loro stabilità chimica e la loro resistenza alla maggior parte delle aggressioni nell'ambiente marino. Tuttavia in Italia le opere di difesa costiera realizzate in geosintetici non sono attualmente molto diffuse, nonostante i primi interventi di questo tipo risalgano tra la fine degli anni Ottanta e i primi anni Novanta (Aminti & Cappuccini, 2012); per questo motivo, in questo Paese, solo recentemente si è cominciato a raccogliere informazioni sulla durabilità di opere marittime costruite con contenitori di geosintetico esposte al moto ondoso (Aminti & Cappuccini, 2012).

Esiste una varietà di geosintetici esistenti (geotessuti, geogriglie, geomembrane etc.) che possono essere utilizzati per il confezionamento: in particolare i geotessili, che possono essere tessuti o non tessuti ed eventualmente accoppiati a altri geosintetici a formare i cosiddetti *geocompositi*, sono particolarmente utili nel fungere da filtro, consentendo il passaggio dell'acqua e trattenendo le particelle più fini (Aminti & Mori, 2008), e da substrato per la crescita della flora marina (Fantini & Simini, 2008).

Come riportato da Koerner (2005) i polimeri adoperati nella manifattura delle fibre dei geotessili elencati in ordine decrescente di utilizzo sono il polipropilene (PP), il poliestere (PET) il polietilene (PE) e la poliammide (nylon, PA), dove la scelta è certamente legata sia alle caratteristiche meccaniche (in particolare si considera la resistenza alla trazione) sia alla stabilità chimica del materiale. Tale scelta concorre al rispetto dei requisiti per la durabilità e la stabilità complessiva del manufatto: resistenza ai raggi UV, resistenza all'abrasione, resistenza al danneggiamento, ritenzione di materiali fini, permeabilità all'acqua, resistenza delle cuciture (Aminti & Mori, 2008).

Un'esperienza riguardante l'utilizzo di Molluschi Bivalvi nel confezionamento di manufatti per opere di protezione ambientale in laguna di Venezia è stata condotta recentemente dal Magistrato alle Acque come riportato nello Studio C.1.7 del 2012 concernente il "Progetto di creazione di aree a molluschicoltura a scopo commerciale e di vivaio per gli interventi morfologici con tecniche di ingegneria naturalistica a elevato valore ambientale in laguna di Venezia" (Magistrato alle Acque di Venezia, 2012). In tale progetto è stata valutata la possibilità di utilizzare strutture "biostabilizzanti" sul fondale lagunare quali opere per la protezione idro-morfologica in prossimità dell'isola di S. Giacomo in Paludo: i manufatti utilizzati comprendevano diverse tipologie, tra le quali strutture cilindriche confezionate con reste di mitili vivi e sacchi di rete riempiti di gusci vuoti di Molluschi Bivalvi e Gasteropodi (tutto il materiale biologico utilizzato era derivante dalla pesca e dall'acquacoltura off-shore).

I risultati dello studio provano l'efficacia di queste barriere nell'azione di smorzamento del moto ondoso e quindi di protezione dall'erosione dei delicati sistemi morfologici retrostanti a velme e barene, dimostrando inoltre la capacità di queste strutture di essere in breve tempo colonizzate dalle biocenosi tipiche dei substrati duri, comunità composte da popolamenti micro e macroalgali e organismi animali sessili quali Poriferi (spugne), Cnidari Antozoi (anemoni), Briozoi incrostanti, ascidie e mitili. L'ecosistema che si viene a formare su queste superfici presenta un'elevata valenza ecologica in quanto è in grado di offrire riparo e nutrimento a numerose specie acquatiche superiori (Pesci, Crostacei).

Sulla base di queste informazioni si propone dunque di testare l'utilizzo dello scarto da venericoltura per il riempimento di sacchi di materiale geosintetico da utilizzare per la protezione e il consolidamento delle aree a barena e la mitigazione dell'azione del moto ondoso in laguna di Venezia, consentendo altresì di sfruttare una risorsa già presente nell'area diminuendo contestualmente la quota di scarto depositata nelle zone destinate a venericoltura e favorendo la pulizia del fondale quale azione utile al proseguimento delle attività colturali. Nel quadro delle attività destinate alla tutela della morfologia lagunare e in particolare al rallentamento dei processi erosivi e all'avvio di processi di sedimentazione sui bassi fondali, è possibile immaginare un'ampia prospettiva di trasferimento di questa nuova tecnologia all'intera area lagunare.

5.1.3 Piano sperimentale

Con l'obiettivo di studiare le potenzialità di utilizzo del materiale di risulta della raccolta di Molluschi Bivalvi (in particolare della vongola filippina) in laguna di Venezia, quale materiale da utilizzare come riempitivo per il confezionamento di manufatti destinati alla protezione idromorfologica della laguna in sostituzione dei materiali solitamente utilizzati (pietrame di diversa origine e/o limi concrezionati), è stato messo a punto un piano sperimentale incentrato sulla definizione delle caratteristiche dello scarto e sulla verifica della sua stabilità chimica e fisica (**Figura 123**).

In particolare, con la finalità di chiarire le caratteristiche dello scarto da venericoltura prelevato nei diversi siti della laguna di Venezia, è stato ritenuto opportuno procedere, in primo luogo, ad un'analisi qualitativa per la descrizione della composizione in termini di gruppi tassonomici principali; in seguito si è proceduto all'analisi elementare di campioni rappresentativi della composizione media per evidenziare il contenuto in termini di elementi costitutivi anche in riferimento alle analisi eseguite su campioni di valve di *V. philippinarum* e sedimenti prelevati nei medesimi siti.

La verifica della stabilità chimica e fisica del materiale è stata condotta attraverso l'esecuzione di:

- un test di cessione, secondo le disposizioni della normativa riguardante il conferimento di rifiuti in discariche per inerti, in modo tale da confermare che lo scarto da venericoltura può essere considerato un materiale che dura nel tempo e non modifica le sue caratteristiche compositive;
- una batteria di test ecotossicologici orientati alla verifica della non tossicità del materiale nei confronti di organismi target rappresentativi della biocenosi lagunare e appartenenti a diversi livelli funzionali, eseguiti su una matrice adatta a prevedere gli effetti della possibile futura applicazione del materiale (lisciviato);
- la messa in posa di un manufatto sperimentale costituito da una burga riempita con materiale di scarto da venericoltura e il suo monitoraggio nel tempo al fine di valutarne la competitività tecnica nei confronti di manufatti analoghi composti con materiali differenti e la capacità di favorire processi di colonizzazione biologica.

Si vuole sottolineare in questa sede come i test ecotossicologici siano stati eseguiti sia sui campioni derivanti dall'elutriazione dello scarto da venericoltura sia su un campione di geocomposito: in particolare è stato

utilizzato un campione di geotessile non tessuto, agugliato su una georete di materiale plastico (**Figura 122**). Non si hanno ulteriori specifiche riguardo questo materiale a causa della mancanza della scheda tecnica allegata e del nome della ditta produttrice che non è stato possibile ottenere nonostante le numerose richieste dalla ditta che ha fornito il campione.



Figura 122: Campione di geocomposito analogo a quello utilizzato per i test ecotossicologici e per il confezionamento del prototipo di bio-burga.

Tuttavia è noto che questo materiale è dello stesso tipo di quello comunemente utilizzato in laguna di Venezia per il confezionamento dei sacchi che, riempiti con materiale di vario genere, costituiscono le burghe. La scelta di coinvolgere nel test anche questa matrice è stata fatta unicamente per fugare ogni dubbio circa un possibile contributo di questo materiale alla tossicità complessiva del manufatto sperimentale: purtroppo i risultati ottenuti hanno confermato la presenza di un effetto tossico mettendo in luce la necessità di approfondire questo aspetto e provvedere eventualmente all'individuazione di un'alternativa meno impattante.

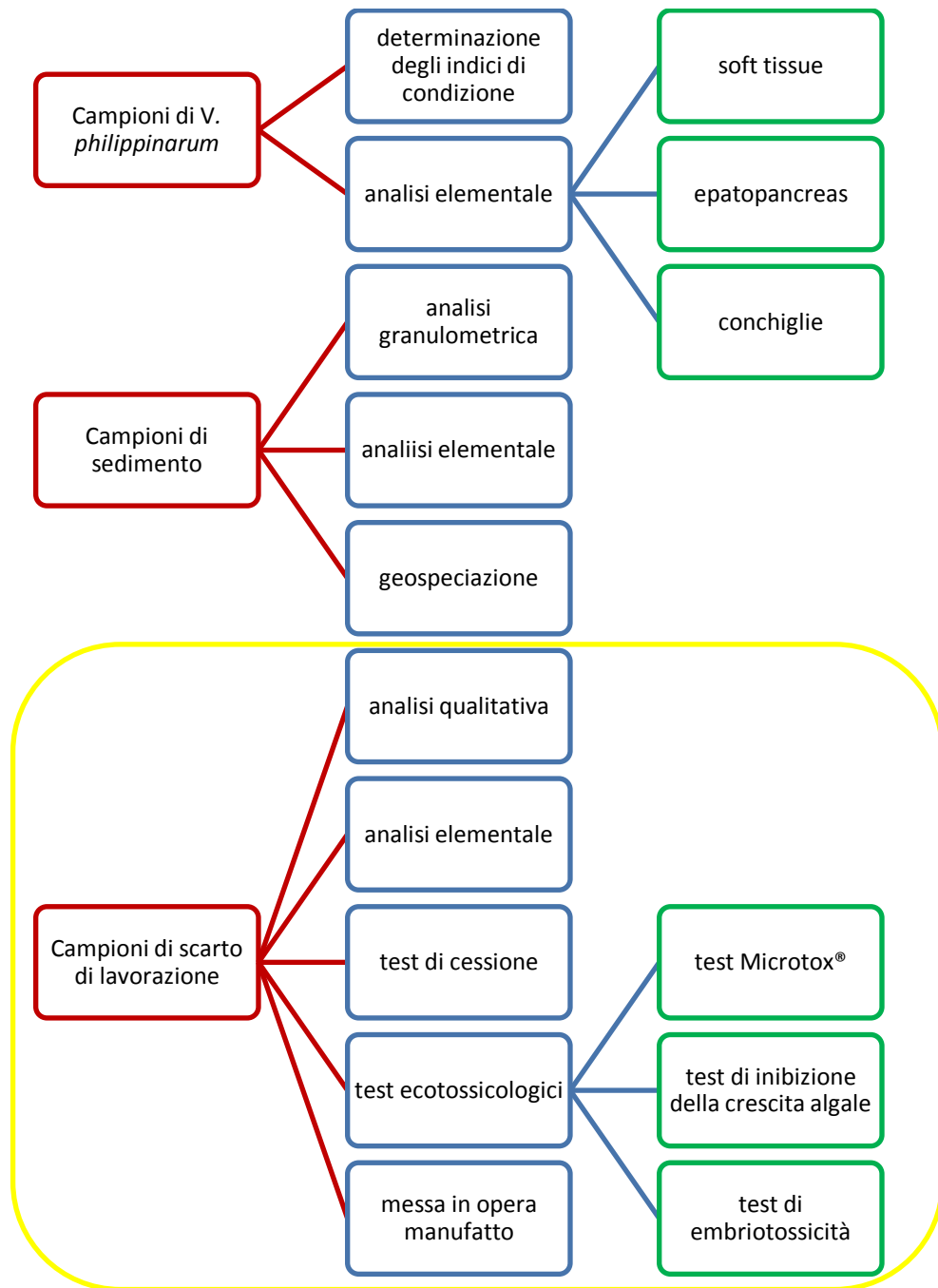


Figura 123: Schema della procedura sperimentale; cerchiare in giallo le fasi prese in esame in questo capitolo (Parte terza).

Si vuole sottolineare in questa sede come la definizione del progetto di lavoro ha richiesto l'instaurarsi di una proficua e utile collaborazione con Enti e Società, quali

- G.R.A.L. – Gestione Risorse Alieutiche Lagunari – Ente consortile pubblico che si pone come obiettivo di favorire lo sviluppo delle economie locali legate alla pesca in un quadro di piena compatibilità ambientale e di qualità per i consumatori.

- Magistrato alle Acque di Venezia – istituto periferico del Ministero delle Infrastrutture e dei Trasporti, si occupa della gestione, della sicurezza e della tutela idraulica nelle lagune di Venezia, Marano e Grado e, in alcune tratte, dei fiumi Tagliamento, Livenza e del torrente Judrio.
- Nuova Co.Ed.Mar. – azienda di primaria importanza nell'ambito delle costruzioni marittime, dragaggi e nelle opere di intervento di bonifica dei canali in Venezia e di quelle opere complementari collegate al riordino dei sotto-servizi; operando con mezzi navali di proprietà, idonei alla navigazione nazionale ed internazionale e con natanti di minori dimensioni adibiti alle lavorazioni in acque interne (lagunari e fluviali).
- Vento di Venezia S.r.l. – società che si pone come obiettivo di progettare, realizzare e gestire strutture e servizi per la nautica da diporto nella laguna di Venezia, nonché utilizzare le attività economiche legate alla nautica quale strumento per la riqualificazione fisica e socio-economica di aree degradate del territorio. Nel 2005 ha avviato il Polo Nautico Vento di Venezia, centro servizi per la nautica insediato presso l'isola della Certosa, in forza di una convenzione con il Comune di Venezia.
- Veritas S.p.A. – Veneziana Energia Risorse Idriche Territorio Ambiente Servizi – una società a capitale interamente pubblico di proprietà di 25 Comuni dell'area provinciale veneziana e 5 dell'area trevigiana che serve un totale di oltre 760'000 abitanti; si occupa del servizio idrico integrato, di energia, di igiene ambientale e di servizi urbani collettivi e in generale si fa carico della gestione ambientale anche attraverso lo svolgimento di attività specifiche legate alla tipicità del territorio lagunare veneziano.

5.1.4 Scelta della batteria di test ecotossicologici

Come evidenziato nello schema della procedura sperimentale di **Figura 123**, è stato ritenuto opportuno verificare la non tossicità dello scarto da venericoltura nei confronti di organismi target rappresentativi della biocenosi lagunare e appartenenti a diversi livelli funzionali attraverso l'esecuzione di una batteria di test ecotossicologici sull'elutriato derivante da questo materiale.

La scelta dei saggi ecotossicologici è stata effettuata valutando le caratteristiche proprie dei singoli test e dei singoli organismi utilizzati; inoltre sono stati considerati i parametri consigliati dall'*Istituto superiore per la protezione e la ricerca ambientale* (ISPRA) nel manuale "Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre" (Baudo *et al.*, 2011). La batteria individuata comprende:

- il saggio acuto Microtox® sull'inibizione della bioluminescenza in *Vibrio fischeri* (Beijerinck, 1889);
- il test cronico di inibizione della crescita algale con *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897);
- il test subcronico di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819).

Sulla base di quanto indicato da ISPRA, si è proceduto alla valutazione della valenza ecologica e della praticabilità - applicabilità della batteria di saggi biologici scelta, sulla base dei criteri proposti dallo stesso manuale; in particolare si è tenuto conto dei fattori numerici di ponderazione e dei punteggi assegnati da ISPRA

per i test considerati al fine di procedere al calcolo della *rilevanza ecologica* della specifica batteria di endpoint (REC_{batt}) e della *rilevanza pratica* (RP_{batt}) che combinate insieme permettono di ottenere una valutazione “scientifico-pratica” della batteria utilizzata (Baudo *et al.*, 2011). I valori assegnati ai singoli parametri e riportati di seguito corrispondono ai valori indicati nel manuale stesso (e specificatamente in “Capitolo 2: Criteri di giudizio per la valutazione della valenza ecologica e pratica di batterie di saggi biologici” e in “Capitolo 3: Identificazione degli organismi e degli endpoint”) per i singoli test e per le specifiche condizioni di applicazione (test su elutriati).

Per quanto riguarda la valenza scientifica dei singoli test sono stati considerati i seguenti fattori di ponderazione a cui sono stati assegnati i punteggi indicati in **Tabella 5**:

- standardizzazione dell’endpoint (**Sep**);
- rappresentatività della specie nell’area di studio (**RSeco**);
- distribuzione geografica della specie test (**DG**);
- rappresentatività dello stadio vitale impiegato nella matrice (**RSVM**);
- rilevanza e sensibilità dell’effetto (**RES**).

Tabella 5: Valori dei fattori di ponderazione considerati per la valutazione della valenza scientifica dei test ecotossicologici scelti.

test	Sep	RSeco	DG	RSVM	RES
Microtox®	3	4	2	4	1,5
Test di inibizione della crescita algale con <i>P. tricorutum</i>	2	4	2	4	2
Test di embriotossicità con <i>M. galloprovincialis</i>	2	4	3	4	2

Per valutare la valenza scientifica dell’intera batteria sono stati considerati i seguenti fattori di ponderazione:

- rappresentatività della matrice rispetto all’applicazione (**RMappI**): considerato come obiettivo del saggio la valutazione degli “effetti nel sito di deposizione in mare” (e3 nella tabella 2.1 del Manuale ISPRA) che prevede l’utilizzo di elutriati, il valore del parametro è stato valutato pari a 6;
- rilevanza della batteria rispetto alle specie (**RBs**): con 3 specie di cui almeno una con effetti diversi da mortalità o immobilità il fattore assume valore pari a 1,25;

- rilevanza della batteria rispetto al livello funzionale (**RBt**): con 3 livelli funzionali il parametro assume valore 3.

A questo punto è stato possibile procedere al calcolo della *Valenza Ecologica Totale della batteria* (**VET_{batt}**)

$$VET_{batt} = (RBS + RBt) \sum (Sep + RSeco + DG + RSVM + RMappl + RES)_{endpoint}$$

che in questo caso risulta pari a 261,375; considerato che il valore massimo ottenibile (**VET_{max}**) per 3 endpoint è 331,5, la *Rilevanza ecologica della specifica batteria di endpoint* (**REC_{batt}**) diventa

$$REC_{batt} = \frac{VET_{batt}}{VET_{max}} = 78,85\%$$

che può essere considerato un valore buono visto che il valore minimo ammissibile è pari a 53,21%.

Analogamente, per valutare la valenza pratica dei singoli test sono stati considerati i seguenti fattori di ponderazione i cui valori assegnati sono riportati in **Tabella 6**:

- reperibilità degli organismi (**RO**);
- standardizzazione del protocollo metodologico (**SP**);
- effetto dell'endpoint sulla scala di rischio (**ER**);
- fattibilità (**FS**);
- economicità (**IS**).

Tabella 6: Valori dei fattori di ponderazione considerati per la valutazione della valenza pratica dei test ecotossicologici scelti.

test	RO	SP	ER	FS	IS
Microtox®	5	4	4,5	3	5
Test di inibizione della crescita algale con <i>P. tricornutum</i>	5	1	4	2	3
Test di embriotossicità con <i>M. galloprovincialis</i>	3	2	3	2	3

Inoltre è stato considerato il fattore relativo alla preparazione della matrice (**PM**) che è risultato pari a 6 considerando che si tratta di un elutriato.

Si è proceduto quindi al calcolo della *Valenza totale della batteria* (**VT_{batt}**) secondo la formula

$$VT_{batt} = \sum (RO + SP + ER + PM + FB + IB)_{endpoint}$$

ottenendo un valore pari a 55,5 che, rapportato al valore massimo ottenibile per 3 endpoint ($VT_{max} = 84$), determina un valore di *Rilevanza pratica della batteria* (RP_{batt}) pari a

$$RP_{batt} = \frac{VT_{batt}}{VT_{max}} = 66,07\%$$

La media dei valori ottenuti di REC_{batt} e RP_{batt} (72,46%) dà un'idea della valenza scientifico – pratica della batteria di saggi ecotossicologici: in questo caso si tratta di un valore buono che conforta la scelta operata e assicura la validità dei risultati ottenuti.

5.2 MATERIALI E METODI

5.2.1 Campionamento

I punti di campionamento utilizzati per il prelievo dello scarto da venericoltura sono quelli indicati in **4.2.1 Campionamento** e in particolare nella **Figura 42**, utilizzati per il contestuale prelievo dei campioni di *V. philippinarum* e di sedimento (in quest'ultimo caso con l'esclusione del punto EF); si ricordano di seguito gli identificativi per i siti disposti in ordine da nord a sud:

- Palude del Monte - B
- Verto -V
- Area della Busa - A
- Perognola (concessione) - EC
- Perognola (fuori concessione) - EF

Immediatamente dopo la raccolta avvenuta secondo le modalità descritte in **4.2.1 Campionamento** è stata eseguita la vagliatura del pescato, l'operazione che consente la separazione del prodotto commercializzabile dallo scarto costituito principalmente da conchiglie vuote; tale operazione viene condotta normalmente dagli operatori nel mezzo natante in modo tale da poter eliminare il materiale non di interesse tramite scarico diretto in laguna. Nel campionamento che ha avuto luogo in aprile 2013 questa fase è stata condotta

- con setaccio a mano dagli operatori nei punti di campionamento V e A (**Figura 124**);



Figura 124: Svuotamento del pescato sul setaccio (a) e successiva fase di vagliatura a mano (b) eseguita nei punti di campionamento A e V – foto G. Cipolato.

- con vaglio vibrante meccanico a motore nel punto di campionamento E (**Figura 125**): si tratta di un vaglio del tutto simile a quelli installati sulle imbarcazioni che operano in mare con delle misure di selettività diverse in grado di separare le vongole grandi, medie e piccole e di fare una selezione dimensionale anche sullo scarto (ICRAM, 1994).

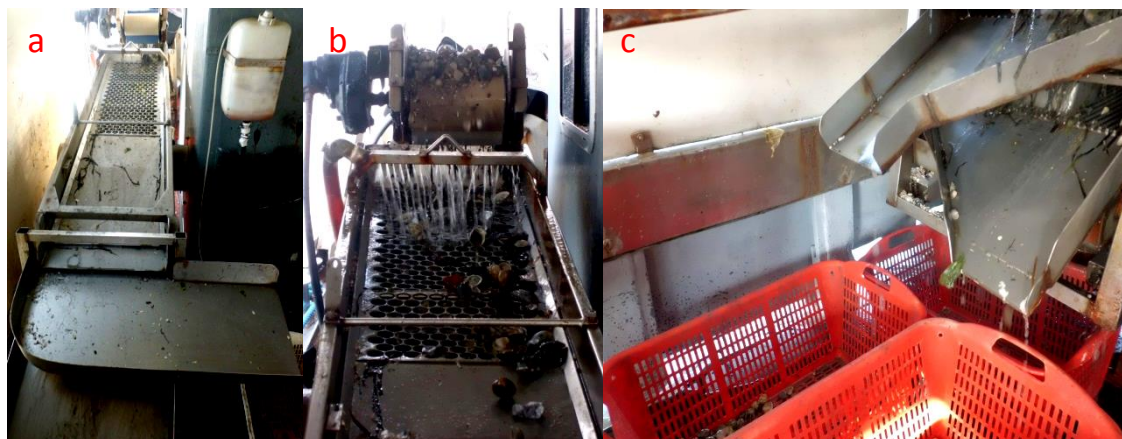


Figura 125: Il vaglio vibrante meccanico utilizzato nei punti di campionamento EC e EF prima dell'utilizzo (a), un particolare in fase di utilizzo (b), gli sbocchi di uscita dello scarto nella parte sottostante (c) – foto G. Cipolato.

Nel caso del punto di campionamento B le vongole sono state selezionate a mano per evitare la perdita dello scarto in quanto lo strumento manuale impiegato per il vaglio nell'imbarcazione utilizzata si trova ancorato al bordo dell'imbarcazione stessa in modo tale da consentire la raccolta all'interno del prodotto (vongola verace) e lo scarico all'esterno in laguna dello scarto (si veda **Figura 126**).



Figura 126: Setaccio rotante manuale installato sull'imbarcazione utilizzata nel campionamento nel sito B, ma non impiegato – foto G. Cipolato.

Di seguito si riportano alcune immagini relative allo scarto raccolto secondo le 3 modalità descritte (**Figura 127**, **Figura 128** e **Figura 129** rispettivamente nel sito A, EC e B a titolo di esempio). Come si può notare dalla **Figura 128** lo scarto prelevato nei punti di campionamento EC e EF e separato dalle vongole tramite il vaglio vibrante meccanico è suddiviso in ceste diverse secondo le dimensioni: al fine di ottenere campioni rappresentativi della composizione media sono state prelevate e mescolate quote proporzionali alla quantità totale raccolta rappresentative di ogni classe dimensionale.



Figura 127: Lo scarto raccolto nel punto di campionamento A dopo la fase di vagliatura – *foto G. Cipolato.*



Figura 128: Lo scarto raccolto nel punto di campionamento EC dopo la fase di vagliatura – *foto G. Cipolato.*



Figura 129: Lo scarto raccolto nel punto di campionamento B dopo la fase di vagliatura – *foto G. Cipolato.*

In ogni stazione sono stati prelevati 3 campioni di scarto di 400 g WW ciascuno, corrispondenti a un volume di circa 600 cm³, rappresentativi della composizione media e in quantità sufficiente per lo svolgimento dell'analisi qualitativa ed elementare e 2 campioni di 800 g WW ciascuno destinati ai test di cessione e ai test ecotossicologici che sono stati conservati in freezer a -20 °C fino al momento delle analisi; inoltre è stato prelevato tutto lo scarto rimanente in modo da poterlo mescolare e utilizzare come riempitivo per il prototipo di *bio-burga*.

Al fine di operare un confronto della composizione qualitativa di campioni di scarto prelevati nei siti EC e V in diversi periodi dell'anno e quindi di verificare l'esistenza di una variabilità stagionale, in questi due siti sono stati prelevati 3 campioni di scarto in momenti successivi (nei mesi di agosto 2013 e febbraio 2014 per il sito EC; nel solo mese di febbraio 2014 per il sito V) dal dott. G. Cipolato, che ha collaborato al presente studio nell'ambito del Progetto "Utilizzazione di materiale di risulta della produzione di Molluschi per opere di protezione ambientale" finanziato dal Fondo Sociale Europeo.

Vista la disomogeneità delle modalità di raccolta e di vagliatura non è stato possibile quantificare l'ammontare di materiale di scarto presente sul fondale rispetto all'unità di superficie nelle diverse aree di campionamento; d'altro canto non si è proceduto a una quantificazione dello scarto per unità di commercializzato (vongole filippine destinate alla vendita), oltre che per la ragione sopra descritta, anche perché non è stata ritenuta attendibile una stima effettuata tramite un campionamento in un unico periodo dell'anno. Si auspica, tuttavia, che questa valutazione possa essere effettuata tramite una modalità di campionamento univoca e in diversi periodi dell'anno direttamente dall'Ente gestore (G.R.A.L.).

5.2.2 Analisi qualitativa dello scarto

I campioni di scarto (3 repliche per sito) sono stati scongelati e vagliati a mano separando in primo luogo gli organismi vivi o pseudo-porzioni di questi (come il bisso) dal resto; tali organismi o porzioni (complessivamente definiti "vivo") sono stati pesati, contati (quando possibile) e raggruppati secondo le classi seguenti:

- *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1789)
- *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeve, 1850)
- granchi
- canalicchi
- *Musculista senhousia* (Benson in Cantor, 1842)
- bisso
- corbole
- uova
- anemoni

Una volta terminata la fase di valutazione del vivo si è passati alla quantificazione e classificazione della porzione costituita dalle conchiglie e dal materiale resistente alla degradazione ("non vivo"): in questa porzione sono state accorpate le conchiglie degli organismi conteggiati nella porzione di "vivo" ritenendo che in una situazione reale la loro parte molle risentirebbe della degradazione lasciando però l'esoscheletro. Anche per questa seconda porzione ("non vivo") sono state individuate classi omogenee quali:

- *C. glaucum*
- materiale vegetale
- ostriche
- Anellidi
- altri Bivalvi
- Gasteropodi
- *V. philippinarum*
- indeterminato
- inerte
- canalicchi
- *M. senhousia*
- conglomerato organogeno

In generale sono stati individuati come classi quei raggruppamenti facilmente riconoscibili in una prima fase di classificazione (prima di lavare lo scarto dal sedimento) che risultano particolarmente abbondanti in almeno un sito e che presentano caratteristiche interessanti per la differenziazione dello scarto. Le classi perciò risultano disomogenee dal punto di vista del livello di classificazione: per alcune classi si arriva alla specie (ad esempio “*V. philippinarum*” o “*M. senhousia*”), in altri casi si raggruppano tutte le conchiglie dello stesso tipo non diversamente identificate (“altri Bivalvi”).

Questa scelta è dettata dall’esigenza di mettere in luce i tratti distintivi dello scarto prelevato nelle diverse aree della laguna di Venezia che, sulla base delle conoscenze acquisite, possono risultare decisive nel determinare la composizione chimica del campione o le sue caratteristiche strutturali: questi aspetti sono, infatti, particolarmente importanti nell’ottica di un prelievo e di un successivo utilizzo di questo materiale come riempitivo per burghe da posizionare nell’area lagunare veneziana.



Figura 130: Le classi componenti il campione di scarto EF (seconda replica) prima del lavaggio.

Dopo la separazione (**Figura 130**, a titolo di esempio) le singole classi sono state lavate per privarle del sedimento, asciugate e pesate per la determinazione della composizione percentuale in peso umido del campione. Un'aliquota rappresentativa del campione privato del "vivo" è stata utilizzata per la determinazione della densità specifica eseguita tramite pesatura di volumi noti di scarto (in 3 repliche) su bilancia tecnica: i risultati sono presentati in **Figura 131**.

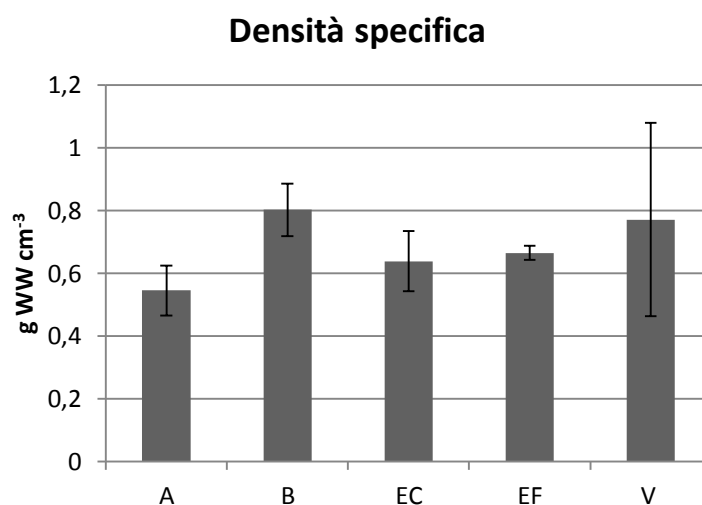


Figura 131: Valore medio e deviazione standard (3 repliche) della densità specifica espressa in g WW cm⁻³ dei campioni di scarto.

5.2.3 Analisi elementare dello scarto

La fase di pretrattamento è stata eseguita scongelando i campioni di scarto (3 repliche per sito) e classificandolo secondo le categorie individuate nella fase di analisi qualitativa relativamente al "non vivo" (*C. glaucum*, materiale vegetale, ostriche, Anellidi, altri Bivalvi, Gasteropodi, *V. philippinarum*, indeterminato, inerte, canalicchi, *M. senhousia*, conglomerato organogeno). Tali classi sono state lavate dal sedimento separatamente

in acqua corrente, asciugate e ne è stato determinato il peso umido. Quindi è stata determinata la percentuale in peso delle singole classi componenti il campione: sulla base di questo calcolo è stato prelevato un campione rappresentativo di circa 10 g che è stato lavato con Milli-Q. Il campione è stato posto in forno a 80 °C per 48 ore e, in seguito, nel cilindro in teflon già utilizzato per le valve, per la frantumazione e omogenazione. Il frantumato è stato conservato in provetta fino al momento della disaggregazione in microonde.

Le fasi successive sono le medesime eseguite per i campioni di conchiglie di *V. philippinarum*: per la disaggregazione in microonde sono stati prelevati e pesati circa 0,15 g di campione e posti in bombe di teflon precedentemente lavate; sono stati aggiunti 4 mL di Milli-Q, 4 mL di HNO₃ suprapur (Fluka Analytical), 4 mL di H₂O₂ suprapur (Fluka Analytical) e le bombe sono state poste in microonde (Ethos 1600, Milestone) per 12 minuti (potenza massima 600 W). I campioni disaggregati sono stati portati a volume (25 mL) con acqua Milli-Q e posti in contenitori in HDPE fino al momento delle analisi.

Le analisi sono state eseguite, previa opportuna diluizione, tramite uno spettrometro di massa a quadrupolo con sistema di ionizzazione al plasma accoppiato induttivamente (Agilent 7500I), dotato di cella di collisione antecedente il quadrupolo.

5.2.4 Test di cessione sullo scarto

Per l'esecuzione del test di cessione sono stati scongelati 5 campioni di scarto, ognuno appartenente a un diverso punto di campionamento. I campioni sono stati classificati secondo le classi già descritte nei paragrafi precedenti ed è stato prelevato un campione rappresentativo (in termini di composizione percentuale) di circa 100 g per ogni stazione. Tali campioni sono stati mescolati al fine di ottenere un unico campione di scarto "medio" (500 g circa) che è stato a sua volta suddiviso in 2 frazioni:

1. la prima è stata frantumata (granulometria < 4 mm) e costituisce il campione tal quale (TQ);
2. la seconda è stata lavata con Milli-Q, privata dei tessuti molli, frantumata (granulometria < 4 mm) e costituisce il campione di scarto lavato (LAV).

La procedura seguita per la preparazione degli eluati è quella prevista dalla UNI 10802:2013 per la parte riguardante "Campionamento manuale e preparazione e analisi degli eluati" per rifiuti liquidi, granulari, pastosi e fanghi (secondo quanto previsto dall'allegato 3 del D.M. del 27 settembre 2010). Essa prevede

- il calcolo della percentuale di umidità utile per determinare la quantità di campione non essiccato e il volume di soluzione lisciviante (acqua Milli-Q) da porre a contatto per ottenere un rapporto Liquido/Solido= 10 L kg⁻¹;
- il posizionamento del recipiente chiuso contenente il campione e la soluzione in agitazione per 24 ore in jar test con agitatore con pale in teflon (velocità selezionata in modo da evitare la sedimentazione e l'abrasione) in ambiente a temperatura controllata;
- la decantazione per 15 minuti circa;
- la centrifugazione per 30 minuti a 2000 g;

- la filtrazione con membrane in acetato di cellulosa (Whatman Schleicher & Schuell, cut-off 0,45 µm) come ulteriore garanzia per la rimozione di tutte le particelle in sospensione che potrebbero rovinare lo strumento di analisi;
- l'acidificazione dei campioni a pH = 2 con HNO₃ e la loro conservazione in contenitori in HDPE fino al momento dell'analisi.

Quest'ultima è stata eseguita sul campione tal quale con uno spettrometro di massa a quadrupolo con sistema di ionizzazione al plasma accoppiato induttivamente (Agilent 7500I).

5.2.5 Test ecotossicologici: fasi preliminari

Per ogni sito una frazione rappresentativa dello scarto in termini di composizione percentuale delle singole classi è stata suddivisa in due aliquote e sottoposta a due differenti trattamenti:

1. una parte è stata frantumata (granulometria < 4 mm) e costituisce il campione tal quale (TQ);
2. la seconda è stata lavata con Milli-Q, privata dei tessuti molli, frantumata (granulometria < 4 mm) e costituisce il campione di scarto lavato (LAV).

Entrambe le frazioni (TQ e LAV per ogni sito) sono state utilizzate per ottenere due elutriati secondo la procedura prevista dalla normativa UNI EN 14735:2005 che riguarda la "Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche": la procedura è analoga a quella prevista per il *test di cessione* (UNI 10802: 2013) fatta eccezione per la soluzione liscivante che in questo caso è costituita da *Artificial Sea Water* (ASW, composizione indicata in **Tabella 7**).

Tabella 7: Composizione della ASW utilizzata per la preparazione degli elutriati da scarto.

SALE	FORMULA	PRODUTTORE	g L ⁻¹
Stronzio cloruro esaidrato	SrCl ₂ · 6H ₂ O	Fluka	0,020
Acido borico	H ₃ BO ₃	Fluka	0,030
Potassio bromuro	KBr	Fluka	0,100
Potassio cloruro	KCl	Riedel-de Haën	0,700
Calcio cloruro diidrato	CaCl ₂ · 2H ₂ O	Riedel-de Haën	1,470
Sodio solfato anidro	Na ₂ SO ₄	J.T. Baker	4,000
Magnesio cloruro esaidrato	MgCl ₂ · 6H ₂ O	Riedel-de Haën	10,780
Sodio cloruro	NaCl	Fluka	23,500
Sodio metasilicato	Na ₂ O ₃ Si · 9H ₂ O	Sigma	0,020
Sodio bicarbonato	NaHCO ₃	Fluka	0,200

Le fasi di preparazione prevedono

- la riduzione della granulometria (che deve risultare inferiore a 4 mm);
- la determinazione dell'umidità del campione necessaria per calcolare la quantità di campione non essiccato e il volume di soluzione lisciviante da utilizzare al fine di ottenere un rapporto Liquido/Solido=10 L kg⁻¹;
- il posizionamento del recipiente chiuso contenente il campione e la soluzione in agitazione per 24 ore in jar test con agitatore a pale in teflon (velocità selezionata in modo da evitare la sedimentazione e l'abrasione) in un ambiente controllato (cella termostatica al buio alla temperatura di 20 °C);
- la decantazione per 15 minuti circa e infine la centrifugazione per 30 minuti a 2500 g (per tutti i campioni a esclusione dei bianchi **W**).

La preparazione degli elutriati è stata effettuata anche utilizzando come campione il solo geocomposito al fine di valutare un suo eventuale contributo alla tossicità dei manufatti: la procedura seguita per l'ottenimento degli elutriati (**G1** e **G2**) è analoga a quella sopra descritta fatta esclusione per il rapporto Liquido/Solido che in questo caso è stato trasformato più convenientemente in rapporto Superficie/Volume. In particolare si è deciso di porre a contatto con 600 mL di soluzione lisciviante un ritaglio di geocomposito di 30 cm², esponendo all'elutrazione una superficie complessiva di 60 cm².

Al termine della procedura di preparazione i valori di pH e di potenziale redox (E_h in mV) degli eluati sono stati misurati con sonda multiparametrica (perpHecT LogR meter, modello 330, Orion, Beverly, MA, USA); inoltre è stato misurato il valore di concentrazione di ammonio nei campioni relativi allo scarto con spettrofotometro (DR/2010, HACH, Loveland, CO, USA) utilizzando il metodo colorimetrico dei silicati (Reardon *et al.*, 1966).

Al fine di evidenziare eventuali effetti tossici del materiale di scarto da venericoltura e del geocomposito posto in ambiente lagunare, tutti gli eluati sono stati successivamente testati sulla batteria di test ecotossicologici opportunamente individuata (come descritto in **5.1.4 Scelta della batteria di test ecotossicologici** e composta da:

- il saggio acuto Microtox® sull'inibizione della bioluminescenza in *V. fischeri*;
- il test cronico di inibizione della crescita algale con *P. tricornutum*;
- il test subcronico di embriotossicità con *M. galloprovincialis*.

5.2.6 Test di inibizione della bioluminescenza con *Vibrio fischeri* (Microtox®)

Il test Microtox® LP (*Liquid Phase*) è un metodo che consente di valutare la tossicità acuta di campioni disaggregati (preferibilmente liquidi) che utilizza come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturale del batterio marino *V. fischeri*. Alcuni ceppi di questo batterio Gram negativo, infatti, in condizioni naturali di crescita, sono in grado di convertire parte dell'energia metabolica chimica in energia luminosa dipendentemente

dalla loro densità cellulare (*quorum sensing*): la presenza di una sostanza in grado di interferire con la fisiologia cellulare e in particolare con i meccanismi di trasporto degli elettroni responsabili della conversione energetica, determinano un effetto quantificabile sull'output luminoso proporzionale alla tossicità del campione.

Nonostante i batteri siano distanti dal punto di vista evolutivo da organismi superiori quali pesci, crostacei e molluschi, presentano percorsi biochimici conservati anche negli organismi superiori che li rendono adatti per la definizione di criteri cautelativi validi anche per le specie più evolute. Questo aspetto, oltre alle caratteristiche di economicità, riproducibilità, standardizzazione, semplicità e rapidità di esecuzione, rendono questo test particolarmente apprezzato e utilizzato a livello internazionale per molte tipologie di saggi con elutriati, acque sovranatanti e interstiziali, sedimento intero.

In questo lavoro il test è stato eseguito sulla base dei protocolli Volpi Ghirardini & Pantani (1996) e Volpi Ghirardini *et al.* (2009) specifici per ambiente lagunare, utilizzando batteri liofilizzati (Modern Water, Lot. No.: 13F4067A) e soluzione ricostituente (Modern Water AZF686016, Lot. No: 1244092).

È stato effettuato un test al 100% per ogni campione in tre repliche, su matrice centrifugata per 30 minuti a 2500 g (Beckman L7-35 Ultracentrifuge) in condizioni di vuoto spinto (per i bianchi W TQ e W LAV, e i campioni derivanti dall'elutrazione del geotessuto, G1 e G2, non è stata prevista centrifugazione a causa dell'assenza di sedimento sospeso). Le letture sono state eseguite a tre tempi (5-15-30 minuti).

In ogni cuvetta è stato introdotto 1 mL di campione e 10 µL di batteri precedentemente rivitalizzati mediante aggiunta di 1 mL di soluzione ricostituente per 40 minuti a 4 °C; l'incubazione è avvenuta a 15 °C. È stato preparato un bianco in tre repliche con 1 mL di ASW (Artificial Sea Water, composizione come in **Tabella 7**) e 10 µL di batteri rivitalizzati.

La lettura dell'emissione luminosa è stata effettuata tramite Microtox® analyzer M500 (Azur Environmental) e i dati ottenuti sono stati analizzati con il software MicrotoxOmni® 1.18 (Azur Environmental).

Il software restituisce il valore della percentuale di inibizione corrispondente (**I%**) calcolata mediante la formula

$$I\% = \frac{I_C - I_t}{I_C}$$

dove I_C è l'intensità luminosa del controllo e I_t quella del campione allo stesso istante.

Nel caso di campioni analizzati a differenti concentrazioni è possibile ottenere un grafico concentrazione - risposta (inibizione) dal quale, tramite la regressione, è possibile ricavare il valore di EC50, ossia il valore di diluizione a cui corrisponde una diminuzione del 50% della luce emessa.

5.2.7 Test di inibizione della crescita algale con *Phaeodactylum tricorutum*

Il test di inibizione della crescita algale è un test di tossicità cronica a breve termine che si basa sul semplice principio di introdurre la specie algale prescelta nel campione da testare che viene utilizzato come terreno di coltura; dopo l'incubazione in condizioni controllate si valuta la crescita algale o l'assenza di essa: questa sarà indice della presenza di nutrienti o di sostanze tossiche, rispettivamente (Trainor, 1984)

I principali vantaggi del test sono legati alla facilità di coltura e alla rapida disponibilità degli organismi, ai bassi costi di esercizio, alla rilevanza ecologica delle specie negli ecosistemi acquatici (trattandosi di produttori primari, la loro alterazione può determinare effetti a cascata sull'intera catena trofica), alla riproducibilità e alla standardizzazione del metodo.

In particolare il protocollo UNI EN ISO 10253:2006, utilizzato anche in questo caso, prevede l'impiego di alghe marine unicellulari quali *P. tricorutum* e *Skeletonema costatum* (Greville; Cleve 1873). La tossicità viene calcolata sulla base della diminuzione del tasso di crescita specifico di una coltura cellulare esposta per 72 ore alla soluzione da testare, valutata rispetto al tasso di crescita della stessa coltura in assenza del presunto tossico, mantenuta alle medesime condizioni della precedente (controllo negativo). La coltura cellulare viene selezionata appositamente in modo che, dopo 72 h in condizioni ottimali di esposizione, raggiunga l'apice della fase esponenziale di crescita.

In questo caso è stata utilizzata la specie *Phaeodactylum tricorutum* di cui è stata preparata una pre-coltura 3 giorni prima dell'esecuzione del test ponendo 4 mL di una sospensione algale precedente in circa 100 mL di soluzione di crescita; tale soluzione è composta da 3 soluzioni di nutrienti (stock) e *Artificial Sea Water* (ASW) secondo la seguente ricetta:

- 15 mL di stock 1 (sali minerali, si veda **Tabella 8**);
- 0,5 mL di stock 2 (vitamine, si veda **Tabella 8**);
- 1 mL di stock 3 (P, N e SiO₂, si veda **Tabella 8**);
- 1 L di ASW (si veda **Tabella 9**).

Tabella 8: Composizione degli stock utilizzati per il test di inibizione della crescita algale con *P. tricorutum*.

Sale	Formula	Concentrazione (mg L ⁻¹)
STOCK 1		
Ferro cloruro esaidrato	FeCl ₃ · 6H ₂ O	48
Manganese cloruro tetraidrato	MnCl ₂ · 4H ₂ O	144
Zinco solfato eptaidrato	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	45
Solfato di rame pentaidrato	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,157

Cobalto cloruro esaidrato	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,404
Acido Borico	H ₃ BO ₃	1140
Acido etilendiamintetracetato	Na ₂ EDTA	1000
STOCK 2		
Tiamina idrocloruro (vitamina B)		50
Biotina (vitamina B7)		0,01
Cianocobalamina (vitamina B12)		0,10
STOCK 3		
Potassio fosfato	K ₃ PO ₄	3
Sodio nitrato	NaNO ₃	50
Sodio metasilicato pentaidrato	Na ₂ SiO ₃ · 5H ₂ O	14,9

Tabella 9: Composizione della ASW utilizzata per il test di inibizione della crescita algale con *P. tricornutum*.

Sale	Formula	Concentrazione (g L ⁻¹)
Acido borico	H ₃ BO ₃	0,023
Potassio cloruro	KCl	0,65
Calcio cloruro anidro	CaCl ₂	1
Sodio solfato anidro	Na ₂ SO ₄	3,7
Magnesio cloruro esaidrato	MgCl ₂ · 6H ₂ O	9,7
Sodio cloruro	NaCl	22
Sodio bicarbonato	NaHCO ₃	0,20

La pre-coltura è stata conservata in incubatore a condizioni controllate (20 ± 2 °C ed esposizione all'illuminazione di intensità 6000–10000 lx h24) per 72 ore, al termine delle quali la coltura si trova in fase di crescita esponenziale. A questo punto si procede al conteggio delle cellule (2 conteggi per 5 repliche) con la camera di Bürker (camera contacellule) e si determina la densità della popolazione, utile per stabilire il volume di coltura da prelevare per ottenere una sospensione con densità di circa 10⁴ cellule /mL nei controlli e nel test.

In particolare

- il controllo negativo è stato condotto con 9,0 mL di acqua marina ricostruita (ASW) addizionata all'inoculo (0,5 mL) e alla soluzione di crescita (0,5 mL);
- il controllo positivo è stato preparato secondo le indicazioni della UNI EN ISO 10253 (2006) utilizzando come tossico di riferimento il bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) a diverse concentrazioni;

- in una prima fase la sospensione per il test è stata preparata aggiungendo a 9,0 mL di campione al 100%, 0,5 mL di mezzo di crescita e 0,5 mL di coltura algale a densità nota; successivamente sono state eseguite le prove per i campioni TQ a diverse diluizioni.

Tutte le prove sono state condotte in tre repliche su piastre IWAKI con 24 pozzetti da 3 mL. L'esposizione ai campioni è durata 72 ± 2 h a 20 ± 2 °C con illuminazione 24 h a 6000–10000 lx.

Trascorso il periodo di esposizione il test è stato fissato con soluzione di formalina tamponata al 4% e successivamente si è passati alla determinazione della numerosità algale mediante conteggio con camera di Bürker.

Una volta determinati i valori di concentrazione cellulare è stato possibile procedere al calcolo della percentuale di inibizione della crescita cellulare, proporzionale agli effetti della sostanza testata nei confronti degli organismi, confrontando il tasso specifico di crescita del controllo negativo con il tasso specifico di crescita del test.

In particolare il tasso di crescita specifico si calcola sulla base dei conteggi effettuati all'inizio e al termine del periodo di esposizione con la formula

$$\mu = \frac{\ln(N_L) - \ln(N_0)}{t_L - t_0}$$

dove μ è il tasso di crescita specifico, $t_L - t_0$ il periodo di durata del test (finale – iniziale) e N_L ed N_0 sono, rispettivamente, i valori delle densità cellulari rilevati a t_L e a t_0 .

Calcolato il valore medio del tasso di crescita specifico per le 3 repliche (μ_i per il test i-esimo e μ_C per il controllo negativo), si procede alla determinazione della percentuale di inibizione cellulare per il test i-esimo secondo la relazione

$$I\mu_i = \left(\frac{\mu_C - \mu_i}{\mu_C} \right) \cdot 100$$

dove $I\mu_i$ è la percentuale di inibizione della crescita cellulare del test i-esimo, μ_i la media del tasso di crescita specifico del test i-esimo e μ_C rappresenta la media del tasso di crescita del controllo.

Mediante la regressione lineare sui valori delle percentuali di inibizione ricavate rispetto alle concentrazioni a cui tali effetti sono stati misurati si può ricavare l'IC50, valore di concentrazione a cui corrisponde una percentuale di inibizione pari al 50%, e, analogamente l'IC20.

I controlli positivi sono stati messi a confronto con la carta di controllo del gruppo di ricerca del laboratorio di Ecotossicologia del DAIS, Università Ca' Foscari di Venezia in cui sono stati condotti i test: i risultati ottenuti in questo lavoro sono in linea con quelli precedenti e in linea con quanto previsto dal protocollo (UNI EN ISO 10253, 2006) che prevede un valore di IC50 pari a 20 mg/L con $n=10$ e coefficiente di variazione $CV=26\%$.

5.2.8 Test di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis*

Il saggio ecotossicologico con embrioni e larve di Bivalvi marini è uno dei test sub-cronici più utilizzati per saggiare la tossicità di inquinanti sia organici che inorganici; l'elevata sensibilità dei primi stadi vitali è indicata per la valutazione della tossicità di sedimenti, elutriati e acque marine superficiali. La sensibilità e la rapidità di risposta del test, ampiamente riconosciuta a livello nazionale e internazionale, ne fanno uno dei test più utilizzati anche se non esiste a oggi un unico protocollo standardizzato (ASTM, 2004).

I maggiori vantaggi derivanti dall'utilizzo di questo test sono dati, oltre che dall'elevata sensibilità degli organismi in queste fasi di sviluppo, dalla brevità di esecuzione, dalla rilevanza ecologica delle specie utilizzate negli ambienti marino costieri, dalla facile reperibilità degli organismi, dall'elevata significatività statistica delle risposte che sono valutabili su un largo numero di uova fecondate.

Le specie maggiormente utilizzate allo scopo sono *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *M. galloprovincialis*; i test possono essere a breve e a lungo termine e considerare diversi tipi di endpoint: sviluppo embrionale, sviluppo larvale, crescita larvale (Baudo *et al.*, 2011). In questo caso è stato condotto un test a breve termine con *M. galloprovincialis* considerando lo sviluppo embrionale, dall'uovo fecondato fino alla formazione della larva D-shape, con un periodo di incubazione di 48 h.

Durante questa fase particolarmente delicata dello sviluppo, nella quale avvengono importanti mutamenti fisiologici che portano alla formazione del veliger, l'eventuale contatto dell'organismo con sostanze tossiche può determinarne la morte, il rallentamento dello sviluppo o uno sviluppo non corretto (Brunelli *et al.*, 2004). Il test infatti si basa sull'osservazione e il conteggio delle anomalie che possono insorgere durante lo sviluppo embrionale a seguito dell'esposizione alla sostanza da saggiare.

In questo caso il test sub-cronico di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis* è stato eseguito seguendo le procedure operative riportate da His *et al.* (1997) e ASTM (1998, 2004). La tossicità degli eluati sugli embrioni di bivalvi è stata dunque misurata in funzione della frequenza del numero di larve anomale e di stadi pre-larvali rispetto alla frequenza di larve normo-formate.

Gli esemplari adulti di *Mytilus galloprovincialis* prelevati tramite campionamento in laguna di Venezia (zona confinata della Fossa di S. Andrea) sono stati trasportati in laboratorio a secco in un contenitore termico; quindi sono stati puliti dal sedimento e dagli organismi epibionti mediante raschiatura manuale della conchiglia e getto di acqua corrente.

Gli organismi selezionati sono stati posti in bagno con acqua marina artificiale (*Artificial Sea Water ASW*) preparata secondo la composizione indicata in **Tabella 10**.

Tabella 10: Composizione della ASW utilizzata per il test di embriotossicità con *M. galloprovincialis*.

Sale	Formula	Concentrazione (g/L)
Stronzio cloruro esaidrato	$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,020

Acido borico	H ₃ BO ₃	0,030
Potassio bromuro	KBr	0,100
Potassio cloruro	KCl	0,700
Calcio cloruro diidrato	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,470
Sodio solfato anidro	Na ₂ SO ₄	4,000
Magnesio cloruro esaidrato	MgCl ₂ · 6H ₂ O	10,780
Sodio cloruro	NaCl	23,500
Sodio metasilicato	Na ₂ O ₃ Si · 9H ₂ O	0,020
Sodio bicarbonato	NaHCO ₃	0,200

Per indurre l'emissione dei gameti, i bivalvi, posti a bagno in acqua marina artificiale in contenitori di pirex, sono stati stimolati tramite shock termico, alternando bagni della durata di 30 minuti ciascuno, in vasche termostate a 18 °C ± 1 °C e a 28 °C ± 1 °C. Nei contenitori di pirex sono stati aggiunti gameti precedentemente congelati in quanto è noto che la presenza dei feromoni ivi contenuti è utile a stimolare ulteriormente l'emissione.

Gli organismi emettitori sono stati trasferiti individualmente in contenitori puliti con acqua marina artificiale alla temperatura di 18 °C ± 1 °C. Un campione di gameti è stato prelevato e controllato al microscopio per verificare la buona mobilità, nel caso degli spermatozoi, le dimensioni, la forma e l'omogeneità, nel caso delle uova.

Dopo 30 minuti dall'inizio dell'emissione, è stata eseguita la filtrazione al fine di eliminare eventuali impurità:

- la sospensione spermatica è stata filtrata con un setaccio sterile da 32-40 µm e mantenuta in una sospensione concentrata;
- la sospensione di uova è stata filtrata con una rete da 75- 100 µm e diluita in un cilindro graduato da 500 mL; 4 aliquote sono state prelevate per eseguire la conta al microscopio e determinare la quantità di sospensione da inoculare in ciascun pozzetto per ottenere una densità finale di circa 200-300 uova in 3 mL.

Per eseguire la fecondazione, 10-15 mL di spermatozoi sono stati inoculati nella sospensione di uova, mantenuta in agitazione continua tramite apposito agitatore. Dopo circa 15 minuti è stato verificato al microscopio il successo della fecondazione: in particolare è stato possibile individuare nelle uova fecondate l'emissione del globulo polare.

Sono state preparate: una piastra per il controllo positivo (CuSO₄), due per il controllo negativo (W1 e W2) e una per ciascun campione da saggiare; le diverse diluizioni (0,78%; 1,56%; 3,13%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100% di campione sul totale per tutti i campioni tranne che il V TQ per cui sono state utilizzate le diluizioni 0,1%; 0,2%; 0,39%; 0,78%; 1,56%; 3,13%; 6,25%; 12,5% di campione sul totale presumendo un maggiore effetto del campione), in 3 repliche, sono state preparate utilizzando l'acqua marina ricostruita (ASW). In ogni pozzetto

sono stati introdotti 3 mL di campione o di controllo e, in seguito, la quantità precedentemente calcolata di sospensione di uova fecondate.

Una volta inoculate le uova fecondate, l'esposizione degli zigoti è avvenuta al buio a 18 °C per 48 h. Trascorso il tempo necessario il test è stato fissato con una soluzione di formalina tamponata al 40%.

La lettura dei campioni è stata eseguita al microscopio ottico a 400x distinguendo tra i primi 100 organismi le larve normo-formate costituite dai veliger con normale e completo sviluppo della conchiglia (D-shape) e larve anormali; queste ultime comprendono:

- le trocofore e i pre-veliger bloccati a questo stadio (pre-D);
- i veliger con mantello che protrude dalla conchiglia, i veliger con conchiglia incompleta, con incisioni nel margine o con cerniera convessa (D malf).

Dalle letture è stata ricavata, quindi, l'embriotossicità espressa come percentuale di larve anormali (pre-D + D malf) sul totale (D-shape + pre-D + D malf). Il dato è stato normalizzato mediante la formula di Abbott

$$\%Eff_{Abbott} = \frac{(\%Eff_i - \%Eff_c)}{100 - \%Eff_c} \cdot 100$$

dove %Eff_i è la percentuale di effetto dell'osservazione i-esima e %Eff_c è la percentuale di effetto del controllo negativo.

Il controllo positivo è stato posto a confronto con la carta di controllo elaborata dal gruppo di ricerca del laboratorio di Ecotossicologia del DAIS, Università Ca' Foscari di Venezia, in cui sono stati condotti i test: la carta raccoglie i dati relativi ai test di controllo effettuati nel laboratorio nel corso degli anni con la medesima procedura qui descritta e la corrispondenza dei risultati con quelli ivi riportati attesta la riproducibilità del test.

Il controllo negativo eseguito con i campioni W1 e W2 presenta un valore medio di larve normali pari al 60 % corrispondente al valore di accettabilità stabilito dalla procedura: Ciò nonostante si è ritenuto di poter considerare validi i test di embriotossicità considerata la buona ripetibilità delle repliche, confermata anche dai risultati ottenuti da un'ulteriore piastra di controllo effettuata con l'ASW. Si ritiene che tale scelta non infici la significatività dei dati che, si ricordi, sono presentati nella loro forma normalizzata dopo l'applicazione dell'algoritmo di Abbott.

5.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.3.1 Scarto: analisi qualitativa

La numerosità, il peso (misurato come peso umido in g) e il contributo in termini di percentuale sul peso totale degli organismi vivi o delle pseudo-porzioni di questi per ogni singola classe individuata dall'analisi qualitativa (*C. glaucum*, *V. philippinarum*, granchi, cannolicchi, *M. senhousia*, bisso, corbole, uova e anemoni) sono riportati in **Figura 132**, **Figura 133** e **Figura 134** rispettivamente. Si noti come nel grafico che riporta il numero di individui non si sia tenuto conto del bisso (non contabile).

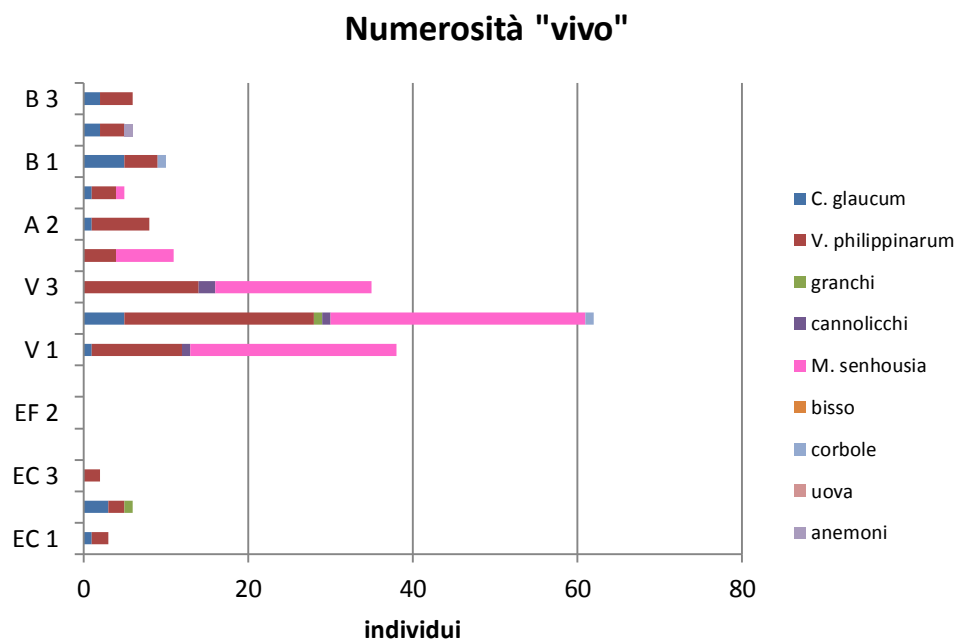


Figura 132: Numero di individui vivi appartenenti alle differenti classi presenti nei campioni di scarto.

Peso umido "vivo"

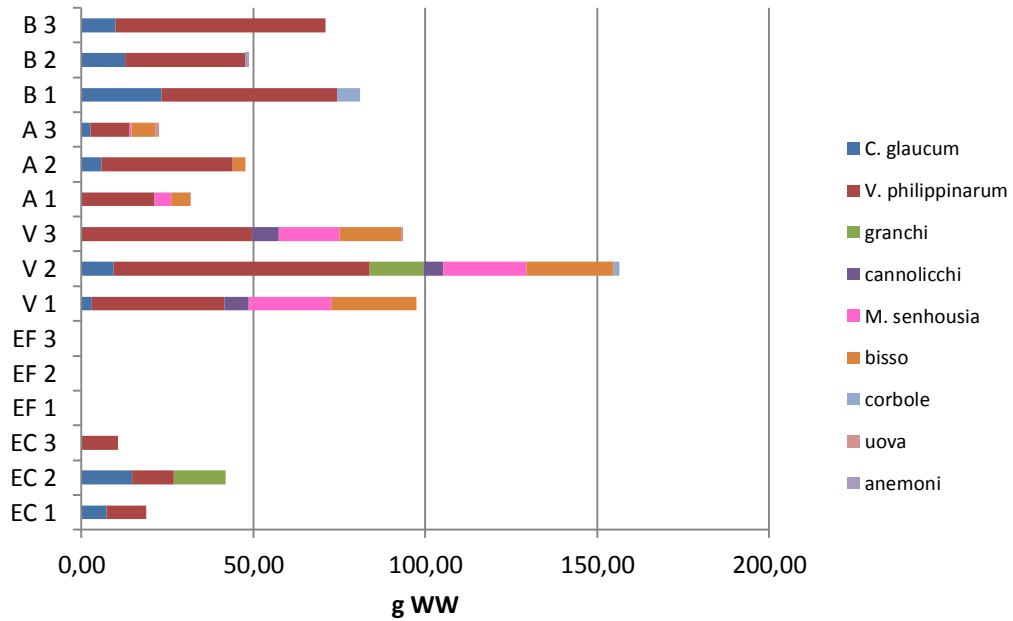


Figura 133: Peso umido degli individui vivi e porzioni appartenenti alle differenti classi trovati nei campioni di scarto.

Composizione "vivo"

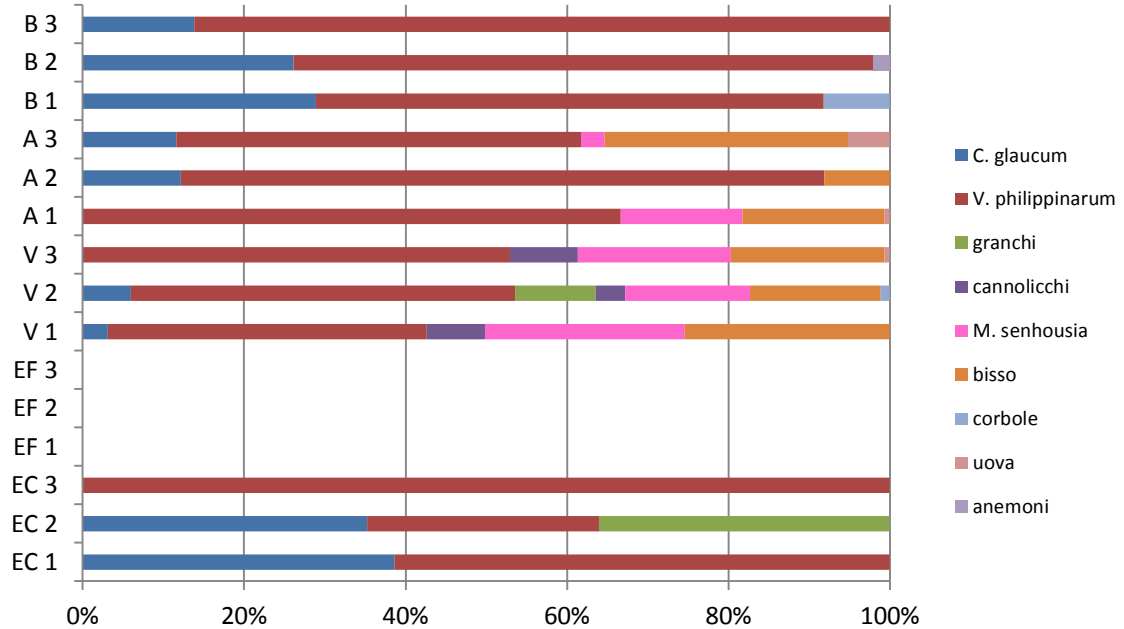


Figura 134: Percentuale delle differenti tipologie di "vivo" rinvenute nei campioni di scarto rispetto al totale.

Dai grafici di **Figura 132** e **Figura 133** si nota facilmente come il sito che presenta una quota considerevole di organismi vivi o di parti di questi è il sito V, seguito dai siti A e B (quest'ultimo presenta una quota importante soprattutto in termini di peso). Anche il sito EC presenta un certo numero di individui, mentre nei campioni del sito EF non sono stati rinvenuti organismi vivi.

D'altra parte, se si esamina la composizione della componente "viva" in termini percentuali (**Figura 134**), si nota come in tutti i siti la maggior quota sia imputabile a *V. philippinarum*: ciò non stupisce dato che i siti di campionamento sono zone di coltivazione della specie e che gli organismi rinvenuti sono tendenzialmente di piccole dimensioni e, dunque, riescono a passare il vaglio.

Un'altra componente significativa in termini percentuali è costituita da *C. glaucum*, particolarmente nei campioni EC1 e EC2 (il campione EC3 presenta esclusivamente individui appartenenti alla specie *V. philippinarum*), e nei campioni del sito B, ma è presente in piccola parte in quasi tutti i campioni dei siti A e V.

La specie *M. senhousia* caratterizza i siti V e A (Verto e Busa): si tratta di una specie alloctona di origine indopacifica e che è stata segnalata per la prima volta in laguna di Venezia nel 2001. I pescatori che hanno collaborato al campionamento e che frequentano abitualmente queste aree hanno segnalato come questa specie si sia diffusa in particolar modo negli ultimi anni, in qualche punto coprendo quasi completamente il fondale tanto da rendere difficoltosa la crescita di altre specie e in particolare di *V. philippinarum*.

M. senhousia è di piccole dimensioni (1-2,5 cm) e presenta una conchiglia fragile e leggera (per questo motivo, nonostante il numero di individui trovati sia elevato, il peso complessivo è piuttosto ridotto), ma presenta un bisso molto ben sviluppato che le permette di ancorarsi saldamente a substrati duri (forniti, per esempio, dalle conchiglie di altre specie) e di formare colonie numerose costituenti una fitta trama che funge da barriera fra il sedimento e la colonna d'acqua (Turolla, 2008). La sua natura infestante e i gravi danni che conseguono il suo insediamento e sviluppo, sono stati verificati da episodi avvenuti negli scorsi anni nella Sacca di Goro dove si è intervenuti con soluzioni drastiche (aratura e sabbatura) allo scopo di bonificare il fondale e permettere l'allevamento di *V. philippinarum*.

Per questa ragione si ritiene che la quota di "bisso" rinvenuta nei campioni di scarto dei siti A e V sia certamente da imputare a questa specie: nella fase di prelievo dal fondale e nella fase di vagliatura questa componente è stata distaccata dal fondale e dagli individui di *M. senhousia* ivi presenti ed è finita all'interno dei campioni di scarto raccolti.

Per quanto riguarda le altre categorie individuate, la numerosità e la percentuale in peso sul totale è sostanzialmente trascurabile, fatta eccezione per il campione EC2 in cui è stato trovato un solo granchio di 15,1 g WW.

In generale si può affermare che

- i differenti campioni mostrano alcune caratteristiche comuni in termini di composizione rispetto agli organismi vivi;
- alcune categorie sono peculiari di determinati siti;
- il contenuto, sia in termini di numero di individui che in peso, differisce a seconda dell'area geografica di provenienza.

Al fine di analizzare meglio la composizione dello scarto si osservino i grafici a torta di **Figura 135** dove sono riportati le percentuali di “vivo” rispetto al totale dello scarto prelevato: è evidente come tali percentuali siano diverse a seconda dl sito di provenienza del campione e siano in particolar modo elevate nel caso del sito V, dove superano il 50% del totale.

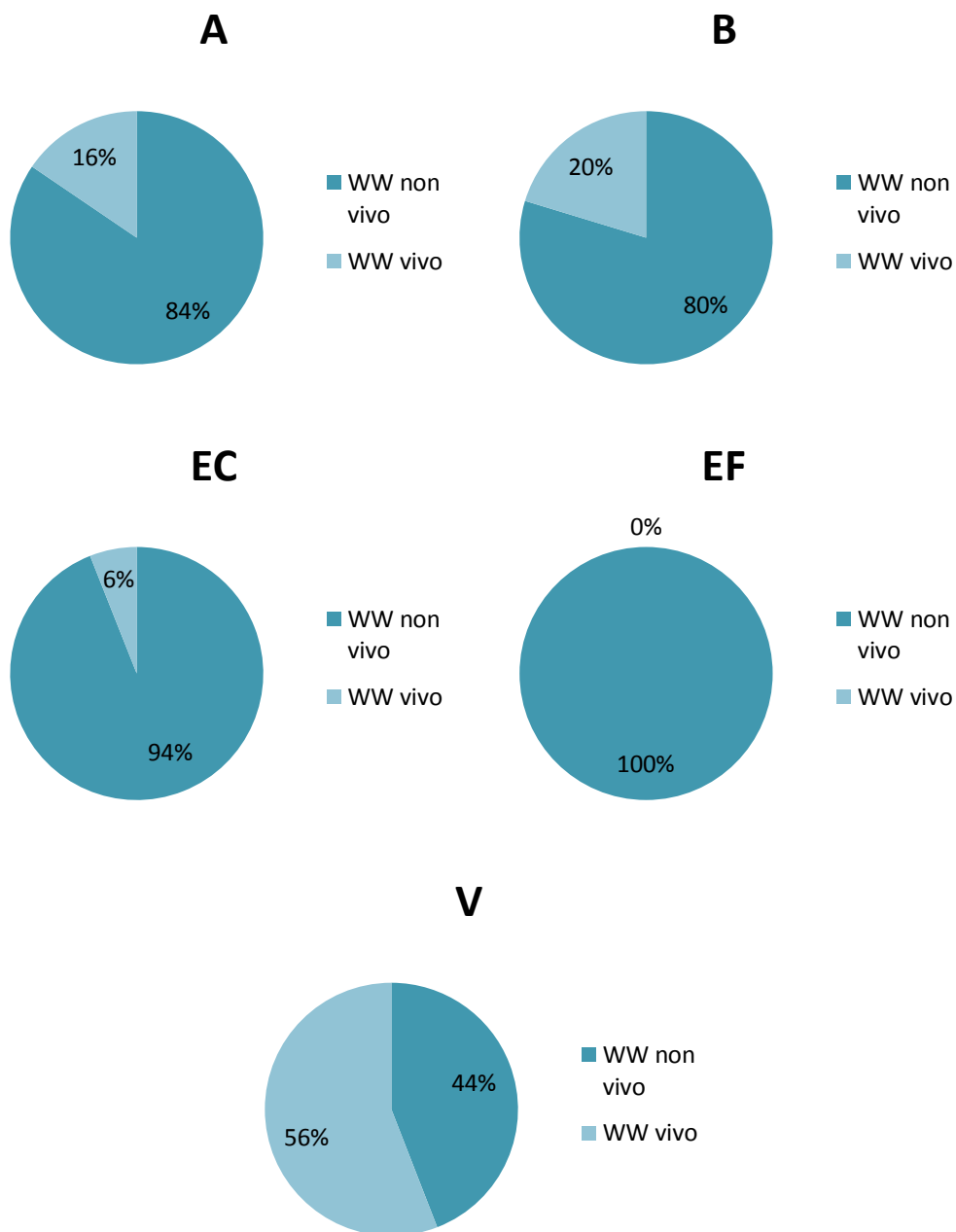


Figura 135: Composizione in termini di “vivo” “non vivo” dello scarto proveniente dalle diverse stazioni.

Queste differenze sono certamente dovute alle diverse biocenosi che caratterizzano i fondali delle aree di prelievo e, in particolare per il sito V, alla presenza di specie invasive come *M. senhousia*; d’altra parte hanno

influito i metodi utilizzati per la separazione degli esemplari di *V. philippinarum* destinati alla vendita dallo scarto: nel caso dei siti EC e EF, ad esempio, la maggior precisione del vaglio meccanico che, si ricorda, riesce a separare gli esemplari di *V. philippinarum* in almeno due classi di grandezza, permette certamente di minimizzare la quota di esemplari vivi di questa specie rimanente nello scarto.

In particolare il fatto che il sito EF, situato appena al di fuori dell'area di concessione, non presenti organismi vivi o porzioni di questi è particolarmente interessante dato che in quest'area viene normalmente gettato lo scarto derivante dalla raccolta di *V. philippinarum* nell'area di concessione. I risultati corroborano le osservazioni condotte in campagna secondo cui il materiale raccolto nel sito EF prima della fase di vaglio presentava un basso rapporto vongole/scarto e la sostanziale assenza di organismi vivi ad eccezione di *V. philippinarum*: ciò è molto probabilmente causato dal fatto che in quest'area avviene un continuo scarico di materiale di scarto che rende difficile la crescita di una vera e propria biocenosi.

In **Figura 136** è possibile visualizzare la composizione delle repliche in termini di peso umido delle singole classi individuate (*C. glaucum*, materiale vegetale, ostriche, Anellidi, altri Bivalvi, Gasteropodi, *V. philippinarum*, indeterminato, inerte, canalicchi, *M. senhousia*, conglomerato organogeno) nella porzione resistente alla degradazione e denominata "non vivo"; in **Figura 137** sono invece riportate le composizioni medie percentuali in peso dello scarto relativo alle diverse stazioni.

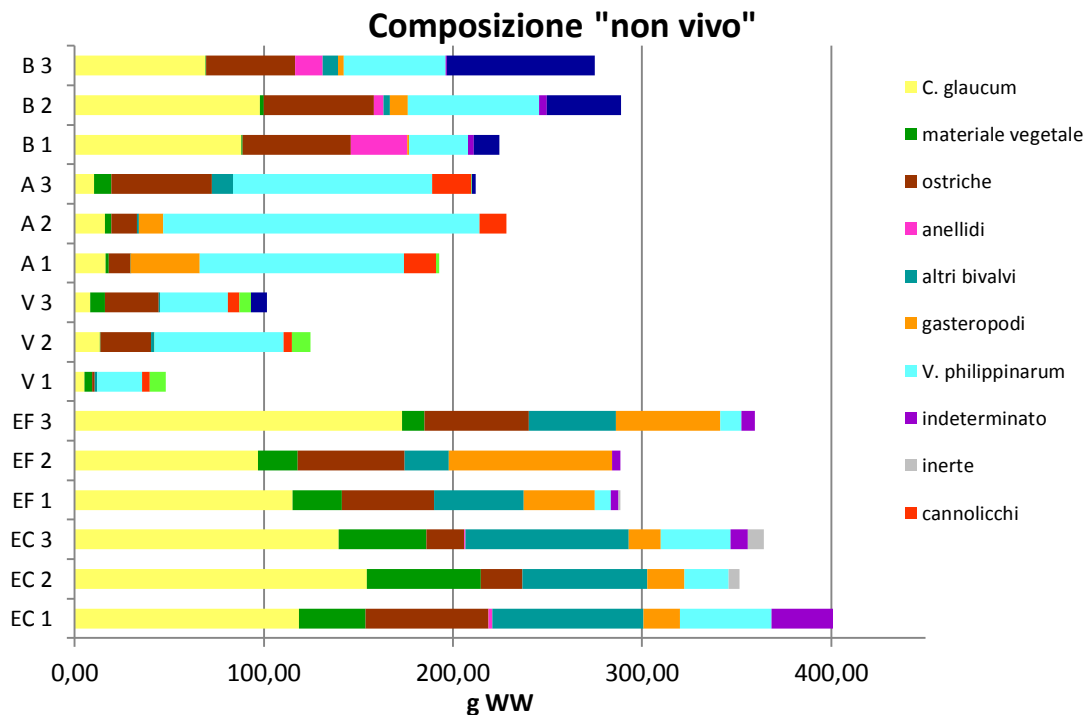


Figura 136: Composizione in termini di peso umido (g WW) delle singole classi dei campioni di scarto.

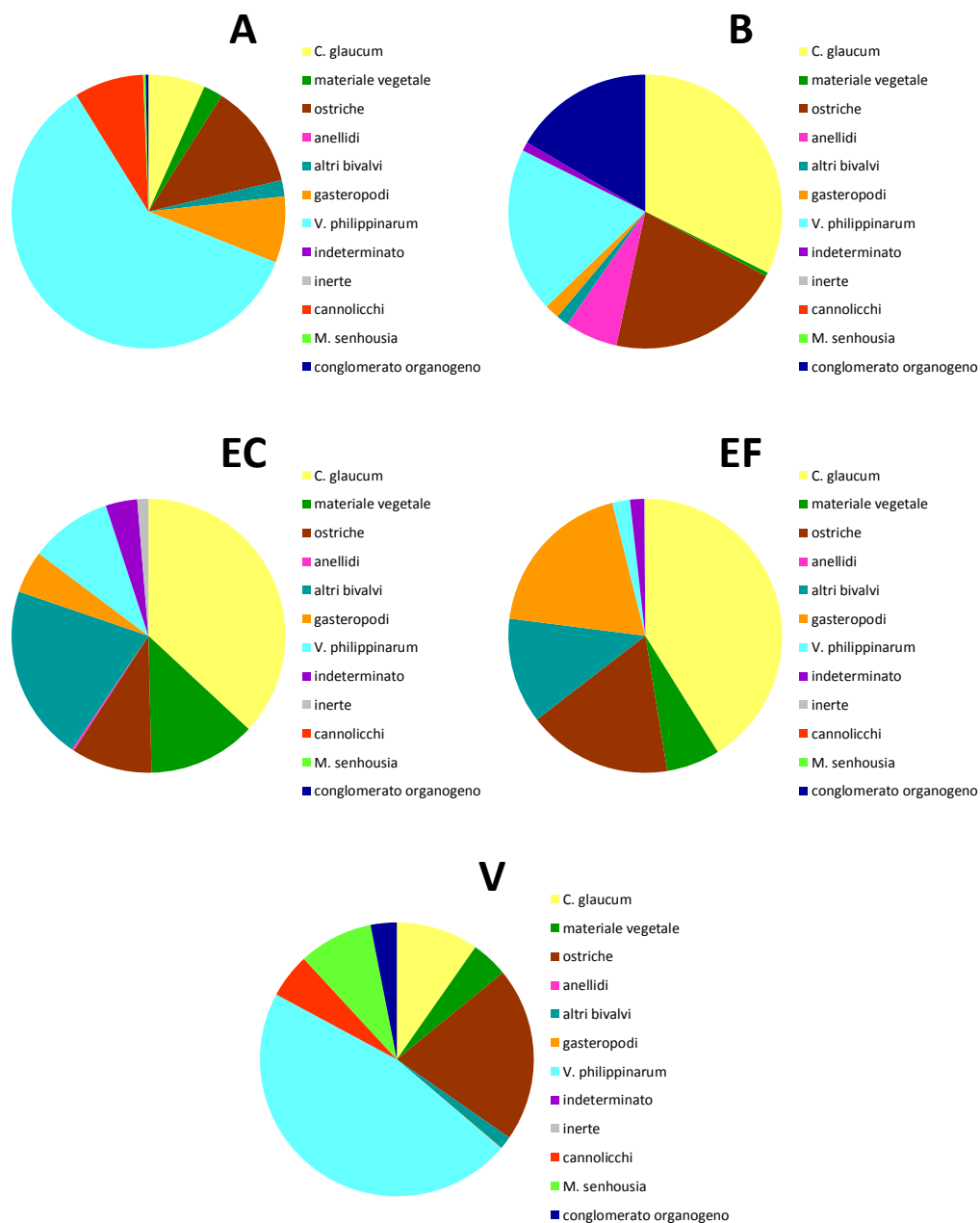


Figura 137: Composizione media dello scarto (percentuale in peso sul totale) per le 5 stazioni considerate.

Osservando il grafico di **Figura 136** si nota come rispetto al totale prelevato (circa 400 g WW) la quota di “non vivo” sia maggiore nei siti EC e EF (come già evidenziato in **Figura 135**), ma in tutti i casi si differenzi molto al proprio interno. Questa rappresentazione grafica unita a quella di **Figura 137** permettono di mettere in luce anche in questo caso alcune differenziazioni:

- *C. glaucum* è la classe prevalente nei siti EC, EF e B;
- il materiale vegetale, costituito sostanzialmente da piccoli pezzi di legno, è presente in particolare nei siti EC e EF, ma anche A e V;
- le conchiglie di ostriche sono presenti con una quota rilevante in tutti i siti;

- la presenza di anellidi caratterizza il sito B;
- le conchiglie di “altri bivalvi” costituiscono una quota rilevante nei siti EC e EF;
- i gasteropodi sono particolarmente presenti nel sito EF, ma anche nei siti EC e A;
- conchiglie di *V. philippinarum* si trovano in tutti i campioni, ma sono prevalenti nei siti A e V;
- i canalicchi sono presenti solo nei siti A e V;
- le conchiglie di *M. senhousia* si trovano solo nei campioni provenienti dal sito V;
- i conglomerati organogeni sono presenti con la quota maggiore nel sito B e secondariamente nel sito V.

Inoltre dalla **Figura 137** emerge la somiglianza in termini di composizione percentuale tra il sito A e il sito V (con dominanza di *V. philippinarum*, presenza di canalicchi, ostriche e *C. glaucum*) e tra i siti EC e EF (con prevalenza di *C. glaucum*, presenza di materiale vegetale, altri bivalvi, ostriche e gasteropodi); il sito B non presenta una particolare dominanza di una categoria sulle altre, con quote ugualmente significative di *C. glaucum*, ostriche, conglomerato organogeno e *V. philippinarum*.

Al fine di rilevare la significatività delle variabili selezionate nel distinguere i campioni, la matrice di dati relativi alla composizione qualitativa dello scarto è stata normalizzata ed è stata condotta la Cluster Analysis (metrica: distanza euclidea, metodo di agglomerazione: metodo di Ward) tramite il software XLStat Addinsoft™: i risultati ottenuti sono riportati in **Figura 138** (Q-mode) e in **Figura 139** (R-mode). Si noti che anche qui la linea tratteggiata indica il livello di troncamento per l'individuazione dei gruppi nel dendrogramma, individuato secondo il criterio automatico integrato nel software XLStat, come già spiegato in **3.2.3 Risultati e discussione**.

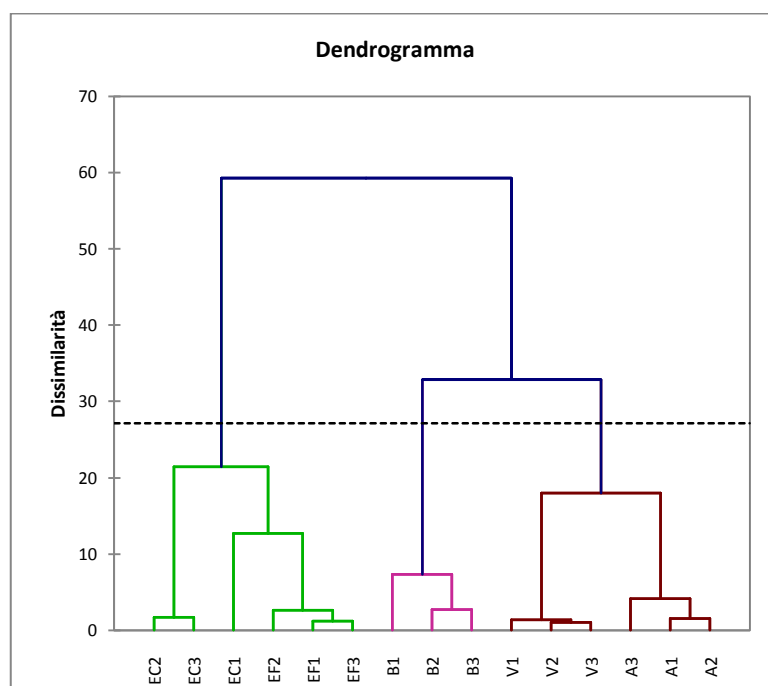


Figura 138: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode (raggruppamento dei campioni) sulla matrice di dati relativi alla composizione qualitativa dello scarto.

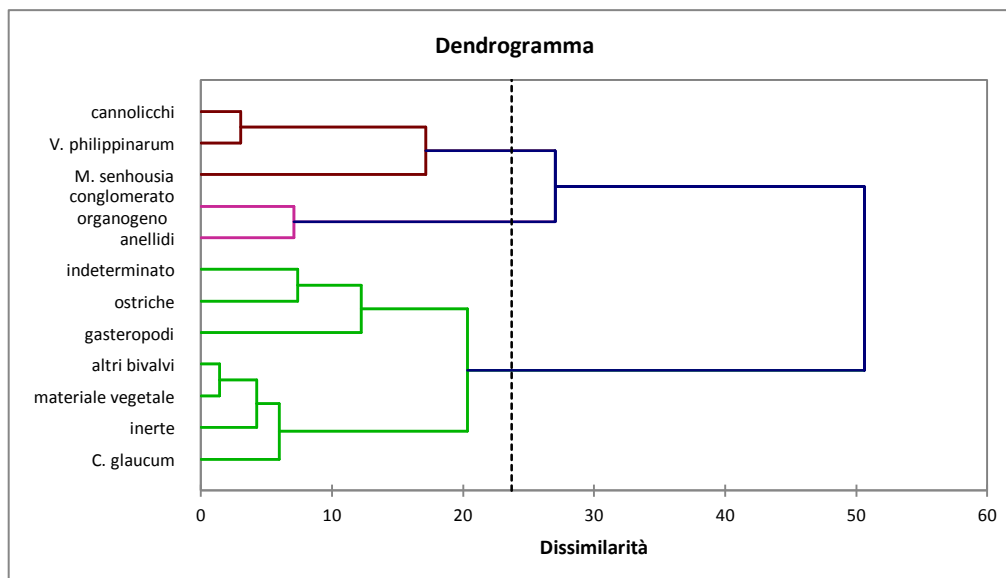


Figura 139: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode (raggruppamento delle variabili) sulla matrice di dati relativi alla composizione qualitativa dello scarto.

Dal dendrogramma di **Figura 138** emerge la differenziazione in 3 gruppi principali:

- il primo gruppo (in verde) comprende i campioni dei siti EC e EF (questi ultimi sono raggruppati tra di loro, un altro gruppo è dato dai campioni EC2 e EC3 mentre EC1 è a se stante e più simile ai campioni EF);
- il secondo gruppo (in rosa) è formato esclusivamente dai campioni provenienti dal sito B;
- il terzo gruppo (in marrone) comprende i campioni provenienti dai siti A e V a loro volta ben separati tra loro.

L'analisi in R-mode mette in luce come le categorie "canalicchi", "*V. philippinarum*" e "*M. senhousia*" concorrano nel separare il terzo gruppo (siti A e V) dagli altri e in particolare dai campioni di EC e EF che presentano invece un'abbondanza di *C. glaucum*. In generale la Cluster Analysis conferma le somiglianze già individuate tramite il confronto dei grafici a torta di **Figura 137**.

La stessa matrice di dati normalizzata è stata utilizzata per la Principal Component Analysis (PCA) estraendo, tramite il software XLStat AddinsoftTM, due componenti principali che spiegano complessivamente poco meno del 60% della varianza dei dati e che sono state utilizzate per costruire lo score plot e il loading plot di **Figura 140** e **Figura 141**, rispettivamente.

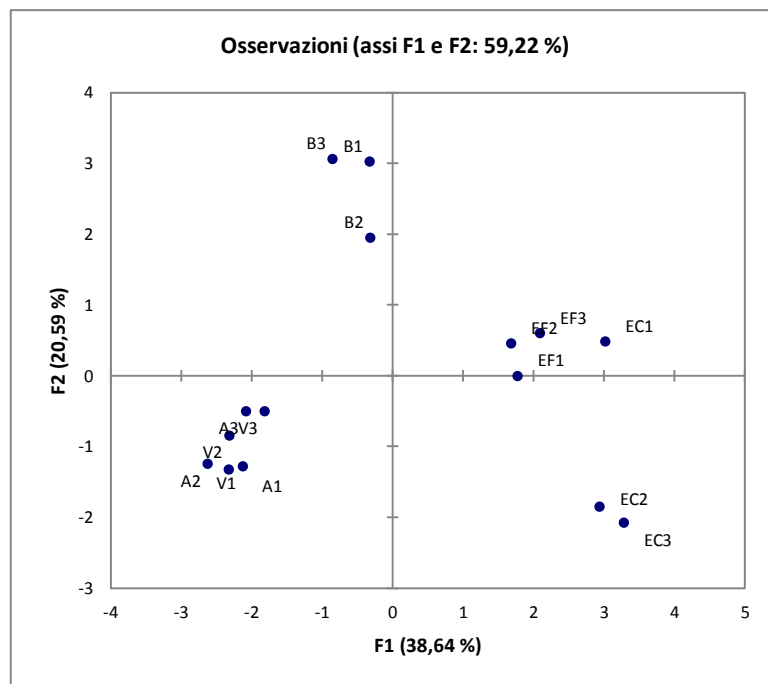


Figura 140: Score plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla composizione qualitativa dello scarto da venericoltura.

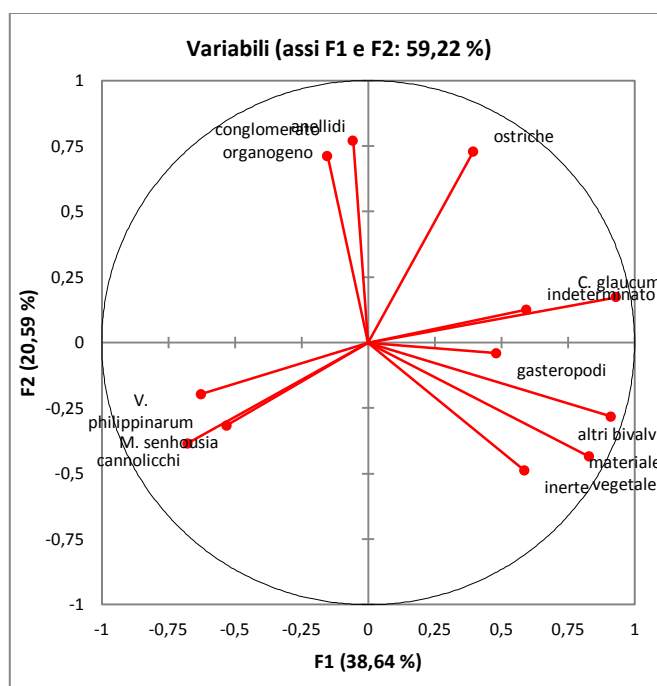


Figura 141: Loading plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla composizione qualitativa dello scarto da venericoltura.

I risultati della PCA sono in linea con quanto già emerso con la Cluster Analysis e i grafici precedenti: l'unico aspetto evidenziabile è la presenza di un raggruppamento a sé formato dai campioni EC2 e EC3 che si distanziano dal resto dei campioni provenienti dal sito della Perognola (EC e EF) in quanto caratterizzati dalla presenza di una maggior quota di inerte.

In generale le variabili analizzate sono in grado di raggruppare i campioni in modo statisticamente significativo: se ne deduce quindi, che la composizione qualitativa dello scarto da venericoltura varia a seconda del sito di provenienza all'interno della laguna di Venezia.

Si riportano infine due grafici (**Figura 142** e **Figura 143**) relativi al confronto tra la composizione qualitativa di campioni di scarto prelevati nei siti EC e V in diversi periodi dell'anno, condotto mediante il prelievo di campioni (3 repliche per sito) in momenti successivi (nei mesi di agosto 2013 e febbraio 2014 per il sito EC; nel solo mese di febbraio 2014 per il sito V) come descritto in **5.2.1 Campionamento**.

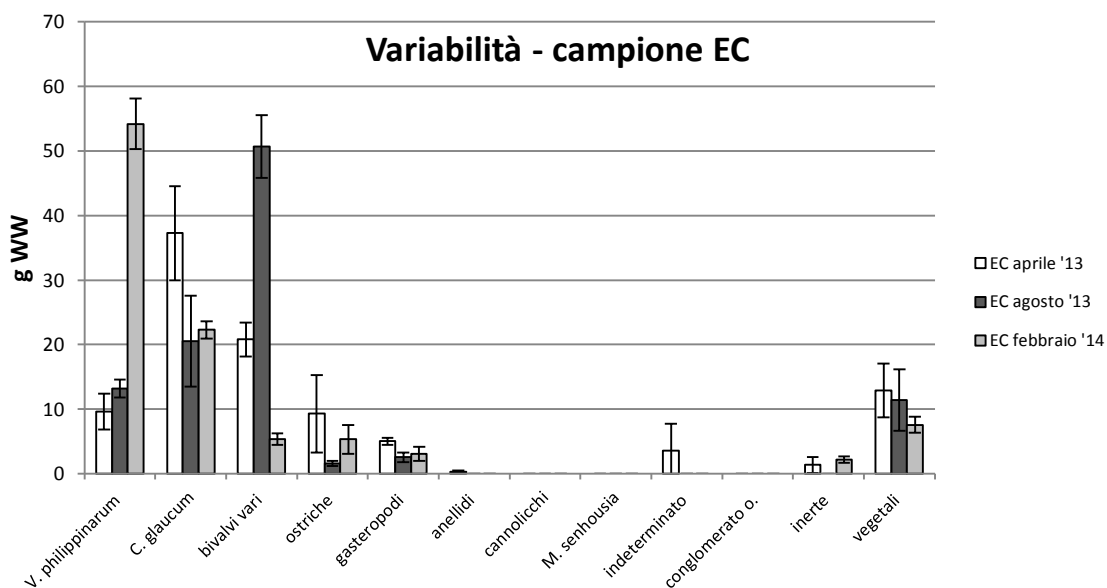


Figura 142: Confronto della composizione qualitativa rispetto alle diverse classi individuate dei campioni di scarto provenienti dal sito EC prelevati in aprile 2013, agosto 2013 e febbraio 2014.

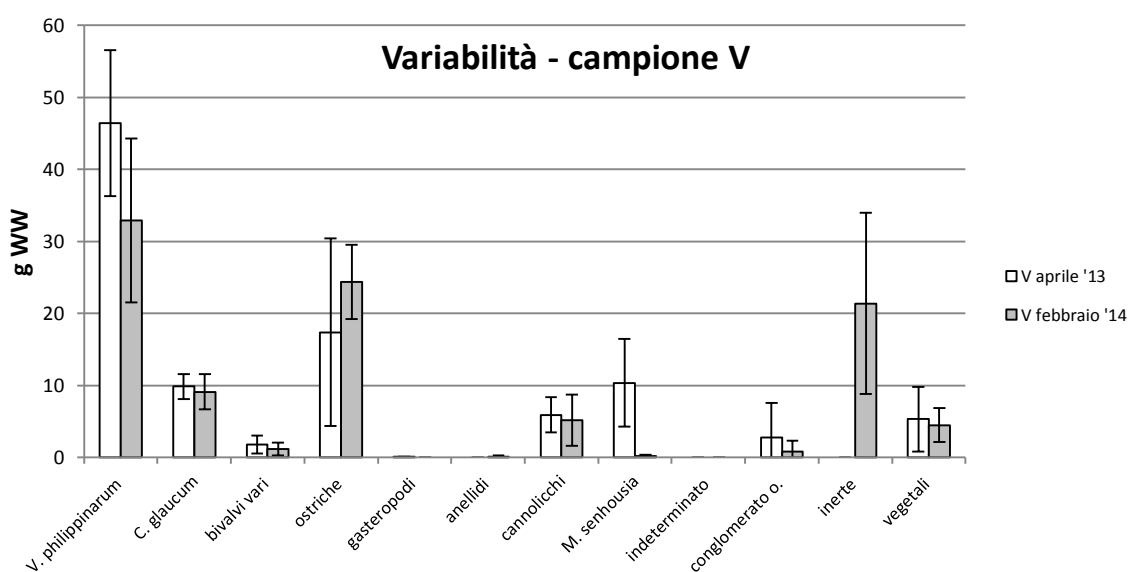
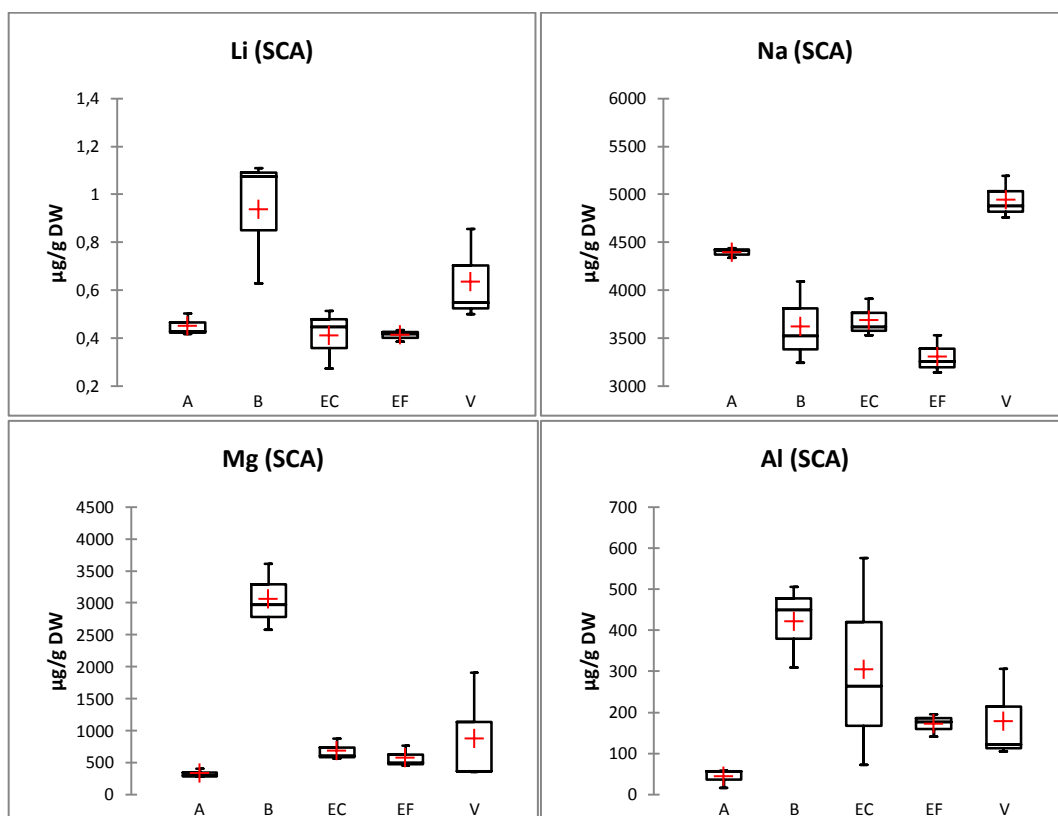


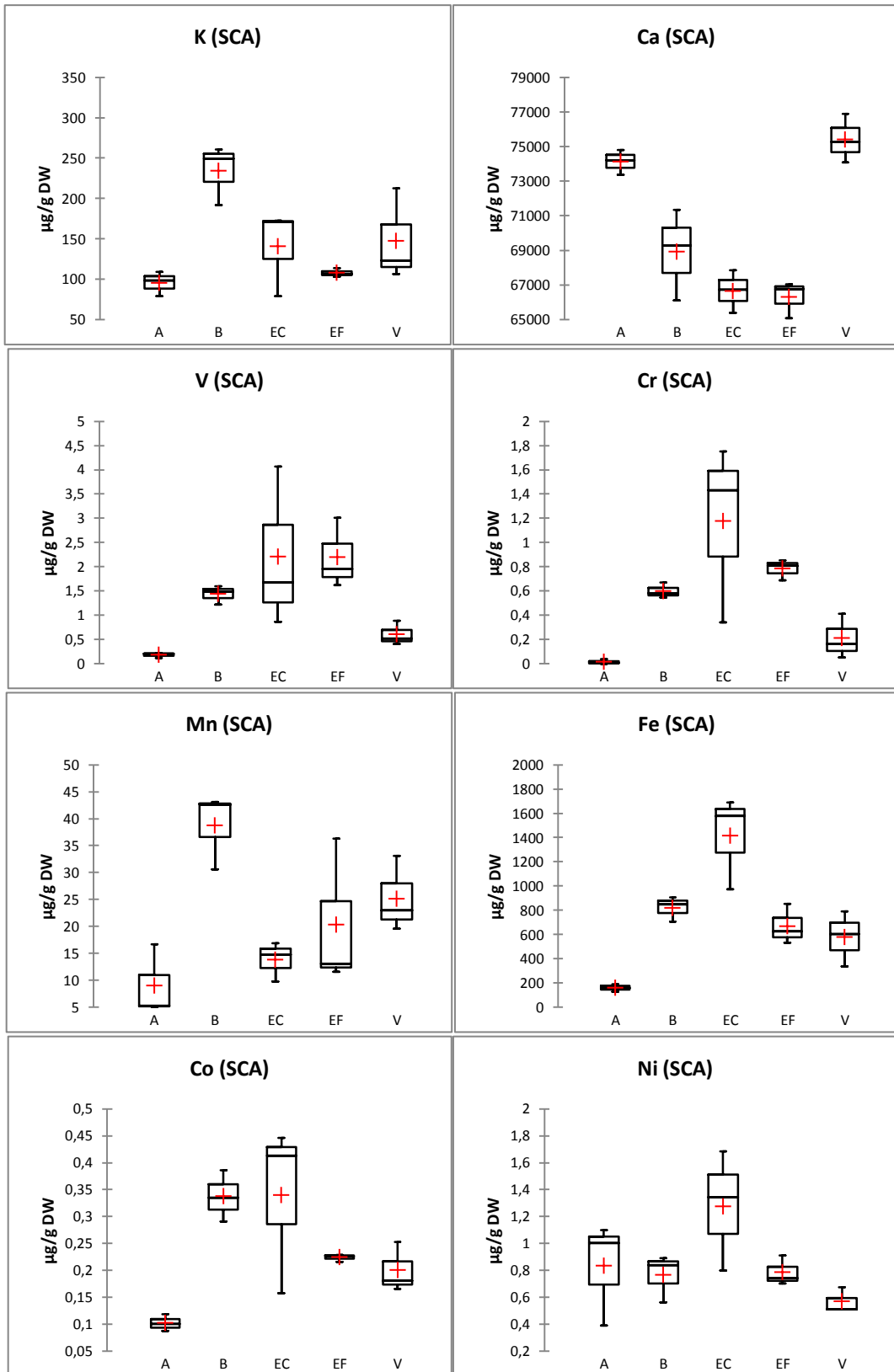
Figura 143: Confronto della composizione qualitativa rispetto alle diverse classi individuate dei campioni di scarto provenienti dal sito V prelevati in aprile 2013 e febbraio 2014.

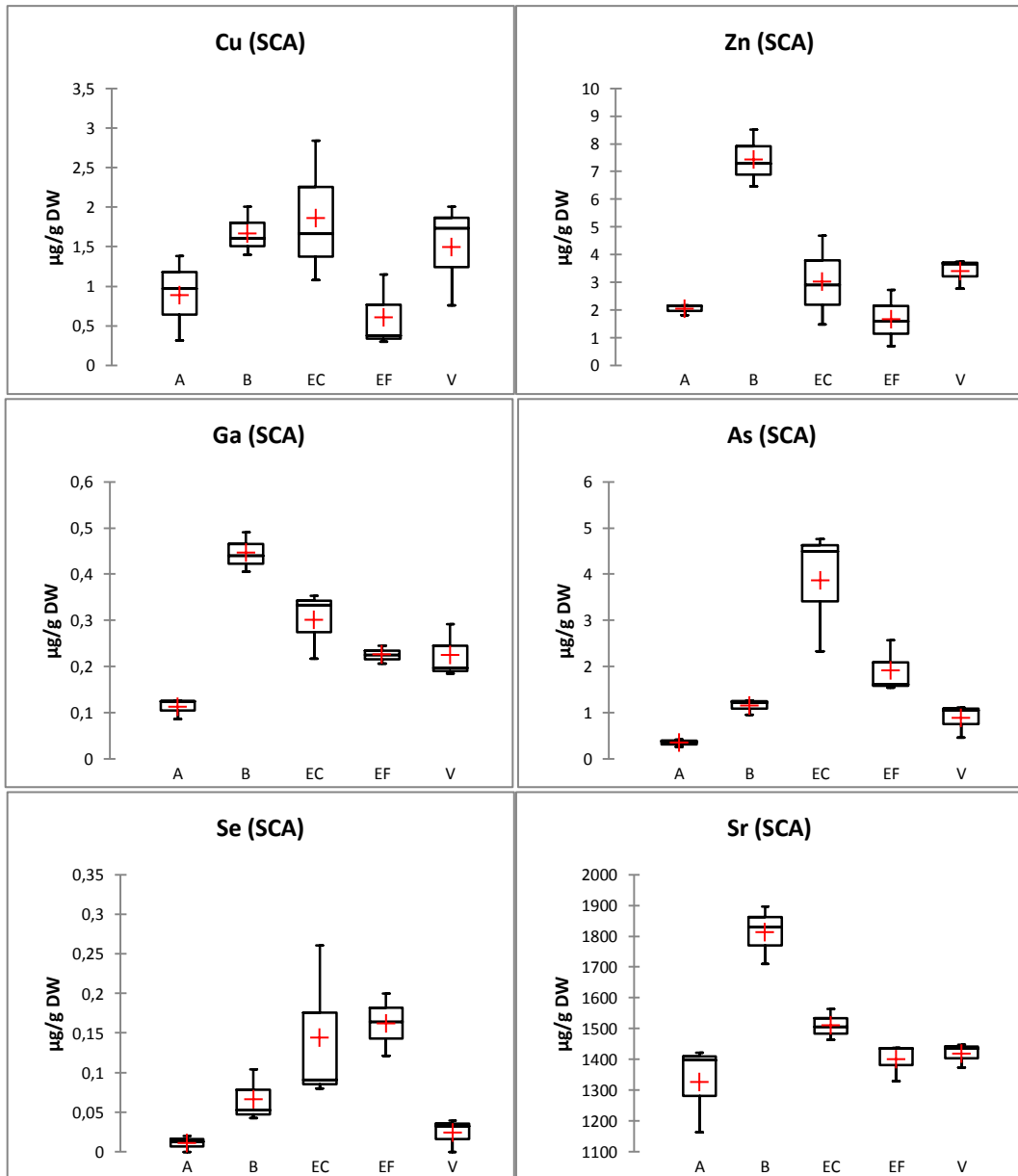
Il confronto dei grafici riportati in **Figura 142** e in **Figura 143** rispettivamente per il sito EC e per il sito V mette in luce come lo scarto da venericoltura possa presentare delle variazioni in termini di contenuto relativo di alcune classi nell'arco dell'anno, variazioni certamente legate agli andamenti stagionali nelle popolazioni dei gruppi tassonomici considerati, ma che possono dipendere anche dal rimescolamento del materiale causato dal progressivo sversamento dello scarto a seguito delle operazioni di raccolta della vongola verace (in particolare nel sito V dove lo sversamento avviene all'interno dell'area di concessione); si conferma tuttavia la presenza di alcune classi dominanti, in particolare *V. philippinarum*, *C. glaucum*, bivalvi vari e materiale vegetale nel sito EC e *V. philippinarum*, ostriche e *C. glaucum* nel sito V.

5.3.2 Scarto: analisi elementale

Di seguito in **Figura 144** si riportano i box plot relativi ai valori di concentrazione in $\mu\text{g g}^{-1}$ Dry Weight ottenuti per i diversi elementi analizzati secondo la procedura descritta in **5.2.3 Analisi elementale dello scarto** nelle cinque stazioni di campionamento.







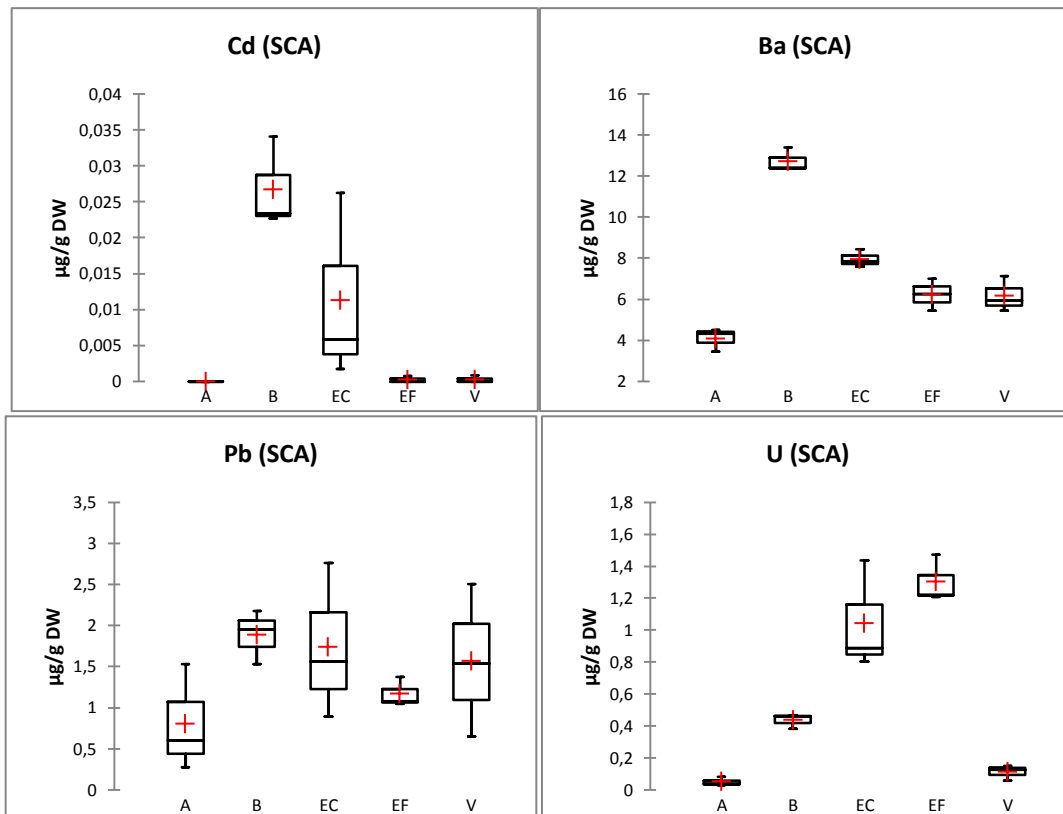


Figura 144: Box plot relativi ai valori di concentrazione degli elementi considerati nello scarto (SCA) prelevato nei 5 siti. [Il rettangolo è delimitato dal primo e dal terzo quartile e diviso al suo interno dalla mediana; i segmenti sono delimitati dal minimo e dal massimo dei valori. In rosso è indicato il valore medio, mentre gli asterischi e i cerchi corrispondono agli outliers].

Osservando i risultati si possono suddividere gli elementi analizzati in tre gruppi:

- il gruppo di Na e Ca, nel quale il valore più elevato di concentrazione si registra per il sito V e poi a scalare per i siti A, B, EC e EF;
- il gruppo comprendente Li, Mg, Al, K, Mn, Zn, Ga, Sr, Cd, Ba e Pb per i quali il valore più elevato di concentrazione si registra nel sito B e il valore più basso nel sito A, mentre i siti EC, EF e V sono situati in una posizione intermedia;
- il gruppo che comprende gli elementi V, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, As e Se, per i quali il sito EC presenta il valore più elevato (a questo gruppo si può aggiungere anche U anche se in questo caso a presentare il valore più elevato è il sito EF).

Confrontando questi risultati con quelli ottenuti analizzando la composizione elementare dei campioni di soft tissue (ST, **Figura 71**) e valve di *V. philippinarum* (**Figura 73**) e dei campioni di sedimento (**Figura 82**) prelevati negli stessi siti di campionamento, non si notano regressioni particolarmente significative (tanto che non si è ritenuto di riportarne qui i grafici), fatta eccezione per alcuni elementi per cui è possibile individuare andamenti comuni in più matrici; è il caso di

- Li e Mn che presentano un andamento tra i siti concorde nello scarto e nei soft tissue di *V. philippinarum*;
- Mg, Cr e Sr per i quali si registra lo stesso andamento tra i siti nello scarto e nei sedimenti;
- Mn, Ga, Ba e U per i quali si osserva una somiglianza tra gli andamenti tra i siti nello scarto e nelle conchiglie di *V. philippinarum*.

Nei dati ottenuti è stata verificata l'assenza di outliers; quindi sono stati normalizzati ed è stata condotta la Cluster Analysis (metrica: distanza euclidea, metodo di agglomerazione: metodo di Ward) tramite il software XLStat Addinsoft™: i risultati ottenuti sono riportati in **Figura 145** e **Figura 146** rispettivamente per quanto riguarda l'analisi condotta in Q-mode e in R-mode. Anche in questo caso in tutti i grafici seguenti riportanti i risultati della Cluster Analysis, la linea tratteggiata indica il livello di troncamento per l'individuazione dei gruppi nel dendrogramma, individuato secondo il criterio automatico integrato nel software XLStat, come già spiegato in **3.2.3 Risultati e discussione**.

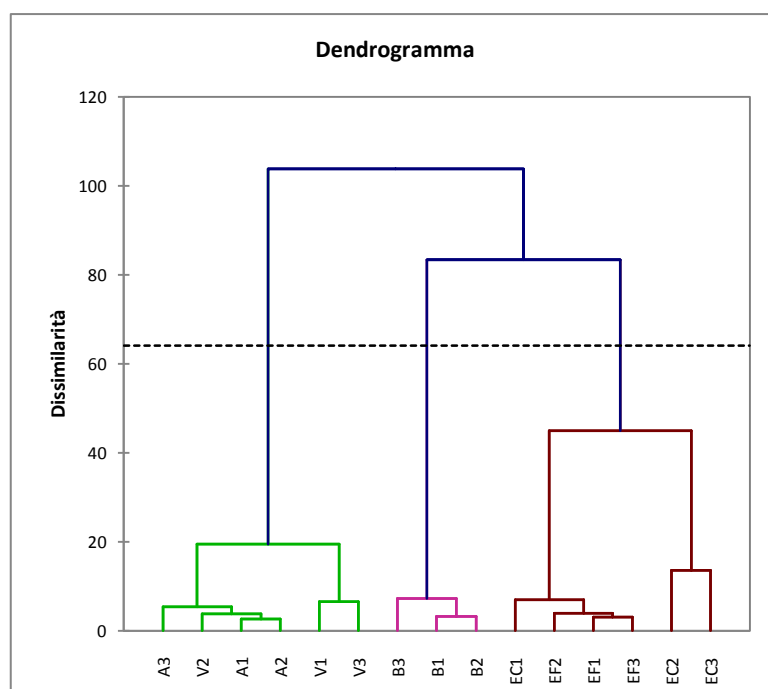


Figura 145: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode (raggruppamento dei campioni) sulla matrice di dati relativi alla composizione elementare dello scarto.

Il dendrogramma di **Figura 145** evidenzia la differenziazione in 3 gruppi principali, il primo comprendente i campioni del sito Perognola a sua volta suddiviso in due sottogruppi (che corrispondono sostanzialmente ai due siti EC e EF, in marrone), il secondo comprendente i campioni del sito B (in rosa) e infine un terzo comprendente i campioni del sito A e V (in verde).

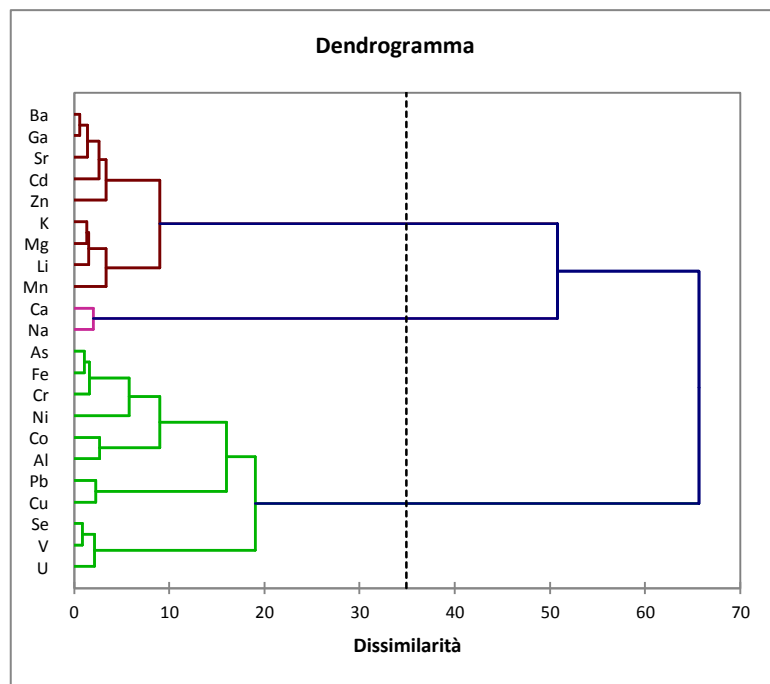


Figura 146: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode (raggruppamento delle variabili) sulla matrice di dati relativi alla composizione elementare dello scarto.

Osservando il dendrogramma di **Figura 146**, invece, si nota come la suddivisione delle variabili in 3 gruppi principali è sostanzialmente in linea con quanto descritto poc'anzi relativamente ai risultati presentati nei box plot, ad esclusione di Al e Pb che secondo la Cluster Analysis sono associati al terzo gruppo (quello che comprende tra gli altri V e Cr).

La matrice di dati normalizzata è stata sottoposta a Principal Component Analysis (PCA) tramite il software XLStat Addinsoft™; l'analisi estrae due componenti principali che spiegano complessivamente oltre il 76% della varianza dei dati e che sono state utilizzate per costruire lo score plot e il loading plot presentati in **Figura 147** e **Figura 148** rispettivamente.

La PCA individua un gruppo comprendente i campioni del sito A, V1 e V2 caratterizzati da valori elevati di Na e Ca e valori più bassi degli altri elementi rispetto agli altri campioni; il gruppo dei campioni B caratterizzati da valori relativamente elevati in particolare di Li, Zn, Mn, Mg e K; un terzo gruppo comprendente i campioni EF e EC1, da quale si distaccano leggermente i campioni EC2 e EC3, caratterizzati da valori più elevati di elementi come U, Se, As, Ni, V, Cr e Fe.

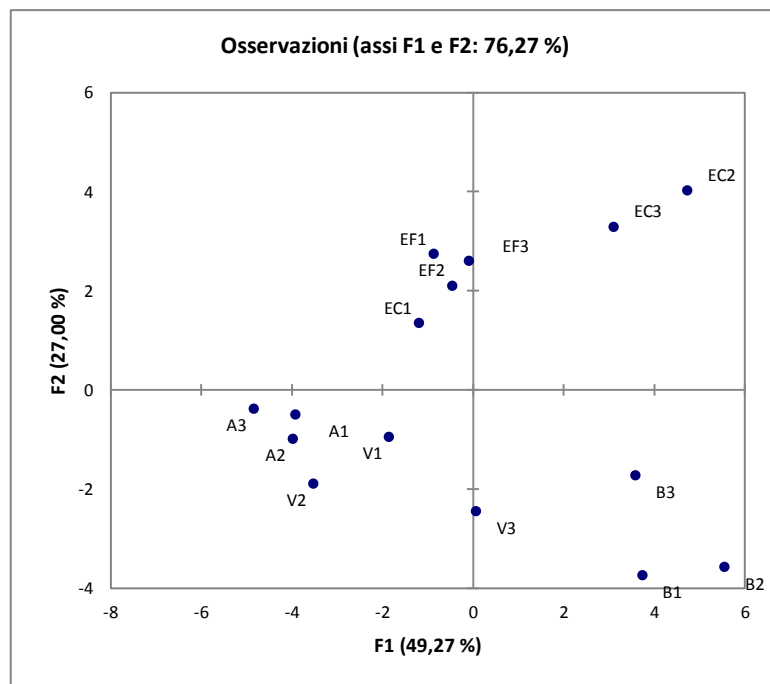


Figura 147: Score plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nello scarto da venericoltura.

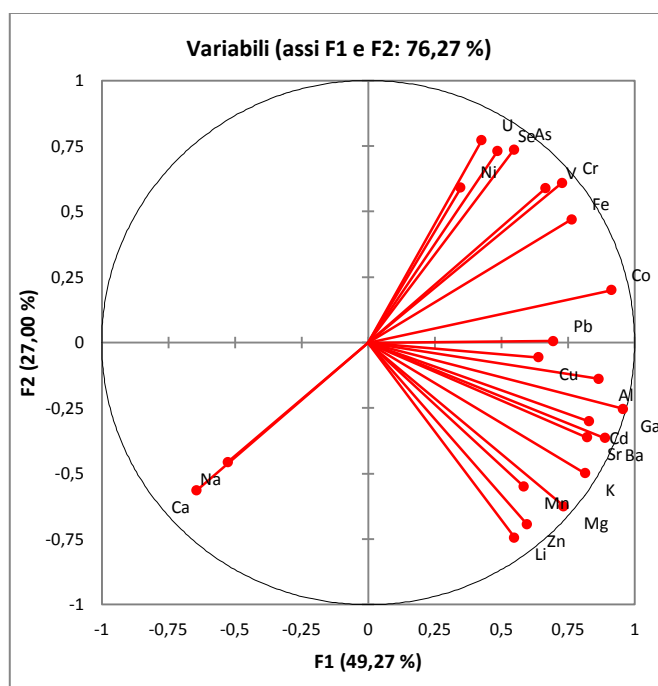


Figura 148: Loading plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati relativi alla concentrazione degli elementi considerati nello scarto da venericoltura.

In generale le analisi condotte sulla composizione elementale dello scarto mettono in luce che è possibile distinguere i campioni provenienti dai diversi punti di campionamento sulla base della loro composizione elementale. Questo risultato suggerisce l'esistenza di un legame tra la composizione qualitativa dello scarto in termini di gruppi tassonomici e la sua composizione elementale, in linea con quanto evidenziato nella prima

parte del presente lavoro riguardo all'influenza delle caratteristiche specie-specifiche sulla composizione della matrice carbonatica degli organismi Bivalvi.

Per approfondire questo aspetto tutti i risultati derivanti dall'analisi qualitativa e quantitativa dello scarto da venericoltura sono stati riuniti in un'unica matrice che è stata normalizzata (auto-scaling) e sottoposta a Cluster Analysis e PCA utilizzando il software XLStat Addinsoft™. Ne derivano i dendrogrammi di **Figura 149** e **Figura 150** (in Q-mode e R-mode rispettivamente) e lo score plot e il loading plot di **Figura 151** e **Figura 152**.

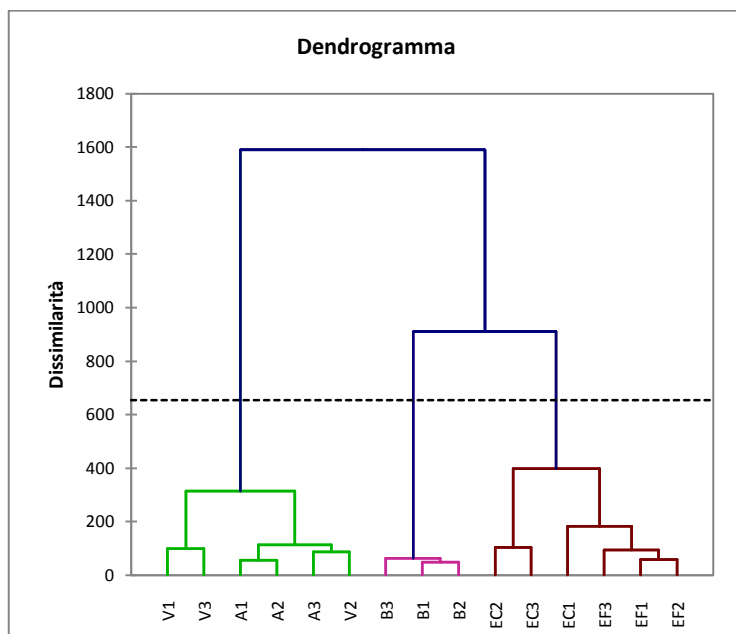


Figura 149: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in Q-mode (raggruppamento dei campioni) sulla matrice di dati contenenti la composizione qualitativa e elementale dello scarto.

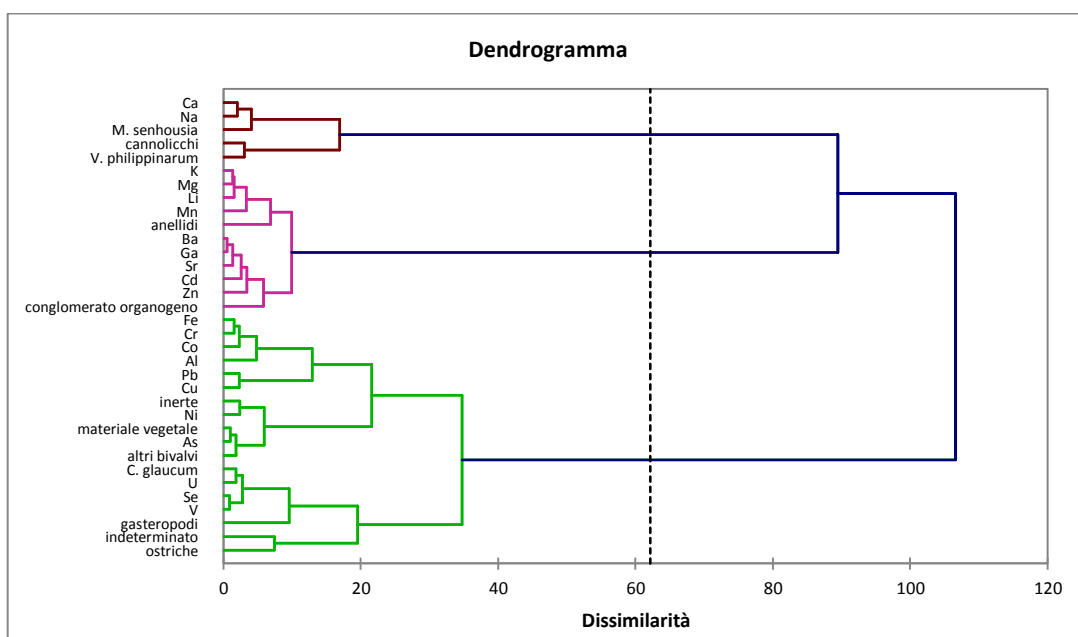


Figura 150: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis in R-mode (raggruppamento delle variabili) sulla matrice di dati contenenti la composizione qualitativa e elementale dello scarto.

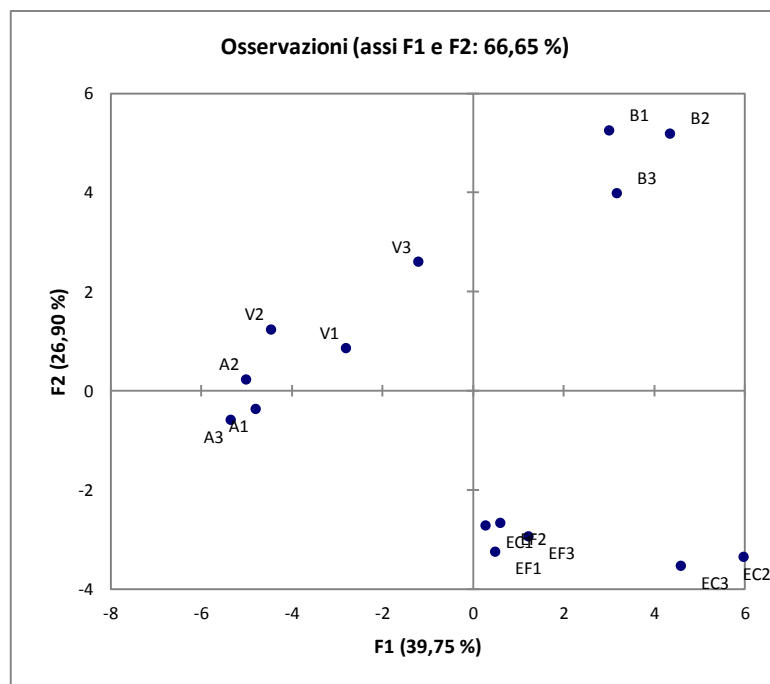


Figura 151: Score plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati qualitativi e di concentrazione degli elementi relativi allo scarto da venericoltura.

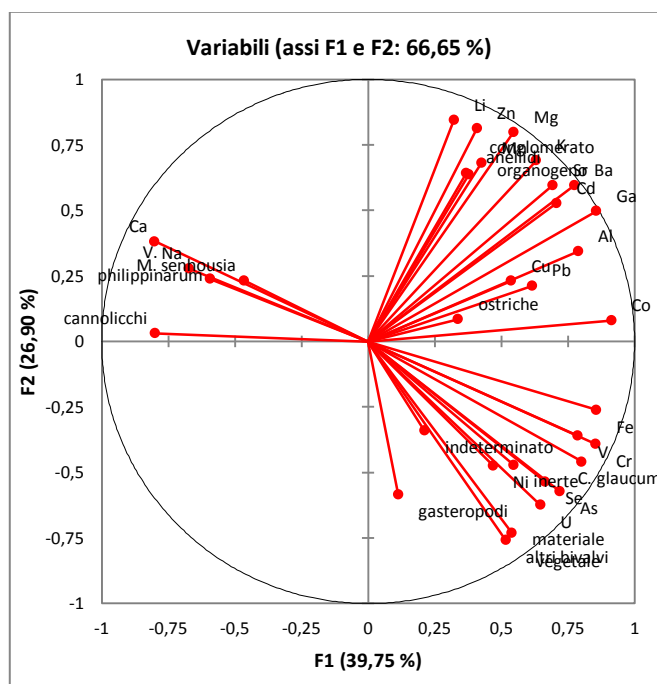


Figura 152: Loading plot risultante dalla PCA applicata alla matrice di dati qualitativi e di concentrazione degli elementi relativi allo scarto da venericoltura.

Entrambe le analisi sono concordi nel separare i campioni e le variabili in 3 classi nel modo seguente:

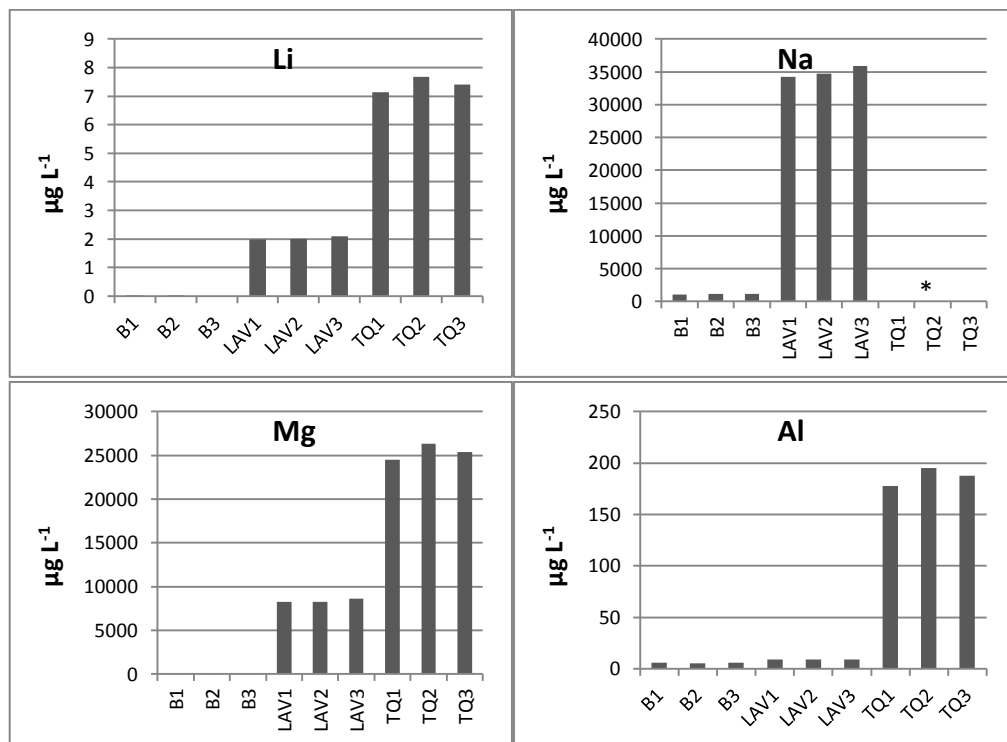
- i campioni del sito B caratterizzati da valori elevati degli elementi Li, Zn, Mg, Mn, Sr, Ba, Cd, Ga, Al e delle classi “anellidi” e “conglomerato organogeno”;

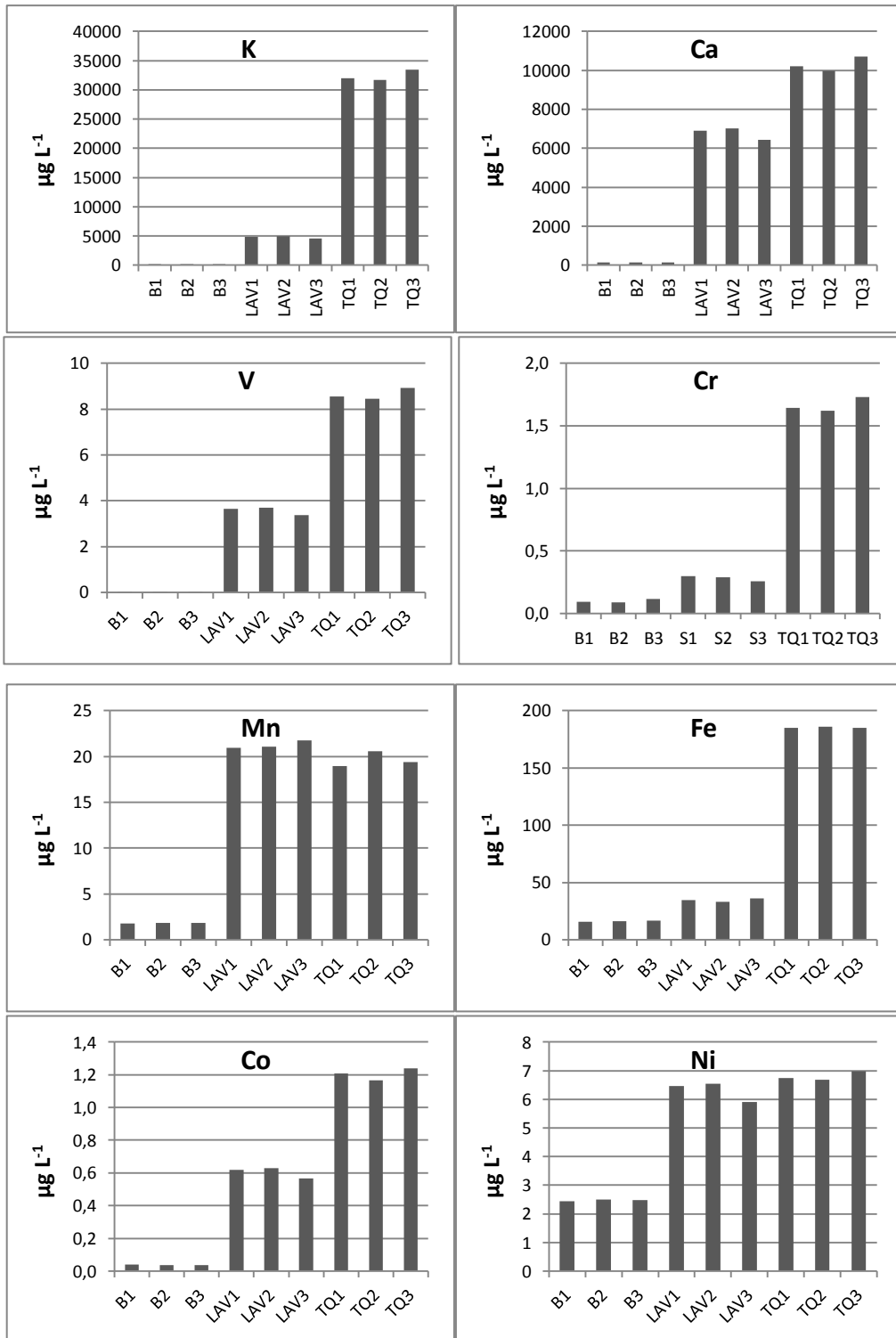
- i campioni dei siti A e V caratterizzati da valori elevati di Ca e Na, da un lato, e di “*V. philippinarum*”, “*Musculista spp.*” e “cannolicchi” dall’altra;
- i campioni dei siti EC e EF per i quali sono più elevati i valori di Fe, V, Cr, Se, As, U, Ni, “*Cerastoderma spp.*”, “inerte”, “indeterminato”, “materiale vegetale”, “altri bivalvi”, “gasteropodi”.

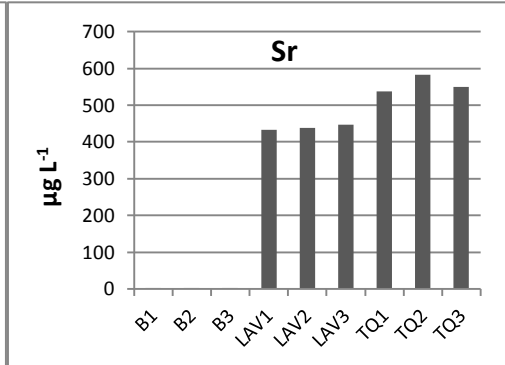
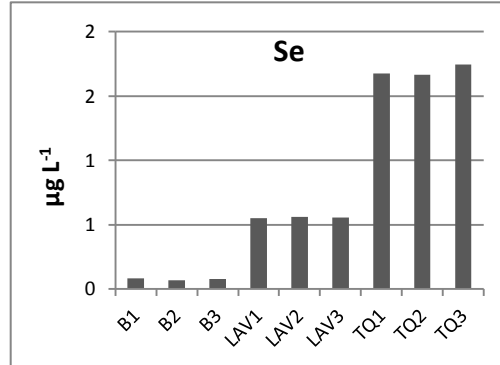
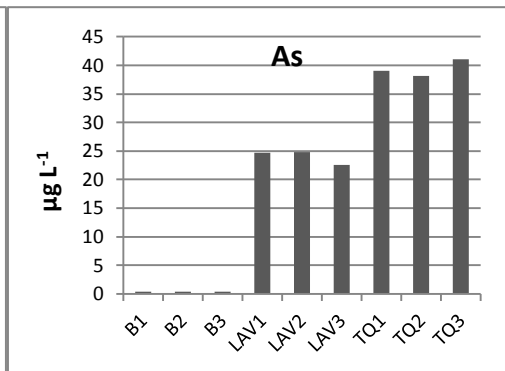
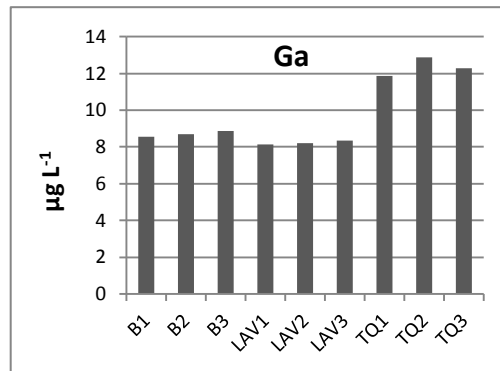
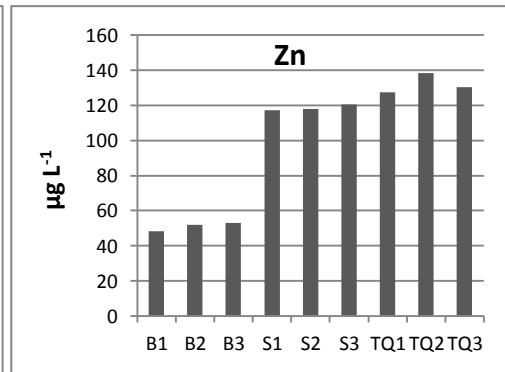
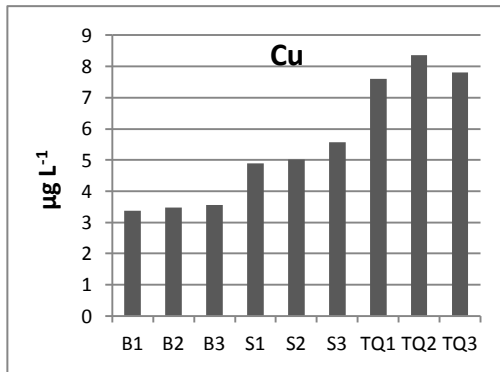
Tale classificazione mette in luce come la provenienza sia un fattore determinante nel differenziare lo scarto sia dal punto di vista della composizione qualitativa in termini di specie/raggruppamenti tassonomici sia in termini di composizione quantitativa rispetto agli elementi che sono stati analizzati. Inoltre, dato che alcune specie/raggruppamenti tassonomici ricorrono contestualmente a un gruppo di elementi, è probabile che le prime siano caratterizzate da concentrazioni particolarmente elevate dei secondi, confermando la variabilità intraspecifica in termini di composizione elementare osservata nella prima parte del lavoro.

5.3.3 Scarto: test di cessione

I risultati ottenuti dall’analisi dei lisciviati ottenuti dall’esecuzione dei test di cessione secondo la procedura prevista dalla UNI 10802:2013 per la parte riguardante “Campionamento manuale e preparazione e analisi degli eluati” per rifiuti liquidi, granulari, pastosi e fanghi e descritta in **5.2.4 Test di cessione sullo scarto** sono presentati in **Figura 153**.







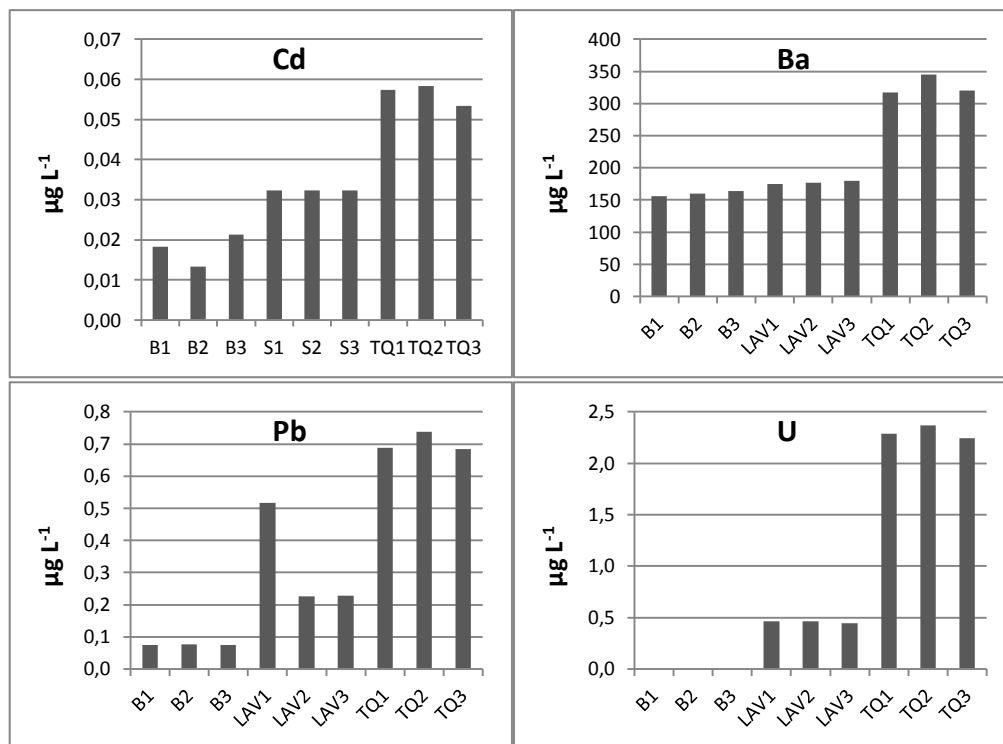


Figura 153: Valori di concentrazione degli elementi analizzati negli eluati derivanti dal test di cessione, dove con B si indicano i bianchi procedurali, con LAV gli elutriati derivanti dallo scarto lavato e con TQ gli elutriati derivanti dallo scarto tal quale (ciascuno in 3 repliche). Si noti che l'asterisco (*) nel grafico relativo a Na indica che i valori corrispondenti ai campioni TQ escono dal range di determinazione dello strumento.

In generale si può osservare come per la maggior parte degli elementi analizzati (Li, Na, Mg, Al, K, Ca, V, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Sr, Pb e U) i valori dei bianchi procedurali (B) siano i più prossimi allo zero, i valori relativi agli elutriati derivanti dallo scarto tal quale (TQ) siano i più elevati mentre i valori degli elutriati derivanti dallo scarto lavato (LAV) si attestino in una posizione intermedia tra i due (si noti che nel caso del sodio le concentrazioni presenti nei campioni TQ sono talmente elevate da uscire dal range di misurazione dello strumento per cui non è stato possibile determinarne il valore).

Nel caso del manganese si registrano valori molto bassi per i bianchi e valori comparabili tra i campioni LAV e TQ (che si attestano intorno ai $20 \mu\text{g L}^{-1}$) con i primi che superano di poco i secondi. Per Ga e Ba i valori dei campioni B e LAV si attestano allo stesso livello, mentre aumenta leggermente la concentrazione nel caso dei campioni TQ.

In ogni caso tutti i campioni (sia di scarto tal quale sia di scarto lavato) presentano concentrazioni ben al di sotto dei limiti stabiliti dalla tabella 2 del D.M. del 27 settembre 2010 (riportata per intero nella **Tabella 11** seguente) per i rifiuti smaltibili in discariche per inerti, per quanto riguarda gli elementi considerati nelle analisi effettuate nell'ambito di questo lavoro di ricerca (sottolineati in grigio in **Tabella 11**). Ne consegue che, limitatamente ai parametri analizzati, tutti gli eluati sono conformi alle concentrazioni stabilite dal D.M. del 27 settembre 2010 e, dunque, che lo scarto esaminato rientra per tali parametri nella definizione di rifiuto inerte secondo quanto previsto dall'articolo 5 del medesimo decreto.

Tabella 11: Limiti di concentrazione nell'eluato per l'accettabilità in discariche per rifiuti inerti (rapporto L/S = 10 L kg⁻¹), secondo D.M. del 27 settembre 2009.

elemento	mg/L
As	0,05
Ba	2
Cd	0,004
Cr totale	0,05
Cu	0,2
Hg	0,001
Mo	0,05
Ni	0,04
Pb	0,05
Sb	0,006
Se	0,01
Zn	0,4
Cloruri	80
Fluoruri	1
Solfati	100
Indice Fenolo	0,1
DOC (*)	50
TDS (**)	400

5.3.4 Esecuzione della batteria di test ecotossicologici sugli elutriati dello scarto

Al termine della procedura di preparazione sono stati misurati i valori di pH e di potenziale redox (E_h in mV) degli eluati ottenendo i risultati riportati in **Tabella 12** e la concentrazione di ammoniaca con metodo spettrofotometrico osservando i valori medi riportati in **Tabella 13**: si può notare come il campione V TQ presenti un valore di pH più basso di circa un'unità rispetto al controllo W e una concentrazione particolarmente elevata (15 mg L⁻¹) di ammoniaca molto probabilmente dovuta all'elevato contenuto di sostanza organica nello scarto di partenza; il valore di ammoniaca è tuttavia elevato anche nel campione V LAV.

Sulla base di queste osservazioni e tenuto conto del fatto che l'elevato contenuto di ammonio può essere considerato un fattore confondente nell'esecuzione dei test ecotossicologici, come rilevato da Arizzi Novelli *et al.* (2003) e Losso *et al.* (2007), è stato ritenuto opportuno non eseguire i test sugli elutriati derivanti dallo scarto prelevato nel sito V, considerando che le caratteristiche chimiche rilevate in tali campioni possano essere decisive nel determinare la risposta della batteria scelta.

Tabella 12: Valori di pH e E_h determinati sugli eluati al termine della procedura di preparazione. Si ricorda che G e W indicano gli elutriati derivanti dal geotessuto e i bianchi procedurali, rispettivamente.

	TQ		LAV	
	pH	E_h (mV)	pH	E_h (mV)
A	7,51	-25,4	7,95	-48,0
B	7,37	-17,3	7,84	-42,1
EC	7,57	-28,7	7,96	-49,3

V	7,16	-5,4	7,87	-44,0
G (2 repliche)	8,17	-62,6	8,03	-53,3
W	7,83	-43,5	8,00	-51,6

Tabella 13: Valori di concentrazione di ammonio espressi in mg L^{-1} determinati sugli eluati da scarto al termine della procedura di preparazione.

	TQ	LAV
A	0,00	0,09
B	0,97	0,00
EC	0,66	0,11
V	15	1,51

Di seguito si riportano i risultati ottenuti in seguito all'applicazione dei singoli test.

- **Microtox®**

L'esecuzione del test Microtox® con *V. fischeri* ha permesso di ottenere i risultati espressi in termini di percentuale di inibizione della bioluminescenza e riportati in **Figura 154** per quanto riguarda i campioni derivanti dallo scarto tal quale (TQ), in **Figura 155** per quanto riguarda gli elutriati derivanti dallo scarto lavato (LAV) e in **Figura 156** per quanto concerne i campioni derivanti dall'elutrazione del geocomposito.

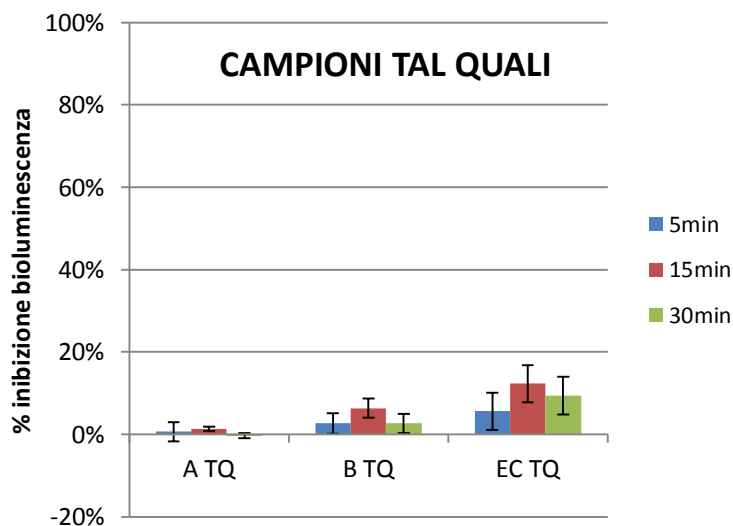


Figura 154: Valori medi della percentuale di inibizione e deviazione standard ($n=3$) nel test Microtox® per i campioni tal quali.

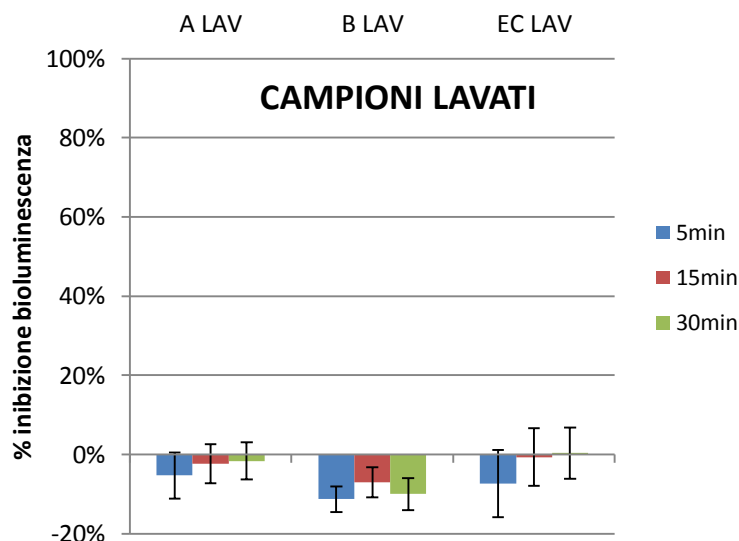


Figura 155: Valori medi della percentuale di inibizione e deviazione standard (n= 3) nel test Microtox® per i campioni lavati.

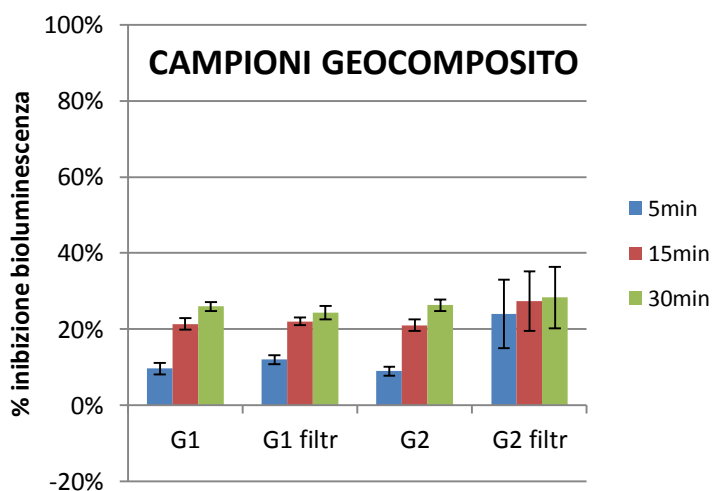


Figura 156: Valori medi della percentuale di inibizione e deviazione standard (n= 3) nel test Microtox® per i campioni di eluato da geocomposito (filtrati e non filtrati).

Dalla **Figura 154** si deduce che i campioni A TQ, B TQ, EC TQ saggiati al 100% non risultano tossici per questi organismi in quanto presentano un'inibizione inferiore al 20% (IRSA-CNR, 1996). I risultati relativi ai campioni di eluato da scarto lavato, presentati in **Figura 155**, mettono in luce l'assenza di effetto tossico e al contrario un leggero effetto bio-stimolante in particolare per il campione B LAV.

Per le due repliche derivanti dall'elutrazione del geocomposito, G1 e G2, che presentano una leggera tossicità in particolare a 15 e 30 minuti di esposizione (**Figura 156**), è stato ritenuto opportuno effettuare una seconda lettura previa filtrazione (*cut off*= 0,2 µm) su filtro in acetato di cellulosa (Whatman GD/X syringe filters, diametro 25 mm) al fine di eliminare le fibre di geotessile sospese, liberate durante la fase di elutrazione. In tal modo si è voluto indagare il possibile contributo alla tossicità dato dalla presenza delle fibre: dai risultati ottenuti non si rileva un contributo significativo (**Figura 156**) ascrivibile direttamente alla parte corpuscolata, dato il permanere della tossicità.

Poiché i risultati ottenuti in termini di percentuale di inibizione della bioluminescenza non superano mai il 30% è stato ritenuto opportuno non procedere con l'esecuzione dei test a diverse diluizioni per calcolare un eventuale valore di EC50 – diluizione tale da produrre un'inibizione della bioluminescenza (endpoint) pari al 50% – in quanto tale valore sarebbe superiore al 100% (campione non diluito).

Allo scopo di valutare il peso delle variabili (specificatamente: "sito", "trattamento", "tempo di esposizione") nel discriminare i diversi gruppi, i risultati del test Microtox® per tutti i campioni non diluiti relativi allo scarto sono stati trattati statisticamente tramite Multi-factor ANOVA (limite di confidenza $\alpha = 5\%$) e il test post-hoc di Tukey mediante il software XLStat Addinsoft™: i risultati sono riportati in **Figura 157**, **Figura 158** e **Figura 159** per le variabili "sito", "trattamento" e "tempo di esposizione", rispettivamente.

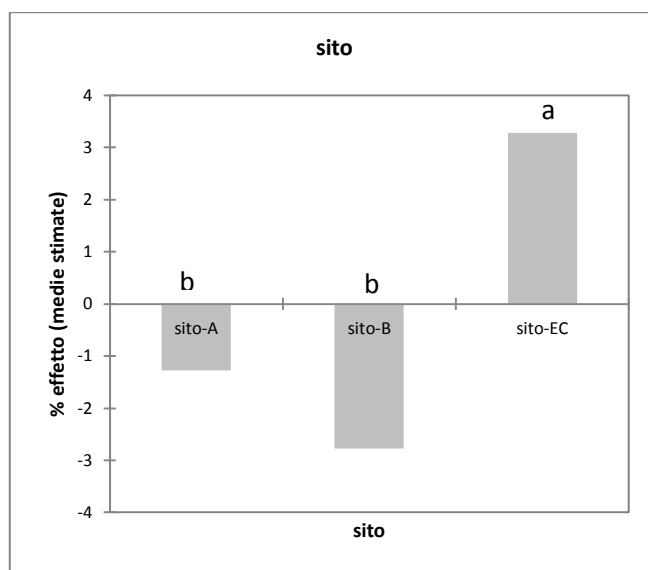


Figura 157: Gruppi individuati rispetto alla variabile "sito" tramite Multi-factor ANOVA e test di Tukey applicati ai risultati del test Microtox® per gli elutriati da scarto.

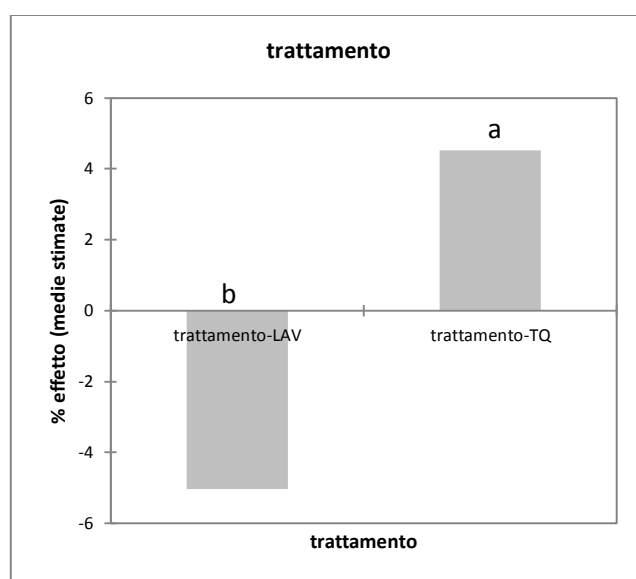


Figura 158: Gruppi individuati rispetto alla variabile "trattamento" tramite Multi-factor ANOVA e test di Tukey applicati ai risultati del test Microtox® per gli elutriati da scarto.

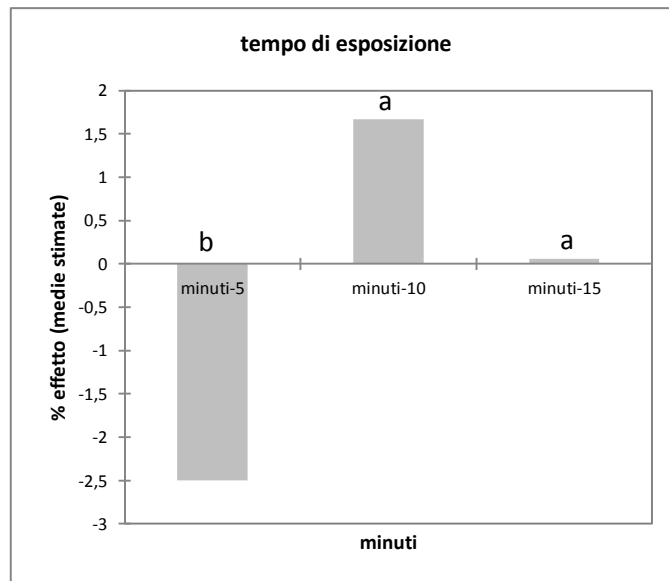


Figura 159: Gruppi individuati rispetto alla variabile “tempo di esposizione” tramite Multi-factor ANOVA e test di Tukey applicati ai risultati del test Microtox® per gli elutriati da scarto.

I risultati ottenuti dall’ANOVA mettono in luce l’esistenza di una differenza significativa tra i campioni provenienti dai siti A, B e i campioni provenienti dal sito EC (**Figura 157**), molto probabilmente a causa della maggiore tossicità dell’elutriato tal quale (EC TQ) testato al 100%. Inoltre si può considerare statisticamente significativa la diversa tossicità tra i campioni derivanti da scarto lavato e tal quale (**Figura 158**); per quanto riguarda i tempi di esposizione (**Figura 159**) appare differente la risposta che si ottiene dopo 5 minuti rispetto a quelle che si ottengono in tempi più lunghi (10 e 15 minuti).

La Multi-factor ANOVA (limite di confidenza $\alpha = 5\%$) e il test di Tukey sono stati condotti mediante il software XLStat Addinsoft™ anche sui risultati del test Microtox® per tutti i campioni non diluiti di eluato da geocomposito rispetto alle variabili “trattamento” (inteso in termini di campione filtrato o non filtrato) e “tempo di esposizione”. I risultati sono presentati in **Figura 160** e **Figura 161** per le due variabili, “trattamento” e “tempo di esposizione”, rispettivamente.

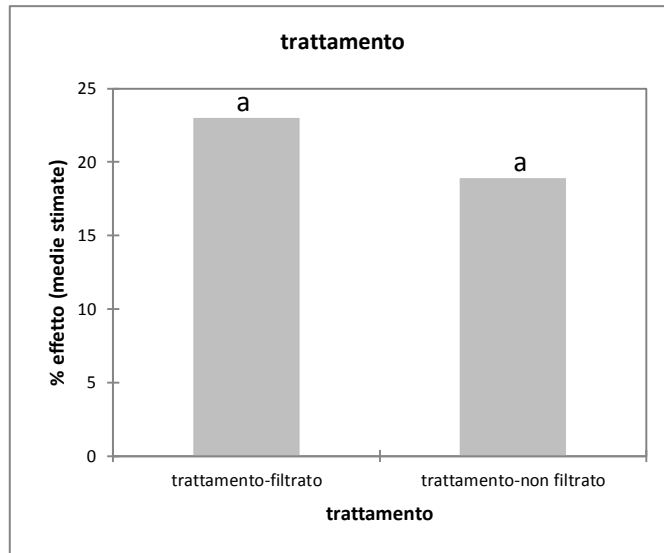


Figura 160: Gruppi individuati rispetto alla variabile “trattamento” tramite Multi-factor ANOVA e test di Tukey applicati ai risultati del test Microtox® per gli elutriati da geocomposito.

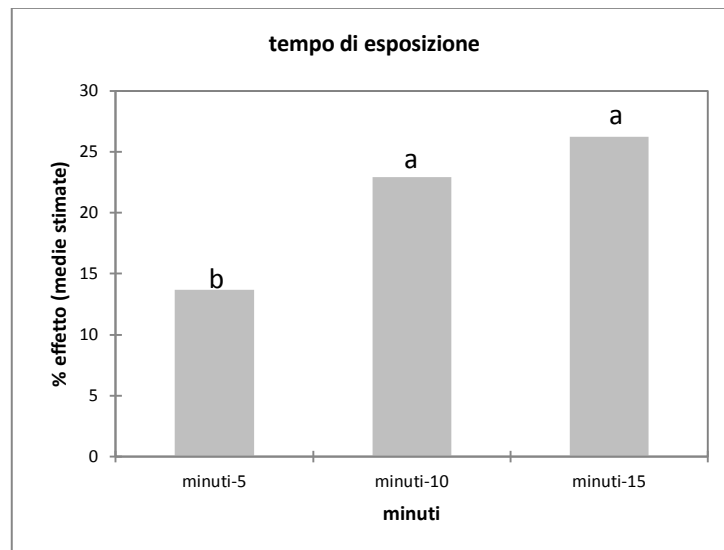


Figura 161: Gruppi individuati rispetto alla variabile “tempo di esposizione” tramite Multi-factor ANOVA e test di Tukey applicati ai risultati del test Microtox® per gli elutriati da geocomposito.

In questo caso i risultati (**Figura 160**) confermano l’ininfluenza della filtrazione sulla tossicità dei campioni derivanti dall’elutrazione del geocomposito, ma rilevano una differenza significativa (**Figura 161**) per quanto riguarda i tempi di esposizione, differenziando l’esposizione a 5 minuti, a conferma di quanto messo in luce con i test condotti sugli elutriati da scarto.

- **Test di inibizione della crescita algale con *P. tricornutum***

I risultati ottenuti dai test effettuati sui campioni al 100% sono presentati di seguito in **Figura 162**, in **Figura 163** e in **Figura 164**, per gli elutriati derivanti dallo scarto tal quale, dallo scarto lavato e dal geotessuto, rispettivamente, espressi come percentuale di inibizione della crescita cellulare rispetto al controllo negativo per i differenti campioni analizzati.

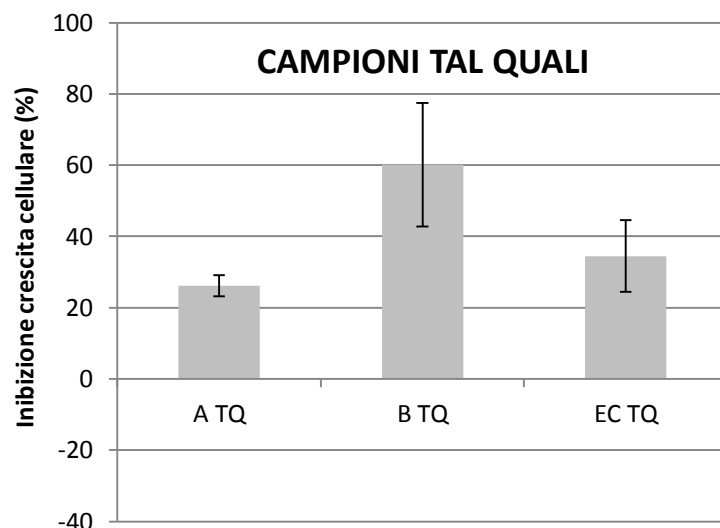


Figura 162: Valori medi e deviazione standard (n= 3) di inibizione della crescita cellulare dei campioni tal quali nel test con *P. tricornutum*.

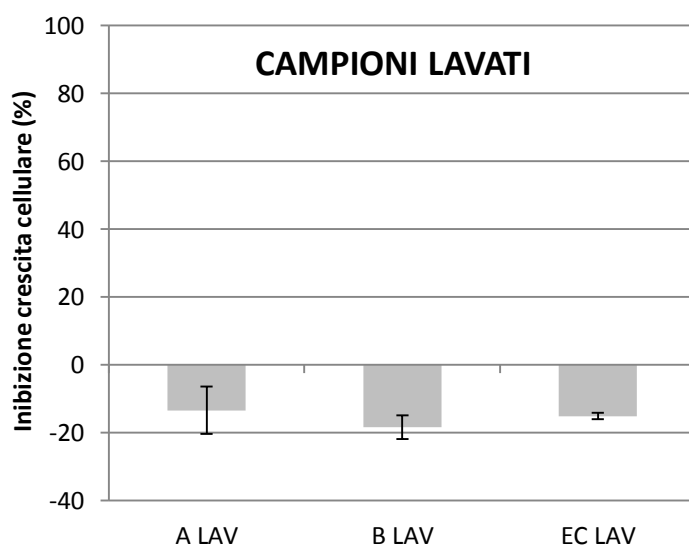


Figura 163: Valori medi e deviazione standard (n= 3) di inibizione della crescita cellulare dei campioni lavati nel test con *P. tricornutum*.

Confrontando i valori medi di inibizione della crescita cellulare ottenuti per i campioni derivanti dallo scarto tal quale riportati in **Figura 162** si nota un effetto inibitorio medio che supera il 20% per il campione A TQ, il 30% per i campioni EC TQ e addirittura il 60% per il campione B TQ. Nel caso dei campioni derivanti dall'elutrazione dello scarto lavato (**Figura 163**) i valori di inibizione della crescita cellulare presentano valori negativi sempre maggiori del -10%, indicando che in questi casi non è evidenziabile un effetto tossico, ma, al contrario, si ha un leggero effetto bio-stimolante.

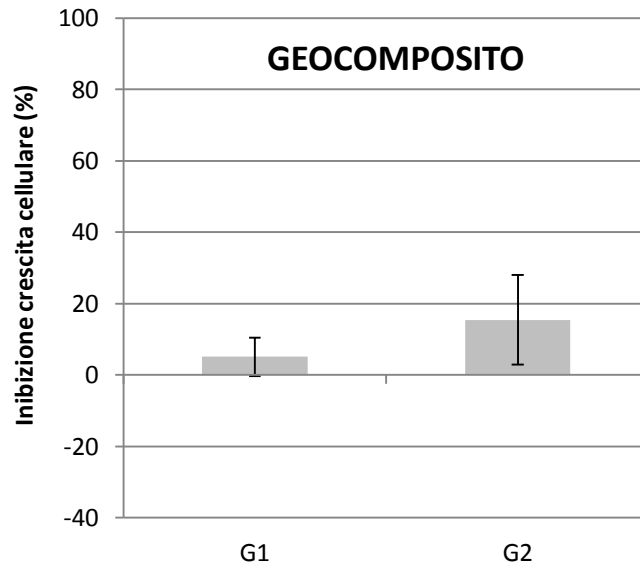


Figura 164: Valori medi e deviazione standard (n= 3) di concentrazione cellulare dei campioni di eluato da geocomposito nel test di inibizione della crescita algale rispetto al controllo.

Per quanto riguarda i campioni di elutriato da geocomposito, il grafico di **Figura 164** mostra una leggera tossicità per entrambe le repliche (G1 e G2) che in valore medio si attesta al 10%.

Sulla base dei risultati ottenuti è stato ritenuto opportuno proseguire le indagini effettuando il test sui campioni tal quali (TQ) a diverse diluizioni (5%, 15%, 30%, 60%, 90% di campione sul totale) in modo da procedere, quando possibile, al calcolo dell'IC50 (inteso come il valore di concentrazione che inibisce al 50% la crescita cellulare). Da questi dati, una volta calcolati i corrispondenti valori di percentuale di inibizione del tasso di crescita, è stato possibile procedere con le regressioni lineari (**Figura 165, Figura 166, Figura 167**), individuare l'equazione della retta che meglio interpola i dati e calcolare i valori di IC50.

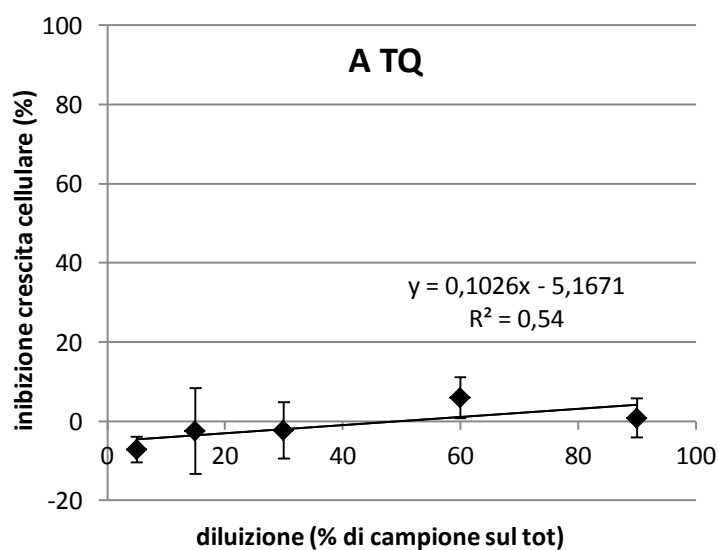


Figura 165: Valori medi (n= 3) della percentuale di inibizione del tasso di crescita alle diverse concentrazioni (esprese come % di campione sul totale) per il campione A TQ.

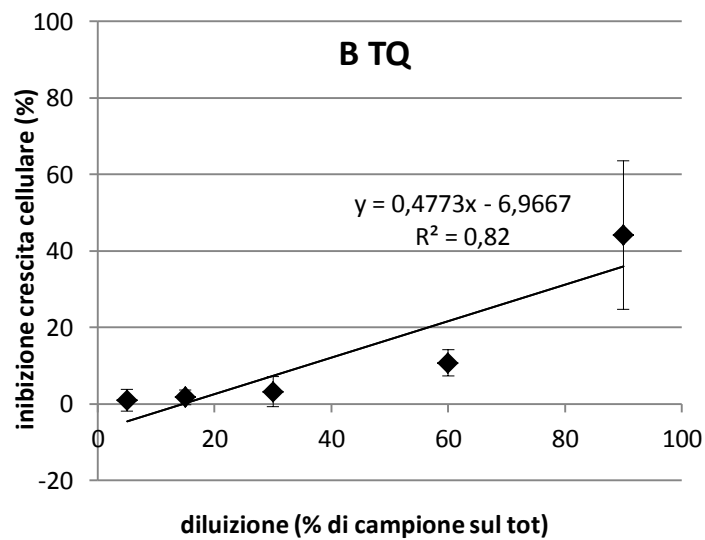


Figura 166: Valori medi (n=3) della percentuale di inibizione del tasso di crescita alle diverse concentrazioni (esprese come % di campione sul totale) per il campione B TQ.

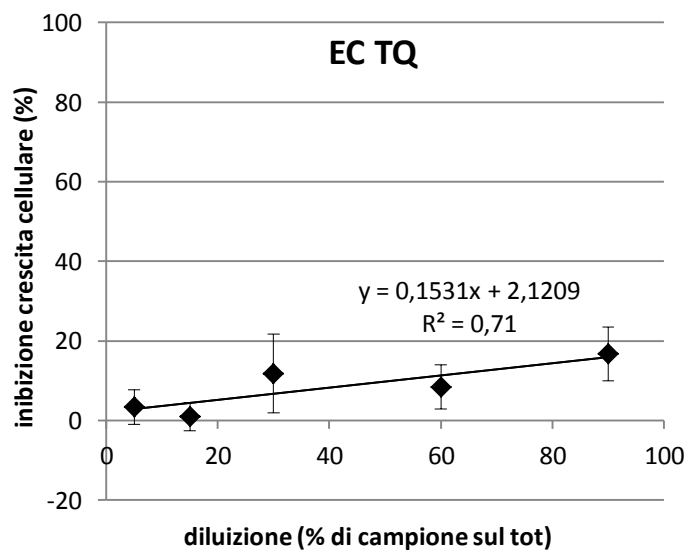


Figura 167: Valori medi (n=3) della percentuale di inibizione del tasso di crescita alle diverse concentrazioni (esprese come % di campione sul totale) per il campione EC TQ.

In tutti i casi i valori di IC50 calcolati (dati non riportati) superano il 100% ad indicare che la concentrazione necessaria per ottenere il 50% di inibizione debba essere determinata virtualmente in quanto supera il valore di diluizione 100 (quale % di campione presente rispetto al campione originario). Questi dati perciò sono stati considerati poco significativi e di essi non si è tenuto conto nella valutazione dei risultati del test.

Anche in questo caso, allo scopo di valutare il peso delle variabili “sito” e “trattamento” nel discriminare i diversi gruppi, i risultati del test di inibizione della crescita algale per i campioni dei diversi siti alla

concentrazione del 100% sono stati trattati statisticamente tramite Multi-factor ANOVA (limite di confidenza $\alpha = 5\%$) e il test post-hoc di Tukey mediante il software XLStat AddinsoftTM: i risultati sono riportati in **Figura 168**, per quanto riguarda la variabile “sito”, e in **Figura 169**, per quanto riguarda la variabile “trattamento”

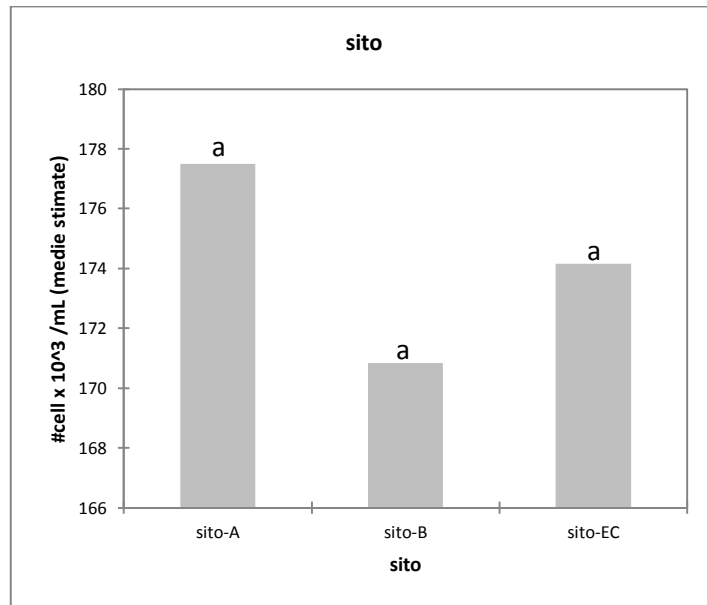


Figura 168: Gruppi individuati rispetto alla variabile “sito” tramite Multi-factor ANOVA e test di Tukey applicati ai risultati del test di inibizione della crescita algale per gli elutriati da scarto testati al 100%.

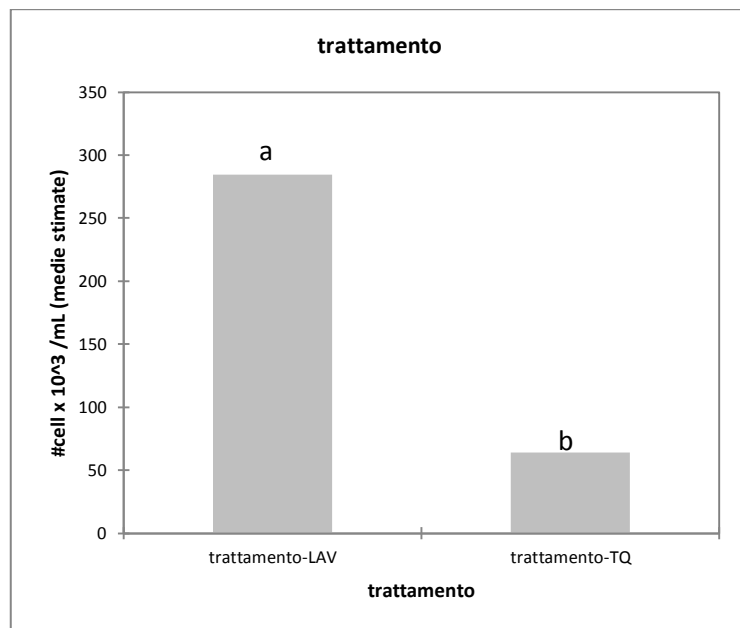


Figura 169: Gruppi individuati rispetto alla variabile “trattamento” tramite Multi-factor ANOVA e test di Tukey applicati ai risultati del test di inibizione della crescita algale per gli elutriati da scarto testati al 100%.

L’Analisi della Varianza non evidenzia differenze statisticamente significative tra i campioni provenienti dai diversi siti (**Figura 168**), ma mette in luce la diversa tossicità dei campioni derivanti da scarto lavato e scarto invece tal quale (**Figura 169**), con i valori di densità cellulare maggiori per il lavato che presenta dunque una tossicità minore.

- **Test di embriotossicità con *M. galloprovincialis***

Di seguito si riportano i risultati ottenuti espressi come media della percentuale di effetto calcolata con la formula di Abbott in funzione della diluizione (in scala logaritmica) per i diversi siti di provenienza, distinguendo tra campione proveniente da scarto lavato o tal quale (**Figura 170, Figura 171, Figura 172**).

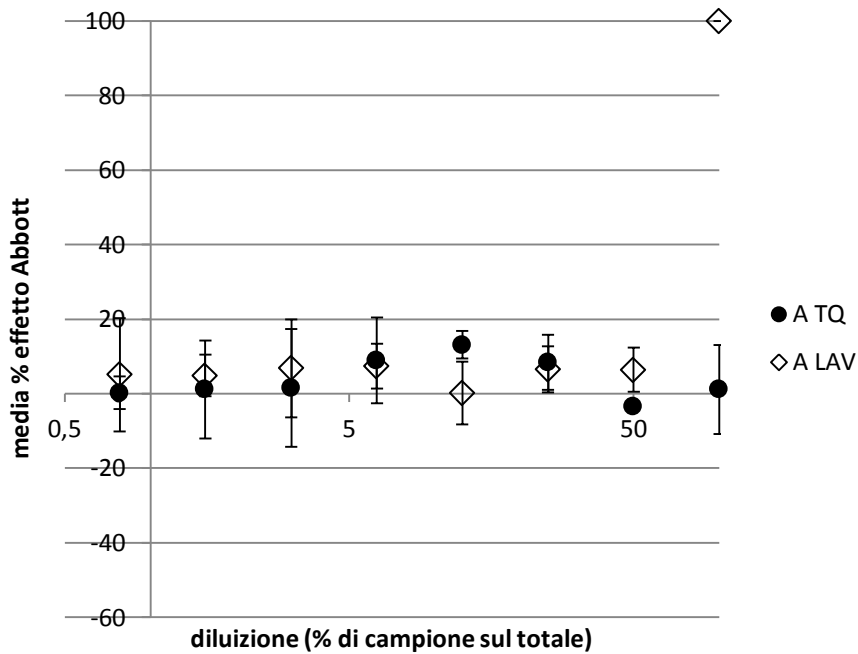


Figura 170: Valori medi e deviazione standard (n= 3) dell'effetto calcolato con la formula di Abbott nel test di embriotossicità per i campioni del sito A alle diverse diluizioni riportate in scala logaritmica.

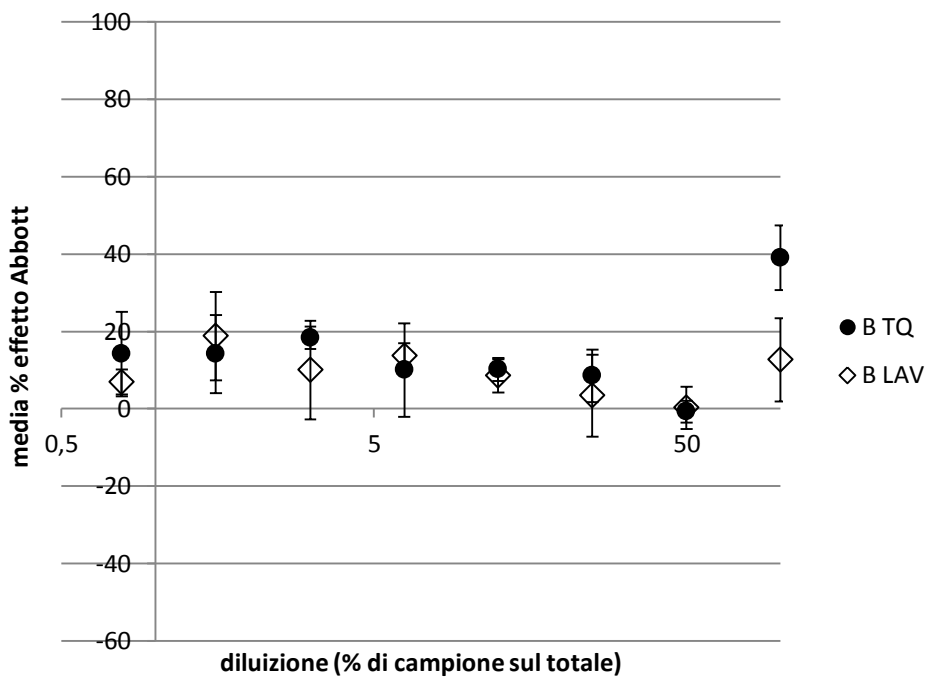


Figura 171: Valori medi e deviazione standard (n= 3) dell'effetto calcolato con la formula di Abbott nel test di embriotossicità per i campioni del sito B alle diverse diluizioni riportate in scala logaritmica.

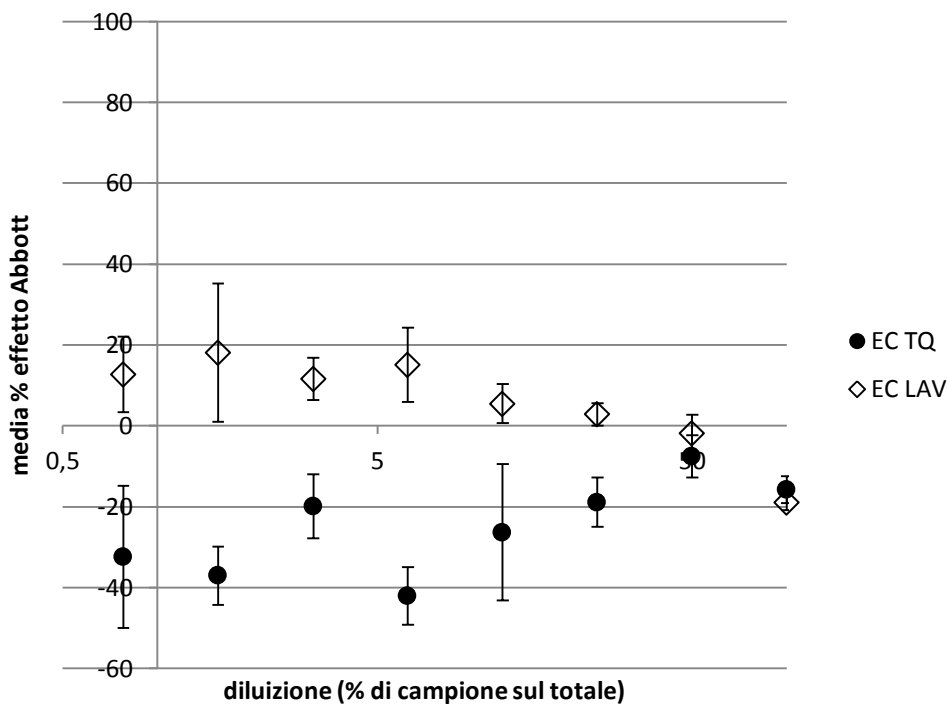


Figura 172: Valori medi e deviazione standard (n= 3) dell'effetto calcolato con la formula di Abbott nel test di embriotossicità per i campioni del sito EC alle diverse diluizioni riportate in scala logaritmica.

In **Figura 173** si riportano invece i risultati espressi come media della percentuale di effetto calcolata con la formula di Abbott in funzione della diluizione (in scala logaritmica), relativi alle due repliche (G1 e G2) effettuate per il campione di eluato da geocomposito non filtrato.

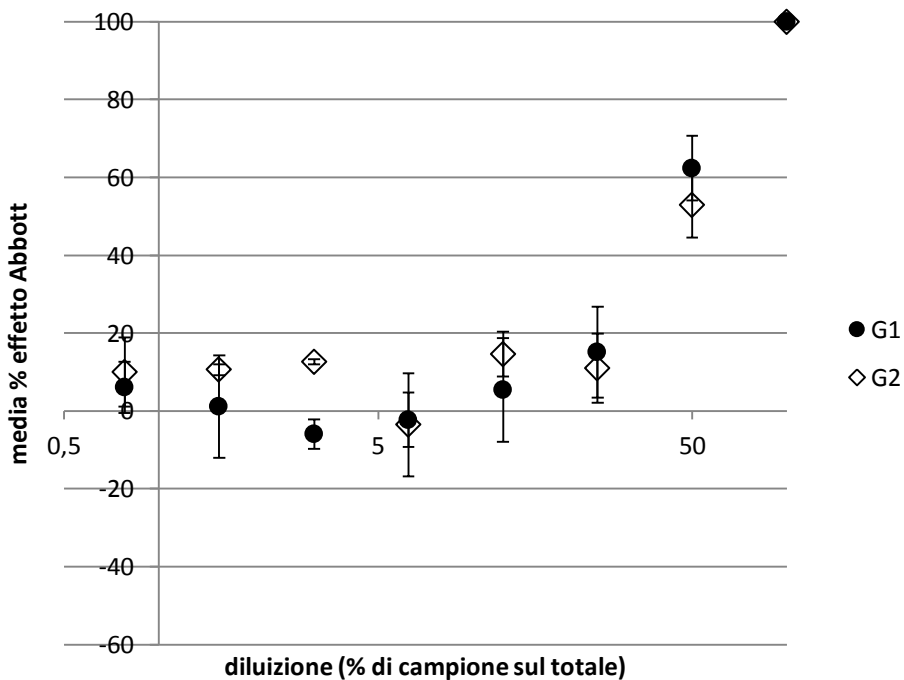


Figura 173: Andamento medio (n= 3) dell'effetto calcolato con la formula di Abbott nel test di embriotossicità per i campioni relativi al geocomposito alle diverse diluizioni riportate in scala logaritmica.

Il calcolo dell'EC50 è stato eseguito mediante l'utilizzo di un programma basato sul metodo non parametrico "Trimmed Spearman Karber" (**Tabella 14**), dato che l'applicazione del metodo parametrico Probit non permette l'esecuzione del calcolo. Il metodo "Trimmed Spearman Karber" è in grado di aggiustare opportunamente (*to trim* significa letteralmente "tagliare, spuntare") la poligonale che collega i punti sperimentali in modo da ottenere la retta che meglio interpola le osservazioni; dall'equazione della retta si ricava il valore di EC50 per il campione testato.

Nei casi in cui non sia stato possibile calcolare il valore di EC50, il programma riporta *minimum required trim too large* (come indicato in **Tabella 14**): in questi casi il metodo Trimmed Spearman Karber osserva che l'aggiustamento necessario per ricavare una retta è troppo "invasivo" per poter considerare attendibile il risultato. Negli altri casi la percentuale S-K Trim indica il valore dell'aggiustamento: i valori ottenuti sono piuttosto bassi, attestandosi sempre al di sotto del 10%, dunque si possono considerare buone le approssimazioni e i valori di EC50 calcolati.

Tabella 14: Risultati del calcolo dell'EC50 mediante metodo Trimmed Spearman Karber.

	EC 50	95% lower conf.	95% upper conf.	S-K Trim
A TQ	minimum required trim too large			
A LAV	67,64	64,07	71,42	4,38%
B TQ	minimum required trim too large			
B LAV	minimum required trim too large			
EC TQ	minimum required trim too large			
EC LAV	minimum required trim too large			
G1	40,34	37,05	43,92	0%
G2	43,41	38,86	48,48	6,64%

Esaminando con più attenzione il grafico di **Figura 170** e considerando l'andamento dell'effetto nel caso di A LAV si evidenzia, tuttavia, come il valore di effetto corrispondente alla concentrazione del 100% sia probabilmente poco attendibile: per questa ragione si considera la percentuale di effetto corrispondente al valore di concentrazione 100% come un outlier e non si tiene in considerazione il corrispondente valore di EC50 calcolato mediante il metodo Trimmed Spearman Karber.

Per quanto riguarda gli elutriati derivanti da geotessuto (G1 e G2) la media per le due repliche dei valori estratti con il metodo Trimmed Spearman Karber corrisponde a un valore di EC50= 41,88: ne risulta che a un valore di diluizione di poco superiore al 40% il test di embriotossicità con *M. galloprovincialis* risponde con un effetto (embriotossicità calcolata mediante la formula di Abbott) pari al 50%.

Infine, i dati sperimentali relativi ai campioni provenienti dai diversi siti sono stati trattati statisticamente tramite Multi-factor ANOVA (limite di confidenza $\alpha = 5\%$) e il test post-hoc di Tukey mediante il software XLStat Addinsoft™ con l'obiettivo di verificare l'esistenza di gruppi statisticamente significativi differenziati sulla base delle variabili selezionate (ovvero "sito" e "trattamento" riportati in **Figura 174** e **Figura 175**, rispettivamente).

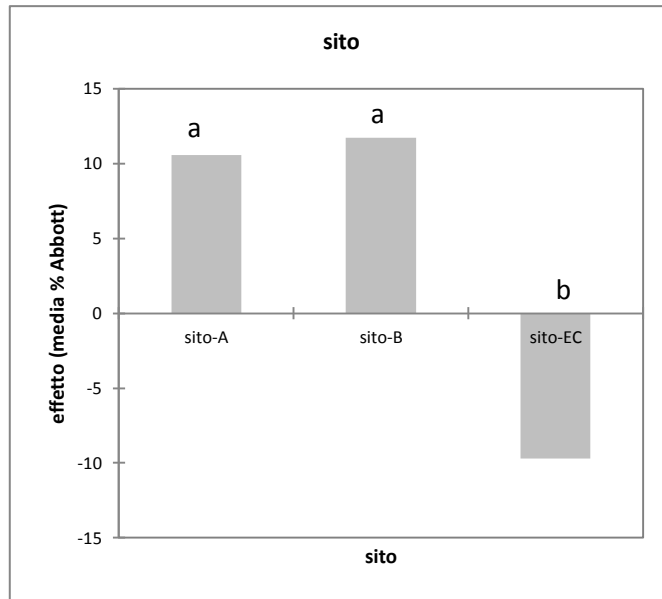


Figura 174: Gruppi individuati rispetto alla variabile “sito” tramite Multi-factor ANOVA e test di Tukey applicati ai risultati del test di embriotossicità per gli elutriati da scarto.

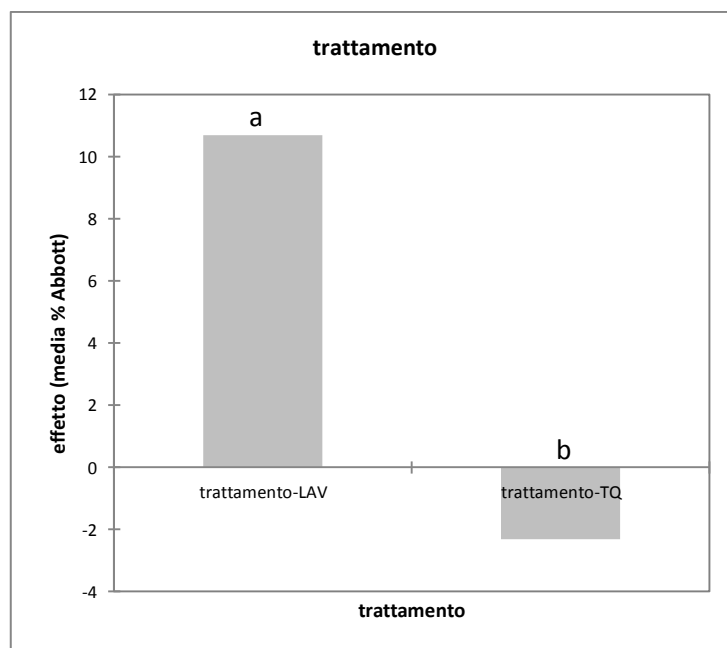


Figura 175: Gruppi individuati rispetto alla variabile “trattamento” tramite Multi-factor ANOVA e test di Tukey applicati ai risultati del test di embriotossicità per gli elutriati da scarto.

L’Analisi della Varianza rispetto alla variabile “sito” (**Figura 174**) mette in luce solamente la differenziazione dei campioni provenienti dal sito EC (Perognola concessione) che, a differenza degli altri, presentano un leggero effetto bio-stimolante, evidenziabile in particolare nel caso del campione tal quale. Interessante notare come anche in questo caso il differente trattamento, lavato o tal quale (**Figura 175**), dia luogo a differenze significative nelle risposte del test ecotossicologico.

5.3.5 Confronto dei risultati della batteria di test ecotossicologici

I risultati ottenuti dalla batteria di test ecotossicologici selezionata consente di trarre alcune conclusioni per quanto riguarda la tossicità dei campioni di elutriato derivanti dallo scarto prelevato dai differenti siti di campionamento:

- i campioni derivanti dallo scarto lavato (LAV) non determinano effetti tossici e nel caso del Microtox® e del test di inibizione della crescita algale presentano un lieve effetto bio-stimolante;
- il campione B TQ presenta un effetto inibitorio evidente solo nel test con *P. tricornutum* che si attesta, in valore medio, intorno al 50% di inibizione per il campione tal quale;
- il campione EC TQ presenta un leggero effetto bio-stimolante nel test di embriotossicità con *M. galloprovincialis*;
- gli altri campioni derivanti dallo scarto tal quale (TQ) non presentano effetti particolarmente rilevanti in nessuno dei test ecotossicologici effettuati e in generale non è stato possibile determinare un valore di EC50 o di IC50 per nessuno degli elutriati considerati.

Queste evidenze, confortate anche dai risultati della Multi-factor ANOVA e del test post-hoc di Tukey per tutti i test ecotossicologici condotti, mettono in luce come i campioni derivanti dallo scarto lavato si differenzino da quelli derivanti dallo scarto tal quale, in quanto decisamente non tossici e anzi, con un leggero effetto di bio-stimolazione. Si ritiene che questa evidenza sperimentale possa essere legata al lieve rilascio di elementi da parte dello scarto lavato registrato anche nei test di cessione; un rilascio talmente contenuto che seppur bio-stimolante (e dunque potenzialmente in grado di determinare una crescita di produttori primari anche ad alti tassi) può essere considerato unicamente in termini positivi.

I campioni TQ presentano d'altra parte una tossicità non preoccupante fatta eccezione per il campione B TQ per il quale l'effetto tossico nel test di inibizione della crescita algale può essere dovuto a un pH leggermente più acido (si veda **Tabella 12**) o alla maggiore concentrazione di ammoniaca (si veda **Tabella 13**) formata in seguito alla degradazione di sostanza organica data la presenza di organismi vivi in proporzione significativa (si veda **Figura 135**). Un caso a parte è il campione EC TQ per il quale il test di embriotossicità evidenzia un effetto bio-stimolante apprezzabile, simile agli effetti registrati per i campioni lavati nel Microtox® e nel test con *P. tricornutum*.

Per quanto riguarda i campioni derivanti dall'elutrazione del geocomposito (G1 e G2) si osserva un effetto tossico in tutti e 3 i test selezionati; la percentuale di inibizione per il campione tal quale si attesta al 10% per il test con *P. tricornutum*, al 20% circa (per i tempi di esposizione maggiori) per il Microtox® e raggiunge il 100% con il test di embriotossicità con *M. galloprovincialis*. Dai dati risultanti da quest'ultimo test è stato possibile stimare, mediante il metodo non parametrico Trimmed Spearman Karber un valore di EC50 di poco inferiore al 42% del campione sul totale.

La prova effettuata con il test Microtox® prima e dopo la filtrazione, analizzata anche tramite Multi-factor ANOVA, mette in luce, inoltre, come la tossicità acuta non dipenda dalla presenza di materiale plastico in

sospensione distaccatosi durante la fase di elutriazione. Ciò significa che la tossicità rilevata dipende da sostanze presenti in soluzione derivanti dal materiale di cui è composto il geocomposito utilizzato.

La ditta che ha fornito il geocomposito per la conduzione di questo test si è tuttavia rifiutata, nonostante le richieste, di fornire la scheda tecnica relativa (ne ha fornito un paio non corrispondenti al campione oggetto di studio e in ogni caso incomplete), impedendo di fatto una più accurata valutazione dei risultati e l'individuazione delle opportune analisi chimiche da eseguire sul campione.

5.3.6 Prototipo di *bio-burga*

Come indicato nell'experimental design di **Figura 123**, parte del materiale di scarto prelevato durante la fase di campionamento è stato utilizzato come riempitivo per il confezionamento di un prototipo di burga (dimensioni 100 x 40 cm, si veda **Figura 176**) a cui ci si riferirà d'ora in avanti con il nome *bio-burga*. Il prototipo è stato posto in acqua per un periodo di due mesi, al fine di verificare la stabilità fisica dello scarto e la resistenza complessiva del manufatto; questa scelta è stata fatta in quanto si è ritenuto che il monitoraggio in campo fosse l'unico modo per testare la performance della soluzione proposta ed eventualmente di suggerire miglioramenti per la sua costruzione (in accordo con quanto suggerito da Aminti *et al.*, 2010)

La *bio-burga* è costituita da un sacco di geocomposito costituito da un geotessile non tessuto agugliato su una georete che ha funzione di rinforzo, dello stesso tipo utilizzato per i test ecotossicologici, confezionato dalla ditta Nuova Co.Ed.Mar S.r.l. sulla base della tipologia utilizzata nel cantiere nei pressi del canale Cenesa (laguna nord, all'altezza di Portegrandi) e riempiti con limi concrezionati. Il geocomposito svolge, tramite il geotessile, la funzione di filtro impedendo la fuoriuscita del materiale più fine e, attraverso la georete, assicura la resistenza dell'involucro fornendo contemporaneamente un substrato ottimale per l'instaurarsi di biocenosi sessili colonizzanti.



Figura 176: Prototipo di burga riempita con materiale di scarto composto principalmente da conchiglie di biocenosi bentoniche derivante dalla raccolta di *V. philippinarum* in laguna di Venezia.

Il prototipo è stato posizionato in un punto protetto nel canale della Scomenzera (un canale con traffico acqueo rilevante di mezzi commerciali e di trasporto sia pubblico che privato situato nella zona di Santa Marta) tramite ancoraggio alla riva (**Figura 177**) al fine di studiare la modalità di riempimento, la consistenza e il comportamento in acqua. La sperimentazione è durata circa 60 giorni durante la primavera 2013 e ha messo in luce come il manufatto si comporti in maniera idonea allo scopo, mostrando resistenza al moto ondoso.

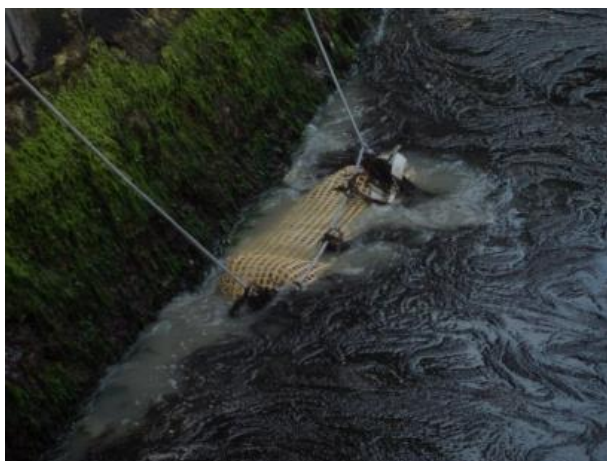


Figura 177: Messa in opera del prototipo di burga nel Canale della Scomenzera.

In particolare, a due mesi dalla deposizione del prototipo, il materiale riempitivo costituito dallo scarto non mostra alterazioni visibili dal punto di vista dimensionale (si veda **Figura 178**) nonostante la posizione e la modalità scelta (un unico manufatto libero a ridosso di una conterminazione in cemento in un canale molto trafficato) fossero ideali per facilitarne la frantumazione. Inoltre la bio-burgh è risultata essere un substrato ideale per l'attecchimento di comunità bentoniche, data la rapida crescita di macroalghe sulla superficie (Ulvaceae e Gracilaria) come si evince da **Figura 179**.



Figura 178: Scarto da venericoltura utilizzato come riempitivo della bio-burgh dopo la sperimentazione di 60 giorni – *foto G. Cipolato*.



Figura 179: La bio-burgha coperta di alghe dopo il periodo di immersione in Canale della Scomenzera – foto G. Cipolato.

Questo risultato sembra in accordo con quello che emerge dal lavoro di Aminti *et al.* (2010) che, dopo tre mesi dalla deposizione in zona costiera di una struttura costituita da un geotessile riempito con sabbia, rilevano una copertura algale pressoché uniforme con una prevalenza di Phaeophyceae e Rhodophyceae, nel loro caso. Gli autori rilevano inoltre come la copertura algale dimostri di essere di attrazione per alcune specie di pesci (Sparidae) e sostengono che, nonostante la struttura in geocomposito sia più semplice se confrontata con gli ambienti “naturali”, essa offra la possibilità di una colonizzazione permanente da parte di specie algali che possono attirare a loro volta altre specie.

Con la consapevolezza che la natura del substrato in termini di composizione mineralogica e complessità topografica gioca un ruolo importante nelle fasi di selezione del sito di insediamento e la successiva colonizzazione, oltre che nell’accumulo di materia organica e nel fornire rifugio dalla predazione, si ritiene che i risultati ottenuti con questo prototipo suggeriscano la possibilità di ottenere l’accrescimento di biocenosi più complesse in zone con caratteristiche idrodinamiche e sedimentologiche più favorevoli e certamente diverse da quelle presenti nel sito individuato per la sperimentazione.

5.4 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'insieme dei risultati ottenuti in questa terza parte del lavoro di ricerca consentono di delineare un quadro sufficientemente completo riguardo le caratteristiche del materiale costituito dallo scarto da venericoltura, la variabilità di tali caratteristiche sia in termini qualitativi che quantitativi all'interno dell'area lagunare veneziana, la stabilità del materiale nelle condizioni di possibile applicabilità della strategia di utilizzo individuata. Offrono inoltre una serie di spunti per ulteriori campi di applicabilità per le analisi condotte in questo lavoro.

La composizione del materiale di scarto in termini di gruppi tassonomici rilevata nel presente studio può essere considerata un indice della variabilità delle comunità bentoniche, almeno per quanto riguarda le specie dotate di esoscheletro che popolano le diverse aree deputate alla venericoltura della laguna di Venezia: pur trattandosi di un dato limitato a un unico campionamento, infatti, si ritiene ragionevole considerarlo indicativo della diversità esistente tra il materiale proveniente dai diversi sottobacini lagunari, anche in virtù delle considerazioni fatte riguardo ai due campioni per cui è stato possibile eseguire una valutazione della variabilità stagionale.

Poiché è noto che ogni alterazione riguardante le caratteristiche dei sedimenti e della colonna d'acqua viene integrata e registrata dagli organismi presenti, seppur entro tempi più o meno lunghi, è possibile utilizzare gli organismi bentonici e in particolare le variazioni che si registrano all'interno delle comunità da essi costituite, per determinare la qualità ambientale del sito di prelievo (Atlante della laguna, 2006). In quest'ottica anche lo scarto da venericoltura, seppur limitatamente a quella porzione di organismi responsabili del deposito di materiali biogenici, dà un'indicazione rispetto alla composizione della comunità bentonica delle aree destinate a venericoltura e conseguentemente del livello di stress ambientale cui è sottoposta.

Fisher *et al.* (2013) sottolineano come i fattori ambientali e le loro dinamiche possano avere conseguenze a scale temporali che superano il tempo di generazione dell'organismo target, andando a colpire a livello di popolazione e comunità (andando a ridurre la numerosità della popolazione o a cambiare la struttura della comunità, ad esempio). La presenza di stress ambientali multipli combinati, in particolare, può determinare un aumento della sensibilità dell'organismo nei confronti di sostanze tossiche (co-tolleranza negativa), ma anche una maggiore resistenza (co-tolleranza indotta) o una mancanza di relazioni tra i diversi fattori; il modo con cui la combinazione di stressori agisce sulle popolazioni e sulla biodiversità delle comunità può dipendere dall'entità e dal tipo di co-tolleranza sviluppata (Fischer *et al.*, 2013).

Esistono tuttavia, casi in cui livelli moderati o transienti di stress multipli determinano un aumento della diversità, soprattutto in ambienti particolarmente competitivi, probabilmente perchè livelli intermedi di disturbo possono promuovere la coesistenza di specie diminuendo il peso dei meccanismi di esclusione competitiva (Fischer *et al.*, 2013). Per questa ragione la valutazione dello stato ambientale, inteso come somma dei fattori di stress ambientale e degli inquinanti, non può essere determinato unicamente considerando la risposta a livello di popolazione e di comunità, ma piuttosto integrando tale valutazione a quelle che considerano le risposte a livello di organismo.

In questo senso si ritiene che l'analisi delle caratteristiche qualitative dello scarto da venericoltura possa costituire un metodo semplice e poco costoso per integrare le analisi che vengono condotte abitualmente sulla specie *V. philippinarum*, al fine di comprendere l'impatto generato dalla venericoltura a livello di popolazione e di comunità di cui l'organismo considerato fa parte; in generale questa tipologia di campione potrebbe fornire indicazioni utili relativamente alla risposta biologica nei confronti di fattori di stress e degli inquinanti al fine di ottenere una valutazione più completa dello stato di salute dell'ambiente lagunare, limitatamente alle aree a forte impatto antropico come quelle in concessione a G.R.A.L.

In quest'ottica potrebbe essere interessante capire se è possibile migliorare il grado di significatività dell'analisi qualitativa definendo i raggruppamenti in termini tassonomici nel modo più accurato allo scopo e assegnando un valore alle specie/gruppi individuati a seconda del loro livello di sensibilità, prendendo a riferimento metodologie già consolidate per la valutazione di indici come il MaQI, *Macrophyte Quality Index* (Sfriso et al., 2007, 2008) o l'IBE, *Indice Biotico Esteso* (Ghetti & Bonazzi, 1980), pur tenendo presente che la significatività di questa analisi sarebbe limitata alla valutazione dell'impatto generato dalle modalità di venericoltura/pesca gestita nelle aree in concessione in laguna di Venezia.

Accanto a queste osservazioni è importante rilevare come alla buona differenziazione dello scarto in termini qualitativi corrisponda un'altrettanto buona differenziazione in termini di composizione elementale: l'analisi quantitativa del materiale prelevato nei diversi punti di campionamento in laguna di Venezia rileva la presenza di un'impronta data dall'insieme degli elementi determinati e dal loro differente livello di concentrazione. I risultati dell'analisi statistica in particolare, mettono in luce che

- la combinazione dei parametri di composizione qualitativa con le variabili date dagli elementi determinati è in grado di separare i campioni di scarto in modo ottimale;
- esiste un forte legame tra le variabili considerate (gruppi tassonomici e concentrazioni degli elementi) che sottolinea come la specie-specificità influisca sul livello di incorporazione degli elementi nel materiale conchigliare.

Questo risultato è in linea con quelli ottenuti nelle precedenti fasi del lavoro secondo cui la composizione elementale del materiale conchigliare è il frutto della combinazione dei fattori ambientali con quelli specie-specifici: in questo senso la composizione elementale dello scarto rappresenta l'espressione massima della somma di queste due forzanti, presentando un livello di differenziazione chiaramente superiore rispetto a quello registrato nelle conchiglie di *V. philippinarum* prelevate nei medesimi siti di campionamento.

Nell'ottica di un possibile utilizzo di questo materiale come riempitivo per opere di protezione e consolidamento idraulico si ritiene, tuttavia, che la diversità di composizione, sia in termini qualitativi che in termini di contenuto di elementi, non influisca sulle qualità complessive dello scarto che lo rendono adatto per questo tipo di utilizzo: il materiale, infatti, risulta sostanzialmente stabile, sia dopo lavaggio che tal quale, come evidenziato dalla bassa concentrazione di elementi determinati negli elutriati del test di cessione eseguito su un campione rappresentativo della composizione media lagunare.

La variabile che sembra invece assumere maggior peso ai fini di un impiego dello scarto da venericoltura nella costruzione di burghe o barriere soffolte è quella relativa al trattamento (lavato/tal quale): dai risultati della batteria di test ecotossicologici è emersa, infatti, una certa tossicità dei campioni derivanti dall'elutrazione dello scarto tal quale e, in particolare per i siti V e B, la presenza di una tossicità associabile al contenuto di specie vive, che induce a consigliarne l'utilizzo dopo lavaggio e rimozione di questa quota. Si tratta certamente di una raccomandazione che porta a preferire metodi di vagliatura meccanizzata (del tipo di quelli installati nell'imbarcazione utilizzata per il prelievo di campioni nei siti EC e EF) che consentono di ottenere uno scarto abbastanza pulito e maggiormente selezionato sul quale è possibile eliminare con maggiore facilità gli organismi vivi (una buona pratica che, a prescindere dalla finalità qui proposta, consente di diminuire l'impatto della raccolta di *V. philippinarum* sulle biocenosi insistenti nell'area).

Si deve sottolineare d'altra parte come i risultati dei test ecotossicologici condotti sugli elutriati derivanti dai campioni di scarto lavato mettano in luce un leggero effetto bio-stimolatorio che, se contenuto, come sembra, entro certi limiti, può tradursi in un impatto positivo sullo sviluppo di biocenosi colonizzanti sulla superficie dei manufatti riempiti con scarto da venericoltura: questo aspetto è certamente legato al progressivo lento rilascio di elementi essenziali che compongono le conchiglie, processo messo in luce dai risultati del test di cessione a 24 ore.

In ogni caso lo scarto da venericoltura dimostra di avere complessivamente proprietà che bene si sposano con l'utilizzo proposto:

- l'elevata resistenza fisica, che non porta a una riduzione del livello dimensionale nemmeno in condizioni che favoriscono la frammentazione, come emerso dalla sperimentazione sul prototipo di bio-burga;
- la densità specifica inferiore rispetto a quella del pietrame attualmente utilizzato, che può migliorare le proprietà statiche dei manufatti diminuendo il rischio di affossamento, oltre a incidere positivamente sulla facilità di movimentazione dei manufatti stessi e sui costi derivanti da tale attività;
- la particolare forma e il conseguente elevato volumi di vuoti, che permettono di ottenere un manufatto con elevata porosità, utile a intrappolare fisicamente il materiale particolato e a ridurre l'energia delle onde facilitando così la deposizione del sedimento.

Per quanto riguarda il geosintetico da utilizzare per il confezionamento dei manufatti riempiti con scarto da venericoltura, nonostante il geocomposito impiegato in questo studio risulti avere caratteristiche ideali in termini di contenimento del materiale, conferimento di solidità e resistenza al manufatto, predisposizione di una superficie idonea allo sviluppo di biocenosi sessili colonizzanti, il suo utilizzo deve essere rivisto sulla base dei dati di tossicità presentati in questo studio. In particolare si invitano le Autorità competenti a predisporre un piano di indagine al fine di ottenere una valutazione più completa degli impatti ambientali connessi all'utilizzo di questa tipologia di materiali plastici in ambiente lagunare.

Potrebbe altresì essere presa in considerazione la possibilità di individuare dei materiali alternativi meno impattanti da poter utilizzare in sostituzione del geocomposito plastico: nello specifico si ritiene opportuno considerare l'utilizzo di materiali contenitivi biodegradabili, resistenti per un tempo sufficientemente lungo da permettere la stabilizzazione del manufatto nel sito di posa e la sua completa integrazione con il contesto ambientale. La funzione di intrappolamento dei sedimenti garantita dalle caratteristiche dimensionali e di porosità dello scarto da venericoltura permettono l'evolversi del manufatto in una matrice consolidata ideale per l'attecchimento di varie specie: in questo quadro risulterebbe addirittura preferibile l'utilizzo di materiali che a lungo andare si degradano e che permetterebbero la completa rinaturalizzazione del sito di intervento.

Alla luce di quanto esposto e ricordando come la rimozione del materiale di scarto dai siti destinati a venericoltura/pesca gestita in laguna di Venezia sia un'operazione necessaria per il miglioramento delle caratteristiche dei fondali e per favorire l'insediamento dei giovanili e l'accrescimento successivo di *V. philippinarum*, si ritiene che la proposta di utilizzare questo materiale come riempitivo di manufatti come le burghe e le barriere soffolte possa essere valutata positivamente sulla base dei seguenti fattori:

- *filiera corta*: utilizzo di materiale di risulta di un'attività già esistente in laguna, eliminando la necessità di approvvigionarsi di materiale da riempimento all'esterno del territorio con conseguente risparmio energetico ed economico (attualmente il materiale riempitivo delle burghe si compone di pietrame di cava di varia pezzatura proveniente anche dalla Croazia e di limi derivanti dal lavaggio delle ghiaie misti a cemento - limi concrezionati);
- *maggior eco-sostenibilità*: trasformazione di uno scarto in una risorsa e utilizzo di materiale più leggero e prodotto in loco con conseguente diminuzione del carico di CO₂ emessa durante le fasi di trasporto e movimentazione;
- *vantaggio ecologico*: pulizia dei fondali interni o esterni agli appezzamenti delle concessioni con graduale diminuzione dell'impatto generato e miglioramento dello stato di salute ambientale delle aree in concessione per venericoltura/pesca gestita;
- *responsabilizzazione degli operatori*: coinvolgimento degli operatori del settore nelle fasi di raccolta e conferimento nel sito di stoccaggio del materiale, che determinerebbe la partecipazione consapevole a un processo produttivo che contribuisce al miglioramento dell'attività colturale e del prodotto ottenuto, nell'ottica di promozione di una qualità nuova del prodotto da commercializzare.

6. CONCLUSIONI

6.1 CONCLUSIONI GENERALI

Lo sviluppo del lavoro di tesi è risultato efficace ai fini del raggiungimento dell'obiettivo principale riguardante l'approfondimento della conoscenza rispetto ai fattori che regolano la presenza di metalli nelle conchiglie di Bivalvi caratteristici degli ambienti lagunari: in particolare è stato possibile identificare nelle forzanti non solo biologiche ma pure in quelle ambientali, intese come commistione di fattori naturali e impatti antropici, i fattori che interagiscono nel determinare i livelli di incorporazione degli elementi nel carbonato biogenico.

Lo studio ha messo in luce come la differenziazione in termini di composizione elementale delle conchiglie dei Bivalvi dipenda, da un lato, dalle caratteristiche specie-specifiche (come, ad esempio, il tasso di filtrazione, le caratteristiche metaboliche, la forma mineralogica prevalente nella matrice cristallina) e dall'altro da fattori ambientali, ovvero *in primis* dalle caratteristiche del sito sia in termini di idrodinamica e parametri chimico-fisici strettamente sito-specifici, sia in termini di impatti derivanti dal tipo di attività insistente e dalla tipologia e dal livello di contaminanti presenti. Inoltre è stato esaminato in maggior dettaglio il processo di bioaccumulo sulla specie *Venerupis philippinarum* in particolare alla luce delle differenze che emergono riguardo al contenuto degli elementi nei soft tissue e nella conchiglia.

L'approfondimento di questi aspetti non si è limitato all'ambito della ricerca scientifica di base, ma ha potuto trovare applicazione nell'individuazione del possibile utilizzo di un materiale come lo scarto da venericoltura, costituito prevalentemente da conchiglie di Bivalvi e Gasteropodi, per il riempimento di manufatti destinati alla protezione e al consolidamento idraulico delle morfologie lagunari: questa soluzione applicativa che si identifica di per se entro una cornice fortemente ecosostenibile, si propone, inoltre, come un possibile metodo efficace per la risoluzione dei problemi derivanti dall'accumulo di questo materiale nelle aree in concessione per venericoltura/pesca gestita in laguna di Venezia, contesto di riferimento per questo studio.

Inoltre, il disegno sperimentale messo a punto ha saputo rispondere efficacemente, oltre che alle necessità di approfondimento appena evidenziate, grazie all'esecuzione del test di cessione, della batteria di test ecotossicologici, nonché della messa in opera di un manufatto sperimentale, alla conseguente successiva definizione di consigli pratici e scelte operative da adottare per migliorare la performance complessiva dei manufatti.

In particolare il confronto con gli stakeholder locali e la maggiore presa di coscienza di tutti gli aspetti coinvolti nella gestione dello scarto da venericoltura che ne è derivata hanno completato il quadro conoscitivo necessario per comprendere appieno le implicazioni derivanti dai risultati sperimentali e per suggerire la migliore strategia di utilizzo del materiale. Questo fattore è stato determinante nel permettere l'integrazione degli obiettivi ecologici/ambientali con quelli pratici/tecnici per la definizione di una proposta concreta, utile e attuabile.

L'ampio approfondimento bibliografico condotto ha certamente fornito un bagaglio conoscitivo imprescindibile per uno sviluppo funzionale del lavoro e ha messo in luce, d'altro canto, l'utilità delle scelte sperimentali nell'apportare un ulteriore tassello all'ambito della ricerca riguardante i meccanismi che regolano il

bioaccumulo di elementi nella matrice costituita dalle conchiglie carbonatiche dei Molluschi Bivalvi caratteristici degli ambienti di transizione, in particolare in riferimento alle ampie conoscenze esistenti sui meccanismi che agiscono a livello dei tessuti molli.

Il carattere multidisciplinare della ricerca ha permesso di interagire sia con gli altri gruppi di ricerca all'interno dell'Università Ca' Foscari di Venezia, competenti in diversi settori disciplinari, sia con enti e imprese all'esterno del mondo universitario, tra cui Magistrato alle Acque di Venezia, G.R.A.L. - Ente Gestore delle Risorse Alieutiche Lagunari, Vento di Venezia S.r.l., Nuova Co.Ed.Mar. S.r.l., Autorità Portuale di Venezia. Ne risulta che il percorso formativo svolto abbia permesso l'acquisizione di competenze specifiche assolutamente integrantesi nella specifica realtà locale inerenti:

- l'analisi delle relazioni intercorrenti tra i vari comparti di un ecosistema e la definizione di un approccio integrato per lo studio di un aspetto ambientale;
- la capacità di operare in un'ottica di sostenibilità e di contenimento della contaminazione ambientale in ambienti a elevato livello di antropizzazione;
- la formulazione di proposte innovative per il recupero e il risanamento ambientale sulla base delle conoscenze acquisite e pregresse;
- l'abilità di integrare nella propria analisi ambientale aspetti emersi attraverso il confronto con diversi portatori di interesse al fine di individuare soluzioni gestionali opportune.

6.2 RISULTATI OTTENUTI

Si ritiene opportuno riassumere brevemente i principali risultati ottenuti mediante il presente lavoro di ricerca:

- la concentrazione di elementi presenti all'interno delle conchiglie di Bivalvi appartenenti a specie diverse dipende dalle caratteristiche specie-specifiche degli organismi considerati, in particolare dal metabolismo, dalla fisiologia dell'organismo, dalle diverse forme cristalline che assume il carbonato biogenico nelle diverse specie; se ciò può sembrare a prima vista ovvio, esso lo è sicuramente per tutti quei metalli fisiologici che anche a bassissime concentrazioni sono essenziali per la vita della singola specie, ma non lo era per quanto concerne la risposta ecologico-adattativa conseguente ad una esposizione/uptake a metalli pesanti tossici;
- la variabilità delle concentrazioni di elementi nelle valve di diverse popolazioni di una singola specie è riconducibile alle caratteristiche specifiche del sito di provenienza, caratteristiche tra le quali hanno particolare peso le variabili legate all'idrodinamismo, agli impatti generati dalle attività umane e alle dinamiche che coinvolgono gli elementi presenti nel sedimento, nella colonna d'acqua e all'interfaccia tra questi due comparti;
- la composizione della valva in termini di elementi in traccia è frutto dell'interazione di due forzanti principali date dalle specifiche tipologie di uptake, processazione e accumulo degli elementi da parte dell'organismo, da un lato, e dagli equilibri e le dinamiche che coinvolgono il singolo elemento nell'ambiente di crescita dell'organismo, dall'altro;
- in generale non si evidenziano correlazioni particolarmente significative, fatta eccezione per pochi casi, tra la composizione dei sedimenti e il livello di bioaccumulo nei tessuti di *V. philippinarum* a prova della complessità dei meccanismi che regolano la biodisponibilità e la bioaccessibilità degli elementi nei sistemi acquatici e dell'importanza del controllo biologico nel regolare il livello di assimilazione degli elementi;
- i dati relativi alla speciazione geochimica sono stati particolarmente utili per formulare ipotesi circa le dinamiche ambientali che coinvolgono gli elementi analizzati e che influiscono sul loro grado di incorporazione negli organismi considerati; inoltre – pur nella consapevolezza dei limiti effettivi che presenta tale metodica dal momento che difficilmente si può mimare in laboratorio la complessità di assunzione/fase metabolica/escrezione di un organismo nei confronti di un metallo – essi confermano una volta di più l'urgenza di rivedere l'approccio classico nella formulazione dei fattori di bioaccumulo, che dovrebbero far riferimento unicamente alla parte effettivamente biodisponibile del metallo e non al suo contenuto totale *tout court* nel sedimento;
- l'assenza di correlazioni evidenti tra le concentrazioni di elementi rinvenibili nei tessuti molli e nella conchiglia di *V. philippinarum* mette in luce come il Bivalve sia in grado di regolare l'assimilazione

degli elementi essenziali per le sue funzioni fisiologiche e per la sintesi di materiale organico o inorganico biogenico e di operare un controllo sulla maggior parte degli elementi che possono determinare un effetto tossico;

- come già riscontrato da Almeida *et al.* (1998b) e Giusti e Zhang (2002) si conferma che la composizione elementale della valva non è significativamente influenzata dal livello di crescita di *V. philippinarum*, a differenza di quanto accade per i tessuti molli, e presenta una variabilità minore rispetto a quella registrata nei soft tissue;
- la composizione elementale delle conchiglie ha una maggiore capacità rispetto a quella dei soft tissue di differenziare i campioni dipendentemente dal sito di provenienza, a tal punto che è possibile riconoscere un mutamento nella composizione a seconda dell'area geografica della laguna da cui provengono i campioni;
- anche se le conchiglie di *V. philippinarum* risultano meno arricchite rispetto ai soft tissue di tutti gli elementi analizzati, presentano una composizione diversificata a seconda delle condizioni ambientali tipiche a cui sono esposte e questa "impronta" può essere considerata indicatore affidabile del sito di provenienza dell'organismo;
- la composizione del materiale di scarto in termini di gruppi tassonomici può essere considerata un indice della variabilità delle comunità bentoniche, almeno per quanto riguarda le specie dotate di esoscheletro che popolano le diverse aree deputate alla venericoltura della laguna di Venezia;
- la composizione elementale del materiale conchigliare è il frutto della combinazione dei fattori ambientali con quelli specie-specifici e in questo senso rappresenta l'espressione massima della somma di queste due forzanti, presentando un livello di differenziazione chiaramente superiore rispetto a quello registrato nelle conchiglie di *V. philippinarum* prelevate nei medesimi siti di campionamento;
- alla buona differenziazione dello scarto in termini qualitativi corrisponde un'altrettanto buona differenziazione in termini di composizione elementale che mette in luce, anche in questo caso, la presenza di un'impronta del sito di provenienza data dall'insieme degli elementi determinati e dal loro differente livello di concentrazione;
- per quanto concerne l'utilizzo dello scarto da venericoltura come riempitivo per burghe e barriere soffolte, i risultati della batteria di test ecotossicologici inducono a consigliarne l'utilizzo dopo lavaggio e rimozione della quota di organismi vivi e del materiale organico a rapida degradazione;
- lo scarto da venericoltura ha proprietà ideali, tra cui si annoverano l'elevata resistenza fisica, la bassa densità specifica e l'alto livello di porosità del materiale, per prevederne l'impiego nella modalità proposta;

- è opportuno prevedere la sostituzione del geosintetico utilizzato nello studio con un materiale che presenti un minore livello di tossicità ma che mantenga caratteristiche ideali in termini di contenimento del materiale, conferimento di solidità e resistenza al manufatto, predisposizione di una superficie idonea allo sviluppo di biocenosi sessili colonizzanti.

6.3 RIPERCUSSIONI APPLICATIVE

Le conoscenze acquisite riguardo alla composizione del carbonato biogenico sintetizzato dagli organismi Bivalvi hanno messo in luce la presenza all'interno di questa matrice di concentrazioni variabili di elementi in traccia (intesi come presenti in concentrazioni decisamente inferiori rispetto ai costituenti maggiori). Poiché i risultati confermano che la tipologia di elementi presenti e il loro livello di concentrazione dipendono, tra gli altri fattori, dal livello di contaminazione ambientale, come già evidenziato in letteratura, e vista la sostanziale stabilità del materiale conchigliare come verificato dal test di cessione, è possibile immaginare la possibilità di utilizzare questo materiale per la bioinertizzazione di metalli tossici. In particolare si potrebbe pensare di approfondire la possibilità di massimizzare la quantità di metalli incamerati nella matrice cristallina della valva attraverso test di laboratorio progettati allo scopo (ad esempio mediante l'utilizzo di sedimenti *spiked*, variando le condizioni al contorno per determinare quali fattori influiscono maggiormente sull'incorporazione).

Ciò nonostante questa eventuale applicazione porrebbe certamente alcune questioni di carattere etico riguardanti il fatto se si può considerare lecito l'utilizzo di organismi filtratori/accumulatori con l'unico scopo di diminuire il contenuto di inquinanti nell'ambiente e sequestrarli in una matrice inerte. Demina *et al.* (2011) ritengono tuttavia che il processo naturale di sintesi di carbonato biogenico possa essere considerato già di per se un sistema di bioaccumulo e biomineralizzazione che dovrebbe essere valutato nella sua capacità di svolgere un ruolo geochimico e ambientale importante nel quadro dei processi di auto-purificazione dei sistemi acquatici; essi, inoltre, pongono l'accento sull'eventualità di poter utilizzare le conchiglie come fonti di minerali: un insieme di aspetti che vanno certamente approfonditi nel quadro di una maggiore sostenibilità dei processi produttivi.

D'altro canto la stabilità chimica delle conchiglie e la presenza di un legame evidente tra la provenienza dell'animale e la sua impronta a livello di composizione elementale, suggerisce la possibilità di impiegare questa impronta come marcatore della zona di provenienza del Bivalve nell'ottica di tracciabilità dei prodotti commercializzati: l'individuazione dell'insieme più significativo di elementi da monitorare e l'istituzione di una banca dati sito-specifica potrebbe essere il primo passo per la creazione di un sistema di filiera controllata. L'utilizzo di marcatori di questo tipo avrebbe l'ulteriore vantaggio di poter lavorare sia sul prodotto fresco che "a posteriori" sullo scarto derivante dal consumo umano e di non far ricorso ad analisi particolarmente costose come quelle di genetica molecolare che necessitano, tra l'altro, di operatori altamente specializzati.

Come si è visto, anche lo scarto da venericoltura presenta caratteristiche sito-specifiche particolari sia in termini di gruppi tassonomici (che pur variando in termini quantitativi su base stagionale rimangono stabili in termini qualitativi) sia rispetto alla composizione elementale, due aspetti a loro volta strettamente correlati a causa delle specie-specificità dei meccanismi di incorporazione degli elementi: in questo caso potrebbe essere interessante approfondire la possibilità di sviluppare un indice che valuti la salubrità degli orti destinati a semina/accrescimento/raccolta di *Venerupis philippinarum* in laguna di Venezia o delle aree direttamente adiacenti, che metta in luce in particolare il livello di stress generato dall'impatto delle attività colturali a livelli ecosistemici superiori rispetto alla specie, quali le popolazioni e le comunità.

Questo sistema di verifica e controllo degli impatti potrebbe essere particolarmente utile anche per valutare la risposta del sistema alle procedure di pulizia dei fondali che secondo il G.R.A.L., l'Ente deputato alla gestione delle risorse alieutiche in laguna di Venezia, devono essere messe in atto all'interno degli orti per migliorare il livello di produttività delle aree destinate a venericoltura. Nonostante il G.R.A.L. proponga di procedere alla frantumazione del prodotto di scarto attraverso appositi macchinari per provvedere poi alla redistribuzione dello stesso sul fondale, come già avviene in altre aree nord adriatiche allo scopo di migliorarne la tessitura (G.R.A.L., 2013), si ritiene preferibile per la laguna di Venezia adottare nel contempo strategie mirate alla diminuzione dei volumi complessivi presenti, viste le stime effettuate sulla base delle osservazioni in campo e del parere esperto degli operatori del settore.

In questo senso la possibilità di utilizzare lo scarto da venericoltura per il confezionamento di manufatti, quali le burghe e le barriere soffolte, adatti alla protezione e al consolidamento idraulico delle morfologie tipiche della laguna di Venezia può rappresentare una soluzione conveniente sia dal punto di vista dell'ottimizzazione dei cicli produttivi in un'ottica di maggiore sostenibilità sia per il miglioramento delle performance dei manufatti stessi grazie alle caratteristiche intrinseche del materiale che si propone di utilizzare. I risultati ottenuti nel presente lavoro indicano la necessità di preferire per questa finalità lo scarto proveniente dalle attività di raccolta dalle aree di concessione della laguna meridionale dove le cooperative di pescatori operano con imbarcazioni di grandi dimensioni che consentono la raccolta e la pulizia dello scarto a bordo e che permetterebbero, in un secondo momento, il suo immediato conferimento in aree prestabilite e opportunamente individuate per lo stoccaggio e il confezionamento.

D'altra parte, data la facilità di reperimento e di manipolazione del materiale, è possibile prevedere un utilizzo dello scarto da venericoltura non confezionato anche per interventi di minore portata in aree maggiormente sensibili quali il sovrizzo dei bassofondali allo scopo di stabilizzazione e di difesa delle aree retrostanti dal moto ondoso, la difesa morfologica delle barene più interne mediante un accumulo a ridosso delle rive o la costituzione di letti filtranti, la costruzione di crostoni emersi per la nidificazione dell'avifauna in aree confinate di barena e valli da pesca, dove tali strutture ad elevato valore ecologico non sono più presenti naturalmente.

6.4 PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

I risultati ottenuti nel corso di questo lavoro di ricerca sono stati presentati in occasione di congressi scientifici nazionali e internazionali; in particolare:

- al VI Congresso Mondiale / 22esimo Incontro Europeo della SETAC, Society of Environmental Toxicology And Chemistry (Berlin - D, 20 – 24 maggio 2012) in due poster dal titolo *“Heavy metal bioaccumulation trends in the shell of two Bivalve species: a comparative study”* e *“Estimation of experimental conditions to maximize mussels shell capability in trace metals accumulation”*;
- alla 50esima Conferenza ECSA “Estuarine Coastal and Shelf Science” (Venezia, 3 – 7 giugno 2012) in una comunicazione orale dal titolo *“Bioinertization strategy by Bivalves: a new challenging technique also for CO₂ balance”*;
- al XII Congresso SItE, Società Italiana Ecologia (Alessandria, 10 – 13 settembre 2012) in un poster intitolato *“Analisi comparativa del contenuto di elementi maggiori e in traccia nelle conchiglie di due specie di Bivalvi della Laguna di Venezia”* e in una comunicazione orale dal titolo *“Bioaccumulo di metalli nelle valve di Tapes philippinarum dell’Alto Adriatico: uno studio comparativo”*;
- al VII Congresso Mondiale / 23esimo Incontro Europeo della SETAC, Society of Environmental Toxicology And Chemistry (Glasgow - UK, 12 – 16 maggio 2013) in un poster dal titolo *“Bivalve shells reuse and recovery: bio-inertisation and engineering applications”*;
- al 53esimo Congresso ECSA “Estuaries and coastal areas in times of intense change” (Shanghai - RC, 13 – 17 ottobre 2013), in un poster dal titolo *“Waste from clam harvesting: a resource for environmental engineering in the Venice lagoon”*;
- al VIII Congresso Mondiale / 24esimo Incontro Europeo della SETAC, Society of Environmental Toxicology And Chemistry (Basel - CH, 11 – 15 maggio 2014) in due poster dal titolo *“Toxicity tests to assess the possibility to use clam harvesting waste as gabions filler material in the Venice lagoon”* e *“Heavy metals in shells: considerations around a possible bioinertization process by using bioaccumulation factors”*.

7. BIBLIOGRAFIA

AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION CITATION STYLE

- Adami, G., Aleffi, F., Barbieri, P., Favretto, A., Predonzani, S., & Reisenhofer, E. (1997). Bivalves and heavy metals in polluted sediments: a chemometric approach. *Water, Air, and Soil Pollution*, 99(1-4), 615-622.
- Ahmad, I., Singh, M. K., Pereira, M. L., Pacheco, M., Santos, M. A., Duarte, A. C., ... & Grácio, J. (2013). Morphological, compositional and ultrastructural changes in the *Scrobicularia plana* shell in response to environmental mercury—An indelible fingerprint of metal exposure?. *Chemosphere*, 90(11), 2697-2704.
- Al-Aasm, I. S., Clarke, J. D., & Fryer, B. J. (1998). Stable isotopes and heavy metal distribution in *Dreissena polymorpha* (zebra mussels) from western basin of Lake Erie, Canada. *Environmental Geology*, 33(2-3), 122-129.
- Alam, M. Z., Ali, M. P., Al-Harbi, N. A., & Choudhury, T. R. (2011). Contamination status of arsenic, lead, and cadmium of different wetland waters. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(10), 1934-1945.
- Alfonso, J. A., Handt, H., Mora, A., Vázquez, Y., Azocar, J., & Marcano, E. (2013). Temporal distribution of heavy metal concentrations in oysters *Crassostrea rhizophorae* from the central Venezuelan coast. *Marine pollution bulletin*, 73(1), 394-398.
- Almeida, M. J., Machado, J., Moura, G., Azevedo, M., & Coimbra, J. (1998a). Temporal and local variations in biochemical composition of *Crassostrea gigas* shells. *Journal of Sea Research*, 40(3), 233-249.
- Almeida, M. J., Moura, G., Pinheiro, T., Machado, J., & Coimbra, J. (1998b). Modifications in *Crassostrea gigas* shell composition exposed to high concentrations of lead. *Aquatic toxicology*, 40(4), 323-334.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Charbonnier, L., Mesnil, A., Rainbow, P. S., & Wang, W. X. (2008). Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6), 2010-2022.
- Aminti P. L., Cappuccini L. (2012). Utilizzo di contenitori in materiali geosintetici riempiti di sabbia per la protezione di strutture archeologiche sommerse. *Geologia dell'Ambiente* 1: 29-31.
- Aminti, P., Mori, E., & Fantini, P. (2010). Submerged barrier for coastal protection application built with tubes in geosynthetics of big diameter in Tuscany—Italy. In *Proceedings of the 9th ICG: International Conference on Geosynthetics*: 1235-1240.
- Aminti, P.L., Mori, E. (2008). Opere di difesa della costa costruite con contenitori in geotessuto riempiti di sabbia. Proc. National Conference Prevenire, Programmare, Pianificare. Maratea, May 2008.
- Apitz, S. E., Barbanti, A., Bocci, M., Carlin, A., Montobbio, L., & Bernstein, A. G. (2007). The sediments of the Venice lagoon (Italy) evaluated in a screening risk assessment approach: part I—application of international sediment quality guidelines. *Integrated environmental assessment and management*, 3(3), 393-414.
- Argese, E., & Bettioli, C. (2001). Heavy metal partitioning in sediments from the lagoon of Venice (Italy). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 79(3-4), 157-170.
- Argese, E., Bettioli, C., Cedolin, A., Bertini, S., & Delaney, E. (2003). Speciation of heavy metals in sediments of the lagoon of Venice collected in the industrial area. *Annali di chimica*, 93(4), 329-336.
- Argese, E., Ramieri, E., Bettioli, C., Pavoni, B., Chiozzotto, E., & Sfriso, A. (1997). Pollutant exchange at the water/sediment interface in the Venice canals. *Water, Air, and Soil Pollution*, 99(1-4), 255-263.
- Arizzi Novelli, A., Picone, M., Losso, C., & Volpi Ghirardini, A. (2003). Ammonia as confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Toxicol. and Environ. Chem.*, 85(4-6), 183-191.

- Asha, K. K., Anandan, R., Suseela, M., Lakshmanan, P. T. (2014). Biochemical profile of oyster *Crassostrea madrasensis* and its nutritional attributes. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40, 35-41.
- ASTM International. E 1563-98 (1998).
- Baccarani G. (2012). Identificazione e validazione di marcatori molecolari, fisiologici ed ambientali per la gestione delle risorse alieutiche lagunari. Tesi di dottorato di ricerca in Scienze Ambientali, XXIV ciclo. Università Ca' Foscari di Venezia.
- Bauchau, V. (2001). Developmental stability as the primary function of the pigmentation patterns in bivalve shells. *Belg J Zool*, 131(Suppl 2), 23-28.
- Baudo, R., Faimali, M., Onorati, F., Pellegrini, D. (2011). Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. Roma, ISPRA.
- Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury-Brachet, R., Bossy, C., Boudou, A., & Blanc, G. (2005). Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Science of the Total Environment*, 337(1), 265-280.
- Beer, N. A., Wing, S. R., & Hu, Y. (2011). Physical versus biological control of element incorporation into biogenic carbonate: an in situ experiment in a New Zealand fjord. *Marine Ecology Progress Series*, 433, 289-301.
- Belabed, B. E., Laffray, X., Dhib, A., Fertouna-Belakhal, M., Turki, S., & Aleya, L. (2013). Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria). *Marine pollution bulletin*, 74(1), 477-489.
- Bellas, J., Albertosa, M., Vidal-Linan, L., Besada, V., Franco M. A., Fumega, J., Gonzalez-Quijano, A., Vinas, L., Beiras, R. (2014). Combined use of chemical, biochemical and physiological variables in mussels for the assessment of marine pollution along the N-NW Spanish coast. *Marine Environmental Research*, 96, 105-117.
- Bellucci, L. G., Frignani, M., Paolucci, D., & Ravanelli, M. (2002). Distribution of heavy metals in sediments of the Venice Lagoon: the role of the industrial area. *Science of the Total Environment*, 295(1), 35-49.
- Bernardello, M., Secco, T., Pellizzato, F., Chinellato, M., Sfriso, A., & Pavoni, B. (2006). The changing state of contamination in the Lagoon of Venice. Part 2: Heavy metals. *Chemosphere*, 64(8), 1334-1345.
- Berto, D., Boscolo Brusà, R., Cacciatore, F., Covelli, S., Rampazzo, F., Giovanardi, O., & Giani, M. (2012). Tin free antifouling paints as potential contamination source of metals in sediments and gastropods of the southern Venice lagoon. *Continental Shelf Research*, 45, 34-41.
- Besada, V., Sericano, J. L., & Schultze, F. (2014). An assessment of two decades of trace metals monitoring in wild mussels from the Northwest Atlantic and Cantabrian coastal areas of Spain, 1991–2011. *Environment international*, 71, 1-12.
- Blackmore, G., & Wang, W. X. (2003). Comparison of metal accumulation in mussels at different local and global scales. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(2), 388-395.
- Boalt, E., Miller, A., & Dahlgren, H. (2014). Distribution of cadmium, mercury, and lead in different body parts of Baltic herring (*Clupea harengus*) and perch (*Perca fluviatilis*): Implications for environmental status assessments. *Marine pollution bulletin*, 78(1), 130-136.

- Boatto, V., & Pellizzato, M. (a cura di). (2005). *La filiera della vongola. Tapes philippinarum in Italia*. Franco Angeli, Milano.
- Bogdanović, T., Ujević, I., Sedak, M., Listeš, E., Šimat, V., Petričević, S., & Poljak, V. (2014). As, Cd, Hg and Pb in four edible shellfish species from breeding and harvesting areas along the eastern Adriatic Coast, Croatia. *Food chemistry*, *146*, 197-203.
- Bonato, G., Manente, S., Perin, G. (2002). Assessment of the environmental pollution relative to Cd and metallothionein concentration in tissues of mussels. Proceedings of 12th SETAC Europe Annual Meeting "Challenges in environmental risk assessment and modelling: linking basic and applied research", Vienna, 12-16 maggio 2002.
- Boro, J., Deka, D., & Thakur, A. J. (2012). A review on solid oxide derived from waste shells as catalyst for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*(1), 904-910.
- Boscolo Papo, M., Bertotto, D., Quaglio, F., Vascellari, M., Pascoli, F., Negrato, E., ... & Radaelli, G. (2014). Histopathology and stress biomarkers in the clam *Venerupis philippinarum* from the Venice Lagoon (Italy). *Fish & shellfish immunology*, *39*(1), 42-50.
- Boscolo, R., Cornello, M., & Giovanardi, O. (2003). Condition index and air survival time to compare three kinds of Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) farming systems. *Aquaculture International*, *11*(3), 243-254.
- Bosse, C., Rosen, G., Colvin, M., Earley, P., Santore, R., & Rivera-Duarte, I. (2014). Copper bioavailability and toxicity to *Mytilus galloprovincialis* in Shelter Island Yacht Basin, San Diego, CA. *Marine pollution bulletin*, *85*(1), 225-234.
- Bourgoin, B. P. (1990). *Mytilus edulis* shell as a bioindicator of lead pollution: Considerations on bioavailability and variability. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, *61*(3), 253-262.
- Breda S. (2012). Qualità ambientale dei siti di coltivazione della vongola verace filippina *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): un approccio integrato mediante analisi ambientali, fisiologiche e molecolari ai fini della tracciabilità e sicurezza alimentare. Tesi di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali. Università Ca' Foscari di Venezia.
- Brooks, R. R., & Rumsby, M. G. (1965). The biogeochemistry of trace element uptake by some New Zealand bivalves. *Limnol. Oceanogr*, *10*(4), 521-527.
- Brunelli, F., Gelli, F., Pregnoletto, L., Pumo, T. C., Scialoja, M. G., Bencivelli, S., Selvatico, L., Roncarati, A., Savorelli, F. (2004). Rilevazione delle emergenze idriche con sensori di preallarme e valutazione dei sedimenti e delle acque destinate alla molluschicoltura attraverso test ecotossicologici (*Mytilus galloprovincialis*). *Biologia Marina Mediterranea*, *11*(2): 490-492.
- Caliceti, M., Argese, E., Sfriso, A., & Pavoni, B. (2002). Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice lagoon. *Chemosphere*, *47*(4), 443-454.
- Carré, M., Bentaleb, I., Bruguier, O., Ordinola, E., Barrett, N. T., & Fontugne, M. (2006). Calcification rate influence on trace element concentrations in aragonitic bivalve shells: Evidences and mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *70*(19), 4906-4920.
- Carrer, S., Coffaro, G., Bocci, M., & Barbanti, A. (2005). Modelling partitioning and distribution of micropollutants in the lagoon of Venice: a first step towards a comprehensive ecotoxicological model. *Ecological modelling*, *184*(1), 83-101.

- Carriker, M. R., Palmer, R. E., Sick, L. V., & Johnson, C. C. (1980). Interaction of mineral elements in sea water and shell of oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin)) cultured in controlled and natural systems. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 46(2), 279-296.
- Carroll, M., & Romanek, C. S. (2008). Shell layer variation in trace element concentration for the freshwater bivalve *Elliptio complanata*. *Geo-Marine Letters*, 28(5-6), 369-381.
- Cautadella, S., Spagnolo, M. (a cura di). (2012). Capitolo 5. L'acquacoltura. in *Lo stato della pesca e dell'acquacoltura nei mari italiani*. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.
- Cecconi, G., & Ardone, V. (2000). La protezione dell'ambiente lagunare e costiero veneziano. *Mare e cambiamenti globali*, 181-198.
- Cesari, P., & Pellizzato, M. (1985). Molluschi pervenuti in Laguna di Venezia per apporti volontari o casuali. Acclimazione di *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughely, 1933) e di *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Bollettino Malacologico*, 21(10-12), 237-274.
- Chester, R., & Hughes, M. J. (1967). A chemical technique for the separation of Fe-Mn minerals, carbonate minerals and adsorbed trace elements from pelagic sediments. *Chemical geology*, 2, 249-262.
- Chiesa, S., Nonnis Marzano, F., Minervini, G., De Lucrezia, D., Baccarani, G., Bordignon, G., Poli, I., Ravagnan, 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.
- 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.
- Comfort, A. (1951). The pigmentation of molluscan shells. *Biological Reviews*, 26(3), 285-301.
- Cravo, A., Bebianno, M. J., & Foster, P. (2004). Partitioning of trace metals between soft tissues and shells of *Patella aspera*. *Environment International*, 30(1), 87-98.
- Cravo, A., Foster, P., & Bebianno, M. J. (2002). Minor and trace elements in the shell of *Patella aspera* (Röding 1798). *Environment international*, 28(4), 295-302.
- Crosby, M. P., & Gale, L. D. (1990). A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *J. Shellfish Res*, 9(1), 233-237.
- D.Lgs. 10 dicembre 2010, n. 219, "Attuazione della direttiva 2008/105/CE relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque, recante modifica e successiva abrogazione delle direttive 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE, nonché modifica della direttiva 2000/60/CE e recepimento della direttiva 2009/90/CE che stabilisce, conformemente alla direttiva 2000/60/CE, specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque. (10G0244)".
- D.M. 27 settembre 2010, "Definizione dei criteri di ammissibilità dei rifiuti in discarica, in sostituzione di quelli contenuti nel decreto del Ministro dell'ambiente e della tutela del territorio 3 agosto 2005. (10A14538)"
- Da Ros, L., Moschino, V., Meneghetti, F., & Marin, M. G. (2005). Aspetti del ciclo riproduttivo e del metabolismo energetico di *Tapes Philippinarum* in Laguna di Venezia. *La filiera della vongola*, 77-88.

- Da Ros, L., Nasci, C., Marigomez, I., & Soto, M. (2000). Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. *Marine environmental research*, 50(1), 417-423.
- Dahms, S., van der Bank, F. H., & Greenfield, R. (2014). A baseline study of metal contamination along the Namibian coastline for *Perna perna* and *Choromytilus meridionalis*. *Marine Pollution Bulletin*, in press.
- Demina, L. L. (2011, July). Estimation of the role of global biological filters in the geochemical migration of trace elements in the ocean: The marginal filter of the ocean. In *Doklady Earth Sciences* (Vol. 439, No. 1, pp. 981-985). SP MAIK Nauka/Interperiodica.
- Dermott, R. M., & Lum, K. R. (1986). Metal concentrations in the annual shell layers of the Bivalve *Elliptio complanata*. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 12(2), 131-143.
- Di Salvatore, P., Calcagno, J. A., Ortíz, N., Ríos de Molina, M. D. C., & Sabatini, S. E. (2013). Effect of seasonality on oxidative stress responses and metal accumulation in soft tissues of *Aulacomya atra*, a mussel from the South Atlantic Patagonian coast. *Marine environmental research*, 92, 244-252.
- Donazzolo, R., Merlin, O. H., Vitturi, L. M., Orio, A. A., Pavoni, B., Perin, G., & Rabitti, S. (1981). Heavy metal contamination in surface sediments from the Gulf of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 12(12), 417-425.
- Du, Y., Lian, F., & Zhu, L. (2011). Biosorption of divalent Pb, Cd and Zn on aragonite and calcite mollusk shells. *Environmental Pollution*, 159(7), 1763-1768.
- Eisler, R. (2009). *Compendium of Trace Metals and Marine Biota: Volume 1: Plants and Invertebrates* (Vol. 1). Elsevier.
- El Haddad, M., Regti, A., Laamari, M. R., Slimani, R., Mamouni, R., Antri, S. E., & Lazar, S. (2014). Calcined mussel shells as a new and eco-friendly biosorbent to remove textile dyes from aqueous solutions. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(2), 533-540.
- El-Shenawy, N. S. (2004). Heavy-metal and microbial depuration of the clam *Ruditapes decussatus* and its effect on bivalve behavior and physiology. *Environmental toxicology*, 19(2), 143-153.
- Facca, C., Pellegrino, N., Ceoldo, S., Tibaldo, M., & Sfriso, A. (2011). Trophic Conditions in the Waters of the Venice Lagoon (Northern Adriatic Sea, Italy). *Open Oceanography Journal*, 5, 1-13.
- Fantini P., Simini A. (2008). Controllo dell'erosione costiera con geosintetici tubolari di grandi dimensioni. Proc. National Conference Prevenire, Programmare, Pianificare. Maratea, May 2008
- FAO (2010) - Fishery and Aquaculture statistics - 2008: 100 pp.
- Figueira, E., Cardoso, P., & Freitas, R. (2012). *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* exposed to cadmium: Toxicological effects and bioaccumulation patterns. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(2), 80-86.
- Fischer, B. B., Pomati, F., & Eggen, R. I. (2013). The toxicity of chemical pollutants in dynamic natural systems: the challenge of integrating environmental factors and biological complexity. *Science of the Total Environment*, 449, 253-259.
- Fletcher, C. A., & Spencer, T. (Eds.). (2005). *Flooding and environmental challenges for Venice and its lagoon: state of knowledge*. Cambridge University Press.

- 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*, 41-56.
- Franzoi, P., Longo, A., Pranovi, F., & Torricelli, P. (2001). La pesca nella laguna di Venezia: un percorso di sostenibilità nel recupero delle tradizioni. Lo stato dell'arte. *Rapporto sullo sviluppo sostenibile. Fondazione ENI Enrico Mattei*.
- Fuge, R., Palmer, T. J., Pearce, N. J., & Perkins, W. T. (1993). Minor and trace element chemistry of modern shells: a laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry study. *Applied geochemistry*, *8*, 111-116.
- G.R.A.L. (2006). Piano d'uso sostenibile delle aree in concessione per venericoltura.
- G.R.A.L. (2013). Piano d'uso delle aree in concessione per venericoltura. Aggiornamento 2013.
- Gaspar, M. B., Santos, M. N., Vasconcelos, P., & Monteiro, C. C. (2002). Shell morphometric relationships of the most common bivalve species (Mollusca: Bivalvia) of the Algarve coast (southern Portugal). *Hydrobiologia*, *477*(1-3), 73-80.
- Ghetti, P.F. & Bonazzi, G. (1980). Biological water assessment methods: Torrente Parma, Torrente Stirone e Fiume Po. 3rd Technical Seminar, Final Report, Commission of the European Communities
- Giacomin, M., Jorge, M. B., & Bianchini, A. (2014). Effects of copper exposure on the energy metabolism in juveniles of the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Aquatic Toxicology*, *152*, 30-37.
- Girón-Pérez, M. I. (2010). Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *ISJ*, *7*, 149-156.
- Giusti, L., & Zhang, H. (2002). Heavy metals and arsenic in sediments, mussels and marine water from Murano (Venice, Italy). *Environmental geochemistry and Health*, *24*(1), 47-65.
- Gosling, E. (2008). *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. John Wiley & Sons.
- Granzotto, A., Franzoi, P., Longo, A., Pranovi, F., & Torricelli, P. (2001). La pesca nella laguna di Venezia: un percorso di sostenibilità nel recupero delle tradizioni. Lo stato dell'arte. *Rapporto sullo sviluppo sostenibile. Fondazione ENI Enrico Mattei*.
- Granzotto, A., Pranovi, F., Libralato, S., Torricelli, P., & Mainardi, D. (2003). Valutazione degli effetti della pesca a livello ecosistemico in laguna di Venezia. *Rapporto sullo sviluppo sostenibile. Fondazione ENI Enrico Mattei*.
- Greenfield, R., Brink, K., Degger, N., & Wepener, V. (2014). The usefulness of transplantation studies in monitoring of metals in the marine environment: South African experience. *Marine pollution bulletin*, in press.
- Guersoni, S., & Tagliapietra, D. (Eds.). (2006). *Atlante della laguna: Venezia tra terra e mare*. Marsilio.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Quéré, C., Bruneau, A., Riso, R., ... & Soudant, P. (2014). Cellular and biochemical responses of the oyster *Crassostrea gigas* to controlled exposures to metals and *Alexandrium minutum*. *Aquatic Toxicology*, *147*, 158-167.
- His, E., Seaman, R.N.L., Beiras R. (1997). A simplified bivalve larval bioassay method for seawater quality assessment. *Water Research* *31*, 351-355.

- Hong, S., Khim, J. S., Park, J., Son, H. S., Choi, S. D., Choi, K., ... & Giesy, J. P. (2014). Species- and tissue-specific bioaccumulation of arsenicals in various aquatic organisms from a highly industrialized area in the Pohang City, Korea. *Environmental Pollution*, *192*, 27-35.
- Hu, S., Wang, Y., & Han, H. (2011). Utilization of waste freshwater mussel shell as an economic catalyst for biodiesel production. *biomass and bioenergy*, *35*(8), 3627-3635.
- Huanxin, W., Lejun, Z., & Presley, B. J. (2000). Bioaccumulation of heavy metals in oyster (*Crassostrea virginica*) tissue and shell. *Environmental Geology*, *39*(11), 1216-1226.
- Hussein, A., & Khaled, A. (2014). Determination of metals in tuna species and bivalves from Alexandria, Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, *40*(1), 9-17.
- IRSA-CNR, a cura di L. Guzzella (1996). Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti (Metodo per la determinazione dell'inibizione della bioluminescenza emessa da *Vibrio fischeri*). *Biologia ambientale*, *6*.
- Jacob, D. E., Soldati, A. L., Wirth, R., Huth, J., Wehrmeister, U., & Hofmeister, W. (2008). Nanostructure, composition and mechanisms of bivalve shell growth. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *72*(22), 5401-5415.
- Jebali, J., Chouba, L., Banni, M., & Boussetta, H. (2014). Comparative study of the bioaccumulation and elimination of trace metals (Cd, Pb, Zn, Mn and Fe) in the digestive gland, gills and muscle of bivalve *Pinna nobilis* during a field transplant experiment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *28*(2), 212-217.
- Kacar, Y., Arpa, Ç., Tan, S., Denizli, A., Genç, Ö., & Arica, M. Y. (2002). Biosorption of Hg (II) and Cd (II) from aqueous solutions: comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, *37*(6), 601-610.
- Kalantzi, I., Papageorgiou, N., Sevastou, K., Black, K. D., Pergantis, S. A., & Karakassis, I. (2014). Metals in benthic macrofauna and biogeochemical factors affecting their trophic transfer to wild fish around fish farm cages. *Science of the Total Environment*, *470*, 742-753.
- Kalman, J., Smith, B. D., Bury, N. R., & Rainbow, P. S. (2014). Biodynamic modelling of the bioaccumulation of trace metals (Ag, As and Zn) by an infaunal estuarine invertebrate, the clam *Scrobicularia plana*. *Aquatic Toxicology*, *154*, 121-130.
- Koerner, R. M. (2005). *Designing with geosynthetics*, V ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Koschinsky, A., Kausch, M., & Borowski, C. (2014). Metal concentrations in the tissues of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus*: Reflection of different metal sources. *Marine environmental research*, *95*, 62-73.
- Kucuksezgin, F., Pazi, I., Yucel-Gier, G., Akcali, B., & Galgani, F. (2013). Monitoring of heavy metal and organic compound levels along the Eastern Aegean coast with transplanted mussels. *Chemosphere*, *93*(8), 1511-1518.
- Lazareth, C. E., Putten, E. V., André, L., & Dehairs, F. (2003). High-resolution trace element profiles in shells of the mangrove bivalve *Isognomon ehippium*: a record of environmental spatio-temporal variations?. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *57*(5), 1103-1114.
- Li, M., Yao, Z. T., Chen, T., Lou, Z. H., & Xia, M. (2014). The antibacterial activity and mechanism of mussel shell waste derived material. *Powder Technology*, *264*, 577-582.

- Li, P., & Gao, X. (2014). Trace elements in major marketed marine bivalves from six northern coastal cities of China: Concentrations and risk assessment for human health. *Ecotoxicology and environmental safety*, *109*, 1-9.
- Libralato, S., Pastres, R., Pranovi, F., Raicevich, S., Granzotto, A., Giovanardi, O., & Torricelli, P. (2002). Comparison between the energy flow networks of two habitats in the Venice Lagoon. *Marine Ecology*, *23*(s1), 228-236.
- Lingard, S. M., Evans, R. D., & Bourgoin, B. P. (1992). Method for the estimation of organic-bound and crystal-bound metal concentrations in bivalve shells. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *48*(2), 179-184.
- Liu, F., & Wang, W. X. (2014). Differential influences of Cu and Zn chronic exposure on Cd and Hg bioaccumulation in an estuarine oyster. *Aquatic Toxicology*, *148*, 204-210.
- Liu, L., Wang, Z., Ju, F., & Zhang, T. (2014). Co-occurrence correlations of heavy metals in sediments revealed using network analysis. *Chemosphere*, in press.
- Liu, Y., Sun, C., Xu, J., & Li, Y. (2009). The use of raw and acid-pretreated bivalve mollusk shells to remove metals from aqueous solutions. *Journal of hazardous materials*, *168*(1), 156-162.
- Lobel, P. B., Bajdik, C. D., Belkhole, S. P., Jackson, S. E., & Longerich, H. P. (1991). Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *21*(3), 409-414.
- Losso, C., Arizzi Novelli, A., Picone, M., Marchetto, D., Pessa, G., Molinaroli, E., Ghetti, P.F., Volpi Ghirardini, A. (2004). Evaluation of surficial sediment toxicity and sediment physico-chemical characteristics of representative sites in the Lagoon of Venice (Italy). *Journal of Marine Systems*, *51*, 281-292.
- Losso, C., Novelli, A. A., De Salvador, D., Ghetti, P. F., & Volpi Ghirardini, A. (2010). Integration of biological responses from a suite of bioassays for the Venice Lagoon (Italy) through sediment toxicity index—Part A: Development and comparison of two methodological approaches. *Environmental Pollution*, *158*(12), 3655-3662.
- Losso, C., Novelli, A. A., Picone, M., Marchetto, D., Pantani, C., Ghetti, P. F., & Ghirardini, A. V. (2007). Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxicology and environmental safety*, *66*(2), 252-257.
- Luo, H., Huang, G., Fu, X., Liu, X., Zheng, D., Peng, J., ... & Sun, X. (2013). Waste oyster shell as a kind of active filler to treat the combined wastewater at an estuary. *Journal of Environmental Sciences*, *25*(10), 2047-2055.
- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., & Huang, M. (2014). Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. *Fish & shellfish immunology*, *38*(2), 318-329.
- Luoma, S. N. (1989). Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements?. *Hydrobiologia*, *176*(1), 379-396.
- Lyons, D. M., Medakovic, D., Skoko, Z., Popovic, S., Roncevic, S., Pitarević Svedružić, L., & Karniš, I. (2009). Biomineralization on an Ancient Sculpture of the Apoxyomenos: Effects of a Metal-Rich Environment on Crystal Growth in Living Organisms. *Crystal Growth and Design*, *9*(8), 3671-3675.

- Mackay, E. A., Overnell, J., Dunbar, B., Davidson, I., Hunziker, P. E., Kägi, J. H., & Fothergill, J. E. (1993). Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *European Journal of Biochemistry*, 218 (1), 183-194.
- Maggi, C., Ausili, A., Boscolo, R., Cacciatore, F., Bonometto, A., Cornello, M., & Berto, D. (2012). Sediment and biota in trend monitoring of contaminants in transitional waters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 36, 82-91.
- Magistrato alle Acque - Ufficio di Piano ex dPCM 13 febbraio 2004 (2008). Pesca di *Tapes philippinarum* in Laguna di Venezia. Stato dell'arte e prospettive.
- Magistrato alle Acque di Venezia (2012). *Progetto di creazione di aree a molluschicoltura a scopo commerciale e di vivaio per gli interventi morfologici con tecniche di ingegneria naturalistica ad elevato valore ambientale in laguna di Venezia*. Rapporto finale. Allegato n. 1.
- Maier, B. J., Griesshaber, E., Alexa, P., Ziegler, A., Ubhi, H. S., & Schmahl, W. W. (2014). Biological control of crystallographic architecture: Hierarchy and co-alignment parameters. *Acta biomaterialia*, in press.
- Majer, A. P., Petti, M. A. V., Corbisier, T. N., Ribeiro, A. P., Theophilo, C. Y. S., Ferreira, P. A. D. L., & Figueira, R. C. L. (2014). Bioaccumulation of potentially toxic trace elements in benthic organisms of Admiralty Bay (King George Island, Antarctica). *Marine pollution bulletin*, 79(1), 321-325.
- Manente S. & Ravagnan G. (2012). *Progetto Arsenale: gli esiti della BIO₂REMEDIATION*. Venezia, Dip. di Scienze Molecolari e Nanosistemi.
- Manente, S. (2004). *Trasferimento di inquinanti tossici da sedimenti a Molluschi in ambiente di transizione*. Tesi di dottorato di ricerca in Scienze Ambientali, XVI ciclo. Università Ca' Foscari di Venezia.
- Manente, S. (2007). *Sediment elutriation, toxicity and bioconcentration in Guanabara Bay*. [Chap. 12], Roma, Dip. Scienze Ambientali, Università Ca' Foscari di Venezia, Ministero Affari Esteri - Ufficio alla Cooperazione e Sviluppo, Agenzia Brasiliana alla Cooperazione - Governo Federale del Brasile, pp. 1-152
- Manente, S., Mao, A., Perin, G. (2003). Active biomonitoring studies related to suspended sediment heavy metal content in Venice Lagoon, Italy, Proceedings of 13th SETAC Europe Annual Meeting "Understanding the complexity of environmental issues: a way to sustainability", Hamburg, 27 aprile – 1 maggio 2003.
- Mann, R., & Glomb, S. J. (1978). The effect of temperature on growth and ammonia excretion of the Manila clam *Tapes japonica*. *Estuarine and coastal marine science*, 6(3), 335-339.
- Marasinghe Wadige, C. P., Taylor, A. M., Maher, W. A., Ubrihien, R. P., & Krikowa, F. (2014). Effects of lead-spiked sediments on freshwater bivalve, *Hyridella australis*: linking organism metal exposure-dose-response. *Aquatic Toxicology*, 149, 83-93.
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E., & Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy research and technique*, 56(5), 358-392.
- Markich, S. J., Jeffree, R. A., & Burke, P. T. (2002). Freshwater bivalve shells as archival indicators of metal pollution from a copper-uranium mine in tropical northern Australia. *Environmental science & technology*, 36(5), 821-832.
- Marsden, I. D., Smith, B. D., & Rainbow, P. S. (2014). Effects of environmental and physiological variables on the accumulated concentrations of trace metals in the New Zealand cockle *Austrovenus stutchburyi*. *Science of The Total Environment*, 470, 324-339.

- Martincić, D., Nürnberg, H. W., Stoeppler, M., & Branica, M. (1984). Bioaccumulation of heavy metals by bivalves from Lim Fjord (North Adriatic Sea). *Marine biology*, 81(2), 177-188.
- Matozzo, V., Binelli, A., Parolini, M., Previato, M., Masiero, L., Finos, L., ... & 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.
- Mauri, M., & Baraldi, E. (2003). Heavy metal bioaccumulation in *Mytilus galloprovincialis*: a transplantation experiment in Venice Lagoon. *Chemistry and Ecology*, 19(2-3), 79-90.
- May, T. W., & Wiedmeyer, R. H. (1998). A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy - Norwalk Connecticut*, 19, 150-155.
- Moriarty, F. (1988). *Ecotoxicology, the study of pollutants in ecosystems*. Academic Press, London, UK.
- Muñoz-Barbosa, A., & Huerta-Díaz, M. A. (2013). Trace metal enrichments in nearshore sediments and accumulation in mussels (*Modiolus capax*) along the eastern coast of Baja California, Mexico: Environmental status in 1995. *Marine pollution bulletin*, 77(1), 71-81.
- Navarrete-Mier, F., Sanz-Lázaro, C., & Marín, A. (2010). Does bivalve mollusc polyculture reduce marine fin fish farming environmental impact?. *Aquaculture*, 306(1), 101-107.
- Nesto, N., Romano, S., Moschino, V., Mauri, M., & Da Ros, L. (2007). Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 55(10), 469-484.
- Niju, S., Meera Sheriffa Begum, K. M., & Anantharaman, N. (2014). Enhancement of biodiesel synthesis over highly active CaO derived from natural white bivalve clam shell. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Núñez, J. D., Laitano, M. V., & Cledón, M. (2012). An intertidal limpet species as a bioindicator: Pollution effects reflected by shell characteristics. *Ecological Indicators*, 14(1), 178-183.
- Olmedo, P., Hernández, A. F., Pla, A., Femia, P., Navas-Acien, A., & Gil, F. (2013). Determination of essential elements (copper, manganese, selenium and zinc) in fish and shellfish samples. Risk and nutritional assessment and mercury–selenium balance. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 299-307.
- Orban, E., Di Lena, G., Masci, M., Navigato, T., Casini, I., Caproni, R., ... & Pellizzato, M. (2004). Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1929-1938.
- Owsianiak, M., Veltman, K., Hauschild, M. Z., Hendriks, A. J., Steinmann, Z. J., & Huijbregts, M. A. (2014). Elucidating differences in metal absorption efficiencies between terrestrial soft-bodied and aquatic species. *Chemosphere*, 112, 487-495.
- Paesanti, F., Pellizzato, M. (2000). *Tapes philippinarum*. Manuale sulla vongola verace di allevamento. Veneto Agricoltura.
- 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(4), 987-998.
- Peña-Rodríguez, S., Bermúdez-Couso, A., Nóvoa-Muñoz, J. C., Arias-Estévez, M., Fernández-Sanjurjo, M. J., Álvarez-Rodríguez, E., & Núñez-Delgado, A. (2013). Mercury removal using ground and calcined mussel shell. *Journal of Environmental Sciences*, 25(12), 2476-2486.

- Perin, G., Bonardi, M., Fabris, R., Simoncini, B., Manente, S., Tosi, L., & Scotto, S. (1997). Heavy metal pollution in central Venice Lagoon bottom sediments: evaluation of the metal bioavailability by geochemical speciation procedure. *Environmental Technology*, 18(6), 593-604.
- Perin, G., Fabris, R., Manente, S., Wagener, A. R., Hamacher, C., & Scotto, S. (1997). A five-year study on the heavy-metal pollution of Guanabara Bay sediments (Rio de Janeiro, Brazil) and evaluation of the metal bioavailability by means of geochemical speciation. *Water Research*, 31(12), 3017-3028.
- Petersen, J. K., Hasler, B., Timmermann, K., Nielsen, P., Tørring, D. B., Larsen, M. M., & Holmer, M. (2014). Mussels as a tool for mitigation of nutrients in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 82(1), 137-143.
- Petrović, S., Ozretić, B., Krajnović-Ozretić, M., & Bobinac, D. (2001). Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as Biomarkers in a Field Study. *Marine pollution bulletin*, 42 (12), 1373-1378.
- Phillips, D. J., & Rainbow, P. S. (1989). Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. *Marine Environmental Research*, 28(1), 207-210.
- Piccirillo, C., Pereira, S. I. A., Marques, A. P., Pullar, R. C., Tobaldi, D. M., Pintado, M. E., & Castro, P. M. (2013). Bacteria immobilisation on hydroxyapatite surface for heavy metals removal. *Journal of environmental management*, 121, 87-95.
- Pilarczyk, K. W. (2000). Critical review of geosystems in hydraulics and coastal engineering application. Atti II European Geosynthetics Conference, Bologna., 65-76.
- Poigner, H., Monien, P., Monien, D., Kriews, M., Brumsack, H. J., Wilhelms-Dick, D., & Abele, D. (2013). Influence of the porewater geochemistry on Fe and Mn assimilation in *Laternula elliptica* at King George Island (Antarctica). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 135, 285-295.
- Pourang, N., Richardson, C. A., Chenery, S. R. N., & Nasrollahzede, H. (2014). Assessment of trace elements in the shell layers and soft tissues of the pearl oyster *Pinctada radiata* using multivariate analyses: a potential proxy for temporal and spatial variations of trace elements. *Environmental monitoring and assessment*, 186(4), 2465-2485.
- Pranovi, F., Da Ponte, F., Raicevich, S., & Giovanardi, O. (2004). A multidisciplinary study of the immediate effects of mechanical clam harvesting in the Venice Lagoon. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 61(1), 43-52.
- Pranovi, F., Libralato, S., Raicevich, S., Granzotto, A., Pastres, R., & Giovanardi, O. (2003). Mechanical clam dredging in Venice lagoon: ecosystem effects evaluated with a trophic mass-balance model. *Marine Biology*, 143(2), 393-403.
- Preda, C., Saporta, G., & Mbarek, M. H. B. H. (2010). The NIPALS algorithm for missing functional data. *Rev. Roumaine Math. Pures Appl.*, 55(4), 315-326.
- Protocollo d'Intesa sui fanghi dell'8 aprile 1993 tra Ministero dell'Ambiente, Regione Veneto Provincia di Venezia, Comuni di Venezia e Chioggia, recante "Criteri di sicurezza ambientale per gli interventi di escavazione, trasporto e impiego dei fanghi estratti dai canali di Venezia (art.4, comma 6, L. 360/91)"
- Puente, X., Villares, R., Carral, E., & Carballeira, A. (1996). Nacreous shell of *Mytilus galloprovincialis* as a biomonitor of heavy metal pollution in Galiza (NW Spain). *Science of the total environment*, 183(3), 205-211.

- Putten, E. V., Dehairs, F., Keppens, E., & Baeyens, W. (2000). High resolution distribution of trace elements in the calcite shell layer of modern *Mytilus edulis*: environmental and biological controls. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(6), 997-1011.
- Ravera, O., Cenci, R., Beone, G. M., Dantas, M., & Lodigiani, P. (2003). Trace element concentrations in freshwater mussels and macrophytes as related to those in their environment. *Journal of Limnology*, 62(1), 61-70.
- Reardon, J., Foreman, J. A., & Searcy, R. L. (1966). New reactants for the colorimetric determination of ammonia. *Clinica Chimica Acta*, 14 (3), 403-405.
- Reg. CE del 19 dicembre 2006, n. 1881, Tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE).
- Reinfelder, J. R., Wang, W. X., Luoma, S. N., & Fisher, N. S. (1997). Assimilation efficiencies and turnover rates of trace elements in marine bivalves: a comparison of oysters, clams and mussels. *Marine Biology*, 129(3), 443-452.
- Rezaei, R., Mohadesi, M., & Moradi, G. R. (2013). Optimization of biodiesel production using waste mussel shell catalyst. *Fuel*, 109, 534-541.
- Richir, J., & Gobert, S. (2014). The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators*, 36, 33-47.
- Rubio, R., Lopez Sanchez, J.F., Rauret, G. (1993). Trace metals partitioning in sediment: a common sequential extraction procedure. *International Association of Theoretical and Applied Limnology - Proceedings*, 25, 1147-1149.
- Sacchi, A., Mouneyrac, C., Bolognesi, C., Sciutto, A., Roggieri, P., Fusi, M., ... & Capri, E. (2013). Biomonitoring study of an estuarine coastal ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Environmental pollution*, 177, 82-89.
- Sadaoui, L., Badri, M., & Badri, L. (2012). Improving Class Cohesion Measurement: Towards a Novel Approach Using Hierarchical Clustering. *Journal of Software Engineering and Applications*, 5, 449.
- Sager, M. (1989). The speciation of heavy metals in river sediments found by sequential leaching methods. *Heavy Metals in the Environment*, 1, 213-216.
- Santos, C. M., Nunes, M. A., Barbosa, I. S., Santos, G. L., Peso-Aguiar, M. C., Korn, M. G., ... & Dressler, V. L. (2013). Evaluation of microwave and ultrasound extraction procedures for arsenic speciation in bivalve mollusks by liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 86, 108-114.
- Schöne, B. R., Zhang, Z., Jacob, D., Gillikin, D. P., Tütken, T., Garbe-Schönberg, D., & Soldati, A. (2010). Effect of organic matrices on the determination of the trace element chemistry (Mg, Sr, Mg/Ca, Sr/Ca) of aragonitic bivalve shells (*Arctica islandica*)—Comparison of ICP-OES and LA-ICP-MS data. *Geochemical Journal*, 44(1), 23-37.
- Scudiero, R., Cretì, P., Trinchella, F., & Grazia Esposito, M. (2014). Evaluation of cadmium, lead and metallothionein contents in the tissues of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Campania coast (Italy): Levels and seasonal trends. *Comptes rendus biologiques*, 337(7), 451-458.

- Sfriso, A., Facca, C., Ghetti, P.F. (2007). Rapid Quality Index (R-MaQI), based mainly on macrophyte associations, to assess the ecological status of Mediterranean transitional environments. *Chemistry and Ecology*, 23: 493-503.
- Sfriso, A., Facca, C., Ghetti, P.F. (2009). Validation of the Macrophyte Quality Index (MaQI) set up to assess the ecological status of Italian marine transitional environments. *Hydrobiologia*, 617: 117-141.
- Shirai, K., Schöne, B. R., Miyaji, T., Radarmacher, P., Krause Jr, R. A., & Tanabe, K. (2014). Assessment of the mechanism of elemental incorporation into bivalve shells (*Arctica islandica*) based on elemental distribution at the microstructural scale. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 126, 307-320.
- Simeoni, U., & Corbau, C. (2009). A review of the Delta Po evolution (Italy) related to climatic changes and human impacts. *Geomorphology*, 107(1), 64-71.
- Soído, C., Vasconcellos, M. C., Diniz, A. G., & Pinheiro, J. (2009). An improvement of calcium determination technique in the shell of molluscs. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1), 93-98.
- Solidoro, C., Pastres, R., Melaku Canu, D., Pellizzato, M., & Rossi, R. (2000). Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. *Marine ecology. Progress series*, 199, 137-148.
- Søndergaard, J., Bach, L., & Gustavson, K. (2014). Measuring bioavailable metals using diffusive gradients in thin films (DGT) and transplanted seaweed (*Fucus vesiculosus*), blue mussels (*Mytilus edulis*) and sea snails (*Littorina saxatilis*) suspended from monitoring buoys near a former lead–zinc mine in West Greenland. *Marine pollution bulletin*, 78(1), 102-109.
- Sorokin, Y. I., & Giovanardi, O. (1995). Trophic characteristics of the Manila clam (*Tapes philippinarum* Adams and Reeve). *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 52(5), 853-862.
- Stortini, A. M., Freda, A., Cesari, D., Cairns, W. R. L., Contini, D., Barbante, C., ... & Gambaro, A. (2009). An evaluation of the PM_{2.5} trace elemental composition in the Venice Lagoon area and an analysis of the possible sources. *Atmospheric Environment*, 43(40), 6296-6304.
- Strižak, Ž., Ivanković, D., Pröfrock, D., Helmholz, H., Cindrić, A. M., Erk, M., & Prange, A. (2014). Characterization of the cytosolic distribution of priority pollutant metals and metalloids in the digestive gland cytosol of marine mussels: Seasonal and spatial variability. *Science of The Total Environment*, 470, 159-170.
- Sturesson, U. (1978). Cadmium enrichment in shells of *Mytilus edulis*. *Ambio*, 122-125.
- Sundby, B., Anderson, L. G., Hall, P. O., Iverfeldt, Å., van der Loeff, M. M., & Westerlund, S. F. (1986). The effect of oxygen on release and uptake of cobalt, manganese, iron and phosphate at the sediment-water interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 50(6), 1281-1288.
- Takesue, R. K., Bacon, C. R., & Thompson, J. K. (2008). Influences of organic matter and calcification rate on trace elements in aragonitic estuarine bivalve shells. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(22), 5431-5445.
- Tankéré, S. P. C., Price, N. B., & Statham, P. J. (2000). Mass balance of trace metals in the Adriatic Sea. *Journal of Marine systems*, 25(3), 269-286.
- Taylor, A. M., & Maher, W. A. (2014). Exposure–dose–response of *Tellina deltoidalis* to metal contaminated estuarine sediments 2. Lead spiked sediments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 159, 52-61.
- Taylor, J. D. (1973). The structural evolution of the bivalve shell. *Palaeontology*, 16(3), 519-534.

- Tessier, A., Campbell, P. G., & Bisson, M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical chemistry*, 51(7), 844-851.
- Trainor, F. R. (1984). Indicator algal assays: laboratory and field approaches. *Algae as Ecological Indicators*, Academic Press, New York 1984. p 3-14, 6 tab, 22 ref.
- Tudor, H. E., Gryte, C. C., & Harris, C. C. (2006). Seashells: detoxifying agents for metal-contaminated waters. *Water, air, and soil pollution*, 173(1-4), 209-242.
- Turolla, E. (2008). La venericoltura in Italia. *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura*, 177.
- UNI 10802:2013, Rifiuti - Campionamento manuale, preparazione del campione ed analisi degli eluati.
- UNI EN 14735:2005, Caratterizzazione dei rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.
- UNI EN ISO 10253:2006, Qualità dell'acqua - Saggio di inibizione della crescita di alghe marine con *Skeletonema costatum* e *Phaeodactylum tricornutum*.
- Veneto Agricoltura, Provincia di Venezia (2011). *Piano per la gestione della venericoltura in laguna di Venezia*.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., & Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44 (1), 69-84.
- Vijayaraghavan, K., & Yun, Y. S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*, 26(3), 266-291.
- Viriya-Empikul, N., Krasae, P., Puttasawat, B., Yoosuk, B., Chollacoop, N., & Faungnawakij, K. (2010). Waste shells of mollusk and egg as biodiesel production catalysts. *Bioresource technology*, 101(10), 3765-3767.
- Volpi Ghirardini, A., & Pantani, C. (1996, May). Sediment toxicity assessment: further development of Microtox solid-phase bioassay procedure. In *Poster presented at the Sixth SETAC—Europe Annual Meeting, Taormina, Italy* (pp. 19-22).
- Volpi Ghirardini, A., Girardini, M., Marchetto, D., & Pantani, C. (2009). Microtox® solid phase test: Effect of diluent used in toxicity test. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72 (3), 851-861.
- Walne, P. R. (1976). Experiments on the culture in the sea of the butterflyfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture*, 8(4), 371-381.
- Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology advances*, 27(2), 195-226.
- Wang, W. X., & Fisher, N. S. (1999). Effects of calcium and metabolic inhibitors on trace element uptake in two marine bivalves. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 236(1), 149-164.
- Weng, N., & Wang, W. X. (2014). Variations of trace metals in two estuarine environments with contrasting pollution histories. *Science of The Total Environment*, 485, 604-614.
- Wepener, V., Bervoets, L., Mubiana, V., & Blust, R. (2008). Metal exposure and biological responses in resident and transplanted blue mussels (*Mytilus edulis*) from the Scheldt estuary. *Marine pollution bulletin*, 57(6), 624-631.

- Williams, T. P., Bubb, J. M., & Lester, J. N. (1994). Metal accumulation within salt marsh environments: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 28(5), 277-290.
- Yap, C. K., Ismail, A., Tan, S. G., & Abdul Rahim, I. (2003). Can the shell of the green-lipped mussel *Perna viridis* from the west coast of Peninsular Malaysia be a potential biomonitoring material for Cd, Pb and Zn?. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 57(4), 623-630.
- Zatta, P., Gobbo, S., Rocco, P., Perazzolo, M., & Favarato, M. (1992). Evaluation of heavy metal pollution in the Venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. *Science of the total environment*, 119, 29-41.
- Zhang, C., Yu, Z. G., Zeng, G. M., Jiang, M., Yang, Z. Z., Cui, F., ... & Hu, L. (2014). Effects of sediment geochemical properties on heavy metal bioavailability. *Environment international*, 73, 270-281.
- Zuin, A. & Cipolato, G., Minetto, D., Libralato, G., Manente, S., Volpi Ghirardini, A., Ravagnan, G. (2014). Toxicity tests to assess the possibility to use clam harvesting waste as gabions filler material in the Venice lagoon. Proceedings of SETAC Europe 24th Annual Congress "Science across bridges, borders and boundaries". Basel, 11-15 maggio 2014.
- Zuin, A. & Cipolato, G., Visin, F., Cairns, W., Manente, S., Rampazzo, G., Ravagnan, G. (2014). Heavy metals in shells: considerations around a possible bioinertization process by using bioaccumulation factors. Proceedings of SETAC Europe 24th Annual Congress "Science across bridges, borders and boundaries". Basel, 11-15 maggio 2014.
- Zuin, A., Cipolato, G., Manente, S., Ravagnan, G. (2013). Waste from clam harvesting: a resource for environmental engineering in the Venice lagoon. Proceedings of 53rd ECSA Conference "Estuaries and coastal areas in times of intense change". Shanghai, 13-17 October 2013.
- Zuin, A., Manente, S., Brando, V., Bordignon, G., Ravagnan, G. (2012). Bioinertization strategy by Bivalves: A new challenging technique also for CO₂ balance. Proceedings of 50th ECSA Conference "Today's science for tomorrow's Management". Venice,, 3-7 June 2012.
- Zuin, A., Manente, S., Minello, F., Gobbo, L., Argese, E.; Ravagnan, G. (2012). Analisi comparativa del contenuto di elementi maggiori e in traccia nelle conchiglie di due specie di Bivalvi della Laguna di Venezia. Atti del XXXII Congresso della Società Italiana di Ecologia – S.It.E., "Ecologia e Gestione Ambientale". Alessandria, 10-13 Settembre 2012.
- Zuin, A., Manente, S., Minello, F., Gobbo, L., Breda, S., Argese, E., Ravagnan, G. (2012). Bioaccumulo di metalli nelle valve di *Tapes philippinarum* dell'Alto Adriatico: uno studio comparativo. Atti del XXXII Congresso della Società Italiana di Ecologia – S.It.E., "Ecologia e Gestione Ambientale". Alessandria, 10-13 Settembre 2012.
- Zuin, A., Manente, S., Ravagnan G. (2012). Estimation of experimental conditions to maximize mussels shell capability in trace metals accumulation. Proceedings of 6th SETAC World Congress / SETAC Europe 22nd Annual Meeting "Securing a sustainable future: Integrating science, policy and people". Berlin, 20-24 May 2012.
- Zuin, A., Manente, S., Ravagnan, G. (2012). Heavy metal bioaccumulation trends in the shell of two Bivalve species: a comparative study., Proceeding of 6th SETAC World Congress / SETAC Europe 22nd Annual Meeting "Securing a sustainable future: Integrating science, policy and people". Berlin, 20-24 May 2012.

Zuin, A., Manente, S., Ruggeri, R., Ravagnan, G. (2013). Bivalve shells reuse and recovery: bio-inertisation and engineering applications. Proceedings of SETAC Europe 23rd Annual Congress “Building a better future: Responsible innovation and environmental protection”. Glasgow, 12-16 maggio 2013.

ALLEGATO A

DATI

Analisi elementale delle conchiglie (Parte prima): concentrazioni (in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) degli elementi analizzati, peso della conchiglia (in g DW) e dimensioni (L1, L2 e L3 in cm)

	SITO	PESO (g DW)	L1 (cm)	L2 (cm)	L3 (cm)	Al	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Ga	Li	Mg	Mn	Pb	Se	Sr	U	V	Zn
A1	A	5,800	2,520	3,590	0,120	18,099	0,323		0,638	1,693	0,186	0,550	0,694	249,317	5,692	0,361			882,922			
A2	A	4,564	2,430	3,140	0,120	36,471	0,274	3,440	0,543	1,731		0,810	0,175	0,827	257,063	4,375	0,857			862,154	0,257	2,521
A3	A	7,753	2,620	3,510	0,130	18,281		3,195		1,731		0,508		0,726	285,582	3,371	0,469			861,355		0,612
A4	A	7,872	2,590	3,760	0,140	28,193	0,294	3,402	0,391	1,099	0,162	0,589	0,112	0,725	237,472	4,157				847,607	0,126	0,128
A5	A	4,901	2,350	3,200	0,130	7,598	0,218	3,839	0,390	1,130	0,193	0,510	0,111	0,768	240,525	3,986	0,035			907,225	0,117	1,041
A6	A	5,495	2,410	3,170	0,120	28,840	0,302	4,090	0,396	1,161	0,077	0,589	0,103	0,704	196,749	5,253	0,486			1639,028	0,189	1,002
A7	A	5,252	2,550	3,410	0,110	25,740	0,203	3,062	0,463	1,691		0,504		0,736	279,856	5,498	0,566			797,640		0,499
A8	A	7,884	2,830	3,750	0,120	28,349		3,512		1,139	0,160	0,567	0,107	0,760	220,393	9,398	0,604	0,536		905,046	0,135	0,364
A9	A	3,980	2,280	2,930	0,110	29,375	0,653	4,673	0,406	1,258	0,194	0,838	0,116	0,693	227,288	4,381	0,907			1854,206	0,267	1,873
B1	B	6,137	2,430	3,550	0,110	62,525	0,474	3,762	0,348	1,130	0,253	0,926	0,119	0,704	305,026	4,587	0,566			936,650	0,165	0,364
B2	B	4,680	2,160	3,210	0,120	65,097	0,521	4,141		1,277	0,254	0,738	0,119	0,645	255,275	5,461	0,295			1822,720	0,101	0,317
B3	B	4,663	2,270	3,080	0,140	94,404	0,454	3,575		1,139	0,270	0,759	0,125	0,658	368,778	3,689	0,482	0,930		1005,375	0,102	0,382
B4	B	5,212	2,290	3,180	0,120	72,472	0,428	3,036		1,213	0,248	0,689	0,108	0,685	324,613	3,744	0,089	1,059		932,053	0,396	1,095
B5	B	6,243	2,420	3,220	0,160	90,901	0,574	3,918		1,240	0,121	0,798	0,116	0,586	337,135	4,205	0,363	0,396		1757,990	0,091	0,469
B6	B	7,869	2,620	3,380	0,160	26,427	0,523	3,008		1,227	0,095	0,456		0,620	178,949	2,455	0,620			1655,140		0,283
E1	E	6,328	2,490	3,650	0,150	63,285	0,441	6,309		1,188	0,262	0,802	0,158	1,157	269,462	10,404	0,312			1859,310	0,233	0,343
E2	E	5,705	2,520	3,600	0,110	61,032	0,457	4,633	0,391	1,219	0,205	0,363	0,126	1,234	239,685	3,542	1,073			1797,373	0,112	0,296
E3	E	6,399	2,440	3,620	0,120	41,508	0,470	4,589	0,396	1,234	0,338	0,451	0,112	1,419	198,335	4,520	0,394			1746,182	0,091	0,212
E4	E	4,724	2,350	3,430	0,090	80,409		7,633		1,278	0,327	0,562	0,191	0,861	293,557	8,279	0,975			1966,882	0,219	0,502
E5	E	6,696	2,590	3,930	0,130	67,503	0,327	3,914		1,171	0,237	0,478	0,127	1,088	276,462	4,061	1,456	0,922		947,829	0,132	0,315
E6	E	5,928	2,400	3,430	0,110	24,818	0,310	4,051		1,306	0,232	0,448	0,107	0,625	211,501	3,914	0,429			1608,298	0,195	0,039
H2	H	6,399	2,440	3,620	0,120	12,854	0,161	4,264	0,268	1,331	0,178	0,494	0,112	0,610	257,879	3,099	0,610	0,853		1731,700		0,064
H3	H	6,607	2,680	3,520	0,140	6,828		3,623		1,334	0,094	0,409	0,093		243,717	6,324	1,299			1583,912		0,097
H4	H	4,280	2,290	3,300	0,120	22,204	0,288	3,820		1,369	0,326	0,553	0,090		283,142	7,730	1,300			1564,781	0,122	0,193
H5	H	4,479	2,300	3,080	0,120	2,570		3,562		1,519	0,216	0,325	0,091	0,578	215,670	4,442	0,136			1549,752		0,089
H6	H	5,188	2,410	3,290	0,130	9,295		3,368		1,692	0,169	0,384	0,086	0,473	195,072	5,589	0,575			1461,303		0,247
Z11	ZI	8,818	3,000	3,920	0,170	69,807	0,927	3,467		1,493	0,267	0,610	0,126	0,506	261,398	6,326	2,273			902,680	0,250	1,933
Z12	ZI	5,906	2,570	3,560	0,130	20,190		3,114		1,557	0,193	0,477	0,099		186,455	4,325	0,750	1,265		829,026	0,084	1,053
Z13	ZI	4,881	2,470	3,150	0,110	13,601	0,349	3,095		1,589	0,167	0,525	0,095	0,396	154,769	3,281	0,727			807,526		0,755
MR1	MR	3,848	2,330	3,480	0,100	28,233	0,255			1,881	0,239		0,334	0,417	212,135	13,002	2,703			1921,138	0,118	0,144
MR2	MR	4,667	2,280	3,290	0,120	33,201	0,337	11,595	0,319	1,850	0,279	0,466	0,285	0,366	184,327	12,511	1,500			1845,749	0,114	0,182
MR3	MR	6,406	2,480	3,560	0,120	18,129	0,191	11,793	0,280	1,195	0,234	0,567	0,308	0,573	183,385	13,813	0,051			926,449	0,108	0,107
MR4	MR	6,558	2,550	3,110	0,120	86,395	0,667	21,696	0,517	1,906	0,099	0,598	0,509	0,799	272,694	15,904	0,909	1,194		992,370	0,279	0,310
MR5	MR	6,429	2,530	3,570	0,130	51,080	0,521	15,513	0,517	1,973	0,324	0,651	0,395	0,621	219,452	10,156	0,602	1,453		922,942	0,252	0,247
MR6	MR	7,314	2,740	3,710	0,100	81,570	0,837	16,122	0,380	1,955	0,509	0,629	0,388	0,398	165,419	12,928	0,724	1,571		1792,971	0,122	0,275
MR7	MR	5,951	2,290	3,380	0,140	14,107	0,478	4,566		1,624	0,184	0,460		0,693	271,652	6,618	0,387			844,590		
MR8	MR	5,207	2,510	3,520	0,120	14,974	0,342	4,079	0,444	1,662	0,202	0,456		0,756	274,115	9,859	1,738			820,042		
MR9	MR	4,148	2,370	3,300	0,110	13,899	0,421	4,767		2,023	0,231	0,503	0,118	0,424	196,747	7,425	0,371			1972,563		0,111
SC1	SC	3,796	2,200	3,140	0,090	44,112	0,181	15,749		1,227	0,293	0,553	0,412	0,605	280,129	16,664	2,411	1,028		946,807	0,093	0,137
SC2	SC	4,512	2,330	3,440	0,090	23,995	0,675	16,223		2,932	0,270	0,452	0,377		109,027	8,260	1,156	3,837		1843,039	0,157	0,203
SC3	SC	6,544	2,660	3,730	0,110	76,382	0,618	16,850		2,079	0,047	0,647	0,422		229,531	11,893	0,547	1,565		893,852	0,198	0,298
SC4	SC	4,691	2,310	3,250	0,090	23,413	0,304	12,503		2,063	0,227	0,468	0,312	0,508	204,461	8,823	0,341	1,472		994,654		
SC5	SC	4,258	2,440	3,360	0,100	31,758	0,285	13,360	0,506	2,089	0,254	0,438	0,328	0,499	235,056	10,702	0,273	1,585		944,189		
SC6	SC	3,414	2,240	3,130	0,100	20,974	0,310	13,364	0,490	2,228		0,478	0,332		269,226	9,501	0,337			959,368		
SC7	SC	7,424	2,590	3,710	0,180	33,353	0,502	6,939		2,140	0,240	0,455	0,203	0,574	178,520	11,285	0,645			992,395	0,271	0,236
SC8	SC	6,977	2,600	3,510	0,140	63,398	0,392	6,192		1,250	0,340	0,490	0,181	0,732	249,206	9,116	2,030			917,990	0,132	0,280
SC9	SC	4,033	2,250	3,220	0,100	14,878	0,461	5,325		2,382	0,255	0,463	0,168		276,900	9,704	0,945	2,050		180,012		0,390
VL1	VL	4,333	2,330	3,310	0,090	33,206	0,233	13,655		1,291	0,258	0,612	0,357	0,568	290,675	16,069	0,554			890,095	0,133	0,171
VL2	VL	5,501	2,570	3,740	0,100	9,154	0,280	12,269		2,164	0,266	0,502	0,289		155,467	10,090	0,543	2,545		1934,234	0,095	0,115
VL3	VL	3,764	2,300	3,270	0,090	19,569	0,262	12,643		2,221	0,297	0,497	0,296		163,681	12,428	0,662			1941,463		0,093
VL4	VL	5,428	2,440	3,460	0,100	32,482	0,235	12,393		1,402	0,294	0,558	0,312	0,534	271,672	13,830	0,013			880,229	0,103	0,190
VL5	VL	4,773	2,470	3,580	0,100	24,984		17,537	0,389	2,441	0,410	0,657	0,396	0,288	150,825	13,827	1,096			2134,571	0,213	0,143
VL6	VL	4,672	2,340	3,500	0,090	8,871	0,309	13,858		2,582	0,278	0,456	0,311	0,242	137,529	8,561	0,162	2,997		1938,949		0,097
VL7	VL	4,428	2,430	3,400	0,100	16,943		4,918		2,724	0,258	0,440	0,124	0,231	160,949	7,393	0,480	2,988		1893,696	0,120	0,367
VL8	VL	4,822	2,370	3,170	0,110	6,985		4,318	0,567	2,490	0,011	0,430			204,878	3,385	0,382	2,341		950,304		
VL9	VL	3,695	2,340	3,200	0,100	22,071	0,527	4,859		2,477		0,514		0,431	188,379	5,549	1,791	2,565		928,740		0,346
s16 1	s16	7,108	2,520	3,310	0,180	5,280		2,683		0,519		0,150	0,208	0,208	96,689	1,325	0,16					

Calcolo dell'indice di condizione per i campioni di *Venerupis philippinarum* (Parte seconda): dimensioni delle conchiglie (L1, L2 e L3 in cm), peso della conchiglie (SH in g DW) e dei tessuti molli (ST in g DW)

	L1 (cm)	L2 (cm)	L3 (cm)	SH (g DW)	ST (g DW)		L1 (cm)	L2 (cm)	L3 (cm)	SH (g DW)	ST (g DW)
A1	3,29	1,84	2,55	4,94	0,47	EF1	3,21	1,64	2,54	4,17	0,3
A2	3,41	1,69	2,61	4,87	0,4	EF2	3,31	1,73	2,52	4,96	0,64
A3	3,28	1,87	2,53	5,52	0,38	EF3	3,57	1,64	2,52	4,4	0,53
A4	3,42	1,78	2,53	5,27	0,44	EF4	3,57	1,75	2,67	5,78	0,54
A5	3,33	1,71	2,52	4,82	0,4	EF5	3,71	1,94	2,76	6,85	0,77
A6	3,92	2,19	2,99	8,81	0,62	EF6	3,12	1,58	2,45	4,61	0,52
A7	3,17	1,76	2,36	4,16	0,36	EF7	3,21	1,79	2,57	5,43	0,49
A8	3,19	1,74	2,41	5,3	0,41	EF8	3,53	1,98	2,67	5,98	0,65
A9	4,03	1,94	2,76	6,92	0,72	EF9	3,33	1,61	2,46	5,09	0,57
A10	3,34	1,75	2,56	5,28	0,5	EF10	3,44	1,85	2,59	5,77	0,49
A11	3,39	1,75	2,61	5,03	0,35	EF11	3,26	1,63	2,37	4,04	0,53
A12	3,78	1,97	2,9	6,49	0,42	EF12	3,29	1,64	2,44	4,89	0,49
A13	3,22	1,68	2,38	4,18	0,38	EF13	3,19	1,57	2,44	3,98	0,39
A14	3,12	1,66	2,35	4,16	0,27	EF14	3,12	1,57	2,3	3,84	0,48
A15	3,48	1,95	2,68	6,55	0,38	EF15	3,46	1,61	2,46	4,61	0,55
A16	3,77	1,93	2,8	6,31	0,54	EF16	3,75	1,93	2,84	6,86	0,57
A17	3,66	2,12	2,77	8,43	0,5	EF17	3,34	1,78	2,54	4,87	0,59
A18	3,54	1,87	2,75	5,73	0,47	EF18	3,87	1,85	2,85	7,49	0,69
A19	3,47	1,82	2,61	4,83	0,39	EF19	3,33	1,69	2,41	5,04	0,51
A20	3,25	1,73	2,48	4,75	0,53	EF20	4,8	2,51	3,6	17,14	1,08
A21	3,55	1,83	2,76	6,49	0,42	EF21	3,13	1,61	2,41	4,19	0,52
A22	3,47	1,86	2,51	5,52	0,42	EF22	3,44	1,69	2,65	5	0,42
A23	3,42	1,79	2,56	4,29	0,41	EF23	3,24	1,37	2,36	4,25	0,55
A24	2,99	1,62	2,32	3,4	0,34	EF24	3,52	1,66	2,38	5,12	0,55
A25	3,37	1,78	2,52	5,03	0,36	EF25	3,42	1,78	2,63	5,93	0,56
A26	3,25	1,7	2,61	5,4	0,37	EF26	3,32	1,56	2,53	4,41	0,55
A27	3,59	1,91	2,82	6,56	0,43	EF27	3,44	1,7	2,43	4,34	0,47
A28	3,05	1,52	2,43	3,3	0,37	EF28	3,47	1,79	2,55	4,33	0,54
A29	2,82	1,64	2,27	4	0,37	EF29	3,58	1,6	2,43	4,96	0,45
A30	2,79	1,52	2,43	3,63	0,4	EF30	3,42	1,54	2,49	4,61	0,46
B1	3,29	1,8	2,72	5,65	0,38	V1	2,98	1,54	2,46	4,06	0,31
B2	3,18	1,75	2,17	5,09	0,39	V2	3,27	1,7	2,5	4,08	0,28
B3	3,42	1,9	2,7	5,98	0,38	V3	3,52	1,79	2,54	4,8	0,4
B4	3,33	1,79	2,53	4,66	0,39	V4	4,11	2,22	2,85	9,46	0,5
B5	3,48	1,9	2,77	6,6	0,42	V5	3,2	1,68	2,36	3,82	0,29
B6	3,28	1,71	2,59	5,2	0,29	V6	3,3	1,66	2,38	4,43	0,3
B7	3,54	2,12	3	8,96	0,49	V7	3,89	1,88	2,64	5,77	0,44
B8	3,26	1,75	2,61	5,74	0,37	V8	3,25	1,6	2,42	4,38	0,3
B9	3,5	1,82	2,7	6,91	0,27	V9	3,12	1,05	2,3	3,62	0,28
B10	3,92	2,19	3,12	9,98	0,67	V10	3,36	1,86	2,44	5,97	0,27
B11	3,8	2	3,01	7,63	0,5	V11	3,44	1,72	2,46	5,71	0,35
B12	3,61	1,9	2,78	7,44	0,33	V12	3,32	1,62	2,32	4,11	0,25
B13	3,94	2,33	3,09	13,93	0,51	V13	2,97	1,46	2,24	3,05	0,2
B14	3,46	1,94	2,76	6,94	0,39	V14	2,96	1,61	2,33	3,97	0,17
B15	3,99	2,05	2,94	7,65	0,43	V15	2,98	1,59	2,35	4,1	0,17
B16	3,46	1,79	2,61	6,24	0,44	V16	3,49	1,9	2,55	5,93	0,42
B17	3,24	1,77	2,53	5,15	0,33	V17	3,17	1,62	2,37	3,61	0,37
B18	3,43	1,82	2,61	5,78	0,38	V18	3,18	1,59	2,35	4,81	0,24
B19	3,37	2,04	2,68	7,33	0,35	V19	3,24	2,73	2,49	5,39	0,44
B20	3,19	1,75	2,03	5,05	0,28	V20	3,12	1,52	2,15	3,81	0,28
B21	4,01	1,75	3,12	9,62	0,57	V21	3,04	1,69	2,8	4,87	0,29
B22	3,94	2,05	2,95	9,37	0,4	V22	3,17	1,64	2,33	3,87	0,47
B23	3,74	1,92	2,84	7,27	0,41	V23	3,59	1,8	2,68	5,91	0,37
B24	3,66	1,89	2,89	8,43	0,45	V24	3,32	1,61	2,31	3,75	0,25
B25	3,9	1,98	2,8	7,33	0,33	V25	3,62	1,74	2,64	5,41	0,37
B26	4,55	2,35	3,45	14,18	0,57	V26	3,22	1,59	2,24	4,28	0,25
B27	3,65	1,84	2,76	7,47	0,38	V27	4,07	2,07	3,08	10,52	0,48
B28	3,67	1,95	2,76	7,05	0,46	V28	3,38	1,84	2,64	5,83	0,4
B29	2,89	1,58	2,33	3,94	0,33	V29	2,89	1,48	2,09	3,01	0,19
B30	3,01	1,76	2,41	4,39	0,28	V30	3,21	1,72	2,36	3,83	0,34
EC1	3,05	1,56	2,33	4,09	0,43						
EC2	3,47	1,64	2,54	4,41	0,61						
EC3	3,35	1,69	2,48	4,9	0,58						
EC4	3,03	1,53	2,32	3,62	0,4						
EC5	3,48	1,72	2,49	5,16	0,58						
EC6	3,12	1,62	2,35	4,38	0,47						
EC7	3,39	1,79	2,53	5,45	0,53						
EC8	3,4	1,62	2,52	4,6	0,54						
EC9	3,12	1,69	2,32	3,77	0,4						
EC10	3,21	1,71	2,41	4,71	0,48						
EC11	3,5	1,78	2,44	4,96	0,69						
EC12	3,18	1,63	2,43	4,65	0,51						
EC13	3,24	1,55	2,33	3,81	0,44						
EC14	3,38	1,61	2,34	4,39	0,38						
EC15	4,04	1,85	2,88	6,95	0,86						
EC16	3,19	1,17	2,34	4,1	0,42						
EC17	3,21	1,62	2,45	4,49	0,49						
EC18	3,66	1,79	2,5	5,72	0,74						
EC19	3,23	1,68	2,35	4,48	0,47						
EC20	3,35	1,71	2,41	4,58	0,57						
EC21	3,23	1,61	2,33	4,27	0,59						
EC22	3,31	1,65	2,43	4,46	0,56						
EC23	3,02	1,65	2,3	3,57	0,36						
EC24	3,29	1,64	2,37	5,32	0,54						
EC25	3,26	1,65	2,41	4,75	0,55						
EC26	3,46	1,96	2,7	6,87	0,57						
EC27	3,67	1,87	2,6	6,13	0,62						
EC28	3,32	1,56	2,37	3,94	0,38						
EC29	3,2	1,57	2,29	4,78	0,55						
EC30	3,13	1,72	2,43	4,84	0,42						

Analisi elementale dei soft tissue privati di epatopancreas di *V. philippinarum* (Parte seconda): concentrazioni (in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) degli elementi analizzati.

	Li	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Se	Sr	Cd	Ba	Pb	U
A1	0,879	47425,470	6902,792	155,560	15155,888	1681,039	0,491	0,854	9,185	493,399	2,443	6,517	5,635	158,969	0,216	14,860	4,607	69,222	0,623	3,958	1,267	0,116
A2	0,853	47184,418	7100,837	116,485	15173,491	880,892	0,357	0,509	9,422	411,168	3,006	6,110	4,920	192,013	0,029	12,966	4,635	60,837	0,631	0,426	0,541	0,093
A3	0,933	46388,072	7077,594	199,971	16046,588	845,058	0,507	0,924	9,337	523,527	2,552	16,779	5,492	191,094	0,056	15,066	4,854	57,297	0,655	0,630	0,872	0,095
B1	1,338	59163,762	9313,672	337,161	17139,095	1732,565	0,890	1,238	13,845	926,690	4,532	18,135	7,495	186,725	0,175	20,889	5,058	86,004	1,171	2,371	1,143	0,141
B2	1,200	52241,902	8179,993	298,383	16447,154	1446,460	0,727	1,475	14,027	766,872	5,424	20,858	7,062	184,902	0,255	23,643	4,894	79,254	0,830	4,440	1,441	0,112
B3	0,994	43474,755	7346,311	269,383	14658,150	1313,081	0,687	1,238	12,278	752,582	3,807	13,946	9,926	154,320	0,162	19,870	4,474	66,699	0,624	2,635	0,982	0,121
EC1	0,234	17636,816	3002,285	74,764	12111,598	538,741	0,321	0,370	6,806	165,322	0,997	2,957	2,178	76,131	0,000	11,291	1,851	26,729	0,126	0,057	0,095	0,068
EC2	0,316	20699,675	3548,632	77,023	12343,146	726,548	0,267	0,695	6,778	185,910	0,932	3,930	2,984	84,468	0,000	11,266	1,858	30,884	0,105	0,043	0,098	0,050
EC3	0,321	17879,301	3383,219	118,227	12547,501	604,974	0,318	2,055	8,704	233,541	1,108	3,042	3,217	81,994	0,000	10,861	1,738	27,559	0,080	0,096	0,038	0,035
EF1	0,439	20270,472	3744,523	129,940	13797,577	664,978	0,323	0,589	9,428	266,880	1,250	4,387	4,510	91,136	0,072	13,101	2,016	33,384	0,147	1,029	0,422	0,071
EF2	0,405	23586,050	3929,212	114,578	15051,243	2197,466	0,320	0,501	8,209	216,150	1,313	3,192	5,276	81,741	0,025	14,520	2,031	59,496	0,151	0,723	0,153	0,059
EF3	0,570	24701,753	4403,062	111,888	14525,688	709,307	0,308	0,892	9,091	236,159	1,344	5,416	3,234	88,923	0,028	12,457	1,954	31,793	0,152	0,185	0,172	0,074
V1	1,191	58940,261	8601,418	87,872	17209,042	1079,515	0,335	1,985	8,011	283,947	3,497	11,501	5,844	162,445	0,043	18,978	3,769	61,766	0,514	0,321	0,351	0,128
V2	1,346	65224,297	9290,591	151,635	16146,865	1286,469	0,431	0,747	8,255	303,619	2,949	9,098	6,813	166,017	0,051	17,929	3,640	69,101	0,635	0,475	0,422	0,122
V3	0,940	40594,362	6871,976	163,536	14124,678	1199,344	0,421	0,835	9,077	324,236	3,318	8,721	4,510	146,371	0,096	17,507	3,348	56,635	0,419	1,383	0,553	0,128

(valori espressi in $\mu\text{g/g DW}$)

Analisi elementale dell'epatopancreas *V. philippinarum* (Parte seconda): concentrazioni (in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) degli elementi analizzati.

	Li	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Se	Sr	Cd	Ba	Pb	U
A1	0,600	23321,667	3812,448	157,127	17274,599	522,377	1,233	0,683	9,739	413,150	1,944	6,261	31,597	123,184	0,096	24,931	5,431	23,384	0,190	1,333	0,723	0,186
A2	1,404	25933,085	5045,343	765,033	17650,079	1981,339	2,239	1,344	19,388	883,515	2,386	6,378	32,179	131,436	0,316	22,589	5,654	50,364	0,198	2,812	1,266	0,221
A3	0,841	27646,869	4368,111	282,538	18291,083	612,570	1,240	0,893	10,769	498,691	2,004	6,349	26,332	132,548	0,163	22,679	5,195	29,339	0,141	2,076	1,089	0,171
B1	1,328	29995,348	6306,876	608,823	18401,889	2915,030	1,879	1,182	18,203	770,992	2,548	9,611	21,892	122,765	0,398	29,997	5,775	67,033	0,157	5,617	1,222	0,235
B2	0,706	31544,941	4892,505	101,801	19008,673	767,555	1,149	0,718	10,244	475,376	3,734	13,888	25,739	148,421	0,300	36,311	5,959	41,715	0,743	5,445	1,007	0,250
B3	1,220	29274,048	5801,733	536,770	17703,171	1271,425	1,723	1,209	17,879	734,103	2,886	12,869	23,800	137,469	0,444	29,895	5,256	38,979	0,189	6,641	1,243	0,227
EC1	0,776	17500,223	3236,000	348,981	16005,205	724,550	1,063	0,912	12,911	465,788	1,251	7,321	13,328	88,085	0,178	19,388	4,237	25,516	0,060	2,010	0,856	0,257
EC2	0,584	18113,725	3036,440	190,818	15471,221	496,965	0,826	0,591	9,995	339,532	1,063	3,477	12,090	76,424	0,113	19,098	4,008	20,056	0,035	1,371	0,297	0,196
EC3	0,992	17699,361	3245,398	460,161	14934,444	7014,499	1,294	1,112	15,324	583,882	1,384	5,020	11,457	79,541	0,218	17,480	4,009	121,783	0,041	2,443	0,616	0,248
EF1	0,839	18133,350	3323,101	433,059	15778,494	912,010	1,203	1,007	12,485	531,837	1,377	5,368	13,973	85,150	0,196	19,705	4,449	30,624	0,052	1,962	0,496	0,243
EF2	0,502	13379,460	2513,323	204,366	16858,643	459,348	0,860	0,764	8,714	400,416	1,265	5,185	14,273	73,056	0,146	21,689	4,103	16,402	0,054	2,129	0,683	0,282
EF3	0,571	17152,320	2974,814	196,761	15542,092	543,166	0,786	0,713	10,369	345,163	1,134	5,631	14,551	81,552	0,098	18,134	4,069	19,127	0,056	1,136	0,303	0,232
V1	1,122	29398,610	5200,690	512,927	20818,149	871,880	2,133	1,525	16,045	761,321	2,920	9,432	40,402	137,793	0,216	31,246	7,247	35,058	0,230	2,135	1,007	0,259
V2	0,969	32560,811	5189,254	311,844	19408,974	807,196	2,147	1,351	12,218	636,005	2,818	13,444	43,315	139,183	0,182	30,384	7,187	39,553	0,236	2,251	1,490	0,274
V3	1,915	31220,048	5856,831	1114,960	18297,903	2577,291	2,975	2,214	28,693	1238,220	2,912	10,688	37,695	131,128	0,445	28,553	6,817	59,073	0,216	3,966	1,868	0,264

(valori espressi in $\mu\text{g/g DW}$)

Analisi elementale dei soft tissue totali di *V. philippinarum* (Parte seconda): concentrazioni (in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) degli elementi analizzati.

	Li	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Se	Sr	Cd	Ba	Pb	U
A1	1,104	44381,091	6781,248	239,279	16662,110	971,711	0,791	18,429	11,854	696,910	2,700	7,244	10,027	163,143	0,257	14,680	3,556	49,979	0,533	3,311	1,118	0,162
A2	1,183	48841,576	7273,017	227,880	17264,010	950,651	0,613	2,156	11,799	885,470	2,574	6,253	8,789	172,360	0,121	14,937	3,660	53,238	0,482	1,275	0,579	0,119
A3	1,208	49354,096	7431,819	246,545	16926,688	976,332	0,711	1,048	10,523	390,917	3,251	8,748	8,897	167,595	0,116	14,618	3,513	53,354	0,449	1,292	0,689	0,129
B1	1,200	49244,703	7785,406	231,854	16768,347	1315,677	1,269	3,425	11,096	846,369	4,449	16,053	8,110	129,624	0,167	22,398	3,494	62,323	0,628	2,473	1,270	0,137
B2	1,613	51514,049	8470,495	544,638	17143,686	1577,742	1,234	1,403	15,800	702,030	3,764	12,427	7,595	125,599	0,274	18,996	3,449	60,720	0,723	3,419	0,967	0,140
B3	1,276	48563,353	7750,307	273,358	17747,015	3012,044	0,760	2,045	11,201	450,317	3,360	13,069	8,622	122,772	0,169	16,524	3,472	77,830	0,580	2,388	0,635	0,117
EC1	0,776	22106,515	4263,553	285,354	15444,059	770,465	0,628	1,011	9,809	335,935	1,217	3,327	6,251	91,314	0,139	13,523	2,522	31,219	0,098	1,585	0,365	0,108
EC2	0,669	27542,586	4717,957	115,672	16088,234	884,531	0,376	0,762	8,758	223,839	1,282	4,527	4,492	92,161	0,072	14,026	2,400	37,857	0,090	1,075	0,131	0,099
EC3	0,648	23770,477	4324,082	160,665	15666,347	767,126	0,465	0,335	9,562	254,329	1,117	4,616	4,357	78,791	0,075	13,811	2,302	33,065	0,085	0,937	0,236	0,070
EF1	0,676	24332,467	4349,337	149,599	16802,598	848,588	0,445	0,214	10,009	256,346	1,580	4,513	6,481	89,120	0,068	14,310	2,443	34,506	0,112	0,856	0,211	0,078
EF2	0,633	24437,075	4516,342	128,146	15645,175	1176,667	0,423	1,762	9,706	237,403	1,449	5,447	6,096	85,905	0,102	13,696	2,381	36,928	0,106	1,605	0,278	0,085
EF3	0,696	25937,675	4550,691	158,723	17033,312	707,606	0,449	1,138	9,347	299,981	1,382	6,498	6,668	92,937	0,104	14,896	2,400	32,136	0,127	1,493	0,325	0,093
V1	1,256	53453,227	8423,845	237,353	18303,227	1258,764	0,739	0,478	10,475	437,885	3,905	11,636	10,546	182,139	0,128	20,168	4,105	63,936	0,470	1,648	0,694	0,148
V2	1,425	55264,047	8631,579	306,907	18233,708	5294,827	0,855	0,588	12,179	467,842	3,320	10,314	12,082	177,538	0,141	21,390	4,390	129,469	0,512	1,734	0,763	0,167
V3	1,349	55059,995	8549,941	240,203	17895,443	1716,180	0,735	0,832	11,975	457,103	3,258	10,344	11,386	181,790	0,109	18,727	4,254	69,099	0,561	1,352	0,656	0,142

Analisi elementale delle conchiglie di *V. philippinarum* (Parte seconda): concentrazioni (in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) degli elementi analizzati.

	Li	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Se	Sr	Cd	Ba	Pb	U
A1	0,581	6565,807	272,636	53,605	179,770	85732,683	0,202	0,097	12,422	226,890	0,239	0,614	0,773	2,259	0,144	0,505	0,023	1368,336	0,003	4,230	0,466	0,038
A2	0,562	6247,347	275,137	67,138	163,695	83724,627	0,263	0,094	5,956	268,397	0,209	0,713	0,497	3,553	0,142	0,597	0,053	1457,176		4,056	0,740	0,018
A3	0,555	6099,421	334,801	76,476	193,840	82050,668	0,265	0,085	6,189	319,333	0,216	0,567	0,900	2,008	0,150	0,643	0,295	1427,717		4,343	3,417	0,027
A4	0,508	6124,069	262,263	51,404	134,728	83567,966	0,223	0,154	5,850	233,419	0,135	0,534	1,113	2,332	0,098	0,533	0,032	1344,660		2,619	2,264	0,035
A5	0,522	6152,687	272,376	42,300	161,387	83738,988	0,156	0,204	5,216	159,347	0,122	0,821	1,398	11,736	0,066	0,375	0,022	1323,813		2,486	14,483	0,028
A6	0,498	5971,313	241,307	46,275	144,889	81610,884	0,194	0,096	4,808	164,663	0,124	0,914	1,344	2,746	0,074	0,581	0,013	1312,899		2,713	1,131	0,032
B1	0,438	5719,631	243,058	25,046	106,444	84316,602	0,091	0,020	5,970	205,448	0,213	0,750	1,275		0,180	0,823	0,115	1501,625		5,587	0,052	
B2	0,489	5669,277	377,504	93,957	143,661	85320,324	0,548	0,385	12,037	699,393	0,263	0,657	1,219	5,472	0,202	0,950	0,055	1591,067		5,979	2,186	0,010
B3	0,429	5030,243	404,113	65,791	122,273	71150,058	0,380	0,413	5,782	474,354	0,187	0,978	2,027	3,588	0,161	0,575	0,044	1267,207	0,009	4,503	1,591	0,002
B4	0,520	5445,635	438,009	133,567	152,581	80261,084	0,485	0,194	13,410	384,997	0,245	0,619	1,399	5,717	0,163	0,994	0,043	1500,774		4,840	5,751	0,019
B5	0,463	5361,262	303,848	77,820	103,935	81639,714	0,341	0,214	9,386	335,908	0,190	0,558	1,731	1,120	0,156	1,098	0,077	1491,580		5,000	5,064	0,045
B6	0,439	5352,166	291,089	82,611	126,125	80077,531	0,282	0,139	11,399	282,464	0,187	0,730	1,309	1,921	0,116	1,169	0,061	1401,968		3,819	1,508	0,007
EC1	0,771	6455,882	261,125	32,150	171,861	83337,462	0,178	0,079	4,553	152,263	0,171	0,618	1,114		0,156	0,451	0,125	1472,072		5,116	0,474	0,061
EC2	0,651	6319,648	217,524	19,901	147,508	84944,639	0,067		3,514	94,826	0,163	0,522	0,465		0,154	0,180	0,022	1444,429		5,070	0,000	0,062
EC3	0,645	6174,542	194,200	20,559	131,262	84026,425	0,117	0,000	9,772	106,611	0,200	0,524			0,122	0,195	0,015	1438,967		4,228	0,000	0,048
EC4	0,718	6629,115	236,967	38,761	161,557	92031,514	0,154	0,104	4,637	106,020	0,131	1,008	1,802	2,301	0,060	0,335	0,068	1511,754		2,608	0,398	0,049
EC5	0,730	5756,317	217,586	33,852	128,389	77419,611	0,172	0,082	6,087	110,293	0,130	0,622	1,689	6,064	0,060	0,286	0,105	1349,208		2,535	1,221	0,096
EF1	0,690	6046,875	208,496	18,822	130,419	81475,365	0,111	0,105	3,409	107,247	0,153	0,889	0,339		0,153	0,318		1461,394		5,076	0,366	0,118
EF2	0,681	6241,303	273,896	38,272	149,115	82610,326	0,195	0,105	9,255	138,382	0,184	0,658	1,040		0,124	0,382	0,025	1425,595		4,005	1,114	0,119
EF3	0,669	5959,100	190,231	34,843	124,985	81287,278	0,133	0,147	4,429	134,358	0,172	0,594	0,855		0,116	0,435	0,004	1367,393		3,799	0,061	0,048
EF4	0,702	6147,786	233,189	23,324	148,680	83572,917	0,120	0,033	5,336	94,322	0,108	0,618	1,133		0,095	0,430	0,035	1406,600		3,823	0,047	0,102
EF5	0,676	5533,105	273,716	47,573	124,708	80476,756	0,195	0,064	4,776	118,252	0,113	0,530	0,936		0,061	0,506	0,017	1360,014		2,719	0,097	0,139
EF6	0,639	5527,851	209,580	42,032	112,141	78055,546	0,195	0,055	7,341	106,729	0,115	0,737	0,959	1,869	0,047	0,356	0,032	1276,544		2,272	2,227	0,088
V1	0,510	5617,404	224,096	46,520	134,645	79760,064	0,139	0,160	7,798	215,402	0,173	0,611	0,056	1,541	0,143	0,588	0,120	1415,899		4,706	1,655	0,035
V2	0,613	5591,820	251,930	114,398	131,271	79046,300	0,337	0,236	10,793	274,025	0,227	0,663	0,134	0,282	0,122	0,376		1388,397	0,022	3,638	0,342	0,010
V3	0,497	5519,817	248,497	80,094	155,981	76562,830	0,219	0,328	10,573	238,224	0,176	0,707	0,724	0,510	0,148	0,650	0,014	1376,133	0,008	4,552	2,756	0,029
V4	0,484	5375,436	264,934	81,065	121,262	76313,640	0,212	0,171	9,134	173,406	0,123	0,659	1,156	0,418	0,075	0,547	0,025	1277,307		2,998	0,402	0,038
V5	0,432	5359,877	264,683	65,840	125,696	75005,408	0,202	0,060	8,181	178,813	0,121	0,446	1,498		0,062	0,549	0,072	1290,298		2,822	0,369	0,008
V6	0,126	1768,787	74,509	21,652	24,436	26899,763	0,057		3,158	54,489	0,042	0,038		14,353		0,136		496,143		0,112	0,103	

(valori espressi in $\mu\text{g/g DW}$)

Analisi elementale dei sedimenti (Parte seconda): concentrazioni (in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) degli elementi analizzati.

	Li	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Se	Sr	Cd	Ba	Pb	U
A1	24,103	11374,752	14902,835	10187,992	15985,237	9835,028	29,434	22,068	309,320	13787,785	6,387	10,156	10,981	76,834	16,401	9,625	0,364	109,549	0,430	147,908	14,899	1,587
A2	24,487	12548,966	14700,519	11712,293	15495,379	9593,061	28,933	21,751	312,485	13816,262	6,247	9,706	10,868	74,672	15,940	8,145	0,351	112,381	0,447	150,415	15,227	1,672
A3	23,237	10712,038	14532,027	9307,067	13647,679	8995,423	28,704	21,174	303,042	13751,961	5,811	9,524	10,029	75,523	14,964	7,119	0,255	107,166	0,397	139,262	15,058	1,626
B1	15,173	7811,479	24810,816	2363,639	6663,082	7569,378	22,003	19,273	210,229	8037,237	3,287	6,770	7,973	42,245	3,720	8,431	0,090	262,761	0,216	14,976	12,148	1,442
B2	16,137	8125,487	24592,517	2274,333	6934,934	6852,556	22,987	22,605	227,745	8840,553	3,512	7,289	8,882	43,938	4,844	8,355	0,069	209,869	0,175	29,036	13,981	1,578
B3	14,556	7794,984	22188,859	1527,109	6140,681	6080,512	20,295	22,461	207,105	8294,505	2,974	6,204	8,004	42,345	3,718	7,294	0,132	334,232	0,166	11,727	12,270	1,538
EC1	20,241	11073,246	10961,315	8994,374	11315,437	6997,663	39,345	56,515	580,662	19401,430	5,666	20,262	5,977	32,114	13,875	8,259	0,227	149,412	0,070	129,703	12,036	2,103
EC2	18,802	11307,571	10923,219	9019,382	11133,969	7017,612	36,248	55,922	508,578	17689,203	5,330	18,178	4,715	32,771	13,686	6,902	0,177	165,574	0,052	126,482	10,413	1,698
EC3	17,845	10834,049	10516,694	9259,261	11834,855	6479,734	36,125	66,378	463,907	17485,879	5,441	20,778	6,022	30,798	13,874	6,849	0,162	162,139	0,045	129,881	11,511	1,865
V1	21,196	10497,513	11512,271	8173,079	13236,784	7618,759	34,854	31,672	345,563	16527,491	5,725	15,269	11,976	63,852	14,850	10,372	0,266	124,237	0,257	135,766	18,632	1,831
V2	19,175	9602,334	10687,041	7831,872	12979,538	7132,537	36,495	40,093	332,169	16513,731	5,765	16,147	11,683	65,037	14,785	10,288	0,254	114,171	0,274	139,269	18,184	1,792
V3	20,694	10439,222	11663,202	8293,603	12716,050	7542,825	34,826	33,380	344,340	16839,954	5,648	16,950	11,332	65,175	15,525	12,748	0,224	122,277	0,256	150,812	17,883	1,873

(valori espressi in $\mu\text{g/g DW}$)

Speciazione geochemica dei sedimenti (Parte seconda): concentrazioni (in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) degli elementi analizzati.

	$\mu\text{g/g DW}$	Li	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Se	Sr	Cd	Ba	Pb	U
GPH1_1_A1	0,123	3085,293	464,547	0,000	285,453	221,424	0,020	0,030	2,513	1,015	0,006	0,029	0,000	0,212	0,023	0,041	0,009	6,532	0,000	0,502	0,037	0,033	
GPH1_1_A2	0,119	3211,795	471,235	0,000	297,375	232,821	0,022	0,033	2,401	0,933	0,007	0,033	0,000	0,141	0,018	0,042	0,008	6,626	0,000	0,386	0,043	0,030	
GPH1_1_A3	0,126	3188,220	471,208	0,000	296,725	226,115	0,023	0,034	2,671	0,878	0,006	0,032	0,000	0,105	0,018	0,044	0,012	6,541	0,000	0,389	0,043	0,029	
GPH1_1_B1	0,116	3993,635	613,558	0,014	367,783	271,890	0,025	0,037	3,006	1,002	0,008	0,042	0,000	0,000	0,019	0,054	0,007	12,366	0,000	0,409	0,036	0,021	
GPH1_1_B2	0,120	4118,214	635,171	0,000	376,872	277,236	0,025	0,037	2,899	0,933	0,008	0,043	0,085	0,000	0,017	0,055	0,009	12,617	0,000	0,360	0,038	0,017	
GPH1_1_B3	0,120	4118,494	628,447	0,000	374,804	255,068	0,023	0,034	2,916	0,801	0,007	0,039	0,000	0,000	0,016	0,052	0,013	11,467	0,000	0,354	0,042	0,018	
GPH1_1_EC1	0,122	3567,268	528,103	0,008	257,283	242,267	0,037	0,030	1,891	0,702	0,008	0,047	0,000	0,000	0,023	0,039	0,008	8,942	0,001	0,478	0,015	0,026	
GPH1_1_EC2	0,130	3520,822	527,543	0,039	253,106	262,713	0,043	0,029	2,005	0,676	0,009	0,051	0,058	0,013	0,028	0,042	0,007	9,426	0,001	0,579	0,018	0,029	
GPH1_1_EC3	0,120	3450,818	513,766	0,000	249,315	246,073	0,034	0,027	1,944	0,613	0,008	0,050	0,000	0,196	0,026	0,040	0,006	9,047	0,001	0,531	0,013	0,027	
GPH1_1_V1	0,186	5733,335	841,961	0,000	547,723	257,352	0,046	0,035	3,964	0,591	0,008	0,049	0,000	0,107	0,023	0,121	0,007	9,034	0,000	0,478	0,019	0,019	
GPH1_1_V2	0,219	6634,828	998,116	0,000	621,766	322,888	0,047	0,048	5,649	0,760	0,009	0,059	0,000	0,248	0,032	0,145	0,009	10,980	0,001	0,672	0,059	0,019	
GPH1_1_V3	0,216	6537,092	978,538	0,023	623,642	297,181	0,044	0,041	4,597	0,561	0,008	0,051	0,000	0,000	0,028	0,137	0,010	10,886	0,000	0,582	0,043	0,018	
GPH2_2_A1	0,417	1821,967	24,602	95,554	10169,044	0,307	0,436	104,400	133,779	0,752	0,962	0,578	42,528	0,101	0,469	0,541	75,857	0,313	2,639	2,497	0,265		
GPH2_2_A2	0,423	1517,421	25,198	99,337	11760,205	0,336	0,457	106,382	136,689	0,792	1,040	0,752	42,538	0,098	0,521	0,591	104,369	0,282	2,535	2,458	0,273		
GPH2_2_A3	0,417	2198,364	27,799	92,079	10454,627	0,362	0,509	109,838	144,197	0,829	1,003	0,949	45,856	0,099	0,532	0,572	68,434	0,308	2,479	2,550	0,270		
GPH2_2_B1	0,390	1492,195	7,019	99,177	21690,339	0,338	0,296	117,886	51,068	0,890	1,581	0,825	23,978	0,170	0,528	0,893	402,739	0,183	4,640	1,442	0,222		
GPH2_2_B2	0,364	1357,831	8,949	89,964	19994,734	0,383	0,313	119,260	61,628	0,828	1,438	0,709	25,466	0,164	0,520	0,848	357,321	0,183	4,591	1,658	0,224		
GPH2_2_B3	0,346	1470,818	9,470	89,526	19756,798	0,378	0,302	113,317	59,698	0,802	1,387	0,549	24,810	0,173	0,533	0,871	369,901	0,171	4,813	1,591	0,225		
GPH2_2_EC1	0,252	3020,443	19,738	47,815	7691,810	0,272	0,407	69,128	82,411	0,519	1,005	0,400	6,993	0,086	0,371	0,553	103,463	0,065	2,214	0,854	0,179		
GPH2_2_EC2	0,253	2536,618	17,868	49,005	8643,383	0,233	0,390	66,448	74,846	0,509	1,025	0,607	7,137	0,102	0,341	0,645	120,222	0,069	2,690	0,967	0,190		
GPH2_2_EC3	0,259	3570,186	21,537	51,128	6873,046	0,264	0,462	65,574	98,870	0,492	0,956	0,821	7,305	0,084	0,329	0,456	82,558	0,063	2,209	0,943	0,176		
GPH2_2_V1	0,379	1528,724	16,504	92,207	10499,350	0,879	0,455	128,318	128,667	0,707	1,063	0,556	29,414	0,183	0,743	0,596	83,508	0,238	5,037	3,828	0,263		
GPH2_2_V2	0,499	1768,523	16,486	112,044	10804,906	0,750	0,535	132,387	130,654	0,756	1,096	0,436	32,211	0,188	0,661	0,647	87,533	0,266	5,137	3,631	0,275		
GPH2_2_V3	0,464	2346,741	18,852	106,145	10998,200	0,781	0,530	135,537	127,655	0,768	1,131	0,514	33,660	0,189	0,706	0,611	86,633	0,779	5,253	3,853	0,278		
GPH3_3_A1	0,191	17204,486	6030,956	0,649	21,984	2195,705	0,773	0,061	14,540	64,698	0,056	0,208	0,000	6,896	0,043	0,028	0,024	7,534	0,078	0,986	0,001	0,015	
GPH3_3_A2	0,199	16536,841	5896,887	0,725	21,604	2186,438	0,763	0,047	14,118	67,880	0,054	0,239	0,045	7,198	0,042	0,032	0,020	8,615	0,090	0,929	0,004	0,014	
GPH3_3_A3	0,198	18191,088	6035,391	0,519	21,664	2170,236	0,772	0,050	13,909	64,173	0,051	0,227	0,000	6,895	0,048	0,030	0,021	7,095	0,087	1,081	0,069	0,015	
GPH3_3_B1	0,212	23055,322	525,589	0,000	33,622	6043,113	1,129	0,060	31,449	16,708	0,096	0,442	0,037	2,049	0,157	0,053	0,035	105,676	0,037	3,619	0,000	0,013	
GPH3_3_B2	0,223	21208,539	889,781	0,000	30,538	5148,318	1,240	0,072	39,055	38,869	0,082	0,386	0,000	3,328	0,179	0,037	0,040	64,333	0,044	4,033	0,000	0,012	
GPH3_3_B3	0,218	21295,405	687,429	0,000	31,390	5508,302	1,312	0,078	36,113	29,812	0,086	0,399	0,000	3,009	0,206	0,044	0,045	78,343	0,045	4,652	0,021	0,016	
GPH3_3_EC1	0,179	14304,237	6477,550	0,378	15,406	2052,666	0,566	0,062	9,388	43,466	0,035	0,226	0,000	0,518	0,037	0,024	0,024	8,667	0,008	0,827	0,000	0,013	
GPH3_3_EC2	0,184	14105,287	6467,617	0,307	16,979	2075,104	0,582	0,059	8,973	50,908	0,035	0,227	0,000	0,709	0,061	0,024	0,022	9,088	0,007	1,400	0,000	0,013	
GPH3_3_EC3	0,148	11865,653	4154,254	0,000	14,514	1327,498	0,267	0,000	6,126	11,425	0,021	0,126	0,000	0,000	0,025	0,008	0,000	5,518	0,002	0,541	0,000	0,004	
GPH3_3_V1	0,324	24930,183	6332,083	0,633	34,174	2418,797	0,920	0,062	29,168	62,848	0,046	0,239	0,000	5,379	0,143	0,060	0,035	10,564	0,062	3,244	0,059	0,007	
GPH3_3_V2	0,296	24103,333	6424,377	0,320	35,523	2423,263	1,003	0,043	25,759	63,329	0,043	0,236	0,000	3,778	0,146	0,059	0,018	10,513	0,045	3,325	0,003	0,007	
GPH3_3_V3	0,295	22577,542	6608,447	0,695	35,527	2396,980	0,975	0,044	24,183	59,047	0,044	0,230	0,000	3,979	0,142	0,061	0,031	9,902	0,369	3,209	0,006	0,006	
GPH4_4_A1	0,474	1002,862	35069,490	166,110	27,246	10214,187	1,639	1,890	31,203	863,734	2,037	1,892	7,843	13,147	0,050	0,901	0,682	15,876	0,124	0,932	1,948	0,414	
GPH4_4_A2	0,469	926,247	35277,902	159,001	26,247	10410,063	1,767	1,903	30,728	918,016	2,110	1,967	8,338	14,167	0,055	0,992	0,696	16,394	0,152	1,058	2,094	0,422	
GPH4_4_A3	0,494	1162,095	34703,246	169,978	28,160	10230,301	1,928	1,965	32,832	1021,379	2,117	2,018	8,190	14,420	0,052	1,305	0,697	16,100	0,154	0,947	2,303	0,409	
GPH4_4_B1	0,563	1703,363	52389,420	131,133	29,051	17737,281	2,410	2,107	59,876	1013,777	1,367	2,298	7,920	16,114	0,147	0,966	0,882	81,943	0,108	3,518	2,607	0,618	
GPH4_4_B2	0,583	1520,225	56640,674	152,493	29,334	17525,593	3,009	2,356	61,673	1387,060	1,582	2,555	8,704	16,089	0,152	1,254	1,011	42,849	0,116	3,615	3,265	0,691	
GPH4_4_B3	0,576	1464,181	52915,209	133,985	29,235	17440,977	2,170	2,330	61,423	1087,267	1,427	2,457	8,656	19,101	0,176	1,096	0,949	55,477	0,120	4,230	2,672	0,633	
GPH4_4_EC1	0,424	682,744	23778,250	135,784	22,559	7008,323	2,228	2,553	24,650	784,346	1,197	2,456	3,006	3,509	0,055	1,032	0,582	13,964	0,030	1,048	0,968	0,402	
GPH4_4_EC2	0,430	660,812	23524,024	138,000	23,842	6969,412	2,011	2,446	24,115	823,663	1,197	2,475	3,358	4,764	0,071	1,016	0,574	13,767	0,023	1,429	1,074	0,406	
GPH4_4_EC3	0,436	1380,104	24840,518	126,406	26,784	7350,105	1,855	2,248	24,041	843,037	1,108	2,321	2,940	3,313	0,056	0,924	0,509	14,587	0,026	1,106	0,876	0,392	
GPH4_4_V1	0,573	1725,167	27816,887	244,036	31,950	8294,910	2,934	3,020	49,545	1752,542	1,872	2,746	9,150	14,149	0,138	1,258	0,847	15,839	0,112	2,806	2,768	0,445	
GPH4_4_V2	0,532	1716,475	29801,304	245,833	33,621	8775,303	3,463	3,139	51,097	1920,315	1,874	2,884	10,104	13,539	0,158	1,542	0,912	16,791	0,099	3,246	2,968	0,459	
GPH4_4_V3	0,584	1857,062	29465,115	272,300	34,986	8770,547	4,016	3,370	51,446	1988,857	2,014	3,013	10,725	14,653	0,153	1,241	1,042	16,707	0,194	3,211	3,088	0,470	
GPH5_5_A1	3,715	154,468	5662,687	1249,483	37,787	1391,037	5,168	1,913	37,389														

Analisi qualitativa dello scarto (Parte terza): peso (g WW) di ogni categoria individuata.

	sito	<i>C. glaucum</i>	materiale veg.	ostriche	anellidi	altri bivalvi	gasteropodi	<i>V. phil.</i>	indeterminato	inerte	cannolicchi	<i>M. senhousia</i>	congl.organogeno	WW tot
A1	A	16,17	1,94	11,24	0	0,08	36,56	108,04	0	0	16,86	1,69	0	192,58
A2	A	16,05	3,45	13,36	0	0,9	13,03	167,2	0	0	14,15	0	0	228,14
A3	A	10,26	8,99	53,38	0	11,06	0	105,17	0	0	20,86	0,25	2,02	211,99
B1	B	88,16	0,64	57,26	29,82	0	1,06	30,87	3,29	0	0	0	13,33	224,43
B2	B	97,84	2,27	58,13	5,09	3,31	9,51	69,3	4,28	0	0	0	39,25	288,98
B3	B	69,12	0,51	47,01	14,39	8,07	3,01	53,98	0,65	0	0	0	78,16	274,9
EC1	EC	118,5	35,33	64,8	2,17	79,79	19,47	48,29	32,59	0	0	0	0	400,94
EC2	EC	154,58	60,03	22,03	0	65,97	19,91	23,11	0	5,97	0	0	0	351,6
EC3	EC	139,41	46,64	19,76	0,76	86,47	16,7	37,06	9,03	8,67	0	0	0	364,5
EF1	EF	115,15	26,14	48,84	0	47,32	37,7	8,19	4,06	1	0	0	0	288,4
EF2	EF	96,99	21,03	56,37	0	23,35	86,35	0	4,56	0	0	0	0	288,65
EF3	EF	173,05	11,99	54,93	0	46,35	54,93	11,36	7,16	0	0	0	0	359,77
V1	V	5,26	3,88	1,36	0	1,55	0	23,65	0	0	4,02	8,32	0	48,04
V2	V	13,36	0,19	26,7	0	1,72	0,21	68,36	0	0	4,27	9,69	0	124,5
V3	V	8,03	7,9	28,38	0	0,86	0	35,75	0	0	6,13	6,1	8,46	101,61

(valori espressi in g WW)

Analisi elementare dello scarto (Parte terza): concentrazioni (in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) degli elementi analizzati.

	Li	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Se	Sr	Cd	Ba	Pb	U
A1	0,417	4441,190	292,299	56,546	98,384	74814,006	0,215	0,037	5,068	189,624	0,118	1,002	1,386	2,167	0,126	0,267	0,020	1421,351	0,000	4,507	0,604	0,082
A2	0,428	4410,575	287,497	58,381	109,221	74201,208	0,204	0,007	5,302	158,925	0,101	0,391	0,968	2,145	0,125	0,415	0,013	1396,851	0,000	4,331	1,531	0,032
A3	0,504	4337,896	409,522	16,781	78,988	73366,405	0,114	0,000	16,714	127,593	0,087	1,101	0,319	1,808	0,086	0,373	0,000	1163,989	0,000	3,447	0,280	0,037
B1	1,108	4091,891	2970,349	448,735	249,618	69296,208	1,220	0,544	43,112	704,460	0,335	0,564	1,401	7,296	0,440	1,228	0,042	1710,345	0,023	12,387	1,533	0,382
B2	1,073	3526,090	3614,470	505,792	260,536	66100,797	1,602	0,672	42,575	846,603	0,291	0,891	2,003	8,512	0,491	0,952	0,053	1829,411	0,034	13,380	2,180	0,467
B3	0,628	3241,534	2578,685	308,689	191,903	71341,209	1,483	0,580	30,549	907,447	0,386	0,840	1,609	6,471	0,405	1,257	0,104	1896,570	0,023	12,352	1,948	0,457
EC1	0,273	3619,158	606,469	72,165	79,037	67837,052	0,863	0,339	9,733	972,224	0,158	0,801	1,078	4,683	0,217	2,331	0,091	1464,063	0,006	7,580	0,893	0,888
EC2	0,446	3908,848	874,708	263,430	172,764	65388,615	4,063	1,431	14,803	1578,868	0,446	1,343	2,842	2,897	0,333	4,493	0,260	1563,529	0,026	8,430	2,765	1,436
EC3	0,513	3530,584	562,300	574,969	170,926	66733,369	1,671	1,753	16,845	1690,261	0,413	1,683	1,666	1,478	0,353	4,767	0,080	1504,860	0,002	7,829	1,560	0,805
EF1	0,435	3532,131	491,513	141,807	106,227	67029,053	1,620	0,689	13,038	853,503	0,227	0,911	0,299	0,692	0,207	2,569	0,164	1435,346	0,000	6,253	1,050	1,220
EF2	0,418	3142,361	762,874	195,094	113,725	65092,640	1,952	0,806	36,306	623,513	0,229	0,704	0,380	1,587	0,224	1,608	0,121	1329,321	0,000	5,451	1,080	1,471
EF3	0,385	3255,518	454,453	177,586	103,429	66776,606	3,007	0,852	11,603	531,031	0,216	0,742	1,152	2,724	0,245	1,545	0,200	1437,083	0,001	6,987	1,377	1,210
V1	0,502	4878,716	369,678	122,520	106,674	74080,562	0,521	0,162	22,949	603,794	0,181	0,676	2,006	2,774	0,197	1,115	0,033	1435,549	0,000	5,940	2,503	0,127
V2	0,549	5191,956	354,429	104,725	123,105	76884,520	0,401	0,051	19,528	334,274	0,166	0,512	0,760	3,666	0,185	0,465	0,000	1373,211	0,000	5,444	0,648	0,059
V3	0,856	4758,412	1903,275	306,382	212,309	75266,244	0,880	0,411	33,061	792,393	0,253	0,512	1,730	3,760	0,292	1,054	0,039	1447,045	0,001	7,120	1,539	0,151

(valori espressi in $\mu\text{g/g DW}$)

Risultati del test di cessione sullo scarto (Parte terza): concentrazioni (in $\mu\text{g L}^{-1}$) degli elementi analizzati.

	Li	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Se	Sr	Cd	Ba	Pb	U
B1	0,006	1102,925	53,357	5,681	207,360	144,505	0,005	0,091	1,798	15,692	0,039	2,447	3,383	48,179	8,570	0,383	0,082	2,316	0,018	155,675	0,075	0,000
B2	0,003	1133,925	54,967	5,534	209,160	147,605	0,002	0,089	1,844	15,982	0,036	2,503	3,482	52,079	8,700	0,357	0,069	2,387	0,013	159,375	0,076	0,000
B3	0,000	1130,925	54,617	5,655	214,160	148,805	0,000	0,117	1,845	16,442	0,036	2,481	3,559	53,179	8,870	0,375	0,078	2,398	0,021	163,975	0,075	0,000
S1	1,971	34264,925	8276,647	8,810	4839,560	6909,305	3,650	0,300	20,957	34,342	0,618	6,462	4,899	117,379	8,140	24,647	0,549	432,524	0,032	174,375	0,516	0,461
S2	1,995	34674,925	8272,647	9,010	4942,560	7016,305	3,700	0,289	21,097	33,162	0,627	6,537	5,009	118,079	8,200	24,827	0,558	437,924	0,032	176,675	0,226	0,466
S3	2,090	35874,925	8648,647	9,150	4537,560	6431,305	3,377	0,257	21,737	36,172	0,567	5,914	5,579	120,579	8,340	22,577	0,555	447,524	0,032	179,475	0,227	0,446
TQ1	7,143		24497,647	177,680	31997,560	10217,305	8,551	1,645	18,957	185,192	1,206	6,749	7,607	127,379	11,870	39,077	1,678	536,824	0,057	316,675	0,688	2,288
TQ2	7,684		26347,647	194,880	31647,560	9989,305	8,451	1,623	20,577	186,092	1,166	6,691	8,369	138,379	12,890	38,147	1,668	583,624	0,058	344,775	0,737	2,366
TQ3	7,401		25357,647	187,680	33437,560	10697,305	8,921	1,728	19,387	184,992	1,237	6,984	7,809	130,379	12,300	41,007	1,745	549,624	0,053	319,875	0,683	2,245

(valori espressi in $\mu\text{g/L}$)

Risultati del test di inibizione della bioluminescenza con *Vibrio fischeri* (Parte terza).

sito	trattamento	minuti	% effetto
A	TQ	5	0,67
A	TQ	10	1,33
A	TQ	15	-0,33
A	LAV	5	-5,33
A	LAV	10	-2,33
A	LAV	15	-1,67
B	TQ	5	2,67
B	TQ	10	6,33
B	TQ	15	2,67
B	LAV	5	-11,33
B	LAV	10	-7
B	LAV	15	-10
EC	TQ	5	5,67
EC	TQ	10	12,33
EC	TQ	15	9,33
EC	LAV	5	-7,33
EC	LAV	10	-0,67
EC	LAV	15	0,33

campione	replica	trattamento	minuti	% effetto
G	1	non filtrato	5	9,67
G	1	non filtrato	10	21,33
G	1	non filtrato	15	26,00
G	1	filtrato	5	12,00
G	1	filtrato	10	22,00
G	1	filtrato	15	24,33
G	2	non filtrato	5	9,00
G	2	non filtrato	10	21,00
G	2	non filtrato	15	26,33
G	2	filtrato	5	24,00
G	2	filtrato	10	27,33
G	2	filtrato	15	28,33

Risultati test di inibizione della crescita algale con *Phaeodactylum tricorutum* (Parte terza).

sito	trattamento	#cell x 10 ³ /mL
A	TQ	95
A	TQ	85
A	TQ	80
A	LAV	210
A	LAV	290
A	LAV	305
B	TQ	20
B	TQ	55
B	TQ	30
B	LAV	275
B	LAV	310
B	LAV	335
EC	TQ	55
EC	TQ	95
EC	TQ	60
EC	LAV	280
EC	LAV	285
EC	LAV	270

sito	diluizione	media #cell x 10 ³ /mL
A	0	195
A	5	240
A	15	215
A	30	210
A	60	163,33
A	90	190
B	0	253,33
B	5	246,66
B	15	240
B	30	230
B	60	180
B	90	68,33
EC	0	245
EC	5	216,66
EC	15	233,33
EC	30	170
EC	60	185
EC	90	143,33

Risultati test di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis* (Parte terza).

sito	trattamento	concentrazione	effetto (media % Abbott)
A	LAV	0,78	5,10
A	LAV	1,56	4,89
A	LAV	3,13	6,82
A	LAV	6,25	7,43
A	LAV	12,50	0,21
A	LAV	25,00	6,53
A	LAV	50,00	6,45
A	LAV	100,00	100,00
A	TQ	0,78	0,25
A	TQ	1,56	1,14
A	TQ	3,13	1,60
A	TQ	6,25	8,91
A	TQ	12,50	13,14
A	TQ	25,00	8,50
A	TQ	50,00	-3,34
A	TQ	100,00	1,13
B	LAV	0,78	6,94
B	LAV	1,56	18,77
B	LAV	3,13	10,03
B	LAV	6,25	13,66
B	LAV	12,50	8,51
B	LAV	25,00	3,41
B	LAV	50,00	0,20
B	LAV	100,00	12,60
B	TQ	0,78	14,17
B	TQ	1,56	14,13
B	TQ	3,13	18,32
B	TQ	6,25	9,96
B	TQ	12,50	10,11
B	TQ	25,00	8,45
B	TQ	50,00	-0,79
B	TQ	100,00	39,03
EC	LAV	0,78	12,72
EC	LAV	1,56	18,12
EC	LAV	3,13	11,58
EC	LAV	6,25	15,12
EC	LAV	12,50	5,49
EC	LAV	25,00	2,85
EC	LAV	50,00	-1,86
EC	LAV	100,00	-18,89
EC	TQ	0,78	-32,45
EC	TQ	1,56	-37,05
EC	TQ	3,13	-19,88
EC	TQ	6,25	-42,06
EC	TQ	12,50	-26,33
EC	TQ	25,00	-18,92
EC	TQ	50,00	-7,56
EC	TQ	100,00	-15,80

Ringraziamenti

A Giampietro Ravagnan. Per avermi dato la possibilità di intraprendere e portare a termine questo percorso. Per la fiducia che ha riposto nelle mie capacità e nel mio lavoro. Per avermi insegnato che fare qualcosa per gli altri è prima di tutto un gesto gratuito.

A Sabrina Manente. Per essere stata il riferimento imprescindibile in questo progetto, per aver partecipato attivamente alla mia crescita, professionale e umana, anche oltre l'orario di lavoro. Per tutte le volte che hai saputo ridare senso (non solo scientifico!) al mio proseguire e hai immaginato nuovi approcci (non solo sperimentali!) alla risoluzione dei problemi.

A Anna Micheluz. Per essere stata letteralmente al mio fianco giorno dopo giorno, per aver condiviso gli affanni, le paure e i momenti felici. Per avermi sempre un'offerta una spalla (ma anche più di qualche spritz al momento giusto!). Perché sei un'Amica (adesso la finirai di presentarmi come tua collega?!?).

A Giacomo Cipolato. Perché hai reso divertente la parte sperimentale di questo lavoro anche nei momenti più bui. Perché non mi hai mai mandato al diavolo nemmeno quando ho cercato di ucciderti... (!!!). Perché ho scoperto di te dei lati che non conoscevo e ...te vojo ben!

A Diego Minetto. Per i preziosi consigli, per il supporto costante durante il lavoro alla Celestia, per la tua disponibilità senza limiti. E perché siamo entrambi convinti che il dottorato sia prima di tutto un percorso formativo (anche se nessuno ci capisce!).

A Michela Sicari. Per il tuo sapermi sempre offrire un rifugio protetto in cui sfogare tutte le mie ansie di dottoranda. Per avermi insegnato tutto quello che so in fatto di eco-bio (!). E per aver continuato a lavorare con professionalità con la mitica celletta!!!

A Emanuele Argese. Per la disponibilità e il prezioso supporto conoscitivo nella messa a punto delle prime fasi del lavoro, oltre che per l'attenzione dedicata al mio lavoro.

A Lorena Gobbo. Per la competenza e la professionalità con cui mi ha seguito nel primo anno in laboratorio e per essere sempre stata cortese e disponibile.

A Fabiola Minello. Per aver permesso l'esecuzione delle prime analisi e per avermi seguita con pazienza nella prima fase di preparazione ed elaborazione dei risultati!

A Cinzia Bettiol. Per aver messo in ordine le mie idee un po' confuse sulla geospeciazione e avermi sempre offerto un sorriso!

A Silvia Breda. Per aver condiviso un pezzettino di questo viaggio e aver saputo, infine, mettere da parte le incomprensioni!

A Giancarlo Rampazzo e Flavia Visin. Per aver sempre aperto la porta alle mie richieste (sia teoriche che pratiche) durante questi anni!

A Emanuela Molinaroli. Per il supporto nelle analisi di caratterizzazione del sedimento e per la disponibilità nel fornirmi preziosi riferimenti bibliografici.

A Warren Cairns e Chiara Rigo. Per i consigli, le indicazioni, il supporto pratico e la pazienza (!) durante tutta la seconda fase del lavoro di analisi.

A Annamaria Volpi Ghirardini e Giovanni Libralato. Per la disponibilità e il supporto tecnico-conoscitivo nell'esecuzione dei test ecotossicologici.

A Ruggero Ruggeri. Per le preziose e utili indicazioni riguardo al complesso mondo della venericoltura in laguna di Venezia e per aver messo in luce le problematiche da cui è nato questo studio.

A Nicola Penzo. Per le indimenticabili scorribande in laguna, per essere sempre stato disponibile ad esaudire ogni nostro desiderio in termini di campionamento!

A Nicola Miotello. Per aver sopportato i momenti di delirio e aver sempre saputo come sistemare tutto, in un modo o nell'altro!

A Italo Ongaro. Per il prezioso aiuto nella messa in opera del manufatto sperimentale (ma soprattutto per averlo tirato su dopo!!!)

A Valter Tomasi e a tutta l'officina. Per la disponibilità e la cortesia, anche nell'aver intuito e realizzato lo strumento che avevo immaginato per rompere le conchiglie!

A Bruno Pavoni. Per aver creduto che meritassi di proseguire il mio percorso di studi e per avermi dato un'occasione per mettermi alla prova.

A Gabriele Zanetto. Per aver acceso nel mio cuore la passione che mi ha portato ad arrivare fino a questo traguardo.

A Francesco Gonella. Per avermi insegnato che non bisogna mai smettere di cercare e per avermi fatto scoprire nuovi mondi da esplorare che hanno risvegliato quella passione.

A Santa Marta. Perché tutto è nato qui e resterà sempre nel cuore.

A Maria Gabriella Marin e Luca Palmeri. Per i preziosi consigli nella fase di revisione del presente lavoro.

Ai volontari del Gruppo di Venezia e Mestre. Perché mi avete sopportata in questi anni e perché mi siete stati sempre amorevolmente vicini (anche quando svengo in metropolitana a Milano!). Perché siete delle bellissime persone e sono felice di portare avanti con voi questa splendida avventura che si chiama Emergency!

A Sara, Dajana, Erica e Piero. Per l'affetto immenso che mi lega a voi e che mi riempie il cuore anche solo nel pensarvi.

A Ivonne e Tiziano. Per il supporto e il sostegno. Per essere dei genitori attenti e premurosi. Per avermi trasmesso la curiosità per le cose del mondo.

A noi, Mek. Per tutte le curve ancora da inventare.