



Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea in Scienze ambientali
Classe L75 - Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e la Natura

Tesi di Laurea Magistrale

Strategie di detossificazione dei metalli non essenziali
Pb e Cd nei molluschi bivalvi.

Relatore

Prof.ssa Volpi Ghirardini Annamaria

Correlatore

Prof. Marco Picone

Laureando

Gerardo Montella

Matricola 855072

Anno Accademico
2020 / 2021

Sommario

CAPITOLO 1 – METALLI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI.....	1
1.1 Elementi essenziali e non essenziali.....	1
1.2 Metalli: comportamento, speciazione e biodisponibilità negli ambienti marini e di transizione.....	4
1.3 Interazione tra metalli e organismi	8
1.4 Cadmio.....	9
1.4.1 Caratteristiche chimico-fisiche	9
1.4.2 Impieghi, esposizione ed accumulo.....	10
1.4.3 Assorbimento e metabolismo del Cadmio.....	11
1.4.4 Tossicità.....	12
1.5 Piombo.....	14
1.5.1 Caratteristiche chimico-fisiche.....	14
1.5.2 Impieghi, esposizione e accumulo.....	16
1.5.3 Assorbimento e metabolismo del Piombo.....	17
1.5.4 Tossicità.....	17
CAPITOLO 2 – I MOLLUSCHI BIVALVI COME INDICATORI DI BIOACCUMULO.....	18
2.1 Molluschi Bivalvi: Caratteristiche generali.....	18
2.2 Impiego dei Bivalvi nella Bioindicazione.....	23
2.2.1 Protocollo Mussel watch	26
2.3 La biodisponibilità ed il processo di bioaccumulo.....	27
CAPITOLO 3 – STRATEGIE DI DETOSSIFICAZIONE DI PB E CD NEI BIVALVI.....	36
3.1 Biomineralizzazione.....	37
3.1.1 Conchiglia.....	43
3.1.2 La formazione della conchiglia nei bivalvi.....	44

3.3.3 Il problema della calcificazione.....	47
3.2 Granuli.....	51
3.3 Metallotioneine (MT).....	58
CAPITOLO 4 – PROSPETTIVE FUTURE PER L’IMPIEGO DEI BIVALVI	
4.1 Conchiglie come indicatori paleoecologici.....	68
4.2 Conchiglie come biomateriale.....	69
4.2.1 Le potenziali applicazioni dei gusci.....	70
4.2.2 Applicazioni potenziali e non realizzate con le conchiglie.....	71
4.3 Impiego dei bivalvi per il biorisanamento.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	74
SITOGRAFIA.....	83
RINGRAZIAMENTI.....	86

Abstract:

In questo lavoro di tesi sono stati ripresi i concetti fondamentali dell'ecotossicologia marina con particolare riguardo alle vie di assunzione e trasporto e ai meccanismi di detossificazione dei metalli per comprendere come i molluschi bivalvi abbiano le caratteristiche per essere considerati degli ottimi indicatori di bioaccumulo. In particolare si è voluto approfondire come il Cadmio e il Piombo, due metalli in tracce non essenziali, possono essere assimilati (uptake) e stoccati sia nella parte molle sia nella conchiglia mettendo in luce le strategie di detossificazione e di sequestro: ad esempio la produzione di metallotioneine, i processi di biomineralizzazione e l'inclusione in granuli intra o extracellulari. Concludendo si è voluta mettere in evidenza anche l'importanza della conchiglia come potenziale biomateriale e la necessità di investire maggiore ricerca per approfondimenti nell'uso della conchiglia in campo paleoecologico e di biorisanamento per le future generazioni secondo gli obiettivi dello sviluppo sostenibile.

CAPITOLO 1 – METALLI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI

1.1 Elementi essenziali e non essenziali

Sono note circa 2 milioni di specie di organismi viventi e ciò ha permesso di stabilire il numero e l'identità degli elementi chimici e riconoscere quelli che sono essenziali (figura 1).

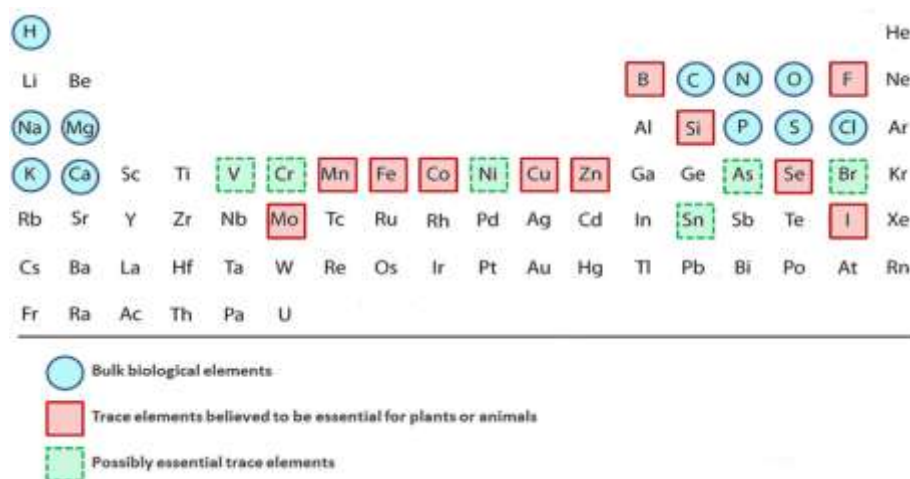


Figura 1: Tavola degli elementi chimici. In rosso sono gli elementi in tracce considerati essenziali per piante e animali. In blu gli undici elementi predominanti in tutti i sistemi biologici. In verde elementi possibilmente essenziali.

Undici elementi chimici (**H, Na, Mg, K, Ca, C, N, O, P, S, Cl**) sono circa costanti (percentualmente) e nettamente predominanti in tutti i sistemi biologici; nel corpo umano essi costituiscono il 99.9% del totale degli atomi, ma il 99% del totale è raggiunto con solo quattro di essi: **C, H, O, N**. Gli altri 7 (**Na, K, Ca, Mg, P, S, Cl**) degli 11 elementi rappresentano quindi circa lo 0.9% del totale. Oltre a questi 11 elementi, che sono assolutamente essenziali, ce ne sono circa altri 10, tra metalli e non-metalli, che sono richiesti dalla maggior parte dei sistemi biologici, ma non necessariamente da tutti; essi sono: **Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, B, Si, Se**. Ce ne sono poi altri 8, alcuni dei quali sono generalmente richiesti da piante e animali, altri solo da piante o solo da animali, e altri ancora soltanto da alcune specie. Essi sono: **V, Cr, F, I, As, Br, Sn**. Per quanto riguarda in maniera specifica i metalli, al momento sono 13 gli elementi metallici che sono essenziali per piante e/o animali. Quattro di essi **Na, K, Mg e Ca** sono presenti in grosse quantità e sono noti come bulk metals. I restanti nove che sono presenti in quantità più piccole sono elementi di transizione dei gruppi d: **V, Cr, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn** e sono noti come trace metals (Phillips et al., 1989).

In anni recenti è stato introdotto il concetto che ogni specie presenta, oltre ad uno specifico genoma (insieme dei geni) e proteoma (insieme delle specifiche proteine di quella specie) anche uno specifico metalloma, definito come l'insieme di metalli contenuto in ogni tipo di cellula di quella specie, ognuno con la sua specifica quantità, speciazione e localizzazione all'interno di ogni cellula (Williams, 2001).

La suddivisione in base al peso atomico (così come la definizione "metalli pesanti") è stata sostituita da una classificazione in base all'affinità elettronica per i leganti presenti in ambiente (Nieboer and Richardson, 1980):

- la classe "a" identifica i metalli "oxygen seeking"
Cs, K, Li, Na, Be, Ba, Ca, Mg, Sr, Al, Fe(III), Co (alcalini , alcalini terrosi)
- la classe "b" racchiude gli elementi "N/S seeking"
Ag, Au, Cu(I), Tl, Cd, Hg, Pt, Pd (Sali e prodotti di azoto e zolfo)
- intermedi
Co, Cu(II), Fe(II), Mn, Ni, Pb, Sn, Zn, Ga, (In mare quelli in grossetto)

L'uptake di un certo elemento da parte di un sistema biologico non significa necessariamente che tale elemento sia essenziale, così come la sua determinazione analitica in tracce: sono possibili contaminazioni (e.g. da aria, acqua, suolo) e elementi diversi possono competere per gli stessi siti chimici. Inoltre è noto che certe specie accumulano elementi senza apparente motivo. Quindi l'accumulo di un elemento non costituisce una prova che vi sia necessità fisiologica di tale elemento. Si definisce quindi essenziale un elemento sistematicamente presente in una certa specie biologica e tale che la sua assenza (o carenza) nelle fonti nutritive di quella specie sia causa di malattie, disturbi metabolici o dello sviluppo. L'effetto di un elemento essenziale sulla crescita di un organismo ha un tipico andamento a campana in funzione della concentrazione, con sofferenze dovute sia a carenza che a eccesso (figura 2).

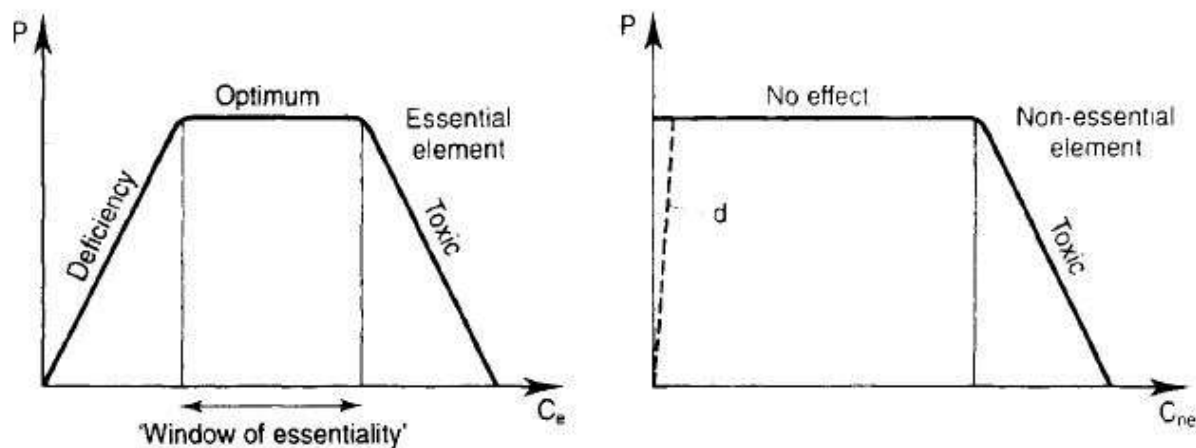


Figura 2 Relazioni tra la performance (P) (crescita, fecondità, sopravvivenza) e le concentrazioni di un elemento essenziale (C) o di un elemento non essenziale (C_{ne}) della dieta degli animali. Eventuali effetti di carenza a livelli di ultratraccia (d) di un elemento apparentemente non essenziale possono essere scoperti man mano che la sensibilità delle tecniche analitiche viene migliorata. Riprodotto da Hopkin (1989) con il permesso di Elsevier Applied Science.

L'eccesso di metalli essenziali, così come la loro carenza, comporta serie conseguenze sugli organismi viventi perché è generalmente correlato a problemi di inquinamento e tossicità, mentre per elementi non essenziali si osservano solo effetti dannosi (Zoroddu et al., 2019). La tossicità di un metallo in un sistema biologico dipende da diversi fattori: la tossicità intrinseca, la specificità del sistema biologico per il trasporto del metallo attraverso un organo target, la biotrasformazione del metallo in una forma derivata e spesso più tossica, l'abilità dell'organismo vivente di sequestrare o espellere il metallo, la capacità del metallo di legare/legarsi e la dose di metallo (Zatta et al., 1992).

1.2 Metalli: comportamento, speciazione e biodisponibilità negli ambienti marini e di transizione

I metalli sono presenti come ioni positivi nell'acqua di mare, ma possono presentarsi sotto molte forme diverse. Nonostante con la loro ripartizione tra la fase disciolta, dove gli elementi si trovano associati a leganti organici ed inorganici presenti nella soluzione, e quella particellata, dove gli elementi si possono legare mediante assimilazione (assunzione da parte di organismi marini di dimensioni microscopiche) o 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). Quando passano attraverso l'interfaccia acqua di mare-sedimento gli elementi sono soggetti a cambiamenti nelle caratteristiche chimico-fisiche. Per esempio, alcuni minerali si sciolgono, altri precipitano, gli acidi reagiscono con le basi ed i metalli in soluzione si legano con dei donatori di elettroni chiamati leganti. Calcoli basati sul principio dell'equilibrio termodinamico sono stati anche usati per predire il destino chimico di inquinanti introdotti nelle acque, in particolare oceaniche. In confronto con gli ioni maggiori (ioni liberi) e minori, una frazione molto maggiore dei metalli in tracce disciolti si trova sotto forma di complessi di coordinazione e coppie ioniche.

Come mostrato in Tabella 1 le associazioni ioniche probabilmente più abbondanti sono:

- ✚ In acque aerobiche, quelle con l'ossidrile, il cloruro, il solfato e il carbonato.
- ✚ In acque anossiche sono importanti i complessi con il solfuro.
- ✚ In aree costiere, sono importanti le associazioni con la materia organica disciolta (DOM), per la presenza di alte concentrazioni di questo legante.

I problemi relativi ai metalli in tracce sono molteplici; per molte specie, o non esistono dati termodinamici, oppure vengono riportati da diversi autori dati molto variabili, inoltre la rilevazione diretta delle specie dei metalli in tracce è complicata da basse concentrazioni ed interferenze analitiche causate dalle concentrazioni di ioni maggiori (Bruland,1983). In tabella 1 vengono riportate la speciazione (con le relative specie dominanti in condizioni ossidate nell'acqua di mare) e le concentrazioni medie degli elementi in tracce con evidenziati il Cd e il Pb, i due metalli non essenziali oggetto di studio della presente tesi.

Speciations, Concentrations, and Distribution Types of Trace Elements in Ocean Water

Element	Probable Main Species in Oxygenated Seawater	Range and Average Concentration at 35‰ Salinity ^a	Type of Distribution ^b
Ag	AgCl ₂ ⁻	(0.5–35 nmol kg ⁻¹ ; 25 pmol kg ⁻¹)	Nutrient-type
Cd	CdCl ₂ ⁰	0.001–1.1 nmol kg ⁻¹ ; 0.7 nmol kg ⁻¹	Nutrient-type
In	In(OH) ₃	(1 pmol kg ⁻¹)	?
Sn	SnO(OH) ₂	(1–12 pmol kg ⁻¹ ; ~4 pmol kg ⁻¹)	High in surface waters
Sb	Sb(OH) ₃	(1.2 nmol kg ⁻¹)	?
Te	TeO ₃ ²⁻ ; HTeO ₃ ⁻	?	?
I	IO ₃ ⁻	0.2–0.5 μmol kg ⁻¹ ; 0.4 μmol kg ⁻¹	Nutrient-type
Cs	Cs ⁺	2.2 nmol kg ⁻¹	Conservative
Ba	Ba ²⁺	32–150 nmol kg ⁻¹ ; 100 nmol kg ⁻¹	Nutrient-type
La	La ³⁺ ; LaCO ₃ ⁺ ; LaCl ₂ ⁺	13–37 pmol kg ⁻¹ ; 30 pmol kg ⁻¹	Surface depletion
Ce	CeCO ₃ ⁺ ; Ce ³⁺ ; CeCl ₂ ⁺	16–26 pmol kg ⁻¹ ; 20 pmol kg ⁻¹	Surface depletion
Pr	PrCO ₃ ⁺ ; Pr ³⁺ ; PrSO ₄ ⁻	(4 pmol kg ⁻¹)	Surface depletion
Nd	NdCO ₃ ⁺ ; Nd ³⁺ ; NdSO ₄ ⁻	12–25 pmol kg ⁻¹ ; 20 pmol kg ⁻¹	Surface depletion
Sm	SmCO ₃ ⁺ ; Sm ³⁺ ; SmSO ₄ ⁻	2.7–4.8 pmol kg ⁻¹ ; 4 pmol kg ⁻¹	Surface depletion
Eu	EuCO ₃ ⁺ ; Eu ³⁺ ; EuOH ²⁺	0.6–1.0 pmol kg ⁻¹ ; 0.9 pmol kg ⁻¹	Surface depletion
Gd	GdCO ₃ ⁺ ; Gd ³⁺	3.4–7.2 pmol kg ⁻¹ ; 6 pmol kg ⁻¹	Surface depletion
Tb	TbCO ₃ ⁺ ; Tb ³⁺ ; TbOH ²⁺	(0.9 pmol kg ⁻¹)	Surface depletion
Dy	DyCO ₃ ⁺ ; Dy ³⁺ ; DyOH ²⁺	(4.8–6.1 pmol kg ⁻¹ ; 6 pmol kg ⁻¹)	Surface depletion
Ho	HoCO ₃ ⁺ ; Ho ³⁺ ; HoOH ²⁺	(1.9 pmol kg ⁻¹)	Surface depletion
Er	ErCO ₃ ⁺ ; ErOH ²⁺ ; Er ³⁺	4.1–5.8 pmol kg ⁻¹ ; 5 pmol kg ⁻¹	Surface depletion
Tm	TmCO ₃ ⁺ ; TmOH ²⁺ ; Tm ³⁺	(0.8 pmol kg ⁻¹)	Surface depletion
Yb	YbCO ₃ ⁺ ; YbOH ²⁺	3.5–5.4 pmol kg ⁻¹ ; 5 pmol kg ⁻¹	Surface depletion
Lu	LuCO ₃ ⁺ ; LuOH ²⁺	(0.9 pmol kg ⁻¹)	Surface depletion
Hf	Hf(OH) ₄ ; Hf(OH) ₃	(<40 pmol kg ⁻¹)	?
Ta	Ta(OH) ₅	(<14 pmol kg ⁻¹)	?
W	WO ₄ ²⁻	0.5 nmol kg ⁻¹	?
Re	ReO ₄ ⁻	(14–30 pmol kg ⁻¹ ; 20 pmol kg ⁻¹)	?
Ox	?	?	?
Ir	?	?	?
Pt	?	?	?
Au	AuCl ₂ ⁻	(25 pmol kg ⁻¹)	?
Hg	HgCl ₂ ⁰	(2–10 pmol kg ⁻¹ ; 5 pmol kg ⁻¹)	?
Tl	Tl ⁺ ; TlCl ₂ ⁺ ; or Tl(OH) ₂ ⁺	60 pmol kg ⁻¹	Conservative
Pb	PbCO ₃ ⁺ ; Pb(OH) ₂ ⁺ ; PbCl ⁺	5–175 pmol kg ⁻¹ ; 10 pmol kg ⁻¹	High in surface waters, depleted at depth
Bi	BiO ⁺ ; Bi(OH) ₂ ⁺	<0.015–0.24 pmol kg ⁻¹	Depletion at depth

Tabella 1 Speciazione, concentrazione ed esempi di distribuzione degli elementi in tracce. Fonte: Dispensa lezione Prof. Pavoni Corso di Chimica del mare (tabella tratta da Bruland K.W.,1983).

In Tabella 2 sono riportati esempi di risultati di analisi di speciazione per metalli in tracce come Piombo, Cadmio, Zinco e Rame.

Per riassumere la speciazione di Pb e Cd in acqua di mare è la seguente:

- Pb: PbCO₃, Pb(OH)⁺, PbOHCl,
- Cd: CdCl₂, CdCl⁺, CdCl₃⁻, (CdCl₄²⁻).

Species Distribution in Seawater for Copper, Lead, Zinc, and Cadmium*

Metal Species	Copper	Lead	Zinc	Cadmium
Me ²⁺	3	1.8	39.0	1.9
MeCl ⁻	1	8.6	15.8	29.1
MeCl ₂ /Me(OH)Cl	0.6	12.6	10.0	37.2
MeCl ₂ /MeCl ₂	—	—	3.8	31.0
MeSO ₄	0.4	—	15.8	—
MeOH ⁺	2.8	30	0.6	—
Me(OH) ₂	1	0.5	0.1	0.8
MeCO ₃	80	43.0	13.0	—
Me(CO ₃) ₂ ⁻	—	3.7	1.8	—
Me-humate	11	—	—	—

Tabella 2: Esempi di risultati di speciazione (percentuali sul totale) per alcuni metalli in tracce: Rame, Piombo, Zinco e Cadmio. Forstner et al. (1986).

Nell'acqua di mare sono stati identificati tutti gli elementi. Quelli che sono presenti a concentrazioni < 50 µmol/kg sono chiamati elementi minori e quelli a concentrazioni < 50 nmol/kg sono chiamati elementi in tracce (vedi Figura 3).

Figura 3: Una tavola periodica abbreviata degli elementi nell'acqua di mare. Gli elementi sono suddivisi in categorie in base alle loro concentrazioni medie. Viene anche indicato il probabile stato di ossidazione maggiore nell'acqua di mare in condizione aerobica (O₂). Gli elementi tra parentesi sono radioattivi e non hanno un isotopo stabile (Fonte: Bruland et al., 1983).

Come è evidente in Figura 3 gli elementi in tracce sono per la maggior parte metalli, i quali sono introdotti nell'acqua di mare con: 1) il deflusso dei fiumi (sorgente maggiore), 2) i venti, 3) gli sfiati idrotermali, 4) la diffusione dai sedimenti e 5) le attività antropiche (Bruland et al., 1983; Libes ,1992).

Globalmente, i metalli in tracce sono più reattivi nell'acqua di mare rispetto agli ioni più abbondanti, così essi si arricchiscono nei sedimenti. I metalli sono rimossi dall'acqua di mare con processi di non equilibrio. In condizioni ossiche, i metalli disciolti sono rimossi dall'acqua di mare con l'adsorbimento sulle particelle o la precipitazione come ossidi. Alcune di queste particelle arricchite di metalli alla fine precipitano sui fondali, rimuovendo perciò i metalli dalla colonna d'acqua. Questo processo di rimozione è chiamato *scavenging*. La velocità e il grado con cui un metallo disciolto è rimosso dalle acque dipende dalla sua natura elementare, come anche dall'abbondanza della materia particellata, dalla concentrazione di altri soluti e dalla profondità dell'acqua. Aree con alte velocità di rimozione possono avere concentrazioni locali di metalli disciolti che deviano considerevolmente dalla media (Bruland et al., 1983).

Gli organismi marini concentrano i metalli nei loro tessuti e nei materiali componenti lo scheletro. Il grado con cui un metallo è concentrato in un organismo marino è dato dal fattore di arricchimento ($FA = \text{Concentrazione del metallo nel materiale biogenico} / \text{Concentrazione del metallo nell'acqua di mare}$, con FA alti fino a 10^5). Molti di questi metalli in tracce sono classificati come micronutrienti, perché sono essenziali per il metabolismo. Per la maggior parte sono componenti di sistemi enzimatici, che catalizzano importanti reazioni biochimiche come la glicolisi, il ciclo degli acidi tricarbossilici, la fotosintesi, e il metabolismo delle proteine. La distribuzione di concentrazione esibita da un metallo in tracce può essere classificata come: (1) tipo conservativo, (2) tipo nutriente, (3) arricchimento dell'acqua superficiale, (4) minimo di media profondità, (5) massimo di media profondità, (6) minimo o massimo di media profondità entro uno strato subossico, o come (7) minimo o massimo entro uno strato anossico (Libes ,1992).

1.3 Interazione tra metalli e organismi

La deposizione del particolato sospeso contribuisce all'arricchimento in metalli 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.

Gli organismi acquatici mostrano un controllo delle concentrazioni intracellulari di metalli in traccia, ma 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: 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) in (figura 4): • 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 ad esempio i cirripedi che sequestrano elevate quantità di Zn in forme granulari nelle cellule;

- 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 (Depledge et al., 1990).

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 (Phillips et al., 1989).

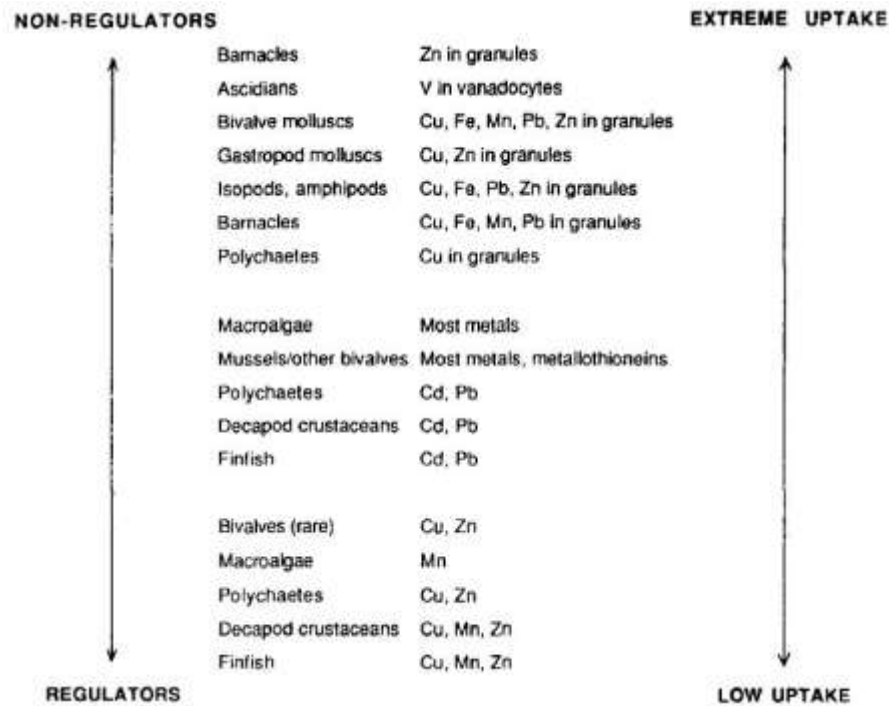
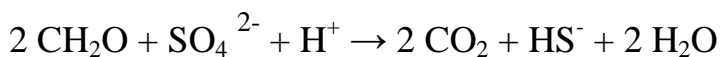


Figura 4: Organismi come bivalvi sono regolatori parziali perché capaci a regolare ed accumulare metalli in tracce in modo direttamente proporzionale alla concentrazione ambientale. (Fonte: Depledge et al., 1990).

1.4 Cadmio

1.4.1 Caratteristiche chimico-fisiche

Il Cadmio fu scoperto da Fredrich Stromeyer nel 1817. E' un metallo bianco-argento, brillante, molto malleabile e duttile, molto simile allo Zinco. Il numero atomico è 48 ed ha una densità pari a 8.7 g cm^{-3} a 20°C . Il Cd sostituisce lo Zn in alcuni enzimi; però, essendo più grosso, ne altera la struttura sterica compromettendone l'attività catalitica. In condizioni aerobiche e in presenza di complessanti può dare specie solubili come CdCl^+ , $\text{CdCl}_2(\text{acq})$, (CdCl_3^-) , CdCl_4^{2-} . In condizioni anaerobiche precipita come solfuro (Bruland, 1983):



In letteratura sono riportati esempi di mobilizzazione del Cd da sedimenti nei quali è presente come solfuro insolubile per cambiamenti di potenziale redox intervenuti alla superficie del sedimento o per risospensione di sedimenti. Un aumento del potenziale redox, da valori negativi (condizioni riducenti) a positivi (condizioni ossidanti)

provoca la dissoluzione del solfuro, insolubile, che viene ossidato a solfato, solubile. Il Cd è complessato dal cloruro dell'acqua di mare (CdCl^+) e viene mobilizzato e disperso nel corpo d'acqua, causando una diffusione dell'inquinamento.

1.4.2 Impieghi, esposizione ed accumulo

Il Cd è usato soprattutto nella placcatura, nella produzione di rivestimenti e pigmenti fluorescenti, e come stabilizzatore per la plastica; inoltre è usato come materiale catodico per le batterie, soprattutto come complessi Ni-Cd, ma anche in alcuni fertilizzanti e fuochi d'artificio. È stato usato specialmente per placcare l'acciaio in cui una pellicola di cadmio spessa soltanto 0.05 millimetri assicura completa protezione contro l'azione dell'acqua di mare. Le fonti di inquinamento da Cd sono le seguenti: scarichi industriali (ad es. industrie galvaniche), tubature per l'acqua, rifiuti minerari (la blenda, ZnS, contiene infatti percentuali variabili di Cd (Libes, 1992).

È presente come impurità in molte leghe metalliche, in idrocarburi fossili ed è un sottoprodotto delle fasi di estrazione, fusione e lavorazione di Zn, Cu e Pb. Il Cd è un inquinante prioritario e generalmente si accumula raggiungendo concentrazioni più elevate nei molluschi rispetto ad altri gruppi di organismi acquatici (ad esempio crostacei e pesci) (Eisler, 2009).

Negli ecosistemi acquatici il Cd può bioaccumulare in pesci, aragoste, gamberi ostriche e mitili (Jerry, 2002). La predisposizione all'accumulo di Cd può variare notevolmente fra gli organismi acquatici. Gli organismi di acqua salata sono noti essere più resistenti alla presenza di Cd rispetto agli organismi di acqua dolce, come è stato verificato nell'accumulo di questo inquinante da parte di molluschi della specie *Perna viridis* (Yap et al, 2003). Inoltre, indagando la tossicocinetica, che non solo descrive quantitativamente la velocità di assorbimento ed eliminazione dei metalli negli organismi, ma è anche importante per interpretare i dati di biomonitoraggio, si è osservato che le cozze continuano ad accumulare Cd anche quando sono fuori dall'acqua durante la bassa marea, in quanto l'assorbimento avviene nella cavità del mantello sostenendo ore di bioaccumulo (Li et al, 2020). Altri studi hanno evidenziato che, quando le cozze sono state reimmerse dopo un periodo di esposizione all'aria, hanno filtrato più attivamente per moderare lo stress causato dall'emersione, cosa che ha portato a tassi di assorbimento di Cd più elevati (Coleman, 1980).

Una significativa via di esposizione al Cd è rappresentata anche dal desorbimento dei metalli associati a particolato organico e inorganico. Un esempio è il caso in cui l'ematite a grana superfine (ferrossido) viene erosa dalle scogliere vicine alle baie. L'ematite ha infatti una capacità legante molto elevata per il Cd tale da aumentarne le concentrazioni in acqua e favorirne poi l'assimilazione durante l'alimentazione e l'accumulo nelle branchie dei bivalvi (Jerry, 2002).

1.4.3 Assorbimento e metabolismo del Cadmio

La presenza di Cd nei bivalvi ha dimostrato di produrre alterazioni fisiologiche e metaboliche, influenzando i processi di trascrizione e sintesi dell'RNA, il trasporto attraverso la membrana plasmatica, le funzioni mitocondriali, nonché la stabilità lisosomiale (Zapata et al.2012). *Perna viridis* è una specie in grado di regolare i livelli di Cd, rispondendo con meccanismi di regolazione efficaci che le consentono di acclimatarsi ad aree contaminate. Il continuo accumulo di Cd nel guscio suggerisce che questo compartimento possa essere utilizzato come un indicatore di contaminazione da questo metallo nei sistemi acquatici (Vanessa et al., 2018).

Il Cd non subisce biotrasformazione, pertanto la sua omeostasi è finemente regolata. Il Cd accumulato da molluschi bivalvi come le ostriche (*Crassostrea gigas*) si lega alle proteine plasmatiche nell'emolinfa. Tuttavia, la maggior parte del Cd nei tessuti, in particolare nella ghiandola digerente, è associata a proteine ad alto contenuto di zolfo, simili a metallothioneine, a granuli mineralizzati o ai lisosomi (Jerry, 2002). L'efficienza di assimilazione del Cd dall'acqua è compresa tra lo 0,18 e lo 0,35%. Le efficienze di assimilazione dal cibo variano ampiamente a seconda della specie e dell'alimento: dall'11 al 40% per *Mytilus edulis* che si nutre di fitoplancton, al 69-88% per le vongole *Macoma balthica* che si nutrono di diatomee, dal 72 all'88% per i cirripedi *Balanus anfronit* che si nutrono di copepodi. Due bivalvi, *Macoma balthica* e *Mytilus edulis*, sembrano bioaccumulare Cd dall'ingestione diretta di particelle di sedimenti e non dall'acqua interstiziale (Jerry, 2002).

Praticamente tutto il Cd nei tessuti delle ostriche è legato organicamente. Le Metallothioneine (MT), proteine di basso peso molecolare (6-8 KDa) e ricche di residui cisteinici, sono in grado di formare complessi con i metalli pesanti. L'espressione delle MT è indotta in seguito all'esposizione dell'organismo ad elevate concentrazioni di metalli pesanti e questa risposta costituisce una difesa rapida ed

efficiente da parte degli organismi viventi all'esposizione indesiderata ai metalli tossici come il Cd (Bebianno et al, 1991).

Le cozze possono accumulare Cd attraverso l'acqua di mare, il cibo, i sedimenti e particolato sospeso (Figura 5) Il processo con maggiore efficienza risulta l'accumulo dall'acqua di mare, probabilmente a causa del fatto che il Cd è presente in gran parte come ione libero Cd²⁺ (Zhanqiang, 2006).

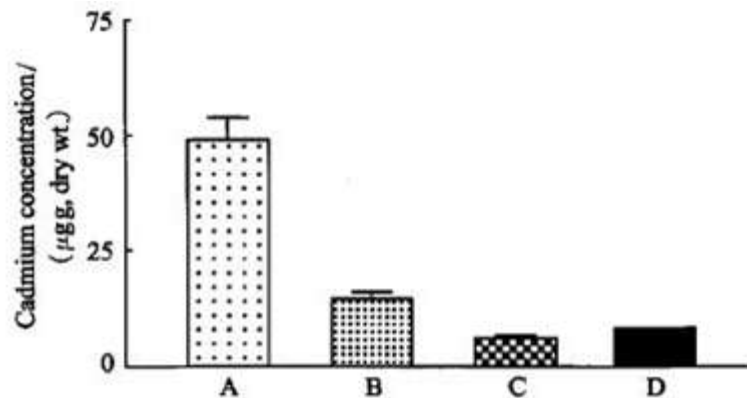


Figura 5: Confronto del bioaccumulo di Cd in mitili della specie *Perna viridis* attraverso diversi percorsi A) acqua di mare, B) alghe, C) sedimenti, D) particolato sospeso (Fonte: Zhanqiang, 2006).

1.4.4 Tossicità

Il Cd deriva le sue proprietà tossicologiche alla capacità di vicariare in enzimi e proteine lo Zn, un micronutriente essenziale per le piante, gli animali e gli esseri umani. Ad esempio, si sostituisce allo Zn nell'enzima superossido dismutasi, coinvolto nella "detossificazione" dei radicali liberi. E' mutageno e probabile cancerogeno in quanto in grado di danneggiare il DNA e/o la cromatina attraverso la formazione diretta di radicali liberi (stress ossidativo). Inoltre, si sostituisce allo Zn nella struttura delle metallotioneine impedendo a queste ultime di regolare la presenza di metalli nel citoplasma. Gli effetti del Cd sugli animali terrestri e acquatici includono tossicità acuta e cronica (Robbins,1999).

Come conseguenza si ha la perossidazione lipidica, ovvero la degradazione ossidativa dei lipidi, causata da radicali liberi che sottraggono elettroni ai lipidi di membrana, destabilizzandoli e generando un danno cellulare. Nel sistema scheletrico il Cd interferisce con il metabolismo della vitamina D e del Ca, provocando un

impoverimento di Ca nelle ossa. Gli organismi acquatici risultano molto più vulnerabili al Cd rispetto a quelli terrestri (Robbins,1999).

Nella figura 6 sono rappresentati gli effetti preferenziali del Cadmio sull'uomo. Nello specifico si vuole evidenziare che, come nell'uomo, anche nei molluschi il Cadmio può portare come effetto allo stress ossidativo.

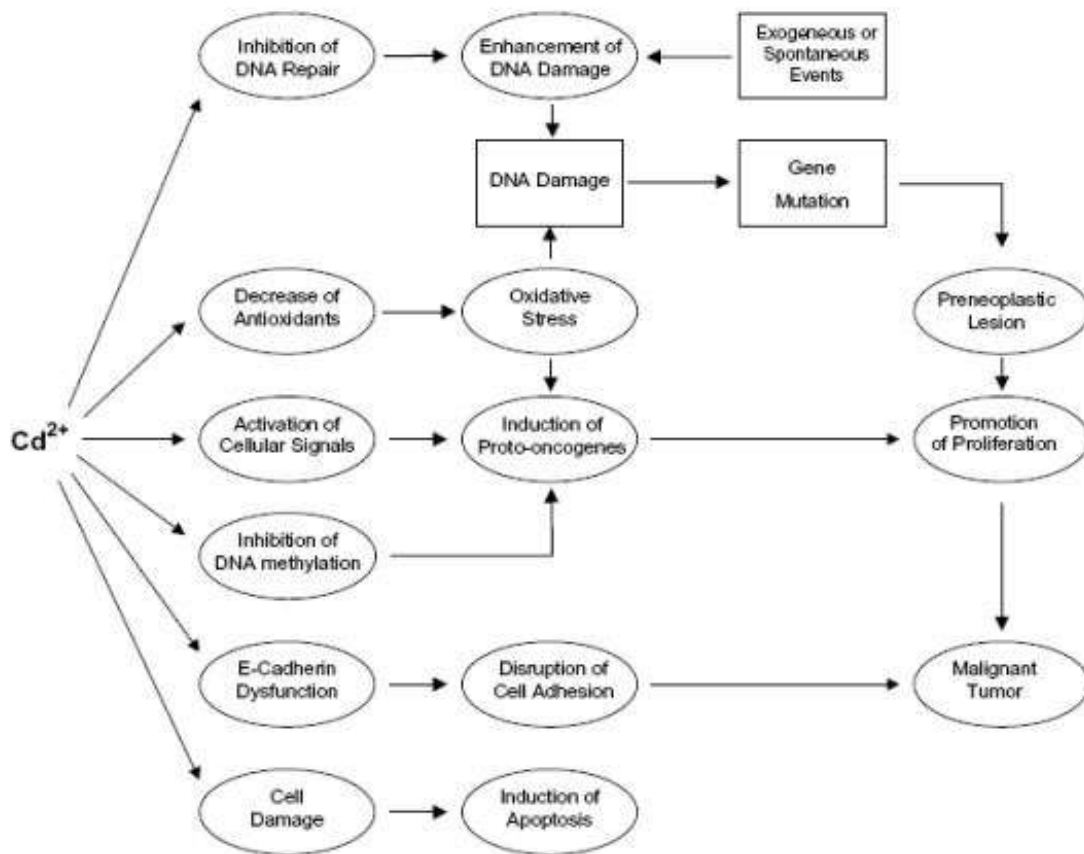


Figura 6: Sono rappresentati gli effetti preferenziali del Cadmio sull'uomo. Nello specifico si vuole evidenziare che, come nell'uomo, anche nei molluschi il Cadmio può portare come effetto allo stress ossidativo. (Fonte: Robbins,1999).

1.5 Piombo

1.5.1 Caratteristiche chimico-fisiche

Fu scoperto in epoca molto antica, se ne parla in papiri egizi del 1550 a.C. È un metallo tenero, denso, duttile e malleabile. Di colore bianco azzurrognolo appena tagliato, esposto all'aria si colora di grigio scuro. È molto resistente alla corrosione; non viene intaccato dall'acido solforico, si scioglie però in acido nitrico. Si presume che tutto il Piombo esistente sia derivato dal decadimento dell'uranio (U) 238 che si trasforma in Piombo (Pb) con un tempo di dimezzamento di circa 4.51 miliardi di anni. Nei primi anni del 1900 però si riteneva che il Pb derivasse dal decadimento del radio. Il comportamento chimico nell'ambiente marino del Pb è stato oggetto di studi approfonditi a causa della rilevanza delle emissioni di questo inquinante e della sua tossicità (Figura 7).

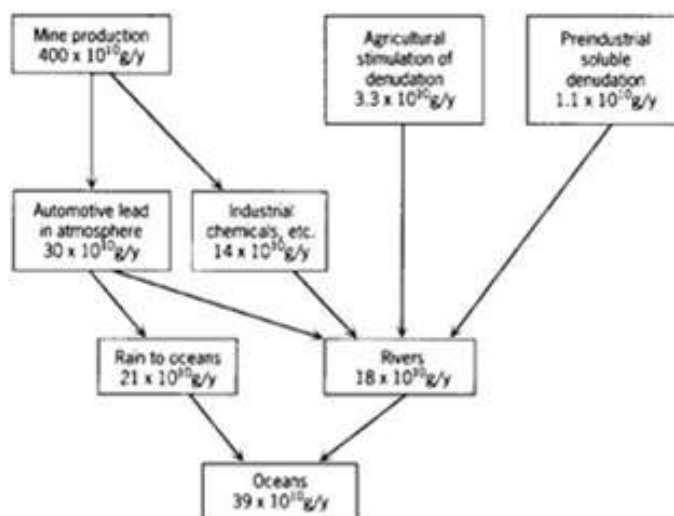


Figura 7: Input di Piombo nei diversi comparti ambientali.
(Craig et al., 1992)

Come mostrato in Figura 7, le attività umane sono attualmente responsabili della maggior parte del Pb immesso nell'atmosfera e nei fiumi. Il Pb è un elemento non essenziale e tossico sia per gli animali che per l'uomo. La legge italiana prevede un contenuto massimo di 0,3 mg/l di Pb²⁺ per le acque di scarico in rete fognaria e di 0,2 mg/L in acque superficiali (Decreto Legislativo 152/2006). La maggior parte del Pb

proviene dalla combustione dei combustibili fossili, dalla raffinazione dei minerali e da una accelerazione nell'erosione dei suoli.

La combustione dei combustibili fossili porta alla formazione di aerosol. Sebbene la maggior parte si depositi relativamente vicino al punto di immissione, parte del Pb presente in questo aerosol viene trasportato fino alle regioni polari. La velocità di aumento della concentrazione del Pb è stata moderata durante tutto il 1800, ma è aumentata rapidamente negli anni '50, in seguito all'avvento della benzina contenente piombo (Murozumi et al., 1969).

Gli arricchimenti nelle acque superficiali sono di solito causati dalla presenza di grandi apporti di metalli nello strato misto (parte superficiale di zone di mare aperto 0-300 metri di profondità). La rimozione di solito avviene attraverso reazioni di precipitazione relativamente rapide e reazioni di adsorbimento. Come risultato, il tempo di ricambio di questi metallo è molto più breve del tempo di mescolamento della massa d'acqua (cioè, la quantità di tempo richiesta per omogeneizzare completamente la massa d'acqua). Diversi processi possono fornire metallo in forma particellare a velocità abbastanza grandi da creare massimi di concentrazione alla superficie del mare. Per esempio, il trasporto atmosferico del Pb antropogenico ha creato massimi di concentrazione nelle acque di superficie del Nord Atlantico e in minor grado in quelle del Nord Pacifico, come mostrato in Figura 8 . È presente in forma organica (piombo tetraetile, piombo tetrametile) ed inorganica (Schaule et al., 1983).



Figura 8: Profili verticali della concentrazione di Piombo disciolti in Atlantico e Pacifico del Nord (Fonte: Schaule et al., 1983).

1.5.2 Impieghi, esposizione e accumulo

Il piombo è un metallo che si trova nella crosta terrestre e che si insinua negli ambienti acquatici attraverso i naturali processi di erosione. Nel settore industriale il Pb è stato ampiamente utilizzato come piombo tetraetile (antidetonante delle benzine) e per la produzione di caratteri da stampa. Nel settore domestico invece è stato utilizzato per la produzione di tubature, nelle pitture murali e nelle ceramiche. Ormai è un metallo ubiquitario a causa dei suoi ampi utilizzi.

Diversi studi hanno dimostrato sperimentalmente l'accumulo di Pb nei tessuti molli di bivalvi sia marini, come ad esempio il mitilidae *Perna perna* (Pessatti et al., 2002), sia dulciacquicoli come *Dreissena polymorpha* (Rahnaa et al., 2010) e come questo sia concentrazione-dipendente. Nei bivalvi si nota un accumulo preferenziale nell'epatopancreas. Anche le conchiglie sono particolarmente arricchite di questo elemento (Zuin et al, 2014). Il Pb è inoltre in grado di accumulare e di danneggiare direttamente gli organi riproduttivi provocandone degenerazione o necrosi (Tsapakos & Wetterhahn, 1983).

1.5.3 Assorbimento e metabolismo del Piombo

Il Pb ha alta affinità per i gruppi tiolici (-SH) e legandosi a questi interferisce con le funzioni omeostatiche di proteine ed enzimi (ferritina, ferrochelatasi). Interferisce con il metabolismo del Ca, alterando la neurotrasmissione e/o sostituendosi a Ca^{2+} in processi di calcificazione. Genera anemia attraverso molteplici meccanismi di blocco della sintesi del gruppo eme e inibendo l'enzima δ -ALAD. Il Pb non è un metallo essenziale, quindi non è normalmente presente all'interno di cellule e tessuti, ma può superare le barriere cellulari utilizzando le stesse vie seguite dal calcio, che, al contrario, è un elemento fondamentale per tutti gli esseri viventi. Una volta penetrato nelle cellule, il Pb causa disordini metabolici che provocano effetti su diversi apparati.

I bivalvi sono in grado di detossificare il Pb mediante la sintesi di metallotioneine (Rahanna et al., 2010). Nello studio condotto è stato verificato che, inizialmente, i livelli di piombo e metallotioneina erano più alti nelle branchie che nello stomaco delle due specie di ostriche (*Crassostrea iredalei* e *Crassostrea glomerata*). Ciò indica che le MT possono essere responsabili del sequestro di questo metallo, come è già stato osservato negli animali terrestri (Asus et al., 2018). Tuttavia, molti studi hanno confermato l'affidabilità dell'utilizzo della ghiandola digestiva come la migliore matrice biologica per la determinazione della MT nei mitili. I livelli di metallo sono significativamente più alti nella ghiandola digestiva rispetto alla ghiandola riproduttiva; infatti, la ghiandola digestiva dei molluschi è nota come organo bersaglio per gli effetti dell'inquinamento, perché accumula principalmente contaminanti e svolge un ruolo importante nel metabolismo degli xenobiotici, nella difesa immunitaria, nella regolazione omeostatica e nella detossificazione (Scudiero et al., 2014).

1.5.4 Tossicità

Caratterizzato da una forte affinità per i componenti tissutali, la tossicità del Pb si esplica nei vertebrati sotto due forme: avvelenamento acuto, in cui prevalgono disturbi a carico del sistema nervoso e dell'apparato gastro-enterico; e avvelenamento cronico, detto anche "saturnismo", con disturbi dell'apparato scheletrico ed alterazione della crasi ematica (rapporto tra i componenti del sangue), con anemia dovuta ad interferenza del Pb sugli enzimi implicati nella sintesi dell'eme ed emolisi

per danno diretto sugli eritrociti, al sistema riproduttivo, al cervello, e al fegato (Galli et al. 2004). La dose massima al giorno consentita varia da 0,36-1,24 a 2,43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per peso corporeo (EFSA, 2010).

CAPITOLO 2 – I MOLLUSCHI BIVALVI COME INDICATORI DI BIOACCUMULO

2.1 Molluschi Bivalvi: Caratteristiche generali

I Molluschi sono comparsi prima del Cambriano: si sono originati probabilmente da un ceppo che presentava alcune delle caratteristiche che oggi osserviamo nei Nemertini e negli Anellidi, cioè le cui uova hanno segmentazione spirale e vanno incontro a divisioni mitotiche. I molluschi vermiformi si sono adattati a vivere nel fango, tra le alghe e i coralli. Quelli muniti di conchiglia hanno colonizzato dapprima le superfici rocciose incrostate da organismi animali e vegetali dei quali si nutrivano. In un secondo tempo, grazie all'efficiente organizzazione fisiologica e alla flessibilità dell'organizzazione anatomica, hanno finito con l'occupare ambienti molto variegati e hanno colonizzato le acque interne, soprattutto quelle lagunari e palustri (Figura 9). Il phylum dei Molluschi è attualmente il secondo per numero di specie descritte (circa 130 000) dopo quello degli Artropodi.

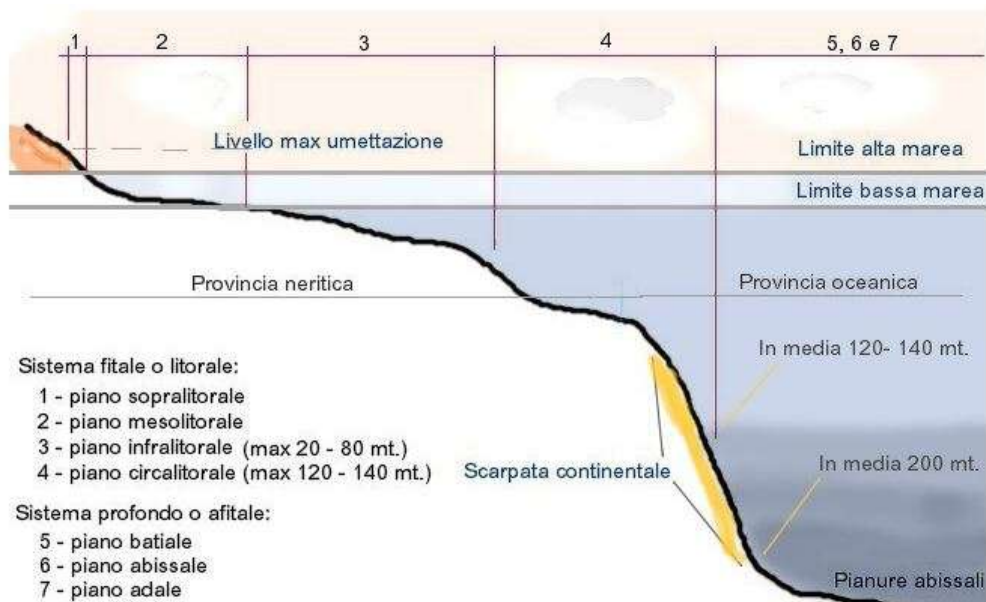


Figura 9: Piani del dominio bentonico. Maggiore occupazione di bivalvi nel sistema fitale - piano mesolitorale massimo a 20 metri di profondità.

I molluschi vivono infossati nei sedimenti, nelle rocce e nel legno o come specie sessili su substrati duri massimo fino a 20 metri di profondità. Il loro corpo si divide in cinque regioni:

- la regione cefalica dove è presente la radula, atta alla raschiatura delle superfici (tale regione è assente nei Bivalvi);
- la regione viscerale posta in posizione dorsale dove hanno sede lo stomaco, il sistema circolatorio sanguigno, i reni e le gonadi;
- il mantello contorna il sacco delle viscere dove hanno sede l'ano, le branchie e le aperture genitali;
- la conchiglia è formata dalle secrezioni ghiandolari di alcune pieghe del mantello che depositano dapprima una proteina, la conchiolina, che viene successivamente impregnata di Sali di calcio;
- il piede atto alla locomozione è costituito da un'espansione muscolare ventrale.

Questo phylum è suddiviso in 8 classi (Cerrano et al., 2004):

1. Solenogastri: sono molluschi a forma di verme bentonici. Vivono liberi nell'oceano nutrendosi di cnidari. Assenza di branchie e conchiglia. Presenza di spicole calcaree e aragonitiche. Ermafroditi . Presenza di radula.
2. Caudofoveati: sono molluschi a forma di verme, dotati di uno scudo pedale atto alla locomozione. Assenza di guscio, ma il corpo è coperto da spicole calcaree e aragoniti. Vivono sepolti nei substrati molli con la testa rivolta verso il basso.
3. Monoplacofori: sono molluschi molto primitivi. Il loro corpo è coperto da un singolo guscio e da una serie di branchie ripetute. Presenza di organi escretori (nefridi), muscoli dorso-ventrali, sistema nervoso e gonadi. La conchiglia dorsale è unica.
4. Poliplacofori: Presenza di branchie ripetute. Corpo appiattito rivestito da scudo ricoperto di scaglie e setole chitinose. Assenza di tentacoli. Fecondazione esterna perché privi di organi copulatori. Presenza di radula.

5. Gasteropodi: Conchiglia spiralata non concamerata formata da un unico pezzo (non sempre presente). Capo ben differenziato con organi di senso e appendici tattili. Respirazione branchiale, polmonare o epiteliale. Piede strisciante ventrale ben sviluppato.
6. Bivalvi: Capo e radula assenti, piede ridotto non strisciante. Vi è fusione dei margini del mantello. Presenza di organi di senso sull'orlo intermedio del mantello, il quale origina due sifoni, strutture tubulari che mettono in comunicazione l'interno della conchiglia con l'ambiente generando due flussi d'acqua, uno inalante ed uno esalante. La loro conchiglia è **sempre divisa in due parti**, le “*valve*”, da cui la denominazione “*bivalvi*”. Ci sono molluschi “*equivalvi*” in quanto posseggono valve uguali, come la vongola e la cozza, e ci sono altre specie dove le valve sono diverse l'una dall'altra, come nell'ostrica e nella cappasanta pertanto definite “*inequivalvi*”. Alcuni di essi, come i mitili, sono dotati di un organo che produce il “*bisso*”, un insieme di filamenti che fissa questi molluschi ad un substrato naturale duro (es. scoglio) o artificiale per tutta la durata della loro vita. Per questa caratteristica sono detti “*sessili*”. Scafopodi: sono conchiferi marini di piccole dimensioni (2-150 mm). Hanno una conchiglia a forma di zanna. Cavità palleale tubulare priva di ctenidi. Capo poco sviluppato e privo di organi di senso. Bocca provvista di radula e palpi labiali. Presenza di tentacoli prensili e piede fossorio. Privi di branchie. Presenza di simmetria bilaterale. L'apparato digerente ed il sistema nervoso sono rudimentali, manca anche l'apparato visivo.
7. Cefalopodi: Conchiglia concamerata, da ben sviluppata ad assente. Corpo allungato dorso-ventralmente. Ampia cavità palleale con 1-2 coppie di ctenidi. Capo ben sviluppato provvisto di occhi. Piede trasformato in imbuto atto all'idropropulsione. Bocca munita di radula e 2 mandibole. Corona di 8 braccia tentacolari (fino a 90 nei Nautoloidi). In alcuni gruppi 2 braccia accessorie modificate atte alla predazione e riproduzione (ectocotile).

I bivalvi, oggetto di questa tesi, sono ampiamente distribuiti nelle acque interne, lungo le coste e negli estuari, a tutte le latitudini:

- ✓ sono facili da raccogliere perché sono organismi sessili di superficie (epifauna) sia in acque dolci (es. *Dreissena polymorpha*) sia in acque marine (es. *Mytilus galloprovincialis*);
- ✓ sono ideali integratori ambientali in una data area;
- ✓ sono tolleranti, ma non insensibili ad un ampio stretto di condizioni ambientali compresi livelli moderatamente alti di vari inquinanti;

- ✓ sono organismi filtratori;
- ✓ le popolazioni sono stabili ed ampie da consentire ripetuti campionamenti anche a diverse scadenze temporali; possono essere trapiantati e posizionati in siti di interesse;
- ✓ molte specie sono eduli e commercialmente rilevanti e la valutazione della contaminazione chimica dei loro tessuti è di grande interesse anche per la salute pubblica (Montella, 2018).

Di seguito si riportano le caratteristiche fondamentali di quattro tra le più importanti famiglie di molluschi bivalvi, le famiglie Mitilidae, e Ostreidae, Cardiidae e Unionidae che sono state prese in considerazione per questo lavoro di tesi:

➤ **Mytilidae** Rafinesque, 1815

Regno Animalia

Phylum Mollusca

Classe Bivalvia

Sottoclasse Pteromorphia

Ordine Mytiloida

Bivalvi caratterizzati da conchiglia allungata, equivalve che si restringe verso l'ombone. Il periostraco è generalmente evidente, tipicamente più suro del guscio, con o senza spine. La cerniera è priva di denti, raramente con piccole crenulazioni. Il legamento è interno o esterno, posizionato in un solco stretto e poco appariscente. Cicatrici muscolari degli adduttori disuguali, cicatrice muscolare anteriore ridotta. Nessun seno palliale. Attaccati al substrato mediante un bisso diffuso e fibroso (Hayward, 1990).

➤ **Ostreidae** Rafinesque, 1815

Regno Animalia

Phylum Mollusca

Classe Bivalvia

Sottoclasse Pteromorphia

Ordine Ostreoida

Comprende la maggior parte delle specie di molluschi comunemente identificate come ostriche. Le ostriche perlate non sono vere ostriche e appartengono all'ordine Pteriid . Come le capesante, le vere ostriche hanno un muscolo adduttore centrale, il che significa che il guscio presenta una caratteristica cicatrice centrale che ne segna il

punto di attacco. Il guscio tende ad essere irregolare a causa del fissaggio ad un substrato. Sono ermafroditi: gli organi maschili e femminili raggiungono il completo sviluppo in tempi diversi. I membri del genere *Ostrea* vivono generalmente continuamente immersi e sono piuttosto piatti, con conchiglie tondeggianti. Si differenziano dalla maggior parte dei bivalvi per avere gusci completamente costituiti da calcite, ma con cicatrici muscolari interne di composizione aragonitica. I membri dei generi *Saccostrea*, *Magallana* e *Crassostrea* vivono generalmente nella zona intercotidale, emettono spermatozoi e uova in mare e possono prosperare nell'acqua eutrofica (Fratini, 2012).

➤ **Unionidae** Fleming, 1828

Regno Animalia

Phylum Mollusca

Classe Bivalvia

Sottoclasse Palaeoheterodonta

Ordine Unionoida

La famiglia degli Unionidae costituisce una parte importante della biomassa dei fondali di fiumi e laghi; è stato calcolato che nel fiume Tamigi essa rappresenta il 90% del benthos (Negus, 1966). Essendo privi di sifoni, gli Unionidi hanno la parte posteriore della conchiglia affiorante dal substrato, per permettere all'acqua di circolare attraverso l'apertura inalante ed esalante (Vaughn and Hakenkamp, 2001). Gli Unionidi si nutrono di fitoplancton, filtrando in media 7.2 l in un giorno. Molte specie di bivalvi appartenenti a questa famiglia sono gonocorici (i sessi sono separati): i maschi emettono nell'acqua gli spermatozoi, che raggiungono la femmina e fecondano gli ovuli internamente. Gli embrioni si sviluppano in larve (dette "glochidi") nella camera esterna delle branchie della femmina. I glochidi, successivamente, passano attraverso uno stadio di parassitismo (2 – 3 settimane) sulle pinne (*A. anatina*) o nelle branchie (*U. mancus*) dei pesci, durante il quale vanno incontro a metamorfosi, passando allo stadio giovanile.

➤ **Cardiidae** Lamarck, 1809

Regno Animalia

Phylum Mollusca

Classe Bivalvia

Sottoclasse Heterodonta

Ordine Veneroida

Famiglia Cardiidae

Questa famiglia di bivalvi marini è caratterizzata da una cerniera eterodonte, costituita da due denti laterali allunganti, e da tre denti mediani detti cardinali. Prendono il nome dal genere *Cardium*, a causa del loro profilo a forma di cuore. Il piede del mollusco è robusto e permette un rapido insabbiamento o avanzamento a balzi in caso di pericolo (Cerrano et al., 2004)

2.2 Impiego dei Bivalvi nella Bioindicazione

La scienza della bioindicazione è la disciplina che studia e mette a punto indicatori biologici (bioindicatori) e indici bio/ecologici. Costituisce un importante strumento di conoscenza e gestione degli ecosistemi esta conoscendo un enorme sviluppo in risposta alle difficoltà di sostenibilità ambientale. Un bioindicatore può essere definito come una qualsiasi reazione del comparto biologico, a diversi livelli di organizzazione biologica, utilizzabile per scopi pratici nelle fasi di conoscenza, controllo, prevenzione e gestione dell'ambiente (Nicolai, 1992). Si definiscono bioindicatori “ ... tutti quegli organismi che mediante reazioni identificabili (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, ecc.) forniscono informazioni sulla qualità dell'ambiente (o di una parte di esso)”. La bioindicazione si basa su diverse scale di intervento, da livello molecolare a livello di ecosistema: dalle variazioni di parametri biochimici, fisiologici e comportamentali, al bioaccumulo di contaminanti, fino alla presenza/assenza di specie e a modificazioni nella struttura delle comunità (Bargagli et al., 1998).

Una volta individuato il bioindicatore (o l'indice) bisogna mettere a punto una metodologia che sia in grado di fornire informazioni originali, applicabili possibilmente su un vasto territorio e che risponda ai seguenti requisiti (Ghetti, 2002):

1. rappresentatività - l'indicatore o l'indice deve essere in grado di rappresentare una relazione funzionale ben definita con il fenomeno da studiare;

2. riproducibilità - la misura deve essere riproducibile;
3. sensibilità - deve rilevare con adeguata precisione le variazioni del fenomeno;
4. generalizzabilità - possibilità di essere facilmente applicato in modo comparabile, da operatori diversi, in ambienti simili;
5. utilità - un buon bioindicatore o indice biologico deve essere utile alla politica ambientale (diagnosi, controllo, prevenzione);
6. comprensibilità - deve fornire informazioni che siano traducibili in una scala di valori di comprensione universale (politici, amministratori, legislatori);
7. accessibilità - deve poter essere applicato e richiedere procedure e strumentazioni accessibili e ad un costo congruo.

Tra le varie tipologie di bioindicatori prendiamo in considerazione gli indicatori di bioaccumulo, ovvero quegli organismi che sono in grado di accumulare i contaminanti dall'ambiente concentrandoli nei loro tessuti. Tra i principali vantaggi offerti dalla loro analisi, vi è la possibilità di ottenere un'immagine integrata nel tempo del tipo e livello di inquinamento presente e di poter stimare la reale biodisponibilità dei contaminanti. Quest'ultima indicazione è fondamentale sia per effettuare valutazioni di impatto biologico che per stimare possibili rischi di tipo tossicologico con implicazioni dunque anche sulla tutela della salute pubblica.

Se la caratteristica fondamentale dell'indicatore di bioaccumulo è quella di poter accumulare i contaminanti in funzione della loro concentrazione nell'ambiente, va precisato come non tutti gli organismi, anche se analizzati chimicamente, diano indicazioni di qualità ambientale: vi sono infatti alcuni requisiti indispensabili affinché una specie possa essere definita un indicatore di bioaccumulo:

- tolleranza agli inquinanti oggetto di indagine
- capacità di accumulare per mancanza di meccanismi di regolazione
- ampia distribuzione nell'area di indagine
- scarsa mobilità (organismo sessile o sedentario)
- ciclo vitale possibilmente lungo
- uniformità genetica (evitare popolazioni che hanno sviluppato forme di resistenza)

Tra questi il più importante è senza dubbio la mancanza di meccanismi di regolazione delle concentrazioni corporee dei contaminanti. La letteratura offre molti esempi di organismi (es. crostacei decapodi) (Phillips & Rainbow, 1989) che sono in grado di regolare le concentrazioni di metalli essenziali e non danno pertanto alcuna

indicazione sulla biodisponibilità ambientale di questi elementi i cui livelli corporei sono mantenuti costanti anche al variare delle concentrazioni ambientali. Altre specie per motivi assolutamente naturali, presentano valori basali di certi metalli eccezionalmente alti rispetto a quelli misurati in altri organismi (es. vanadio negli ascidiacei) (Phillips & Rainbow, 1989) La presenza di alti valori basali, che non deve essere confusa con forme di contaminazione ambientale, rende ovviamente inutile l'impiego di queste specie per evidenziare variazioni spazio-temporali dei livelli di queste sostanze.

Un'altra caratteristica importante affinché una specie possa essere utilizzata come indicatore di bioaccumulo è che si tratti di un organismo sessile o sedentario poiché in questo caso può essere considerato rappresentativo dell'area di campionamento. Analisi effettuate su specie in grado di compiere ampi spostamenti danno risultati che sono di difficile interpretazione in quanto derivano dall'interazione dei fattori spazio e tempo.

La specie indicatrice deve essere tollerante oltre che ad elevate concentrazioni ambientali di contaminanti anche ad elevate fluttuazioni di parametri chimico-fisici (specie euriecia). Deve avere un'ampia distribuzione geografica affinché si possano effettuare confronti tra zone diverse; deve inoltre essere diffusa, facile da identificare e campionare, in grado di fornire una biomassa consistente per l'analisi chimica

Molti molluschi bivalvi, ed in primis i mitili, sono sicuramente gli organismi più utilizzati nei programmi di monitoraggio ambientale a livello mondiale in quanto possiedono tutte le caratteristiche che li rendono idonei come indicatori di bioaccumulo. Infatti non hanno meccanismi di regolazione che possano limitare l'accumulo nei tessuti di sostanze inquinanti ed anche l'efficienza dei sistemi metabolici in grado di biotrasformare molecole organiche è piuttosto limitata in questi organismi. In considerazione poi della loro strategia alimentare filtrano grossi volumi d'acqua e possono concentrare nei propri tessuti le sostanze presenti nell'acqua e nel particolato fornendo un'immagine integrata nel tempo dei livelli ambientali di molte classi di contaminanti tra cui metalli e POPs. Sono inoltre facilmente reperibili negli habitat da studiare, ampiamente distribuiti, molto spesso hanno un'importanza economico-commerciale come risorsa alimentare nell'ambito della pesca e dell'acquacoltura e sopravvivono anche in presenza di concentrazioni relativamente alte di contaminanti (Bryan et al., 1985).

Sono impiegati a livello internazionale per misurare i livelli di inquinamento e gli effetti dei contaminanti sugli organismi. Molte specie di molluschi appartenenti alla classe Bivalvia, sono utilizzati come organismi sentinella non solo in indagini di bioaccumulo, ma anche per l'identificazione di condizioni di stress ambientale tramite l'impiego di biomarker generici quali il test della sopravvivenza in aria e il test di infossamento e specifici quali, ad esempio, le metallotioneine (Nesto et al., 2004, 2007).

Nell'ambito degli studi di bioaccumulo, i molluschi bivalvi possono essere utilizzati secondo due diverse strategie, di biomonitoraggio passivo o attivo. Il **biomonitoraggio passivo** prevede l'utilizzo di organismi nativi, ovvero prelevati nel sito di indagine e portati in laboratorio, dove vengono preparati per l'analisi. Questo tipo di indagine prevede la predisposizione di un reticolo di campionamento che copre l'intera area ipoteticamente impattata da contaminanti; implica inoltre che l'indicatore sia uniformemente distribuito nell'area di indagine e che sia identificabile un sito di controllo, all'interno o all'esterno dell'area di indagine. Il **biomonitoraggio attivo**, invece, prevede l'utilizzo di organismi trapiantati, provenienti da una popolazione non stressata e priva di parassiti, prelevata in un'area a basso livello di contaminazione.

Per effettuare uno studio di bioaccumulo utilizzando molluschi bivalvi è comunque necessario selezionare un bioindicatore rappresentativo dell'area di indagine, appropriato per il comparto di interesse e per i contaminanti target.

Hanno grande facilità di reperimento soprattutto le specie sedentarie che si possono trovare in forme gregarie permanentemente ancorate a substrati (es. *Ostrea spp*, *Crassostrea spp.*), in forme gregarie ancorate attraverso il bisso e parzialmente mobili (es. *Mytilus spp.*) o infaunali che si infossano sia in sedimenti acquatici interni (es. *Anodonta sp.*) sia in sedimenti marini ed estuarini (es. *Cerastoderma edule*, *Tapes spp.*)

2.2.1 Protocollo Mussel watch

L'impiego dei molluschi bivalvi nel monitoraggio della contaminazione chimica degli ambienti costieri è, da decenni, utilizzato sia negli Stati Uniti sia in numerosi Paesi europei. Con il D. Lgs. 152/2006 del Ministero dell'ambiente e Tutela del Territorio (http://www.bosettiegatti.eu/info/norme/statali/2006_0152.htm) il Mussel watch è oramai riconosciuto anche in programmi nazionali. Il Mussel Watch è un

approccio metodologico, introdotto negli anni '70 da Goldberg (Goldberg, 1975), da anni utilizzato nell'ambito di programmi internazionali di monitoraggio (Phillips e Segar, 1986). I principali vantaggi offerti da un programma di monitoraggio condotto mediante l'utilizzo di bioaccumulatori si possono riassumere di seguito:

- la valutazione del grado di contaminazione dell'area considerate secondo una misura "integrata nel tempo" e non riferibile, quindi, al solo momento in cui è stato effettuato il prelievo,
- la possibilità di evidenziare facilmente gradienti di inquinamento sia in senso spaziale che temporale,
- la stima della "biodisponibilità" delle sostanze tossiche presenti nell'ambiente marino
- la valutazione del rischio legato al trasferimento di questi elementi attraverso le catene alimentari.

Anche in Laguna di Venezia si è fatto largo impiego di *M. galloprovincialis* per studiare il bioaccumulo di microinquinanti organici e inorganici come documentato nella review di Losso & Volpi Ghirardini (2010) e nel mio lavoro di tesi triennale all'Università Cà Foscari di Venezia (Montella, 2018). Si evince che questo approccio metodologico richiede necessariamente anche l'integrazione di indici di condizione in grado di definire lo stato delle popolazioni in esame identificando indici affidabili e proponibili nei diversi ambiti applicativi sia il biomonitoraggio sia l'acquacoltura (Montella , 2018).

2.3 La biodisponibilità ed il processo di bioaccumulo

Con il termine biodisponibilità ci si riferisce alla "disponibilità di una sostanza all'assunzione (uptake) da parte degli organismi". Con "**biodisponibile**" si indica la frazione di una data sostanza chimica, presente in uno specifico comparto ambientale (acqua, sedimento) che è disponibile o è potenzialmente disponibile per l'assunzione da parte del biota, in quelle particolari condizioni ambientali (stato di ossidazione, pH, temperatura), per assunzione diretta sia dall'ambiente abiotico sia dal cibo.

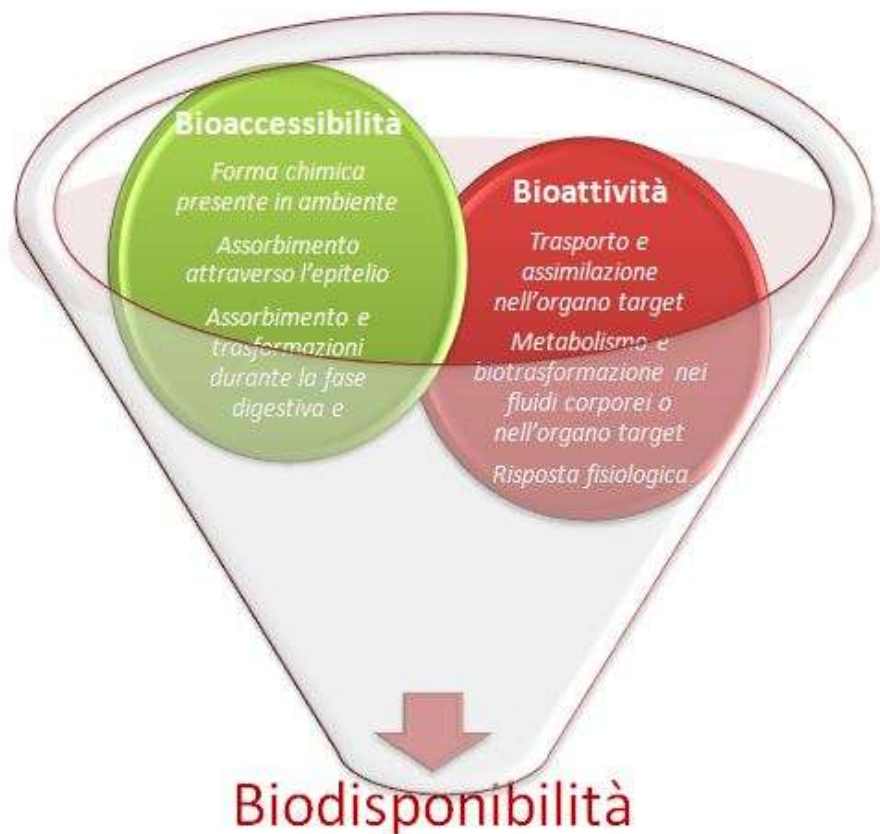


Figura 10 La biodisponibilità può essere vista come la combinazione di due concetti distinti. Fonte: Slide della lezione del Prof. Picone Corso di Ecotossicologia marina.

La biodisponibilità (Figura 10) è quindi un processo dinamico, complesso, che dipende da molti parametri, abiotici e biotici. Concettualmente, può essere vista come la combinazione di due concetti distinti (Anderson and Hillwalker, 2008):

- Bioaccessibilità: incorpora i processi chimico-fisici che avvengono nell'ambiente, che definiscono la “*disponibilità ambientale*” dei contaminanti, e i processi di uptake fisiologico, che definiscono la “*biodisponibilità ambientale*”. È la frazione della quantità totale di una sostanza che viene effettivamente assunta da un particolare organismo in funzione delle vie di esposizione, di assunzione e dei meccanismi di regolazione (inclusa la capacità di mobilitare il contaminante una volta ingerito).
- Bioattività (Biodisponibilità tossicologica): considera invece la distribuzione dei contaminanti internamente all'organismo ed i processi metabolici (inclusi biotrasformazione ed eliminazione).

La biodisponibilità è quindi condizione necessaria affinché un contaminante bioaccumuli ed è funzione di:

1. proprietà intrinseche del contaminante
2. proprietà intrinseche dell'organismo
3. condizioni ambientali in cui avviene l'interazione tra contaminante ed organismo

Alla luce di queste considerazioni, gli organismi esposti alla presenza dei contaminanti possono risentire degli effetti tossici se:

- se questi sono bioaccessibili, ovvero presenti in forme che possono essere assimilate dagli organismi superando la barriera epiteliale e la barriera gastrica;
- se i contaminanti sono bioattivi, ovvero raggiungono gli organi target a concentrazioni sufficienti ad alterare il metabolismo.

Il bioaccumulo può essere sinteticamente definito come l'accumulo netto di un contaminante in un organismo, risultante dalle fasi di uptake dall'ambiente, biotrasformazione/detossificazione ed eliminazione dei contaminanti. In particolare, con bioaccumulo ci si riferisce all'accumulo di contaminante derivante da tutte le potenziali fonti, incluse l'acqua, l'aria, la fase solida, l'alimento.

Prima però che si inneschi il processo di bioaccumulo è necessario che l'organismo indicatore sia esposto alla presenza dei contaminanti (Figura 11). Con "esposizione" quindi si identifica il processo di contatto tra indicatore e contaminanti, ovvero l'insieme delle vie attraverso cui gli organismi entrano in contatto con i contaminanti: attraverso il contatto con acque contaminate, attraverso l'ingestione di cibo o sedimento contaminato.

Modello di bioaccumulo in un mitilo

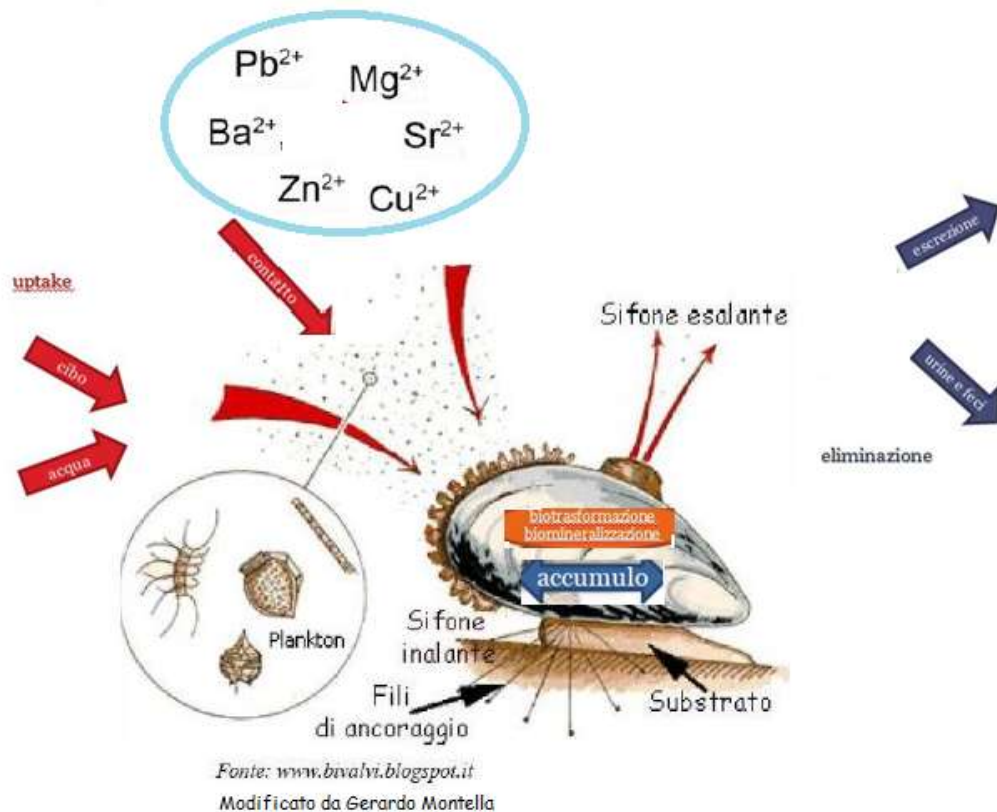


Figura 11 Modello di bioaccumulo in un mitilo Fonte:www.bivalvi.blogspot.it (modificato da G. Montella).

L'uptake (assimilazione) è la fase in cui i contaminanti entrano nell'organismo. Questo avviene, in generale, per:

- contatto con membrane e superfici corporee (branchie, tegumento, cornee, etc)
- ingestione di acqua, suolo e sedimento (esofago, stomaco, intestino, branchie)
- ingestione di cibo contaminato (stomaco, intestino, epatopancreas, fegato)

Il processo di uptake inizia con l'interazione tra il contaminante e la superficie delle cellule con cui entra in contatto (adsorbimento) a livello di derma, apparato digerente e/o apparato respiratorio. **L'adsorbimento è il meccanismo tramite cui i contaminanti entrano in contatto con le cellule.** In seguito all'adsorbimento sulla superficie della membrana cellulare, per entrare nella cellula il contaminante deve riuscire a superare la membrana stessa.

Meccanismi di uptake coinvolgono principalmente tre vie di trasporto: la via dei lipidi, la via dell'acqua e la via dei solidi. I possibili meccanismi coinvolti nella fase di uptake includono (Simkiss, 1998):

1. diffusione attraverso il doppio strato fosfolipidico (*via dei lipidi*)
2. diffusione attraverso i canali, diffusione facilitata e trasporto attivo (*via dell'acqua*)
3. endocitosi (solidi) Per piante e batteri l'endocitosi non è una forma significativa perché le cellule sono dotate di una parete cellulare che non consente l'endocitosi e pinocitosi (liquidi).

La *via dei lipidi* prevede il passaggio di contaminanti lipofilici attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana plasmatica (ad es. benzene, metilmercurio, organostannici). È un processo limitato dalle dimensioni delle molecole. Anche piccole molecole, polari ma non cariche come CO₂, glicerolo, NH₃ e H₂O possono diffondere attraverso la membrana.

La *via dell'acqua* prevede l'utilizzo di proteine di trasporto tra cui:

Porine: proteine non specifiche che delimitano i pori di membrana, attraverso cui fluiscono acqua, ioni e molecole idrofile.

Canali ionici: proteine selettive per anioni e cationi, che si attivano in risposta a segnali di tipo chimico (legami su sito attivo), elettrico (variazioni di potenziale di membrana) o fisico (cambiamento nella forma della membrana).

Questi due primi processi sono passivi, secondo gradiente, regolato da differenze di pressione idrostatica od osmotica. Coinvolge ioni e molecole a basso peso molecolare (200-300 Da), idrofile che riescono ad attraversare la membrana in corrispondenza di questi passaggi.

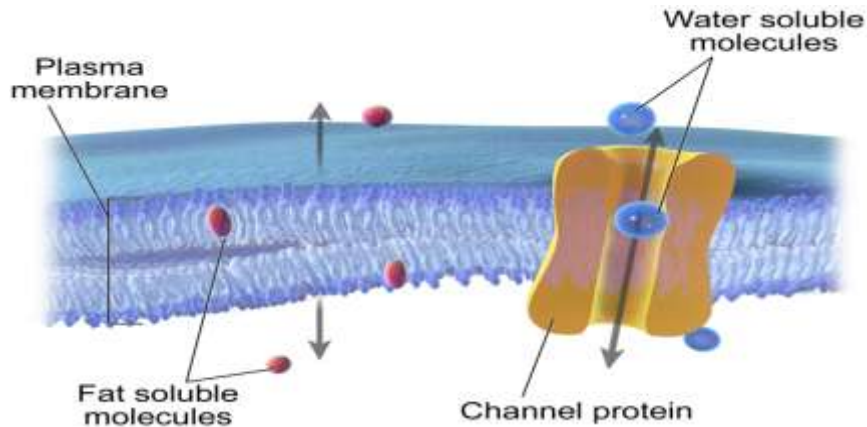


Figura 12 Esempio di porina nella membrana plasmatica Fonte: Slide della lezione Prof. Picone Corso di Ecotossicologia marina.

Canali ionici chiusi: sono tipologie particolari di canali ionici che rispondono a stimoli di natura chimica e fisica. I neuroni e le cellule muscolari possiedono canali che si aprono o chiudono in risposta al mutamento delle cariche della membrana plasmatica (ion gated channels). Alcuni canali sono controllati dalla luce, si aprono dopo aver assorbito fotoni, consentendo il passaggio di cationi. La diffusione attraverso canali chiusi coinvolge ioni e piccole molecole (fino a 600 Da)

Proteine carrier: regolano il trasporto selettivo di molecole attraverso la membrana. Hanno siti di legame in grado di riconoscere la molecola che deve essere trasportata. Accelerano il processo di trasporto, agiscono selettivamente e sono riciclate. Il trasporto richiede l'impiego di proteine carrier ma avviene secondo il gradiente elettrochimico (non richiede energia). È un meccanismo di trasporto più veloce rispetto alla diffusione semplice; la sostanza tossica riesce ad entrare per complementarità con il carrier. Esistono diverse proteine trasportatrici coinvolte nel trasporto facilitato attraverso i canali chiusi:

- carrier di una specifica molecola o ione (*uniporto*)
- carrier che trasporta una specifica molecola ed uno ione nella stessa direzione (*simporto*)
- carrier che scambia una molecola e uno ione, nella direzione opposta (*antiporto*)
- canali chemio-dipendenti da molecole
- canali voltaggio-dipendenti

Pompe di membrana: espellono in modo attivo e specifico gli ioni, contrastandone il flusso passivo (pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ negli assoni e pompa $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasi}$). Il trasporto avviene contro gradiente di concentrazione e richiede un carrier ed energia (consumo di ATP). Il carrier presenta un sito di legame specifico per la molecola o elemento da trasportare. Se una sostanza tossica presenta forma affine a quella del target, entra in competizione con esso ed entra nella cellula (caso di Pb^{2+} con carrier di Ca^{2+} nell'intestino).

I passaggi attraverso porine, canali ionici aperti e chiusi sono tutti regolati dalla legge di Fick (vedi equazione 1) in quanto processi detti diffusivi. La velocità di diffusione attraverso la membrana dS/dt , ossia il movimento del soluto nell'unità di tempo, è in rapporto col gradiente di concentrazione dC/dX tra l'ambiente esterno ed interno della membrana. Sono quindi soggetti a “saturazione”.

D = coefficiente di diffusione

A = area della sezione in cui avviene la diffusione

Equazione 1: Legge di Fick regola i passaggi attraverso porine, canali ionici aperti e chiusi .

S = concentrazione di soluto

t = tempo

C = concentrazione

X = distanza

$$\frac{dS}{dt} = -DA \frac{dC}{dX}$$

Infine, la *via dei solidi* prevede l'endocitosi, la fagocitosi o la pinocitosi: avviene mediante l'invaginazione della membrana cellulare nella zona a contatto con la molecola. Si distingue in **fagocitosi** (nel caso di particellato solido) e **pinocitosi** (nel caso di liquidi). Sono meccanismi impiegati da virus, particelle di silice, metalli in forma particolata e nanometalli.

Distribuzione

Una volta superate le barriere (epiderma, barriera gastrica), i contaminanti possono diffondersi nell'organismo. La distribuzione di un contaminante all'interno di un organismo, fino agli organi e ai tessuti bersaglio, avviene attraverso il sistema circolatorio o l'emolinfa. Il processo dipende dalla velocità e dalla *pressione di perfusione* del sangue o dell'emolinfa in quell'organo, ma anche dall'*affinità* per il tessuto target. Nelle piante il trasporto avviene attraverso xilema e floema. Organi e tessuti ricchi in lipidi costituiscono siti di deposito per le sostanze maggiormente lipofile (PCB, PCDD, DDT e altri pesticidi) come ad esempio: membrane cellulari, tessuto adiposo (adipociti), sistema nervoso ed organi riproduttivi.

Una volta all'interno dell'organismo o dell'organo target, il contaminante può incorrere in processi di trasformazione mediati da sistemi biochimici, che ne possono modificare la struttura. L'obiettivo è:

- velocizzare l'eliminazione (ad esempio aumentandone l'idrosolubilità)
- detossificazione (trasformazione in metabolita non tossico)
- sequestro (produzione di metallotioneine o granuli di stoccaggio)
- redistribuzione
- attivazione (trasformazione in un metabolita tossico)

Biotrasformazione è comunque un termine che più correttamente si dovrebbe applicare ai soli organici, tuttavia i metalli stessi possono essere soggetti a trasformazioni di sorta che ne consentono l'eliminazione o il sequestro:

- **Biometilazione:** batteri adattati agli ambienti ricchi in metalli, sono in grado di aggiungere gruppi metilici (-CH₃) o etilici (-CH₂CH₃) agli ioni metallici. Hg metallico viene convertito in MeHg(II) grazie all'azione di un agente metilante, la metilcobalamina (MeCbl) che reagisce con Hg(II) in H₂O metilando il metallo (*transmetilazione*) La biometilazione di As è importante nei produttori primari: As³⁺ e As⁵⁺ negli organismi marini e nel fitoplancton sono trasformati per metilazione in acido monometilarsonico e acido monometilarsenioso e successivamente in acido dimetilarsinico e dimetilarsenioso. È un processo molto importante perché le forme dimetilate sono rapidamente escrete. La loro tossicità è oggetto di recente revisione (De Pol & Argese, 2010)

- **Biom mineralizzazione**: alcuni metalli possono essere incorporati nelle conchiglie, negli esoscheletri calcarei o nelle ossa (Pb, Cd, ed alcuni radionuclidi). I metalli possono essere anche inclusi in **granuli intracellulari** stoccati all'interno di alcuni organi target (intestino, epatopancreas, reni, tubuli Malpighiani).
- **Produzione di metallotioneine**: proteine citoplasmatiche a basso PM (7000 Da), costituite per circa il 25-30% da cisteina (ricca in zolfo), in grado di chelare 6-7 atomi di metallo per molecola. Sono normalmente coinvolte nell'omeostasi dei metalli: in presenza di elevata concentrazione di questi nel citoplasma, la loro produzione aumenta per sequestrare i metalli e prevenirne l'interazione con componenti cellulari. Sono inducibili da metalli come Cd, Cu, Hg e Zn e dagli altri metalli di classe "b" e intermedi. Sono un importante biomarker per rilevare l'esposizione a metalli. Tuttavia, elevate concentrazioni di metalli ne possono inibire la produzione (proteine analoghe sono presenti anche nelle piante, note come fitochelatine).

Eliminazione senza trasformazione: alcuni metalli sono chelati da leganti presenti nel citoplasma (i.e. malato e citrato) e predisposti per l'immediata eliminazione senza intervento di processi di trasformazione (meccanismo attivo presente, ad esempio, nel plasma di alcuni crostacei).

CAPITOLO 3 – STRATEGIE DI DETOSSIFICAZIONE DI PB E CD NEI BIVALVI

3.1 Biomineralizzazione

La biomineralizzazione è il processo mediante il quale gli organismi viventi acquisiscono la capacità di accumulare minerali nei tessuti. Le conchiglie sono l'esoscheletro biomineralizzato dei molluschi marini prodotto dal mantello, ma il meccanismo con cui viene prodotto il guscio ad oggi non è del tutto compreso (Cardoso et al., 2020). È noto che nei molluschi esistono fattori regolatori della mineralizzazione: in *M. galloprovincialis* è stato trovato un sistema di regolazione simile alla calcitonina dei vertebrati (CALC), che probabilmente condivide un'ascendenza comune con il sistema omologo dei vertebrati, ma si è evoluto sotto una pressione diversa (Cardoso et al., 2020). Nei vertebrati la mineralizzazione è controllata da CALC, un ormone ipocalcemico che funziona per ridurre i livelli di calcio nel plasma, e dall'ormone paratiroideo (PTH), un ormone ipercalcemico che limita i tenori di Calcio nel sangue. Questi ormoni agiscono sui tessuti target legandosi a recettori specifici definiti CALCR e PTHR. Nei molluschi, omologhi dei recettori CALCR sono stati rilevati in alcune specie e la loro espressione nel mantello li ha identificati come possibili fattori regolatori per la mineralizzazione del guscio. Tuttavia, il loro coinvolgimento diretto nella produzione della conchiglia non è certo, ed ulteriori ricerche sono necessarie in questo campo. Una nuova proteina della matrice (teosina) è stata isolata in *Hyriopsis cumini*. L'analisi dell'espressione genica ha mostrato che la teosina è espressa principalmente nel mantello e nel sangue. L'espressione di tale proteina durante la formazione della perla ha indicato chiaramente la sua partecipazione alla biomineralizzazione dello strato madreperlaceo (Jin et al., 2020).

Biomineralizzazione del Piombo

Nello studio di Moura et al. (2000) finalizzato a studiare i processi di biomineralizzazione nel bivalve *Anodonta cygnea*, si evince che i fluidi biologici, emolinfa e fluido extrapalleale, rappresentano una componente fondamentale per l'intero processo, perché è stato accertato che la struttura calcificata derivi dai materiali presenti in questi fluidi, che comprendono, oltre ai componenti necessari alla biomineralizzazione come ad esempio le proteine (es. glucosamina), Ca e i carbonati, anche metalli in tracce tra cui Pb, Cd, Cr, Zn, e Cu. In questa specie Pb, insieme allo Zn e Cr, genera disfunzioni dell'attività metabolica, e quindi ad attivare meccanismi di mineralizzazione. Un modello di come Pb possa essere incorporato nelle strutture biologiche dei bivalvi è fornito da uno studio sull'incorporazione di oligoelementi nei gusci di vongola filippina (*Ruditapes philippinarum*) (Zhao et al. 2017). Il Ca^{2+} dall'acqua di mare è trasportato nel fluido calcificante in gran parte attraverso vie intracellulari (Ca^{2+} -ATPasi e canali Ca) e in parte tramite via intercellulare (per diffusione passiva). Ioni metallici bivalenti come Cu^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} vengono quindi assorbiti dai bivalvi attraverso le stesse vie intracellulari del Ca^{2+} (Figura 13), mentre la diffusione passiva intercellulare è considerata predominante per il trasporto di Mg^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} (Zhao et al.,2017). Inoltre, la biodisponibilità delle forme libere di Cu, Zn, Ba e Pb in acqua di mare è altamente dipendente dal pH, quindi con la diminuzione del pH dell'acqua di mare aumentano le concentrazioni dei loro ioni liberi (Millero et al., 2009).

Molti studi hanno rilevato la grande capacità dei molluschi di incorporare Pb nelle loro conchiglie. Yap and Cheng (2013) hanno rilevato nei gusci di *Nerita lineata* concentrazioni di Pb superiori a quelle presenti nei sedimenti circostanti, mentre Dar et al. (2018) hanno rilevato la grande abilità di *Cardium papyraceum* concentrazioni di Pb comprese tra 24.39 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 32.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ con fattori di biomineralizzazione (BMF)¹ rispetto al sedimento compresi tra 0.92 e 2.16 (Figura 14 e Figura 15).

$$BMF = \frac{\text{metallo}_{[\text{conchiglia}]}}{\text{metallo}_{[\text{sedimento}]}} \quad (\text{Gobas et al.}, 2000)$$

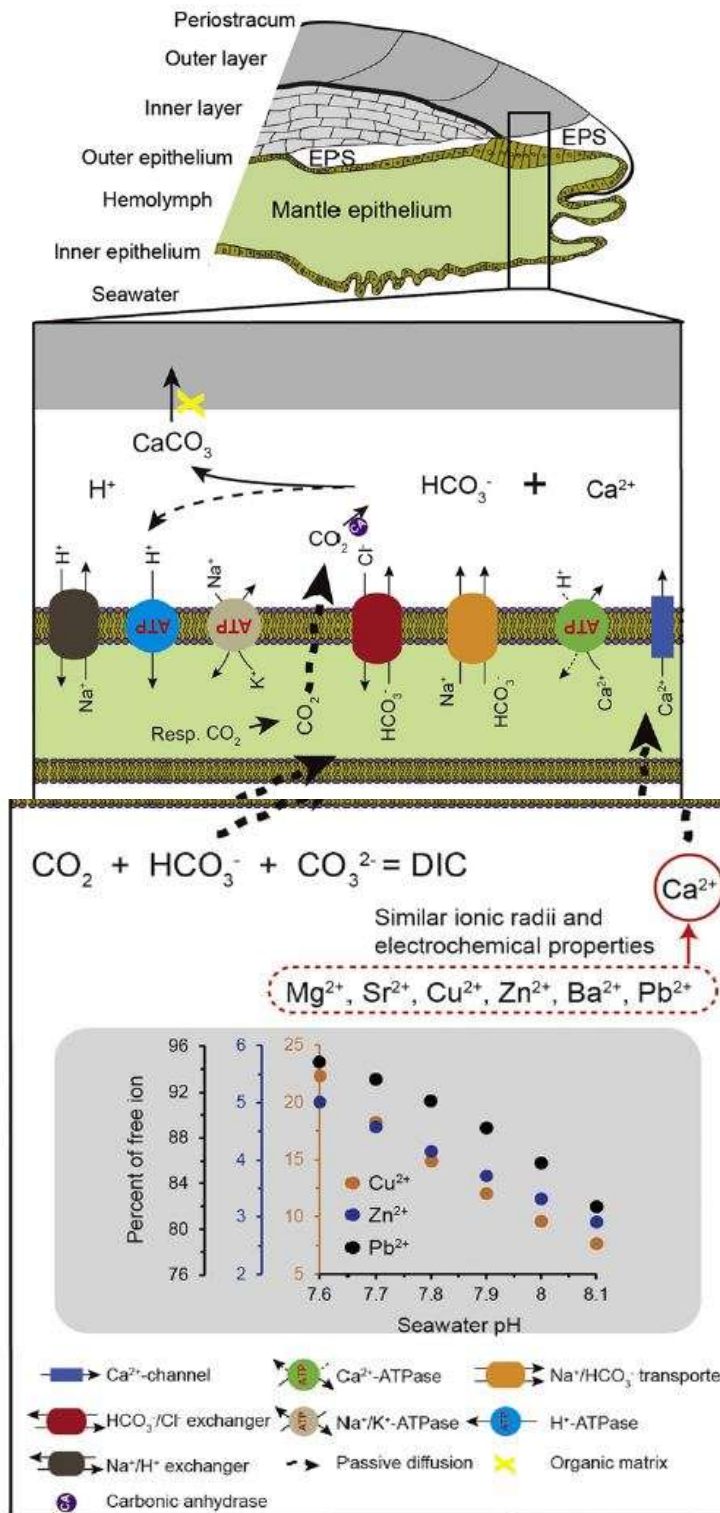


Figura 13: In questo modello schematico si nota la presenza di metalli pesanti vicarianti al calcio. Gli ioni bivalenti Cu²⁺, Zn²⁺ e Pb²⁺ vengono assorbiti dai bivalvi attraverso vie intracellulari del Ca²⁺ (Fonte: Zhao et al.,2017).

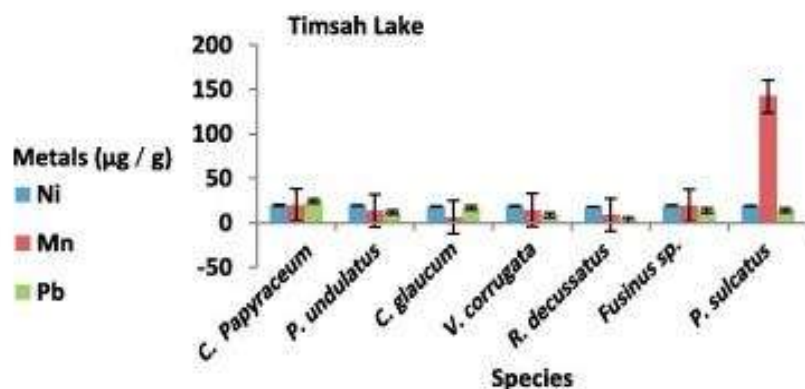


Figura 14: La media \pm SE dei contenuti mineralizzati di Ni, Mn e Pb nei gusci dei molluschi del lago Timsah (Fonte: Dar et al., 2018)

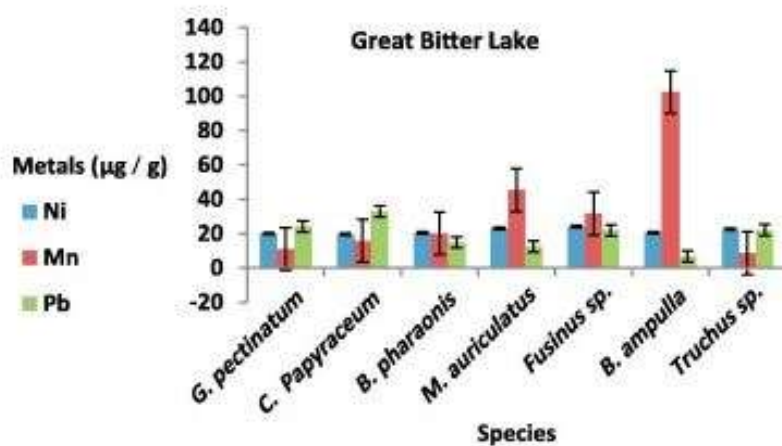


Figura 15: La media \pm SE dei contenuti mineralizzati di Ni, Mn e Pb nei gusci dei molluschi del Great Bitter Lake. (Fonte: Dar et al., 2018).

Biomineralizzazione del Cadmio

Studi condotti su diversi molluschi bivalvi raccolti nel Grande Lago Amaro e nel Lago Timsah (Egitto), hanno consentito di capire come specie diverse tendano ad accumulare in maniera differenziata Cd nei gusci (Dar et al. 2018). Non tutte le specie biomineralizzano allo stesso modo Cd, infatti il Mytilidae *Brachidontes pharaonis* ha mostrato il BMF più alto per il Cadmio (2.3) mentre il Cardidae *Cardium papyraceum* ha mostrato valori decisamente più bassi (0.94), ma che comunque sono indicativi di stoccaggio preferenziale di Cd nelle valve. Altre specie, nei medesimi laghi, hanno registrato un accumulo di Cd nei loro gusci inferiore all'unità ($<1.00 \mu\text{g/g}$) con rapporti BMF_M significativamente bassi. Si deduce che le variazioni registrate nei rapporti BMF_M tra le diverse specie accertano la probabilità di selettività alla mineralizzazione dei metalli pesanti in funzione delle condizioni locali molto più della biodisponibilità dei metalli pesanti (Dar et al., 2018)

(Figure: 16,17,18).

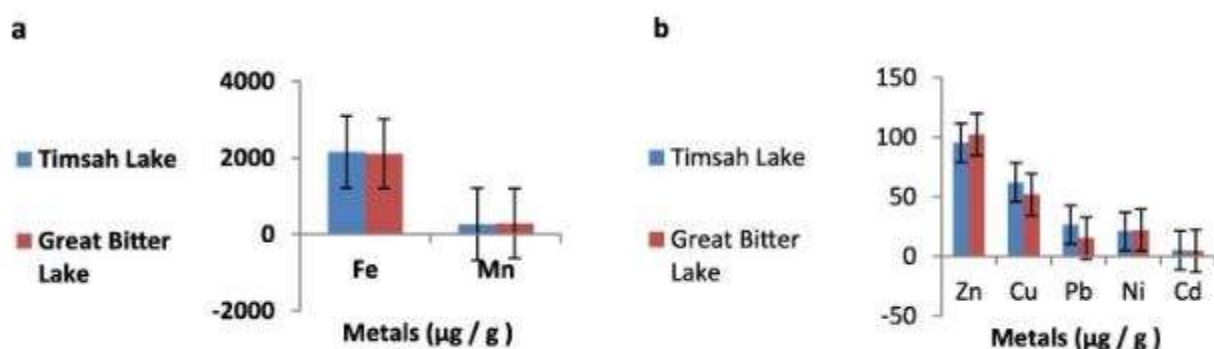


Figura 16: (a e b): Media \pm SE dei contenuti di metalli biodisponibili nelle frazioni totali del sedimento ($< 0.063 \text{ mm}$) nei laghi Timsah e Great Bitter (Fonte: Dar et al., 2018).

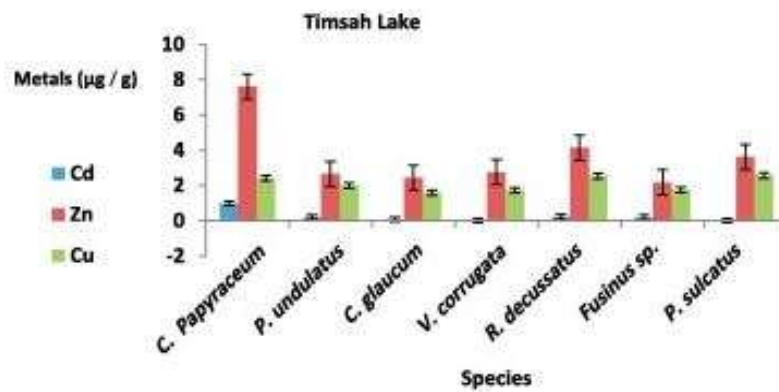


Figura 17: Grafico m La media \pm SE dei contenuti mineralizzati di Cd , Zn e Cu nei gusci dei molluschi del lago Timsah (Fonte: Dar et al., 2018).

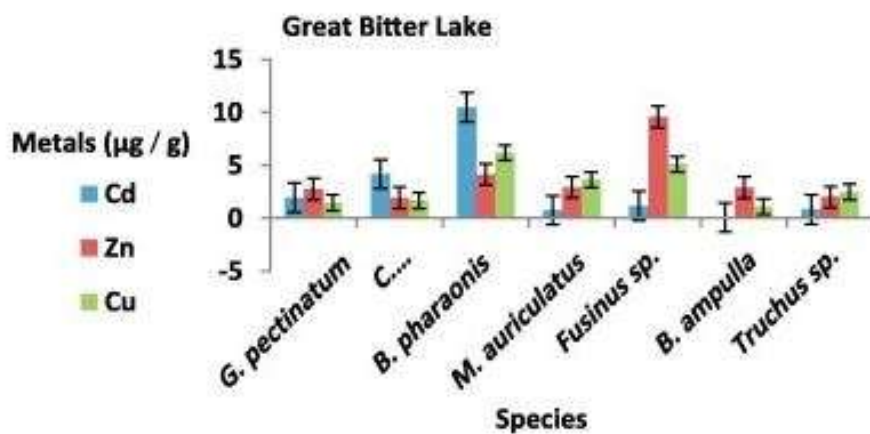


Figura 18: La media \pm SE dei contenuti mineralizzati di Cd , Zn e Cu nei gusci dei molluschi del Great Bitter Lake (Fonte: Dar et al., 2018).

In ambienti di acqua dolce come i laghi, dove la concentrazione del Ca^{2+} è relativamente bassa rispetto agli ambienti di acqua salata come gli oceani, l'assorbimento del calcio negli Unionidi è principalmente un trasporto attivo. Lo ione Cd^{2+} si accumula nei tessuti e nei fluidi dei bivalvi d'acqua dolce e sposta i meccanismi di assorbimento, trasporto e regolazione dello ione Ca^{2+} (Machado et al., 2011). Questo ione tossico influenza l'equilibrio acido-base che è fondamentale per l'omeostasi di Ca inibendo l'anidraasi carbonica e favorendo un effetto acidosi generale.

Inoltre, il metabolismo energetico è fortemente attivato per il funzionamento dei meccanismi di detossificazione che consumano le riserve di glicogeno e potenzia un aumento dell'effetto acidosi. Questa acidosi interna influenzerà le microsferule e favorirà il rilascio di grandi quantità di Ca all'emolinfa e ai fluidi di questi animali. Mentre il contenuto di Ca aumenta nei fluidi, diminuisce nei tessuti man mano che i siti di uptake di Ca vengono bloccati dagli ioni Cd^{2+} , interrompendo il normale funzionamento cellulare. Inoltre, Cd blocca leggermente la pompa protonica sulla barriera apicale dell'OME (epitelio del mantello esterno), che dovrebbe indurre un'alcalosi nel compartimento del guscio (Antunes et al. 2002). Di conseguenza, la calcificazione del guscio sarà influenzata in misura maggiore a causa dei gradienti elettrochimici tra l'emolinfa e i compartimenti del guscio che, insieme a una ridotta secrezione di proteine del guscio, porteranno a un guscio estremamente irregolare e fragile (Machado et al., 2011).

Come mostrato in Figura 19 da sinistra, Ca^{2+} viene attivamente pompato all'interno del corpo attraverso le branchie o gli epitelii intestinali per essere immagazzinato nelle sferule di Ca^{2+} in una situazione di lieve alcalosi. Questa situazione è inibita da Cd. A destra, gli eventi di calcificazione (gusci adulti e larvali) sono innescati da un evento di acidosi che rilascia calcio dai suoi depositi. Questi eventi sono promossi dagli ioni Cd^{2+} anche se in modo caotico e disorganizzato.

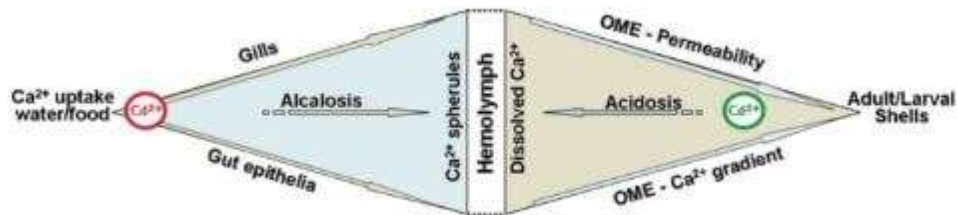


Figura 19: Assorbimento, trasporto e stoccaggio del calcio e biomineralizzazione del guscio di *Anodonta* spp. (Fonte: Machado et al., 2011).

3.1.1 Conchiglia

In natura, le conchiglie dei molluschi si trovano in grandi varietà di forme: ci sono conchiglie equivalve con valve destra e sinistra uguali, conchiglie inequivalve con valva destra diversa dalla sinistra, conchiglie equilaterali con parte anteriore delle valve dimensionalmente uguale alla posteriore e conchiglie inequilaterale con parte anteriore delle valve diversa (solitamente più piccola) della posteriore.

Nel caso del mitilo le conchiglie sono costituite da due valve simmetriche di forma quasi triangolare di colore nero e bluastro. Sono separate dai corrispettivi lobi del mantello con la funzione di proteggere i tessuti molli. Sulla parte esterna delle valve si notano delle linee concentriche di forma ovale: sono le strisce di accrescimento che determinano una sorta di quaderno biochimico. Le valve unite dal legamento e da una cerniera sono costituite da una matrice organica formata da proteine, mucopolissacaridi e cristalli di carbonato di calcio (CaCO_3), generalmente sotto forma di calcite o aragonite. Il legamento è fissato ai bordi dorsali delle valve e grazie alla sua elasticità determina l'apertura delle valve, invece i muscoli adduttori inseriti perpendicolarmente rispetto alle valve, si oppongono all'azione meccanica del legamento e chiudono la conchiglia.

Il periostraco, lo strato più esterno della conchiglia, è costituito da un insieme di proteine che prendono il nome di conchiolina. Questo strato protegge il CaCO_3 sottostante, l'ostraco o mesostraco, ovvero lo strato calcareo più esterno, detto anche strato prismatico poiché è formato da prismi esagonali impilati in colonne. Lo strato calcareo più interno è invece detto ipostraco o endostraco ed in questo strato i cristalli di aragonite sono disposti in lamine parallele al mantello. In alcuni bivalvi questo

strato è composto da spessi strati di cristalli tabulari e viene definito nacreo o madreperlaceo. Essi sono caratterizzate dall'aver diverse capacità di resistenza agli stress meccanici (Lowenstam & Weiner, 1989).

Il processo di formazione della conchiglia dei Molluschi coinvolge processi biochimici, cristallografici e fisiologici che determinano la formazione di una struttura altamente ordinata di carbonato di calcio inserita in una matrice organica. Gli ioni calcio e bicarbonato sono utilizzati nella calcificazione e sono trasportati verso il fluido extrapalleale (EPF) attraverso pompe attive e passive. La loro incorporazione nella matrice dipende direttamente dalla concentrazione nell'EPF nel sito di cristallizzazione, concentrazione che è a sua volta controllata dall'emolinfa e dai tessuti del mantello (Puentes et al., 1996; Beer et al., 2011).

3.1.2 La formazione della conchiglia nei bivalvi

La formazione del guscio avviene in due fasi: la prima attraverso processi cellulari di trasporto ionico, sintesi proteica e secrezione, invece la seconda dipende da una serie di processi fisico-chimici in cui i cristalli di CaCO_3 sono nucleati, orientati e crescono in associazione con una matrice organica secreta (Lowenstam, 1981).

Nella prima fase, per fornire il minerale della conchiglia, Ca^{2+} e HCO_3^- vengono prima trasportati attraverso epitelio sulla superficie del corpo e l'epitelio del mantello rivolto verso la superficie del guscio interno. Il movimento di questi ioni non è del tutto noto, ma quasi certamente coinvolge il trasporto attivo di Ca^{2+} .

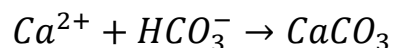
La seconda fase avviene nel fluido tra l'epitelio del mantello esterno e la superficie del guscio interno e su questa superficie del guscio. Affinché i cristalli vengano depositati, sono richieste le seguenti condizioni (1) concentrazioni di Ca^{2+} e HCO_3^{2-} tale da determinare il superamento del prodotto di solubilità, (2) condizioni che favoriscano la nucleazione dei cristalli e (3) l'eliminazione di H^+ risultante dalla formazione di CaCO_3 . Ottenute queste condizioni si ottiene un guscio costituito da una varietà di modelli cristallini. Nel processo la proteina secreta dal mantello circonda i singoli cristalli e diventa il "cemento" che li lega insieme come un guscio (Wilbur et al., 1983).

Oggi, l'approccio biologico alla formazione dei cristalli si sta rivelando molto sorprendente. I Molluschi costruiscono la loro conchiglia usando un gel di seta idrofobo, proteine ricche di acido aspartico molto acido e apparentemente anche una fase precursore amorfa da cui si formano i cristalli. Tutto questo avviene in un quadro

chitinoso altamente strutturato (Addadi et al., 2006). In figura 20 (Li et al., 2016 , Zhao et al. 2017) vi è :

- a. Sezione schematica di un bivalve che indica il bordo della conchiglia e il mantello. IME: epitelio del mantello interno; OME: epitelio del mantello esterno; ISL: strato interno della calotta; OSL: strato esterno del guscio; GL: linea di crescita. iEPS: spazio extrapalleale interno; oEPS: spazio extrapalleale esterno.
- b. Processi semplificati di formazione del guscio. I substrati di calcificazione (Ca^{2+} e DIC) possono diffondersi passivamente attraverso l'IME (epitelio del mantello interno) fino all'emolinfa, da dove diversi trasportatori di ioni nell'OME (epitelio del mantello esterno) possono trasportarli attivamente all'EPS (spazio extrapalleale). Ca^{2+} -ATPasi e canale Ca^{2+} sono responsabili del trasporto di Ca^{2+} ; $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ cotrasportatore e scambiatore $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ per il trasporto di HCO_3^- . Nessun sistema di importazione di CO_3^{2-} è identificato in OME (epitelio del mantello esterno). La CO_2 acquosa proveniente dall'acqua di mare e di origine metabolica si diffonde passivamente nell'EPS (spazio extrapalleale) e si trasforma in HCO_3^- tramite l'idratazione dell'anidrasi carbonica.

Nel sito di calcificazione, CaCO_3 inorganico si deposita attraverso la reazione:



La cristallizzazione di CaCO_3 è diretta dalla matrice organica secreta dall'OME (epitelio del mantello esterno). I prodotti finali (ad esempio, H^+) vengono attivamente escreti attraverso Ca^{2+} -ATPasi, H^+ -ATPasi o lo scambiatore Na^+/H^+ . Durante la formazione del guscio, eventuali impurità nello spazio extrapalleale (ad esempio Na^+ , Cl^-) vengono incorporati nei gusci (Zhao et al. , 2018).

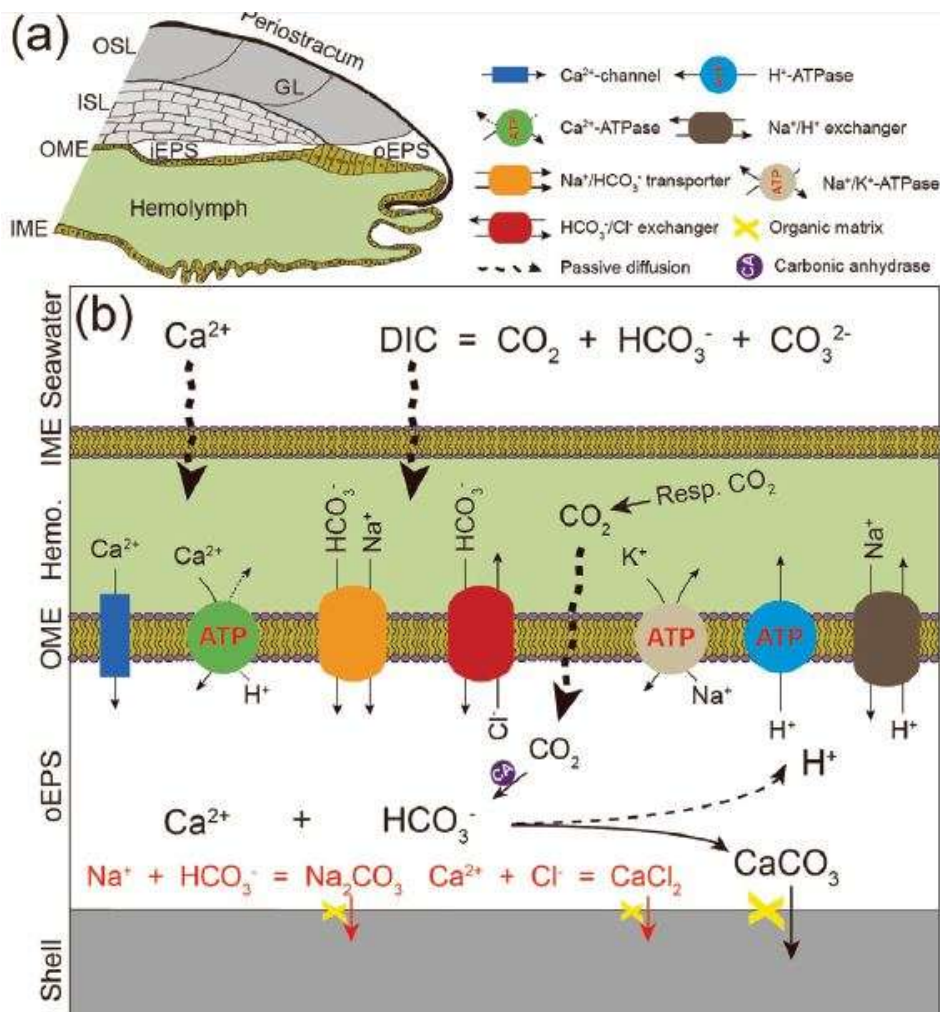


Figura 20: Meccanismi coinvolti nella formazione del guscio bivalve. Modificato da Li et al. (2016) and Zhao et al. (2017).

Il tasso di crescita è maggiore nella fase giovanile e diminuisce progressivamente nel tempo. Nella fase larvale di trocofora, è stato documentato, che la formazione della conchiglia inizia con la secrezione di una lamella organica la quale ha la funzione di sostenere il primo processo di mineralizzazione, e come sia esposto all'acqua di mare (Ramesh et al. 2017). In questo fluido extrapalleale supersaturato, tutte queste componenti riescono ad auto-assemblarsi e interagire con gli ioni metallici. Mount et al., (2004) hanno evidenziato nell'ostrica *Cassostrea virginica*, il contributo dei granulociti, ovvero di una componente degli emociti dell'emolinfa dei molluschi bivalvi, nella rigenerazione della conchiglia. I granulociti infatti sono in grado di rilasciare e modellare i cristalli di CaCO_3 . Il prodotto finale di questa complessa interazione tra componente organica e inorganica, ovvero la conchiglia, è una struttura di strati sovrapposti, costituiti principalmente da due distinte forme: calcite (struttura romboedrica) e/o aragonite (struttura ortorombrica) .

3.3.3 Il problema della calcificazione

Numero reazioni contribuiscono a determinare il pH dell'oceano; tra queste, le principali riguardano l'idrolisi di CO_2 che produce acidificazione, la fotosintesi clorofilliana che produce ossigeno, la dissoluzione del carbonato di calcio per effetto della respirazione. Inoltre, ci sono altre reazioni legate agli equilibri termodinamici dell'acido borico e dell'acido fosforico ($\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}_2\text{O} = \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O} = \text{PO}_4^{3-}$) che in acqua possono contribuire a determinare il pH.

Al pH tipico dell'acqua di mare, le specie dominanti sono bicarbonato, ammonio, acido silicico e acido borico ($\text{H}_3\text{BO}_3 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{B}(\text{OH})_4^-$) (Libes, 1992; Millero, 1996) (Figura 21 e Figura 22).

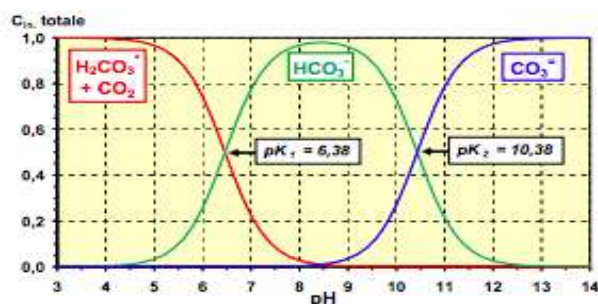


Figura 21: Relazione tra pH – Concentrazione totale del sistema carbonico: biossido di Carbonio Bicarbonato, Carbonato.

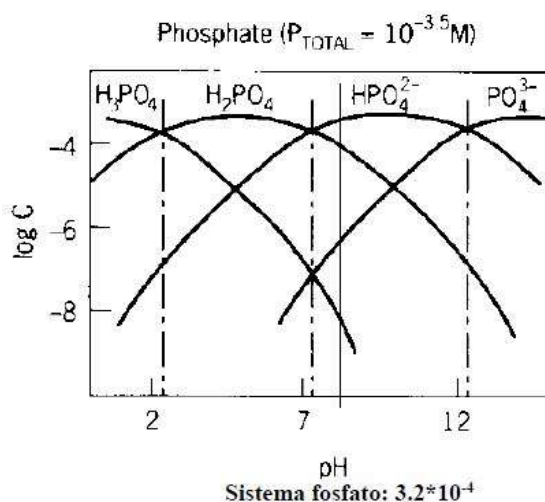


Figura 22: Esempio di relazione pH – Log(Concentrazione) del sistema fosfato

Sulla superficie degli oceani, il biossido di carbonio allo stato gassoso, viene scambiato attraverso l'interfaccia aria-acqua. Si discioglie nell'acqua, e reagisce immediatamente con essa per formare l'acido carbonico (H_2CO_3), lo ione bicarbonato (HCO_3^-) e lo ione carbonato (CO_3^{2-}) e liberando protoni H^+ . Queste reazioni sono reversibili e vicine all'equilibrio. Poiché queste reazioni sono in uno stato di equilibrio, la somma delle concentrazioni di tutte le specie chimiche inorganiche è indicata come carbonio inorganico disciolto (DIC). A seconda del pH la reazione sarà più o meno spostata verso destra o verso sinistra. Le acque oceaniche hanno in generale un pH di circa 8.1, ed approssimativamente il 90% del carbonio inorganico è presente sotto forma di ioni bicarbonati, il 9% come ioni carbonato, e solo l'1% è rappresentato da CO_2 disciolta. L'assetto chimico quindi è di fondamentale importanza. Con $\text{pH} < 6$ il diossido di carbonio si trova essenzialmente come gas disciolto con diminuzione della $[\text{CO}_3^{2-}]$, mentre con $\text{pH} > 10$ si ha prevalenza di ione carbonato.

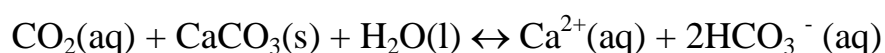
Alcuni studi hanno scoperto una relazione diretta tra l'acidificazione dei mari dovuta al cambiamento climatico e il ritmo con cui i mitili o le ostriche sviluppano il loro guscio esterno calcificato (Machado et al., 2011, Millero et al., 2009). Il guscio delle cozze ha la funzione di proteggere dai predatori e si forma nelle prime fasi dello sviluppo ad appena un giorno di vita. I molluschi sono molto sensibili a bassi livelli di pH nell'acqua di mare causati da un aumento dell'assorbimento di biossido di carbonio dall'atmosfera disciolto nell'acqua di mare. Il CACHE (Calcium in a CHanging Environment), studio finanziato dall'UE della durata di 4 anni (1 Novembre 2013 – 31 Ottobre 2017) e coordinato dal Natural Environment Research Council <https://cordis.europa.eu/project/id/605051/it>, ha analizzato gli effetti dell'acidificazione su meccanismi ancora in gran parte sconosciuti alla base della calcificazione, la crescita e la dissoluzione dei gusci di cozze. I risultati hanno aiutato a spiegare in che modo le larve dei bivalvi come le cozze formano il guscio in situazioni di acidificazione moderata e forniscono un collegamento diretto tra la chimica del carbonato dell'oceano e la velocità con cui la larva calcifica. I ricercatori spiegano come hanno usato micro-elettrodi e tinture fluorescenti per tracciare la deposizione di carbonato di calcio in larve di uno o due giorni.

E' stato rilevato che il calcio non si forma a livello intracellulare, come si pensava in precedenza, ma che più probabilmente è estratto dall'acqua di mare e trasportato per mezzo di specifiche proteine prima che si formi il carbonato di calcio (Ramesh et al., 2017). Gli studi hanno dimostrato inoltre che le larve sono in grado di aumentare il pH e la concentrazione di CaCO_3 al di sotto del guscio, ottenendo tassi più alti di calcificazione. In condizioni più acide, la capacità delle larve di calcificare

diminuiva; alle massime concentrazioni di CO₂ si è notata una maggiore dissoluzione del guscio, che porta a una maggiore mortalità. La ricerca svolta nell'ambito del progetto CACHE suggerisce che la ragione dell'alta sensibilità delle larve di bivalvi all'acidificazione è la loro limitata capacità di regolazione ionica.

Come è stato detto, calcite e aragonite ricoprono un ruolo importante nella conchiglia dei bivalvi. Il CaCO₃, una volta formatosi, può dissolversi nell'acqua, se vi è una bassa concentrazione di CO₃²⁻, e diventare più solubile a basse temperature e con alte pressioni, condizioni che si ritrovano nelle profondità oceaniche. Esiste quindi una profondità sopra la quale il CaCO₃ si può facilmente depositare, permettendo agli organismi calcificatori la deposizione delle proprie strutture calcaree, e sotto la quale invece prevalgono fenomeni opposti di dissoluzione. Questa profondità è detta orizzonte di saturazione.

La stabilità del CaCO₃ è influenzata anche dalla concentrazione di CO₂ presente nell'acqua. La concentrazione di questo gas aumenta con la diminuzione della temperatura: acque fredde riescono ad assorbire maggiori quantità di CO₂. La risalita di acque profonde, fredde e ricche di CO₂, porta alla formazione di strati superficiali a basso pH. Infatti, i più bassi valori di pH dell'acqua superficiale si sono riscontrati nelle zone di upwelling. L'aumento della concentrazione di CO₂ causa la diminuzione del pH con un conseguente spostamento dell'orizzonte di saturazione verso la superficie. Tra le due più comuni forme del CaCO₃, l'aragonite ha la caratteristica di essere più solubile rispetto alla calcite e quindi l'orizzonte di saturazione dell'aragonite è sempre più vicino alla superficie rispetto a quello della calcite (Fig. 23). Di conseguenza, gli organismi che depongono calcite sembrano essere meno vulnerabili alle suddette condizioni di acidificazione rispetto a quelli che depongono aragonite (The Royal Society, 2005). Tra i bivalvi, specie come i mitilidi *M. galloprovincialis*, *M. edulis* avendo una conchiglia composta prevalentemente a base di aragonite potrebbero essere più sensibili alle future condizioni di acidificazione rispetto a specie con una composizione prevalentemente di calcite come *Ostrea edulis* o *Crassostrea gigas* (Checa et al., 2007).



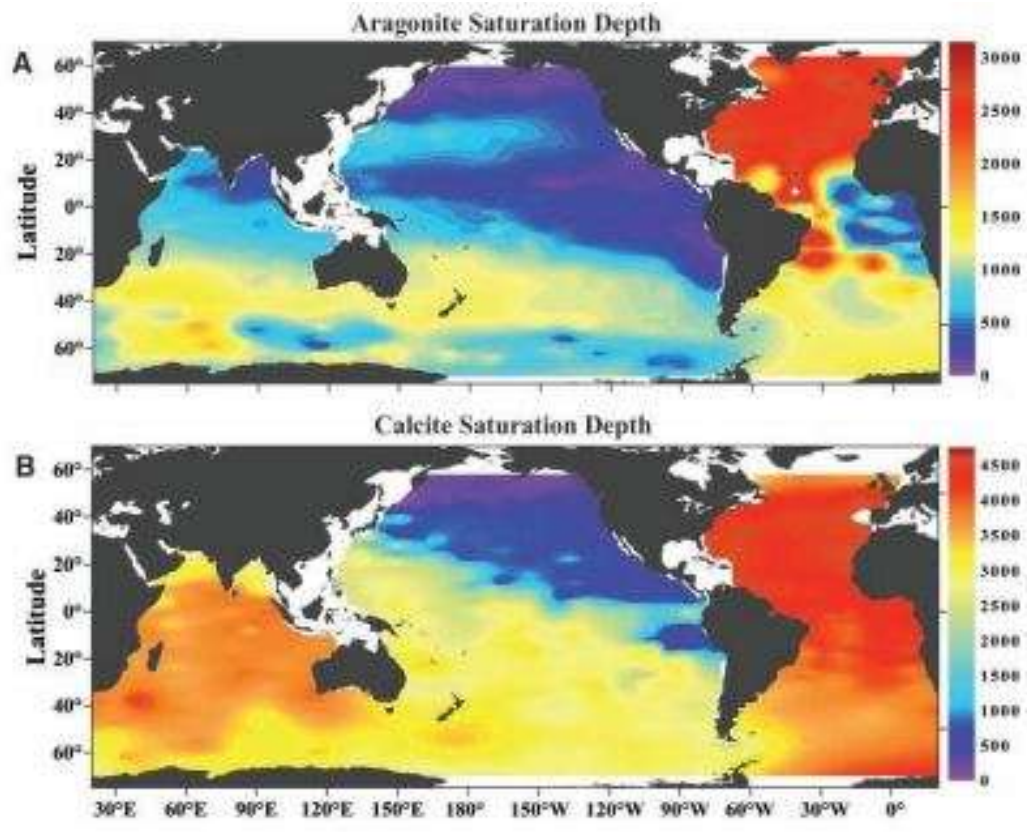


Figura 23: mostra gli orizzonti di saturazione per calcite (A) e aragonite (B) . Da Feely et al., (2004) .

3.2 Granuli

Quando un inquinante entra in una cellula, innesca alcune risposte biochimiche che si sono evolute o per scomporre la sostanza chimica o per stoccarlo il contaminante in determinati compartimenti, prevenendo l'interferenza con le reazioni biochimiche essenziali all'interno della cellula (Walker et al., 2000)

Nel caso dei metalli, la formazione di granuli è uno dei principali mezzi di detossificazione e successivo smaltimento delle concentrazioni accumulate. I meccanismi di formazione dei granuli sono numerosi e complessi, e non tutti i completamente noti. Una delle principali via attraverso cui si formano i granuli è attraverso la digestione, mediata da lisosomi, di metallotioneine, organelli e altre proteine in grado di legare i metalli presenti nel citoplasma. Secondo questo processo, i lisosomi primari prodotti dal corpo di Golgi inglobano gli organelli e le proteine ricchi in metalli, formando un lisosoma secondario in cui queste strutture vengono digerite fino a risultare in una matrice organica di lipofuscina, o in matrici inorganiche ricche di Ca, Fe o S. I granuli così formati possono essere eliminati per esocitosi o lisi cellulare direttamente nel lume intestinale, oppure mantenuti all'interno dell'organismo. Si conoscono ad oggi 4 tipi di granuli:

- Tipo A: granuli intracellulari che si formano come strati concentrici di calcio e magnesio pirofosfato in una matrice organica di lipofuscina. Accumulano metalli di *classe a* e intermedia. Anche lo Zinco e il Piombo si trovano associati con questi granuli (Walker et al., 2000, Vesik et al., 1999);
- Tipo B: granuli intracellulari ad alta concentrazione di zolfo, quindi accumulano metalli di *classe b* come ad esempio Rame e Cadmio, che tendono a legarsi ai gruppi contenenti zolfo. I granuli di tipo B ricchi di Zolfo contengono probabilmente prodotti di degradazione di metallotioneina, una proteina ricca di cisteina coinvolta nel legame intracellulare di Mercurio, Rame, Zinco e Cadmio, e hanno la loro origine nel sistema lisosomiale (Walker et al., 2000);
- Tipo C: granuli intracellulari ricchi di ferro derivante dalla ferritina quindi per l'accumulo di Ferro. L'unica via per la quale questi granuli possono essere escreti è l'eliminazione dalle feci del contenuto della cellula nel lume dell'apparato digerente (Walker et al., 2000);
- Tipo D: granuli extracellulari composti di carbonato di calcio.

Per quanto concerne in particolare i molluschi bivalvi, uno studio di George et al., (1980) ha rilevato che i granuli, di dimensioni variabili da $5 - 15 \cdot 10^{-6}$ m di diametro, sono di natura inorganica e contengono Ca, Mn, Zn e P, pari al 75% del loro peso secco, con Mg, Cu, Fe, Cd, K, S e Cl che sono presenti anche in quantità molto minori. Questi metalli si accumulano nel rene delle capesante *Pecten maximus* in concentrazioni molto diverse. Questi metalli possono essere classificati in due gruppi: quelli presenti in concentrazione estremamente elevate come Zn, Mn, Ca e Mg (> 1 mg/g peso umido) invece quelli tra 10 e 100 $\mu\text{g/g}$ come il Cadmio e il Piombo, Fe e Cu.

I granuli minerali intracellulari sono di forma grossolanamente sferoidale e di dimensioni variabili da 7-15 μm di diametro. Quasi tutti i granuli contengono una matrice molto densa di elettroni e sono circondati da una membrana multistrato (George et al., 1980). Nel complesso, i risultati dello studio mostrano che i granuli intracellulari sono composti principalmente da fosfati di Ca, Mn e Zn (Tipo A) e che la composizione dei singoli granuli, entrambi all'interno del rene è piuttosto variabile. Questo può essere attribuito ai vari gradi di mineralizzazione in quanto si forma apatite che ha un rapporto Ca:P in rapporto 1.66:1.

I granuli molto densi purificati nel presente studio contengono pochissimo Cd, anche se la concentrazione di Cd nel rene è piuttosto elevata. C'è solo il 20% del Cd totale nella frazione del citosol, indicando che solo una piccola percentuale di Cd- proteine è presente nel rene del *Pecten*.

Sempre per quanto concerne Cd, esperimenti a breve termine sono stati condotti a diverse concentrazioni per studiare la dinamica di distribuzione subcellulare del Cd in *Chlamys nobilis*, una specie di bivalve che è noto per accumulare Zn e Cd nei suoi tessuti. I risultati hanno mostrato che Cd è sequestrato in forma insolubile cioè in granuli ricchi di metalli e detriti cellulari. La principale strategia di detossificazione in questa specie per controllare il Cd risulta lo stoccaggio in forma non tossica negli organelli e nelle MT anziché l'eliminazione attraverso formazione di granuli e successiva l'esocitosi. Tuttavia, questo non esclude che il Cd legato a organelli e MT sia successivamente stoccato in granuli a seguito della degradazione mediata dai lisosomi (Figura 24).

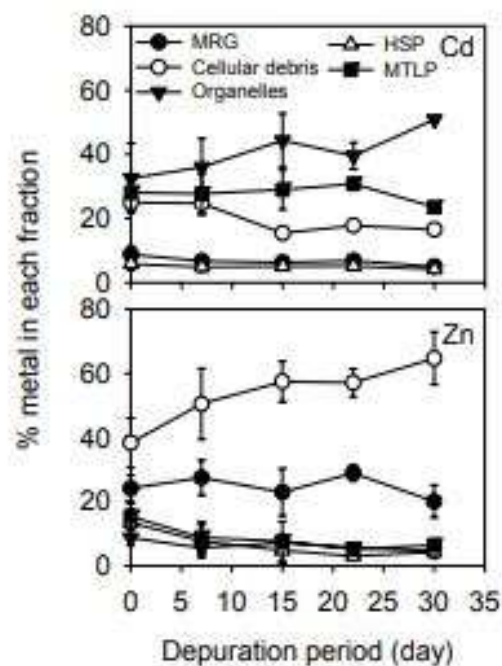


Figura 24: Distribuzione subcellulare dei metalli appena accumulati (%) nella capesante *Chlamys nobilis* durante un periodo di 30 giorni di depurazione dopo 7 giorni di alimentazione con diatomee radio marcate. Media \pm SD (n=4) (Fonte: Pan et al., 2009). MTLP = metallotioneine; HSP = heat shock proteins; MRG = metal rich granules (granuli).

E' probabile che la maggior parte del Cd negli organelli rimanga intrappolata nei lisosomi. Le cellule digestive dei bivalvi sono considerate una delle fonti più ricche di lisosomi a causa della loro digestione intracellulare attiva nella ghiandola digestiva. Come si evince in figura 25 durante i 30 giorni di esposizione è stata osservata anche una redistribuzione del metallo subcellulare. Si evince che i lisosomi fungono da sink di Cd. Il Cadmio interno può essere eliminato lentamente dai lisosomi o rimosso e depositati nella frazione MT per lo stoccaggio.

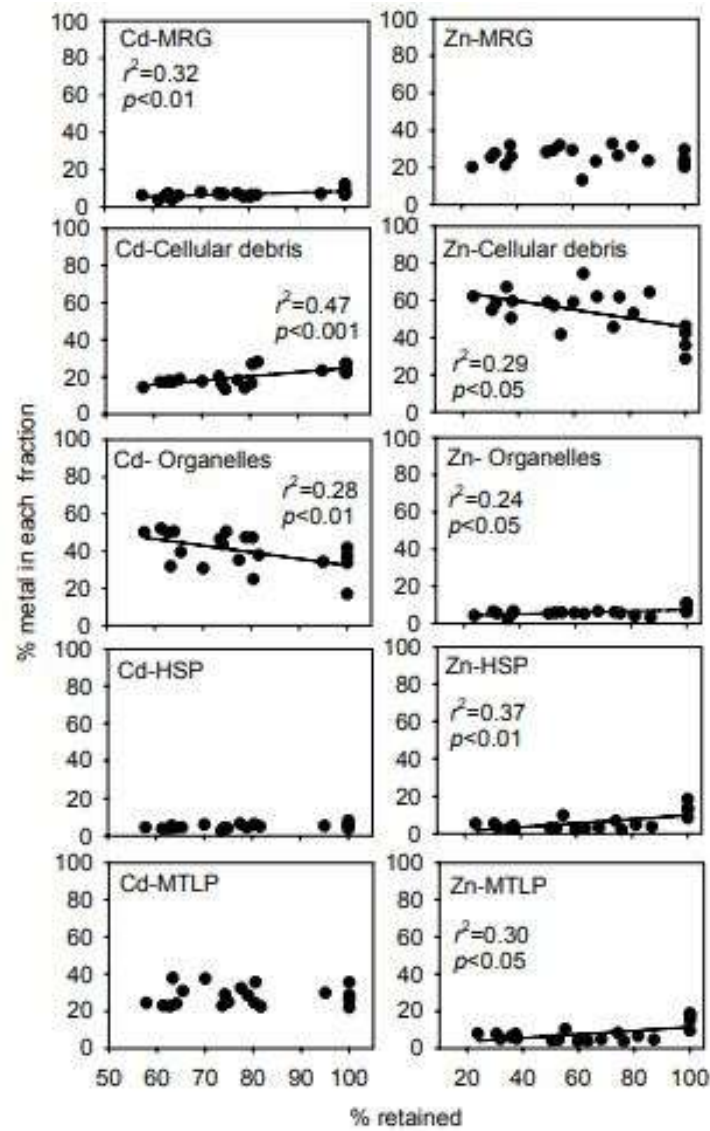


Figura 25: Relazione tra ritenzione (perdita) di metalli (%) e distribuzione subcellulare (%) in capesante *C.nobilis* durante l’esperienza di efflusso (n=20) (Fonte: Pan et al., 2009).

Anche per Pb è stata osservata la detossificazione attraverso la formazione di granuli. In particolare, il mollusco bivalve *Dosina exoleta* riesce a bioaccumulare una elevata quantità di Pb in granuli extracellulari o depositi insolubili presenti nel lume del tubulo renale. Il sistema escretore dei bivalvi comprende la ghiandola pericardica e il rene (*nephridium*) che è composto da strutture tubolari (tubuli renali) che raccolgono fluidi dalla ghiandola pericardica e sono collegati al poro escretore per espellere l'urina. I grandi granuli extracellulari circondati da cellule epiteliali (20-200 μm) sono composti principalmente da fosfato di calcio e costituiscono tra il 50% e il 75% del peso secco dei reni. Questi granuli hanno una forma irregolare e sono organizzati in strati concentrici attorno a un nucleo centrale. La maggior parte delle cellule epiteliali contenevano piccoli granuli intracellulari rifrangenti di forma rotonda e colore marrone come in Figura 26 (Darriba et al.,2013).

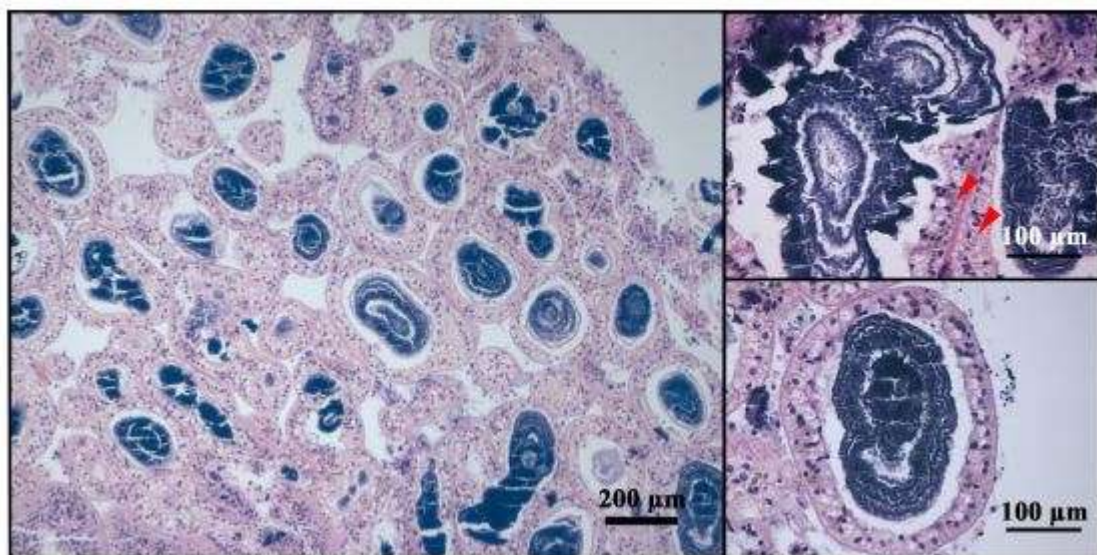


Figura 26: Lumen renale di *Dosina exoleta* con ematossilina ed eosina di Harris osservati al microscopio ottico. Grandi granuli extracellulari (20-200 μm) sono colorati in blu e piccoli granuli intracellulari rifrangenti nelle cellule epiteliali sono indicati da frecce rosse. (Fonte: Darriba et al.,2013).

Al microscopio elettronico a scansione, i granuli extracellulari hanno mostrato dimensioni variabili e una forma estremamente irregolare con una superficie alveolata e sono formati principalmente da depositi di $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ come in Figura 27.

L'analisi dei metalli ha inoltre rilevato che dal 78% al 98% del Pb totale accumulato dall'organismo era presente nel rene, e dal 87% al 92% di questo Pb all'interno del rene era contenuto in granuli ricchi di metalli (Darriba et al., 2013).

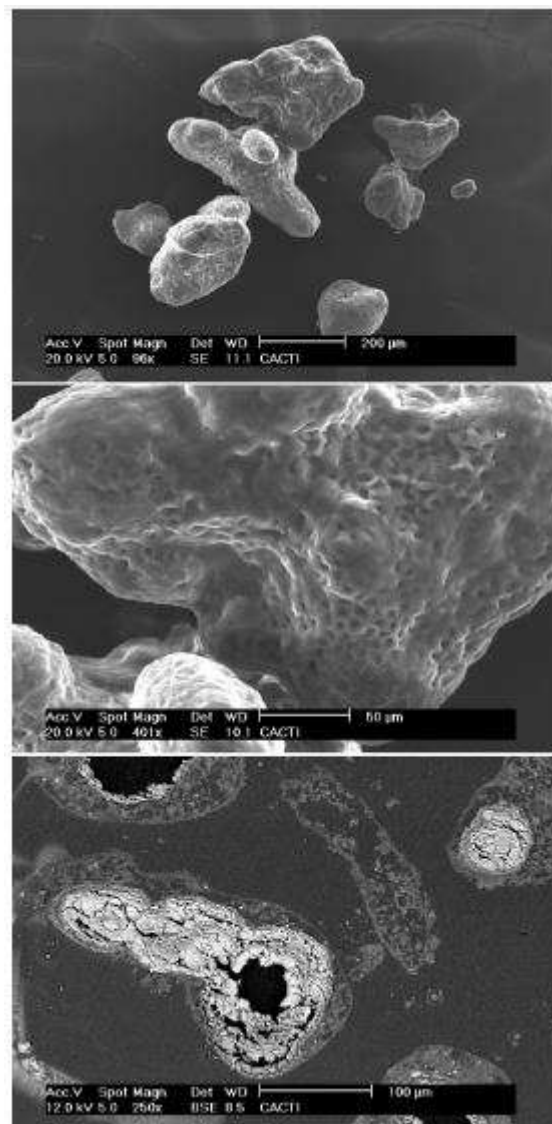


Figura 27: Scansione di immagini al microscopio elettronico granuli extracellulari isolati e una sezione trasversale di granuli nel lume renale (Fonte: Darriba et al., 2013).

I granuli qui descritti corrispondono a granuli di tipo A “intracellulari” secondo la classificazione di Hopkin (1989) e di Walker et al. (2000) . Questi granuli hanno bassa purezza di Ca, ovvero si trovano anche elevate quantità di Mn, Mg, e P. Si ritiene che abbiano principalmente una funzione di immagazzinamento del calcio con funzione di escrezione, conservazione e mobilizzazione e/o detossificazione. La grande dimensione raggiunta dai granuli trovati in *D. exoleta*, e la relazione esistente tra la concentrazione di Pb con la taglia dell’animale, è probabile che questa specie conservi tutti i granuli che produce o che la loro escrezione sia di fatto molto limitata. Inoltre, bivalvi che hanno mostrato “ gigantismo renale” hanno la capacità di produrre granuli extracellulari maggiore rispetto a quelli che hanno reni normali (Darriba et al.,2013). La maggior parte (>80%) di Pb e Zn è stata trovata nella frazione ricca in granuli di metalli (MRG), mentre in questa sono stati trovati solo (<20%) di Cu e Cd come riportato in figura 28.

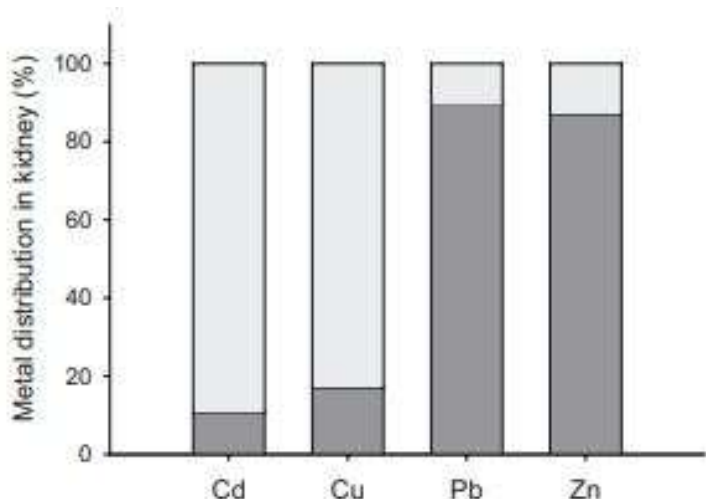


Figura 28: Distribuzione media dei metalli nel rene di *Dosinia exoleta* nella frazione MRG (granuli ricchi di metalli) (grigio scuro) e il resto del rene (grigio chiaro). La maggior parte (>80%) di Pb e Zn è stata trovata nella frazione MRG, mentre in questa sono stati trovati solo (<20%) della frazione Cu e Cd (Fonte: Darriba et al., 2013).

3.3 Metallotioneine (MT)

Le metallotioneine (MT), sono proteine inducibili a basso peso molecolare, ad alto contenuto di amminoacidi solforati (e pertanto di zolfo) che si legano fortemente a metalli, svolgendo un ruolo significativo nella loro detossificazione, specialmente quella del Cd. Hanno un ruolo:

- ✓ Nella regolazione dei metalli pesanti essenziali (es. Zn e Cu)
- ✓ Nel controllare la concentrazione di questi ioni
- ✓ Nella regolazione dei flussi degli ioni ai vari distretti cellulari,
- ✓ Nella neutralizzazione dei metalli non essenziali (Cd, Hg) e nella protezione dallo stress indotto dai questi metalli.

Le MT sono presenti in tutti gli organismi: animali, vegetali e microrganismi (Walker et al., 2000). Negli animali queste proteine posseggono polimorfismo genetico e sono abbondanti nei tessuti parenchimali (fegato, rene, pancreas e intestino). La loro concentrazione dipende da specie, tessuto, età ed altri fattori non ancora completamente identificati. Nonostante le MT siano proteine citoplasmatiche si sono trovate accumulate nei lisosomi e nel nucleo (Walker et al., 2000). La più importante delle funzionalità delle MT è la loro inducibilità da una serie di condizioni: citochine (sono molecole proteiche prodotte da vari tipi di cellule e secrete nel mezzo circostante, di solito in risposta a uno stimolo, e inducono nuove attività come crescita, differenziazione e morte) , ioni metalli (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} ..) promotori tumorali, stress, ormoni.

Le concentrazioni di metalli nei tessuti dipendono da un lato dai diversi processi biochimici coinvolti nell'assorbimento dei metalli dal cibo e dall'acqua di mare e dall'altro dalla velocità di escrezione del metallo. Gli alti livelli di metalli in tracce presenti nei molluschi sono facilitati da (Isani et al., 2000):

1. Chelazione dovuta a ligandi specifici
2. Compartimentazione all'interno di vescicole limitate dalla membrana
3. Formazione di precipitati insolubili

Nella figura 29 è presente uno schema semplificato di un bivalve, dove viene riportata le principali vie di assimilazione ed escrezione dei metalli.

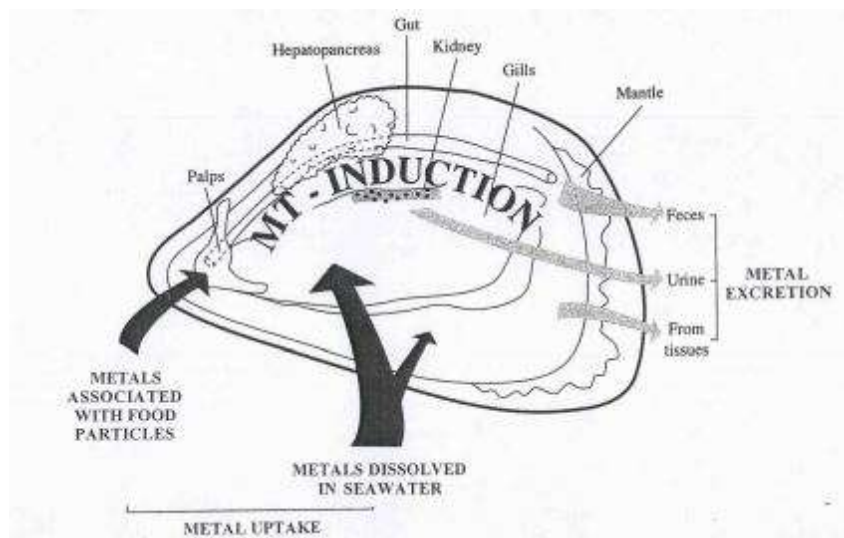


Figura 29: Principali vie di assunzione ed escrezione dei metalli pesanti in diversi tessuti di *Mytilus sp* e successiva induzione di MT (Fonte: Isani et al., 2000)

In figura 30 sono riportate le concentrazioni di MT rilevate in diversi tessuti di *Mytilus* sia esposti sia non esposti a Cd disciolto in acqua di mare, determinate con metodo polarografico. Si notano valori minimi e massimi misurati durante un ciclo stagionale: (a) esposizione a 0.5 $\mu\text{g Cd/mL}$ di acqua di mare per 7 giorni, (b) esposizione a 0.2 $\mu\text{g Cd/mL}$ per 28 giorni; cozze non esposte; (d) cozze esposte a 0.4 $\mu\text{g Cd/mL}$ di acqua di mare per 40 giorni.

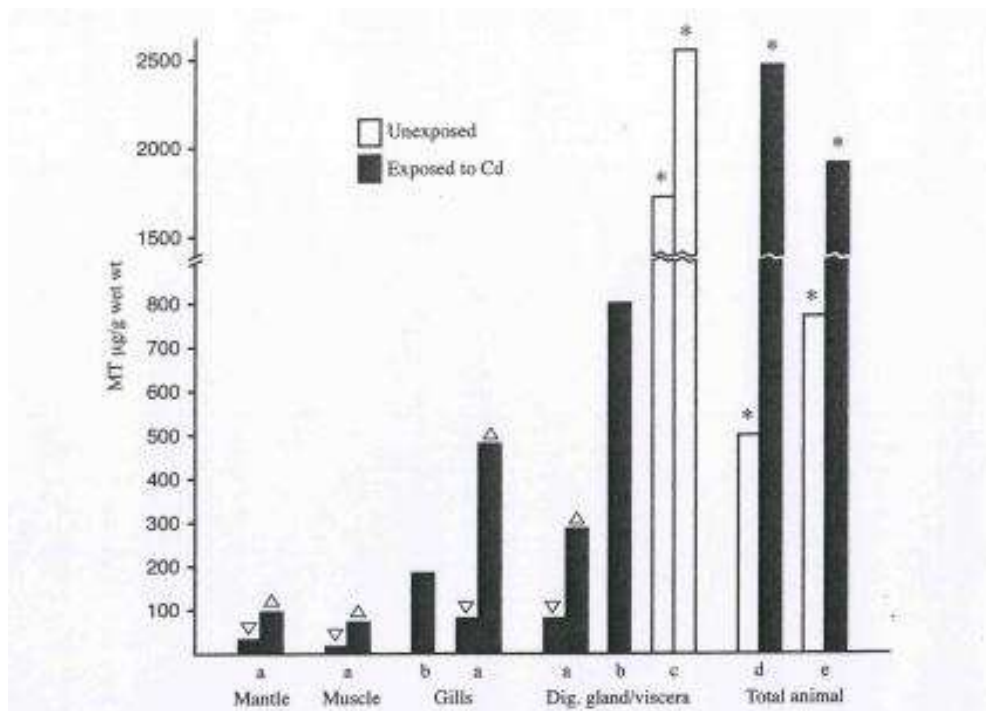


Figura 30: Concentrazioni di MT in diversi tessuti di *Mytilus* sia esposti a 0.4 microgrammo di Cd/mL di acqua di mare per 65 giorni sia non esposti, determinate con metodo polarografico (Fonte: Isani et al., 2000).

La capacità di un organismo di sintetizzare MT può essere correlata a molti fattori biotici e abiotici, compreso lo stato fisiologico dell'animale o la composizione minerale della dieta. Tutti questi fattori influenzano il turnover della MT, alterando continuamente i tassi di sintesi e degradazione. Il turnover della MT rappresenta una via di adattamento cellulare a condizioni fisiologiche e ambientali alterate. Gli stimoli estrinseci ed intrinseci possono agire su diversi livelli nel metabolismo. La fase più compresa per controllare il turnover di una MT è quello relativo al controllo trascrizionale della sintesi di MT-mRNA negli animali esposti a metalli pesanti. Inoltre la concentrazione di MT dipende anche dalla sua degradazione considerando anche il sistema lisosomiale in Figura 31 (Isani et al., 2000).

La biosintesi di MT è spesso mediata dalla presenza di ioni metallici liberi nella frazione citosolica di differenti tessuti, e i meccanismi di trasporto specifici possono governare le concentrazioni intracellulari di certi ioni metallici. Un ipotetico modello per il trasporto dei metalli attraverso un epitelio branchiale di un bivalve marino è riportato in Figura 32. E' stato dimostrato che nel trasporto attraverso l'epitelio branchiale dei bivalvi l'assorbimento di Cd aumenta linearmente con il tempo che è direttamente proporzionale alla concentrazione esterna di Cd. Il 50% del Cd cellulare era associato al materiale particolato, il metallo solubile era associato ad una componente proteica di circa 60kDa e successivamente con la MT. Nelle cozze, le MT sono state trovate ampiamente distribuite tra diversi tessuti, quali la ghiandola digestiva, il mantello, le branchie, il piede e il muscolo adduttore. In contrasto a quanto avviene nei mammiferi in cui la produzione di MT è per lo più limitata a organi parenchimatici come fegato e reni (Isani et al., 2000).

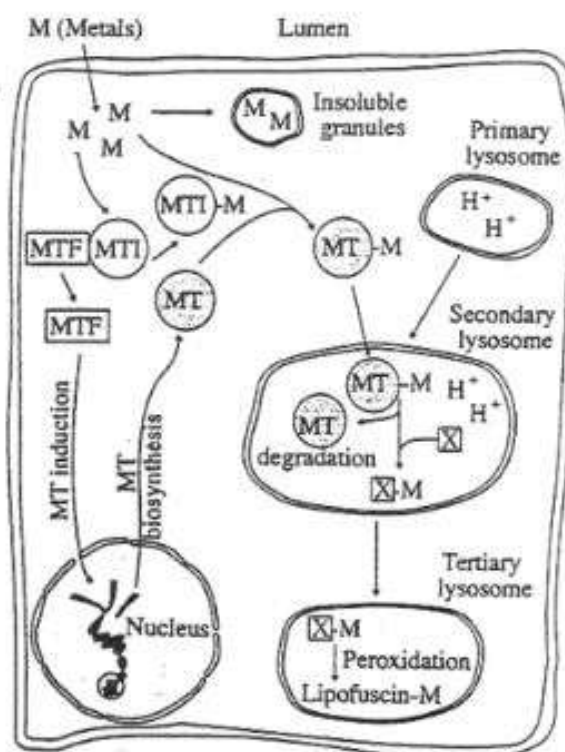


Figura 31: Schema del turnover di MT in cellule di molluschi bivalvi (Fonte: Isani et al., 2000) . M: Metalli, MTF: Fattori di Trascrizione(proteina); MTI: Inibitori di Trascrizione.

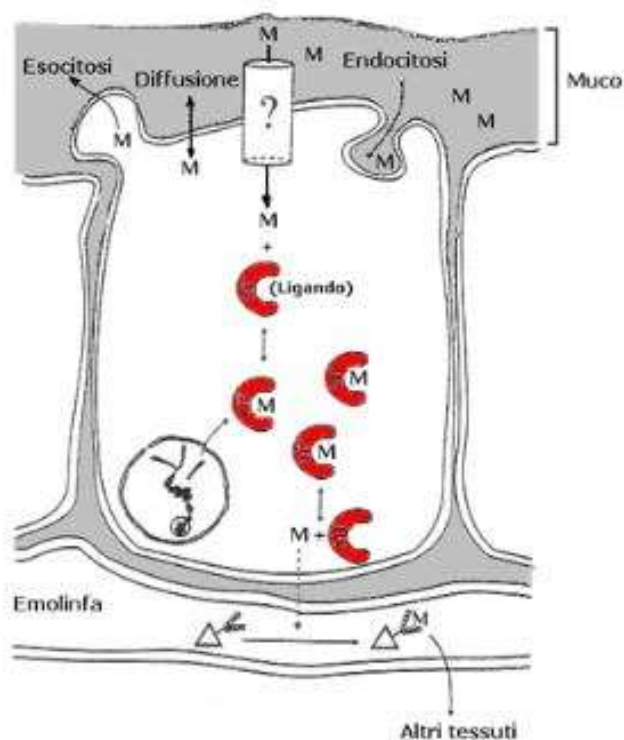


Figura 32: Schema ipotetico del trasporto di metalli pesanti attraverso l'epitelio branchiale di molluschi bivalvi. M: metalli in traccia; MT metallotioneine (Fonte: Isani et al., 2000).

Le MT, per la loro proprietà di essere indotte dalla presenza di metalli nel citoplasma, sono impiegate come biomarker di esposizione da metalli pesanti. Nello studio di Scudiero et al. (2014) è stato valutato l'effetto biologico della stagionalità sui contenuti di Cd, Pb e MT in *Mytilus galloprovincialis* lungo la costa del Golfo di Napoli. Si evince che risulta una correlazione tra il contenuto di MT e lo stato della ghiandola riproduttiva determinato durante le stagioni. Si nota che le concentrazioni Cd e Pb sono maggiori nella ghiandola digestiva rispetto al mantello, mentre le MT si accumulano preferenzialmente nel mantello. Come si nota in figura 33 i livelli di metalli erano significativamente più alti nella ghiandola digestiva (epatopancreas) in quanto questa risulta il principale organo bersaglio per gli effetti dell'inquinamento, perché svolge un ruolo importante nella difesa immunitaria, detossificazione e regolazione omeostatica.

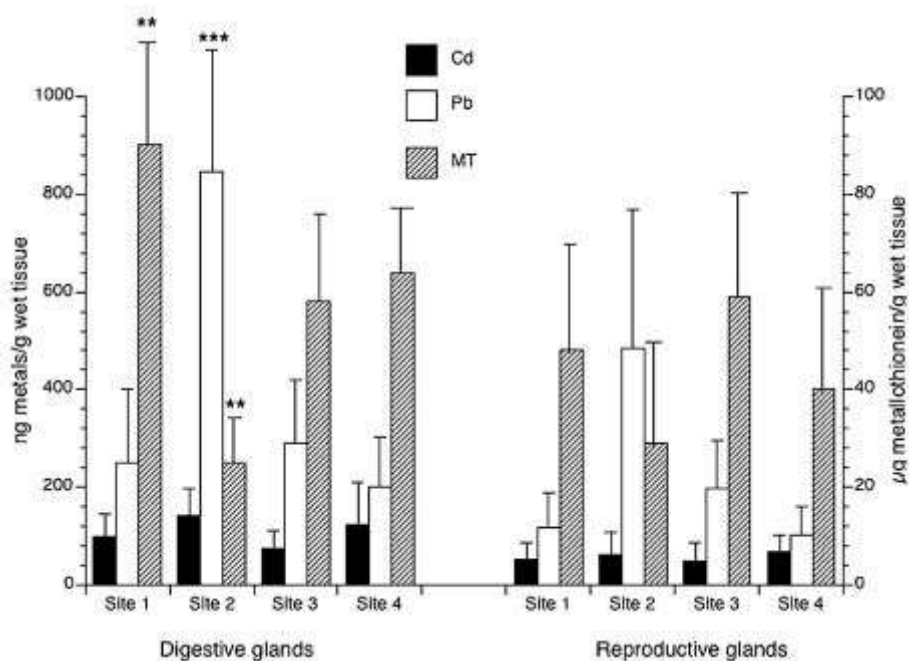


Figura 33: Contenuto di Cadmio (Cd), Piombo (Pb) e metallotioneina (MT) nelle ghiandole digestive (sinistra) e riproduttive (destra) di *Mytilus galloprovincialis* da quattro diversi banchi naturali. I valori sono espressi come media \pm SD (n=48). Sito 1, Torre Gaveta; sito 2, Capo Miseno; sito 3, area portuale di Napoli; sito 4, Zona portuale di Torre del Greco (Fonte: Scudiero et al., 2014).

L'induzione delle MT da parte dei metalli è stata ampiamente studiata. L'esposizione di *Mytilus edulis* a concentrazioni subletali di Cd (400 µg/L concentrazione usata in laboratorio) per 2 mesi ha provocato l'induzione di MT nei tessuti molli con andamento crescente come in figura 36. Si evince che il Cd nei tessuti era significativamente correlato con le concentrazioni MT come mostrato in figure 34,35 (Bebiano et al.,1991).

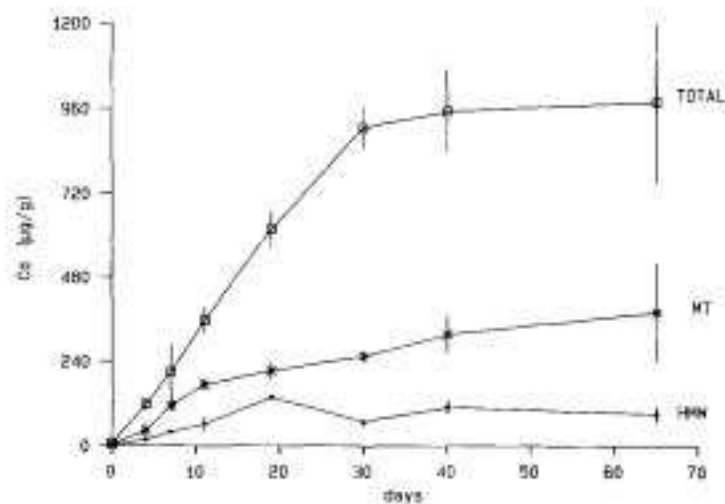


Figura 34: Mytilus edulis. Accumulo di Cadmio nei tessuti e nelle frazioni citosoliche (HMW: alto pool di peso molecolare precipitato dopo il trattamento termico) Concentrazioni calcolate in funzione del peso del tessuto secco. (Fonte: Bebbiano et al.,1991)

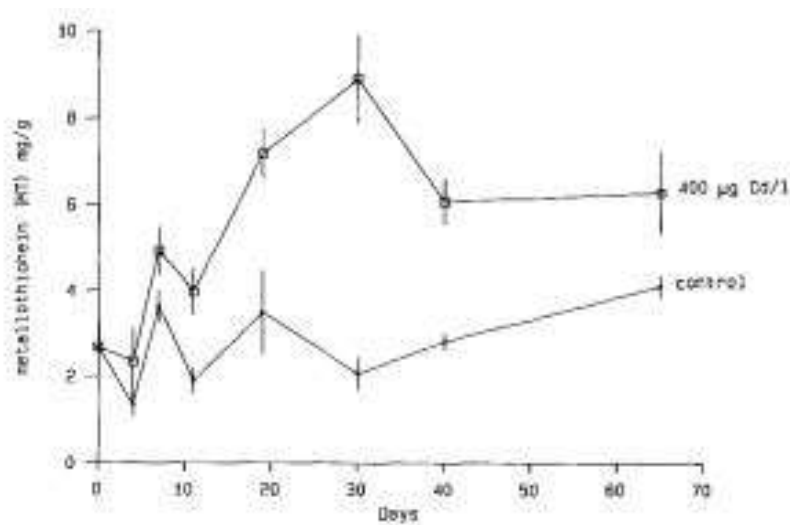


Figura 35: Concentrazioni di MT nei controlli e nei Mytilus edulis esposti per 2 mesi. (400 µg/L) (Fonte: Bebbiano et al.,1991)

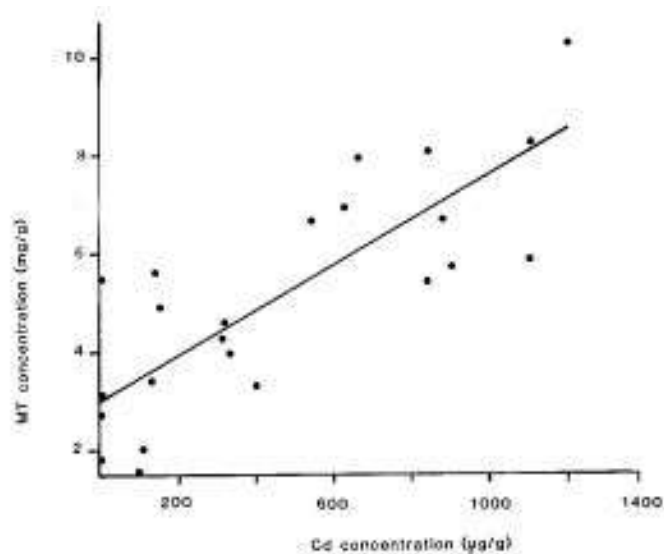


Figura 36: Relazione tra le concentrazioni di MT e Cd in interi tessuti molli in *Mytilus edulis*. (Fonte: Bebbiano et al.,1991)

Uno studio condotto da Asus et al. (2018) su *Crassostrea iredalei* e *Crassostrea glomerata* nell'Oceano Indiano ha confermato la capacità delle ostriche di assorbire Pb e Cd presenti nell'acqua, evidenziando una relazione significativa tra le concentrazioni dei due metalli nell'acqua di mare e i livelli di MT nei tessuti (branchie e stomaco). I livelli di MT e metalli pesanti variavano notevolmente tra gli individui delle due specie, ma erano sempre più alte nelle branchie che nello stomaco come in figura 37. Nello specifico i livelli di MT hanno dimostrato di essere significativamente associati al livello dei due metalli portando alla conclusione che le MT potrebbero essere responsabili del loro sequestro (Asus et al., 2018).

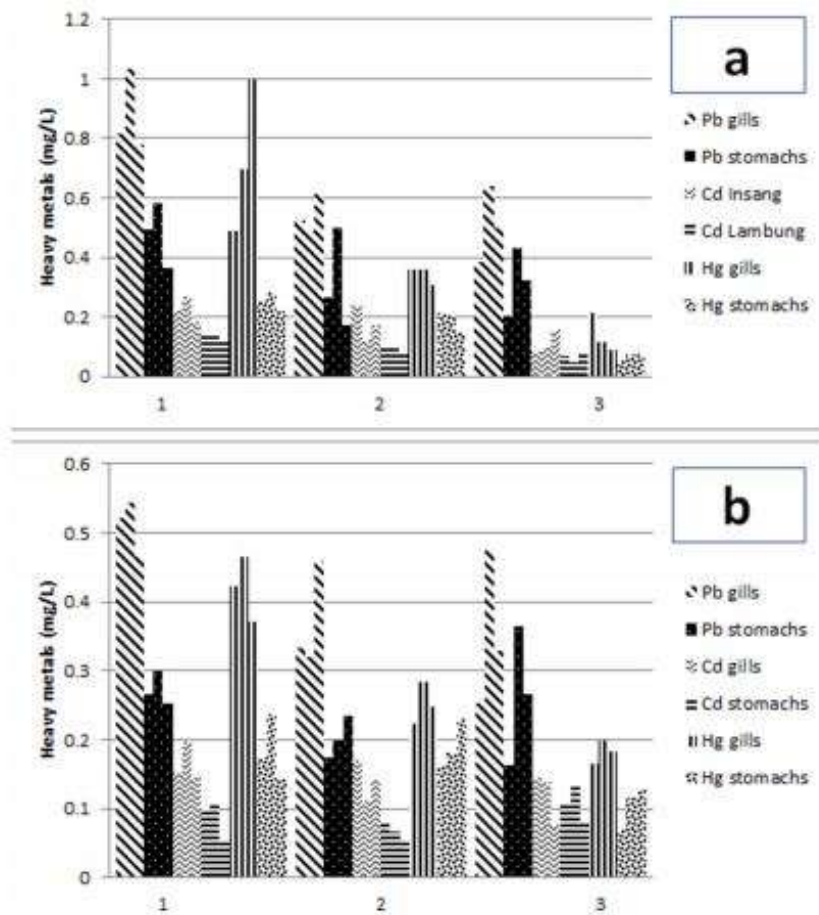


Figura 37: Contenuto di metalli pesanti (Pb,Cd e Hg) nelle branchie e nello stomaco di (a) *Crassostrea iredalei* e (b) *Cassostrea glomerata* alle tre stazioni. Stazione 1, Mayagan; Stazione 2, Kenjeran; Stazione 3, porto di Gresik. (Fonte: Asus et al.,2018)

Come mostrato in figura 38, sono rappresentate le concentrazioni di Cd e Pb nelle branchie e tessuti dello stomaco delle due specie analizzate. E' evidente che i livelli di metalli pesanti sono più alte nelle branchie che nello stomaco delle ostriche. Invece, le due specie di ostriche hanno prodotto livelli di MT più elevati nelle branchie che nei tessuti dello stomaco. C'è una associazione positiva tra i livelli di MT e quello dei metalli pesanti. Si pensa che accumulo maggiore di metalli e quindi produzione, in difesa, di MT, sia dipendente dalla specie; infatti nel *Mytilus galloprovincialis* le maggiore produzione di MT è stata dimostrata nella ghiandola digestiva rispetto alle branchie (Asus et al., 2018).

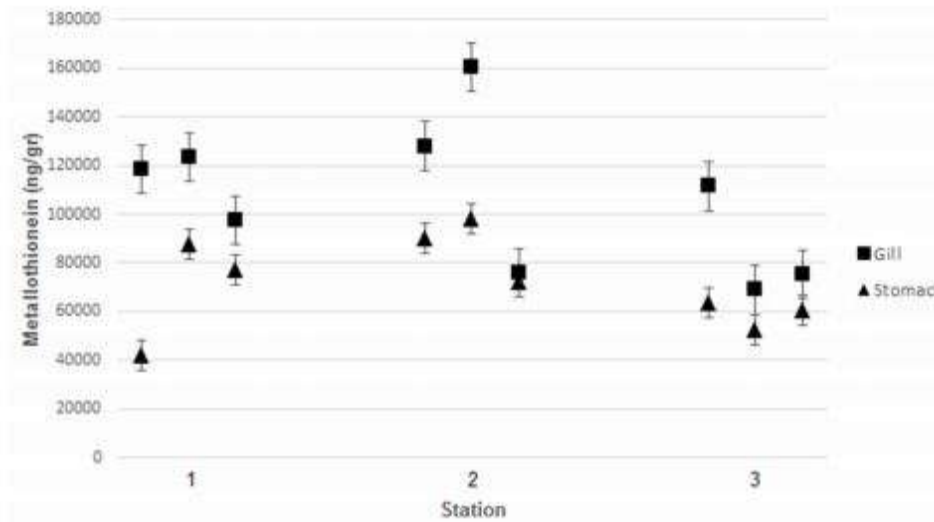


Figura 38: Livello di MT (massa umida) nelle branchie e nello stomaco di *Crassostrea glomerata* raccolti dalle tre stazioni. Stazione 1, Mayagan; Stazione 2, Kenjeran;; Stazione 3, porto di Gresik (Fonte: Asus et al., 2018).

CAPITOLO 4 – PROSPETTIVE FUTURE PER L'IMPIEGO DEI BIVALVI

4.1 Conchiglie come indicatori paleoecologici

I molluschi, come abbiamo potuto vedere, possono immagazzinare nelle conchiglie alcuni metalli in tracce se presenti in ambiente contaminato a causa della notevole tolleranza biologica e/o dell' impossibilità di eliminare i metalli che vengono stoccati in questo comparto in modo pressoché permanente. Per questa ragione le conchiglie possono essere considerate dei registratori della presenza di metalli e degli integratori temporali, anche migliori dei tessuti molli (Al-AAsm et al., 1998). I vantaggi pratici nell'uso delle conchiglie sono talvolta maggiori rispetto a quelli offerti dall'analisi dei tessuti: infatti le conchiglie sono semplici da raccogliere e facilmente identificabili; si puliscono e non hanno problemi di conservazione, a differenza di quanto avviene nel caso dell'impiego delle parti molli per lo studio del bioaccumulo, in cui i campioni di animali devono essere mantenuti refrigerati a 4°C, in ambiente umido (non immersi in acqua), fino a un massimo di 24 ore dal momento del prelievo; in alternativa essi possono essere congelati a -20°C (Montella, 2018). Inoltre le concentrazioni dei metalli nelle conchiglie sono più basse rispetto a quelle nei tessuti molli e la varianza è più piccola, permettendo una più precisa inferenza statistica; altri vantaggi riguardano il fatto che i metodi analitici sono standardizzati, ma soprattutto le conchiglie integrano la concentrazione degli elementi per tutta la vita dell'organismo e li conservano anche dopo la loro morte. Gli elementi incorporati nella matrice cristallina possono essere rimossi infatti solo tramite dissoluzione o diffusione: processi molto lenti per modificarne le concentrazioni (Dermott & Lum, 1986). La conservazione dei metalli dopo la morte dell'animale può essere utilizzata per capire i trend e risalire a quale fosse la concentrazione nel passato (Cravo et al., 2002). Gli studi in laboratorio hanno confermato che è possibile considerare l'aumento di alcuni metalli nelle conchiglie quale risposta all'aumento delle concentrazioni del metallo nei mezzi di crescita nonostante il contenuto nelle conchiglie sia solitamente inferiore a quello che si rinviene nei tessuti molli (Cravo et al., 2004).

La presenza di una resistente conchiglia calcarea ha fatto sì che i Bivalvi si siano conservati assai bene allo stato fossile; le loro conchiglie si rinvencono, a volte in grande abbondanza, nei sedimenti marini e spesso d'acqua dolce, di tutte le ere geologiche. I Bivalvi più antichi provengono da sedimenti datati nel Cambriano; si tratta di conchiglie per molti aspetti non fundamentalmente dissimili da alcuni tipi

attuali (ordine dei Paleotassodonti): queste affinità costituiscono in paleontologia uno degli aspetti più interessanti dei Bivalvi perché permettono una comparazione fra fossili e viventi, che da un lato ha reso abbastanza agevole la classificazione, dall'altro ha fatto sì che i Bivalvi costituiscano una componente fondamentale nella determinazione degli ambienti del passato e possano essere considerati in definitiva degli ottimi indicatori paleoecologici (Girod et al., 2015).

5.2 Conchiglie come biomateriale

L' allevamento dei molluschi, in particolare, è in grado di fornire servizi ecosistemici come il controllo dell'eutrofizzazione (Lindahl et al., 2005), la crescita della barriera corallina e il mantenimento/incremento della biodiversità in tali ambienti (Coen & Luckenbach , 2000) e la protezione costiera naturale (Walles et al., 2016). Le conchiglie da acquacoltura sono un prezioso biomateriale, non un prodotto di scarto come erroneamente si pensa (Morris et al., 2019). Aspetto non trascurabile, oggi è la possibilità della produzione di calcare dalle conchiglie. Il carbonato di calcio viene estratto e viene considerato un bene. Il mondo sta entrando nell'ottica di salvaguardare il pianeta, rendere tutto eco-green e sostenibile per le future generazioni grazie anche alle normative che impongono tali direttive. L'Italia ha accolto questo impegno, ma il suo percorso verso l'Agenda 2030 dell'Onu, che appariva già in salita prima della crisi economica, diventa oggi ancora più difficile (Rapporto ASviS 2020, <https://asvis.it/rapporto-asvis-2020>). Per questo bisogna intraprendere immediatamente il cammino verso una transizione ecologica “giusta”, capace di generare nuova occupazione e sviluppo economico e sociale, utilizzando in modo coerente le risorse al fine di rilanciare il Paese in un'ottica di sostenibilità economica, sociale e ambientale (Rapporto ASviS 2020, <https://asvis.it/rapporto-asvis-2020>).

In un momento come questo di maggiore consapevolezza della necessità di un'economia circolare, è auspicabile che l'acquacoltura e l'industria ittica considerino i gusci come un potenziale prezioso biomateriale che può essere riutilizzato sia in ambiente sia a livello economico dal momento che i molluschi possono essere sink di biossido di carbonio (vedi cap. 3.3.3). I rifiuti di guscio rappresentano fino al 75% del peso totale dell'organismo (Tokeshi et al., 2000). L'utilizzo dei gusci dipende anche dalla cultura della nazione e dalla distanza tra la sorgente di raccolta e l'impianto di elaborazione del prodotto; a tal proposito è stata condotta un'analisi del ciclo di vita (LCA sui rifiuti di ostriche *Crassostrea gigas* in

Brasile, che ha rilevato che una distanza maggiore di 323 km tra i due luoghi non ha prodotto alcun vantaggio ambientale del guscio rispetto allo smaltimento in discarica (De Alvarenga et al., 2012).

4.2.1 Le potenziali applicazioni dei gusci

- **Integratore alimentare per il bestiame:** il Ca estraibile aiuta alla salute delle ossa, ma anche nella deposizione delle galline ovaiole come supplemento per migliorare la qualità e la forza dell'uovo (Suttle 2010). Dopo aver subito un trattamento termico viene usato come mangime per pollame, come lettiera e per altri utilizzi (Martínez-García et al., 2020).
- **Agente calcinante agricolo:** E' stato dimostrato che la farina di guscio di ostrica aumenta in modo significativo il pH del suolo, permettendo uno stato nutrizionale del suolo migliore, inclusi fosfato disponibile e massa di materia organica (Lee et al. 2008). Le cozze macinate hanno aumentato l'adsorbimento e diminuito il desorbimento di arsenico sia nei suoli forestali che nei vigneti, riducendo così il rischio di inquinamento del suolo da arsenico in queste aree (Osorio- López et al. 2014).
- **Inerti di conchiglia:** possono essere utilizzate come semplice materiale da costruzione o incorporate in un aggregato miscelate alla malta. Tuttavia, è necessario prestare attenzione, poiché molti materiali da costruzione sono altamente regolamentati ai fini delle prestazioni e della sicurezza (Regolamento UE n. 305/2011).
- **Mezzo per biofiltri:** I gusci hanno la capacità di biofiltrazione per il trattamento delle acque reflue e di tamponamento del pH grazie al CaCO_3 (Chiou et al., 2014). L'uso di conchiglie di molluschi come trattamento dei metalli pesanti per le acque reflue contaminate è stato esplorato utilizzando sia gusci di cannolicchi ricchi di aragonite sia gusci di ostriche ricchi di calcite. E' stato riscontrato che entrambe le polveri derivate dal guscio avevano simili capacità di assorbimento dello Zn^{2+} . Tuttavia, la polvere di conchiglia dell'ostrica ricca in calcite si è rivelata essere un assorbente migliore per il Pb^{2+} , mentre quella della vongola ricca in aragonite aveva una migliore capacità di assorbimento del Cd^{2+} (Du et al., 2011). E' stato comunque

evidenziato che è necessaria la miscela di calcite e aragonite per ottimizzare la rimozione dei metalli pesanti dalle acque reflue.

4.2.2 Applicazioni potenziali e non realizzate con le conchiglie

Il lavoro di Morris et al. (2018) riporta altre potenziali applicazioni testate ad oggi prevalentemente a scala di laboratorio o ipotizzate in scenari del mondo reale, ma che certamente devono ancora raggiungere un mercato di larga scala e diventare una strategia di valorizzazione consolidata.

- **Graniglia antighiaccio:** C'è discussione sul potenziale uso dei rifiuti di CaCO_3 dall'industria dell'acquacoltura come fonte di calcio per la formazione di acetati di calcio. Ci sono, tuttavia, segnalazioni sull'uso di conchiglie di capesante mista a scarti di vinaccia di mele a livello industriale nel nord del Giappone per formare una sostanza antigelo a base di acetato di calcio da utilizzare sulle strade locali REF
- **Substrato per coperture verdi:** Un altro potenziale utilizzo di gusci di molluschi di scarto è come strato di drenaggio in strutture di copertura verde (Weiler & Scholz-Barth 2009). Le conchiglie potrebbero anche essere incorporate nel terriccio di un tetto verde o di un prato per la loro potenzialità nel biorisanamento.

Le conchiglie sono oggetto di valorizzazione dei rifiuti anche per ripristino degli ecosistemi. Ne è un esempio il progetto Billion Oyster a Governors Island a New York che è finalizzato a collegare una raccolta di rifiuti nei ristoranti di Manhattan al fine di ripristinare la barriera corallina (www.billionoysterproject.org – accessibile 01/06/2017).

4.3 Impiego dei bivalvi per il biorisanamento

L'impiego di metodi biologici si sta diffondendo grazie anche all'efficacia da essi dimostrata e ai costi notevolmente inferiori rispetto ai tradizionali metodi di bonifica. I trattamenti di tipo biologico presentano comunque anche alcuni svantaggi e limiti di applicazione (Carrera e Buzzelli, 2000):

- Il risultato finale dell'intervento può portare ad avere un eventuale livello di contaminazione residua; è possibile la persistenza di contaminazione residua di frazioni xenobiotiche recalcitranti, anche nei casi in cui si siano realizzate ottime condizioni degradative.
- Le condizioni ambientali devono essere monitorate costantemente, quindi sono necessarie operazioni di mantenimento del sito nel corso del tempo;
- La conoscenza ancora incompleta dei meccanismi di degradazione di composti xenobiotici e comunque della biodisponibilità dei contaminanti da rimuovere;
- La necessità di valutare preventivamente l'efficacia del trattamento biologico.

I biorisanatori sono di due tipi:

- Invertebrati marini che comunemente vivono attaccati al substrato duro (sessili) facendo passare tra le loro strutture filtranti enormi quantità di acqua e raccogliendo particelle di cibo; per aumentarne la biomassa bisogna solo aumentare la superficie delle strutture su cui possano fissarsi. Sono animali che si nutrono di piccoli organismi e sostanza organica.
- Macroalghe che hanno bisogno di luce e che si sviluppano più in superficie. Essendo vegetali si nutrono di sostanze inorganiche.

Per allevare/coltivare entrambi non bisogna aggiungere alcun alimento. Tra gli organismi biorisanatori i mitili sono i filtratori per eccellenza e il loro allevamento vanta una lunga tradizione. E' noto che essi crescono velocemente in condizioni di acque particolarmente cariche di inquinamento organico. Come tutti i filtratori marini sono sessili e processano grandi quantitativi di acqua "ripulendola" da tutti i microrganismi e dal particolato in sospensione. Anche le ostriche sono molto apprezzate e coltivate da tempo. Hanno la stessa funzione dei mitili, ma hanno un accrescimento più lento e presentano maggiori difficoltà di allevamento (<https://remedialife.eu/media/>).

I bivalvi forniscono diversi servizi ecosistemici, per esempio come bioindicatori per monitorare i livelli di inquinanti in un corpo d'acqua e come biofiltri. Mytilidae, Ostreidae e Unionidae e altre famiglie possiedono una grande capacità di filtrazione: una singola ostrica può filtrare 190 Litri di acqua al giorno, assorbendo anche tossine o sostanze dannose ripulendo l'acqua in cui vivono. Ecco perché, così come le cozze, si possono considerare ottimi “biomonitors” ossia organismi che consentono di monitorare la salute dell'ambiente. Inoltre le ostriche forniscono cibo e habitat per centinaia di specie. I benefici per l'ecosistema non finiscono qui, in quanto la loro presenza aiuta a stabilizzare le rive e a ridurre l'erosione. Da qui nasce il progetto F.L.O.O.R. (Florida Oceanographic Oyster Restoration), che si impegna attivamente nel ripristinare l'habitat delle ostriche riciclando i gusci per costruirne delle “barriere”. Le conchiglie, in particolare quelle delle ostriche, sono il substrato ideale, per favorire la ripopolazione e la crescita di nuovi individui (Fonte: “FLOOR”, Florida Oceanographic Society, <https://www.floridaocean.org/floor>). Gli Unionidae sono rappresentati da 812 specie in tutto il mondo e includono il più grande ecosistema di cozze d'acqua dolce (Bogan and Roe, 2008). Considerando la loro ampia distribuzione, la loro flessibilità ecologica questi organismi svolgono un ruolo chiave negli ecosistemi acquatici, grazie alla loro elevata capacità di filtrazione e alla loro capacità di riciclare i nutrienti e mescolare i sedimenti (Frischer et al., 2000). Le cozze d'acqua dolce sono ampiamente utilizzate nel monitoraggio dell'inquinamento. Negli ultimi decenni il concetto di biorisanamento ha assunto una notevole importanza nel campo dell'ecologia applicata: esso permette di risolvere alcuni problemi d'inquinamento sfruttando determinate proprietà degli organismi presenti nell'ambiente. In ambiente marino, l'impiego dei bivalvi ha fornito ottimi risultati in questa direzione (Smaal, 1991). La capacità di biofiltrazione e biorisanamento dei molluschi bivalvi è stata ampiamente dimostrata per i bivalvi marini che sono tradizionalmente allevati per il consumo umano (Smaal, 1991), allo stesso modo è stata dimostrata anche l'efficienza dei rifiuti di gusci di ostrica per la rimozione del fosforo (P) nell'acqua salata (Martins et al, 2017).

BIBLIOGRAFIA

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., & Weiner, S. (2006). Mollusk Shell Formation: A Source of New Concepts for Understanding Biomineralization Processes. *Chemistry – A European Journal*, 12(4), 980-987.
- 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
- Anderson, K. A., and W. E. Hillwalker (2008). "Bioavailability.": 348-357.
- Antunes, C., T. Magalhães-Cardoso, G. Moura, D. Gonçalves, and J. Machado. 2002. Effects of Al, Ni, Co, Zn, Cd and Cu metals on the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea* (Unionidae). *Haliothis* 31: 71–84.
- Asus Maizar Suryanto Hertika, Kusriani Kusriani, Erlinda Indrayani, Rahmi Nurdiani, & Renanda B. D. S. Putra. (2018). Relationship between levels of the heavy metals lead, cadmium and mercury, and metallothionein in the gills and stomach of *Crassostrea iredalei* and *Crassostrea glomerata* [version 1; referees: 2 approved]. *F1000 Research*, 7, 1239.
- Bargagli R., Cruscianti M., Leonzio C. Bacci E., (1998). I bioindicatori. In: Eco tossicologia, Vighi e Bacci editori, Trattato di Farmacologia e Terapia, UTET. Torino, Italy. pp 40-45
- Bebianno, M. J., & Langston, W. J. (1991). Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Marine Biology*, 108(1), 91-96
- 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.
- Bruland K. W. , J. P. Riley and R. Chester (1983) Trace elements in sea water. *In Chemical. Oceanography* . Academic. Press, London, Vol. 8, pp. 157–220.
- Bryan G.W., Langston W.J., Hummerstone L.G., Burt G.R., (1985). A guide to assessment of heavy metal contamination in estuaries usigng biological indicators. *Marine biological association United Kindom Occ. Publ.*, 4: 1-92.

- Cardoso João C. R., Rute C. Félix, Vinícius Ferreira, Maoxiao Peng, Xushuai Zhang, & Deborah M. Power. (2020). The calcitonin-like system is an ancient regulatory system of biomineralization. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-18.
- Carrera P., Buzzelli M. (2000). La bonifica dei siti contaminati: tecnologie di trattamento. *Acqua e Aria* (gen.).
- Cerrano C. , Ponti M. e Silvestri S. (2004). Guida alla biologia marina del Mediterraneo. *Ananke*, 149-158
- Checa A.G., Lopez C.J., Navarro A.R., Machad J.P., (2007) - Precipitation of aragonite by calcitic bivalves in Mg-enriched marine waters. *Mar Biol*, *150*: 820-827.
- Chiou IJ, Chen CH, Li YH (2014) Using oyster-shell foamed bricks to neutralize the acidity of recycled rainwater. *Construction and Building Materials* **64**: 480–487
- Coen LD, Luckenbach MW (2000) Developing success criteria and goals for evaluating oyster reef restoration: ecological function or resource exploitation? *Ecological Engineering* **15**: 323–343.
- Coleman, N. (1980). The effect of emersion on cadmium accumulation by *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, *11*(12), 359-362.
- Craig P.J., Hutzinger O. (1992). The Natural Environment and the Biogeochemical Cycles. Springer Verlag: p.25.
- 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.
- Dar, M., Belal, A., & Madkour, A. (2018). The differential abilities of some molluscs to accumulate heavy metals within their shells in the Timsah and the Great Bitter lakes, Suez Canal, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, *44*(4), 291-298.
- Darriba, S., & Sánchez-Marín, P. (2013). Lead accumulation in extracellular granules detected in the kidney of the bivalve *Dosinia exoleta*. *Aquatic Living Resources*, *26*(1), 11-17
- De Alvarenga RAF, Galindro BM, de Fatima Helpa C, Soares SR (2012) The recycling of oyster shells: an environmental analysis using life cycle assessment. *Journal of Environmental Management* **106**: 102–109.

De Pol, Riccardo <1978>, & Argese, Emanuele. (2010). Inquinamento Da Metalli Pesanti in Relazione Ai Processi Metabolici: Importanza Delle Metodiche Di Speciazione; Heavy Metals Pollution Related to Metabolic Processes: Importance of Speciation Methods

Decreto Legislativo n.152 del 2006

Depledge M H & Rainbow PS (1990) Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates *Comp.Biochem.Physiol* 97C, 1-7

Du Y, Lian F, Zhu L (2011) Biosorption of divalent Pb, Cd and Zn on aragonite and calcite mollusk shells. *Environmental Pollution* **159**: 1763–1768

EFSA Journal (2010). Scientific Opinion on Lead in Food. 8(4):1570 [147 pp.].available at:<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/1570.htm>

Eisler, Ronald. (2009). Compendium of trace metals and marine biota / by *Ronald Eisler* (1st ed.). Amsterdam: Elsevier.

European Food Safety Authority: <http://www.efsa.europa.eu>

Feely R.A., Sabine C.L., Lee K., Berelson W., Kleypas J., Fabry V.J., 2004 - Impact of antropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the ocean. *Science*, 305: 362-366.

Forstner, U., W. Ahlf, W. Calmano, and M.Kersten. (D. Reidel Publ. Co., 1986) The role of the Oceans as a Waste Disposal Option. In: G.Kullenberg, Ed., pp. 597-615.

Fratini G., 2012. Effect of different farming sites and techniques on the growing performances and quality of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg). Tesi di dottorato. Università degli Studi di Firenze. 162 p.

Frischer, M. E., Nierzwicki-Bauer, S. A., Parsons, R. H., Vathanodorn, K., & Waitkus, K. R. (2000). Interactions between zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and microbial communities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(3), 591-599.

Galli, Corsini & Marinovich. (2004). Tossicologia. Padova: Piccin.

George, S., Pirie, B., & Coombs, T. (1980). Isolation and elemental analysis of metal-rich granules from the kidney of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 42(2), 143-156.

Ghetti P.F. (2002), Elementi di ecologia , CLEUP pp 334

- Girod, Biagi, & Biagi Paolo. (2015). *Appunti di archeomalacologia*. Sesto Fiorentino: All'insegna del giglio, 170-175
- Gobas, F. A. P. C., & Morrison, H. A. (2000). Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. *Handbook of property estimation methods for chemicals*, 189-231.
- Goldberg E.D. (1975). The Mussel Watch. *Mar. Pollut. Bull.*, 6: 111-113.
- Hayward, P.J., 1990. Mollusca II: Bivalvia and Cephalopoda. In: *The Marine Fauna of the British Isles and North-West Europe*. (ed. P.J. Hayward & J.S. Ryland). *Clarendon Press*, Oxford: 731-793.
- Hayward, P.J., Wigham, G.D. & N. Yonow, 1990. Mollusca I: Polyplacophora, Scaphopoda, and Gastropoda. In: *The Marine Fauna of the British Isles and North-West Europe*. (ed. P.J. Hayward & J.S. Ryland). *Clarendon Press*, Oxford: 628-730.
- Hopkin S.P., (1989), *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Barking (UK) *Essex, Elsevier Applied Science*
- Isani G, Andreani G, Kindt M, Carpenè E. (2000). Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 46(2): 311-330.
- Jerry M. Neff Ph.D. (2002) *Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water*. *Elsevier* (8), 89-102
- Jin, C., Li, J., & Liu, X. (2020). Teosin, a novel basic shell matrix protein from *Hyriopsis cumingii* induces calcium carbonate polycrystal formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1229-1237.
- Lee CH, Lee DK, Ali MA, Kim PJ (2008) Effects of oyster shell on soil chemical and biological properties and cabbage productivity as a liming materials. *Waste Management* 28: 2702–2708.
- Li, S., Liu, C., Huang, J., Liu, Y., Zhang, S., Zheng, G., ... & Zhang, R. (2016). Transcriptome and biomineralization responses of the pearl oyster *Pinctada fucata* to elevated CO₂ and temperature. *Scientific reports*, 6, 18943.
- Libes S.M. (1992) *An introduction to marine biogeochemistry*, J. Wiley and Sons, N.Y..
- Libes, S. (1992). *An *introduction to marine biogeochemistry*. New York [etc: John Wiley. Nuova Edizione: *Introduction to marine biogeochemistry*, Elsevier, 2009

- Lindahl O, Hart R, Hernroth B, Kollberg S, Loo LO, Olrog L et al. (2005) Improving marine water quality by mussel farming: a profitable solution for Swedish society. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **34**: 131–138.
- Losso C. & A. Volpi Ghirardini (2010). Overview on ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy). *Environment International* **36**: 92–121.
- Lowenstam H.A., (1981) - Minerals formed by organisms. *Science*, **211**: 1126- 1131
- Lowenstam H.A., Weiner S., (1989) - On Biomineralization. Oxford University Press, New York, 7-24.
- Machado, J., & Lopes-Lima, M. (2011). Calcification mechanism in freshwater mussels: potential targets for cadmium. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **93**, 1778 - 1787.
- Martínez-García, C., González-Fonteboa, B., Carro-López, D., & Pérez-Ordóñez, J. (2020). Mussel shells: A canning industry by-product converted into a bio-based insulation material. *Journal of Cleaner Production*, **269**, 01 October 2020, Vol.269
- Martins, M., Santos, E., & Marques, C. (2017). First study on oyster-shell-based phosphorous removal in saltwater — A proxy to effluent bioremediation of marine aquaculture. *The Science of the Total Environment*, **574**, 605-615.
- Millero, F. (1996). *Chemical oceanography* (Second ed.). Boca Raton [etc: CRC press
- Millero, F.J., Woosley, R., Ditrolo, B., Waters, J., (2009). Effect of ocean acidification on the speciation of metals in seawater. *Oceanography* **22**, 72–85.
- Montella, Gerardo <1993>,(2018). Indici di condizione nel bivalve *Mytilus galloprovincialis*: metodi a confronto e loro applicazione in Laguna di Venezia Università Ca' Foscari di Venezia.
- Morris, J., Backeljau, T., & Chapelle, G. (2019). Shells from aquaculture: A valuable biomaterial, not a nuisance waste product. *Reviews In Aquaculture*, **11**(1), 42-57.
- Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P., Snider D., (2004) - Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern oyster. *Science*, **304**: 297-300
- Moura, G., Vilarinho, L., & Machado, J. (2000). The action of Cd, Cu, Cr, Zn, and Pb on fluid composition of *Anodonta cygnea* (L.): Organic components. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **127**(1), 105-112

- Murozumi M, Chow T J & Patterson C C (1969) Chemical concentrations of pollutant aerosols, terrestrial dusts and sea salts in Greenland and Antarctic snow strata, *Geochimica et Cosmochimica Acta* (33):1247-1294.
- Negus, C.L., 1966. A quantitative study of growth and production of Unionid mussels in the River Thames at Reading. *J. Anim. Ecol.* 35, 513-532.
- Nesto N., Bertoldo M., Nasci C., Da Ros L. (2004). Spatial and temporal variation of biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Lagoon of Venice, Italy 58, 287–291
- 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, 469–484
- Nicolai P. (1992). La scienza della bioindicazione. Guida introduttiva alle metodologie di valutazione della qualità ambientale mediante monitoraggio biologico, ENEA, PP. 8-77
- Nieboer, E., & Richardson, D. (1980). The replacement of the nondescript term ‘heavy metals’ by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution. Series B. Chemical and Physical*, 1(1), 3-26
- Osorio-Lopez C, Seco-Reigosa N, Garrido-Rodriguez B, Cutillas-Barreiro L, Arias-Estévez M, Fernández-Sanjurjo MJ et al. (2014) As(V) adsorption on forest and vineyard soils and pyritic material with or without mussel shell: kinetics and fractionation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 45: 1007–1014.
- Pan, K., & Wang, Wen-Xiong. (2009). Application of Biokinetic Model in Studying the Bioaccumulation of Cadmium, Zinc, and Copper in the Scallop *Chlamys Nobilis*, *ProQuest Dissertations and Theses*, 44-59
- Pessatti, M. L., Resgalla Jr, C., REIS, F., Kuehn, J., Salomao, L. C., & Fontana, J. D. (2002). Variability of filtration and food assimilation rates, respiratory activity and multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the mussel *Perna perna* under lead influence. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4A), 651-656.
- Phillips, D. J., & Rainbow, P. S. (1989). Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. *Marine Environmental Research*, 28(1), 207-210
- Phillips D.J.H., Segar D.A. (1986) - Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. *Mar. Pollut. Bull.*, 1: 10-17.

- 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.
- Ramesh, K., Hu, M. Y., Thomsen, J., Bleich, M., & Melzner, F. (2017). Mussel larvae modify calcifying fluid carbonate chemistry to promote calcification. *Nature Communications*, 8(1), 1-8.
- Robbins. 1999. Le basi patologiche delle malattie. Volume I. VI Edizione Piccin a cura di Contrar, Kumar, Collins. W.B. Saunders Company Philadelphia Pennsylvania-USA; pp. 492
- Schaule B.K., Patterson C.C., in: C.S. Wong (Ed.), (1983) . Trace Metals in Sea Water. *Plenum, New York*, p. 487.
- 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. Biologies*, 337(7-8), 451-458.
- Simkiss, K. (1998). Mechanisms of metal uptake. In *Metal metabolism in aquatic environments*. Springer, Boston, MA. : pp. 1-17.
- Smaal, A.C., 1991. The ecology and cultivation of mussels: new advances. *Aquaculture* 94, 245-261
- Suttle NF (2010) Mineral Nutrition of Livestock. CABI, Oxford, UK.
- The Royal Society, June (2005) - Ocean acidification due increasing atmospheric carbon dioxide. Policy document 12/05.
- Tokeshi M, Ota N, Kawai T (2000) A comparative study of morphometry in shell-bearing molluscs. *Journal of Zoology* 251: 31–38
- Tsapakos M.J., Wetterhahn K.E., (1983); The interaction of Chromium with nucleic acids. *Chem.-Biol. Interact.*, 46: 265-277.
- Vanessa Acosta, César Lodeiros, Osmar Nusett, & Mairín Lemus. (2018). BIOCUMULACIÓN Y EFECTO DEL CADMIO EN JUVENILES DEL MEJILLÓN VERDE *Perna viridis* (L. 1758) (MYTILOIDA: MYTILIDAE)I BIOCUMULACIÓN AND EFFECT OF CADMIUM IN JUVENILES THE GREEN MUSSEL *Perna viridis* (L. 1758) (MYTILOIDA: MYTILIDAE. *Saber (Cumaná, Venezuela)*, 25(1), 39-45.

- Vaughn, C.C., Hakenkamp, C.C., 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwat. Biol.* 46, 1431-1446.
- Vesk, P., & Byrne, M. (1999). Metal levels in tissue granules of the freshwater bivalve *Hyridella depressa* (Unionida) for biomonitoring: The importance of cryopreparation. *The Science of the Total Environment*, 225(3), 219-229.
- Walker, C., H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2000). *Principles of Ecotoxicology*. (2nd ed.), 132-139.
- Walles B, Troost K, van den Ende D, Nieuwhof S, Smaal AC, Ysebaert T (2016) From artificial structures to self-sustaining oyster reefs. *Journal of Sea Research* **108**: 1–9
- Weiler SK, Scholz-Barth K (2009) Green Roof Systems: A Guide to the Planning, Design, and Construction of Landscapes Over Structure. *John Wiley and Sons*, Hoboken, NJ.
- Wilbur, K. M., & Saleuddin, A. S. M. (1983). Shell formation. In *The mollusca* (pp. 235-287). Academic Press.
- Williams, R. (2001). Chemical selection of elements by cells. *Coordination Chemistry Reviews*, 216-217, 583-595.
- Yap, C., Ismail, K., Tan, A., & Omar, S. (2003). Accumulation, depuration and distribution of cadmium and zinc in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) under laboratory conditions. *Hydrobiologia*, 498(1), 151-160
- Yap, C.K., Cheng, W.H. (2013) Distributions of Heavy Metal Concentrations in Different Tissues of the Mangrove Snail *Nerita lineate*. *Sains Malaysiana*, 42 (5), pp. 597-603.
- Zapata-Vívenes E, Rojas de Astudillo L, Sánchez G, Barreto G. (2012). Heavy metals and related biomarkers in *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) collected on the coast of Sucre State, *Venezuela Cienc. Mar.* 38(3):517–528.
- 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.
- Zhanqiang, F. (2006). Comparative studies on uptake pathway of cadmium by *Perna viridis*. *Journal of Ocean University of China*, 5(1), 49-54.

Zhao, L., Milano, S., Walliser, E., & Schöne, B. (2018). Bivalve shell formation in a naturally CO₂-enriched habitat: Unraveling the resilience mechanisms from elemental signatures. *Chemosphere (Oxford)*, 203, 132-138.

Zhao, L., Schöne, B.R. & Mertz-Kraus, R. (2017). Delineating the role of calcium in shell formation and elemental composition of *Corbicula fluminea* (Bivalvia). *Hydrobiologia* 790, 259–272

Zoroddu et al. (2019). The essential metals for humans: a brief overview.

Zuin, Alessandra <1984>, & Ravagnan, Giampietro. (2014). Studio Sulle Potenzialità Di Bioaccumulo Di Metalli Tossici Da Parte Di Molluschi Bivalvi in Ambiente Lagunare. Università Ca' Foscari di Venezia.

SITOGRAFIA

<http://dipbsf.uninsubria.it/paleo/bivalvi%20%5Bmodalit%E0%20compatibilit%E0%5D.pdf> x il powerpoint

<http://omodeo.anisn.it/omodeo/molluschi.htm>

http://species-identification.org/index.php?groep=Bivalve+shells&selectie=52&hoofdgroepen_pad=%2C1%2C12%2C52

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622013000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=en

<http://www.biologiamarina.eu/Zonazione.html>

http://www.bosettiegatti.eu/info/norme/statali/2006_0152.htm

<http://www.corila.it/it>

http://www.gslunense.it/index.php?option=com_content&view=article&id=63:aragone&catid=41:geologia&Itemid=64#:~:text=La%20sostanziale%20differenza%20tra%20la,la%20differente%20carica%20elettrostatica%20di

<http://www.orsacampania.it/la-contaminazione-da-metalli-pesanti-nei-prodotti-della-pesca/>

<https://asvis.it/rapporto-asvis-2020/>

<https://cns.cnr.it/?p=532#:~:text=Le%20sostanze%20PBT%20sono%20sostanze,restando%20inalterata%20per%20lunghi%20periodi.>

[**https://cordis.europa.eu/article/id/122769-a-hard-shell-how-mussels-are-affected-by-ocean-acidification/it**](https://cordis.europa.eu/article/id/122769-a-hard-shell-how-mussels-are-affected-by-ocean-acidification/it)

https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r11_en.pdf

https://festivalsvilupposostenibile.it/public/asvis/files/Festival_2020/Eventi_Segretario/Report_ASviS_2020_FINAL8ott.pdf

<https://remedialife.eu/i-biorisanatori/>

<https://www.aulss8.veneto.it/nodo.php/2503>

https://www.bosettiegatti.eu/info/norme/statali/2006_0152.htm

<https://www.controluce.it/notizie/rapporto-asvis-2020-impatto-della-pandemia-covid-19-sugli-sdg/>

<https://www.floridaocean.org/floor>

<https://www.lenntech.it/periodica/elementi/cd.htm>

<https://www.lenntech.it/periodica/elementi/pb.htm>

<https://www.pesceinrete.com/economia-circolare-nuova-vita-per-i-gusci-di-molluschi-biomateriali-potenzialmente-utili/>

<https://www.sapere.it/enciclopedia/Bivalvi.html>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749120302682>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389420307287>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305049100002418>

Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare

<http://www.minambiente.it/>

ICRAM Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare

www.icram.org

<https://slideplayer.it/slide/9295160/>

https://moodle2.units.it/pluginfile.php/114448/mod_resource/content/1/Bioinorganica%202016-2017%20parte%201.pdf#:~:text=Ferro,%20rame%20e%20zinco,%20i%20tre%20pi%20C3%B9%20abbondanti,,V%20%20C3%A8%20stato%20individuato%20un%20ruolo%20in%20metallo-enzimi.

<http://www.parks.it/parco.laghi.avigliana/pdf/biofiltratori.pdf>

<http://www.veterinariaalimenti.marche.it/Articoli/molluschi-bivalvi-e-gasteropodi-marini-cenni-di-anatomia-e-rischi-correlati>

<https://it.wikipedia.org/wiki/Piombo>

<http://omodeo.anisn.it/omodeo/molluschi.htm>

http://www.trapaninostra.it/libri/Luigi_Bruno/Le_conchiglie_tra_natura_e_le_attivita_dell_uomo/Le_conchiglie_tra_natura_e_le_attivita_dell_uomo_di_Luigi_e_Gabriella_Bruno.pdf

<https://www.biopills.net/molluschi/>

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare la professoressa Volpi Ghirardini Annamaria e il professore Marco Picone per i preziosi insegnamenti e per avermi seguito con la didattica a distanza causa Sars-Covid 2, ma soprattutto per il tempo dedicatomi, offrendomi interessanti spunti per sviluppare, approfondire ed affinare la stesura del presente lavoro di tesi magistrale. Ringraziamenti vivissimi a tutti i professori ed ex professori, professoresses, tirocinanti e aspiranti dottori del corso Laurea in Scienze Ambientali nel Campus Scientifico presso Via Torino a Mestre. Da ciascuno ho appreso tematiche interessanti che mi permettono e mi permetteranno di guardare tutto ciò che mi è intorno in modo più scientifico e razionale. Ringraziamenti vivissimi a Mariangela Bertelle per avermi sostenuto nella ricerca bibliografica. Cordiale saluto alla Dott.ssa Anna Tortorella per il Servizio di Consulenza psicologica, Centro di Orientamento e Consulenza psicologica Cuori ESU di Venezia- Azienda regionale per il diritto allo studio universitario sede Badoer, primo piano Rio Terà dietro ai Frari San Polo 2549-30125 Venezia, per avermi ascoltato e lavorato sulle mie emozioni, sulla mia autostima, sulla mia “disabilità” (oncologica, familiare, relazionale... solo per citarne alcuni), nello stare in contatto con gli altri e nell’allontanare o risanare chi ci è “tossico” per noi. Ecco che l’università, per me, mi ha consentito una crescita non solo interdisciplinare, culturale, di competenze e conoscenze, ma anche soprattutto personale ed emotiva; sono consapevole che d’ora in poi tutto ciò sarà l’inizio di un mio percorso di crescita, un nuovo ciclo, che mi permetterà di attrarre lavoro ed aggiungere sempre più “tesoro”. In merito a ciò ringrazio il percorso intrapreso con Lara Rozza del percorso PF24CFU nelle discipline antro-psico-pedagogiche e nelle metodologie e tecnologie didattiche (DM 616/17 fit@unive.it) del Settore Carriere Post Laurem – Ufficio Carriere studenti e Diritto allo studio – Area Didattica e Servizi agli studenti Università Cà Foscari Venezia, credo che sarà una buona direzione da seguire. Infine esprimo la mia sincera gratitudine alla Dott.ssa Alessandra Zuin per avermi fornito preziosi suggerimenti per questa indagine che ho condotto con grande interesse e passione. Ringrazio tutti anche per essere sempre stati disponibili e pazienti a dirimere tutti i miei dubbi e a fornirmi aiuto nelle mie difficoltà ed accettare ed cercare di superare i miei limiti, colgo l’occasione di salutare in merito il professore Bruno Pavoni, incontrate durante il mio percorso di Laurea sia magistrale sia triennale.