



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.
Corso di laurea in Scienze Naturali**

Tesi Magistrale in Scienze della Natura

**TOSSICITA' DEI FLUORURI IN
DREISSENA POLYMORPHA (Pallas, 1771)**

**Relatore: Prof.ssa Sandra Casellato
Correlatore: Dr. Luciano Masiero
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Elisa Bertolin

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

*“Il fenomeno non è distaccato
dall’osservatore, piuttosto è intrecciato
e avviluppato nell’individualità
dell’osservatore”*

(J. Wolfgang Goethe “Teoria della natura: aforismi”)

INDICE

CAP. 1 INTRODUZIONE

- 1.1 I fluoruri nell'ambiente**
- 1.2 La tossicità dei fluoruri in piante e animali**

CAP. 2 SCOPO DELLA RICERCA

CAP. 3 DREISSENA POLYMORPHA

- 3.1 Descrizione del bivalve**
- 3.2 Aspetti biologici**
- 3.3 Areale di distribuzione**
- 3.4 Problematiche passate ed attuali**

CAP. 4 METODOLOGIE DELL'ESPERIMENTO

- 4.1 Descrizione stazione e periodo di campionamento**
- 4.2 Test systems**

CAP. 5 RISULTATI

- 5.1 Risultati test acuti**
- 5.2 Risultati long- term**

CAP. 6 DISCUSSIONE

Ringraziamenti

BIBLIOGRAFIA

CAP. 1. INTRODUZIONE

1.1 I fluoruri nell'ambiente

Gli organismi acquatici che vivono in acque dolci possono essere più colpiti dall'inquinamento da fluoruri di quelli che vivono in acque salate o salmastre, perché la biodisponibilità di ioni fluoro si riduce con l'aumentare della durezza dell'acqua e quindi della salinità. Il fluoro è l'elemento chimico della tavola periodica degli elementi che ha come simbolo F e come numero atomico 9. È un gas velenoso e di colore giallognolo, è l'elemento chimicamente più reattivo di più piccole dimensioni e con la maggior elettronegatività. Nella sua forma pura è altamente pericoloso, causa gravi ustioni chimiche a contatto con la pelle. A causa della sua grande reattività, non può essere trovato in natura nel suo stato elementare; i fluoruri inorganici sono molto più abbondanti di quelli organici. La maggior fonte naturale sedimentaria di fluoruri inorganici è la crosta terrestre, dove si trovano come fluoroapatite, fluorite e criolite. I Vulcani sono la loro fonte gassosa, poiché li rilasciano nell'atmosfera come fluoruro di idrogeno.

Il fluoruro di idrogeno si utilizza per il 60% nella produzione di refrigeranti, e per il restante nella produzione di erbicidi, prodotti farmaceutici, gasolio, alluminio, plastica, componenti elettrici e lampade fluorescenti. Il fluoruro di idrogeno si usa anche nella produzione di vetro smerigliato e in metallurgia. Responsabile dell'apporto di fluoruri è l'attività umana come la raffinazione dell'alluminio e fabbricazione di ceramica, vetro, processi manifatturieri chimici che riversano nelle acque superficiali tale elemento tossico. In qualche caso sono state misurate nelle acque dei fiumi concentrazioni di fluoruri sopra i 10 mg F⁻/l.

I fluoruri rilasciati in aria dai vulcani e dall'industria sono trasportati dal vento e dalla pioggia verso le acque, il suolo e le sorgenti d'acqua circostanti.

Il fluoruro di idrogeno viene idratato dalla pioggia, dalle nubi e dalla nebbia per formare acido fluoridrico che si riverserà sul terreno.

I fluoruri nell'acqua e nel suolo formano forti associazioni con sedimenti o particelle presenti nell'acqua e rimangono in soluzione in condizioni di pH e durezza relativamente bassi.

Gli animali acquatici come pesci e invertebrati possono assumere i fluoruri direttamente dall'acqua o dal cibo. Questa assimilazione dei fluoruri è in funzione della loro concentrazione media nell'acqua, del tempo di esposizione e della temperatura dell'acqua.

Anche se possono essere eliminati attraverso sistemi di escrezione, i fluoruri tendono ad essere accumulati nell'esoscheletro di invertebrati e nei tessuti ossei dei vertebrati. L'accumulazione dei fluoruri in tali strutture può essere vista come un meccanismo di difesa, che sottrae il fluoro alla circolazione corporea. La loro azione tossica nei confronti degli animali acquatici sta nel fatto che, gli ioni di fluoro agiscono come veleno, inibendo l'attività enzimatica ed infine interrompendo processi metabolici come la glicolisi e la sintesi proteica.

Il reale meccanismo a livello molecolare col quale il fluoro inorganico inibisce l'attività enzimatica e interrompe i processi metabolici rimane ancora materia di discussione.

La combinazione dei fluoruri con ioni calcio e magnesio, che in molti casi sono necessari come cofattori di molti enzimi, può essere un meccanismo principale (Camargo, 2003). Conseguentemente livelli sicuri di F^- per la vita acquatica non sono ancora stati determinati, inoltre la risposta è molto diversa da parte di specie differenti anche all'interno dello stesso phylum.

1.2 Tossicità dei fluoruri in uomo, piante e animali

Sintomi nell'uomo

Il fluoruro di idrogeno penetra rapidamente nell'organismo attraverso la pelle ed i tessuti, danneggiando le cellule e provocando malfunzionamenti. La gravità dell'intossicazione dipende da quantità, forma e durata dell'esposizione, come pure dall'età del soggetto esposto e dalle condizioni di salute preesistenti. La sostanza può essere assorbita nell'organismo per inalazione, oltre che per contatto diretto.

A causa di una perdita (bombole), può essere raggiunta molto rapidamente una concentrazione dannosa di questo gas in aria. E' possibile che la popolazione in generale sia esposta ai fluoruri in presenza di aria, cibo, acqua e suolo contaminati. Le persone che lavorano o vivono in prossimità di industrie dove si utilizzano sostanze che contengono fluoruri possono essere esposti a livelli superiori. Precisamente gli effetti provocati da tossicità dei fluoruri che si possono vedere nell'uomo sono:

- **Vie respiratorie:** sensazione di bruciore, tosse, mal di gola, respiro affannoso, difficoltà respiratoria, vertigini. I sintomi dell'edema polmonare spesso non si manifestano prima di alcune ore e sono aggravati dallo sforzo fisico. Sono pertanto essenziali il riposo e l'osservazione medica. Si deve prevedere l'immediata somministrazione di una appropriata terapia inalatoria da parte di un medico o personale autorizzato;
- **Cute:** arrossamento, dolore, ustioni cutanee e vesciche. Al contatto col liquido si verifica congelamento;
- **Occhi :** arrossamento, dolore, gravi ustioni profonde;
- **Ingestione:** dolore addominale, intorpidimento mentale, nausea, stato d'incoscienza, vomito, collasso. L'ingestione di fluoruro di idrogeno può danneggiare l'esofago e lo stomaco. Il danno può progredire per diverse settimane, portando un graduale e duraturo restringimento del tubo esofageo.

Non esiste un test specifico per il rilevamento dell'acido fluoridrico negli uomini; tuttavia, l'ipocalcemia e un'elevata concentrazione sierica potrebbero indicare che vi è stata esposizione. I livelli sierici normali di acido fluoridrico sono $<20 \mu\text{g/L}$, ma variano sostanzialmente sulla base dell'assunzione alimentare e dei livelli ambientali o dalla gravità degli effetti tossici. In determinati casi è possibile effettuare una biopsia ossea per misurare l'esposizione a lungo termine ai fluoruri (ATSDR 2001, 2003).

Sintomi nelle piante

La quantità assorbita dalle piante dipende dal tipo di pianta, dal tipo di terreno e dalla quantità ed il tipo di fluoro presente nello stesso. Con le piante che sono sensibili all'esposizione da fluoro persino una bassa concentrazione di fluoro può causare danni alle foglie ed un declino nella crescita.

Sintomi in animali

Gli animali che mangiano piante contenenti fluoro possono accumulare grandi quantità di fluoro nei loro corpi. Gli invertebrati marini e d'estuario in più recenti studi di laboratorio (Camargo, 2003) hanno mostrato che la tossicità dei fluoruri negli invertebrati acquatici può decrescere con l'incremento della taglia del corpo e dei contenuti di calcio cloruro nell'acqua. Una concentrazione letale di fluoruri causando intossicazione acuta in pesci, porta prima della morte ad avere dei sintomi di fluorosi. Inizialmente è presente una condizione di letargo e comportamento apatico accompagnato da anoressia, decrescita del livello respiratorio, aumento dei livelli di fluoruri nelle ossa, oscuramento della pelle e un aumento delle secrezioni mucose. Poi si possono notare nei pesci dei vaghi movimenti con perdita di equilibrio. Si arriverà così alla morte dei pesci in uno stato di parziale o completa contrazione/paralisi muscolare. In più l'elevata concentrazione di fluoruri può causare un ritardo nella schiusa di uova di pesci d'acqua. Non solo la durezza dell'acqua e la taglia dei pesci, ma anche la temperatura può influire sulla tolleranza dei pesci alla tossicità di fluoruro. E' stato visto che nella trota un aumento della concentrazione di ioni cloruro porta ad una maggiore escrezione di fluoruri..

CAP. 2 SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo mio lavoro è stato quello di valutare la tossicità dei fluoruri su *Dreissena polymorpha*. Questo è un bivalve non-indigeno invasivo, che, proprio grazie ai suoi ampi livelli di tolleranza nei confronti dei parametri ambientali, si è rapidamente diffuso dalla sua area di origine in mezzo mondo.

Dalla letteratura si sa che questi xenobiotici sono presenti in molti ecosistemi acquatici e sono in continuo aumento le loro concentrazioni, come effetto dell'aumento del loro utilizzo in molte attività antropiche.

Gli esperimenti che ho inteso portare avanti, sottoponendo la specie a diverse concentrazioni di fluoruri, sia in test acuti che cronici, forniscono risultati che mi consentiranno di effettuare una comparazione con i dati riportati dalla letteratura relativi alla tolleranza di altre specie di invertebrati nei confronti di queste sostanze.

CAP. 3 DREISSENA POLYMORPHA

3.1 Descrizione del bivalve



Fig. 1: Gruppo di individui di *D. polymorpha* attaccati con il bisso ad un bastoncino

Posizione sistematica:
Classe = BIVALVIA
Sottoclasse = Heterodonta
Ordine = VENEROIDA
Superfamiglia = DREISSENIDAE
Famiglia = DREISSENIDAE
Genere = *Dreissena*
Specie = *Dreissena polymorpha*

Si dice *Dreissena polymorpha* perché la conchiglia è di forma varia, talvolta con cerniera di tipo eterodonte (Baccetti *et al.*, 1994).

Come tutti i bivalvi possono essere chiamati anche *Pelecypoda* dal greco *pelekis*, accetta e *pous*, *podos*, piede. Sono compressi lateralmente e le due valve della conchiglia di *D. polymorpha* sono tenute insieme dorsalmente da un legamento a cerniera che determina l'apertura ventrale delle valve. I muscoli adduttori lavorano in maniera antagonista al legamento a cerniera mantenendo le due valve ravvicinate. Questa è triangolare, allungata con bordo superiore angolato e inferiore ristretto leggermente concavo. La conchiglia assomiglia per forma a quella di una cozza, *Mytilus edulis* (Linneo, 1758), può raggiungere i 50 mm; le dimensioni medie variano dai 20 ai 30 mm. La colorazione alterna bande più scure a quelle più chiare proprio per questo tale bivalve è conosciuto come “zebra mussel”, cozza zebrata. Si muove estendendo il piede muscolare attraverso l'apertura tra le due valve. Il bivalve pompa sangue nel piede, rendendolo turgido in modo che agisca come un ancora nel fango o nella sabbia, quindi i muscoli longitudinali si contraggono per accorciare il piede e far trascinare in avanti l'animale (Cleveland *et al.*, 2003).

3.2 Aspetti biologici

I sessi in *D. polymorpha* sono genericamente separati ma non rari sono i casi di ermafroditismo (Baccetti *et al.*, 1994). Il ciclo di sviluppo della *Dreissena polymorpha* è distinto in tre fasi: larva *veliger*, *post-veliger* o giovani individui ed adulti. Se le uova vengono espulse all'esterno dalle femmine che il maschio feconda si ha la fecondazione esterna se la fecondazione avviene all'interno della camera palleale si ha quella interna. La schiusa avviene dopo tre cinque giorni, le larve *veliger* trascorrono un mese di vita planctonica, per poi fissarsi tramite il bisso sul substrato o su piante. *Dreissena* colonizza tutte le superfici dure sommerse: pareti in cemento, tubature in metallo, bottiglie di vetro, ruote in gomma, sassi e strutture in legno. I nuovi nati durante l'estate incominciano a fissarsi in settembre. *D. polymorpha* si alimenta filtrando le particelle di cibo

sospeso nell'acqua acquisendo così un ruolo importante nel ciclo della materia e nel flusso di energia dell'ecosistema lacustre. Filtra organismi microscopici vegetali animali (fitoplancton, rotiferi, protozoi) e composti inorganici. L'acqua entra nel sifone inalante e nell'apparato branchiale: le particelle più piccole vengono dirette alla bocca. Nello stomaco si ha un'ulteriore cernita: le particelle più piccole sono spinte da correnti ciliari nei diverticoli digestivi; quelle grossolane sono trasportate nell'intestino medio. Da studi fatti in laboratorio si è potuto vedere che il processo di filtrazione viene influenzato da parametri quali la qualità e quantità del fitoplancton, temperatura, torbidità, pH e viscosità della depressione (Morton, 1971; Hinz e Scheil, 1972; Stanczykowska *et al.*, 1975). Si è osservato, da casi presi in considerazione da questi autori, che la filtrazione aumenta all'aumentare della temperatura e del pH dell'acqua (pH > 7-8). L'alta viscosità dell'acqua porta a un decremento della filtrazione.

Le larve di *Dreissena* sono un alimento per giovani pesci e per alcune specie di copepodi (Stanczykowska *et al.*, 1975).



Fig. 2: Numerosi esemplari di *D. polymorpha* adesi ad un vaso

3.3 Areale di distribuzione

Dreissena polymorpha è un bivalve originario dell'area Ponto-Caspiana.

La distribuzione di questo bivalve rappresenta la prima massiccia invasione di specie originarie da quest'area. E perciò fornisce un buon esempio di come e in che direzioni gli invasori Ponto-Caspiani sono in grado di estendere il proprio areale invasivo (Strayer & Smith, 1993).

La costruzione di canali artificiali che hanno fin dal 18° secolo connesso tra loro i fiumi Dnieper, Neman e Vistula con altri fiumi europei hanno determinato dei corridoi di diffusione, che coprono l'intera superficie del centro Europa e delle coste del Mar Baltico (Kinzelbach 1992; Minchin *et al.*, 2002). Recentemente è stata segnalata anche in Spagna nella parte sud del fiume Ebro (Araujo R., 2004) (Araujo & Álvarez, 2001) e anche nel lago Sheelin, Irlanda settentrionale (Millane *et al.*, 2008).

In Italia, la specie è segnalata per la prima volta nel lago di Garda nel 1969 (Giusti & Oppi, 1972) (Franchini, 1978), probabilmente trasportata sotto la chiglia delle imbarcazioni da diporto provenienti da altri laghi europei. Questo mollusco è sopravvissuto al viaggio grazie al fatto che il bisso offre all'animale la possibilità di attaccarsi fortemente a qualsiasi substrato duro.

Successivamente è stata segnalata la sua presenza nel Lago di Ledro nel 1973 (Bianchi *et al.*, 1974) nel lago di Caldonazzo nel 1992 (Dalfreddo & Maiolini, 2003). Nel settembre 2001 è stata osservata per la prima volta nel lago Grande di Monticolo, si tratta del primo ritrovamento della specie in Alto Adige (Morpurgo & Thaler, 2002). Dal Garda grazie al trasporto passivo da parte dei natanti e delle larve planctoniche, è dilagata nel bacino padano spingendosi a colonizzare anche il lago Maggiore, Lugano, Como e Iseo (Camusso *et al.*, 2001) (Roncaglio & Borsani, 2005). È stata segnalata anche sui piloni delle darsene e sulle cannuce del Transimeno (Spilinga *et al.*, Chiappafreddo U., Pirisinu Q., 2000). Nel 2003-2005 si è registrata la presenza di organismi di "zebra mussel" anche nel lago artificiale Paviana in Toscana (Lori & Cianfanelli, 2006). Oltre alla presenza cospicua in fiumi della Turchia e Europa come Volga, Don, Dnieper e Danubio

esemplari di *Dreissena polymorpha* si possono trovare anche in laghi del Nord America : lago Superiore, Michigan, St clair, Ontario (May *et al.*, 2006; Strayer, 1991; Schloesser *et al.*, 1996) e nel fiume Hudson a New York (Strayer *et al.*, 1994; Strayer & Smith, 1996; Strayer *et al.*, 1998).

3.4 Problematiche passate ed attuali relative alle invasioni biologiche

Nel corso degli ultimi tempi un gran numero di nuove specie si è aggiunto alla fauna ed alla flora italiane ed europee superando in un periodo relativamente breve le barriere geografiche presenti tra regioni distanti e spesso differenti dal punto di vista climatico. Questi organismi traggono incentivo a moltiplicarsi dai continui traffici commerciali e dal degrado degli ecosistemi. Vengono continuamente monitorati perché provocano danni all'economia e alla sicurezza sanitaria. Scenari di questa invasione europea sono soprattutto il biota marino e quello delle acque interne. Le immissioni e le introduzioni accidentali di specie esotiche come *Dreissena polymorpha* rischiano di alterare irrimediabilmente la fisionomia e la consistenza delle peculiari comunità di organismi autoctoni endemici, evolutisi in condizioni di isolamento (Leppakoski *et al.*, 2003). La nascita di idrovie artificiali ha portato alla caduta delle antiche barriere geografiche come quelle che distaccavano i bacini pontocaspici dal Mar Baltico e dai fiume dell'Europa media. Questi sono i percorsi preferenziali che, secondo questi ultimi autori ha seguito *Dreissena polymorpha* dopo essere stata confinata nell'area ponto-caspiana dalle glaciazioni pleistoceniche.

Le attività antropiche hanno rappresentato un fattore di accelerazione di un naturale processo di riconquista dell'antico areale di distribuzione, ridotto o frammentato dalle ultime glaciazioni o da più antichi eventi geologici, che hanno lasciato nei mari e nelle acque interne europee molte nicchie ecologiche solo parzialmente occupate. Anche l'Italia entra in questa situazione e dal quadro delle immisioni di organismi acquatici esotici fornitoci dalla letteratura si percepisce che *Dreissena polymorpha* arrivò nel lago di Garda dopo aver oltrepassato passivamente la catena alpina nel 1969. L'impatto di *Dreissena*

polymorpha sugli ecosistemi lacustri e fluviali evidenzia dinamiche e modalità d'inserimento spesso presenti tra le specie invasive. Ad un'iniziale "onda biologica" (biological wave) consistente in una massiccia proliferazione del bivalve nel nuovo habitat segue una graduale riduzione numerica dovuta anche all'aumentata pressione di predatori e parassiti, che ne favorisce nel contempo un inserimento più armonico nella biocenosi (Leppakoski *et al.*, 2003).

Nelle acque europee come in quelle del lago di Garda le proliferazioni di organismi alloctoni trovano incentivo nella destrutturazione delle comunità biotiche originarie, conseguente all'impatto delle molteplici azione antropiche. Anche nei mari spesso vengono segnalati specie di animali e vegetali esotici, e in particolare nell'Adriatico settentrionale, dove agli stress provocati dalla variabilità dei parametri ambientali si sommano quelli derivanti dall'eutrofizzazione, dall'inquinamento chimico, dall'overfishing e dall'acquacoltura.

Ci sono molti altri molluschi non indigeni che sono stati segnalati anche nell'Adriatico e nei sistemi lagunari ad esso associati: *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), *Anadara inaequalis* (Bruguère, 1789), *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846), *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), *Musculista senhousia* (Benson in Cantor, 1842) e *Xenostrobus securis* (Lamarck, 1819). Questi giunti in maniera accidentali o per scopi di molluschicoltura, hanno dimostrato di competere con successo con le specie indigene determinandone in molti casi la riduzione numerica di queste ultime. L'acquacoltura con l'introduzione di organismi marini di paesi esteri rappresenta una delle vie d'ingresso di specie alloctone indesiderabili.

Alexandrium catenella (Whedon e Kofoid) Balech, 1985, *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) e *Karenia brevis* (Davis, 1948) in grado di originare "maree rosse" e produrre neurotossine idrosolubili o liposolubili che, accumulate in filtratori come mitili possono causare nell'uomo gravi sintomi del tipo PSP (paralytic shellfish poisoning) o NSP (neurotoxic shellfish poisoning). L'ultimo tipo di biointossicazione è causata soprattutto da *Karenia brevis* un tempo endemica del golfo del Messico. A partire dagli anni '70 si è segnalato in Europa un'incremento di sindromi di tipo PSP, NSP, DSP (diarrhetic shellfish poisoning)

provocate da tossine microalgali. Rischi ulteriori alla salute umana possono derivare dall'introduzione incontrollata di specie parassite che insieme ai loro ospiti esotici possono rivelarsi tossici nei confronti degli organismi indigeni. Come per esempio nel caso delle popolazioni dei gamberi *Austropotamobius pallipes italicus* (Lereboullet, 1858) e *Astacus astacus* (Linneo, 1758) d'acqua dolce decimata da una grave epizoozia determinata dal fungo *Aphanomyces astaci* Schikora . L'immissione di pesci, crostacei o vegetali esotici in bacini d'acqua dolce, fluviali e lacustri finisce con l'eliminazione di organismi endemici a seguito di competizione, predazione, ibridazione o diffusione di parassiti. Questo comporta la necessità di una gestione complessiva degli ambienti acquatici basata sempre più su criteri rigorosi dal punto di vista ecologico piuttosto che da quello della semplice produttività.

CAP. 4 MATERIALI E METODI

4.1 Descrizione stazione e modalità di raccolta

La raccolta degli esemplari di *Dreissena polymorpha* è stata effettuata sulla sponda meridionale del lago di Garda nella località Padenghe (BS). L'ambiente di raccolta è pietroso e ghiaioso a ridosso di un' area con canneti (Fig.3 e 4).

Le raccolte sono state fatte manualmente da un sommozzatore, collaboratore del laboratorio di Ecologia del Benthos, a profondità comprese tra i 3 e i 5 metri, essendo questa la profondità dove la specie è abbondante. Una tale modalità di campionamento è stata necessaria perchè c'era la necessità di raccogliere delicatamente gli individui vivi e sani, per cui molto spesso sono stati asportati dal fondo del lago sassi e legni sui quali erano adesi numerosi individui del bivalve.



Fig.3: Località Padenghe, molo dal quale si sono realizzate le immersioni per le raccolte subacquee



Fig.4: Stazione di Padenghe: località in mezzo al canneto

Gli esemplari raccolti sono stati acclimatati prima degli esperimenti in laboratorio per circa 15 giorni in una cella termostata alla temperatura di 17 °C in cristallizzatori di vetro della capienza di 600 cc. di acqua del lago di Garda (Fig. 5).



Fig.5: Cristallizzatori con aeratori per l'ossigenazione dell'acqua

Durante l'acclimatazione in acqua continuamente ossigenata gli esemplari sono stati alimentati con LIQUIFRY MARINE costituito da destrina, fiore della pianta del pisello, uova intere, lievito e conservanti, un cibo composto per organismi acquatici filtratori sia marini che di acqua dolce.

4.2 Test systems

Preparazione delle soluzioni

La sostanza xenobiotica usata per testare gli animali è un sale di fluoro, il fluoruro di sodio (NaF); partendo da una soluzione madre di 10.000 mg/l di F^- (22,105 grammi in 1 litro di acqua distillata) misurati con la bilancia analitica (Fig.6) per arrivare alle concentrazioni volute applicate a un volume di 600 ml di acqua del lago di Garda per ogni vaschetta.



Fig.6: Bilancia analitica, usata per misurare la quantità di NaF

Esperimenti acuti

Per gli esperimenti acuti sono stati selezionati gli individui con un range dimensionale da 10 a 12 mm. Sono stati allestiti cristallizzatori con 600 ml d'acqua proveniente dal lago di Garda (zona d'origine degli animali testati), collegati a degli aereatori per garantire l'ossigenazione ottimale nell'acqua. Si sono eseguite 3 repliche per ogni concentrazione ; in ogni replicato sono stati usati 5 individui per un totale di 15 individui per ogni concentrazione. Contemporaneamente si sono allestiti anche 3 repliche di controllo seguendo le stesse modalità , ma nelle quali non si è aggiunto il xenobiotico.

Le concentrazioni usate in un primo esperimento perlustrativo sono state: 5, 10, 20, 40, 80 mg/l di fluoro.

Successivamente, vista la pressoché completa sopravvivenza in questo primo test, abbiamo ritenuto opportuno effettuare un secondo esperimento a dosi di fluoruri maggiori, rispettivamente 120, 160, 200, 360, 720 mg/l.

Il parametro di riferimento per i test acuti è stato la mortalità. Gli individui sottoposti al test sono stati continuamente monitorati e si sono fatte osservazioni anche relative a: i tempi di chiusura delle valve su sollecitazione e eventuali cambiamenti di colore delle valve stesse.

Per evitare una eccessiva evaporazione dell'acqua delle vaschette, che avrebbe potuto variare la concentrazione del fluoro queste sono state chiuse con un piano di plexiglas. All'inizio e alla fine dell'esperimento abbiamo misurato il pH e il contenuto di ossigeno disciolto, mediante pH-metro CRISON Mod. micro pH 2001 (Fig. 7) e ossimetro modello YSI 55 (Fig.8).

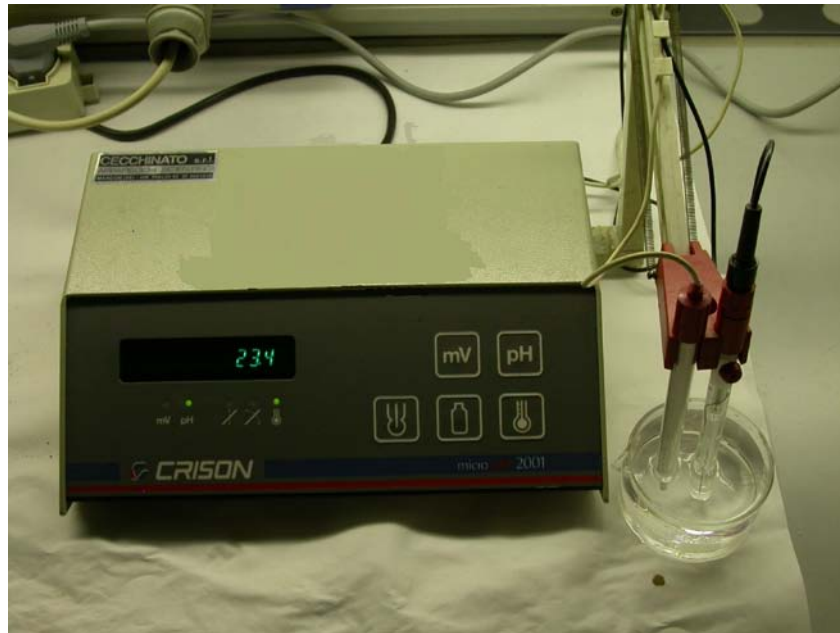


Fig. 7: pHmetro



Fig.8: Ossimetro posizionato per stimare l'ossigeno disciolto

Si considerava da eliminarsi l'esperimento se fra gli individui dei controlli c'era una mortalità superiore al 10 %. Durante i test acuti gli animali non venivano alimentati.

Giornalmente e alla fine delle 96 ore abbiamo misurato la concentrazione dello ione fluoro nell'acqua, con un misuratore di ioni ION SPECIFIC METER, HANNA INSTRUMENTS, Mod. HI 93729 per poterla confrontare con la concentrazione iniziale nominale (Fig.9).



Fig.9: Misuratore della concentrazione di ioni F^- , micropipetta, Fluoride reagent, cuvette, pinzette, provette; soluzione di F^- da aggiungere a cristallizzatori

Gli organismi, man mano che morivano, venivano congelati in azoto liquido e conservati in freezer a -80° , per ulteriori studi da eseguire in un secondo momento, per la valutazione dell'accumulo dei fluoruri nei tessuti degli organismi trattati.

I dati raccolti ci hanno permesso di calcolare i seguenti parametri:

-LC50 (Letal concentration fifty) a 96h', esprime la concentrazione alla quale si ha la mortalità del 50% degli organismi trattati in 96 h';

-NOEC (no observed effect concentration) cioè la concentrazione di fluoruri che non dà nessun effetto evidente;

-LOEC (lowest observed effect concentration) cioè la più bassa concentrazione che da effetti;

-MATC (maximum acceptable toxicant concentration) cioè il range tra i valori di NOEC e LOEC.

Calcolo dell' LC50

I dati delle percentuali di mortalità sono stati trasformati con l'analisi dei Probit (Finney 1952). Dal momento che la relazione tra le varie risposte (percentuale di mortalità) e concentrazioni usate è una sigmoide, per il calcolo dell'LC50 è stato necessario trasformarla in una retta facendo riferimento al logaritmo della concentrazione e al probit corrispondente alle varie percentuali di mortalità trovate.

Esperimenti cronici

Per gli esperimenti cronici ci siamo avvalsi dello stesso materiale di laboratorio del test acuto e della stessa acqua proveniente dal lago di Garda, usando però concentrazioni più basse indicateci dall'intervallo tra il NOEC e il LOEC (MATC). Il tempo di esposizione degli esemplari al xenobiotico usato è stato di 18 giorni. Le osservazioni durante questo periodo non si sono limitate a segnalare la morte degli individui, ma hanno fatto riferimento anche a parametri "subcronici" come: la lentezza nella chiusura delle valve, una volta stimolato l'animale in acquario, eventuali cambiamenti di colore delle valve e loro consistenza.

I controlli, allestiti in contemporanea, non dovevano fornire, come negli esperimenti acuti, una mortalità superiore del 10 % dei individui, qualora si fosse verificata una tale situazione l'esperimento sarebbe stato annullato.

Durante gli esperimenti cronici gli animali venivano regolarmente alimentati ogni giorno con LIQUIFRY MARINE.

CAP.5 RISULTATI

5.1 Risultati degli esperimenti acuti (short-term)

1° esperimento

Le concentrazioni usate per questo primo esperimento (Tab.1), in assenza di indicazioni precise circa la tossicità di questo xenobiotico nei confronti di *Dreissena polymorpha*, mi hanno fornito risultati che sono serviti per allestire il 2° esperimento. Sottoponendo, infatti, gli esemplari a concentrazioni comprese tra 5 e 80 mg/l (range esplorativo), ho ottenuto risultati alquanto confusi, ma che, comunque, mi hanno consentito di capire che la concentrazione più elevata usata (80 mg/l) dava una limitata mortalità degli individui e non mi permetteva di calcolare il parametro LC50.

	24 h'	48 h'	72 h'	96 h'	% morti
Fluoruri (mg/l)	Ind.morti	Ind.morti	Ind.morti	Ind.morti	mortalità
Controllo	0	1	0	2	12.5
5	0	0	0	0	0
10	0	1	0	0	4.16
20	1	1	0	1	12.5
40	0	0	0	2	8.3
80	0	1	0	0	4.16

Tab.1: Dati mortalità relativi al 1° esperimento esplorativo

Questo primo test, comunque, mi è stato utile, perché mi ha permesso di seguire il comportamento dei fluoruri disciolti in acqua, nel tempo dell'esposizione. Infatti, ho misurato ogni 24 ore i valori della loro concentrazione, per verificare se alla fine dei 4 giorni del test acuto risultasse molto differente da quella iniziale (Tab.2). Ho misurato anche i valori del pH e dell'ossigeno disciolto alla fine dell'esperimento e ho verificato che non c'erano grosse variazioni rispetto ai valori iniziali delle acque usate.

	24 h'	48 h'	72 h'	96 h'
Fluoruro (mg/l)	Conc.F reale media e dev.st.F-	Conc.F reale media e dev.st.	Conc.F reale media e dev.st.	Conc.F reale media e dev.st.
Controllo	0,18 ± 0.006	0,15 ± 0.02	0,21 ± 0.06	0.24 ± 0.08
5	5.02 ± 0.06	5.23 ± 0.47	3.05 ± 1.67	2,93 ± 1.14
10	11,83 ± 2.41	12,07 ± 1.50	0,52 ± 2.42	8.57 ± 1.58
20	19,5 ± 0.06	17,17 ± 4.77	15.47 ± 1.80	17.40 ± 2.34
40	40,33 ± 3.91	36.87 ± 3.80	32.60 ± 7.61	31.40 ± 4.16
80	84,27 ± 3.33	75,33 ± 7.60	36.87 ± 2.08	32,8 ± 0.72

Tab.2:Variazione della concentrazione reale dei fluoruri nelle 96 ore del test acuto

I dati ottenuti con lo strumento di misurazione dei fluoruri nell'acqua (vedi cap. Materiali e Metodi) sono, in qualche caso, difficilmente interpretabili, ma nel complesso ho potuto osservare, che alla fine dell'esperimento la concentrazione dei fluoruri risultava mediamente diminuita di un terzo rispetto a quella iniziale.

2° esperimento

Nel secondo esperimento ho scelto una serie di concentrazioni più' alte, comprese tra 120 e 720 mg/l.

Alle concentrazioni più elevate (360 e 720 mg/l) gli animali cominciavano a morire già dopo le prime 24 ore e a 720 mg/l ho ottenuto la mortalità completa degli individui alla fine dell'esperimento. Questo mi ha consentito di calcolare il valore di LC50, avendo ottenuto sia la sopravvivenza totale degli individui ad una data concentrazione che la mortalità totale degli individui esposti, ad un' altra concentrazione (Tab. 3 e Fig.10). Ho stimato, inoltre, il range del MATC tra i valori del NOEC (160 mg/l) e del LOEC (2000 mg/l).

	24 h'	48h'	72h'	96h'	% morti
Fluoruri (mg/l)	Ind.morti	Ind.morti	Ind.morti	Ind.morti	mortalità
controllo	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0
160	0	0	0	0	0
200	0	1	0	0	6
360	0	4	2	0	30
720	9	3	0	3	100

Tab.3: Dati della mortalità di *D. polymorpha* nel secondo esperimento

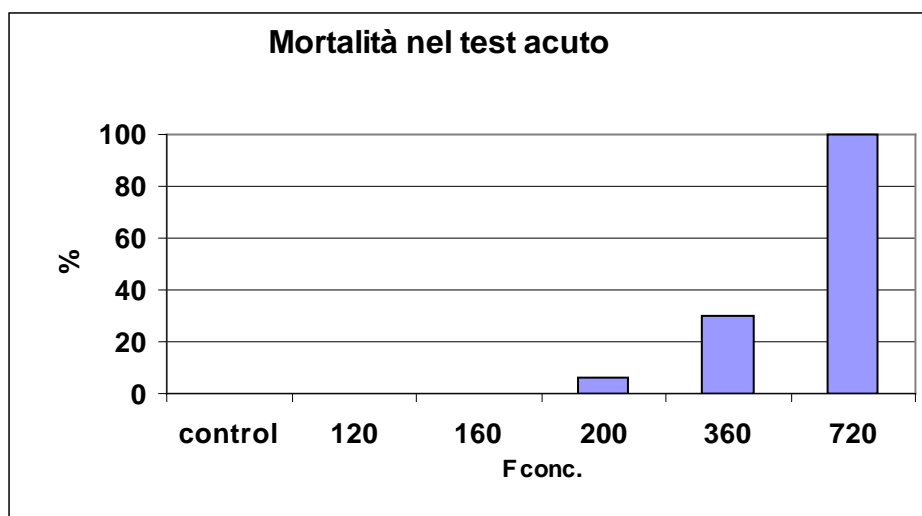


Fig.10: Variazioni del tasso di mortalità di *D. polymorpha* alle concentrazioni usate nel 2° esperimento

Il valore del LC50, cioè la concentrazione alla quale muore il 50% degli individui esposti è stato calcolato estrapolandolo dalla curva ottenuta con le percentuali di mortalità trasformate in probit (vedi Tab.4) e le concentrazioni trasformate in logaritmi naturali. Il valore è risultato uguale a 403,428 (Fig. 11).

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.30	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Tab.4 Trasformazione delle percentuali di mortalità in valori Probit

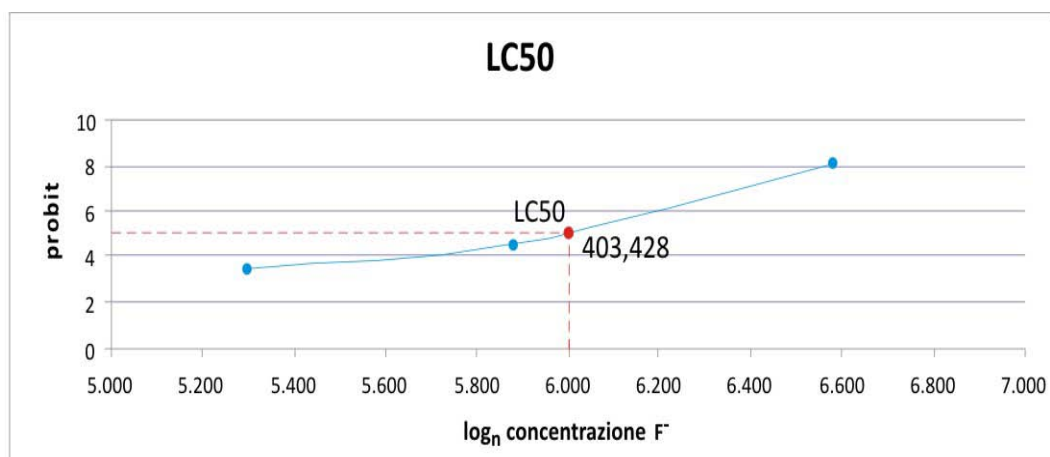


Fig.11: Valore del LC50 calcolato estrapolandolo dai risultati ottenuti

Anche durante questo secondo test, ho tenuto sotto controllo il pH e l'ossigeno disciolto che non sono variati rispetto ai loro valori iniziali e giornalmente ho stimato la concentrazione reale dei fluoruri in soluzione (Tab.5, Fig.11).

	24 h'	48 h'	72 h'	96 h'
Conc. fluoruri mg/l	Conc. media reale e dev. st.	Conc. media reale e dev.st.	Conc. media reale e dev.st.	Conc. media reale e dev.st.
Controllo	0.11 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.1 ± 0
120	84.06 ± 13.94	85.3 ± 3.51	88 ± 2.65	89.6 ± 12.42
160	135 ± 4.36	134.6 ± 9.02	119.3 ± 7.57	114.6 ± 10.97
200	180 ± 11.14	176.3 ± 7.64	162 ± 16.7	145.3 ± 2.31

Tab.5 : Variazione della concentrazione dei fluoruri durante il 2° esperimento acuto

Alle concentrazioni iniziali di 120, 160 e 200 mg/l corrispondono alla fine dell'esperimento delle concentrazioni reali diminuite rispettivamente del 25.3, 28.4 e 27.4 %. Per la concentrazione nominale di 120 mg/l la riduzione di ca. ¼ si misura già dopo le prime 24 h'. Dopo le prime 24 ore la concentrazione del 160 e 200 era diminuita rispettivamente del 15.6 e 10 %.

Mancano i dati relativi alle concentrazioni reali finali rispettivamente di 360 e 720 mg/l di fluoro, in quanto il range di lettura dello strumento non mi permetteva di calcolare concentrazioni così elevate, se non facendo una diluizione eccessiva del campione, compromettendone così la precisione della stima dei fluoruri.

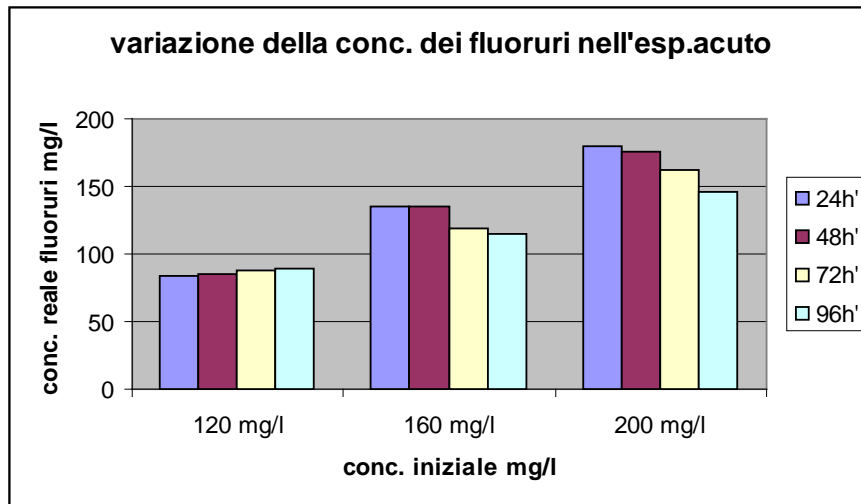


Fig. 11: Andamento concentrazione reale dei fluoruri nel test acuto

5.2 Esperimenti long-term

Negli esperimenti cosiddetti “cronici (long-term) il range di concentrazioni al quale sono stati esposti per 18 gg a 17 °C gli esemplari di *Dreissena polymorpha* è stato scelto sulla base delle indicazioni fornitemi dai test acuti.

Ho scelto 3 concentrazioni comprese tra il NOEC e il LOEC: 120, 160 e 200 mg/l.

Le osservazioni, oltre alla mortalità, erano riferite anche alle possibili modificazioni che potevano insorgere via via che l’esperimento procedeva.

Le osservazioni erano relative a:

- 1) lentezza chiusura delle valve quando gli animali venivano stimolati
- 2) cambio del colore delle valve
- 3) maggiore capacità di frantumazione delle valve medesime

La sopravvivenza degli individui è stata pressochè totale nei primi 4 giorni dell’esperimento, con l’eccezione di 1 morto a 200 mg/l nel 2° giorno. Gli animali hanno cominciato a morire dal 7° giorno in poi, non raggiungendo mai la mortalità totale neanche alla concentrazione più elevata (Tab.6): Le concentrazioni di 160 e 200 mg/l, che non avevano dato nessun effetto nell’esposizione di 4 gg, causano la mortalità di parte degli individui con esposizioni prolungate nel tempo.

	24 h	48 h	72 h	96 h	7°g	8°g.	9°g.	10°g.	11°g.	14°g	15°g	16°g	17°g	18°g
mg/l	morti	morti	morti	morti	morti	morti	morti	morti	morti	morti	morti	morti	morti	morti
contr.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
120	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
160	0	0	0	0	2	2	2	1	0	0	1	0	0	0
200	0	1	0	0	2	2	3	1	1	0	1	0	0	1

Tab.6: Dati della mortalità registrati per *D. polymorpha* durante l'esperimento long-term

Dopo 18 giorni si è verificata anche la mortalità di un individuo su 15 individui dei replicati di controllo. Una mortalità inferiore al 10%, dunque, che non inficia la validità del test (Tab. 6, 7 e Fig.12).

	% morti in 18 gg
Controllo	6,66
120	20,00
160	53,33
200	80,00

Tab.7: Percentuale di mortalità nel long-term test

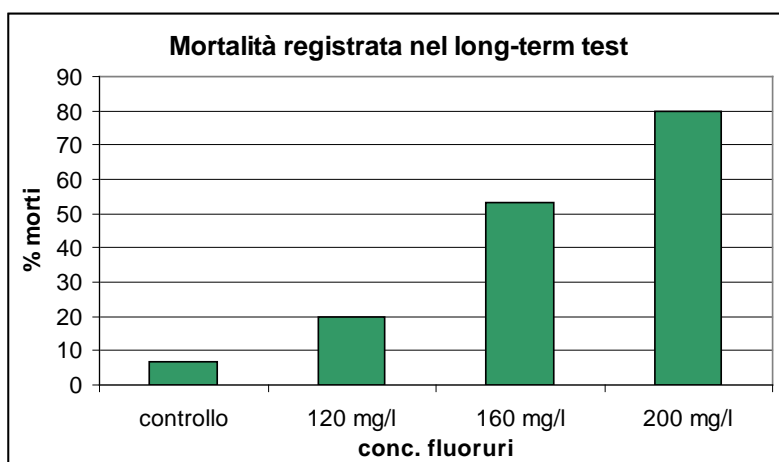


Fig. 12: Variazioni tasso di mortalità nel long-term test

Per quanto riguarda gli altri parametri presi in considerazione in questo test cronico, posso dire che dal 10° giorno si poteva osservare una maggior lentezza

nella chiusura delle valve da parte di tutti gli esemplari trattati a 160 e 200 g/l, quando venivano stimolati. Segno questo che poteva far pensare ad una mutata funzionalità degli esemplari esposti a concentrazioni subletali ma in tempi ben più lunghi dei test acuti. Ho osservato, inoltre, che le valve degli organismi morti cambiavano rapidamente di colore, iscurendosi notevolmente. Inoltre aumentava la fragilità della conchiglia che si frantumava facilmente.

Come nei test acuti ho verificato la reale concentrazione dei fluoruri nell'acqua di ogni vaschetta nei seguenti giorni: 8°, 11°, 15° e 18° giorno (Tab. 8, Fig.13), per poterla confrontare con quella iniziale.

	8°g.	11° g.	15°g	18°g
Conc. fluoruri mg/l	Conc. media reale e dev. st.	Conc. media reale e dev.st.	Conc. media reale e dev.st.	Conc. media reale e dev.st.
Controllo	0,24 ± 0,12	0,36 ± 0,11	0,33 ± 0,04	0,49 ± 0,1
120	101,73 ± 21,07	63,14 ± 10,65	45,8 ± 4,54	36 ± 1,2
160	138 ± 22,94	99,4 ± 17,42	62,13 ± 9,78	55,46 ± 20,34
200	165 ± 8,19	106,33 ± 30,09	77,33 ± 18,5	61,5 ± 23,33

Tab. 8: Concentrazione media e deviazione standard di F⁻ stimata nel long-term

Alla fine dell'esperimento ho osservato una diminuzione rispetto alla concentrazione nominale rispettivamente del 70, 65.3, 69.3 % alle varie concentrazioni usate.

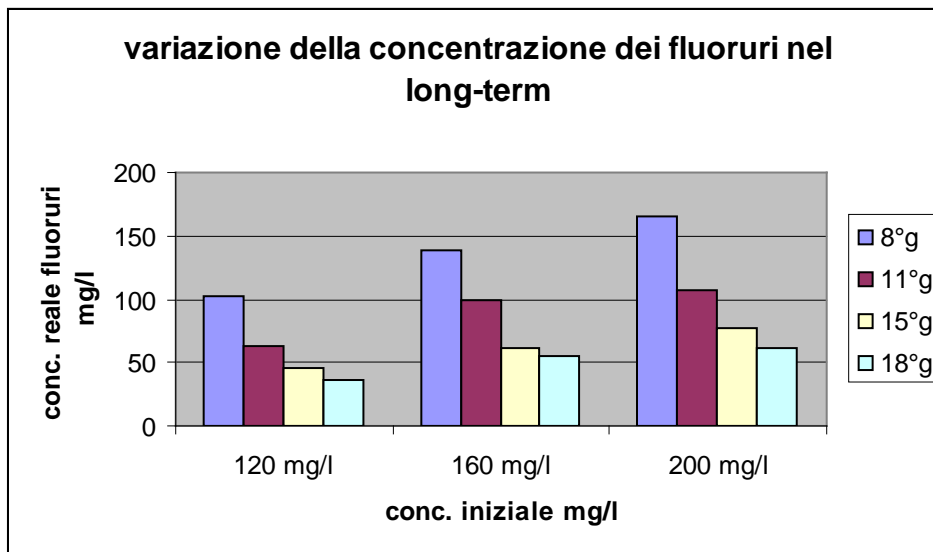


Fig. 13: Variazione delle concentrazione reale di fluoruri nel long-term

Si può osservare come la concentrazione dei fluoruri decresca gradualmente nel tempo dell'esperimento, con un trend abbastanza regolare. E' da ritenersi che questo sia dovuto all'assorbimento del xenobiotico da parte dei tessuti degli animali esposti.

Ho controllato anche il pH e l'O₂ disciolto confrontando tra loro i valori a 48 h' e a 18 (Tabs. 9, 10). Tali valori si sono mantenuti, con piccole oscillazioni, rispetto agli originali valori dell'acqua usata per il test.

	48 h	18 g
Fluoruri mg/l	pH medio e dev.st.	pH medio e dev.st.
Controllo	8.07 ± 0.02	8.19 ± 0.06
120	8.17 ± 0.04	8.35 ± 0.06
160	8.22 ± 0.02	8.37 ± 0.01
200	8.22 ± 0.05	8.48 ± 0.06

Tab. 9: Valori del pH misurati dopo 2 giorni e al termine dell'esperimento

	a 48 h	a 18 gg
Conc.O ₂ disciolto	OD medio e dev st.	OD medio e dev st.
Controllo	7.78 ± 4.54	7.38 ± 0.46
120	7.65 ± 4.41	6.86 ± 0.70
160	8.05 ± 4	7.03 ± 0.13
200	8.13 ± 4.56	7.22 ± 0.66

Tab.10: Valori delle concentrazioni di ossigeno disciolto dopo 2 giorni e al termine dell'esperimento

CAP. 6 DISCUSSIONE

La tossicità dei fluoruri nelle acque si realizza in modo differente a seconda che si tratti di acque dolci a basso contenuto ionico o di acque marine o salmastre dove la biodisponibilità di questi xenobiotici (per fenomeni di complessazione chimica) è di gran lunga minore per gli organismi che vi vivono. I dati pubblicati in letteratura sulla tossicità dei fluoruri nei confronti di alghe, piante acquatiche e pesci sono vari e numerosi e mi permettono di fare delle comparazioni con i dati ottenuti per *D. polymorpha*.

E' già noto che questa specie di mollusco invasivo presenta ampi limiti di tolleranza nei confronti di svariati parametri ambientali. I miei esperimenti hanno aggiunto un'informazione ulteriore che riguarda la sua capacità di sopravvivere a concentrazioni ben più elevate di quelle che solitamente possono essere trovate nelle acque in cui vive.

Confrontando il valore di LC50 a 96 ore ottenuto per *Dreissena polymorpha* (403.428 mg/l) con quello di altre specie sia marine che di acque dolci (Tab. 11) se ne può avere conferma (Camargo, J.A., 1991 Camargo & Tarazona, 1990; Camargo *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1985).

E' vero che, essendo un mollusco filtratore, *D. polymorpha* può chiudere le valve e interrompere la filtrazione, qualora le sostanze in soluzione siano un pericolo per la sua sopravvivenza, almeno compatibilmente con la sua resistenza al digiuno. Questo potrebbe spiegare i più alti valori di LC50 se comparati con specie di altri gruppi fanistici, come gli insetti o i crostacei.

Gli unici dati con altre specie di mollusco con i quali posso confrontare i miei sono quelli relativi ad un'altra specie non-indigena invasiva: *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), che secondo i primi dati di un esperimento in corso (Casellato com. pers.), indicano una ancor maggior tolleranza nei confronti di questo xenobiotico rispetto a *D. polymorpha*.

Sicuramente i valori di LC50 ottenuti per questa specie sono molto più elevati di quelli ottenuti per il crostaceo gammaride *Dikerogammarus villosus* (Sovinskii, 1894)(5.07) (Camargo *et al.*, 2009) e più alti anche di quelli registrati per un altro crostaceo *Daphnia magna* (Müller, 1785), che pur risulta tra le specie più

tolleranti, nei confronti di questo xenobiotico, assieme ad alcune specie di osteitti. Una maggior sensibilità è stata riscontrata per alcune specie di Tricotteri (Tab. 11).

SPECIE	LC50 (mg/l)	AUTORI
<i>Daphnia magna</i> (Müller, 1785)	304 (48 h')	Fieser et al., 1986
<i>Chimarra marginata</i> (Linnaeus, 1767)	44.9 (96 h')	Camargo e Tarazona 1990
<i>Cheumatopsyche pettiti</i> Banks, 1908	42.5 (96 h')	Camargo et al. 1992
<i>Dikerogammarus villosus</i> (Sovinskii, 1894)	5.07 (96 h')	Camargo et al. 2008
<i>Penaeus indicus</i> (H. Milne Edwards, 1837)	1118 (96 h')	McClurg 1984
<i>Americamysis (Mysidopsis) bahia</i> (Molenock)	10.5 (96 h')	LeBlanc, 1984
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Linnaeus, 1758)	340 (96 h')	Smith et al., 1985
<i>Hydropsyche bulbifera</i> (McLachlan, 1878)	26.3 (96 h')	Camargo e Tarazona 1990
<i>Hydropsyche ex ocellata</i> Dufour, 1841	26.5 (96 h')	Camargo e Tarazona 1990
<i>Hydropsyche lobata</i> McLachlan, 1884	48.2 (96 h')	Camargo e Tarazona 1990
<i>Hydropsyche pellucidula</i> (Curtis 1834)	38.5 (96 h')	Camargo e Tarazona 1990
<i>Hydropsyche bronta</i> Ross, 1938	17 (96 h')	Camargo et al.1992
<i>Hydropsyche occidentalis</i> Banks, 1900	34.7 (96 h')	Camargo et al.1992
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792)	107.5 (96 h')	Camargo 1991
<i>Pimephales promelas</i> Rafinesque, 1820	315 (96 h')	Smith et al., 1985
<i>Salmo trutta</i> (Linnaeus, 1758)	164.5 (96 h')	Camargo 1991

Tab. 11: Valori del LC50 a96 h' (eccetto *D. magna*) misurate per alcune specie di invertebrati e di pesci

Questi valori della letteratura sono molto variabili e vanno spiegati solo con la conoscenza dei meccanismi di reazione al xenobiotico messi in atto dalle diverse specie appartenenti a gruppi diversi, come l'accumulo nell'esoscheletro, nei muscoli e in altri tessuti del corpo.

E' stato importante, inoltre, seguire sia durante i test acuti che quelli cronici, la variazione nel tempo della concentrazione dei fluoruri nell'acqua. Ho osservato una graduale riduzione che non è facile poter interpretare esattamente. Non credo di poter dare delle spiegazioni esaustive al riguardo, in assenza dei dati relativi dell'accumulo negli individui trattati, che sono ancora in fase di elaborazione.

I test acuti, inoltre, fanno riferimento solo al parametro mortalità, mentre nei test cronici, avendo a disposizione un periodo più lungo durante il quale gli animali vengono esposti al xenobiotico, si possono fare anche altre osservazioni riguardo

a parametri comportamentali o morfologici: ho osservato, infatti, che dopo un lungo periodo di esposizione anche a concentrazioni vicine al LOEC, pur sopravvivendo, il mollusco manifestava una certa lentezza alla chiusura delle valve quando veniva sollecitato. Tale chiusura è solitamente immediata al tocco, quando l'animale sta bene e si nutre filtrando. Evidentemente il xenobiotico, anche se a dosi subletali, è capace di indurre una qualche forma di apatia, fenomeno osservato anche in altri gruppi di animali, come i pesci.

Inoltre ho verificato che concentrazioni che non danno alcun effetto su tempi brevi sono capaci di indurre anche la mortalità, se si prolungano i tempi di esposizione ed è per questo che i long-term test sono di gran lunga molto più utili di quelli acuti per poter definire i safe-level delle concentrazioni nelle acque per qualsiasi tipo di inquinante.

BIBLIOGRAFIA

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2003. Toxicological Profile for Fluorine, Hydrogen Fluoride and Fluorides. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service

ATSDR. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2001. Managing Hazardous Materials Incidents. Volume III – Medical Management Guidelines for Acute Chemical Exposures: Fluorine, Hydrogen Fluoride, and Fluorides. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service

ARAUJO R., 2004. Los bivalves dulceacuicolas de la Rioja. *Zubia*, 22: 29-39.

ARAUJO R. & ALVAREZ R.M., 2001. El mejillón cebra en el Ebro: un grave caso de riesgo ambiental en Aragón. *Naturaleza Aragonesa*, 8: 39-46.

BACCETTI B., BEDINI C., CAPANNA E., COBOLLI M., GHIRARDELLI E., GIUSTI F., MINELLI A., RICCI N., RUFFO S., SARA' M., ZULLINI A., 1994. In: "Lineamenti di zoologia sistematica". (Zanichelli Ed.), 13: 200-212.

BIANCHI I., GIROD A., MARIANI M., 1974. Densità, strutture di popolazione e distribuzione di *Dreissena polymorpha* nel bacino idrografico del Benaco. *Arch. Moll.*, 104 (1-3): 97-105.

CAMARGO J. A., GONZALO C., MASIERO L., CASELLATO S., 2009. The relative sensitivity of the invading amphipod *Dikerogammarus villosus* to fluoride toxicity. SETAC Europe 19th Annual Meeting

CAMARGO J. A., 2003. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere*, 50: 251-264.

CAMARGO J.A., 1991. Ecotoxicological analysis of the influence of an industrial effluent on fish populations in a regulated stream. *Aquacult fish manag.*, 22: 509-518.

CAMARGO J.A. & TARAZONA J.V., 1990. Acute toxicity to freshwater macroinvertebrates of fluoride ion (F) in soft water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 45: 883-887.

CAMARGO J.A., WARD J.V., MARTIN K.L., 1992. The relative sensitivity of competing hydropsychid species to fluoride toxicity in the Cache la Poudre River (Colorado). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 107-113.

CLEVELAND P. HICKMAN, JR. LARRY S. ROBERTS, ALLAN LARSON, 2003. In: "Diversità animale" (McGraw Hill Ed.), 174-178.

CAMUSSO M., BALESTRINI R., BINELLI A., 2001. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to asses trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere*, 44: 263-270.

DALFREDDO C. & MAIOLINI B., 2003. Il popolamento malacologico di alcuni laghi trentini a confronto 70 anni dopo. *Studi trent. Sci. Nat., Acta Biol.*, 80: 175-177.

FIESER A.H., SYKORA J.L., KOSTALOS M.S., WU Y.C., WEYEL D.W., 1986. Effect of fluorides on survival and reproduction of *Daphnia magna*. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 58: 82-86.

FINNEY D.J., 1952. Probit Analysis. Cambridge, England, Cambridge University Press.

FRANCHINI D., 1978. Distribuzione verticale di *Dreissena polymorpha* (Pallas) nel lago di Garda. *Boll. Zool.*, 45: 257-260.

GIUSTI F. & OPPI E., 1972. *Dreissena polymorpha* (Pallas) nuovamente in Italia (Bivalvia, Dreissenidae). *Mem. Mus. Civ. St. Nat. Verona*, 20: 45-49.

HINZ W. & SCHEIL H.G., 1972. Filtration rate of *Dreissena*, *Sphaerium* and *Pisidium* (Eulamellibranchiata). *Oecologia*, 11: 45-54.

KINZELBACH R., 1992. The Main Features Of The Phylogeny And Dispersal Of The Zebra Mussel *Dreissena Polymorpha*. *Limnologie Aktuell*, 4: 5-16.

LEBLANC G.A., 1984. Interspecies relationships in acute toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3: 47-60.

LEPPAKOSKI E., GOLLASCH S., OLENIN S., 2003. Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management. *Ann. Ist Super Sanità*, 39(1): 125-133.

LORI E. & CIANFANELLI S., 2006. New records of *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (Mollusca: Bivalvia: Dreissenidae) from Central Italy. *Aquatic Invasions*, 1(4): 281-283.

MAY G., GELEMBIUK G., PANOV V., ORLOVA M., EUNMI LEE C., 2006. Molecular ecology of zebra mussel invasions. *Molecular Ecology*, 15: 1021-1031.

MCCLURG T.P., 1984. Effects of fluoride, cadmium and mercury on the estuarine prawn *Penaeus indicus*. *Water SA*, 10: 40-45.

MILLANE M., KELLY-QUINN M., CHAMP T., 2008. Impact of the zebra mussel invasion on the ecological integrity of Lough Sheelin, Ireland: distribution characteristics and water quality changes in the lake. *Aquatic Invasions*, 3(3): 271-281.

MINCHIN D., FRANCES L., SULLIVAN M., 2002. Zebra mussel: impacts and spread. In: "Invasive Aquatic Species of Europe" (E. Leppakoski et al. Eds.), 135-146.

MORTON B.S., 1971. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. 5. Some aspects of filter-feeding and the effect of micro-organisms upon the rate of filtration. *Proc. Malac. Soc. London*, 39: 289-301.

MORPURGO M. & THALER B., 2002. Ritrovamento di *Dreissena polymorpha* (Pallas) (Mollusca, Bivalvia) nel Lago Grande di Monticalo (Alto Adige, Italia). *Gredleriana*, 2: 19-29.

RONCAGLIO P. & BORSANI G., 2005. Analisi della struttura di popolazione del mollusco bivalve *Dreissena polymorpha* (PALLAS, 1771) nel Sebino (Lombardia, Italia settentrionale). *Natura Bresciana, Ann. Mus. Civ. Sc. Nat. Brescia*, 34: 49-53.

SMITH L.R., HOLSEN T.M., IBAY N.C., BLOCK R.M., LEON A.B., 1985. Ambient water quality criteria for fluoride. *Chemosphere*, 14: 1383-1389.

SCHLOESSER D., NALEPA T., MACKIE G., 1996. Zebra Mussel Infestation of Unionid Bivalves (Unionidae) in North America. *American zool.*, 36: 300-310.

SPILINGA C., CHIAPPAREDDO U., PIRISINU Q., 2000. *Dreissena polymorpha* (Pallas) al Lago Transimeno. *Riv. Idrobiol.*, 39 (1-3): 145-152.

STANCZYKOWSKA A., LAWACZ W., MATTICE J., 1975. Use of field measurements of consumption and assimilation in evaluation of the role of *Dreissena polymorpha* Pall. in a lake ecosystem. *Pol. Arh. Hydrobiol.*, 22(4): 509-520.

STRAYER D.L., SMITH L C., HUNTER D.C., 1998. Effects of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) invasion on the macrobenthos of the freshwater tidal Hudson River. *Can. J. Zool.*, 76(39): 419-425.

STRAYER D.L. & SMITH L.C., 1996. Relationships between Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) and Unionid Clams During the Early Stage of the Zebra Mussel Invasion of the Hudson River. *Freshwater Biology*, 36: 771-779.

STRAYER D.L., HUNTER D.C., SMITH L.C., BORG C.K., 1994. Distribution, Abundance, and Roles of Freshwater Clams (Bivalvia, Unionidae) In The Freshwater Tidal Hudson River. *Freshwater. Biol.*, 31: 239-248.

STRAYER D.L. & SMITH L.C., 1993. Distribution of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in estuaries and brackish water. In: "Zebra Mussels, Biology, Impacts, and Control". (T. F. Nalepa and D. W. Schloester Eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, Florida., 715-727.

STRAYER D.L., 1991. Projected distribution of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 1389-1395.

WALLENTINUS I., 2002. Introduced marine algae and vascular plants in European aquatic environments. In: "Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management Kluwer Academic Publishers, Dordrecht" (Leppäkoski E, Gollasch S, Olenin S. Eds): 27-52.

Ringraziamenti

A conclusione del ciclo di studi universitari, non posso fare a meno di esprimere la mia profonda gratitudine per quanti mi sono stati vicini.

Nella stesura della tesi sono stati preziosi i consigli e l'aiuto di molte persone che hanno fatto accrescere in me la sensibilità e l'amore per la natura.

Un ringraziamento particolare va alla prof.ssa Sandra Casellato che mi ha seguito con pazienza, professionalità e tenacia senza mai lesinare parole di amorevole incoraggiamento nei momenti di indecisione.

Sono riconoscente al dott. Masiero Luciano per avermi fatto avvicinare nel laboratorio all'affascinante mondo della *Dreissena polymorpha* con l'ausilio di strumentazione adeguata.

Inoltre non posso dimenticare, ed essere riconoscente, la dott.sa Cristina Gonzalo dell'Università di Alcalà di Madrid che con molta passione ed entusiasmo mi ha accompagnato nell'esperimento e il prof. J.A. Camargo per lo scambio di dati scientifici.

Infine, ma non ultimi, un grazie va ai tecnici di laboratorio Renzo Mazzaro e Matteo che hanno permesso la realizzazione di grafici.

In questi anni, durante la mia esperienza universitaria, non è mai mancata una parola di conforto e sostegno dalla mia famiglia, da mio fratello, da mia sorella, da Davide e dagli amici che, di fronte alle difficoltà, mi hanno sempre incoraggiato a continuare l'esperienza di studio. Sarò sempre grata ai miei genitori in modo speciale per avermi dato la possibilità di arrivare fino a qui. Non posso non ringraziare Francesca, Silvia ed i compagni di corso per le numerose giornate trascorse in aula studio o in un qualsiasi spazio libero per confrontarsi su vari argomenti di studio.

Nulla di quanto ho appreso sarà stato vano e rimarrà per sempre impresso nella mente e nel mio cuore.