



UNIVERSITÀ CA' FOSCARI VENEZIA

Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE
SCIENZE AMBIENTALI

LM-75- Classe delle lauree magistrali in scienze e tecnologie per l'ambiente e il
territorio
Capitale naturale

**BODY BURDEN E ACCUMULO DI TERRE RARE (REEs) IN
PENNE DI FRATINO (*Charadrius alexandrinus*) DEL CENTRO
ITALIA**

Relatore:
Prof. Marco Picone

Relatore esterno:
Dr. Fabiana Corami

Laureanda:
Alessia Giurin

Matricola: 867700

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

*“Sono le scelte che facciamo che dimostrano quel che siamo veramente,
molto più delle nostre capacità”*

-J. K. Rowling

INDICE

SCOPO E OBIETTIVI	p. 1
1. INTRODUZIONE	p. 2
1.1 LE TERRE RARE	p. 2
1.1.1 CARATTERISTICHE CHIMICHE E IMPIEGO	p. 3
1.1.2 INTRODUZIONE E MOBILITAZIONE NELL'ECOSISTEMA	p. 4
1.1.3 REEs IN AMBIENTE ACQUATICO	p. 5
1.1.4 TOSSICITÀ E MECCANISMO DI AZIONE	p. 6
1.2 BIOACCUMULO E BIOMONITORAGGIO: L'IMPIEGO DELL'AVIFAUNA	p. 7
1.2.1 AVIFAUNA COME BIOMONITOR PER GLI INQUINANTI	p. 8
1.3 ECOLOGIA DEL FRATINO EURASIATICO (<i>Charadrius alexandrinus</i>)	p. 11
2. MATERIALI E METODI	p. 15
2.1 REAGENTI CHIMICI E STRUMENTAZIONE	p. 15
2.2 SPETTROSCOPIA DI MASSA ACCOPPIATA INDUTTIVAMENTE AL PLASMA	p. 16
2.2.1 INTRODUZIONE DEL CAMPIONE	p. 18
2.2.2 PLASMA AD ACCOPPIAMENTO INDUTTIVO (ICP)	p. 19
2.2.3 INTERFACCIA	p. 20
2.2.4 ANALIZZATORE DI MASSA	p. 21
2.3 RIVELATORE	p. 22
2.3.1 CURVA DI CALIBRAZIONE ESTERNA E STANDARD INTERNO	p. 23
2.3.2 INTERFERENZE SPETTROSCOPICHE	p. 24
2.3.3 INTERFERENZE NON SPETTROSCOPICHE	p. 24
2.4 RACCOLTA E PRETRATTAMENTO DEI CAMPIONI	p. 25
2.5 DIGESTIONE ACIDO-UMIDA	p. 26
2.6 ANALISI CON ICP-MS	p. 28
2.7 ANOMALIE DELLE TERRE RARE	p. 29
2.7.1 ANOMALIA DEL CERIO	p. 29
2.7.2 RAPPORTO GADOLINIO GEOGENICO/GADOLINIO ANTROPOGENICO	p. 30
2.8 ANALISI STATISTICA	p. 30

3. RISULTATI E DISCUSSIONE	p. 31
3.1 MARCHE	p. 31
3.1.1 CONCENTRAZIONE TOTALE DI TERRE RARE	p. 31
3.1.2 RAPPORTO GADOLINIO GEOGENICO E ANTROPOGENICO	p. 37
3.1.3 ANOMALIA DEL CERIO	p. 38
3.1.4 ANALISI STATISTICA	p. 39
3.2 VENETO	p. 40
3.2.1 CONCENTRAZIONE TOTALE DI TERRE RARE	p. 40
3.2.2 RAPPORTO GADOLINIO GEOGENICO E ANTROPOGENICO	p. 47
3.2.3 ANOMALIA DEL CERIO	p. 48
3.1.4 ANALISI STATISTICA	p. 49
3.3 CONFRONTO CON I DATI DI LETTERATURA E RILEVANZA ECOLOGICA DELL'ESPOSIZIONE ALLE REEs	p. 50
4. CONCLUSIONI	p. 52
5. BIBLIOGRAFIA	p. 54
6. SITOGRAFIA	p. 61

SCOPO E OBIETTIVI

Lo scopo della presente tesi sperimentale è la valutazione del body burden e lo studio del bioaccumulo delle terre rare (REEs) in penne di fratino eurasiatico (*Charadrius alexandrinus*, Linnaeus 1758) provenienti dalle Marche. L'analisi effettuata non è invasiva per i soggetti campionati come una sperimentazione tossicologica attiva, dal momento che non prevede il prelievo di organi bersaglio come fegato e reni, ma di una struttura che il singolo individuo è in grado di rinnovare periodicamente durante la muta. Il fratino eurasiatico è una specie residente e migratrice che nidifica sulle coste Italiane nel periodo primaverile ed estivo, viene perciò minacciata dall'urbanizzazione costiera e dall'erosione dei litorali sabbiosi. La popolazione italiana sta subendo un marcato declino nell'ultimo decennio, rientrando pertanto nella lista rossa nazionale della IUCN e classificata come specie in pericolo (EN). Il body burden all'interno delle penne è strettamente connesso con l'uptake di terre rare attraverso la dieta dell'individuo, per questo motivo risulta di vitale importanza studiare il loro bioaccumulo e i possibili effetti tossici sulla specie. Come confronto verranno utilizzate penne di fratino provenienti dal Veneto, delle quali esistono ampi studi e ricerche pregresse.

1. INTRODUZIONE

1.1 LE TERRE RARE

Le terre rare, Rare Earth Elements (REEs) in inglese, sono un insieme di 17 elementi che comprende l'ittrio (Y), lo scandio (Sc) e il gruppo dei lantanidi, ovvero lantanio (La), cerio (Ce), praseodimio (Pr), neodimio (Nd), promezio (Pm), samario (Sm), europio (Eu), gadolinio (Gd), terbio (Tb), disprosio (Dy), olmio (Ho), erbio (Er), tulio (Tm), itterbio (Yb) e lutezio (Lu) (Khan et al., 2017). Y e Sc vengono presi in considerazione assieme ai lantanidi perché mostrano un comportamento chimico simile. Le terre rare seguono la **regola di Oddo-Harkins**, per la quale gli elementi con numero atomico pari sono più abbondanti rispetto a quelli con numero atomico dispari adiacenti, inoltre l'abbondanza degli elementi diminuisce lungo la serie dei lantanidi (Binnemans et al, 2013; Chakhmouradian e Wall, 2012; Migaszewski e Gałuszka, 2015; Ramos et al., 2016). Nella crosta terrestre l'abbondanza dei REEs è significativamente maggiore rispetto ad altri elementi comunemente sfruttati (Gupta e Krishnamurthy, 2004). Le loro abbondanze chimiche sono infatti paragonabili, e talvolta superiori, a quelle dell'oro e dell'argento (Gupta et al., 2014; Henderson, 2013; Schüler et al., 2011; Wedepohl, 1995; Weltje et al., 2002). Pertanto il termine "terre rare" utilizzato per questi elementi non si riferisce all'abbondanza crostale relativa, ma al fatto che non esistono in forma pura e si trovano in associazione ad un'ampia gamma di minerali, inclusi alogenuri, carbonati, ossidi, fosfati e silicati (Dostal, 2017). Esistono oltre 250 minerali contenenti terre rare come costituenti principali nella loro formula chimica e struttura cristallina (Tabella 1), tuttavia solamente una piccola parte può essere sfruttata economicamente.

Tabella 1: Nome e formula dei principali minerali associati ai REEs con le rispettive percentuali in peso degli ossidi (wt%). (Dostal J., 2017).

Mineral	Formula	Approx. TREO (wt %)
Allanite	$(Y, Ln, Ca)_2(Al, Fe^{3+})_3(SiO_4)_3(OH)$	39
Apatite	$(Ca, Ln)_5(PO_4)_3(F, Cl, OH)$	19
Bastnäsite	$(Ln, Y)(CO_3)F$	75
Eudialyte	$Na_4(Ca, Ln)_2(Fe^{2+}, Mn^{2+}, Y)ZrSi_8O_{22}(OH, Cl)_2$	9
Fergusonite	$(Ln, Y)NbO_4$	53
Gittinsite	$CaZrSi_2O_7$	
Ilmorite	$Y_2(SiO_4)(CO_3)$	68
Kainosite	$Ca_2(Y, Ln)_2Si_4O_{12}(CO_3) \cdot H_2O$	38
Loparite	$(Ln, Na, Ca)(Ti, Nb)O_3$	30
Monazite	$(Ln, Th)PO_4$	65
Mosandrite	$(Na, Ca)_3Ca_3Ln(Ti, Nb, Zr)(Si_2O_7)_2(O, OH, F)_4$	33
Parisite	$Ca(Ln)_2(CO_3)_3F_2$	61
Pyrochlore	$(Ca, Na, Ln)_2Nb_2O_6(OH, F)$	
Rinkite (rinkolite)	$(Ca, Ln)_4Na(Na, Ca)_2Ti(Si_2O_7)_2(O, F)_2$	20
Steenstrupine	$Na_{14}Ln_6Mn_2Fe_2(Zr, Th)(Si_6O_{18})_2(PO_4)_7 \cdot 3H_2O$	31
Synchysite	$Ca(Ln)(CO_3)_2F$	51
Xenotime	YPO_4	61
Zircon	$(Zr, Ln)SiO_4$	4

La maggior parte delle risorse di REEs prevede lo sfruttamento di tre minerali principali:

- **Bastnasite**, composta da fluoruro di carbonato di Ce, La e Y;
- **Monazite**, composta da fosfati di La, Ce, Nd e Sm;
- **Xenotime**, composto da ittrio ortofosfato.

Le terre rare vengono classificate in due gruppi sulla base della loro configurazione elettronica: le **terre rare leggere (LREEs)** comprendono gli elementi dal lantanio al gadolinio, mentre le **terre rare pesanti (HREEs)** comprendono gli elementi dal terbio al lutezio (Gonzales et al., 2014). Secondo Akimov et al. (2016), le terre rare leggere sono più solubili rispetto a quelle pesanti. In particolare, bastnasite e monazite sono composte da terre rare leggere (LREEs), mentre lo xenotime è la fonte principale delle terre rare pesanti (HREEs) e Y (Humphries, 2012; Ondrejka et al., 2007; Spear and Pyle, 2002).

1.1.1 CARATTERISTICHE CHIMICHE E IMPIEGO

Generalmente le terre rare hanno valenza pari a 3, ma alcuni elementi raggiungono uno stato di ossidazione pari a 2⁺ e 4⁺ quando sono ossidati (come il Ce e l'Eu), inoltre il loro raggio ionico diminuisce con l'aumentare del numero atomico (Ramos et al., 2016). Poiché sono facilmente ossidabili, i REEs sono utili come agenti riducenti per metalli potenzialmente recalcitranti alla riduzione (Redling, 2006). Grazie ad una configurazione elettronica e proprietà uniche, le terre rare sono molto reattive nei confronti della maggior parte dei non metalli (ad es. H, O, S) rendendole preziose per le applicazioni industriali (Borzzone et al., 1999; Huang, 2011; Koyanagi e Bohme, 2001; Strange et al., 1999). Per la loro importanza economica e strategica, le terre rare sono classificate come materie prime critiche per applicazioni industriali ad alta tecnologia (Du e Graedel, 2011; Massari e Ruberti, 2013). Sono utilizzate principalmente nella produzione di magneti permanenti, nei processi di catalisi, nelle leghe e nella produzione di polveri e fosfori (Arvidsson e Sandén, 2017; Hatje et al., 2016; Migaszewski e Gałuszka, 2015; Paulick e Machacek, 2017; Savvilotidou et al., 2015). Sono impiegate anche in ambito medico (ad es. il Gd viene usato come agente di contrasto nelle risonanze magnetiche), nello sviluppo di farmaci per il trattamento del cancro (Lu et al., 2017; Sato et al., 2006; Townley, 2013), nel settore tessile e in agricoltura, esponendo l'essere umano a questi elementi (Gambogi, 2014; Guimarães et al., 2016; Ramos et al., 2016; Tan et al., 2015; Xie et al., 2014). Queste materie prime sono utilizzate anche come promotori della crescita nei mangimi per animali, in cui si riscontra che basse dosi di terre rare migliorano la crescita del bestiame nei suini e nei polli da carne (He and Rambeck, 2000; He et al., 2001, 2010; Redling, 2006). In Cina, le terre rare

vengono inoltre applicate ai suoli come integratori di fertilizzanti per aumentare i raccolti e la qualità delle colture, in particolare di cereali e leguminose (CX Wang et al., 2001; Migaszewski e Gafuszka, 2015; Z Wang et al., 2001).

In Tabella 2 è riportata una sintesi degli impieghi di terre rare in applicazioni industriali e nell'alta tecnologia.

Tabella 2: REEs e usi in ambito industriale e tecnologico. (Gwenzi W. et al., 2018).

REE	Main application
Eu, Tb, Gd, Ce	Flat screen display
Yb, Er	Optical fibres
La, Ce, Pr, Nd,	Alloys
Eu, Tb, Er, Y	Fibre optics
Nd, Pr, Dy, Tb	Medical imaging
Pr, Nd, Gd, Tb, Dy	Permanent magnets
La, Ce, Pr, Nd	Auto catalysts
La, Ce	Petroleum refining
La, Ce, Pr, Nd, Y	Ceramics, glass additives
La, Ce, Eu, Gd, Tb, Y	Phosphors
La, Ce, Pr	Polishing compounds

1.1.2 INTRODUZIONE E MOBILITAZIONE NELL'ECOSISTEMA

Le terre rare sono studiate a causa delle loro concentrazioni negli ecosistemi acquatici e terrestri (Adeel et al., 2019; Khan et al., 2017; Kulaksiz e Bau, 2011). Le informazioni disponibili sono concentrate su un numero ristretto di elementi, in particolare Ce, La, Gd, Nd e Y, ponendo l'accento sull'attuale controversia sui benefici per la salute rispetto ai loro effetti tossici.

Esistono numerosi problemi ambientali associati alla produzione, alla lavorazione e all'utilizzo delle terre rare, il cui principale impiego industriale per produrre catalizzatori utilizzati nel craking del petrolio grezzo coinvolge milioni di tonnellate di REEs ogni anno. La presenza di questi elementi all'interno dei tessuti animali e vegetali si può attribuire quasi esclusivamente a fonti antropogeniche poiché non sono elementi essenziali per il biota (Leal Filho, 2016).

Le terre rare entrano nell'ambiente attraverso lo smaltimento di prodotti industriali e di consumo, scarichi di processi minerari e industriali (Chakhmouradian e Wall, 2012; Haque et al., 2014; Humphries, 2012; Jordens et al., 2013; Navarro e Zhao, 2014; Paulick e Machacek, 2017) e sistemi di trattamento di acque reflue urbane (Klaver et al., 2014; Lawrence et al., 2009; Rabiet et al., 2009), le quali rappresentano la fonte principale di Gd antropogenico nei sistemi acquatici (Kulaksiz e Bau, 2011, 2013; Thomsen, 2017).

Le terre rare vengono mobilitate nei comparti ambientali attraverso processi di trasporto eolico (es. polveri) e idrologico, come ad esempio il deflusso e l'infiltrazione attraverso il suolo (Cao et al., 2017; Möller et al., 2014; Ojiambo et al., 2003). La natura, le proprietà chimico-fisiche e le condizioni geochimiche del territorio influenzano la mobilità e la ripartizione di REEs nell'ambiente, il cui comportamento viene controllato dalle caratteristiche ambientali come salinità, pH, potenziale redox, materia organica disciolta (Guo et al., 2010; Johannesson et al., 2004; Marsac et al., 2011; Piper e Bau, 2013; Pourret et al., 2007; Shan et al., 2002; Weltje et al., 2004; Wilke et al., 2017).

Le terre rare possono adsorbire su matrici solide come i sedimenti, infatti, fasi minerali come idrossidi di Fe e Mn (es. goethite) hanno un'elevata area superficiale svolgendo un ruolo fondamentale nella dinamica ambientale dei REEs (Johannesson e Zhou, 1999; Quinn et al., 2004). Secondo Liang et al. (2005) e Tyler (2004), sulla superficie del suolo la concentrazione di terre rare raggiunge i 100-200 mg kg⁻¹, però le attività antropiche possono incrementarne la soglia oltre i 1000 mg kg⁻¹ (Li et al., 2013). Questo arricchimento viene attribuito alla bassa mobilità delle terre rare associata al loro elevato adsorbimento su suolo e sedimenti (Cao et al., 2000; Sneller et al., 2000), inoltre, pur essendo scarsamente biodisponibili, circa il 10% di terre rare diventa solubile dopo essersi mescolato con il suolo (Pang et al., 2001). Dopo essere stati solubilizzati questi elementi migrano attraverso il terreno fino a giungere alle falde acquifere, per poi diffondersi in vaste aree, contaminando fiumi e laghi.

1.1.3 REEs IN AMBIENTE ACQUATICO

Gli ambienti acquatici sono sistemi molto complessi, costituiti da diversi comparti biologici (es. piante, pesci, zooplancton, alghe) che interagiscono con le terre rare in modo differente. Secondo gli studi di Amyot et al. (2017) e di MacMillan et al. (2017), in ambienti acquatici sub-artici le concentrazioni individuali di REEs e la sommatoria delle concentrazioni dei singoli elementi (Σ REEs) sono risultate fortemente correlate tra loro in tutte le diverse componenti della rete trofica. Le concentrazioni di Σ REEs nei pesci, nei macroinvertebrati bentonici e nello zooplancton sono diminuite con l'aumentare del livello trofico, determinato dai gruppi funzionali di alimentazione e dalle firme isotopiche dell'azoto ($\delta^{15}\text{N}$), indicando che le terre rare sono soggette a **diluizione trofica**. Gli isotopi stabili dell'azoto e del carbonio ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$) sono comunemente utilizzati per quantificare il grado di trasferimento trofico e le potenziali fonti di energia e contaminanti nelle reti alimentari. Questa tecnica ha permesso ai ricercatori di confrontare il trasferimento trofico dei contaminanti tra le diverse reti alimentari acquatiche.

Secondo lo studio di Squadrone et al. (2019), i livelli più elevati di Σ REEs sono stati riscontrati nelle alghe (valore medio 12 mg kg^{-1}), seguite dai pesci ($0,21 \text{ mg kg}^{-1}$), dai bivalvi ($0,16 \text{ mg kg}^{-1}$) e dallo zooplancton ($0,12 \text{ mg kg}^{-1}$). Anche questo studio sembra confermare la diluizione delle terre rare lungo la rete trofica. I dati relativi alla concentrazione di terre rare nelle alghe sono scarsi, ma è chiaro che, indipendentemente dalle dimensioni, dal phylum o dall'origine geografica, le alghe contengono sempre REEs in concentrazioni di 1-10 ordini di grandezza superiori a quelle delle piante terrestri (Mashitah et al., 2012). La capacità delle alghe di concentrare i metalli all'interno dei propri tessuti, le rende adatte come bioindicatori nell'ambiente marino, caratterizzando la qualità dell'acqua costiera o per segnalare attività antropiche. Le alghe e il fitoplancton sono produttori primari e costituiscono un'importante fonte di ingresso di REEs nella catena alimentare marina. Lo zooplancton ha un ruolo importante nel trasferimento di questi elementi dal fitoplancton ai consumatori di livello superiore come i pesci. Le terre rare vengono trasferite dalla rete trofica acquatica agli organismi terrestri (es. uccelli o mammiferi) che traggono sostentamento da ecosistemi acquatici costieri o lagunari.

1.1.4 TOSSICITÀ E MECCANISMO DI AZIONE

La tossicità delle terre rare è influenzata dalla concentrazione, dal tipo di esposizione e dall'età dell'organismo. Il principale meccanismo d'azione di questi elementi è l'induzione di **stress ossidativo cellulare** a causa dell'elevato potenziale redox degli ioni REE^{3+} e REE^{2+} , inoltre i lantanidi possiedono un raggio ionico molto simile a quello di Ca^{2+} ($0,99 \text{ \AA}$) favorendo la sostituzione del calcio all'interno del comparto cellulare (Das et al., 1988). In alcuni studi tossicologici si nota la diminuzione della tossicità delle terre rare all'aumentare del numero atomico poiché gli elementi più pesanti possiedono stabilità maggiore (Hirano e Kazuo, 1996; Zielhuis, 2006).

I dati raccolti nello studio di Picone et al. (2022) sul beccapesci (*Thalasseus sandvicensis*) hanno evidenziato che i REEs (soprattutto La, seguito da Ce, Y e Nd) sono bioaccessibili e biodisponibili per gli uccelli che si riproducono nella Laguna di Venezia. Le terre rare possono anche influenzare la riproduzione negli uccelli, in particolare, la deposizione di Y al posto del Ca può compromettere la calcificazione dello scheletro degli embrioni in via di sviluppo (Chien et al., 2009; Kaweewong et al, 2013).

1.2 BIOACCUMULO E BIOMONITORAGGIO: L'IMPIEGO DELL'AVIFAUNA

Metalli ed oligoelementi sono presenti nell'ambiente come conseguenza di processi naturali, alcuni di essi svolgono infatti un ruolo essenziale all'interno dei processi biologici, come il metabolismo e le funzioni neuronali. Tuttavia, se presenti in elevate quantità possono risultare dannosi per vari organismi, compromettendo le funzioni vitali e le aspettative di vita, oltre ad avere ripercussioni anche sull'uomo (Nriagu, 1989; Jearup, 2003). Oggigiorno molti xenobiotici vengono introdotti nell'ambiente a causa delle attività antropiche, minacciando la qualità e la sostenibilità degli ecosistemi.

La speciazione chimica degli elementi in traccia (Caroli et al., 2000; Cescon et al., 2000; Cui et al., 2018; Fairbrother et al., 2007; Morabito et al., 2017; Scarponi et al., 1995, 1996; Wijayawardena et al., 2017), ovvero la forma in cui sono presenti nell'ambiente, definisce la loro bioaccessibilità, biodisponibilità e mobilità, influenzando il loro destino e i loro effetti sui vari recettori ambientali, compreso l'uomo. Perciò è importante comprendere e prevedere l'accumulo di contaminanti nel biota, poiché i loro effetti sono una conseguenza delle concentrazioni all'interno di organi o tessuti bersaglio. Inoltre, poiché l'esposizione umana avviene spesso attraverso il consumo di alimenti contaminati, la capacità di prevedere la quantità di xenobiotico che si accumula in questi potenziali vettori di esposizione è fondamentale per evitare avvelenamenti umani.

La **biodisponibilità** è la misura in cui un contaminante in una fonte è libero di essere assorbito (Newman e Jagoe, 1994). Si misura come la quantità di contaminante che può raggiungere il flusso sanguigno (Paustenbach e Madl, 2008; Shen, 2008). L'assorbimento di una sostanza all'interno di un organismo può avvenire attraverso diversi meccanismi, i quali coinvolgono il derma, le branchie, le superfici polmonari o l'intestino. In tutti i casi, il processo inizia con interazioni superficiali delle cellule tissutali.

Simkiss (1996) ha classificato l'assorbimento da parte di una cellula in tre vie generali:

- lipidica
- acquosa
- endocitica

La **via lipidica** comprende il passaggio di contaminanti lipofili attraverso il bilayer dei lipidi di membrana. Anche alcune piccole molecole polari prive di carica, come CO₂, glicerolo e H₂O, possono diffondere in varia misura attraverso il doppio strato fosfolipidico (Alberts et al., 1983).

La **via acquosa** utilizza due tipologie di proteine di trasporto di membrana, che formano canali (proteine canale) o agiscono come proteine carrier nella membrana, le quali trasferiscono contaminanti idrofili nelle cellule.

La **via endocitica** comporta il trasporto di molecole presenti al di fuori della cellula tramite la formazione di vescicole, le quali vengono convogliate all'interno della cellula, nel citoplasma, all'interno del quale rilasceranno la sostanza. Si parla di fagocitosi per particelle solide e pinocitosi per sostanze liquide.

Una volta che un contaminante entra nell'organismo, diventa disponibile per una possibile **biotrasformazione**, ovvero la trasformazione biologicamente mediata di un composto chimico in un altro. La biotrasformazione può portare a una maggiore eliminazione, disintossicazione, sequestro, redistribuzione o attivazione. Può aumentare il tasso di perdita dall'organismo, come spesso accade se uno xenobiotico lipofilo viene convertito in un composto più reattivo o idrofilo (es. ossidazione del naftalene a naftalene diolo). Il contaminante potrebbe essere trasformato in una forma non tossica, oppure potrebbe permanere all'interno degli organismi ma lontano da qualsiasi sito di possibile effetto negativo.

Il **bioaccumulo** è l'accumulo netto di un contaminante in un organismo da tutte le fonti, comprese l'acqua, l'aria e le fasi solide dell'ambiente. Le fasi solide possono includere alimenti, suolo, sedimenti o particelle fini sospese nell'aria o nell'acqua. Per convenzione in ecotossicologia, il termine bioaccumulo non coincide con il termine **bioconcentrazione**, il quale indica l'accumulo netto di un contaminante in un organismo derivante solo dall'acqua.

1.2.1 AVIFAUNA COME BIOMONITOR PER GLI INQUINANTI

L'avifauna, diffusa in molteplici habitat, viene utilizzata come *biomonitor* per vari tipi di inquinanti (Furness & Greenwood 1993). Gli uccelli infatti, grazie alla loro posizione nella catena trofica e alla sensibilità ai cambiamenti climatici, sono degli ottimi soggetti in ambito di monitoraggio ambientale. Per l'elaborazione di un piano di biomonitoraggio del bioaccumulo nell'avifauna è comunque fondamentale conoscere in modo approfondito l'ecologia della specie oggetto d'indagine. Infatti, le abitudini migratorie e le dimensioni dell'areale trofico variano considerevolmente da specie a specie. Di conseguenza, per relazionare i residui nei tessuti con un determinato habitat o areale, è necessaria un'approfondita conoscenza della fenologia della specie, che consenta di stabilire dove sono stati assimilati i contaminanti.

Come *proxy* per la valutazione dell'esposizione agli inquinanti si possono utilizzare campioni di tessuto, come muscoli, grasso e ossa (Binkowski e Sawicka-Kapusta, 2015), oppure organi interni come fegato, reni e cervello (Eagles-Smith et al., 2009). Per raccogliere questi campioni è tuttavia necessario sacrificare l'animale o ricorrere ad individui morti per incidente (collisioni con auto, edifici, etc.). Invece, per salvaguardare l'animale ed evitare prelievi invasivi, si possono utilizzare le penne oppure le uova non schiuse, evitando quindi ulteriori impatti negativi sugli organismi (Adout et al., 2007; Dauwe et al., 2000; Markowski et al., 2013; Rutkowska et al., 2018; Zheng et al. al., 2018).

L'analisi delle penne è quindi una tecnica eticamente preferibile (Picone et al., 2019, 2022). Rispetto all'analisi degli organi interni, inoltre, l'accumulo di residui dei contaminanti nella penna può essere relazionato a un preciso intervallo temporale, ovvero il tempo necessario allo sviluppo della penna, variabile da specie a specie e per il tipo di penna presa in considerazione (García-Fernández et al., 2013; Grubb, 2006). Per i residui presenti negli organi interni, invece, l'identificazione della finestra temporale in cui è avvenuto l'accumulo dei contaminanti è complessa e spesso non univocamente identificabile.

La **ptilocronologia** permette di conoscere il tempo di crescita delle penne sia negli organismi adulti sia nei pulli (Grubb, 2006; Picone et al., 2019). Questa tecnica si basa sullo studio dell'alternanza di bande chiare e scure visibili sulla penna, che identificano il tessuto depositato di giorno (bande scure) e di notte (bande chiare). Dalla lunghezza della penna e dall'ampiezza delle coppie di bande è quindi possibile calcolare il tempo di crescita della penna (Grubb, 2006) e quindi stimare il tempo in cui è avvenuta la deposizione dei contaminanti nella matrice cheratinosa (García Fernández et al., 2013). La penna è collegata alla circolazione sanguigna solamente durante la fase di crescita, nella quale tutti i contaminanti assunti con il cibo vengono immagazzinati nella matrice cheratinica, ricca di ponti sulfidrici (S-S). Completato lo sviluppo, la connessione vascolare si atrofizza non permettendo l'ulteriore allocazione di elementi assunti attraverso l'alimentazione (Burger, 1993).

Poiché deve essere valutata la deposizione degli elementi in tracce, delle terre rare e di altri inquinanti relativa al metabolismo, è fondamentale che ogni potenziale contaminazione esterna vada accuratamente asportata con un'adeguata procedura di lavaggio che mantenga comunque l'integrità del campione. Questa procedura sarà descritta in dettaglio nel capitolo Materiali e Metodi.

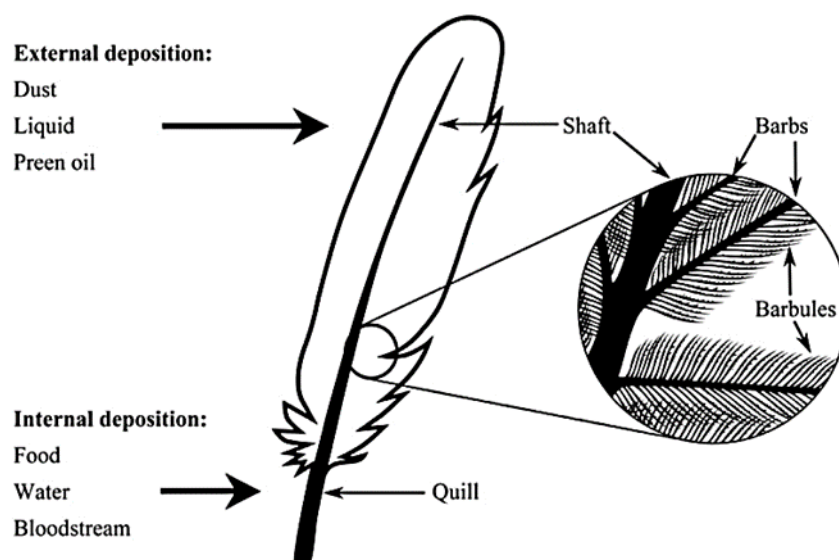


Fig. 1: Schema della struttura di una piuma e possibili percorsi di contaminazione. (Rutkowska M. et al., 2018).

Le penne utilizzate per la valutazione degli inquinanti possono essere prelevate da pulli o da organismi adulti. Chiaramente le informazioni che si ricavano sono diverse, in quanto le abitudini alimentari di esemplari giovani e di adulti non sono le medesime. I pulli presentano il vantaggio di fornire un'informazione localizzata nello spazio e nel tempo relativamente all'accumulo di contaminanti (Picone et al., 2022). Infatti, i contaminanti presenti nelle loro penne fanno esclusivamente riferimento ai contaminanti biodisponibili nell'area in cui sono cresciuti (nel caso di specie con pulli indipendenti dai genitori per la ricerca dell'alimento) o nell'area di caccia di genitori (nel caso di pulli che dipendono dai genitori per il cibo). Lo svantaggio nelle penne di pulli è che prelevare quantità di campione sufficiente per un'analisi è spesso possibile solo per specie di medio-grandi dimensioni, come laridi (inclusi gabbiani e sterne), procellariformi e rapaci, mentre può essere un fattore limitante per molti limicoli e passeriformi. Gli individui adulti forniscono una quantità di campione maggiore ma l'elevata mobilità legata alle migrazioni stagionali, rende difficile per molte specie identificare una corrispondenza tra residui nelle penne e l'area in cui tali residui sono stati acquisiti (aree di svernamento o stopover lungo le rotte migratorie). L'impiego degli adulti è quindi consigliato solo per specie stanziali o per popolazioni di cui si conoscono con precisione la rotta migratoria e la relativa fenologia. Un metodo più semplice e ancor meno invasivo riguarda il campionamento al nido delle penne di muta cadute naturalmente dai soggetti adulti, tuttavia la contaminazione esterna è più elevata e non si conosce l'individuo a cui appartiene il campione.

Dopo la raccolta, le penne campionate possono essere conservate in condizioni controllate per alcuni anni, avendo cura di evitare potenziali fonti di contaminazione e degrado esterne, come i raggi UV e l'umidità (Jaspers et al., 2019).

Nella presente tesi come soggetti per il biomonitoraggio di terre rare sono stati scelti adulti nidificanti di fratino eurasiatico (*Charadrius alexandrinus*, Linnaeus 1758). Questa specie è stanziale e migratore stagionale in Italia, dove sono presenti degli importanti nuclei residenti tutto l'anno in areali molto ristretti (ad esempio in Laguna di Venezia e in Laguna di Caorle).

1.3 ECOLOGIA DEL FRATINO EURASIATICO (*Charadrius alexandrinus*)

Il fratino eurasiatico è un piccolo trampoliere cosmopolita, appartenente alla famiglia Charadriidae, il quale nidifica nelle zone umide e nelle aree costiere dell'Europa, del Nord Africa, del Medio Oriente e dell'Asia centrale (Cramp e Simmons, 1983; Delany et al., 2009). La popolazione europea è attualmente stimata a 22.000 – 35.000 coppie riproduttive (BirdLife International 2004), tuttavia la specie sta regredendo in molte aree con un andamento demografico negativo in Europa (Tucker e Heath, 1994).

La specie si è recentemente estinta nelle isole inglesi, in Norvegia e in Svezia. Il calo demografico globale del fratino eurasiatico è stato principalmente attribuito alle attività umane, gli usi delle aree costiere per scopi ricreativi e commerciali causano perdita e frammentazione di habitat e aumento della predazione da parte di uccelli rapaci e mammiferi (Delany et al., 2009; Domínguez e Vidal, 2003; Gomez-Serrano e Lopez-Lopez, 2014; Weston, 2019). Gli esseri umani sono normalmente percepiti come predatori, il disturbo può quindi influenzare gli uccelli in modo simile al rischio di predazione (Blumstein e Daniels, 2005; Tablado e Jenni, 2015; Weston e Elgar, 2007). Gli uccelli hanno un maggiore dispendio energetico per evitare il disturbo arrecato dalle attività antropiche, il quale può diminuire la loro forma fisica e influenzare la loro fitness (Frid e Dill, 2002). Per questo motivo la specie è stata inserita nell'Allegato I della Direttiva 2009/147/CE ed è stata inserita nella Lista Rossa Italiana IUCN come specie minacciata (EN) (Rondinini et al., 2013).

C. alexandrinus è un piccolo uccello limicolo le cui dimensioni si aggirano attorno ai 15-17 cm di altezza e un peso variabile dai 40 ai 50 grammi, con un'apertura alare di circa 42-45 cm. Presenta un marcato dimorfismo sessuale: i maschi adulti durante il periodo riproduttivo assumono una colorazione arancio rossiccia sulla nuca, possiedono una macchia nera sulla corona anteriore e una linea, anch'essa di colore nero, che si estende dall'occhio verso la nuca,

creando una sorta di “mascherina”. La gola e il colletto sono di colore bianco come le parti inferiori del corpo. Sono presenti delle evidenti macchie nere all’altezza della spalla e ai lati del torace. Il dorso e le ali sono color marrone cenere. Il becco è di color nero in entrambi i sessi, mentre le zampe, lunghe e sottili, presentano una colorazione grigio opaca tendente al nero, raramente possono essere marrone giallastro pallido. Le femmine adulte sono somiglianti al sesso maschile, tuttavia non presentano le caratteristiche macchie nere sulla corona anteriore e ai lati del torace e la “mascherina” nera è assente.

Durante la stagione invernale entrambi i sessi assumono una colorazione più opaca e spenta e i maschi perdono la corona rossastra sulla nuca. Gli individui giovani, non ancora sessualmente maturi, assomigliano alle femmine adulte, tuttavia a distanza ravvicinata presentano corona, nuca e guance più uniformi. Secondo Argüelles-Ticó et al. (2016), le differenze negli ornamenti maschili e femminili del fratino eurasiatico sono associate al sistema di accoppiamento. Popolazioni con un sistema riproduttivo poligamo mostrano infatti un dimorfismo sessuale più accentuato rispetto alle popolazioni monogame.



Fig. 2: Esempari di fratino adulto sulle spiagge del comune di Cavallino-Treporti (VE). Dimorfismo sessuale evidente tra il maschio in posizione eretta e la femmina accovacciata sul litorale sabbioso.

Foto di Marco Picone.

La specie nidifica principalmente lungo la linea di costa, evitando le coste oceaniche maggiormente esposte al vento. Sono stati rinvenuti siti di nidificazione anche nell'entroterra, in laghi, lagune e corsi d'acqua stagionali, soprattutto dove la salinità elevata mantiene un controllo permanente sulla copertura vegetale. L'assenza di vegetazione vicino ai nidi riduce la predazione da parte di mammiferi terrestri, tuttavia può facilitare quella da parte di uccelli, come i gabbiani, man mano che i nidi e i pulcini vengono esposti (Ribeiro, 2001).

Il fratino predilige superfici omogenee di sabbia, limo o fango secco, tuttavia tollera anche spiagge di ciottoli seppur evitando gli ambienti rocciosi. Nell'Europa meridionale, le spiagge sabbiose sono gli habitat naturali di riproduzione più importanti per la specie, sebbene vengano utilizzati anche habitat artificiali come le saline e gli allevamenti ittici (Pardal, 2000; Rufino, 1989). Possiede un comportamento migratorio, anche se sono stati osservati degli individui che stanziano localmente nelle isole atlantiche e a nord-ovest dell'Africa. I limiti settentrionali durante il periodo di svernamento sono la Spagna meridionale e orientale, la Sardegna, la costa adriatica del Nord Italia, la Grecia, la Turchia e l'Iraq centrale (Glutz et al., 1975; Moore e Boswell, 1956).

Il fratino si alimenta principalmente in zone costiere umide e saline con un livello d'acqua basso, riposando durante l'alta marea. La specie si nutre principalmente di policheti (nereidi), piccoli crostacei (es. isopodi, ostracodi e anfipodi) e piccoli bivalvi negli habitat costieri, mentre nell'entroterra predilige coleotteri e ditteri (Castro et al., 2009; Cramp and Simmons, 1983; Perez-Hurtado et al., 1997). Le abitudini alimentari di *C. alexandrinus* lo rendono suscettibile a bioaccumulo di sostanze tossiche.

Il fratino eurasiatico mostra diversi sistemi di accoppiamento e cure parentali con variazioni inter- e intra popolazione: dopo la schiusa delle uova, il maschio o la femmina, o nessuno dei due, può abbandonare la covata per andare alla ricerca di un nuovo partner (Fraga e Amat, 1996; Kosztolányi et al., 2006; Székely e Lessells, 1993; Vincze et al., 2013). Le femmine con poliandria sequenziale solitamente abbandonano la covata quando i pulcini hanno 7-20 giorni di vita per accoppiarsi con un altro maschio (Amat et al., 1999; Székely e Lessells, 1993; Warriner et al., 1986). Tuttavia, sono stati riscontrati casi di poliginia sequenziale con l'abbandono del nido da parte del maschio (Wamner et al., 1986). Generalmente il fratino effettua delle cure biparentali nelle quali la femmina cova durante il giorno e il maschio durante la notte (Fraga e Amat, 1996; Warriner et al., 1986). Nel periodo di cova, assenze prolungate dal nido provocano variazioni nella temperatura delle uova, con possibili influenze negative

sullo sviluppo dell'embrione (Amat e Masero, 2007; Webb, 1987) e maggiore tempo di esposizione ai predatori (Tulp e Schekkerman, 2006).

Per questo motivo i due sessi si alimentano mentre il partner è al nido (le femmine si nutrono di notte e i maschi durante il giorno), in modo tale che la presenza di un adulto sia costante. Alcune ricerche hanno dimostrato che il disturbo provocato dalle attività umane può interferire con le cure parentali rendendole inefficaci, sia durante la fase di cova che in quella di allevamento dei pulcini, determinando un calo del successo riproduttivo (Liley e Sutherland, 2007; Lord et al., 1997; Ruhlen et al., 2003; Weston e Elgar, 2005).

2. MATERIALI E METODI

Le penne di fratino eurasiatico raccolte sono state decontaminate, sottoposte a digestione acido-umida e successivamente analizzate attraverso uno spettrometro di massa accoppiato induttivamente al plasma. Per ogni campione è stato valutato il *body burden* di terre rare, con l'obiettivo di stimare il bioaccumulo di tali elementi all'interno della matrice cheratinica delle penne.

2.1 REAGENTI CHIMICI E STRUMENTAZIONE

I reagenti utilizzati per l'analisi sono i seguenti:

- Soluzione 2% di acetone (UpS, Romil Chemical Ltd., Cambridge, UK)
- Acido nitrico Ultrapuro 69% (HNO₃ Plasma Pure Plus, SCP Science)
- Perossido di idrogeno UpA 30-32% (H₂O₂ Ultrapure Romil)
- Acqua Ultrapura ottenuta con i sistemi PURELAB[®] Ultra e PURELAB[®] flex 1 ELGA
- Soluzione madre a 50 mg/L di Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb e Lu in 2% HNO₃ (TraceCERT[®], Sigma-Aldrich)

La strumentazione utilizzata comprende:

- Microonde Milestone S.R.L. - ETHOS 1- Advanced Microwave Digestion Labstation
- Spettrometro di massa iCAP[™] RQ ICP-MS ThermoFisher Scientific



Fig. 3: a sinistra lo spettrometro di massa ICP-MS e a destra il microonde Milestone ETHOS 1 utilizzati.

2.2 SPETTROSCOPIA DI MASSA ACCOPPIATA INDUTTIVAMENTE AL PLASMA

La spettrometria di massa accoppiata induttivamente al plasma (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS), è una tecnica analitica che può essere utilizzata per misurare elementi a livelli di traccia (ppm-ppb) all'interno di matrici biologiche. I vantaggi più significativi dell'ICP-MS sono la sua capacità di misurare più elementi contemporaneamente in una singola analisi (tecnica multi-elemento) e l'ampio range analitico.

I campioni liquidi vengono prima nebulizzati nel sistema di introduzione del campione, creando un aerosol fine che viene poi trasferito al plasma ad argon. Il plasma ad alta temperatura atomizza e ionizza il campione, generando ioni che vengono poi estratti attraverso la regione dell'interfaccia e in una serie di lenti elettrostatiche dette lenti ottiche ioniche. L'ottica ionica focalizza e guida il fascio di ioni nell'analizzatore di massa a quadrupolo, il quale separa gli ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z) che verranno successivamente misurati dal rivelatore (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

La preparazione dei campioni per l'ICP-MS è relativamente semplice. I campioni biologici vengono solitamente diluiti prima dell'analisi. I diluenti più comuni includono acidi diluiti (ad es. acido nitrico, acido cloridrico) o alcali (ad es. idrossido di ammonio, tetrametilene). L'acqua deionizzata viene utilizzata come diluente, ma alcuni elementi sono instabili nell'acqua pura, pertanto nella maggior parte dei casi si preferiscono diluenti acidi o alcalini. La diluizione dei campioni permette di ridurre l'**effetto matrice**, il quale dipende dalla concentrazione assoluta dei componenti della stessa. La diluizione, generalmente con fattore compreso tra 10 e 50, permette inoltre la riduzione della deriva dello strumento, la quale dipende dalla deposizione di solidi all'interno del nebulizzatore e sui coni di interfaccia. Solitamente è raccomandato un contenuto di **solidi totali disciolti (TDS)** nel campione inferiore allo 0,2% (2 g/L) per una corretta analisi in ICP-MS. I campioni solidi richiedono una digestione chimica per essere sciolti prima dell'analisi. La digestione può essere effettuata utilizzando acidi o alcali forti, a temperatura ambiente o in un bagno di acqua calda, in un blocco di riscaldamento a secco o in un forno a microonde ad alta pressione per facilitare il processo digestivo (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

Lo spettrometro di massa si compone dei seguenti elementi:

- Sistema di introduzione del campione
- Plasma ad accoppiamento induttivo (ICP)
- Interfaccia
- Ottica ionica
- Analizzatore di massa
- Rivelatore

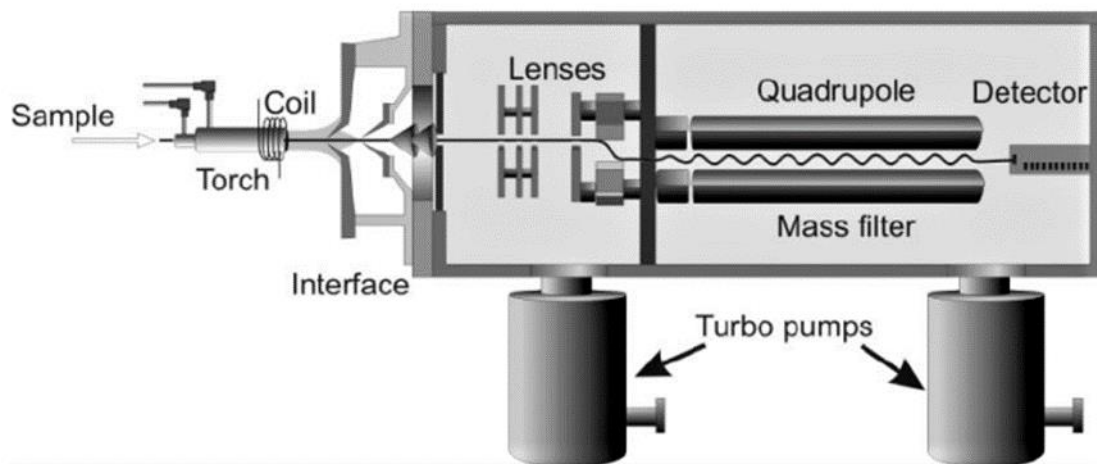


Fig. 4: Sezione trasversale schematica di un ICP-MS. (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

2.2.1 INTRODUZIONE DEL CAMPIONE

Attraverso un autocampionatore e una pompa peristaltica, il campione viene inviato al nebulizzatore per essere trasformato in aerosol. In commercio sono disponibili diversi tipi di nebulizzatori, tra cui quelli pneumatici, a ultrasuoni e desolventi.

I **nebulizzatori pneumatici**, i quali utilizzano il flusso di gas per generare l'aerosol, sono i più comuni per le applicazioni cliniche di routine. Ne esistono diverse tipologie in relazione al tipo di matrice in esame, tra cui il concentrico, a flusso incrociato, Babington e Miramist (impiegato per matrici complesse, come le penne).

In contrasto al design pneumatico, un **nebulizzatore a ultrasuoni** utilizza energia sonora, proveniente da un trasduttore piezoelettrico, per generare l'aerosol, mentre i sistemi di **nebulizzazione desolvente** utilizzano una camera di nebulizzazione riscaldata, per desolvare il campione prima che raggiunga il plasma (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

Dopo essere stato aerosolizzato, il campione entra all'interno della *spray chamber*, la quale ha lo scopo di filtrare selettivamente le goccioline di aerosol più grandi generate dal nebulizzatore. L'azione filtrante della *spray chamber* è fondamentale, in quanto il plasma risulta inefficiente nella ionizzazione di particelle liquide con diametro $>10 \mu\text{m}$.

Il processo di introduzione del campione in ICP-MS è piuttosto inefficiente, normalmente solo l'1-2% del campione raggiunge il plasma mentre il resto viene scaricato nei rifiuti. Pertanto, i fattori che influenzano l'efficienza dell'introduzione del campione possono avere effetti significativi sulla risposta dello strumento. Uno di questi è la temperatura della camera di nebulizzazione, che normalmente viene mantenuta a circa $2 \text{ }^\circ\text{C}$ con l'ausilio di una cella di Peltier. Il funzionamento della *spray chamber* a questa temperatura riduce al minimo la formazione di ossidi ed evita di sovraccaricare il plasma con il solvente, il quale può avere un effetto deleterio sulle prestazioni analitiche (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

2.2.2 PLASMA AD ACCOPPIAMENTO INDUTTIVO (ICP)

Il plasma è essenzialmente un gas ionizzato, costituito da ioni con carica positiva e da elettroni liberi. Il ruolo del plasma nell'ICP-MS è quello di ionizzare il campione. A differenza delle cosiddette sorgenti di ionizzazione “morbide”, utilizzate in altre forme di spettrometria di massa che impartiscono un'energia relativamente bassa all'analita, l'ICP è considerata una tecnica di ionizzazione “dura” perché atomizza completamente la maggior parte delle molecole del campione. Gli strumenti ICP-MS utilizzano un plasma ad argon, sebbene siano stati descritti anche plasmi ad elio. Quest'ultimo presenta numerosi vantaggi, tuttavia viene utilizzato l'argon per via dei costi elevati dell'elio (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

Il plasma si forma alla fine di tre tubi concentrici in quarzo che nell'insieme costituiscono la torcia. Il tubo più interno è l'**iniettore**, che contiene il campione sotto forma di aerosol in un flusso di argon, il quale trasporta il campione al plasma. Concentricamente all'iniettore è presente un flusso tangenziale di argon, detto **gas ausiliario**, che forma il plasma. Il tubo più esterno della torcia contiene un flusso di argon di raffreddamento per evitare la fusione dei tubi in quarzo. L'estremità della torcia è circondata da una **bobina di induzione in rame** (detta bobina di carico), collegata a un generatore di radiofrequenza (RF), il quale fornisce energia alla bobina creando una corrente alternata ad alta frequenza che, a sua volta, induce un campo elettromagnetico variabile nel tempo all'interno della torcia. Si genera così una scarica ad alta tensione, detta **scintilla di Tesla**, la quale ionizza una frazione degli atomi di argon producendo ioni positivi ed elettroni liberi. Essi sono influenzati dal campo elettromagnetico presente all'interno della torcia, vengono infatti accelerati producendo una reazione a cascata scontrandosi con altri atomi di argon, producendo ulteriori ioni ed elettroni. Il movimento delle particelle cariche nella torcia genera un'enorme quantità di calore (fino a 10.000 K), producendo come risultato il plasma accoppiato induttivamente (ICP).

Raggiunto il plasma ad argon ad alta temperatura il campione nebulizzato viene atomizzato e ionizzato, producendo ioni positivi a carica singola (M^+) e talvolta a carica doppia (M^{++}). Il **grado di ionizzazione (%)** di un elemento dipende dalla temperatura del plasma e dal potenziale di ionizzazione dell'elemento stesso. A una data temperatura, maggiore è il potenziale di ionizzazione di un elemento, minore sarà il suo grado di ionizzazione, fino a valori prossimi allo zero con potenziali di ionizzazione superiori a 15,76 eV (potenziale di ionizzazione dell'argon). La maggior parte degli elementi ha un potenziale di prima ionizzazione molto inferiore a quello dell'argon, perciò sono efficacemente ionizzati nel plasma (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

2.2.3 INTERFACCIA

È necessaria la presenza di un'**interfaccia** per separare il plasma, che opera a pressione ambientale, dalla camera a vuoto elevato (circa 10^{-5} - 10^{-3} Pa) dello spettrometro di massa, il quale analizzerà il campione ionizzato in precedenza. L'interfaccia si compone di due coni coassiali in nichel (o platino): il primo cono, il *sampler cone*, si trova a contatto con il plasma e ha lo scopo di estrarre gli ioni prodotti attraverso un orifizio del diametro di circa 1 mm. Una pompa meccanica mantiene una pressione di interfaccia tra i coni di circa 150-300 Pa. L'elevata riduzione di pressione, provocata dal passaggio attraverso l'orifizio, provoca un'espansione degli ioni che generano un getto libero. Successivamente vengono estratti da un ulteriore orifizio (circa 0,45 mm di diametro) presente sul secondo cono dell'interfaccia, lo *skimmer cone*, che convoglia il fascio di ioni sulle lenti elettrostatiche di focalizzazione, le quali compongono l'**ottica ionica**. Per evitare il surriscaldamento di queste componenti, un fluido di raffreddamento (solitamente acqua deionizzata) circola in continuo tra l'*unità chiller* e lo strumento (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

Il **sistema di ottica ionica** ha lo scopo di convogliare il fascio ionico verso l'analizzatore di massa, inoltre, previene l'arrivo al rivelatore di specie chimiche neutre e fotoni, i quali rappresentano una fonte di rumore e instabilità del segnale per l'ICP-MS (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

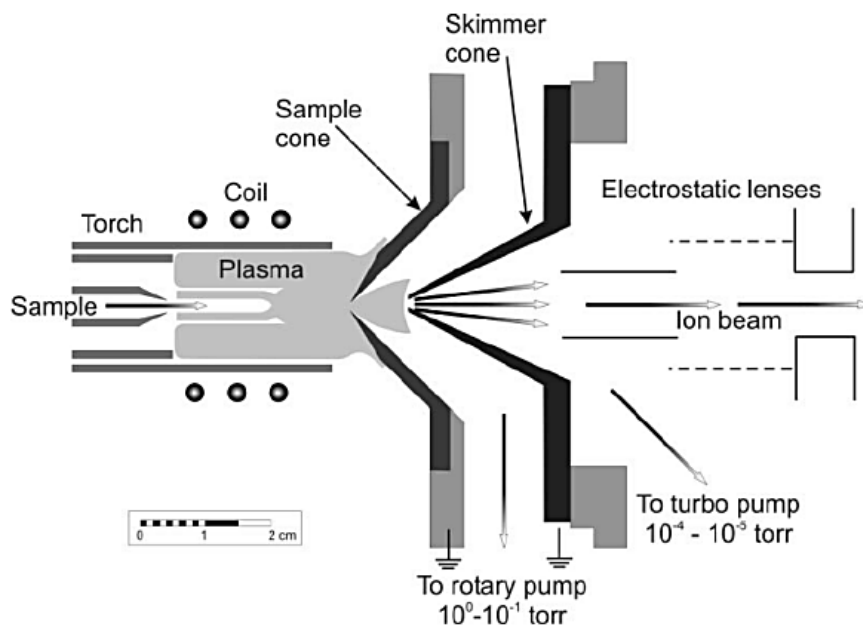


Fig. 5: Sezione trasversale schematica della regione di interfaccia di un ICP-MS. (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

2.2.4 ANALIZZATORE DI MASSA

Dopo aver attraversato il sistema di ottica ionica, gli ioni arrivano all'analizzatore di massa il quale separa gli ioni in base al rapporto massa/carica (m/z). Nella tecnica ICP-MS sono impiegati diversi tipi di analizzatori di massa, tra cui il quadrupolo, il settore magnetico e raramente il time-of-flight (TOF). L'analizzatore più comunemente utilizzato è quello a **quadrupolo**, costituito da quattro aste metalliche parallele (iperboliche o cilindriche), normalmente lunghe 15-20 cm, disposte in una matrice quadrata. Sulle aste viene applicata una corrente a radiofrequenza alternata (AC) e una corrente continua (CC), che generano al centro della matrice un campo elettrico variabile nel tempo attraverso il quale passano gli ioni. Per uno ione con un particolare rapporto m/z , si ottengono solo specifiche combinazioni di potenziali AC e CC, dando luogo a una traiettoria di volo stabile attraverso il quadrupolo. Gli ioni con traiettorie instabili si scontrano con le barre e non vengono trasmessi. Queste tensioni possono essere incrementate molto rapidamente, consentendo di scansionare l'intero intervallo di massa in pochi millisecondi (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

Il tempo che lo strumento impiega per acquisire i dati a un particolare valore m/z è chiamato **tempo di permanenza**. Tempi di permanenza più lunghi consentono di ottenere misure più accurate e sensibili sul rivelatore, calcolando la media del segnale per un periodo di tempo più lungo. La **risoluzione** di un analizzatore di massa è la misura della sua capacità di identificare masse adiacenti.

Esistono due modi per definire la risoluzione in ICP-MS:

1. Misurare la larghezza del picco di massa a una particolare altezza del picco (solitamente il 10% del picco massimo). Per gli analizzatori a quadrupolo, la risoluzione è normalmente di circa 0,75 amu (unità di massa atomica).
2. Calcolare il rapporto $M/\Delta M$, dove M è la massa del picco dell'analita e ΔM è la differenza di massa rispetto al picco più vicino. Utilizzando questo metodo, gli analizzatori a quadrupolo per ICP-MS operano solitamente con una risoluzione di circa 300 (misura senza unità). Tuttavia, gli strumenti a quadrupolo non sono in grado di risolvere molti casi di interferenze spettroscopiche.

Un'altra importante proprietà dell'analizzatore di massa è la **sensibilità all'abbondanza**, ovvero il contributo che un segnale per un isotopo a una certa massa (M) dà alle masse adiacenti ($M-1$ e $M+1$). In altre parole, la sensibilità all'abbondanza è una misura del tailing dei picchi, che può causare interferenza quando il segnale di una massa è considerevolmente più alto di

quello di una massa adiacente. Un valore tipico della sensibilità all'abbondanza di un quadrupolo è 10^{-7} (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

2.3 RIVELATORE

Il rivelatore più utilizzato per l'ICP-MS è un **moltiplicatore di elettroni (EM)**. Gli ioni dell'analita, caricati positivamente, colpiscono il primo dinodo del rivelatore, che viene mantenuto a un'alta tensione negativa. L'impatto dello ione sul rivelatore provoca l'emissione di diversi elettroni dalla superficie che, a loro volta, colpiscono il dinodo successivo rilasciando altri elettroni. Questo processo, chiamato **emissione secondaria**, genera un effetto a cascata che culmina in un segnale sufficientemente grande da poter essere misurato come un "conteggio" di ioni. In questo modo, un EM può generare un impulso di segnale misurabile dall'impatto di un singolo ione sul rivelatore, conferendo una sensibilità analitica molto elevata (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

I **limiti di rilevazione** tipici in ICP-MS sono dell'ordine dei nmol/L per la maggior parte degli elementi, tuttavia il valore esatto dipende dall'elemento, dal tipo di matrice biologica, dal fattore di diluizione impiegato durante la preparazione del campione, dal design del sistema di introduzione del campione, dalle condizioni operative dello strumento (compresa la temperatura del plasma) e dai segnali di fondo (purezza del reagente, ecc.).

Il **limite di rilevabilità (Limit of Detection, LOD)** può essere calcolato come rapporto tra la deviazione standard della risposta della calibrazione esterna (S_y o σ) e la pendenza (S).

$$\text{LOD} = 3\frac{\sigma}{S}$$

Il **limite di quantificazione (Limit of Quantification, LOQ)**, è la concentrazione minima di analita che, tramite la calibrazione esterna, può essere quantificata con certezza all'interno del campione. La formula per il calcolo del LOQ è:

$$\text{LOQ} = 10\frac{\sigma}{S}$$

Dove σ corrisponde a S_y e S è la pendenza della curva di calibrazione esterna.

2.3.1 CURVA DI CALIBRAZIONE ESTERNA E STANDARD INTERNO

Come detto in precedenza, il segnale misurato dal rivelatore è espresso in “conteggi al secondo”, che corrispondono al numero di ioni che colpiscono il rivelatore. Per convertire questi dati in un valore di concentrazione, viene effettuata una **calibrazione esterna**.

Nella calibrazione esterna vengono utilizzate delle soluzioni standard, preparate a partire da soluzioni madre certificate, che contengono concentrazioni note dell'analita. In base al segnale di risposta alle varie concentrazioni note si ottiene un insieme di punti segnale/concentrazione in un sistema cartesiano. Attraverso l'interpolazione di questi punti si ottiene la **curva** (o retta) **di calibrazione** secondo il metodo dei minimi quadrati, per il quale la retta migliore è quella che minimizza il quadrato dei residui (distanza tra il punto nel grafico e la retta) (Dell'Accio F., 2016). La curva di calibrazione deve avere una relazione lineare nel range di concentrazione degli analiti, in modo tale da poterla utilizzare per quantificare le concentrazioni ignote di analita all'interno di campioni partendo dal segnale strumentale. Se i campioni presentano concentrazioni troppo elevate vanno diluiti con un opportuno fattore di diluizione per rientrare nei limiti di linearità della retta. Se un campione si trova agli estremi della curva di calibrazione è fuori dai limiti di linearità e pertanto la concentrazione di analiti presenti al suo interno non può essere calcolata in modo accurato. Assieme agli standards a concentrazioni note viene utilizzato un bianco, il quale contiene solamente i reagenti e non l'analita, per poter sottrarre dai campioni i rumori di fondo e pulire il segnale (Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R., 2019).

Lo **standard interno** è impiegato a concentrazione nota e costante per correggere eventuali variazioni delle condizioni operative dello strumento e effetti della matrice specifici del campione, i quali possono aumentare o sopprimere il segnale dell'analita. Il rapporto analita-standard interno dovrebbe essere indipendente dalla matrice del campione o dalle fluttuazioni delle condizioni operative dello strumento. Lo standard interno è aggiunto o direttamente al campione che deve essere analizzato o tramite un raccordo a T nel sistema di introduzione del campione nella spray chamber. Uno standard interno ideale deve avere una massa e un potenziale di ionizzazione simili a quelli dell'analita, non deve subire interferenze spettroscopiche da parte della matrice e non deve causare a sua volta interferenze con l'analita. Inoltre, lo standard interno non deve essere fonte di contaminazione dell'analita. Gli standard interni più utilizzati in ICP-MS includono germanio (^{72}Ge), rodio (^{103}Rh), indio (^{115}In), tellurio (^{125}Te), renio (^{185}Re) e iridio (^{191}Ir). In questo studio come standard interno è stata utilizzata una soluzione a concentrazione nota e costante di Rh.

2.3.2 INTERFERENZE SPETTROSCOPICHE

L'interferenza spettroscopica si verifica quando ioni che non fanno parte dell'analita in esame hanno il suo stesso rapporto m/z .

1. **Interferenza isobarica:** avviene quando due isotopi di elementi diversi hanno la stessa massa entro la risoluzione dello strumento.
2. **Interferenza da cariche doppie:** la maggior parte degli elementi forma ioni a carica singola nell'ICP-MS, ma elementi con un secondo potenziale di ionizzazione, inferiore al primo potenziale di ionizzazione dell'argon, formano una piccola ma significativa frazione di ioni a doppia carica.
3. **Interferenze poliatomiche:** gli ioni poliatomici si formano nel plasma ad alta temperatura a causa di un'atomizzazione incompleta o di reazioni di ricombinazione durante l'estrazione degli ioni nello spettrometro di massa. Questi ioni possono derivare dalla matrice del campione, dai reagenti utilizzati per la preparazione del campione, dall'argon o dai gas atmosferici trasportati. È il tipo di interferenza che genera più problemi.
4. **Tailing interference:** interferenza dovuta alla sovrapposizione degli spettri di elementi con masse adiacenti. L'entità di questo tipo di interferenza dipende dalla sensibilità all'abbondanza dell'analizzatore di massa.

2.3.3 INTERFERENZE NON SPETTROSCOPICHE

Le interferenze non spettroscopiche possono essere suddivise in effetti matrice e deriva dello strumento. Entrambi possono causare errori analitici se non vengono corretti in modo appropriato.

1. **Effetti matrice:** causano un aumento o, più comunemente, una soppressione del segnale dell'analita a causa delle proprietà o dei costituenti della matrice del campione.
2. **Effetti dell'introduzione del campione:** la viscosità del campione, la pressione di vapore, la tensione superficiale, la forza ionica e l'acidità svolgono un ruolo importante. Le modifiche che aumentano l'apporto del campione al plasma, come una riduzione della viscosità e un aumento della pressione di vapore, porteranno a un aumento del segnale, a condizione che il plasma non sia sovraccarico. Il sovraccarico del plasma con il solvente può avere un effetto di raffreddamento che diminuisce la ionizzazione e genera la soppressione del segnale.

- 3. Deriva dello strumento:** con il tempo i solidi disciolti nei campioni possono depositarsi nel nebulizzatore e/o nei coni di interfaccia. Il deposito di solidi sui coni di interfaccia riduce la trasmissione degli ioni nello spettrometro di massa occludendo l'orifizio, con conseguente soppressione del segnale. Il grado di occlusione aumenta con il tempo, causando una caratteristica deriva verso il basso del segnale.

2.4 RACCOLTA E PRETRATTAMENTO DEI CAMPIONI

In questo studio è stato valutato il body burden in penne di fratino eurasiatico, prelevate da individui adulti riproduttivi. Gli uccelli sono stati catturati al nido durante la cova, le femmine al mattino e i maschi al crepuscolo. Un anello metallico e un anello giallo con un codice alfanumerico a 3 cifre sono stati applicati rispettivamente sul tarso destro e sinistro per identificare univocamente gli uccelli ed evitare doppi campionamenti durante la stessa stagione. Ad ogni soggetto è stata prelevata la penna destra più esterna della coda (R6), poiché la muta di questa penna avviene nel periodo post-riproduttivo (Gin and Melville, 1983), sia per le popolazioni migratrici che per le popolazioni stanziali o migratrici di corto raggio (Newton, 2009). L'impiego di questa penna consente quindi di massimizzare la probabilità che la muta sia avvenuta nelle aree riproduttive in cui i campioni sono stati prelevati. Il codice alfanumerico a tre cifre dell'anello colorato è stato usato per identificare la penna in sede di analisi dati e discussione dei risultati. La raccolta non arreca traumi o influisce sulle capacità di volo degli individui. La penna non viene tagliata perché parte del calamo resta all'interno dell'epidermide dell'uccello e non verrà rimpiazzata dall'organismo fino alla prossima muta. Dopo la raccolta, le penne sono state inserite singolarmente in buste di carta etichettate con la data, i codici degli anelli e il luogo di campionamento e sono state conservate a temperatura ambiente fino all'analisi chimica (Jaspers et al., 2006).

I campioni raccolti provengono dal Veneto, più precisamente dalle località di Valle Vecchia, Celestia e Cavallino-Treporti in provincia di Venezia, e dal Lido di Fermo nelle Marche.

Prima di effettuare le analisi chimiche, ogni penna è stata decontaminata secondo la procedura riportata in Picone et al. (2019). Per rimuovere tracce di polvere e altre impurità, i campioni sono stati lavati accuratamente uno ad uno alternando acqua ultrapura (Elga) e una soluzione al 2% di acetone, ripetendo il procedimento per almeno tre volte. Dopo un ultimo lavaggio con acqua ultrapura, in modo da rimuovere ogni traccia di acetone, i campioni sono stati essiccati in capsule Petri per una notte sotto una cappa a flusso laminare. Le penne sono poi state pesate su una bilancia analitica. Tutti gli strumenti e la vetreria utilizzati per la manipolazione dei

campioni sono stati precedentemente decontaminati, lavati con acqua ultrapura e lasciati asciugare prima dell'uso.

2.5 DIGESTIONE ACIDO-UMIDA

La **digestione acido-umida** a microonde permette di dissolvere rapidamente campioni solidi con una limitata perdita di specie volatili e livelli di contaminazione molto bassi. Inoltre, viene definita come tecnica di pretrattamento dei campioni più robusta per l'analisi ICP-MS.

Una miscela di acidi puri viene aggiunta al campione in una vessel in fluoro polimero (TFM), materiale stabile, inerte chimicamente e trasparente alle radiazioni a microonde. La contaminazione del campione, causata dall'infiltrazione di gas o altre fasi durante la digestione, può essere evitata inserendo il campione all'interno di piccole vessel in quarzo, le quali verranno poste all'interno delle vessel. Questa particolare tecnica, definita *vessel-inside-vessel*, ha il vantaggio di garantire la digestione di una quantità limitata di campione con un basso fattore di diluizione e ridurre il consumo di reagenti chimici (Picone et al., 2019).

Le penne sono state poste, con l'ausilio di una pinzetta teflonata, all'interno di vessel in quarzo precedentemente lavate e decontaminate. Successivamente, all'interno delle suddette, sono stati inseriti 10 mL di acido nitrico ultrapuro e poste all'interno della vessel primaria. È stata inserita all'interno della vessel primaria una soluzione di acqua ultrapura e perossido di idrogeno in rapporto 4,5:1; durante il processo di digestione questa soluzione favorisce la conversione degli ossidi di azoto prodotti in acido nitrico, con la conseguente riduzione della pressione all'interno delle vessels, e coadiuva la riuscita ottimale della digestione acido-umida. Dopo aver allestito i campioni, le vessels sono state chiuse, poste all'interno di una camicia in materiale ceramico e inserite in appositi spicchi di plastica per poter garantire una chiusura ermetica. Prima di azionare il rotore a tecnologia *vent and release* sul quale sono stati posti gli spicchi, viene inserita una sonda termica nella vessel di controllo della temperatura (che deve contenere comunque un campione), in modo da monitorarla durante la digestione. In ogni ciclo è stato inserito un bianco contenente solamente i reagenti utilizzati, in modo tale da quantificare il contenuto di terre rare nei reagenti utilizzati e verificare la presenza di un'eventuale contaminazione. Il bianco reagente verrà sottratto dall'analisi del campione.

Al termine del processo di digestione, dopo aver atteso l'opportuno raffreddamento delle vessels, ogni campione è stato recuperato con 10 mL di acqua ultrapura, ottenendo così una prima diluizione in rapporto 1:2. Dopo ogni digestione, le vessels primarie e secondarie sono

state accuratamente sciacquate con acqua ultrapura. Successivamente, le vessels in quarzo sono state riempite con 10 mL di HNO_3 , mentre nelle vessels in PTFE è stata inserita la soluzione di acqua ultrapura e H_2O_2 in rapporto 4,5:1. È stata eseguita una digestione “a vuoto” per rimuovere eventuali tracce dei campioni digeriti in precedenza. Al termine, tutte le vessel sono state sciacquate con acqua ultrapura e lasciate ad asciugare prima della digestione successiva. Tutti i passaggi sono stati eseguiti sotto una cappa aspirante pulita, al fine di ridurre al minimo qualsiasi contaminazione.

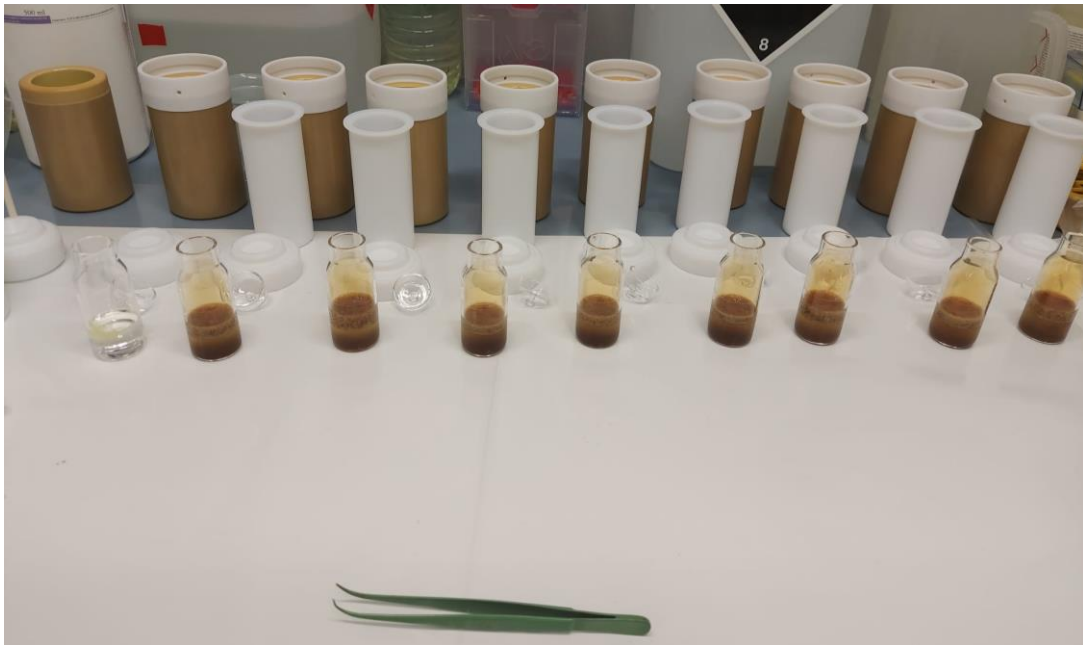


Fig. 6: Allestimento dei campioni nelle vessels per la digestione a microonde (Milestone, ETHOS 1).

Foto di Alessia Giurin

2.6 ANALISI CON ICP-MS

Dopo la digestione i campioni sono stati diluiti con acqua ultrapura in rapporto 1:25 per ridurre la concentrazione dell'acido (deve essere < 5%) e per non intasare il nebulizzatore, essendo in presenza di una matrice complessa. È stato inserito un nebulizzatore *Miramist*, progettato per matrici complesse, e un supporto *robust* sullo *skimmer cone*, per minimizzare eventuali interferenze nell'analisi in ICP-MS.

A partire dalla soluzione madre multielemento contenente REEs, sono state create delle soluzioni standard per la calibrazione esterna con le seguenti concentrazioni: 10 µg/L, 5 µg/L, 2.5 µg/L, 1 µg/L, 0.5 µg/L, 0.1 µg/L e 0.05 µg/L. Come standard interno è stata utilizzata una soluzione di rodio (^{103}Rh) a 10 µg/L.

Per ridurre le interferenze degli ioni poliatomici nelle celle di collisione ICP-MS è stata utilizzata la tecnica di **discriminazione dell'energia cinetica** (Kinetic Energy Discrimination, KED). Gli ioni atomici dell'analita superano la barriera energetica posta a valle della cella di collisione, mentre gli ioni poliatomici interferenti non ci riescono a causa della minore energia cinetica, con conseguente riduzione dell'interferenza poliatomica (Yamada, 2015).

Per l'analisi dei dati ottenuti è stato utilizzato il software Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution™ (ISDS), software flessibile per piattaforme di laboratorio incaricate all'analisi di elementi e isotopi.

I seguenti elementi sono stati analizzati in tutti i campioni: Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb e Lu. Il promezio (Pm) non è stato incluso nello studio in quanto non si trova naturalmente nell'ambiente. Per ogni campione è stata calcolata la deviazione standard e la deviazione standard relativa percentuale (RSD%), la quale possiede un valore $\leq 10\%$ per tutti gli elementi di interesse.

2.7 ANOMALIE DELLE TERRE RARE

A causa della regola di Oddo-Harkins, quando si vanno a tracciare le concentrazioni delle terre rare rispetto al loro numero atomico o raggio ionico, si produce un andamento irregolare a zig-zag, il quale rende molto difficile l'interpretazione dei dati (Allegato 1). Perciò Masuda A. e Coryell L. nei primi anni '60 suggerirono di normalizzare le concentrazioni di REEs rispetto ad una roccia sedimentaria di riferimento. Normalizzando i dati viene eliminato l'effetto della regola di Oddo-Harkins rendendo più semplice l'interpretazione dei risultati. Inoltre, essendo il modello più uniforme, le deviazioni dall'andamento naturale di alcuni elementi sono facilmente distinguibili come anomalie, le quali possono essere quantificate utilizzando delle specifiche formule matematiche.

Secondo lo studio di Bau et al. (2018), le rocce di riferimento (*shales*) non presentano anomalie, perciò qualsiasi roccia utilizzata per la normalizzazione dei dati non andrà ad influire significativamente sul risultato. Anche gli studi di Picone et al. (2022) e Rétif et al. (2022) confermano che se vengono utilizzate shales diverse per la normalizzazione dei dati il trend finale di REEs non cambia. Nella presente tesi è stata utilizzata la **Post-Archean Australian Shale (PAAS)** per la normalizzazione delle concentrazioni di REEs (Pourmand, 2012).

2.7.1 ANOMALIA DEL CERIO

Esistono tre formule per il calcolo dell'anomalia del cerio in base alle REEs di comparazione scelte. Se il valore è superiore ad 1 significa che è presente un'anomalia positiva di Ce, se inferiore ad 1 l'anomalia è negativa.

Facendo riferimento alle concentrazioni di La e Pr si utilizza la seguente formula:

$$\text{Anomalia Ce(I)} = \frac{3 \text{Ce}^*}{2 \text{La}^* + \text{Pr}^*} \quad (\text{Taylor Mc Lennan, 1985})$$

La seconda formula si riferisce alle concentrazioni di Pr e Nd:

$$\text{Anomalia Ce(II)} = \frac{\text{Ce}^*}{(\text{Pr}^*)^2 / \text{Nd}^*} \quad (\text{Lawrence et al., 2006})$$

Infine la terza formula fa riferimento alle concentrazioni di La e Nd:

$$\text{Anomalia Ce(III)} = \frac{3 \text{Ce}^*}{2 \text{La}^* + \text{Nd}^*} \quad (\text{Pat Wilde, 1996})$$

2.7.2 RAPPORTO GADOLINIO GEOGENICO/GADOLINIO ANTROPOGENICO

La concentrazione di gadolinio antropogenico può essere calcolata solamente se è noto il fondo geogenico, per il quale è necessario conoscere l'andamento delle REEs normalizzate. La concentrazione di gadolinio geogenico $[Gd]^*$ viene calcolata sulla base delle concentrazioni normalizzate (SN= Shale Normalized) di Eu e Nd (Kulaksız e Bau, 2013).

$$\text{Log } Gd_{SN} = (4 \log Eu_{SN} - \log Nd_{SN})/3$$

$$[Gd]^* = Gd_{SN} \times [Gd]^{shale}$$

La concentrazione di Gd antropogenico si ottiene sottraendo il fondo geogenico alla concentrazione di Gd presente nel campione.

$$[Gd]_{antropogenico} = [Gd]_{misurato} - [Gd]^*$$

2.8 ANALISI STATISTICA

Per l'analisi statistica delle concentrazioni di REEs è stato utilizzato l'**indice di correlazione per ranghi di Spearman**, un indice non parametrico che indica il grado di relazione tra due variabili continue e ordinabili. Può essere applicato se i valori da relazionare sono casuali e semplici e misurati ad almeno un livello ordinale. Il coefficiente di Spearman varia tra -1 e +1, dove i valori positivi indicano una correlazione direttamente proporzionale, mentre i valori negativi indicano una correlazione inversamente proporzionale. Se i valori si avvicinano ad 1 la correlazione è molto forte, mentre valori vicini allo 0 indicano l'assenza di correlazione tra i dati. Per il calcolo del coefficiente rho di Spearman viene utilizzata la seguente formula:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

Dove: d_i = differenza tra i ranghi delle coppie di variabili
 n = numero delle variabili

L'indice di correlazione di Spearman è stato calcolato utilizzando il software Past.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Le penne di *C. alexandrinus* raccolte nelle Marche, più precisamente in provincia di Fermo, sono state confrontate con penne raccolte lungo il litorale veneto. Le prime rispecchiano l'influenza di un ambiente costiero, a differenza delle seconde che sono state campionate in aree in cui gli organismi possono alimentarsi tanto in ambiente costiero (durante il turno di cova), quanto in ambiente lagunare (soprattutto durante il turno di cova del partner e di notte) (Cecere et al., 2022 submitted). Per entrambe le località sono state valutate le concentrazioni totali di terre rare suddivise in LREEs e HREEs, le anomalie del cerio e il rapporto tra gadolinio geogenico e antropogenico. Per una migliore interpretazione e rappresentazione grafica delle concentrazioni totali di LREEs e HREEs, sia le penne marchigiane che le penne veneziane sono state suddivise in due gruppi: il gruppo 1 (G1) presenta concentrazioni molto maggiori rispetto al gruppo 2 (G2).

3.1 MARCHE

3.1.1 CONCENTRAZIONE TOTALE DI TERRE RARE

La sommatoria di terre rare leggere (Σ LREEs) e pesanti (Σ HREEs) viene solitamente utilizzata per confrontare com'è distribuita la concentrazione di REEs all'interno dei campioni e osservare se è presente una preponderanza delle une sulle altre.

La concentrazione totale più elevata di LREEs è pari a 1943 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nella penna BFK, a seguire con una concentrazione di 1446 $\mu\text{g}/\text{kg}$ la penna BFJ, con 1385 $\mu\text{g}/\text{kg}$ la penna BFV e con 1384 $\mu\text{g}/\text{kg}$ la penna BFT.

Le concentrazioni totali più basse si riscontrano nelle penne BFD e BFF con valori rispettivamente di 89,57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 68,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

La concentrazione totale media di LREEs all'interno delle penne marchigiane è di 617,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Dal grafico delle distribuzioni percentuali di LREEs all'interno dei campioni (Fig. 9), si evince che l'elemento più presente è il Ce, seguito da La e Nd. La penna BFS presenta circa il 65% di Ce, il 30% di La e il 5% di Sm, gli altri elementi sono presenti in concentrazioni inferiori al limite di quantificazione ($< \text{LOQ}$). Nella penna BFN sono presenti solamente il La (circa 30%) e il Ce (circa 70%).

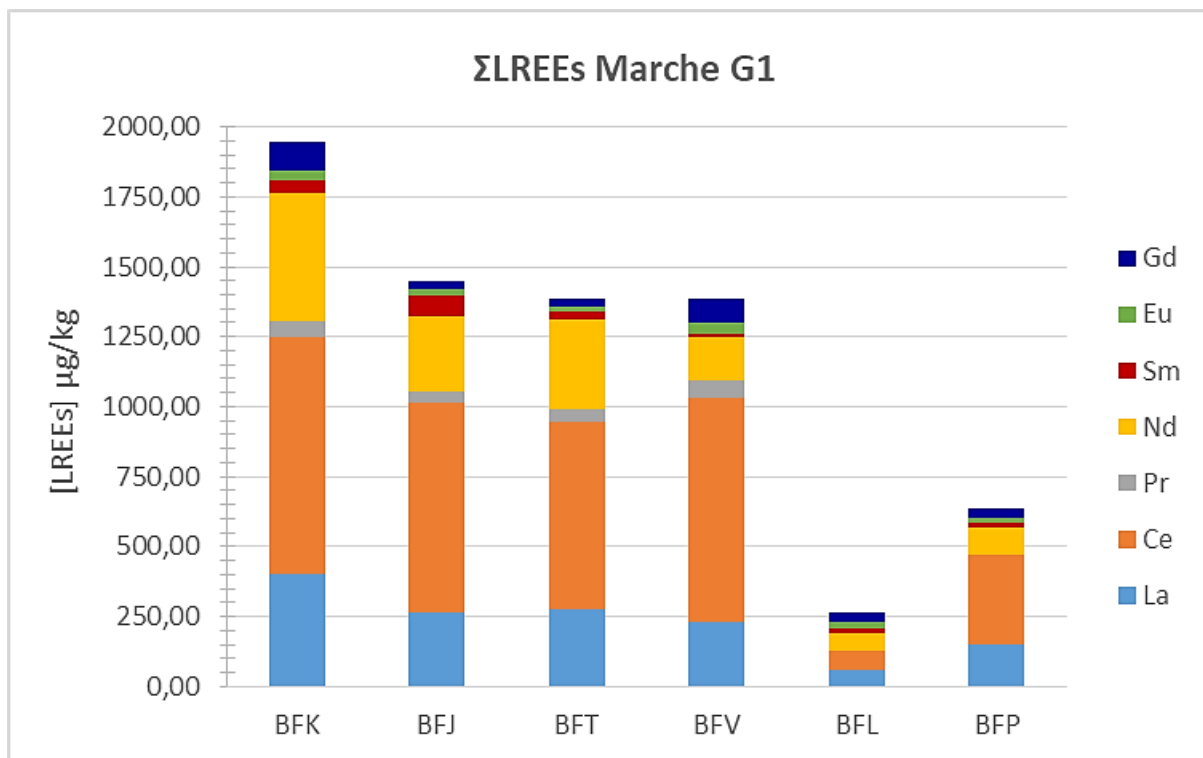


Fig. 7: istogramma della sommatoria di LREEs all'interno delle penne marchigiane del gruppo 1.

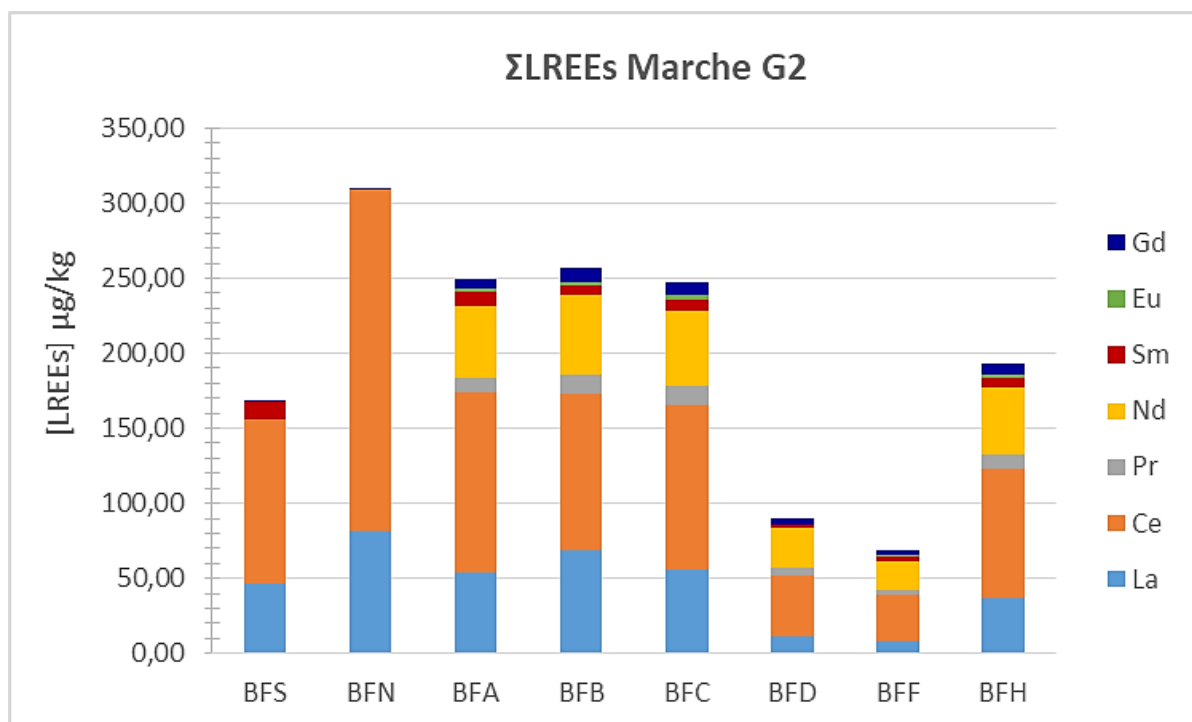


Fig. 8: istogramma della sommatoria di LREEs all'interno delle penne marchigiane del gruppo 2.

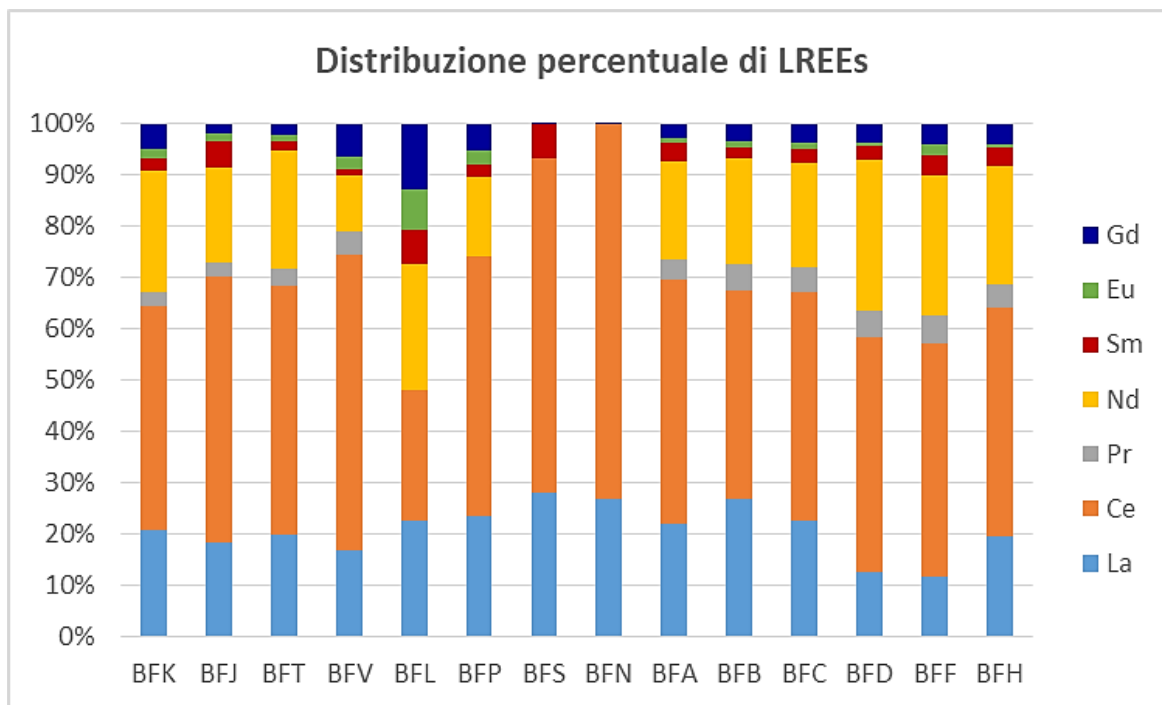


Fig. 9: distribuzione percentuale di LREEs all'interno delle penne marchigiane

Tab. 3: concentrazioni di LREEs rilevate all'interno delle penne marchigiane. I dati evidenziati con il colore giallo sono risultati sotto il limite di quantificazione (< LOQ).¹

<i>LREEs</i>							
Campione	La µg/kg	Ce µg/kg	Pr µg/kg	Nd µg/kg	Sm µg/kg	Eu µg/kg	Gd µg/kg
BFK	402,22	848,69	53,46	457,15	50,08	34,10	97,74
BFJ	262,75	751,91	40,18	266,00	74,79	23,70	26,85
BFT	273,77	673,15	44,48	319,05	27,55	17,03	29,59
BFV	230,95	800,17	61,00	154,70	15,80	35,07	88,14
BFL	59,33	66,85	< LOQ	64,93	17,63	20,79	33,62
BFP	149,09	323,02	< LOQ	98,15	14,94	18,00	33,56
BFS	46,52	109,15	< LOQ	< LOQ	11,58	< LOQ	< LOQ
BFN	81,97	226,53	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
BFA	54,40	119,17	9,62	48,08	9,52	2,30	6,80
BFB	68,65	104,26	12,98	52,97	5,92	2,61	9,12
BFC	56,00	109,95	12,55	49,95	7,29	2,52	9,54
bfd	11,24	40,98	4,48	26,46	2,35	0,81	3,25
BFF	7,97	31,10	3,69	18,89	2,61	1,56	2,69
BFH	37,44	86,00	9,08	44,25	7,20	1,24	7,84

¹ Per convenzione quando un valore risulta < LOQ viene indicato con il LOD/2, pari a 0,0022 per Pr e Sm; 0,0058 per Nd; 0,0004 per Eu e 0,0009 per Gd.

Il Ce è l'elemento delle terre rare più abbondante in natura, inoltre il suo impiego nell'industria è molto ampio, si trova infatti in TV a schermo piatto, lampadine a basso consumo, vetro e nelle marmitte catalitiche (riduce gli NO_x). Anche Nd e La sono utilizzati nella costruzione di TV e nell'industria dell'illuminazione.

L'elevata presenza di Ce all'interno dei campioni era attesa data la sua elevata abbondanza geochimica. Anche le quantità di La riscontrate nelle penne di fratino erano presumibili poiché studi precedenti hanno messo in evidenza come questo elemento all'interno delle penne sia presente in grandi quantità (Picone et al., 2022). L'abbondanza del Nd potrebbe essere legata tanto a caratteristiche geologiche quanto a contaminazione. Tuttavia osservando il trend delle concentrazioni di REEs normalizzate (Allegato 2), si può notare la presenza di una leggera anomalia positiva di Nd, causata probabilmente da input antropici.

Per quanto riguarda le HREEs, la concentrazione totale più elevata si riscontra nella penna BFK con 1351 µg/kg, a seguire la penna BFV con una concentrazione di 805,5 µg/kg.

Le concentrazioni totali più basse si riscontrano nelle penne BFD e BFF con valori rispettivamente di 61,53 µg/kg e 32,56 µg/kg.

La concentrazione totale media di HREEs all'interno delle penne marchigiane è di 406,8 µg/kg.

Dal grafico delle distribuzioni percentuali di HREEs all'interno dei campioni (Fig.12), si evince che l'elemento dominante nel pool di campioni è lo Sc, seguito da Y. Si può notare inoltre il maggior numero di elementi al di sotto del LOQ rispetto a LREEs, in particolare Lu ed Er sono stati quantificati solamente in 8 penne su 14. L'unico elemento che non presenta valori sotto il limite di quantificazione è lo Sc.

Lo scandio in natura è molto raro poiché presente in quantità molto piccole. L'elevata concentrazione riscontrata nei campioni è perciò dovuta con molta probabilità ad un inquinamento antropico. Lo Sc è molto utilizzato nell'industria, soprattutto all'interno delle leghe di alluminio. Per la fauna acquatica questo elemento è molto dannoso poiché danneggia le membrane cellulari, compromettendo la loro salute. Tuttavia solitamente lo scandio viene spesso escluso dalle analisi poiché presenta delle caratteristiche chimiche diverse dalle REEs. Anche l'Y è un elemento presente in quantità molto piccole in natura che viene impiegato nell'industria metallurgica.

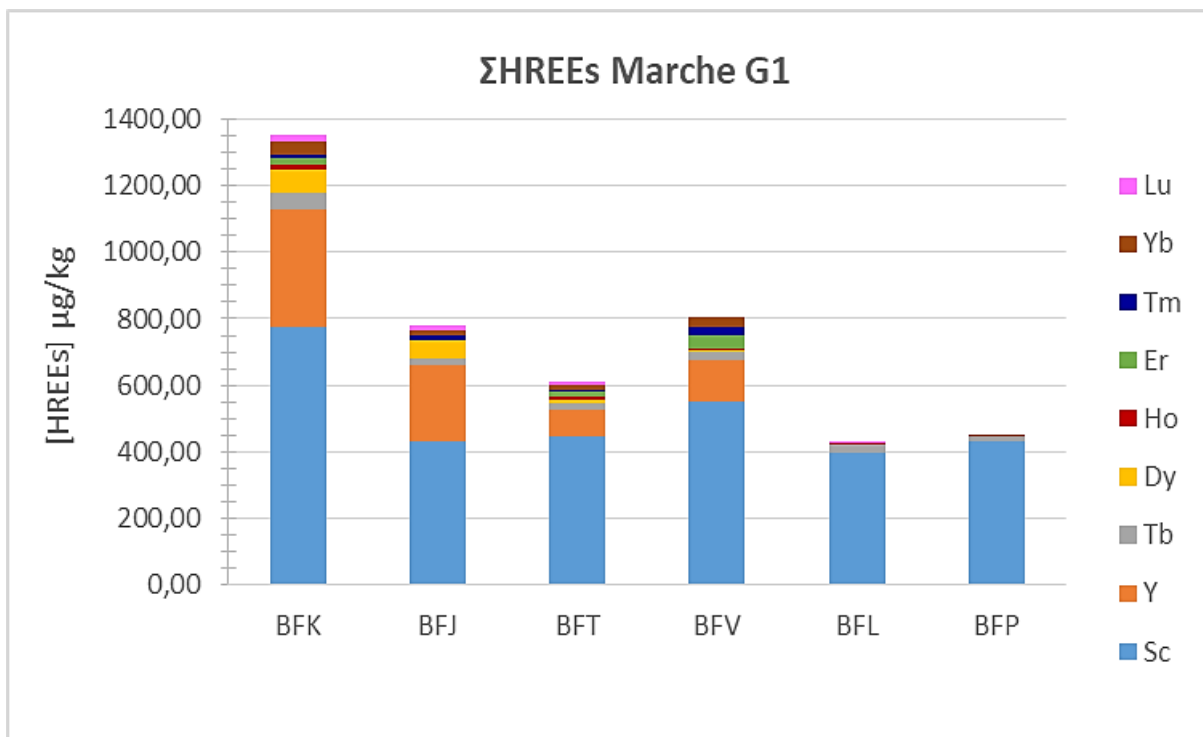


Fig.10: istogramma della sommatoria di HREEs all'interno delle penne marchigiane del gruppo 1.

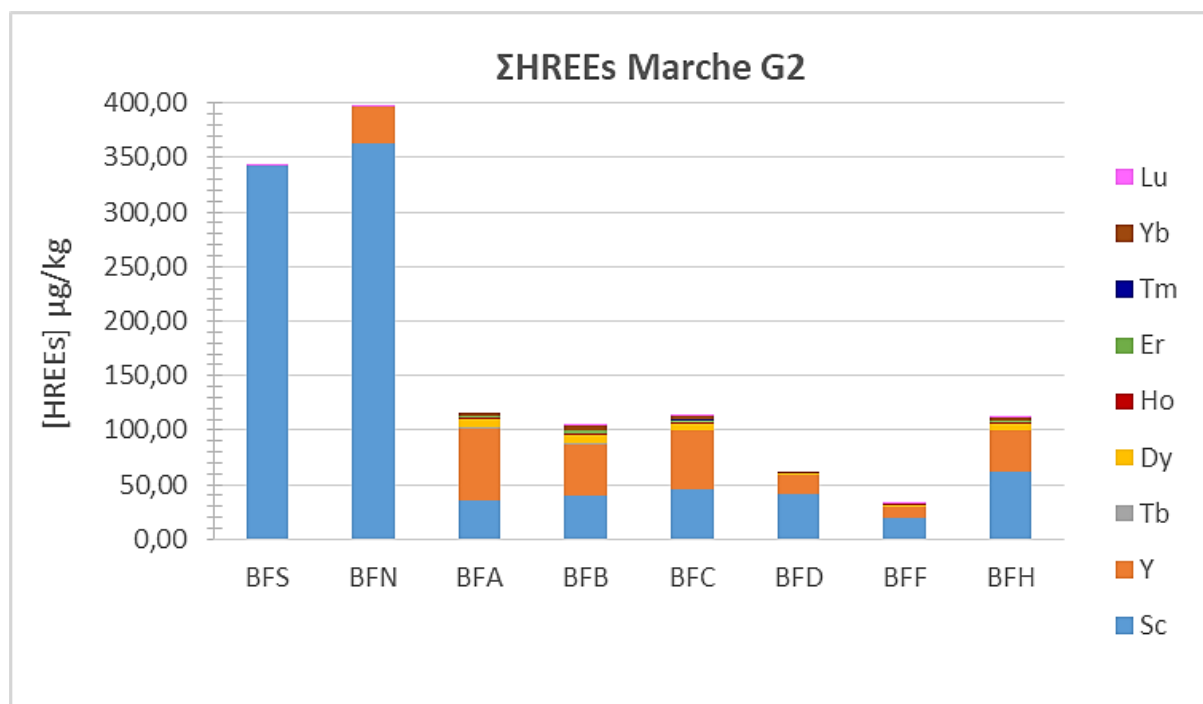


Fig.11: istogramma della sommatoria di HREEs all'interno delle penne marchigiane del gruppo 2.

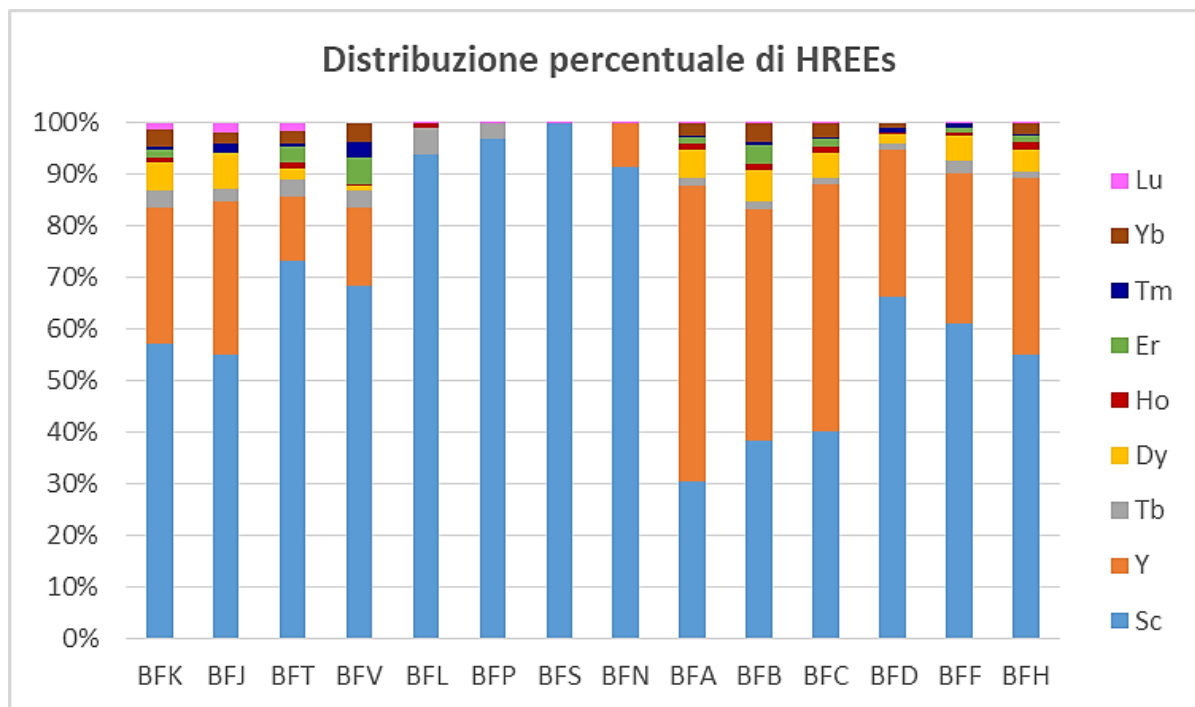


Fig.12: distribuzione percentuale di HREEs all'interno delle penne marchigiane

Tab. 4: concentrazioni di HREEs rilevate all'interno delle penne marchigiane. I dati evidenziati con il colore giallo sono risultati sotto il limite di quantificazione (< LOQ).²

HREEs									
Campione	Sc µg/kg	Y µg/kg	Tb µg/kg	Dy µg/kg	Ho µg/kg	Er µg/kg	Tm µg/kg	Yb µg/kg	Lu µg/kg
BFK	773,04	354,21	49,07	71,17	14,68	20,60	7,91	41,82	18,62
BFJ	429,40	232,10	18,12	54,31	1,90	< LOQ	13,43	16,27	14,42
BFT	448,32	76,33	19,08	14,53	6,91	17,72	3,56	16,10	9,06
BFV	552,02	121,20	25,73	8,24	2,28	41,41	23,96	30,67	< LOQ
BFL	398,57	< LOQ	22,48	< LOQ	3,62	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
BFP	430,78	< LOQ	13,37	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
BFS	343,17	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
BFN	363,27	33,73	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
BFA	35,13	66,44	1,77	6,08	1,53	1,42	0,45	2,69	0,00
BFB	40,06	46,87	1,47	6,39	1,49	3,63	0,65	3,86	0,00
BFC	45,24	54,12	1,10	5,75	1,24	1,62	0,56	2,98	0,00
BFD	40,77	17,57	0,65	1,13	0,25	< LOQ	0,58	0,55	< LOQ
BFF	19,87	9,56	0,73	1,56	0,23	0,32	0,27	< LOQ	0,00
BFH	61,33	37,93	1,27	4,80	1,72	1,18	0,58	2,31	0,00

² Per convenzione quando un valore risulta < LOQ viene indicato con il LOD/2, pari a 0,0052 per Y; 0,0005 per Tb; 0,0017 per Dy; 0,0013 per Er (0,0196 per penna BFD); 0,0001 per Tm; 0,0006 per Yb (0,0209 per penna BFF) e 0,0002 per Lu (0,0001 per penna BFD).

3.1.2 RAPPORTO GADOLINIO GEOGENICO E ANTROPOGENICO

L'uso crescente di agenti di contrasto a base di gadolinio per la risonanza magnetica sta portando a una diffusa contaminazione delle acque superficiali e dei sistemi di acqua potabile. Escreti dal corpo attraverso i reni del paziente entro 1,5-30 ore (Idée et al., 2008), i composti a base di gadolinio vengono trasferiti attraverso il sistema fognario agli impianti di trattamento delle acque reflue. Gli agenti di contrasto a base di Gd sono stabili, e studi indicano che la speciazione di Gd geogenico e antropogenico in acqua differiscono tra loro, favorendo l'assimilazione del Gd di origine geogenica da parte dei gasteropodi (Merschel and Bau, 2015). Tuttavia, le informazioni relative all'accumulo in tessuti biologici di questo elemento sono ancora scarse.

L'aggiunta di Gd antropogenico al fondo geogenico produce anomalie positive di Gd nei modelli di scisti normalizzati per le REEs di tali acque superficiali (Schmidt et al., 2019).

Dalla tabella sottostante si può notare come le penne marchigiane non presentano Gd antropogenico, ad eccezione della penna BFH che ne contiene 1,97 µg/kg. Le penne BFS e BFN presentavano una concentrazione di Gd al di sotto del LOQ, pertanto la concentrazione di Gd geogenico è molto bassa poiché viene calcolata utilizzando la quantità di Gd presente nel campione. Si può inoltre notare che nelle penne BFK, BFJ, BFT, BFV, BFL e BFP la concentrazione di Gd misurato e il fondo geogenico sono molto maggiori rispetto agli altri campioni, ciò è probabilmente dovuto alla diversa area di campionamento lungo la costa marchigiana in provincia di Fermo.

Tab. 5: concentrazione (µg/kg) di gadolinio all'interno dei campioni con il rispettivo fondo geogenico e l'apporto antropogenico.

	[Gd] misurato	[Gd] geogenico	[Gd] antropogenico
BFK	97,74	223,57	-125,83
BFJ	26,85	164,86	-138,01
BFT	29,59	99,86	-70,26
BFV	88,14	333,06	-244,91
BFL	33,62	221,48	-187,86
BFP	33,56	159,25	-125,70
BFS	0,00	0,00	0,00
BFN	0,00	0,00	0,00
BFA	6,80	12,98	-6,18
BFB	9,12	14,88	-5,76
BFC	9,54	14,48	-4,94
BFD	3,25	3,93	-0,68
BFF	2,69	10,54	-7,85
BFH	7,84	5,87	1,97

3.1.3 ANOMALIA DEL CERIO

Il cerio è l'elemento principale per il quale vengono calcolate le anomalie, poiché l'anomalia negativa di Ce è una caratteristica dell'acqua di mare (Piper e Bau 2013). In condizioni di ossidazione, il Ce^{3+} può essere facilmente ossidato allo stato tetravalente (Ce^{4+}), il quale ha una solubilità minore e tende a sprofondare nei sedimenti (MacMillan et al., 2017; Weltje et al., 2002), causando un impoverimento di Ce in acqua rispetto agli altri REEs trivalenti (German e Elderfield, 1990).

Per il calcolo dell'anomalia di Ce si è scelto di utilizzare sia la formula di Taylor Mc Lennan, (1985) sia quella di Pat Wilde (1996). In media, calcolando l'anomalia con la formula Ce(I) di Mc Lennan, risulta esserci una leggera anomalia positiva pari a 1,38, mentre con la formula Ce(III) di Wilde l'anomalia di Ce media risulta essere di 1,22. Con entrambe le formule risulta quindi essere presente una leggera anomalia positiva di Ce all'interno delle penne marchigiane. Alcuni campioni hanno un valore che si discosta molto dalla media, come nelle penne BFV, BFL, BFP, BFS, BFN e BFB. Ciò è dovuto dalle concentrazioni < LOQ di La, Pr e Nd all'interno dei campioni, le quali vanno ad influenzare il valore dell'anomalia del Ce.

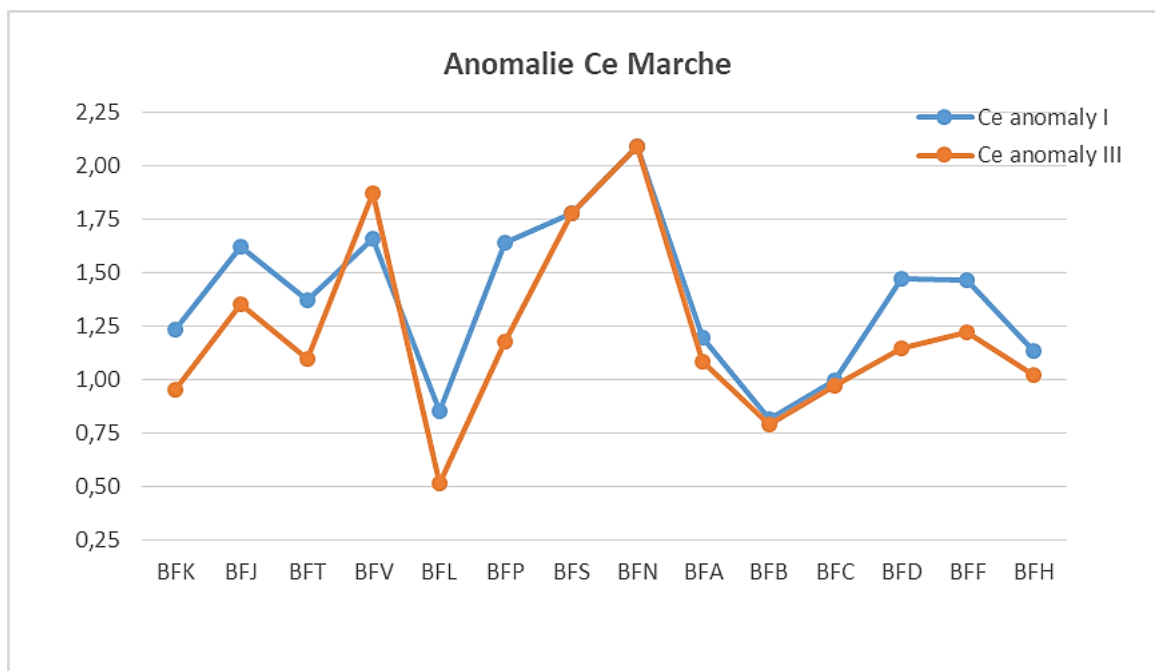


Fig.13: valori dell'anomalia del cerio all'interno delle penne marchigiane.

3.1.4 ANALISI STATISTICA

Attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione di Spearman si può notare come tutti gli elementi siano correlati tra loro positivamente. Le correlazioni sono tra loro molto forti, come nel caso delle coppie di elementi con coefficiente $> 0,80$ evidenziate con il colore rosso in Tab. 6. In Fig. 14 con la croce sono barrate le correlazioni non significative per $\alpha = 0.05$. Si può notare che, all'interno delle penne marchigiane, le HREEs sono meno correlate rispetto alle LREEs, in particolare gli elementi Sc, Y, Dy, Ho, Er, Tm, Yb e Lu.

Tab.6: valori del coefficiente di correlazione di Spearman per ogni elemento

	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Sc	Y	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
La		0,89	0,55	0,82	0,71	0,73	0,71	0,84	0,61	0,71	0,56	0,54	0,30	0,48	0,56	0,51
Ce			0,59	0,69	0,66	0,61	0,57	0,79	0,70	0,59	0,58	0,40	0,34	0,50	0,60	0,40
Pr				0,70	0,46	0,62	0,55	0,36	0,93	0,61	0,96	0,72	0,83	0,95	0,99	0,62
Nd					0,83	0,92	0,92	0,71	0,63	0,93	0,71	0,78	0,47	0,65	0,71	0,58
Sm						0,79	0,76	0,74	0,46	0,81	0,52	0,69	0,16	0,42	0,48	0,47
Eu							0,94	0,65	0,54	0,94	0,60	0,71	0,41	0,58	0,63	0,43
Gd								0,73	0,45	0,94	0,50	0,74	0,43	0,50	0,55	0,38
Sc									0,37	0,67	0,31	0,50	0,16	0,36	0,35	0,26
Y										0,55	0,94	0,67	0,68	0,87	0,94	0,65
Tb											0,61	0,84	0,47	0,55	0,61	0,41
Dy												0,73	0,73	0,91	0,98	0,75
Ho													0,58	0,69	0,72	0,53
Er														0,70	0,79	0,42
Tm															0,95	0,58
Yb																0,67
Lu																

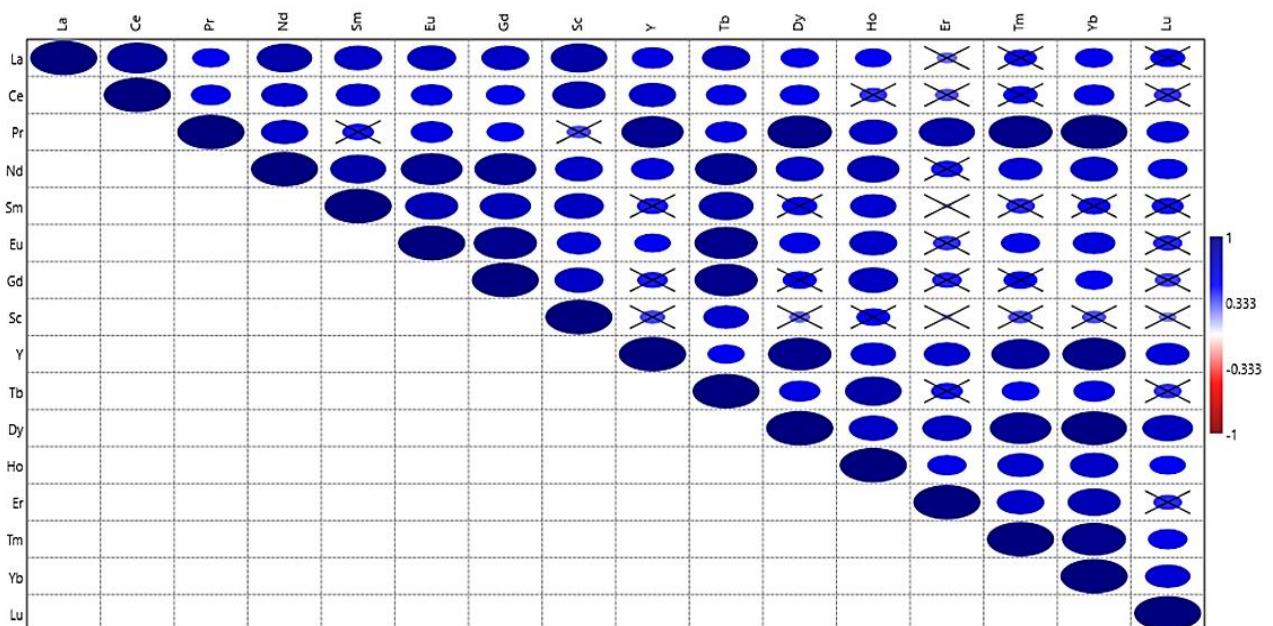


Fig.14: grafico dei valori del coefficiente di correlazione di Spearman. L'ellisse blu significa che è presente una relazione significativa e maggiore è la sua grandezza, più forte sarà la correlazione tra gli elementi. Con la croce sono indicate le correlazioni non significative ($\alpha = 0.05$).

3.2 VENETO

3.2.1 CONCENTRAZIONE TOTALE DI TERRE RARE

La concentrazione totale più elevata di LREEs è pari a 793 µg/kg nella penna ATJ, a seguire con una concentrazione di 680 µg/kg la penna ASZ e con 578 µg/kg la penna ATH.

Le concentrazioni totali più basse si riscontrano nelle penne ATT e ASK con valori rispettivamente di 106 µg/kg e 86,6 µg/kg.

La concentrazione totale media di LREEs all'interno delle penne venete è di 348 µg/kg.

Dal grafico delle distribuzioni percentuali di LREEs all'interno dei campioni (Fig. 17), si evince che l'elemento più presente è il Ce, seguito da La e Nd, come osservato per le penne prelevate nelle Marche. Le distribuzioni percentuali degli elementi all'interno delle penne venete sono simili in tutti i campioni.

L'elevata presenza di Ce all'interno dei campioni può essere dovuta al passaggio delle imbarcazioni in laguna, le quali all'interno delle marmitte catalitiche dei loro motori presentano questo elemento. La concentrazione significativa degli altri elementi può essere giustificata dalla presenza di Porto Marghera, caratterizzato da un porto commerciale e da attività industriali legate alla raffinazione. Come ulteriore sorgente di terre rare in laguna di Venezia sono presenti scarichi ospedalieri, la discarica di fosfogessi di Campalto e vanno inoltre considerati i contributi provenienti dai terreni agricoli che arrivano in laguna attraverso il runoff dal bacino scolante. Per i campioni raccolti in laguna di Caorle il maggiore input di REEs è causato dal runoff dei terreni agricoli, mentre l'impatto dovuto alla navigazione è minimo.

La laguna è un sistema dinamico in cui venti, correnti e moto ondoso generano un'elevata risospensione dei sedimenti provocando un continuo input di terre rare in colonna d'acqua (Picone et al., 2022). Le REEs risospese possono successivamente essere assimilate dalle prede di *C. alexandrinus*.

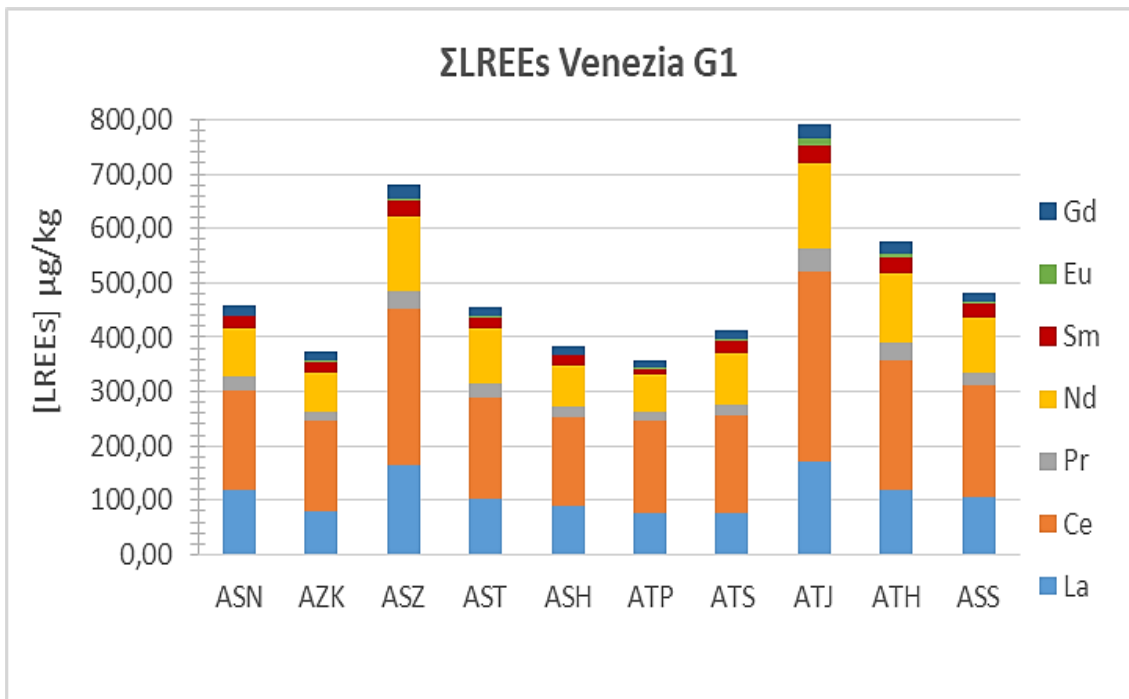


Fig.15: istogramma della sommatoria di LREEs all'interno delle penne venete del gruppo 1.

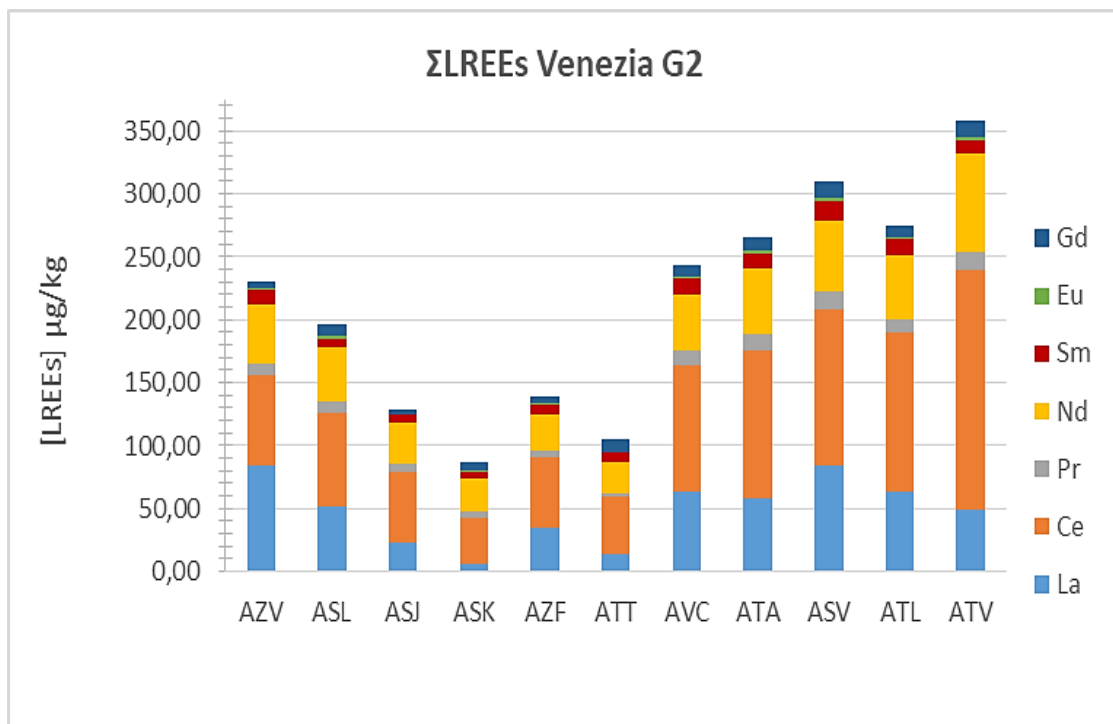


Fig.16: istogramma della sommatoria di LREEs all'interno delle penne venete del gruppo 2.

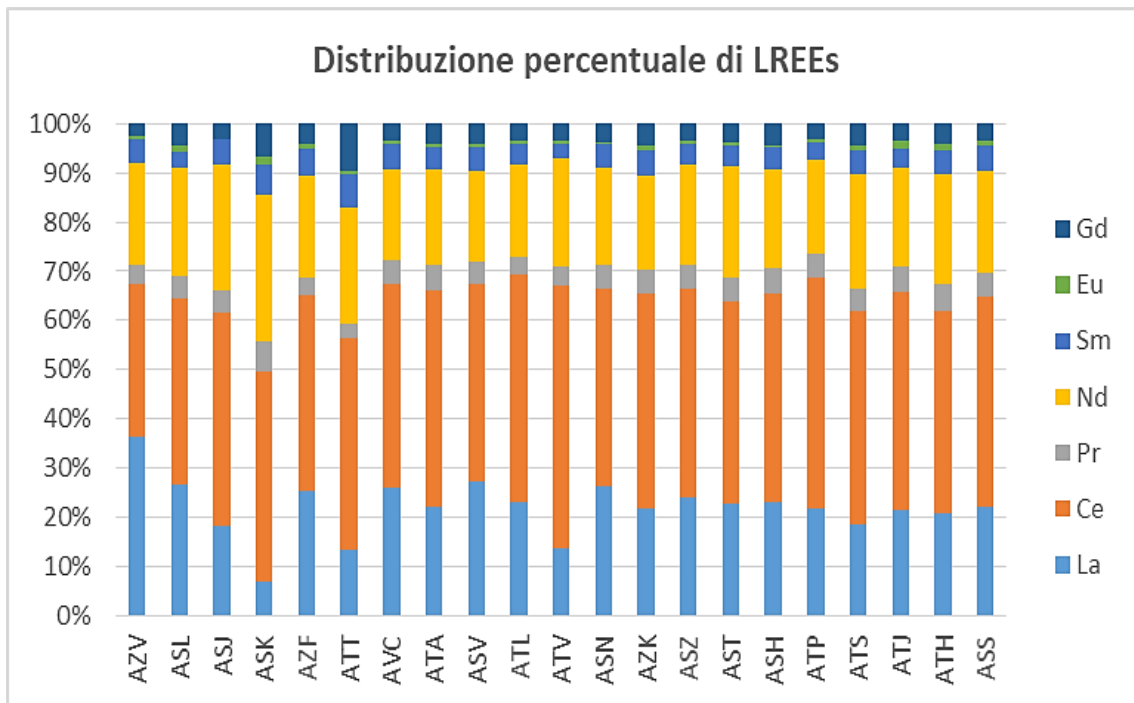


Fig.17: distribuzione percentuale di LREEs all'interno delle penne venete.

Tab.7: concentrazioni di LREEs rilevate all'interno delle penne venete. I dati evidenziati con il colore giallo sono risultati sotto il limite di quantificazione (< LOQ).³

<i>LREEs</i>							
Campione	La µg/kg	Ce µg/kg	Pr µg/kg	Nd µg/kg	Sm µg/kg	Eu µg/kg	Gd µg/kg
AZV	83,76	71,84	9,18	47,72	11,16	1,75	5,53
ASL	52,24	74,24	8,60	43,25	6,10	2,64	8,79
ASJ	23,64	55,72	5,89	33,20	6,50	< LOQ	4,21
ASK	6,14	36,86	5,19	25,91	5,35	1,28	5,85
AZF	35,29	55,25	5,21	28,62	7,66	1,28	5,82
ATT	14,11	45,54	3,06	24,84	7,15	0,56	10,27
AVC	63,64	100,31	11,80	44,80	13,05	1,04	8,82
ATA	58,87	116,39	13,69	51,83	12,36	1,69	10,80
ASV	84,82	123,21	14,21	56,77	15,45	1,97	12,92
ATL	63,96	126,47	9,98	51,23	12,04	1,41	9,65
ATV	48,97	191,05	14,02	78,48	10,12	2,11	12,97
ASN	119,92	183,21	23,32	89,24	21,74	1,67	17,94
AZK	81,29	163,82	17,61	71,68	19,13	3,95	16,95
ASZ	164,49	286,65	33,37	137,73	29,30	4,64	23,74
AST	103,94	186,20	23,42	102,91	17,94	3,49	17,62
ASH	89,19	162,94	19,36	77,16	17,23	2,13	16,76
ATP	77,31	167,65	16,63	68,10	12,60	2,15	11,70
ATS	76,99	179,13	19,26	96,20	20,11	4,00	18,72
ATJ	171,66	349,10	42,48	157,44	31,48	12,00	28,79
ATH	119,73	238,15	31,22	129,48	28,26	7,35	23,38
ASS	106,30	205,92	23,86	98,52	25,74	4,49	16,57

³ Per convenzione quando un valore risulta < LOQ viene indicato con il LOD/2, pari a 0,00002 per Eu.

Per quanto riguarda le HREEs, la concentrazione totale più elevata si riscontra nella penna ATJ con 296,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a seguire la penna ASZ con una concentrazione di 252,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e la penna ATH con 215,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Le concentrazioni totali più basse si riscontrano nelle penne ATL e ASJ con valori rispettivamente di 88,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 67,42 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

La concentrazione totale media di HREEs all'interno delle penne venete è di 140,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Dal grafico delle distribuzioni percentuali di HREEs all'interno dei campioni (Fig.20), si evince che l'elemento dominante è lo Sc, seguito da Y, come osservato per le penne marchigiane. Come per la distribuzione percentuale di LREEs, anche per HREEs gli elementi sono distribuiti all'interno dei campioni in percentuali simili.

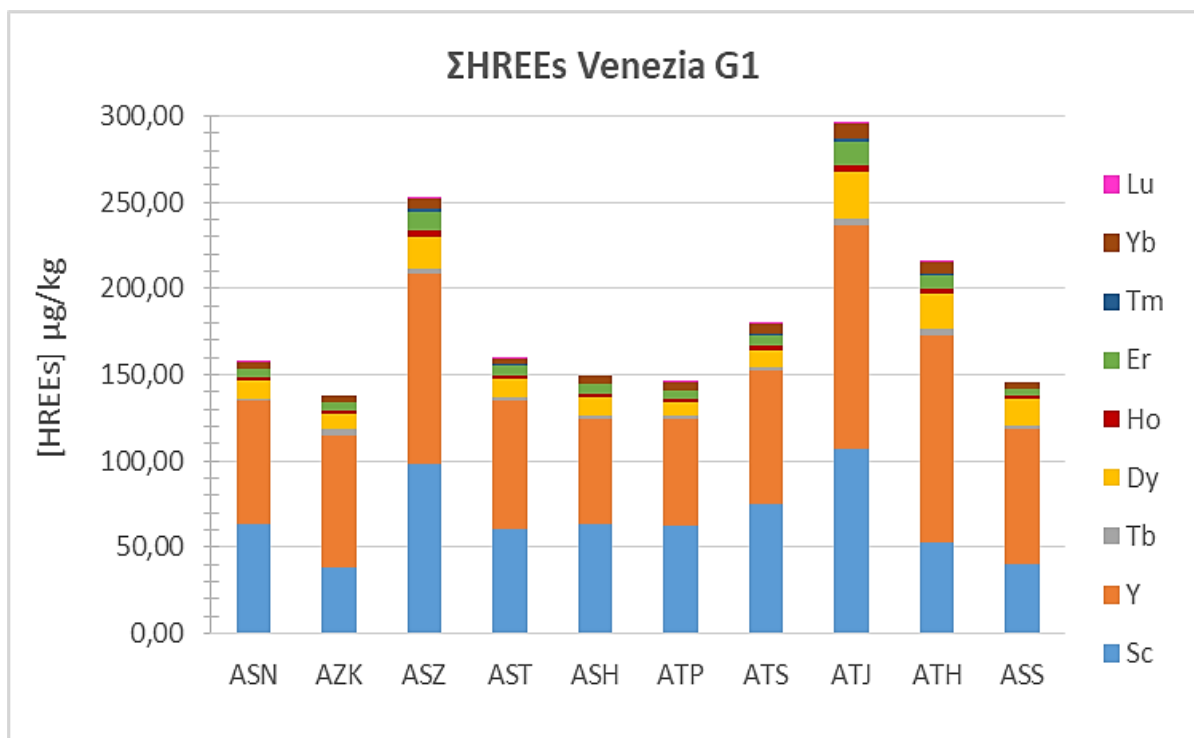


Fig.18: istogramma della sommatoria di HREEs all'interno delle penne venete del gruppo 1.

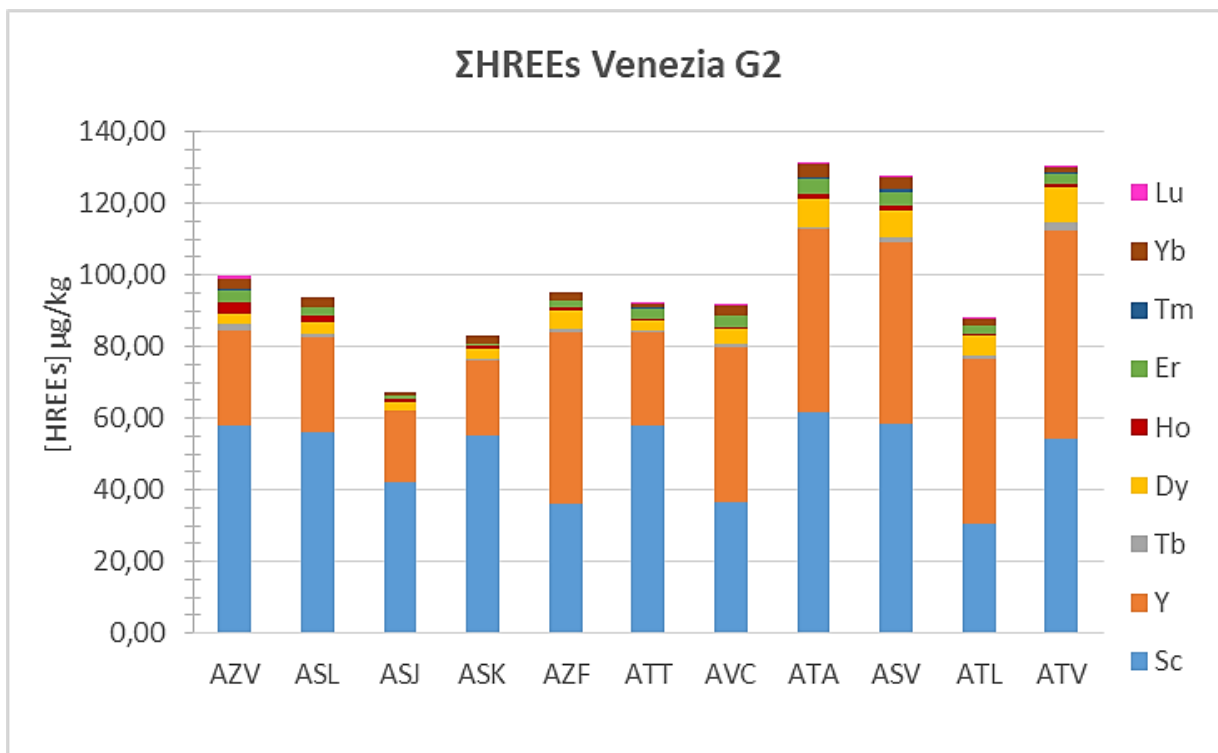


Fig.19: istogramma della sommatoria di HREEs all'interno delle penne venete del gruppo 2.

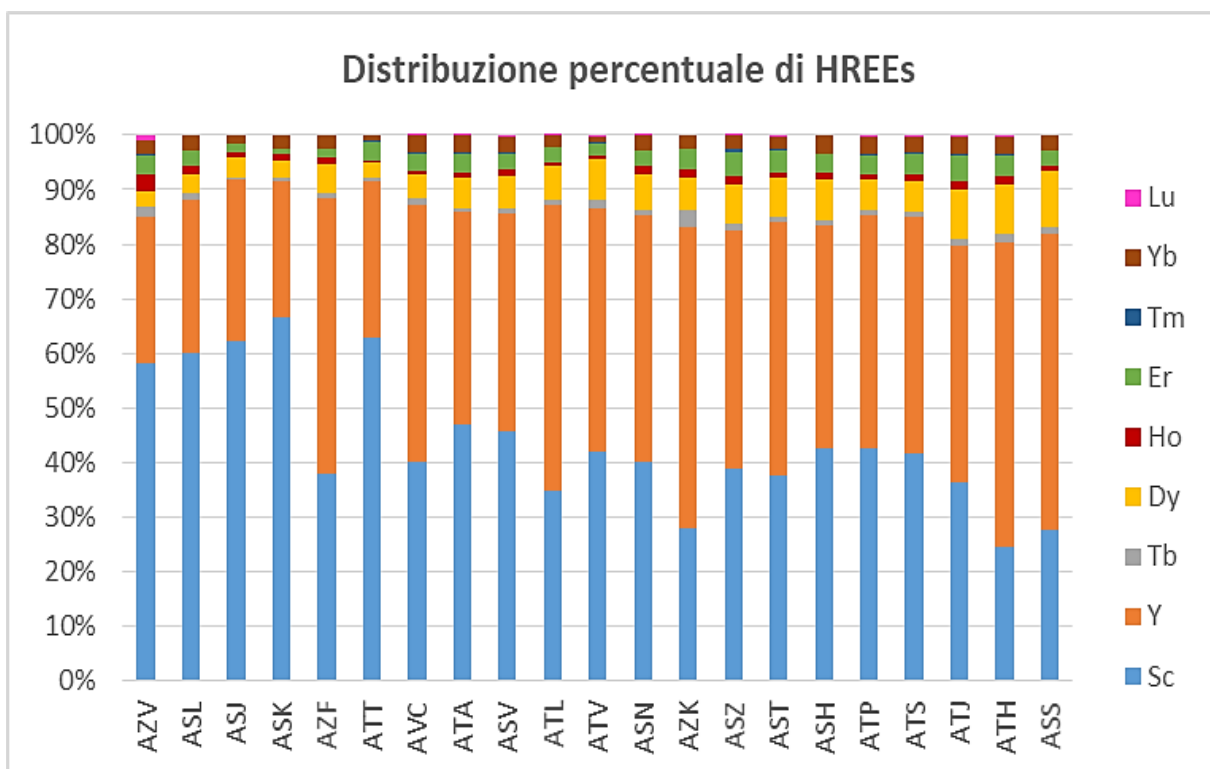


Fig.20: distribuzione percentuale di HREEs all'interno delle penne venete.

Tab.8: concentrazioni di HREEs rilevate all'interno delle penne venete. I dati evidenziati con il colore giallo sono risultati sotto il limite di quantificazione (< LOQ).⁴

HREEs									
Campione	Sc	Y	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
AZV	57,89	26,69	1,95	2,75	3,14	3,35	0,32	2,61	0,95
ASL	56,24	26,43	0,93	3,28	1,55	2,48	< LOQ	2,78	< LOQ
ASJ	41,99	19,97	0,17	2,55	0,54	1,03	< LOQ	1,16	< LOQ
ASK	55,34	20,68	0,49	2,64	1,15	0,62	< LOQ	2,13	< LOQ
AZF	35,88	48,22	0,71	5,18	1,08	1,57	< LOQ	2,31	< LOQ
ATT	57,74	26,37	0,54	2,58	0,26	2,99	0,26	0,98	< LOQ
AVC	36,59	43,23	0,96	4,15	0,43	3,05	0,22	2,68	0,15
ATA	61,63	51,11	0,75	7,49	1,47	4,34	0,38	3,93	0,21
ASV	58,22	50,91	1,40	7,30	1,71	3,73	0,51	3,44	0,39
ATL	30,54	46,16	0,83	5,49	0,73	2,20	0,12	1,83	0,13
ATV	54,44	58,06	2,09	9,65	1,11	2,73	0,47	1,29	0,30
ASN	63,51	71,11	1,74	10,32	2,08	4,58	0,05	4,21	0,27
AZK	38,45	76,32	4,17	8,21	2,29	5,09	< LOQ	3,42	< LOQ
ASZ	98,29	110,22	2,99	18,27	3,64	11,42	1,32	6,18	0,41
AST	60,53	74,13	1,84	11,15	1,83	6,24	0,43	3,52	0,68
ASH	63,79	60,97	1,35	11,32	1,67	5,21	< LOQ	5,26	< LOQ
ATP	62,20	62,29	1,76	7,99	1,40	5,01	0,52	4,38	0,63
ATS	74,73	77,81	1,97	9,93	2,13	6,66	0,87	5,08	0,40
ATJ	107,44	129,10	3,93	26,85	4,06	13,76	1,42	9,01	1,14
ATH	53,23	119,92	3,44	19,92	3,31	7,67	1,20	6,21	0,98
ASS	40,01	78,94	1,98	14,84	1,77	4,01	< LOQ	3,97	< LOQ

⁴ Per convenzione quando un valore risulta < LOQ viene indicato con il LOD/2, pari a 5*10⁻⁶ per Tm e 1*10⁻⁵ per Lu.

3.2.2 RAPPORTO GADOLINIO GEOGENICO E ANTROPOGENICO

Dalla tabella sottostante si può notare che all'interno delle penne venete è presente gadolinio antropogenico in oltre metà dei campioni (12 penne su 21), a differenza di quanto osservato nelle penne marchigiane. I valori più alti si riscontrano nella penna ASN con una concentrazione di Gd antropogenico di 11,02 µg/kg e nella penna ATT con 7,82 µg/kg. In laguna di Venezia e nelle aree limitrofe sono presenti delle strutture ospedaliere che potrebbero giustificare la presenza di Gd antropogenico all'interno dei campioni dato il suo utilizzo come agente di contrasto nelle risonanze magnetiche.

Tab. 9: concentrazione (µg/kg) di gadolinio all'interno dei campioni con il rispettivo fondo geogenico e l'apporto antropogenico.

	[Gd] misurato	[Gd] geogenico	[Gd] antropogenico
AZV	5,53	9,03	-3,50
ASL	8,79	16,21	-7,42
ASJ	4,21	0,00	4,21
ASK	5,85	7,35	-1,50
AZF	5,82	7,10	-1,28
ATT	10,27	2,45	7,82
AVC	8,82	4,62	4,20
ATA	10,80	8,43	2,37
ASV	12,92	10,00	2,92
ATL	9,65	6,64	3,00
ATV	12,97	9,85	3,12
ASN	17,94	6,92	11,02
AZK	16,95	23,40	-6,45
ASZ	23,74	23,36	0,38
AST	17,62	17,59	0,04
ASH	16,76	10,00	6,76
ATP	11,70	10,57	1,13
ATS	18,72	21,62	-2,90
ATJ	28,79	79,24	-50,45
ATH	23,38	44,03	-20,66
ASS	16,57	24,98	-8,41

3.2.3 ANOMALIA DEL CERIO

Sebbene tre campioni risultino arricchiti, in media, utilizzando la formula Ce(I) di Mc Lennan, l'anomalia di Ce risulta essere di 1,05, pressoché pari all'unità. Anche con la formula Ce(III) di Wilde l'anomalia di Ce media risulta essere quasi unitario con un valore di 0,95. Risulta dunque non essere presente un'anomalia di Ce all'interno delle penne venete, al contrario di quanto osservato per le penne marchigiane.

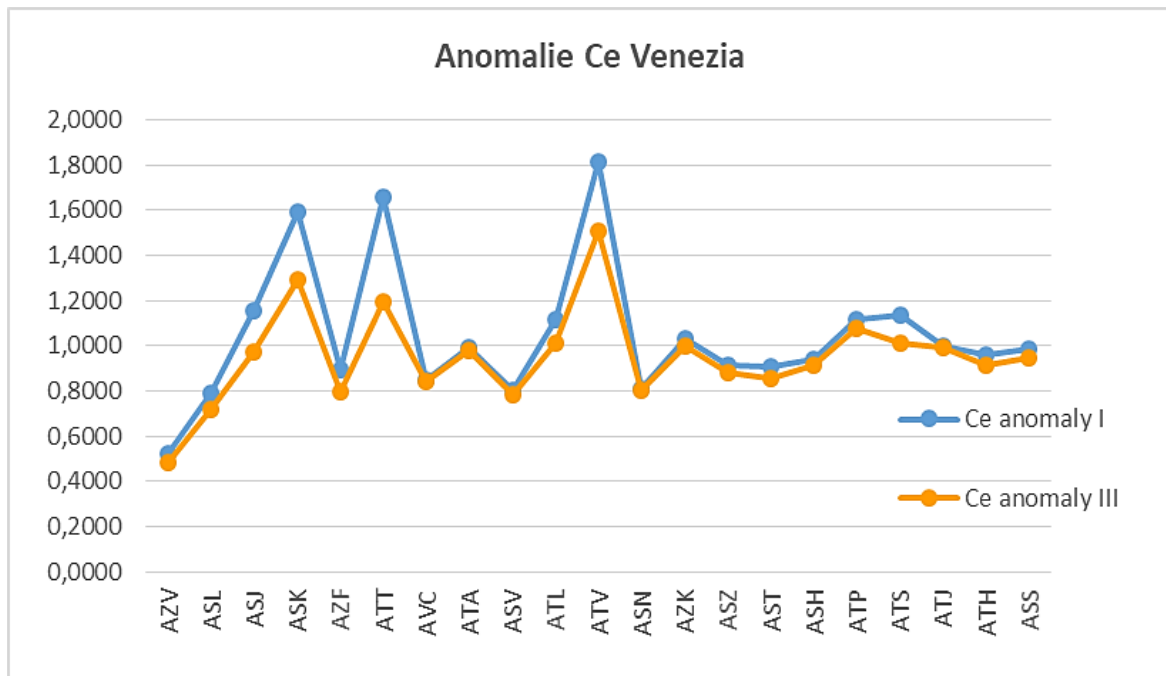


Fig.21: valori dell'anomalia del cerio all'interno delle penne venete.

3.2.4 ANALISI STATISTICA

Attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione di Spearman si può notare come tutti gli elementi sono correlati tra loro positivamente. Le correlazioni sono tra loro molto forti, come nel caso delle coppie di elementi con coefficiente $> 0,80$ evidenziate con il colore rosso in Tab. 10. In Fig. 22 con la croce sono barrate le correlazioni non significative ($\alpha = 0.05$). Lo Sc è l'unico elemento a non essere correlato con Ce, Sm, Eu, Y e Tb.

Tab.10: valori del coefficiente di correlazione di Spearman per ogni elemento

	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Sc	Y	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
La		0,81	0,92	0,86	0,91	0,73	0,78	0,49	0,82	0,74	0,84	0,82	0,83	0,46	0,82	0,60
Ce			0,94	0,97	0,86	0,83	0,89	0,40	0,92	0,84	0,94	0,67	0,79	0,59	0,73	0,60
Pr				0,98	0,95	0,84	0,91	0,50	0,94	0,81	0,96	0,77	0,89	0,52	0,87	0,57
Nd					0,90	0,85	0,91	0,50	0,94	0,84	0,96	0,78	0,86	0,59	0,81	0,63
Sm						0,75	0,89	0,43	0,93	0,78	0,90	0,76	0,89	0,51	0,84	0,53
Eu							0,79	0,43	0,87	0,86	0,83	0,83	0,80	0,50	0,79	0,51
Gd								0,56	0,92	0,77	0,92	0,72	0,90	0,59	0,80	0,51
Sc									0,42	0,28	0,45	0,54	0,66	0,56	0,65	0,51
Y										0,85	0,96	0,76	0,88	0,54	0,84	0,54
Tb											0,78	0,80	0,76	0,53	0,62	0,59
Dy												0,71	0,85	0,48	0,85	0,50
Ho													0,79	0,46	0,77	0,60
Er														0,64	0,89	0,64
Tm															0,51	0,89
Yb																0,54
Lu																

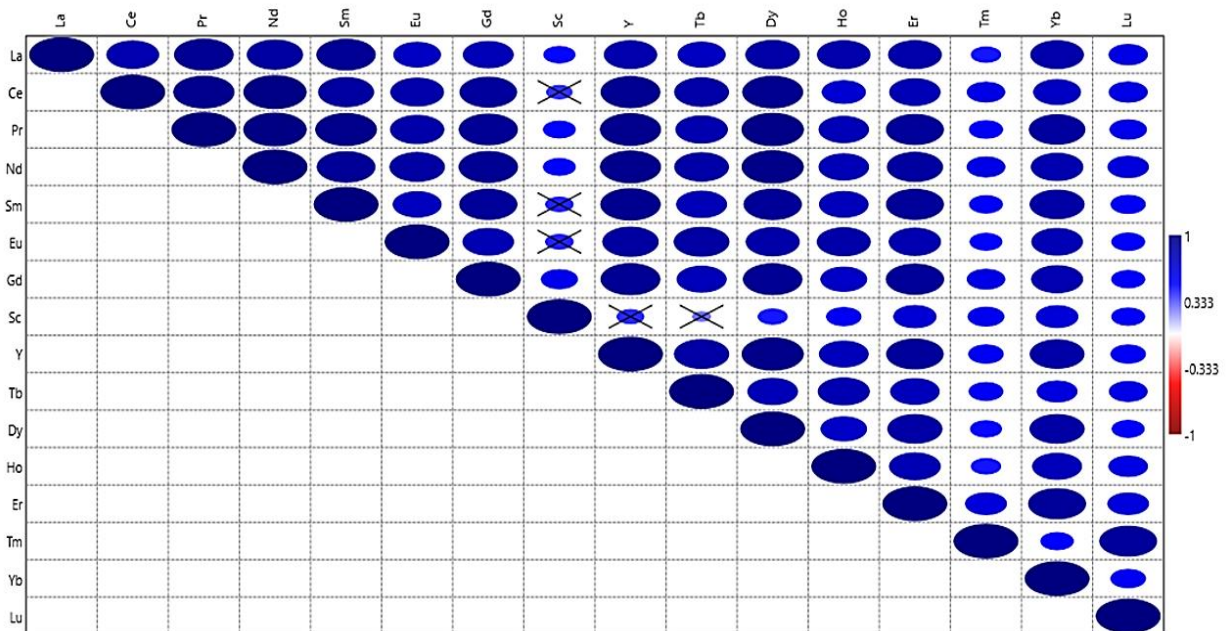


Fig.22: grafico dei valori del coefficiente di correlazione di Spearman. L'ellisse blu significa che è presente una relazione significativa e maggiore è la sua grandezza, più forte sarà la correlazione tra gli elementi. Con la croce sono indicate le correlazioni non significative ($\alpha = 0.05$).

3.3 CONFRONTO CON I DATI DI LETTERATURA E RILEVANZA ECOLOGICA DELL'ESPOSIZIONE ALLE REEs

Da questo studio emerge che le penne sono una buona matrice per la valutazione della concentrazione di terre rare all'interno degli uccelli, questi elementi infatti sono bioaccessibili e biodisponibili per l'avifauna, permettendo di valutare le condizioni ambientali dell'area di campionamento. Alcuni elementi sembrano essere più affini alla matrice cheratinica della penna, come il La, probabilmente per la creazione di complessi con elementi in tracce presenti in esse (es. Ca), tuttavia l'ipotesi va approfondita con ulteriori studi. Alle concentrazioni di REEs riscontrate nelle penne di fratino eurasiatico non è attualmente associabile un pericolo per la specie. Infatti, mancano soglie di effetto che consentano di identificare le concentrazioni di terre rare alle quali è probabile rilevare effetti negativi a livello biochimico e fisiologico negli uccelli.

Ai residui rilevati nelle penne di Marche e Veneto non sono associabili effetti acuti dal momento che tutti gli individui campionati sono sopravvissuti fino alla fine della stagione riproduttiva, senza ripercussioni sulla riproduzione in termini di uova deposte per covata (3 per ogni coppia riproduttiva). Per quanto riguarda il successo riproduttivo della specie, inteso come numero di uova schiuse sul totale deposto e numero di puli sopravvissuti rispetto alle uova schiuse, non è possibile affermare con certezza il contributo della contaminazione di terre rare, poiché sono presenti numerosi fattori di disturbo che influenzano la schiusa e la sopravvivenza dei pulcini (tra cui turismo, animali liberi sulle spiagge e pulizie con mezzi meccanici).

Confrontando i risultati con precedenti studi sul *body burden* di terre rare all'interno delle penne di specie con abitudini alimentari differenti rispetto a *C. alexandrinus*, emerge che le REEs depositate all'interno della matrice cheratinica riflettono le concentrazioni presenti all'interno delle prede. In particolare, nello studio di Picone et al. (2022), le concentrazioni di REEs misurate nel beccapesci (*Thalasseus sandvicensis*) sono le più alte (940,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$) tra quelle riportate in letteratura per le piume degli uccelli. Gli studi sulle prede del beccapesci hanno dimostrato la presenza di elevate concentrazioni di terre rare all'interno dei pesci, indicando che la dieta è una via di esposizione rilevante per gli uccelli.

Nonostante la dieta di *C. alexandrinus* sia completamente diversa da *T. sandvicensis*, è possibile che anche per il fratino gli input attraverso la rete trofica siano una via di esposizione rilevante. Bisogna considerare che il fratino, essendo un invertivoro, si nutre di macrobenthos, ovvero di

organismi che vivono all'interno del sedimento e che da esso ricavano nutrimento, risultando quindi potenzialmente più esposto alle REEs rispetto al beccapesci.

Nel beccapesci, a differenza del fratino, c'è una dominanza di La all'interno delle penne che arriva a circa il 75-90%. La causa potrebbe essere una diversa esposizione ai contaminanti e un differente metabolismo, considerando che per il fratino sono stati campionati adulti mentre per il beccapesci sono state raccolte penne di pulli.

Nello studio di Squadrone et al. (2019) sulle penne dei pinguini di Humboldt (*Spheniscus humboldti*) adulti ospitati in un acquario si è riscontrata una concentrazione media di REEs pari a $160 \mu\text{g kg}^{-1}$. Questi pinguini, vivendo in un ambiente in condizioni controllate, ottengono le terre rare solamente attraverso il pesce con il quale vengono nutriti e non anche dall'ambiente circostante come nel caso degli uccelli selvatici studiati.

La concentrazione totale media di terre rare riscontrata nei fratini ($490 \mu\text{g kg}^{-1}$) risulta essere quasi la metà di quella nei beccapesci, tuttavia è decisamente più elevata rispetto ai valori riscontrati all'interno delle penne dei pinguini di Humboldt, i quali si nutrono di pesce come *T. sanvicensis* ma vivono in un habitat artificiale, facendo presupporre che la contaminazione ambientale da REEs è significativa.

4. CONCLUSIONI

Dopo aver valutato la concentrazione totale di REEs e le anomalie presenti all'interno dei campioni si può concludere che:

- Le penne provenienti dalle Marche hanno una concentrazione di terre rare maggiore rispetto alle penne raccolte in Veneto. Infatti il valore medio di Σ LREEs per le Marche è di 617,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ contro i 348,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ delle penne venete. Anche i valori medi di Σ HRREEs sono più elevati per le Marche (406,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) rispetto al Veneto (140,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$).
- Le penne marchigiane presentano una leggera anomalia positiva di Ce, mentre le penne venete sostanzialmente non presentano anomalie di Ce poiché il valore è prossimo a 1. Per il Gd antropogenico invece si riscontrano concentrazioni in oltre metà dei campioni per il Veneto, mentre le penne marchigiane non presentano Gd antropogenico al loro interno.
- Dall'indice di correlazione di Spearman si nota che le REEs all'interno dei campioni provenienti dalle Marche hanno tutti una correlazione positiva, tuttavia per molti elementi appartenenti a HREEs la correlazione non è significativa. Le penne provenienti dal Veneto invece hanno tutte una correlazione positiva molto forte tra loro, solamente lo Sc sembra non essere correlato con alcuni elementi, probabilmente per le sue differenti caratteristiche chimiche e comportamento in ambiente.

In conclusione, ulteriori studi su matrici ambientali, come acqua e sedimenti, e ulteriori matrici biologiche (es. plasma) sono necessari per comprendere in modo approfondito la dinamica delle terre rare nell'ambiente, la loro biodisponibilità e bioaccessibilità e se sono presenti ripercussioni negative sulla fauna e sull'uomo.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la dottoressa Fabiana Corami che mi ha guidata e aiutata a condurre le ricerche, oggetto dell'elaborato, durante il mio tirocinio presso l'Istituto di Scienze Polari del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

Ringrazio il professor Marco Picone per la sua immensa pazienza, per i suoi indispensabili consigli e per le conoscenze trasmesse durante tutto il percorso di stesura dell'elaborato.

Ringrazio la mia famiglia per avermi sempre sostenuta nelle mie decisioni e durante i miei studi a Ca' Foscari, anche nei momenti più impegnativi.

Ringrazio i miei compagni di corso e amici, che hanno reso questo percorso ricco di momenti indimenticabili.

Infine, ringrazio me stessa per i sacrifici e la tenacia che mi hanno permesso di arrivare fin qui.

5. BIBLIOGRAFIA

- Adeel, M., Lee, J. Y., Zain, M., Rizwan, M., Nawab, A., Ahmad, M. A., Shafiq, M., Yi, H., Jilani, G., Javed, R., Horton, R., Rui, Y., Tsang, D. C. W., Xing, B. (2019). Cryptic footprints of rare earth elements on natural resources and living organisms. *Environment international*, 127, 785-800.
- Adout, A., Hawlena, D., Maman, R., Paz-Tal, O., & Karpas, Z. (2007). Determination of trace elements in pigeon and raven feathers by ICPMS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 267(1-3), 109-116.
- Amaral, A., Soto, M., Cunha, R., Marigómez, I., & Rodrigues, A. (2006). Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils. *Environmental Pollution*, 142(1), 103-108.
- Amyot, M., Clayden, M. G., MacMillan, G. A., Perron, T., & Arscott-Gauvin, A. (2017). Fate and trophic transfer of rare earth elements in temperate lake food webs. *Environmental Science & Technology*, 51(11), 6009-6017.
- Argüelles-Ticó, A., Küpper, C., Kelsh, R. N., Kosztolányi, A., Székely, T., & van Dijk, R. E. (2016). Geographic variation in breeding system and environment predicts melanin-based plumage ornamentation of male and female Kentish plovers. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(1), 49-60.
- Bau, M., & Dulski, P. (1996). Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters. *Earth and Planetary Science Letters*, 143(1-4), 245-255.
- Bau, M., Schmidt, K., Pack, A., Bendel, V., & Kraemer, D. (2018). The European Shale: An improved data set for normalisation of rare earth element and yttrium concentrations in environmental and biological samples from Europe. *Applied Geochemistry*, 90, 142-149.
- BirdLife International, 2004. "Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status." (BirdLife Conservation Series No. 12). *Cambridge: BirdLife International*.
- Blumstein, D. T., & Daniel, J. C. (2005). The loss of anti-predator behaviour following isolation on islands. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1573), 1663-1668.
- Borghesi, F., Migani, F., Andreotti, A., Baccetti, N., Bianchi, N., Birke, M., & Dinelli, E. (2016). Metals and trace elements in feathers: a geochemical approach to avoid misinterpretation of analytical responses. *Science of The Total Environment*, 544, 476-494.
- Borghesi, F., Dinelli, E., Migani, F., Bechet, A., Rendón-Martos, M., Amat, J. A., Sommer, S., Gillingham, M. A. F., Davey M. (2017). Assessing environmental pollution in birds: a new methodological approach for interpreting bioaccumulation of trace elements in feather shafts using geochemical sediment data. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), 96-108.

- Bortolotti, G. R. (2010). Flaws and pitfalls in the chemical analysis of feathers: bad news—good news for avian chemoecology and toxicology. *Ecological Applications*, 20(6), 1766-1774.
- Brünjes, R., & Hofmann, T. (2020). Anthropogenic gadolinium in freshwater and drinking water systems. *Water research*, 182, 115966.
- Bryan, G. W., & Darracott, A. (1979). Bioaccumulation of marine pollutants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 286(1015), 483-505.
- Burger, J., Seyboldt, S., Morganstein, N., & Clark, K. (1993). Heavy metals and selenium in feathers of three shorebird species from Delaware Bay. *Environmental Monitoring and Assessment*, 28(2), 189-198.
- Burger, J., & Gochfeld, M. (1997). Risk, mercury levels, and birds: relating adverse laboratory effects to field biomonitoring. *Environmental research*, 75(2), 160-172.
- Castro, M., Masero, J. A., Pérez-Hurtado, A., Amat, J. A., & Megina, C. (2009). Sex-related seasonal differences in the foraging strategy of the Kentish Plover. *The Condor*, 111(4), 624-632.
- Cecere, J.G., Picone, M., Basso, M., Panzarin, F.L., Berton, F., Imperio, S., Serra, L. (2022). Male but not female Kentish Plovers *Charadrius alexandrinus* modulate foraging behaviour according to the tide during incubation. *Journal of Ornithology*. Submitted.
- Corami, F., Morabito, E., Gambaro, A., Cescon, P., Libralato, G., Picone, M. & Barbante, C. (2020). Geospeciation, toxicological evaluation, and hazard assessment of trace elements in superficial and deep sediments. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(13), 15565-15583.
- Cramp, S. & Simmons, K. E. L. (1983). Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa. The Birds of the Western Palearctic: 3. Waders to Gulls. *Oxford University Press, Oxford*.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Pinxten, R., & Eens, M. (2000). Can excrement and feathers of nestling songbirds be used as biomonitors for heavy metal pollution? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(4), 541-546.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., & Eens, M. (2002). Tissue levels of lead in experimentally exposed zebra finches (*Taeniopygia guttata*) with particular attention on the use of feathers as biomonitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(1), 88-92.
- Delany, S., Scott, D.A., Dodman, T., Stroud D.A. (2009). The Wader Atlas: an Atlas of Wader Populations in Africa and Western Eurasia. *Wetlands International, Wageningen*.
- Dell'Accio, F., (2016). Il metodo dei minimi quadrati e la retta di regressione. *Dipartimento di Matematica e Informatica Università della Calabria*, 87036 Rende (CS), Italia.

- Di Giuseppe, D., Antisari, L. V., Ferronato, C., & Bianchini, G. (2014). New insights on mobility and bioavailability of heavy metals in soils of the Padanian alluvial plain (Ferrara Province, northern Italy). *Geochemistry*, 74(4), 615-623.
- Domínguez, J., & Vidal, M. (2003). Influencia del investigador en el éxito reproductivo del Chorlitejo Patinegro *Charadrius alexandrinus*. *Ardeola*, 50(1), 15-19.
- Dmowski, K. (1999). Birds as bioindicators of heavy metal pollution: review and examples concerning European species. *ACTA ORNITHOLOGICA-POLSKA AKADEMIA NAUK-ORIGINAL EDITION*-, 34, 1-26.
- Dostal, J. (2017). Rare earth element deposits of alkaline igneous rocks. *Resources* 6, 34.
- Ek, K. H., Morrison, G. M., Lindberg, P., & Rauch, S. (2004). Comparative tissue distribution of metals in birds in Sweden using ICP-MS and laser ablation ICP-MS. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2), 259-269.
- Fasola, M., Movalli, P. A., & Gandini, C. (1998). Heavy metal, organochlorine pesticide, and PCB residues in eggs and feathers of herons breeding in northern Italy. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(1), 87-93.
- Fijn, R. C., de Jong, J., Courtens, W., Verstraete, H., Stienen, E. W. M., & Poot, M. J. M. (2017). GPS-tracking and colony observations reveal variation in offshore habitat use and foraging ecology of breeding Sandwich Terns. *Journal of Sea Research*, 127, 203-211.
- Fraga, R. M., & Amat, J. A. (1996). Breeding biology of a Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) population in an inland saline lake. *ARDEOLA* 43, 69–85.
- Frid, A., & Dill, L. (2002). Human-caused disturbance stimuli as a form of predation risk. *Conservation ecology*, 6(1).
- Furness, R. W. (1993). Birds as monitors of pollutants. In *Birds as monitors of environmental change* (pp. 86-143). Springer, Dordrecht.
- García-Fernández, A. J., Espín, S., & Martínez-López, E. (2013). Feathers as a biomonitoring tool of polyhalogenated compounds: a review. *Environmental science & technology*, 47(7), 3028-3043.
- German, C. R., & Elderfield, H. (1990). Application of the Ce anomaly as a paleoredox indicator: the ground rules. *Paleoceanography*, 5(5), 823-833.
- Ginn, H. B., & Melville, D. S. (1983). *Moult in birds* (No. 19). British Trust for Ornithology.
- Gomez-Serrano and Lopez-Lopez. (2014). Nest site selection by Kentish plover suggests a trade-off between nest-crypsis and predator detection strategies. *PLoS ONE* 9, 1-9.

- Gonzalez, V., Vignati, D. A., Leyval, C., & Giamberini, L. (2014). Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: are they a uniform group beyond chemistry? *Environment international*, 71, 148-157.
- Gorman, L. R., & Haig, S. M. (2002). Distribution and abundance of Snowy Plovers in eastern North America, the Caribbean, and the Bahamas. *Journal of Field Ornithology*, 73(1), 38-52.
- Grubb Jr, T. C. (2006). *Ptilochronology: feather time and the biology of birds* (No. 15). Oxford University Press on Demand.
- Gwenzi, W., Mangori, L., Danha, C., Chaukura, N., Dunjana, N., & Sanganyado, E. (2018). Sources, behaviour, and environmental and human health risks of high-technology rare earth elements as emerging contaminants. *Science of the Total Environment*, 636, 299-313.
- Hahn, E., Hahn, K., & Stoeppler, M. (1993). Bird feathers as bioindicators in areas of the German environmental specimen bank-bioaccumulation of mercury in food chains and exogenous deposition of atmospheric pollution with lead and cadmium. *Science of the Total Environment*, 139, 259-270.
- Hollamby, S., Afema-Azikuru, J., Waigo, S., Cameron, K., Rae Gandolf, A., Norris, A., & Sikarskie, J. G. (2006). Suggested guidelines for use of avian species as biomonitors. *Environmental monitoring and assessment*, 118(1), 13-20.
- Idee, J. M., Port, M., Medina, C., Lancelot, E., Fayoux, E., Ballet, S., & Corot, C. (2008). Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a critical review. *Toxicology*, 248(2-3), 77-88.
- Innangi, M., De Rosa, D., Danise, T., Fozzi, I., Giannotti, M., Izzo, M., Fioretto, A. (2019). Analysis of 11 trace elements in flight feathers of Italian Sparrows in southern Italy: A study of bioaccumulation through age classes, variability in three years of sampling, and relations with body condition. *Science of the Total Environment*, 651, 2003-2012.
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68(1), 167-182.
- Jaspers, V. L., Covaci, A., Herzke, D., Eulaers, I., Eens, M. (2019). Bird feathers as a biomonitor for environmental pollutants: prospects and pitfalls. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 223-226.
- Jonsson, P. E. (1995). The Kentish Plover in Scania, South Sweden, 1993-1995 - a report from a conservation project. *Answer*, 34, 203-213.
- Khan, A. M., Bakar, N. K. A., Bakar, A. F. A., Ashraf, M. A. (2017). Chemical speciation and bioavailability of rare earth elements (REEs) in the ecosystem: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(29), 22764-22789.

- Kirpichtchikova, T. A., Manceau, A., Spadini, L., Panfili, F., Marcus, M. A., & Jacquet, T. (2006). Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(9), 2163-2190.
- Kosztolányi, A., Javed, S., Küpper, C., Cuthill, I. C., Al Shamsi, A., Székely, T. (2009). Breeding ecology of Kentish Plover *Charadrius alexandrinus* in an extremely hot environment. *Bird Study*, 56(2), 244-252.
- Lawrence, M. G., & Kamber, B. S. (2006). The behaviour of the rare earth elements during estuarine mixing—revisited. *Marine Chemistry*, 100(1-2), 147-161.
- Lessells, C. M. (1984). The mating system of Kentish plovers *Charadrius alexandrinus*. *Ibis (Lond. 1859)* 126, 474–483.
- Lodeni, M., & Solonen, T. (2013). The use of feathers of birds of prey as indicators of metal pollution. *Ecotoxicology*, 22(9), 1319-1334.
- MacMillan, G. A., Chételat, J., Heath, J. P., Mickpegak, R., & Amyot, M. (2017). Rare earth elements in freshwater, marine, and terrestrial ecosystems in the eastern Canadian Arctic. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 19(10), 1336-1345.
- Markowski, M., Kaliński, A., Skwarska, J., Wawrzyniak, J., Bańbura, M., Markowski, J., Bańbura, J. (2013). Avian feathers as bioindicators of the exposure to heavy metal contamination of food. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 91(3), 302-305.
- McDonald, G. C., Engel, N., Ratão, S. S., Székely, T., & Kosztolányi, A. (2020). The impact of social structure on breeding strategies in an island bird. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Miller, K. J. (1993). Endangered and threatened wildlife and plants: determination of threatened status for the Pacific coast population of the western Snowy Plover. *US Federal Register*, 58, 12864-12874.
- Montalvo, T. & Figuerola, J. (2006). The distribution and conservation of the Kentish Plover *Charadrius alexandrinus* in Catalonia. *Revista Catalana d'Ornitologia*, 22, 1-8.
- Newman, M. C. (2015). Fundamentals of ecotoxicology. The science of pollution. Fourth edition. Edited by CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Fl. 33487-2742.
- Newton, I. (2009). Moults and plumage. *Ringing & Migration*, 24(3), 220-226.
- Norte, A. C., & Ramos, J. A. (2004). Nest-site selection and breeding biology of Kentish Plover *Charadrius alexandrinus* in sandy beaches of the Portuguese west coast. *Ardeola*, (51: 2), 255-268.

- Nriagu, J. O. (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338 (6210), 47-49.
- Palanques, A., Diaz, J. I., & Farran, M. L. (1995). Contamination of heavy metals in the suspended and surface sediment of the Gulf of Cadiz (Spain): the role of sources, currents, pathways and sinks. *Oceanologica acta*, 18(4), 469-477.
- Perez-Hurtado, A., Goss-Custard, J. D., Garcia, F. (1997). The diet of wintering waders in Cádiz Bay, southwest Spain. *Bird Study*, 44(1), 45-52.
- Perrow, M. R., Skeate, E. R., & Gilroy, J. J. (2011). Visual tracking from a rigid-hulled inflatable boat to determine foraging movements of breeding terns. *Journal of Field Ornithology*, 82(1), 68-79
- Picone, M., Corami, F., Gaetan, C., Basso, M., Battiston, A., Panzarin, L., & Ghirardini, A. V. (2019). Accumulation of trace elements in feathers of the Kentish plover *Charadrius alexandrinus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 179, 62-70.
- Picone, M., Distefano, G. G., Corami, F., Franzoi, P., Bristol, S. R., Basso, M., Panzarin, L., Ghirardini, A. V. (2022). Occurrence of rare earth elements in fledgelings of *Thalasseus sandvicensis*. *Environmental Research*, 204, 112152.
- Piper, D. Z., & Bau, M. (2013). Normalized rare earth elements in water, sediments, and wine: identifying sources and environmental redox conditions. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2013.
- Pourmand, A., Dauphas, N., & Ireland, T. J. (2012). A novel extraction chromatography and MC-ICP-MS technique for rapid analysis of REE, Sc and Y: Revising CI-chondrite and Post-Archean Australian Shale (PAAS) abundances. *Chemical Geology*, 291, 38-54.
- Reddy, K. R., & DeLaune, R. D. (2008). Biogeochemistry of wetlands: science and applications. *CRC press*.
- Rétif, J., Zalouk-Vergnoux, A., Briant, N., & Poirier, L. (2022). From geochemistry to ecotoxicology of rare earth elements in aquatic environments: Diversity and uses of normalization reference materials and anomaly calculation methods. *Science of The Total Environment*, 158890.
- Rim, K. T. (2016). Effects of rare earth elements on the environment and human health: a literature review. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 8(3), 189-200.
- Rondinini, C., Battistoni, A., Peronace, V., Teofili, C. (2013). Lista Rossa IUCN dei Vertebrati Italiani. Roma.
- Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Lubinska-Szczygeł, M., Różańska, A., Możejko-Ciesielska, J., & Namieśnik, J. (2018). Birds' feathers—suitable samples for determination of environmental pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 109, 97-115.

- Salomons, W. & Forstner, U. (1984). *Metals in the Hydrocycle*. Springer, Berlin, Germany, 349 pp.
- Scarton, F. (2017). Long-term trend of the waterbird community breeding in a heavily man-modified coastal lagoon: the case of the Important Bird Area “Lagoon of Venice”. *Journal of coastal conservation*, 21(1), 35-45.
- Schmidt, K., Bau, M., Merschel, G., & Tepe, N. (2019). Anthropogenic gadolinium in tap water and in tap water-based beverages from fast-food franchises in six major cities in Germany. *Science of the Total Environment*, 687, 1401-1408.
- Schmude, E., Ertl, H. M., Taylor, R. J., & Mora, M. A. (2018). Using feathers to evaluate adverse effects of metals on northern bobwhites (*Colinus virginianus*) in Texas. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 75(1), 87-95.
- Spanu, D., Butti, L., Boldrocchi, G., Bettinetti, R., & Monticelli, D. (2020). High-throughput, multi-batch system for the efficient microwave digestion of biological samples. *Analytical Sciences*, 19A004.
- Székely, T. (1992). Reproduction of Kentish plover *Charadrius alexandrinus* in grasslands and fish-ponds: the habitat mal-assessment hypothesis. *Aquila*, 99, 59-68.
- Székely, T. & Lessells, C. M. (1993). Mate change by Kentish plovers *Charadrius alexandrinus*. *Ornis Scandinavica*, 317-322.
- Tablado, Z., & Jenni, L. (2017). Determinants of uncertainty in wildlife responses to human disturbance. *Biological Reviews*, 92(1), 216-233.
- Taylor, S. R., & McLennan, S. M. (1985). *The continental crust: its composition and evolution*. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne: *Blackwell Scientific*, XVI 312 pp.
- Tucker, G.M. & Heath, M.F. (1994). *Birds in Europe. Their Conservation Status*. Cambridge: *BirdLife International*.
- Valladares, S., Moreno, R., Jover, L., & Sanpera, C. (2010). Evaluating cleansing effects on trace elements and stable isotope values in feathers of oiled birds. *Ecotoxicology*, 19(1), 223-227.
- Warriner, J. S., Warriner, J. C., Page, G. W., & Stenzel, L. E. (1986). Mating system and reproductive success of a small population of polygamous Snowy Plovers. *The Wilson Bulletin*, 15-37.
- Weston, M. A., & Elgar, M. A. (2007). Responses of incubating hooded plovers (*Thinornis rubricollis*) to disturbance. *Journal of Coastal Research*, 23(3), 569-576.

Weston, M.A. (2019). Human disturbance. In: The population ecology and conservation of *Charadrius* plovers. Edited by Colwell, M.A., and Haig, S.M. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Fl. pp 277-310.

Wilde, P., Quinby-Hunt, M. S., & Erdtmann, B. D. (1996). The whole-rock cerium anomaly: a potential indicator of eustatic sea-level changes in shales of the anoxic facies. *Sedimentary Geology*, 101(1-2), 43-53.

Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively coupled plasma mass spectrometry: introduction to analytical aspects. *The Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 115.

Yamada, N. (2015). Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 110, 31-44.

Zheng, S., Wang, P., Sun, H., Matsiko, J., Hao, Y., Meng, D., Jiang, G. (2018). Tissue distribution and maternal transfer of persistent organic pollutants in Kentish Plovers (*Charadrius alexandrinus*) from Cangzhou Wetland, Bohai Bay, China. *Science of the Total Environment*, 612, 1105-1113.

6. SITOGRAFIA

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

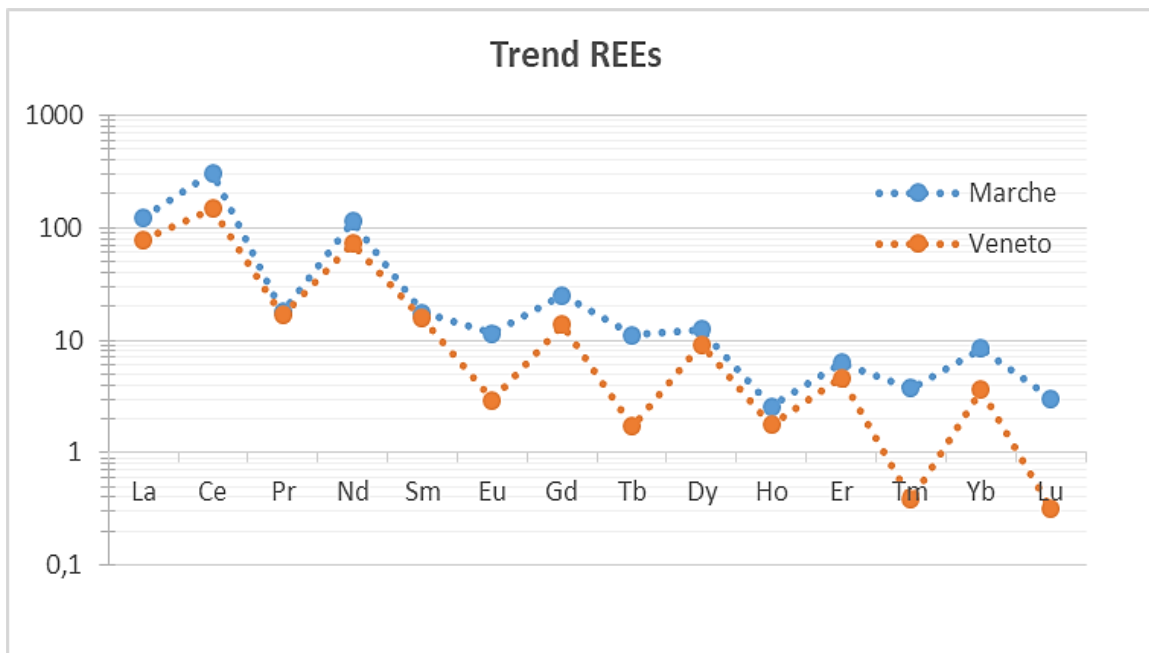
<https://www.thermofisher.com/it/en/home.html>

<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sial/67349>

<https://www.milestonesrl.com/products/microwave-digestion/ethos-up>

ALLEGATI

Allegato 1: trend delle concentrazioni di terre rare misurate nelle penne marchigiane e venete.



Allegato 2: trend delle concentrazioni normalizzate di terre rare nelle penne marchigiane e venete.

