

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SEDE DI CESENA
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

**EFFETTO DELLE CONDIZIONI AMBIENTALI NELLA
PRESENZA DI *ESCHERICHIA COLI* IN VONGOLE LUPINO
(*Chamelea gallina* L.)**

Relazione finale in
Biologia dei microrganismi
(**Biologia dei microrganismi ed ispezione degli alimenti c.i.**)

Relatore:

Prof. **Fausto GARDINI**

Correlatore:

Dott.ssa **Chiara MONTANARI**

Dott.ssa **Giulia TABANELLI**

Presentata da:

Emecy CHAHED

Sessione I

Anno Accademico 2015-2016

INDICE

CAPITOLO 1. IL MERCATO	pag. 1
1.1. Mitili e crostacei nel mondo.....	pag. 1
1.2. Mitili e crostacei in Italia.....	pag. 4
1.3. Consumo.....	pag. 6
CAPITOLO 2. CHAMELEA GALLINA	pag. 7
2.1. Descrizione vongola.....	pag. 7
2.2. La classe dei Bivalvi	pag. 8
2.3. Alimentazione	pag. 10
2.4. Attività filtrante.....	pag. 10
2.5. Habitat	pag. 11
2.6. Biologia.....	pag. 12
2.7. Valore economico, produzione e mercato.....	pag. 13
2.8 Areali di produzione	pag. 14
2.9 Allevamento.....	pag. 14
2.10 Metodo di pesca.....	pag. 15
2.11 Lavorazione e produzione delle vongole.....	pag. 17
2.12 Valore nutrizionale.....	pag. 18

CAPITOLO 3. QUALITA' DEI MOLLUSCHI BIVALVI	pag. 21
3.1 Criteri di qualità.....	pag. 21
3.2 All'interno del Regolamento 178/2002 troviamo l'EFSA.....	pag. 23
3.2.1 Depurazione o non depurazione?.....	pag. 25
3.3 Confezioni e cartellini	pag. 26
3.4 Rischi di natura alimentare.	pag. 28
3.5 Tossinfezioni e intossicazioni alimentari nelle vongole.....	pag. 30
3.6 Biotossine algali.....	pag. 30
3.7 Malattie da batteri.....	pag. 32
3.7.1 <i>Salmonella spp.</i>	pag. 32
3.7.2 <i>Escherichia coli</i>	pag. 33
3.7.3 <i>Vibro spp.</i>	pag. 35
3.7.3.1. <i>Vibrio cholerae</i>	pag. 37
3.7.3.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	pag. 38
3.7.3.3 <i>Vibrio vulnificus</i>	pag. 38
3.7.4 <i>Campylobacter</i>	pag. 39
3.8 Malattie da virus enterici.....	pag. 40
3.8.1 <i>Epatite A</i>	pag. 41
3.8.2 <i>Norovirus (Norwalk-like virus)</i>	pag. 42
3.9 Contaminazione da metalli pesanti.....	pag. 43
3.9.1 <i>Piombo</i>	pag. 43
3.9.2 <i>Cadmio</i>	pag. 43
3.9.3 <i>Mercurio</i>	pag. 44
3.10 Rischi ambientali nella costa adriatica.....	pag. 44
3.10.1 <i>Effetti delle condizioni costiere sulla vongola adriatica</i>	pag. 46
3.11 Alterazioni del pescato.....	pag. 46

3.11.1 *Il processo di alterazione batterica di prodotti ittici*.....pag. 47

CAPITOLO 4. OBIETTIVI.....pag. 49

CAPITOLO 5. MATERIALI E METODIpag. 53

5.1 Raccolta dei campioni.....pag. 53

5.2. Metodo MPN *Escherichia coli*.....pag. 53

5.3 Valutazione dei parametri ambientali.....pag. 55

5.4 Analisi statistica.....pag. 56

5.4.1 *Test Chi quadrato*.....pag. 56

5.4.2 *Test Kruskal-Wallis*.....pag. 57

CAPITOLO 6. RISULTATIpag. 59

CAPITOLO 7. CONCLUSIONEpag. 73

BIBLIOGRAFIA.....pag. 75

SITOGRAFIA.....pag. 81

RINGRAZIAMENTI.....pag. 83

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE:

IL MERCATO

1.1 Mitili e crostacei nel mondo

Oltre il 25% del totale mondiale dei prodotti della pesca più importanti è rappresentato da sole dieci specie: tra queste, due appartengono ai molluschi bivalvi, l'ostrica concava (*Crassostrea gigas*), al secondo posto per quantità, e la vongola verace (*Ruditapes philippinarum*), al quinto. Nel 2007 la produzione è stata rispettivamente di 4'268'411 e di 3'088'597 tonnellate. Le catture totali di prodotti della pesca dal 2000 al 2007 vanno da oltre 127 milioni di t nel 2000 ad oltre 140 milioni t nel 2007. Di questi il 5.6 % è rappresentato dall'ostrica concava e dalla vongola verace. Tra i prodotti dell'acquacoltura, che hanno superato nel 2007 i 50.3 milioni di t con un incremento rispetto all'anno precedente del 6.4%, i molluschi bivalvi (ostrica concava, vongola verace, cappesante orientali) rappresentano ben il 17.2%. Tra i prodotti dell'acquacoltura, la produzione maggiore riguarda l'ostrica concava con 4.2 MI di t, per oltre l'84% allevata in Cina ed il restante in Corea del Sud, Giappone e Francia. La vongola verace è al quarto posto tra i prodotti mondiali dell'acquacoltura, in notevole aumento con oltre 3 MI di t, mentre è in netta contrazione la produzione di *Mytilus edulis* o cozza atlantica. Nella Comunità europea, l'andamento della produzione nel 2007 è caratterizzato da una flessione sia dei quantitativi pescati che di quelli allevati, e diverge dal quadro emerso a livello mondiale, in cui la produzione di pesci, molluschi e crostacei, nonostante il calo dei quantitativi registrato dalla pesca, ha segnato un incremento rispetto al 2006, per effetto della crescita dei prodotti di acquacoltura.

Secondo stime Fao, nel biennio 2010-11 la pesca è di fatto stabile, mentre l'acquacoltura cresce ancora. Attualmente, con oltre 60 milioni di t., l'acquacoltura incide per il 40,5% sul totale prodotto.

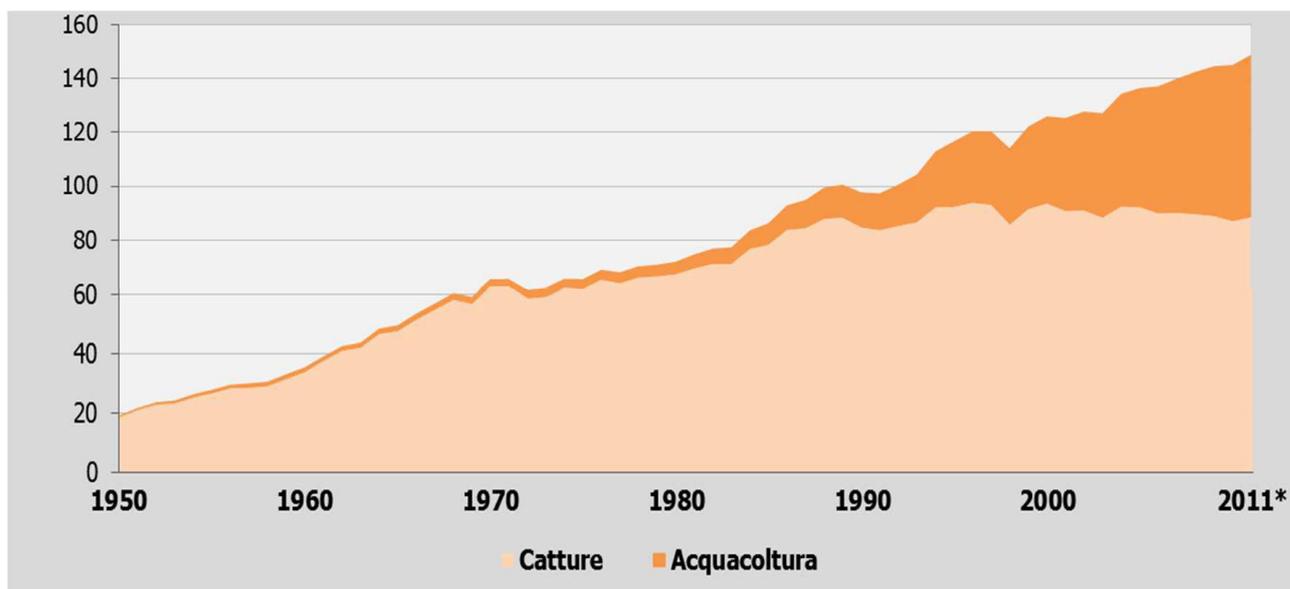


Figura 1.1: Acquacoltura e catture mondiali di pesci, molluschi e crostacei (mln t)

è esclusa la produzione di mammiferi acquatici, perle, coralli, spugne e piante acquatiche. * I dati relativi al 2010 e al 2011 sono stime. Fonte: Elaborazioni Ismea su dati Fao.

La quantità di pesci, molluschi e crostacei allevati nella Comunità era invece, costantemente cresciuta negli anni '80 e '90, seppure a tassi inferiori rispetto al resto del mondo, passando da 674 mila tonnellate del 1980 a 1.4 milioni di tonnellate del 1999, anno in cui si è evidenziato il massimo livello produttivo. Responsabili della notevole crescita registrata alla fine degli anni '90 erano stati i maggiori volumi di cozze prodotti dalla Spagna, dall'Italia e dalla Francia, quelli di ostriche dalla Francia e quelli di salmoni dal Regno Unito. In seguito, l'acquacoltura comunitaria ha registrato una flessione della produzione, in particolare di mitili e ostriche, per effetto di crisi produttive legate a eventi patologici, ad inquinamento delle acque marine da idrocarburi (ad esempio, quello provocato, nel 2002, dall'affondamento della nave Prestige, carica di petrolio, vicino alle coste della Spagna e della Francia) ed alla presenza di tossine algali. Le cozze atlantiche pescate si sono fortemente ridotte negli ultimi anni nell'area nord orientale dell'Oceano Atlantico; in Mediterraneo è importante la pesca delle vongole, quinta per importanza con oltre 15000 t, ottava quella delle cozze con 10000 t.

L'acquacoltura comunitaria si caratterizza da sempre per la prevalente produzione di molluschi (mitili, ostriche e vongole), anche se nell'ultimo decennio sono stati i pesci, a registrare forti balzi in avanti nei quantitativi allevati. Attualmente, la produzione di molluschi incide per il 53.8% sul totale. Le principali zone di allevamento dei molluschi sono la Galizia, in Spagna per le cozze atlantiche, la costa occidentale francese per le ostriche concave e le zone lagunari del Nord Adriatico, in Italia, per le vongole. La produzione di cozze atlantiche (*Mytilus edulis*) è svolta in diversi paesi. I dati produttivi relativi al 2005 mettono in evidenza la seguente composizione: 43.8% in Spagna, 18.4% Francia, 16.6% in Olanda, 10.7% in Irlanda, 7.9% in Regno Unito e il restante 2.6% in Germania.

Diversamente, risulta più concentrata la produzione di cozze (*Mytilus galloprovincialis*), condotta quasi esclusivamente in Italia, in molte regioni (le più importanti sono la Puglia, l'Emilia Romagna, la Sardegna e il Veneto). A livello mondiale il primo produttore di molluschi risulta la Cina, seconda l'UE in particolare l'Italia, seguono poi Cile e Nuova Zelanda. Cile e Nuova Zelanda sono i due principali fornitori di cozze nell'UE, che riforniscono il nostro mercato con prodotti surgelati utilizzati come materia prima per l'industria di trasformazione europea. Il commercio all'interno dell'UE è ben sviluppato e ha un valore pari a circa la metà del valore complessivo del mercato dell'UE. I principali flussi commerciali partono da Spagna, Paesi Bassi e Danimarca verso Belgio, Francia e Italia. Il mercato delle cozze dell'UE è altamente segmentato, con prezzi e stagioni di commercializzazione differenti, a seconda dell'origine. Le esportazioni dall'UE sono molto limitate e dirette soprattutto verso Svizzera e Russia (www.ec.europa.eu).

L'Italia è tra i principali Paesi importatori di prodotti della pesca della comunità, dopo Spagna, Regno Unito, Danimarca, Germania, Francia, ma è il primo importatore di molluschi. In Italia, le vongole sono la seconda specie pescata (dopo le acciughe, da sempre le più pescate con oltre 78 mila tonnellate nel 2006 e un'incidenza pari al 27.3% sul totale) con circa 18700 t nel 2006. Nel 2006, la

produzione ittica proveniente dall'attività di acquacoltura è risultata composta per il 70% circa da prodotti della molluschicoltura e per il restante 30% da prodotti della piscicoltura, mentre hanno concorso al valore della produzione all'incirca in parte uguali. Sia i molluschi che i pesci hanno mostrato una crescita in termini quantitativi e di valore rispetto al 2005, anche se un'analisi più dettagliata consente di individuare andamenti differenti da specie a specie, a conferma in alcuni casi di una tendenza in atto da diversi anni (Cattaneo e Bernardi, 2010).

1.2 Mitili e crostacei in Italia

I dati nazionali relativi alle catture nelle acque del Mediterraneo, forniti da Mipaaf-Irepa, hanno mostrato nell'anno in esame un calo produttivo del 6.5%, accompagnato da una ancor più accentuata diminuzione dei ricavi (-10.5%). L'andamento negativo dei volumi pescati è riconducibile alla riduzione dello sforzo di pesca, legata in parte alla diminuzione delle imbarcazioni attive in atto ormai da diversi anni (il numero dei battelli è sceso del 2.7% rispetto al 2006, il tonnellaggio complessivo è diminuito del 4.3%). A ciò si sono aggiunte anche le minori giornate di pesca soprattutto all'aumento del costo di produzione, il carburante, che a detta di alcuni operatori, ha scoraggiato le uscite in mare in presenza di condizioni meteomarine non buone. Sul risultato negativo della pesca italiana nel Mediterraneo hanno pesato le minori catture di pesci e crostacei, in particolare di alcune fra le specie più importanti per la flotta nazionale: le alici o acciughe, che incidono per oltre il 20% sui volumi prodotti in Italia, collocandosi al primo posto, i naselli, i gamberi rosa, il pesce spada, i sugarelli e gli scampi. Andamento opposto hanno manifestato le catture di molluschi (+21%), soprattutto per l'incremento degli sbarchi di vongole in Puglia e nelle regioni che si affacciano sull'Adriatico centro-settentrionale (Marche, Emilia Romagna e Veneto), e di seppie, anche in questo caso dal Medio-Alto Adriatico (http://www.ismea.it/flex/files/D.4b5f0700280a742f6382/I_consumi_ittici_nei_principali_paesi_europei.pdf).

In Italia, su 979 impianti censiti nel 2005, ben 442 riguardano la molluschicoltura. Oltre il 40% degli impianti è localizzato in Veneto per l'allevamento delle vongole negli ambienti lagunari ed estuarini; seguono la Liguria (che vanta il maggior numero di impianti di mitilicoltura), la Puglia, l'Emilia Romagna, la Campania, il Friuli Venezia Giulia e la Sardegna. Le vongole sono allevate in Veneto e in Emilia Romagna, mentre la produzione di mitili caratterizza più le regioni adriatiche e tirreniche (con la leadership dell'Emilia Romagna, seguita dal Veneto, dalla Sardegna e dalla Puglia) seppure a ritmi differenti.

Non sempre le imprese titolari dell'impianto di allevamento provvedono anche alla gestione dello stesso, in alcuni casi vige, l'affidamento di parte delle strutture di allevamento ad imprese o singoli imprenditori, che esercitano a pieno titolo l'attività di mitilicoltura. Gli addetti in mitilicoltura nel nostro paese sono circa 1 400, di cui il numero maggiore è naturalmente concentrato nelle principali zone di produzione. Per i mitili il prezzo medio, su base nazionale, nel 2005 è stato di €0.84/kg, con differenze su base regionale. (Giuseppe Prioli, 2008). Oggi il prezzo dei mitili è aumentato, secondo Ismea risulta circa €1.50/kg su base regionale. L'Italia risulta il terzo principale paese produttore di molluschi in Europa. La produzione di acquacoltura in Italia si concentra prevalentemente nella costa adriatica per le particolari qualità costiere e il clima temperato caldo (www.ec.europa.eu).

Scambi nazionali: Paesi fornitori

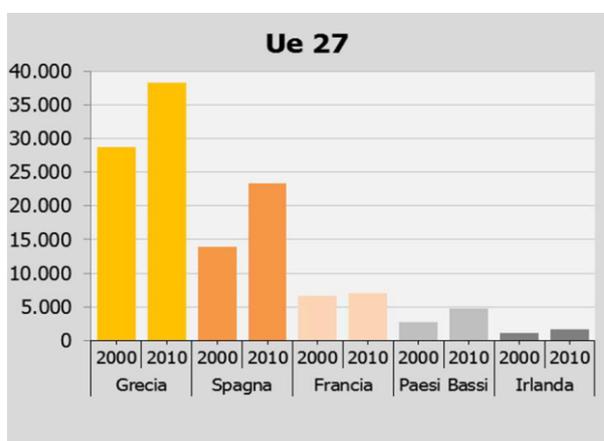


Fig. 1.2: Importazioni di pesci, molluschi e crostacei (t) "allevati"

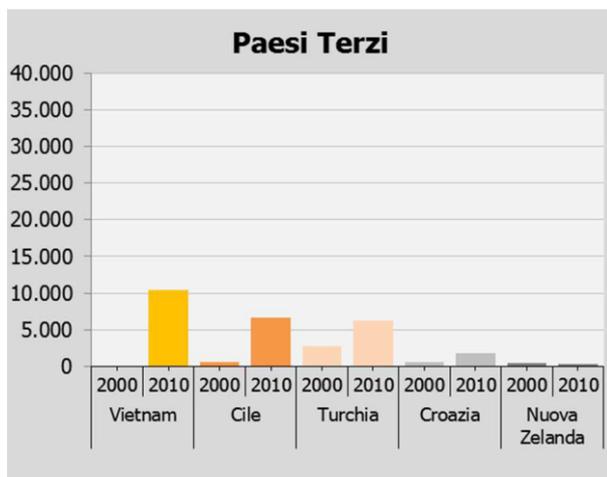


Fig. 1.3: Importazioni di pesci, molluschi e crostacei (t) "allevati"

Fonti: Elaborazioni Ismea su dati Istat 2010

1.3 Consumo

Per quanto riguarda i consumi italiani, i molluschi sono il prodotto ittico più acquistato in Italia con una quota di oltre il 25% dei consumi extra-domestici e di oltre il 9% dei consumi domestici. Tra le specie di prodotti ittici consumate nei fuori casa, cozze e vongole risultano di gran lunga il prodotto preferito dagli italiani con il 46% delle preferenze rispetto al 35% di spigole e orate e al 28% di gamberi e mazzancolle. Il consumo dei molluschi ha registrato in questi anni interessanti e continui incrementi, in particolare nel 2006 il consumo domestico di molluschi freschi in Italia si è attestato a circa 410 milioni di Euro, facendo registrare nel periodo 2004-2006 un tasso di crescita annuo del 9.8%. Una fonte di reddito e produzione in Italia, è data da una particolare varietà di molluschi, la *Chamelea gallina*. Secondo i dati Irepa, essa ha fatto registrare la maggiore produzione lorda vendibile nel 2004 con oltre 75 milioni di euro, scesi poi notevolmente l'anno successivo, passando a 46 milioni di euro, con una flessione del 35% nelle catture. Dal 2005 i quantitativi hanno poi registrato una crescita continua, infatti nel 2007 le catture sono aumentate del 45% rispetto all'anno precedente e il valore dei ricavi ha registrato un incremento del 10%. Questo ha determinato di conseguenza un notevole calo del prezzo (da 3.22 euro/kg a 1.88 euro/kg, ossia un calo del 42%), in seguito quindi all'incremento delle catture (Trevisan, 2011).

CAPITOLO 2

INTRODUZIONE:

CHAMELEA GALLINA

2.1 Descrizione Vongola

La vongola comune è il nome volgare con cui si contraddistingue la *Chamelea gallina* (Linneus 1758). A livello locale viene identificata, oltre che con il nome volgare, anche con altri nomi dialettali: Puraza in Emilia Romagna, Concola, Purazza nelle Marche, Cocciola in Puglia e Lupino in Campania. Questa specie appartiene alla classe delle bivalve per la comune caratteristica di un corpo molle racchiuso da un guscio con due valve laterali generalmente uguali. L'esoscheletro della *Chamelea* è di forma quasi triangolare, arrotondata e più corta anteriormente, più o meno arrotondata posteriormente (www.arpa.emr.it). La conchiglia è costituita da carbonato di calcio, estratto dall'acqua di mare. Le valve sono tenute insieme da una cerniera, costituita da incastri con 3 denti cardine in ciascuna valva e legamenti. Il margine interno della conchiglia è seghettato finemente. All'interno delle valve, il mantello racchiude gli organi interni: branchie, sifone, cuore, centri nervosi, muscoli adduttori, organi riproduttivi, palpi labiali, stomaco, intestino, ecc. (Cattaneo P., Bernardi C. 2008) La colorazione esterna della conchiglia varia dal bianco al grigio chiaro o al beige. Spesso vi sono esemplari che presentano fasce radiali bianche o linee a zig zag scure. Si trovano frequentemente anche individui completamente bianchi. La specie può raggiungere la lunghezza di 45 mm, la taglia minima di legge per la commercializzazione è identificata nella lunghezza di 25 mm. (Turolla, 2007).

Regno: Animali
Phylum: Mollusca
Classe: Bivalvia
Sottoclasse: Heterodonta
Ordine: Veneroida
Superfamiglia: Veneracea
Famiglia: Veneridae
Genere: *Chamelea*



Specie: *Gallina*

Fig. 2.1: *Chamelea Gallina* (Fonte: Wikipedia)

Denominazioni in lingua straniera: Striped Venus (inglese), Petite Prairie (francese), Chirla (spagnolo)

2.2 La classe dei bivalvi

Come tutti i Bivalvi, *Chamelea gallina* è un mollusco caratterizzato da un corpo compresso contenuto in una conchiglia costituita da due valve dette beanti poiché non racchiudono interamente l'animale che sporge all'esterno con piede e sifone. Ogni valva presenta tre strati: un periostraco, esterno poco mineralizzato e composto da chiolina, uno spesso strato intermedio (mesostraco) costituito da prismi di calcite, ed uno strato interno (endostraco) madreperlaceo, costituito da lamelle di aragonite, disposte parallelamente alla conchiglia.

Le valve sono unite dorsalmente da un legamento che serve a mantenere socchiuse le valve quando il mollusco è in stato di rilassamento. L'insieme dei denti e delle fossette complementari nella regione dorsale forma la cerniera che guida la corretta chiusura della conchiglia. Il corpo è ricoperto ai lati dai due lembi del mantello saldati nella regione posteriore in modo da determinare due aperture, una esalante dorsale ed una inalante ventrale. Lo spazio compreso dai lembi del mantello viene detto "cavità palleale" ed in essa sono situati gli organi della respirazione (branchie) e lo sbocco degli apparati digerente, escretore e riproduttore. La circolazione all'interno di questa cavità è tale che l'acqua entrata dal sifone inalante, dopo aver ceduto l'ossigeno ed altre sostanze alle branchie, essersi

caricata di anidride carbonica, ricevuto i prodotti del metabolismo, i prodotti sessuali ed i residui della digestione, esce dal sifone esalante.

Le branchie sono laminari e disposte una per lato, tra il piede ed il mantello. Ogni branchia è costituita da due sottili lamine dotate di numerosi e lunghi filamenti cavi, uniti da connessioni vascolari; ogni lamina è ripiegata su sé stessa in modo da costituire due lamelle, anche queste congiunte da connessioni vascolari, cosicché ciascuna lamina assume l'aspetto di un duplice graticcio. I margini liberi della lamella più esterna e di quella più interna di ciascuna branchia si connettono dorsalmente al mantello ed al piede: in questo modo, dalla cavità palleale si viene a separare per ciascun lato del corpo una camera sopra branchiale, dalla quale si continua il sifone esalante.

Le branchie, oltre ad essere riccamente vascolarizzate, sono rivestite da un epitelio cigliato che, oltre a permettere con il movimento delle sue ciglia una maggiore circolazione di acqua all'interno della cavità palleale, ha una funzione importantissima a livello trofico.

L'apparato circolatorio è di tipo aperto ed il sangue è libero di fluire in seni e lacune. Il cuore è costituito da due atri, uno per branchia, e da un ventricolo al quale fa seguito un'aorta che si dirama dando origine ad un sistema lacunoso. Il pigmento respiratorio contenuto nel sangue è costituito da emocianina.

L'apparato escretore è formato dall'organo di Bojanus, costituito da due nefridi posti sotto la cavità pericardica e comunicanti con questa mediante un nefrostoma.

L'apparato riproduttore è composto da gonadi pari, tubolari ed acinose, con anastomizzazioni che si insinuano a completo sviluppo anche tra l'apparato digerente, il piede ed il mantello. Le aperture genitali sono situate nella cavità soprabranchiale alla base della massa dei visceri.

2.3 Alimentazione

La *Chamelea* si nutre di microorganismi e microparticellato (microfagia) sospesi nella colonna d'acqua. Il cibo è ottenuto per filtrazione ed è costituito principalmente da fitoplancton o micro alghe, da zooplancton vivi e morti e da materia organica. La *Chamelea* ha dei sifoni ben sviluppati in prossimità del margine posteriore, uno inalante e uno esalante. Il flusso d'acqua in entrata dal sifone inalante attraversa le branchie dove l'acqua viene filtrata, le particelle aderiscono allo strato di muco secreto dall'epitelio branchiale e del mantello e in seguito a questo passaggio l'acqua filtrata esce dal sifone esalante (Turolla, 2007).

2.4 Attività filtrante

A causa della loro attività filtrante, i molluschi bivalvi concentrano gli agenti inquinanti ad un livello molto più elevato dell'ambiente circostante. Questo determina in alcuni casi la necessità di processi di depurazione, al fine di rimuovere o ridurre i rischi di contaminazione prima del consumo. Molti degli agenti patogeni, quali i virus gastrointestinali o i virus epatici ed i batteri che causano il tifo, sono di solito associati alla contaminazione da liquami umani. Altri, come i batteri che causano gastroenteriti (*Salmonelle non-tifoidee* e *Campylobacter*), possono essere associati sia alle feci degli animali che alle acque reflue. Queste ultime possono contaminare le aree di produzione dei molluschi bivalvi con il dilavamento della terra durante i periodi di pioggia. Altri rischi sono associati alla naturale presenza di organismi patogeni nell'ambiente marino; si possono ricordare le infezioni causate da batteri patogeni del genere *Vibrio* e le varie forme di avvelenamento provocate dalle biotossine prodotte da alcune alghe unicellulari, come ad esempio l'avvelenamento paralitico dei molluschi (*paralytic shellfish poisoning PSP*), quello neurotossico dei molluschi (*neurotoxic shellfish poisoning NSP*), quello amnesico dei molluschi (*amnesic shellfish poisoning ASP*) e quello diarroico dei molluschi (*diarrhetic shellfish poisoning DSP*). In certe zone i contaminanti chimici quali i metalli pesanti, i pesticidi, gli organoclorurati, le sostanze chimiche di derivazione del petrolio, costituiscono un potenziale pericolo (www.izsum.it).

I molluschi bivalvi possono accumulare oppure espellere batteri e virus in rapporto alle caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche dell'ambiente idrico che li circonda. Le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua in cui si trova il mollusco influiscono sulla sua attività vitale: se non sono favorevoli ne inducono la stasi metabolica, al contrario se sono favorevoli ne consentono l'attività di filtraggio; in tal caso l'effetto di accumulo o rilascio dei contaminanti da parte del mollusco dipende dalle caratteristiche di contaminazione dell'acqua in cui si trova.

Esiste quindi una correlazione tra le condizioni microbiologiche delle acque e quelle dei molluschi (Pluchino, 1988).

2.5 Habitat

Chamelea gallina è un organismo bentonico, vive infossata nei fondali sabbiosi o sabbio-fangosi della costa, dalla granulometria fine ed omogenea, lasciando sporgere solamente i sifoni, organi che le servono per filtrare l'acqua ricca di sostanze organiche in sospensione. Distribuita tipicamente ad una bassa profondità, da 0 a 15 m, vive aggregata in banchi, determinando con la sua massiccia presenza biocenosi caratteristiche dette a *Chamelea gallina* ed a *Chamelea gallina-Owenia fusiformis* (Vatova, 1949; Scaccini, 1967), quest'ultima tipica dei fondali sabbioso-melmosi situati spesso al davanti delle foci dei fiumi.

La vongola adriatica è una specie tipicamente mediterranea presente anche nel Mar Nero, segnalata nel Mar Caspio e lungo le coste europee dell'Atlantico dalla Norvegia al Marocco. In Adriatico occidentale, la specie è presente in "banchi naturali" lungo la fascia costiera della zona intertidale fino a profondità di 12-15 m. I popolamenti più abbondanti sono però riscontrabili solitamente tra i 3 e i 6 m di profondità, con alcune differenze dipendenti dal tratto di costa considerato. La specie è rinvenibile anche negli ambienti lagunari nell'area a elevate componente sabbiosa. La vongola adriatica occupa una nicchia ecologica ben definita, determinata da precise condizioni chimiche e fisiche del mezzo idrico e del sedimento (granulometria, potenziale elettrico e ossigenazione). L'habitat ottimale è caratterizzato da modeste variazioni dei parametri ambientali (temperatura e salinità) e fondali a granulometria sabbiosa. È possibile collegare la presenza della

Chamelea gallina a sedimenti costituiti da sabbie medie, fini e finissime, in percentuali del 90%. L'areale distributivo è in contrazione, in quanto procedendo dalla linea di battigia verso il largo, è possibile notare il progressivo aumento della componente granulometrica di sedimenti fini, meno adatti allo sviluppo della vongola adriatica, tale da determinare la progressiva rarefazione, fino alla completa scomparsa della specie (Trevisan, 2011).

2.6 Biologia

La *Chamelea gallina* è una specie gonorica (sessi separati) a fecondazione esterna. La prima maturità sessuale viene raggiunta già al primo anno di età alla lunghezza di 16-18 mm. Alle nostre latitudini la gametogenesi può avere inizio già a novembre-dicembre e prosegue fino a marzo. Ad aprile, con l'incremento della temperatura, le gonadi arrivano a maturità e possono verificarsi le prime emissioni dei gameti che diventano più consistenti nei mesi di giugno e luglio, proseguendo fino ad agosto e settembre. Dalla fecondazione dell'uovo si origina in poche ore una larva planctonica che dopo circa un mese metamorfosa insediandosi nel sedimento, iniziando così la fase bentonica. Questa è una fase particolarmente delicata, contraddistinta da elevati tassi di mortalità dovuti alle caratteristiche ambientali del sito, alla predazione (granchi, gasteropodi, pesci, ecc.) e all'impatto degli attrezzi da pesca.

La vongola adriatica ha una crescita piuttosto lenta e nel primo anno raggiunge la lunghezza di 15-18 mm, mentre sono necessari circa 2 anni per conseguire la taglia minima commerciale di 25 mm (Frogliola, 1975). In 8 anni la specie può raggiungere la taglia massima di 50 mm: la crescita risulta sostenuta in primavera-estate, mentre rallenta in autunno, fino a interrompersi quando la temperatura scende al di sotto dei 10°C (Trevisan, 2011). L'accrescimento dipende anche da condizioni ambientali abiotiche e biotiche (Bombace e Lucchetti, 2011).

2.7 Valore economico, produzione e mercato

Per volume d'affari la *Chamelea gallina* è certamente la specie più importante tra quelle non allevate. Il valore alla prima vendita è di 2-3 €/Kg, mentre la produzione è di circa 20.000 tonn/anno. Lo sfruttamento di questa risorsa è coordinato da consorzi di gestione che regolano le quantità prelevate, le zone di pesca e i periodi di fermo per favorire il ripopolamento (Turolla, 2007).

Il prezzo delle vongole è calato del 42% nel 2007, in seguito ad un incremento delle catture. Nello stesso anno le vongole sono risultate la seconda specie in Italia dopo le acciughe come quantitativi, con una produzione pari a 28.802 tonnellate. La produzione italiana di vongole è principalmente ripartita tra le Marche, l'Emilia Romagna, la Puglia, l'Abruzzo, il Molise, il Veneto e il Friuli Venezia Giulia. La maggiore produttrice di questa specie risulta essere la regione marchigiana che contribuisce con una percentuale del 46 % (2007) pari ad oltre 13.000 tonnellate di prodotto (Trevisan, 2011). Per quel che riguarda l'Emilia Romagna, la componente maggiore di prodotto proviene dal compartimento di Rimini, con oltre 2.500 tonnellate. Ravenna e Monfalcone contribuiscono rispettivamente con il 7% e il 10% alla produzione dell'Alto Adriatico.

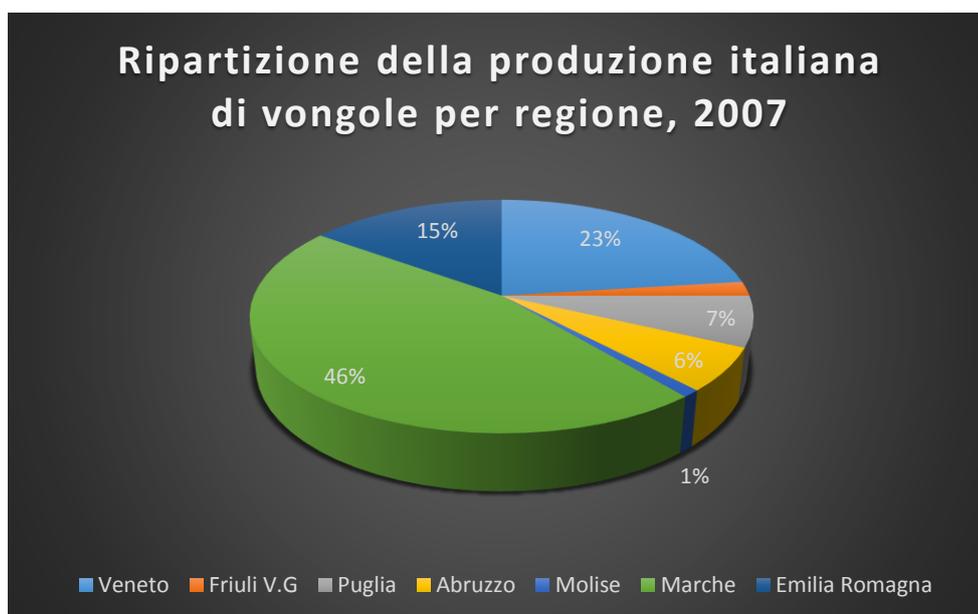


Fig. 2.2: elaborazioni su dati Irepa

2.8 Areali di produzione

Oggi la produzione delle vongole è dominata dalla China, cui si deve il 98% circa della produzione mondiale. Altri importanti produttori mondiali sono l'UE, la Corea e la Turchia. Nell'UE l'Italia è di gran lunga il produttore principale di vongole prima di Portogallo, Francia e Spagna. In Italia l'attività della venericoltura si svolge interamente nelle lagune dell'Adriatico nordorientale e nel delta del fiume Po (ww.ec.europa.eu), ed in particolare lungo le coste dell'Adriatico centro-settentrionale sino circa all'altezza del Gargano, dove si sviluppano densi popolamenti, anche se importanti catture vengono realizzate anche nel basso e medio Tirreno. Questa specie è tuttavia anche distribuita in tutte le coste del Mar Nero e del Mediterraneo. Ha una notevole economica importanza, dal momento che è in fase di sfruttamento commerciale nel Mar Mediterraneo, in particolare nelle acque costiere di Italia, Spagna, Marocco, e Turchia. Quest'ultima risultava essere fino al 2010 il produttore leader, con il 58% della produzione totale mondiale di questa specie. Oggi è stata surclassata dalla China, ma resta comunque un grande produttore. Una significativa parte delle vongole raccolte in Turchia viene esportata principalmente in alcuni paesi europei, quindi è un importante contributo all'economia della pesca della Turchia (Fatma Arik Colakoglu, et al., 2012).

2.9 Allevamento

In Europa la maggior parte del novellame di vongole sia europee che giapponesi è raccolta in ambienti naturali. Tuttavia, il novellame può anche essere prodotto nei vivai, dove la deposizione delle uova viene stimolata mediante shock termico, aggiunta di sperma o incentivando l'ejaculazione nei maschi tramite spremitura (stripping). Le uova fecondate sono filtrate attraverso la rete e poi conservate in diversi tipi di contenitore, fino a raggiungere lo stadio larvale. Le vongole sono alimentate con microalghe fino alla metamorfosi. Le vongole europee possono essere allevate in vivai con un sistema di alimentazione controllata a base di alghe unicellulari. In alternativa, possono essere allevate in contenitori a rete su tavole specifiche per la coltura. In Italia le vongole giapponesi sono perlopiù ingrassate

inizialmente su telai di legno coperti da reti di plastica sotto il livello dell'acqua. In Irlanda i vivai sono costituiti da sacchi a rete posti su cavalletti intorno alle zone di bassa marea. Le vongole sono sottoposte a un processo di selezione per garantire che tutti i molluschi abbiano dimensioni simili. L'obiettivo è quello di evitare la concorrenza per il cibo, che potrebbe rallentare la crescita delle vongole più piccole (www.ec.europa.eu).

2.10 Metodo di pesca

La raccolta delle vongole viene praticata con un'ampia varietà di sistemi e attrezzi a diverso grado di meccanizzazione ed efficienza, ed il cui uso dipende da alcune variabili quali il grado di profondità della zona pesca, il tipo di ambiente, le caratteristiche della specie bersaglio e le normative vigenti e le consuetudini locali. La pesca di *C. gallina*, per anni una delle attività meno redditizie dell'Adriatico, ha avuto un forte sviluppo a partire dagli anni 70' con l'introduzione delle draghe idrauliche (turbosoffianti), diventando una delle attività di pesca economicamente più rilevanti. Prima della diffusione delle turbosoffianti la pesca delle vongole veniva condotta con sistemi di tipo manuale rappresentati da rastrelli.

La draga idraulica è costituita da una gabbia in ferro a forma di parallelepipedo con una lama regolabile nella parte anteriore per tagliare il sedimento e un sistema per inviare acqua in pressione a ugelli posti su diverse file. La prima fila di ugelli, posta in prossimità della lama, ha una funzione di sfondamento per agevolare l'azione di pesca, mentre altre 3-4 file di ugelli poste all'interno della gabbia garantiscono una prima pulizia del prodotto pescato consentendo di allontanare buona parte del sedimento presente. La gabbia è supportata da 2 slitte e presenta generalmente una larghezza di circa 2.70 e un peso di circa 600 Kg (Frogliola, 1989). L'azione di pesca viene condotta procedendo in retromarcia dopo aver calato da prua la draga sul fondale. Al termine di ogni cala la draga viene salpata e il contenuto versato nella vasca di raccolta posta a prua e quindi selezionato tramite la linea di lavaggio e vagliatura (Pellizzato e Giorgiuti, 1997). Questo sistema di pesca, consentito in mare, è stato utilizzato abusivamente anche in laguna di

Venezia soprattutto nella prima metà degli anni 90' in corrispondenza della diffusione delle vongole filippine (Trevisan, 2011).

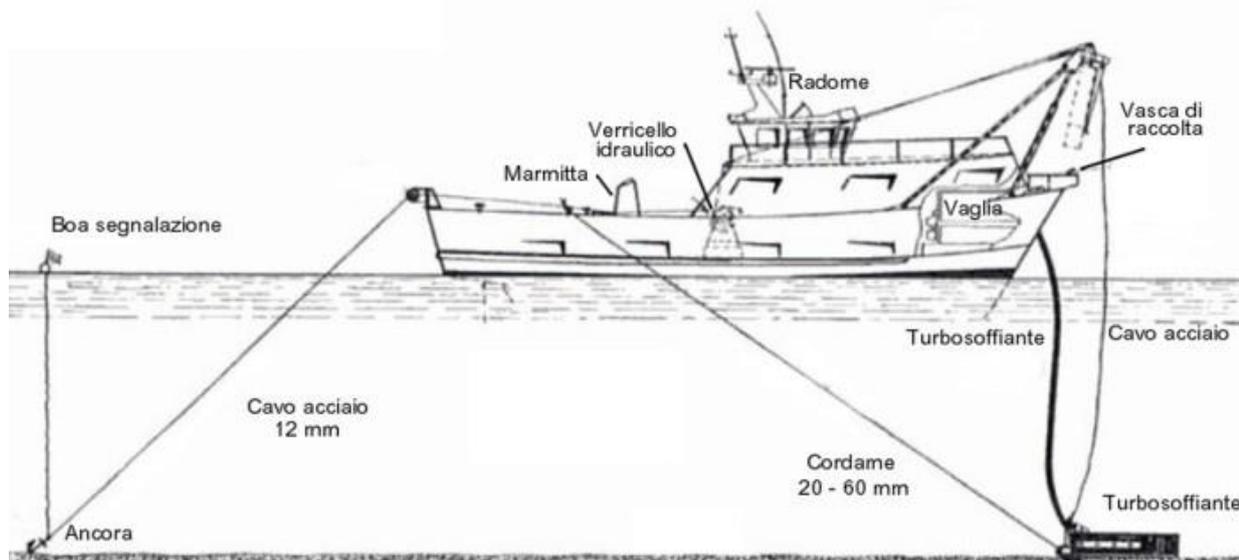


Fig. 2.3: Draga idraulica

In Italia questa è stata la prima pesca ad essere controllata attraverso le licenze, il cui numero era stato fissato a livello nazionale per mantenere la flotta e lo sforzo di pesca quasi invariato. Tuttavia, il numero delle navi autorizzate in realtà è aumentato nel corso del 1980 ed i miglioramenti tecnici sugli attrezzi da pesca hanno permesso alle imbarcazioni di spazzare maggiori aree di terra per unità di tempo. Questo spiega il motivo per cui sono state ricercate varie misure per ridurre la pressione di pesca (come il ritiro dei vasi, l'imposizione di periodi di fermo, gli spazi aperti più grandi nei setacci), e una riduzione limitata della flotta è stata perseguita alla fine del 1990, dopo il grande aumento di mortalità di questa specie registrato durante il tardo autunno-inizio estate del 1996 (Romanelli et al., 2009). Il numero di imbarcati nel 2010 è stimato in 1.480 unità, che equivale ad un equipaggio medio di 2 unità per battello. Il numero medio di giornate di pesca annue è di 85. In termini economici il contributo del segmento delle draghe idrauliche al valore della produzione lorda vendibile dell'intero settore italiano è pari al 5.7%. La produzione complessiva 2011 è stata di 21.796 tonnellate e rappresenta il 10.36% dell'intera produzione della flotta da pesca (Mipaf – IREPA). La flotta è concentrata sul litorale adriatico, con importanti poli produttivi

nelle Marche (il 31% delle draghe idrauliche operative in Italia) e in Veneto (il 23%).

2.11 Lavorazione e produzione delle vongole

Il diagramma di lavorazione e produzione delle vongole è riportato in figura 2.4.

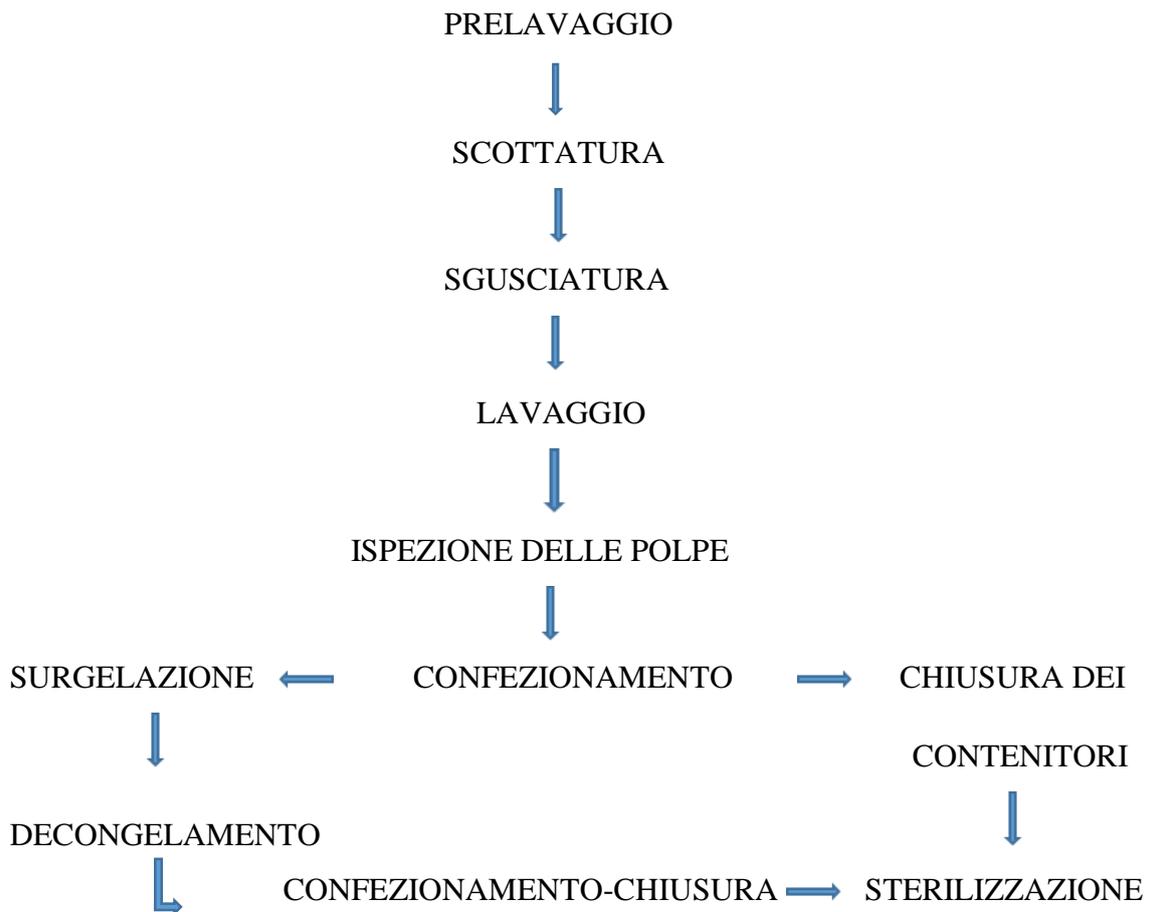


Fig. 2.4: lavorazione e pulizia delle vongole

Come si può osservare dall'immagine, la prima fase consiste nel prelavaggio, che viene effettuato con acqua mediante una lavatrice continua, alimentata da un elevatore a tazze. Essa è costituita da una vasca inferiore che funge da polmone d'acqua, da collettore e da una vasca superiore in cui ruota un cestello inclinato, in lamiera forata, che trascina i molluschi per rotolamento. Questa operazione permette la pulizia da impurità, come sabbia, alghe ed eventuali microorganismi e parassiti che si trovano all'esterno della vongola. In seguito viene effettuata, prima

della sgusciatura, una scottatura per 3 min a 90° C, per favorire l'apertura delle valve e conferire la giusta consistenza delle polpe. Questa operazione avviene in un reattore contemporaneamente alla sgusciatura. La sgusciatura consiste nella separazione della polpa dal guscio ed avviene in un reattore a tamburo rotante con fori di 15 mm. Quindi le vongole passano in questi fori sotto la pressione dell'acqua e le polpe vengono raccolte nel nastro trasportatore, mentre i gusci vengono allontanati.

Il lavaggio di questi molluschi a seguito della sgusciatura serve per eliminare eventuali resti di gusci rimasti attaccati alla polpa. Questo lavaggio avviene per flottazione in salamoia satura o in acqua, continuamente filtrata. La successiva fase di ispezione delle polpe consiste nel valutare le polpe opportunamente lavate per verificare se presentano ancora dei residui calcarei.

A seguito dell'ispezione le polpe avranno diversa utilizzazione: possono essere congelate in involucri di plastica ed essere direttamente commercializzati o venire destinate a successive trasformazioni industriali. Possono essere utilizzati per la produzione di conserve previo congelamento e sterilizzazione.

La sterilizzazione delle vongole viene effettuata con impianti rotanti o in autoclavi statiche a vapore o ad acqua. Questo per permettere una sterilità nei confronti di microorganismi (Arcangeli et al., 2003).

2.12 Valore nutrizionale

La vongola ha carni buone, apprezzate dai consumatori e conosciute fin dall'antichità. Dal punto di vista alimentare può essere classificata come alimento magro e digeribile. Infatti, 100 gr di parte edibile (carne) delle vongole fresche contengono (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise Giuseppe Caporale):

- 15.52 gr di proteine

- 1.70 gr di carboidrati

3.41 gr di grassi di cui: 31.78 % di acidi grassi saturi; 31.42% di acidi grassi monoinsaturi; 36.80% di acidi grassi polinsaturi.

Per caratteristiche nutrizionali i molluschi bivalvi sono paragonabili a carni e pesce e, nel caso di alcuni minerali, sono addirittura superiori. Il contenuto in proteine è simile a quello delle uova. Ad esempio nella cozza e nella vongola vi è abbondanza di selenio, minerale importante come antiossidante e per favorire crescita e fertilità. Buona nella vongola è la quantità di zinco, importante per la crescita e per il sistema immunitario. Inoltre le vongole sono ricche di vitamina A, la cui carenza può incidere negativamente sulla crescita e causare deformazioni ossee, degli organi riproduttivi e visivi. Nella vongola si segnala l'assenza di vitamina C la quale, tuttavia, può essere compensata con qualche goccia di limone al momento del consumo. Nei casi di ipertensione arteriosa, è bene non eccedere nel consumo dei molluschi bivalvi (<http://www.ulssvicenza.it/allegati/1039-ilmangiARBENE.pdf>).

Le vongole costituiscono un alimento ad alto valore nutritivo per quanto non siano tollerate da tutti, a causa di frequenti allergie e intossicazioni. Devono essere consumate particolarmente fresche, perché già pochi giorni dopo la loro cattura, ad una temperatura di 10-19°C, presentano un pH di 6.2-7.0 (Sebastio e Tursi, 1959), che favorisce lo sviluppo dei microrganismi responsabili della degradazione delle carni. Tenuto conto, altresì, della loro potenziale pericolosità, è sempre opportuno consumarli cotti. Anche in cucina la perdita della loro pericolosità non è mai completa per vari motivi, tra cui l'eventuale presenza di agenti termoresistenti, una cottura insufficiente, oppure una cattiva conservazione del prodotto che, anche se cotto è capace di veicolare le tossine preformatesi prima della cottura stessa. Per limitare i rischi associati a questo prodotto, il consumo allo stato crudo o cotto dei molluschi è possibile solo se questi provengono da acque "approvate" o se hanno subito un trattamento depurativo (Palese e Palese, 1992).

CAPITOLO 3

INTRODUZIONE:

QUALITA' DEI MOLLUSCHI BIVALVI

3.1 Criteri di qualità

La normativa vigente sulla qualità e salubrità dei molluschi bivalvi è diretta al controllo per l'idoneità al consumo da parte dell'uomo di questi molluschi. Sono regolamentati dalla normativa comunitaria in termini di requisiti generali della legislazione alimentare ed igiene dei prodotti alimentari dal Regolamento CE n. 178/2002 e 852/2004 ed in termini più specifici dai Regolamenti CE n. 853/2004, 854/2004, 882/2004, 2073/2005, 2074/2005 e successive rettifiche e modifiche. Tali normative prevedono che la loro raccolta avvenga solo in zone di produzione e/o stabulazione individuate in ambiti di monitoraggio geograficamente delimitati e sanitariamente classificati, secondo quanto previsto dal regolamento CE n 853/2004, come appartenenti alle classi A, B e C, tenendo conto dei criteri microbiologici definiti dal Regolamento CE n 2073/2005 e successive modifiche. Sono inoltre applicabili la legge 283/1962 (art.5), il DPR 327/80 e l'Ordinanza Ministeriale 11 ottobre 1978 nel caso di presenza di altri contaminanti non compresi fra i criteri di sicurezza stabiliti dal reg. CE 2073/2005, purché non esista contrasto con la nuova normativa comunitaria. I molluschi bivalvi vengono movimentati dalla zona di raccolta e dagli stabilimenti riconosciuti solamente se scortati, per lotto, da un documento di registrazione che contribuisce a garantire la rintracciabilità del prodotto (Berilli et al., 2008).

Il regolamento (CE) 852/2004, ha esteso il controllo igienico-sanitario degli alimenti e mangimi anche alla produzione primaria e pertanto, nell'ambito della nuova legislazione, i molluschi bivalvi vivi vengono disciplinati lungo tutta la filiera alimentare fino al consumatore finale. Per produzione primaria in relazione ai molluschi bivalvi vivi si intende: la produzione, la raccolta e le operazioni connesse che hanno luogo prima che i molluschi bivalvi arrivino ad un centro di spedizione o ad un centro di depurazione. Potranno essere immessi sul mercato per

la vendita al dettaglio, solo attraverso i centri di spedizione, al fine di garantire le operazioni di etichettatura e di controllo come previsto dal regolamento 853/04. Gli operatori che lavorano nella fase primaria di prodotti di origine animale, devono:

- adottare le misure igienico-sanitarie per tenere puliti gli impianti di raccolta e allevamento, le attrezzature di supporto alla pesca, i veicoli e le imbarcazioni;
- utilizzare l'acqua potabile e/o pulita;
- assicurare che il personale addetto alla manipolazione dei molluschi bivalvi vivi sia in buona salute e segua una formazione sui rischi sanitari;
- evitare la contaminazione da parte di animali ed altri insetti nocivi;
- prevenire la propagazione delle malattie contagiose trasmissibili all'uomo, comunicando i focolai sospetti di dette malattie alle autorità competenti;
- tenere conto dei risultati delle analisi di laboratorio;
- adottare le opportune misure correttive quando sono informati di eventuali problemi individuati nel corso dei controlli ufficiali.

Gli operatori del settore primario possono essere assistiti da altre persone, quali veterinari, agronomi e tecnici agricoli. In questo contesto è consentito considerare e prevedere l'intervento di altre figure (previste dal Reg. 852/04) tra cui biologi, tecnologi alimentari o Enti a supporto dell'attività di autocontrollo, quali i Consorzi di Gestione per il settore molluschi, le associazioni di categoria, le cooperative e i consulenti delle associazioni per il settore ittico, che potrebbero coadiuvare i produttori nella gestione della rintracciabilità e ritiro/riciamo del prodotto e nella redazione e mantenimento delle registrazioni. Le registrazioni, in particolare, devono contenere le seguenti misure per i prodotti di origine animale:

- i risultati di tutte le analisi effettuate su campioni prelevati da animali che abbiano rilevanza sulla salute umana;
- le segnalazioni dei controlli effettuati sugli animali o sui prodotti di origine animale (www.gazzettaufficiale.it).

3.2 All'interno del Regolamento 178/2002 troviamo l'EFSA

La European Food Safety Authority (Efsa) nasce alla fine del 1990 a seguito di una serie di crisi alimentari, tra cui la comparsa della malattia della mucca pazza e la minaccia costituita dalla presenza di diossina nella catena alimentare. Questi scandali hanno suscitato una certa preoccupazione ed un crescente interesse tra il pubblico in merito alla sicurezza degli alimenti. Per riconquistare e mantenere la fiducia dei consumatori, l'Unione Europea nel 2002 si è adoperata per creare un organismo scientifico in grado di valutare, comunicare e fornire consulenze in modo indipendente sui rischi associati alla catena alimentare. L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (Efsa) è, infatti, un organo completamente indipendente con l'incarico di fornire consulenza scientifica, informazione e sostegno alla Commissione Europea, al Parlamento Europeo e agli Stati membri in merito ai rischi legati alla sicurezza di alimenti e mangimi (regolamento n.178/2002). L'Efsa è stata istituita con lo scopo generale di contribuire a migliorare la sicurezza alimentare in Europa e di accrescere la fiducia del pubblico nel processo di valutazione dei rischi e, più in generale, nella capacità delle istituzioni pubbliche di proteggere appieno gli interessi dei consumatori. L'Efsa ha sede ufficiale in Italia, più precisamente a Parma.

Ai sensi del regolamento 854/2004, le zone di produzione/cattura dei molluschi bivalvi e il conseguente destino vengono così classificate:

- Zona A: i molluschi bivalvi vivi provenienti da questa zona possono essere raccolti e utilizzati per il consumo umano diretto senza necessità di depurazione o stabulazione, in quanto il basso contenuto di coliformi fecali e di *Escherichia coli* non rappresenta un rischio. Tali molluschi devono soddisfare i seguenti requisiti previsti dal Reg. 853/2004:
 - contenere meno di 300 coliformi fecali o meno di 230 *E. coli* per 100 g di polpa e di liquido intravalvare;
 - assenza di *salmonella* in 25 g di polpa;
 - non contenere sostanze tossiche o nocive di origine naturale o immesse nell'ambiente;

- tenore massimo di biotossine algali *PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)* nelle parti commestibili, ossia inferiore a 80 µg per 100 g;
- un tenore massimo di tossine *DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning)* inferiore a 160 µg/Kg di polpa o parti edibili;
- un tenore massimo di *ASP (Amnesic Shellfish Poisoning)* inferiore a 20 mg di acido domoico/g di polpa o parti edibili (http://www.unite.it/UniTE/Engine/RAServeFile.php/f/File_Prof/PENNISI_194/18_Molluschi_bivalvi.pdf).

- Zona B: i molluschi catturati in questa zona possono essere destinati al consumo umano diretto solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A. I molluschi provenienti da tali zone devono contenere meno di 6.000 coliformi fecali per 100 g di polpa e liquido intravalvare o 4.600 *E. coli* per 100 g di polpa e liquido intravalvare nel 90% dei campioni.
- Zona C: i molluschi provenienti da questa zona possono essere destinati al consumo umano diretto previa stabulazione, per un periodo non inferiore a due mesi, in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici previsti per la zona A. La stabulazione può essere associata o meno ad un processo di depurazione intensivo. I molluschi bivalvi vivi provenienti da queste zone non devono superare i livelli di 60.000 coliformi fecali per 100 g di polpa e liquido intravalvare.

La *Chamelea gallina* deve essere allevata in zone A, in quanto non subisce solitamente processi di depurazione che ne causerebbero una perdita di vitalità. Essa può avere il marchio di “Qualità controllata” se raccolta in zone di produzione classificate A rispettando i requisiti di questa categoria:

- Assenza di *Salmonella* in 25 gr di polpa o liquido intravalvare;
- Tenore di *E. coli* inferiore a 200 per 100 gr di polpa e di liquido intravalvare e meno di 5×10^5 /g CBT a 25°C;
- Tenore di biotossine algali *PSP (Paralytic Shelfish Poison)* in quantità non determinabili con metodo di legge;

- Tenore di biotossine algali *ASP (Amnesic Shelfish Poison)* in quantità inferiore a 2 µg per grammo di polpa o parte edibile con metodo di legge;
- Non dare risposta positiva per le tossine algali del tipo *DSP (Diarrethic Shelfish Poison)* secondo il test adottato con il metodo di legge prolungato a 24 ore;
- Assenza di parassiti;
- Tenore massimo di nuclidi radioattivi nei limiti previsti dalle vigenti norme sugli alimenti.

Inoltre deve presentare delle caratteristiche organolettiche ben precise:

Aspetto	Gusci integri, privi di sudiciume, di epibionti ed epifiti con reazione adeguata alla percussione. Carni lucide bianco panna che riempiono la cavità palleale. Livello normali di liquido intervalvare;
Odore	Delicato caratteristico del mollusco;
Sapore	Salso, delicato, senza retrogusti ammoniacali;
Taglia	1) Piccola da 25-30 mm 2) Grande oltre i 30 mm;
Impurità	Assenza di tracce di sabbia o di fango.

La commercializzazione del prodotto *Chamelea gallina* a qualità controllata deve avvenire entro e non oltre le 48 ore dalla raccolta. Deve essere venduta al dettaglio sempre viva e vitale. La confezione deve presentare il bollo sanitario previsto dall'articolo 8 del D. Lgs 530/92 con l'apposito marchio QC ed i riferimenti al concessionario del marchio. Deve essere conservato a temperatura idonea e la confezione (sacchetti di rete o altri imballaggi) deve contenere soltanto molluschi della specie *Chamelea gallina* (Disciplinare di produzione integrata, molluschi bivalvi, 1999).

3.2.1 Depurazione o non depurazione?

Secondo l'applicazione del D. Lgs 530/92 non esiste più la distinzione tra specie depurabili e non depurabili e non tutti i molluschi provenienti da zone di tipo B e di tipo C devono subire un processo di depurazione o stabulazione prima della loro

destinazione al consumo umano diretto. Ne consegue che alcune specie, come ad esempio *Chamelea gallina*, possono essere consumate direttamente solamente se provenienti da zone classificate di tipo A. Purtroppo le vongole, la cui pesca rappresenta l'unica fonte di reddito per molti pescatori dell'alto e medio Adriatico, per ragioni legate alla loro biologia, formano banchi sfruttabili solamente in zone marine a ridosso della costa. Questi habitat, com'è facile intuire, sono quelli più soggetti ad inquinamento antropico e quindi difficilmente classificabili come zone di tipo A. Quindi, di fatto, con la definizione delle zone di produzione da parte di tutte le Regioni si potrebbe giungere al paradosso di inibire la raccolta di molluschi sino ad ora pescati e commercializzati direttamente per il consumo umano, senza che siano mai stati segnalati significativi episodi tossinfettivi correlabili direttamente all'ingestione di animali di questa specie. Inoltre, a detta dei tecnici del settore, non è agevole trattare *Chamelea gallina* in impianti di depurazione od in zone di stabulazione senza influenzarne negativamente la vitalità e tantomeno è economicamente sostenibile una pesca il cui unico sbocco commerciale è rappresentato dall'industria di trasformazione (Giulini et al., 2000).

L'approccio migliore per la produzione di vongole sicure è quindi quello di allevarli in zone dove l'acqua non è soggetta a contaminazione fecale (aree approvate zone di classe A). La sua applicazione ha consentito lo sfruttamento a fini produttivi di aree marine in precedenza precluse alla pesca e all'allevamento per motivi igienico-sanitari. Altri pericoli da considerare durante la produzione di molluschi bivalvi sicuri sono rappresentati dai vibriani patogeni naturalmente presenti, le biotossine algali ed i contaminanti chimici come i metalli pesanti ed i prodotti chimici organici.

3.3 Confezioni e cartellini

I molluschi devono essere venduti in sacchetti a rete chiusi. Questo sia per garantire la provenienza del prodotto (se venduti "sfusi" potrebbero appartenere a partite di dubbia provenienza), sia perché se mantenuti in posizione "fissa", con gli animali aderenti gli uni agli altri, essi mantengono più a lungo le condizioni ottimali, poiché più difficilmente rilasciano il liquido intravalvare e appaiono vivi

e vitali. La confezione può presentare la superficie asciutta o bagnata, nel primo caso può essere segno di estrema freschezza, di ottimale manipolazione e conservazione degli animali, che mantengono le valve ben chiuse. Nel caso di confezione con superficie bagnata, situazione molto più frequente nella pratica, occorre valutare se la perdita di liquido intravalvare sia più o meno recente. Passando una mano sulla superficie della confezione è possibile valutare la presenza di viscosità dovuta alla perdita di liquido intravalvare, divenuto più denso per effetto della moltiplicazione batterica, infine si valuta l'odore del liquido portando il palmo della mano al naso. L'odore delle confezioni dei molluschi bivalvi deve sempre essere gradevole; la presenza di cattivi odori può essere ricondotta ad eventi esterni legati ai luoghi di cattura (mareggiate, inquinamento delle acque) o alla proliferazione batterica che si sviluppa dopo la morte dei molluschi, ma anche alla sola presenza di uno o più molluschi rotti nella manipolazione. Talvolta (consentito, ma sconsigliato), il venditore al dettaglio fraziona il contenuto della partita; in questo caso dovrà conservare per almeno sessanta giorni il bollo sanitario apposto su ogni confezione. Le partite frazionabili, tuttavia, sono quelle non confezionate per la vendita al minuto, vale a dire quelle in sacchetti da circa cinque kg o più; non è consentito, infatti, frazionare i colli per la vendita al minuto (1-2 kg). Sull'etichetta, oltre al paese speditore, alla specie con la denominazione italiana e scientifica e all'identificazione del centro di spedizione o di depurazione per mezzo del numero di riconoscimento, deve essere riportata la data di confezionamento con almeno il giorno e il mese e la data di scadenza o, in alternativa, la menzione "i molluschi bivalvi devono essere vivi al momento dell'acquisto". La menzione, però non appare sufficiente. Molte specie di molluschi, infatti, sopravvivono parecchi giorni dopo il confezionamento, non mantenendo, tuttavia, le caratteristiche minime di commestibilità. Non è quindi sufficiente che i molluschi siano vivi al momento dell'acquisto, ma devono essere assolutamente anche vitali. Per essere vitali, i molluschi bivalvi devono, ovviamente, venire conservati alle temperature ottimali. Indice di sofferenza dell'animale è la mancata chiusura delle valve: se aperte, il prodotto è morto (e quindi non commestibile) oppure debilitato. Appena pescati, i molluschi si

presentano pieni, pesanti e con le valve chiuse. In seguito, aprono e chiudono le valve, estroflettono il piede o i sifoni, ma alla minima sollecitazione meccanica si contraggono chiudendo le valve. Con il passare del tempo le reazioni divengono sempre meno pronte e la capacità di contrazione dei muscoli adduttori diminuisce, con apertura delle valve e perdita del liquido intravalvare. Quando l'animale apre i propri "gusci" rilascia il liquido intravalvare, inizia a deteriorarsi e può diventare pericoloso per la salute umana. Esso può aprire le valve perché mantenuto a temperatura troppo elevata o perché vicino alla morte. Accade spesso che il medico veterinario scopra molluschi dalle valve aperte o semiaperte; in quei casi, per verificarne la vitalità, è necessario che il sanitario percuota la conchiglia: se il mollusco possiede ancora le caratteristiche di freschezza, richiuderà immediatamente le valve, in caso contrario non sarà più commestibile. In ogni caso, se le valve risultano aperte significa che la conservazione non è corretta ed è necessario provvedere (<http://www.ulssvicenza.it/allegati/1039-ilmangiarebene.pdf>).

3.4 Rischi di natura alimentare

L'inquinamento dell'ambiente marino da parte di virus, batteri e sostanze chimiche nocive è la conseguenza di numerose fonti contaminanti e provoca una diretta alterazione degli organismi. Oltre a questa contaminazione che deriva dall'ambiente in cui vive l'animale, ve ne può essere una secondaria, che avviene una volta che il prodotto è stato raccolto, ed è dovuta alle manipolazioni, al contatto con il personale e con gli ambienti di lavorazione e stoccaggio. Nel caso delle vongole, la contaminazione primaria è quella più importante, ed è quella che determina le maggiori problematiche di ordine igienico-sanitario. Le vongole come tutti gli altri bivalvi possono essere esposte a diverse forme di contaminazione che possono essere di origine fisica, chimica e microbiologica.

I pericoli fisici possono essere per esempio causati dal sedimento che si può trovare all'interno degli animali e da corpi estranei che accidentalmente sono presenti nel prodotto al momento della raccolta o derivano nel corso delle successive fasi di lavorazione. Sabbia e fango possono essere facilmente rimossi attraverso i processi

di rifinitura, mentre la presenza di eventuali corpi estranei, in genere non rappresenta un rischio significativo, in quanto pezzi di vetro, metallo o legno risultano facilmente individuabili e rimovibili.

I pericoli chimici sono costituiti da sostanze, come per esempio metalli pesanti, idrocarburi, pesticidi e altri composti, che possono essere presenti nell'ambiente acquatico, o entrare successivamente in contatto con il prodotto. Tali sostanze (mercurio, piombo, cadmio, arsenico, ecc. e idrocarburi, soprattutto quelli policiclici) possono dare problemi sanitari in relazione alla concentrazione, in quanto si accumulano nei tessuti delle vongole, e causare nel consumatore intossicazioni croniche e gravi patologie. Erbicidi e pesticidi usati in agricoltura possono raggiungere le lagune e il mare con le foci dei fiumi o con canali agricoli di comunicazione, e rimanere nell'ambiente anche per lunghi periodi e accumularsi nella componente lipidica degli organismi viventi, per poi risultare tossici per la fauna selvatica e l'uomo. Altri fattori di rischio chimico, connessi con il consumo di molluschi bivalvi, possono essere causati dalla presenza di biotossine algali (Trevisan, 2011).

Il rischio microbiologico risulta il principale pericolo per la Salute Pubblica da consumo di molluschi e rappresenta un problema significativo anche per gli operatori del settore, causando limitazioni a livello della raccolta. Questa problematica è rilevata soprattutto nelle aree dove il trattamento delle acque reflue è inadeguato, anche se è sempre possibile un inquinamento imprevedibile e non rilevabile anche in acque di zone con adeguate pratiche igieniche: in questo caso si possono avere accumuli di patogeni in particolar modo in organismi filtranti come i molluschi, i quali si cibano delle particelle sospese nell'acqua, concentrandole in organi e tessuti.

Le cause più frequenti di malattia da consumo di molluschi derivano da virus enterici, specie patogene di *Vibrio* e batteri patogeni di origine fecale (in particolare *E. coli* e *Salmonella spp.*). Questi microrganismi si possono sviluppare da tre differenti vie: nel primo caso possono derivare dall'uomo o dagli animali, possono far parte dell'ambiente acquatico (flora patogena naturalmente presente)

o possono avere origine nell'ambiente di produzione e manipolazione dei molluschi stessi.

3.5 Tossinfezioni e intossicazioni alimentari nelle vongole

Le intossicazioni alimentari sono definite come “manifestazioni patologiche che si determinano in seguito al consumo di alimenti contenenti tossine prodotte da microrganismi, che si sono moltiplicati sull'alimento precedentemente al consumo” (Marriott N., Gravani R. B., 2008)

La tossinfezione alimentare è invece una “malattia causata da un'infezione e/o dai suoi prodotti (tossine), dovuta a microrganismi veicolati nel corpo umano da alimenti” (de Filippis, 2001).

Le intossicazioni e le tossinfezioni alimentari veicolate dalle vongole, possono avere numerose cause biologiche e non biologiche, che possono essere originate principalmente da:

- Metalli pesanti, idrocarburi clorurati e altri inquinanti ambientali che troviamo in acqua
- Tossine
- Parassiti
- Microrganismi (batteri, funghi, virus)

3.6 Biotossine algali

Le tossine algali sono sostanze organiche, con azione tossica, prodotte da microalghe uni e pluricellulari (fitoplancton). Queste “fioriture”, oltre a provocare mortalità in invertebrati e pesci, si accumulano nei filtratori in concentrazioni tali da risultare pericolose per la salute umana. I problemi causati dalle biotossine sono cresciuti negli ultimi anni, anche a causa dell'aumento del numero di alghe tossiche dovuto all'eutrofizzazione delle aree marine costiere, e alla progressiva diffusione di fitoplacton introdotto nei nostri mari, per esempio attraverso le acque di zavorra delle navi da scarico. Le vongole, al pari di altri bivalvi eduli, pur filtrando notevoli quantità di acqua per alimentarsi e quindi accumulare nei propri tessuti significative quantità di cellule algali tossiche e di tossine, risultano

coinvolte in maniera decisamente minore nella trasmissione all'uomo di queste molecole rispetto ad altri generi, quali mitili e capesante, per motivi legati alle loro preferenze alimentari (diatomee di fondo) e ambientali.

Sintomi: l'assunzione provoca un'intossicazione i cui sintomi nell'uomo sono dipendenti dalla natura delle tossine presenti e dalla quantità ingerita. Si possono manifestare sintomi neuro-motori (*PSP Paralytic Shelfish Poisoning* – sindrome paralitica da molluschi bivalvi), gastroenterici (*DSP Diarrhetic Shelfish Poisoning* – sindrome diarroica da molluschi bivalvi) e di tipo “amnesico” (*ASP Amnesic Shelfish Poisoning*).

Prevenzione e lotta: la misura di prevenzione più efficace per prevenire la commercializzazione di prodotto contaminato da biotossine è tenere sotto controllo le zone di produzione. Una corretta gestione delle zone di produzione deve tenere conto delle situazioni di allerta dichiarate dall'Autorità di controllo, dell'aumento della quantità di cellule di fitoplancton, della chiusura delle zone di allevamento limitrofe, per intensificare i controlli e programmare la raccolta in modo da fornire una migliore garanzia nei confronti della sicurezza delle produzioni (Trevisan, 2011). Bisogna ricordare che la cottura in questo caso non sempre riduce il pericolo perché la maggior parte di queste tossine risultano termoresistenti.

Tab 3.1 Principali biotossine presenti nei molluschi bivalvi

Sindrome tossica nell'uomo	Vettori	Principio attivo	Limiti max (Reg. CE 853/04)
<i>PSP</i>	Molluschi bivalvi	Saxitossina e 18 altri composti con proprietà simili	800 µg/kg
<i>ASP</i>	Molluschi bivalvi	Acido domoico e suoi isomeri	20 mg/kg di acido domoico

<i>DSP</i>	Molluschi bivalvi	Acido okadaico, dinophysio- tossine	160 µg di equivalente acido okadaico/kg
------------	----------------------	---	--

3.7 Malattie da batteri

I batteri di origine ittica, responsabili di malattia nell'uomo, possono essere suddivisi in due principali gruppi: batteri comunemente presenti nell'ambiente acquatico, quali l'*Aeromonas*, il *Clostridium botulinum*, la *Listeria Monocytogenes*, il *Plesiomonas shigelloides*, i *Vibrio* alofili (flora indigena), e batteri che originano da contaminazione antropica e/o zootecnica delle acque, quali l'*Escherichia coli*, la *Salmonella*, la *Shigella*, lo *Staphylococcus aureus* e il *Vibrio cholerae* (flora non indigena) (Giuseppe Arcangeli et al., 2003).

3.7.1 *Salmonella* spp

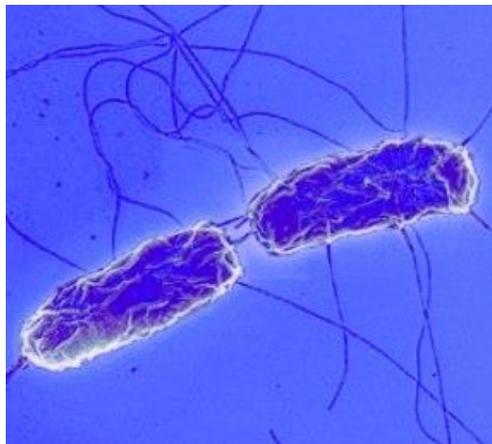


Fig. 3.1 Genere: *Salmonella*

Descrizione: Bacillo gram negativo. Le salmonelle sono patogeni noti come causa di tossinfezioni a partire da altri alimenti, quali carni (di pollo, suino e bovino) e uova. Nei prodotti ittici la presenza risale a quando si è sviluppata l'importazione da paesi terzi, dove l'igiene durante le fasi di lavorazione è abbastanza scarsa. Nel

nostro paese l'unico alimento ittico dove la ricerca di salmonella è di routine sono i bivalvi venduti vivi.

Malattia: classici sintomi di infezione gastroenterica: nausea, vomito, diarrea, febbre, prostrazione. Possibili infezioni localizzate e setticemie. La Dose Minima Infettante è in genere molto alta, anche se nei gruppi più a rischio (anziani, bambini e malati cronici), risulta in genere più bassa e con un andamento più grave.

Prevenzione: controllo delle acque di produzione (D.Lgs. 530/92) in particolare quelle in prossimità di foci di fiumi di provenienza da zone altamente urbanizzate e a vocazione zootecnica, a rischio per i bivalvi allevati. Tecnologie: cottura, pastorizzazione. Deve essere assente in 25 gr di prodotto, limite di legge previsto dal Reg. (CE) 2073/05.

3.7.2 *Escherichia coli*



Fig. 3.2 *E. coli*

Descrizione: è un microrganismo che costituisce la normale flora enterica degli animali a sangue caldo, uomo compreso. *E. coli* è stato implicato in numerosi focolai di tossinfezione alimentare in tutto il mondo, associato per lo più al consumo di alimenti crudi o poco cotti (Gourmelon et al., 2006). Per la sua associazione con il tratto alimentare degli animali a sangue caldo, è utilizzato come indicatore di contaminazione fecale. Nessuno dei ceppi di *E. coli* è tipico dell'acqua o dei prodotti della pesca, tuttavia è comune nelle acque di superficie

contaminate, dove costituisce fino al 98% della popolazione dei *coliformi fecali*. Le principali fonti di *E. coli* sono gli animali selvatici, gli effluenti delle acque luride, i sistemi di depurazione difettosi, gli scarichi di allevamenti animali, pascoli e città. Il numero di batteri fecali alla superficie delle acque aumenta dopo piogge e diminuisce a seguito della deposizione o della morte dei batteri, che dipende da vari fattori ambientali, principalmente dalla temperatura e dalla radiazione solare. Se allevati in acque contaminate, i molluschi bivalvi durante il processo di filtrazione possono accumulare gli *E. coli* nel sistema digestivo, dove però non si moltiplicano, non sono sequestrati dai tessuti e quindi sono digeriti ed eliminati con la depurazione del mollusco. Sebbene *E. coli* non sia di solito considerato un patogeno, la specie comprende ceppi enterotossinogeni (ETEC), enteropatogeni (EPEC), enteroinvasivi (EIEC), di solito associati a contaminazione fecale di origine umana, ed emorragici (EHEC), più spesso associati agli animali da reddito.

Tab 3.2 Parametri di crescita per lo sviluppo di *E. coli*

PARAMETRI	MINIMO	OTTIMALE	MASSIMO
Temperatura °C	7-8	35-40	44-46
pH	4-9	6-7	9
Aw	0.950	0.995	-

Malattia: diarrea, dolori addominali, febbre. Il sierotipo O157:H7 il più pericoloso può causare episodi di colite emorragica.

Prevenzione: trattamento delle acque di lavorazione e delle acque reflue. Come per *Shigella*, anche per *E. coli* la dose minima infettante è bassa (10 microrganismi) e quindi è essenziale evitare la presenza del microrganismo nell'alimento (Cristian Bernardi e Patrizia Cattaneo, 2010). Secondo il regolamento 2073/05, nei molluschi bivalvi *E. coli* deve essere minore 230 MPN/100 gr polpa e liquido intravalvare.

3.7.3 *Vibrio spp.*

Descrizione: I microrganismi del genere *Vibrio* sono dei bacilli Gram-negativi, alofili, molto diffusi nelle acque costiere di tutto il mondo, che possono contaminare la maggior parte delle specie ittiche. Il genere *Vibrio* comprende diverse specie patogene, tra cui: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* e *V. mimicus*. Fattori importanti per il loro sviluppo sono la temperatura dell'acqua (compresa tra 10° e 30°C) e la salinità (tra 5 e 30%). Tutti questi microrganismi possono causare malattie alimentari; la trasmissione avviene generalmente per ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi, anche se, nel caso di *V. vulnificus*, può avvenire anche per contatto con acqua di mare (Mioni et al., 2015).

Malattia: i sintomi variano in base alla specie e compaiono 10-18 ore dopo l'ingestione di alimenti contaminati, con sintomatologia prevalentemente o esclusivamente gastrointestinale, fatta eccezione per *V.o vulnificus*, che manifesta una patogenicità prevalentemente extra-intestinale, causando infezione di ferite e setticemia (Mioni et al., 2015).

Prevenzione: La cottura dei prodotti ittici e dei molluschi bivalvi a 70°C per 15 minuti assicura l'inattivazione dei *Vibrio*; altre misure preventive consistono nel conservare i prodotti ittici crudi a temperatura di refrigerazione e sanificare accuratamente utensili e superfici dopo la preparazione di cibi ittici crudi, prima di manipolare cibi cotti (Mioni et al., 2015).

Tab. 3.3 Principali caratteristiche di *Vibrio spp* a prevalente tropismo intestinale:

Organismo	Malattia	Meccanismo patogenico	Fattori e veicoli di trasmissione
<i>V. cholerae O1</i>	Colera	Tossina colerica (CT)	Ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi; altri alimenti acqua
<i>V. cholerae O139</i>	Colera	Tossina colerica (CT)	Ingestione di molluschi e prodotti ittici crudi; altri alimenti acqua
<i>V. cholerae non O1</i>	Diarrea, spesso con vomito e febbre; altre infezioni (rare)	Tossina colerica (CT); tossina termostabile (ST); altre tossine	Ingestione molluschi e prodotti ittici crudi
<i>V. mimicus</i>	Diarrea, spesso con vomito e febbre; otite esterna	Tossina termostabile (ST); altre tossine	Ingestione molluschi e prodotti ittici crudi; acque marine
<i>V. parahaemolyt.</i>	Diarrea, spesso con vomito e febbre; altre infezioni (rare)	Emolisina	Ingestione molluschi e prodotti ittici crudi
<i>V. hollisae</i>	Diarrea spesso con vomito e febbre	Enterotossina	Ingestione molluschi e prodotti ittici crudi
<i>V. fluvialis</i>	Diarrea	Enterotossina; altre tossine	Ingestione molluschi e prodotti ittici crudi
<i>V. furnissii</i>	Diarrea	Enterotossina	Ingestione molluschi e prodotti ittici crudi

(Fonte: rapp. To ISTISAN 97/31)

3.7.3.1. *Vibrio cholerae*



Fig. 3.3 Genere *Vibrio*

Descrizione: E' diffuso in tutto il mondo in acque dolci e salmastri e soltanto pochi ceppi in grado di produrre l'enterotossina del colera (Ctx) sono classificati come agenti patogeni. Il punto di partenza della malattia è sempre il tratto intestinale umano. Le feci dei portatori asintomatici o dei malati possono contaminare le acque di uso civile o reflue e provocare grandi epidemie. Particolarmente pericolosi sono gli animali marini, quali molluschi, che vivono presso gli scarichi idrici. In genere non si moltiplica negli alimenti. Dopo l'introduzione orale, i germi giungono nello stomaco, dove vengono per la maggior parte uccisi dall'acidità del succo gastrico. Per questo motivo la dose infettante necessaria per ammalarsi è relativamente elevata, ossia circa 10^6 germi. La patogenicità dei germi del colera proviene da un'enterotossina che si forma nell'intestino. Dopo al massimo 4-5 giorni di incubazione sopraggiungo i sintomi.

Malattia: diarrea colerica, enorme perdita di acqua (10 e più litri al giorno) e di elettroliti che può portare rapidamente a collasso letale.

Prevenzione e lotta: terapia appropriata che consiste nel ripristino dell'equilibrio idrico-elettrolitico e nella somministrazione di antibiotici (Kramer e Cantoni, 2011).

3.7.3.2 *Vibrio parahaemolyticus*

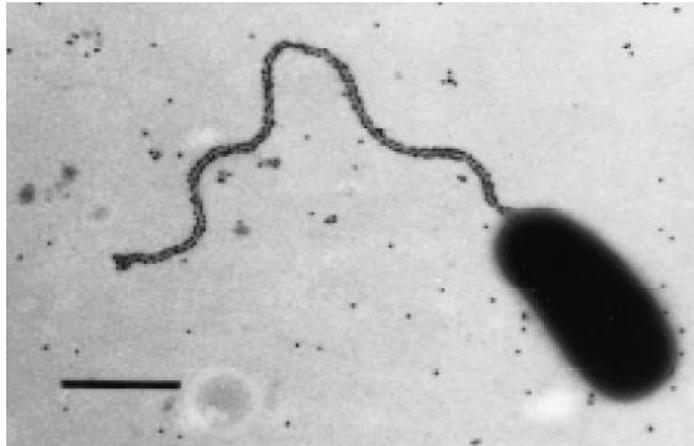


Fig. 3.4 *Vibrio parahaemolyticus*

Descrizione: I ceppi enteropatogeni di *Vibrio parahemolyticus* producono verosimilmente un'esotossina termostabile ad azione emolitica. L'infezione dell'uomo avviene, per lo più, in seguito a ingestione di animali marini crudi o insufficientemente cotti, come pesci, crostacei o molluschi. Dopo 2-48 ore dall'ingestione del cibo inizia il malessere.

Malattia: Vomito, diarrea acuta, accompagnata da dolori addominali e aumento della temperatura che comincia a placarsi, di norma, dopo 2-5 giorni (Kramer e Cantoni, 2011).

3.7.3.3 *Vibrio vulnificus*

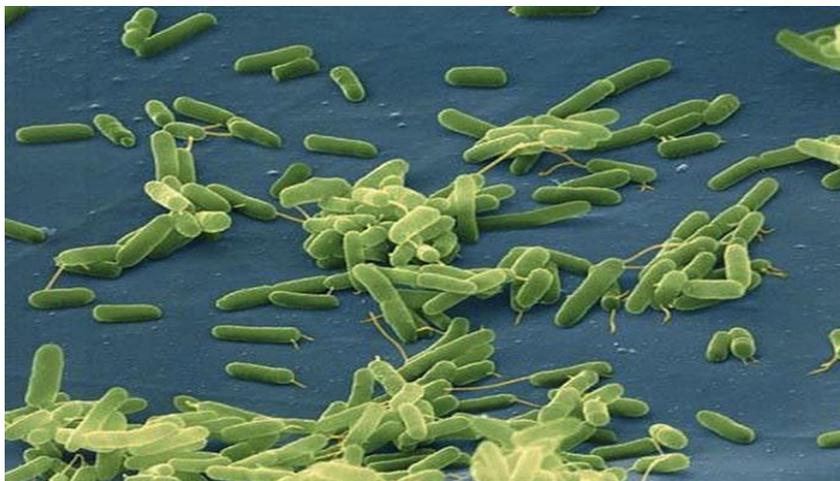


Fig. 3.5 *Vibrio vulnificus*

Descrizione: Viene ingerito per via orale, consumando animali marini crudi e molluschi. Il *Vibrio vulnificus* non è affatto presente, o solo difficilmente, in ambienti freddi come ad esempio acque costiere nei mesi invernali.

Malattia: causa per lo più setticemie primarie, più raramente vomito e diarrea. A seguito della setticemia primaria, possono verificarsi lesioni epidermiche e ulcere con necrosi profonde alle estremità.

Prevenzione-lotta: può rendersi necessaria l'amputazione del membro infetto, per salvare la vita al malato (Kramer e Cantoni, 2011).

3.7.4 *Campylobacter*

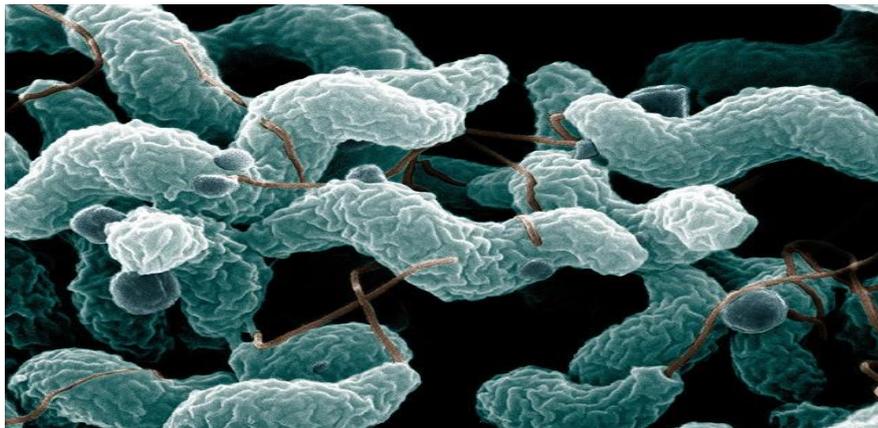


Fig. 3.6 Genere: *Campylobacter*

Descrizione: comprende specie come *C. jejuni* e *C. coli* che causano gastroenterite nell'uomo per consumo di acqua e alimenti contaminati. La malattia è una zoonosi e diverse specie animali da allevamento ne costituiscono il serbatoio. È frequentemente isolato nei molluschi bivalvi, dove sono state segnalate positività fino al 42%.

Malattia: La dose minima infettiva (MID) è inferiore a 1000 cellule. *Campylobacter* sopravvive molto più a lungo nei molluschi che nelle acque marine

aperte, dove muore rapidamente a causa della salinità. Sintomi: diarrea, dolori addominali, febbre, mal di testa, nausea e vomito.

Prevenzione: Il controllo di *Campylobacter* è ottenuto con il controllo delle acque, evitando l'immissione nelle zone di molluschicoltura di scarichi non depurati di allevamenti zootecnici. Le temperature basse ne controllano la moltiplicazione ma non ne causano la morte, mentre il trattamento termico lo inattiva rapidamente (Bernardi e Cattaneo, 2010).

3.8 Malattie da virus enterici

I molluschi bivalvi sono organismi marini in grado di concentrare, mediante filtrazione, tossine e microrganismi quali batteri virus e parassiti. In particolare i virus enterici, adsorbiti in forma aspecifica nell'epatopancreas, vi rimangono adesi anche dopo diverse ore di depurazione in acque controllate (Schawrtzbrod, 1991; Toti, 1992) (http://www.izs-sardegna.it/raz_ricerca.cfm?idric=74). Appartengono a questo gruppo più di 120 differenti specie di virus, in particolare per *epatite A*, *epatite E*, *Poliovirus*, *Norovirus*, *Coxsackievirus* e *Astrovirus* è stata dimostrata la trasmissione all'uomo a seguito di consumo di molluschi bivalvi, particolarmente suscettibili di accumulo, in quanto animali filtratori. I virus non sono in grado di moltiplicarsi nei bivalvi, ma vi si accumulano sia per una sorta di legame dovuto ad interazioni ioniche tra i radicali solfato dei mucopolisaccaridi del mollusco, sia per legami idrogeno. In ambiente marino il virus può rimanere vitale fino a 17 mesi, soprattutto in presenza di sedimento (Arcangeli et al., 2003). La presenza dei virus nei molluschi non è correlata con la presenza di batteri di origine fecale (*coliformi fecali*, *E. coli*, *Salmonella spp.*), anzi, alcuni autori dimostrano che in acque particolarmente inquinate da coliformi la presenza di virus è molto scarsa, per una sorta di azione inattivante dei batteri stessi (Goyal et al., 1979; Wait et al., 1983). Anche i tradizionali metodi di depurazione utilizzati nei bivalvi in cui la norma lo prevede, non sono sufficienti per bonificare la contaminazione virale. Ad eccezione del virus *epatite A*, gli altri enterovirus sono abbastanza termolabili (60°C per 4-6 min). Spesso però nella pratica culinaria comune ci si limita a

“scottare” il mollusco solo per il tempo necessario all’apertura delle valve e non si raggiunge una temperatura sufficiente al cuore del prodotto (Arcangeli et al., 2003).

Questi virus si possono moltiplicare solo nell’ospite umano, dove possono persistere anche per diverse settimane. Purtroppo questi agenti virali sono raramente ricercati a causa della loro difficoltà a isolarli, coltivarli e identificarli, ma i metodi disponibili sono in continuo sviluppo in modo che in futuro anche il rischio di questi patogeni sia ridotto. Intanto la prevenzione prevede che gli operatori adottino buone pratiche igieniche, tramite anche la formazione del personale e l’uso di guanti monouso, in quanto questi patogeni risultano difficilmente rimovibili tramite il lavaggio delle mani.

3.8.1 Epatite A

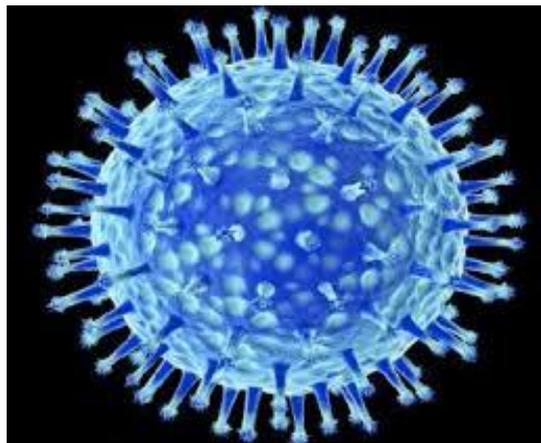


Fig. 3.7 virus dell’epatite A

Descrizione: *Picornavirus* di recente riclassificato ed ascritto al nuovo genere di *Epatovirus* (Minor, 1991). Piuttosto resistente, servono 85-90°C per un minuto al cuore del prodotto per ottenere una riduzione di 4 log (Millard et al., 1987) oppure a 100°C per due minuti (Crocì et al., 1999) e parecchi mesi di refrigerazione. Nell’uomo il virus si localizza a livello epatico e tramite i secreti biliari arriva all’intestino e quindi escreto.

Diffusione: è ubiquitario ed è presente anche nei fondali marini, in prossimità dei centri abitati densamente popolati e sprovvisti di sistemi di depurazione delle acque reflue o di scarsa efficienza depurante.

Malattia: L'incubazione della malattia è di circa un mese. Segue un'infezione di tipo sistemico, con epatite e gastroenterite. *Sintomi:* debolezza, febbre, nausea, dolori epigastrici. La gravità della malattia è correlata con l'età del soggetto, più grave nei soggetti anziani.

Prevenzione: cottura a vapore per 15 min (Cliver,1994; Arcangeli et al., 2003).

3.8.2 *Norovirus (Norwalk-like virus)*

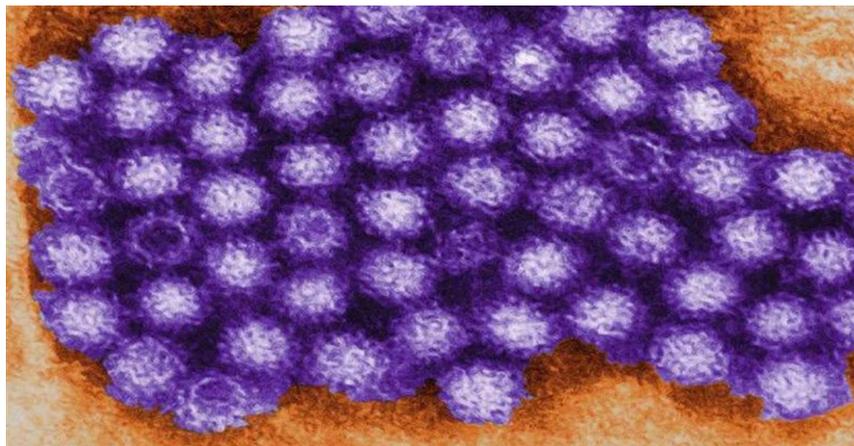


Fig. 3.8 Genere: *Norovirus*

Descrizione: Sono considerati una delle maggiori cause di gastroenteriti di origine non batterica. Appartengono alla famiglia dei Caliciviridae. Il *Norwalk virus* prende il nome dalla città di Norwalk, in Ohio, dove nel 1968 si ebbe il primo episodio di infezione nell'uomo.

Malattia: è causa di gastroenterite con vomito, diarrea, crampi addominali, cefalea, mialgia e febbre occasionale. Il periodo di incubazione varia tra 12 e 72 ore ed in genere la malattia si risolve in 48 ore.

Prevenzione: sono a rischio molluschi crudi o poco cotti (Shieh et al., 2000; Burkhardt e Calci, 2000; Arcangeli et al., 2003).

3.9 Contaminazione da metalli pesanti

E' noto che l'assunzione in dosi elevate di alcuni elementi, può originare problemi sanitari che si possono estrinsecare in casi di tossicità acuta o a lungo termine. La presenza ubiquitaria, in particolare di mercurio, piombo e cadmio, assieme al rilascio da parte di industrie e insediamenti urbani alzano i tassi di concentrazione e diffusione nella catena alimentare di questi composti chimici.

3.9.1 Piombo

I molluschi bivalvi tendono a concentrare maggiormente questo metallo. Caratterizzato da una forte affinità per i componenti tissutali, la sua tossicità si esplica nell'uomo sotto due forme: avvelenamento acuto, in cui prevalgono disturbi a carico del sistema nervoso e dell'apparato gastro-enterico, oppure avvelenamento cronico, detto anche "saturnismo", con disturbi dell'apparato scheletrico ed alterazione della crasi ematica (rapporto tra i componenti del sangue), con anemia dovuta ad interferenza del piombo sugli enzimi implicati nella sintesi dell'eme ed emolisi per danno diretto sugli eritrociti (<http://www.ulssvicenza.it/allegati/1039-ilmangiarbene.pdf>).

3.9.2 Cadmio

Il cadmio non è presente nell'organismo umano alla nascita, ma vi si accumula nel tempo fino a raggiungere la concentrazione massima verso il 50° anno di età (20-30 mg per individuo). La sua preoccupante tossicità tocca, seguendo la via di assunzione alimentare, i reni e il fegato in conseguenza della sua forte affinità per i componenti tissutali.

Sintomi: le manifestazioni più note attribuite al cadmio sono costituite da proteinuria (eliminazione di proteine con le urine), aminoaciduria, glicosuria e

diminuzione del riassorbimento tubulare dei fosfati, oltre ad alterazioni epatiche, lesioni dell'apparato riproduttivo maschile e danni a carico dell'embrione e del feto (<http://www.ulssvicenza.it/allegati/1039-ilmangiarbene.pdf>).

3.9.3 Mercurio

Il mercurio si può accumulare nei sedimenti sotto diverse forme, che permettono da una parte la sua fissazione nei sedimenti, dall'altra la formazione di composti facilmente mobilizzabili tramite correnti marine. In vicinanza delle foci dei fiumi la contaminazione da mercurio risulta più alta, decrescendo poi lungo le coste.

Sintomi: l'esposizione acuta produce manifestazioni neurologiche quali tremori ed ipereccitabilità, mentre l'intossicazione cronica si manifesta con segni a carico del sistema nervoso centrale (neurologici e psichiatrici) accompagnati da stomatite e gengivite (<http://www.ulssvicenza.it/allegati/1039-ilmangiarbene.pdf>).

Tab. 3.4 Parametri chimici previsti dal Reg. CE 1881/06:

Contaminante	Limite di legge
Piombo	1,5 mg/Kg di peso fresco
Mercurio	0,5 mg/Kg di peso fresco
Cadmio	1 mg/Kg di peso fresco

3.10 Rischi ambientali nella costa adriatica

Il bacino settentrionale è caratterizzato da consistenti input fluviali soprattutto del bacino del fiume Po che, attraversando una delle zone agricole ed industriali più produttive e urbanizzate d'Italia, trasporta in mare circa il 50% del carico totale di nutrienti. Oltre ai carichi di sostanze ad effetto eutrofizzante la conformazione della costa e la scarsa profondità del sub-bacino settentrionale hanno effetto sinergico (Rinaldi et al., 1995). E' ormai dimostrato che l'effetto "golfo" che si genera fra il delta del fiume Po e la parte più a Nord della costa emiliano-romagnola impone tempi lunghi di permanenza delle acque con conseguente formazione di intensi blooms fitoplanctonici, soprattutto nei mesi invernali,

dominati dalle diatomee. Le acque discendenti della corrente generale, che tendono a fluire verso Sud lambendo il delta, determinano sotto costa un vortice con senso orario, recluso sia dal fluire della corrente dominante che dal fronte costituito dalle acque aperte a più elevata densità. Un' altra causa al rallentamento complessivo della dinamica delle acque va attribuito alle dighe foranee del porto di Ravenna. Queste, protraendosi per 3 Km perpendicolarmente alla linea di costa, incidono sull'idrodinamica costiera con effetti riduttivi sui fattori di diluizione/dispersione. A sud del porto di Ravenna la situazione si diversifica per via della conformazione lineare della costa che tende a ridurre i tempi di permanenza dei reflui dei fiumi e degli insediamenti costieri. In linea di massima si ha una incidenza dei fenomeni che, per intensità, diffusione e permanenza evidenziano un trend tendente alla diminuzione passando da Nord a Sud e da costa verso il largo. La fascia costiera del Nord Adriatico è interessata da oltre vent'anni da processi di eutrofizzazione (abnorme sviluppo di microalghe) che si manifestano frequentemente. La conseguente formazione di condizioni ipossiche/atossiche negli strati profondi, soprattutto nei periodi estivi e autunnali generano impatti negativi, oltre che sugli equilibri ambientali dell'ecosistema bentonico, anche sul settore produttivo della pesca. Il Mare Adriatico è esposto a possibili apporti di inquinanti sia organici che inorganici trasportati dai corsi d'acqua che attraversano zone industriali o aree interessate da attività agricole e zootecniche intensive. Lo sviluppo industriale rivierasco di siti come Porto Marghera o Ravenna è all'origine di un significativo inquinamento delle acque costiere limitrofe. L'attività industriale contribuisce alla contaminazione delle acque marine anche attraverso le emissioni atmosferiche delle grandi concentrazioni produttive del Nord Italia e dell'Europa centrale nonché attraverso lo scarico diretto al largo effettuato da imbarcazioni commerciali e navi cisterna (Cubadda et al., 1998). A questi apporti vanno aggiunti quelli derivanti dagli scarichi di alcuni insediamenti urbani piccoli e grandi. Non si possono trascurare gli effetti locali prodotti da anomalie geochimiche. Questo mare, costretto in un bacino quasi chiuso e con bassi fondali, accoglie il 32% dell'input complessivo di mercurio nel Mediterraneo e totalizza il 30% del carico

di piombo presente nell'area, oltre al 16% di quello di pesticidi organoclorurati (<http://www.arpa.emr.it/cms3/documenti/daphne/download/bioaccumulo.pdf>).

3.10.1 Effetti delle condizioni costiere sulla vongola adriatica

Sebbene la vongola adriatica *Chamelea gallina* sia ben adattata alle condizioni ambientali delle coste italiane dell'adriatico centrale e settentrionale, sono diversi i fattori ambientali che possono influenzare le sue dinamiche di popolazione e gli eventi in grado di determinare morie con effetti pluriennali sugli stock (Moschino e Marin, 2006; Romanelli et al., 2009).

I fattori che maggiormente incidono sulla sopravvivenza di questa specie sono la carenza protratta di ossigeno disciolto nelle acque (Monari et al., 2005; Matozzo et al., 2005), la riduzione di salinità (Matozzo et al., 2007; Monari et al., 2007b) e il riscaldamento delle acque costiere (Moschino e Marin, 2006; Monari et al., 2007a). I tassi di crescita della vongola adriatica sono fortemente condizionati dalla disponibilità di fitoplancton, su cui si basa la sua dieta. A sua volta la biomassa fitoplantonica è fortemente condizionata dagli andamenti stagionali e, soprattutto, dagli apporti di acque dolci e di nutrienti da parte dei fiumi (Romanelli et al., 2009). L'apporto di nutrienti in mare è stato fortemente ridotto negli ultimi vent'anni a causa delle minori portate del fiume Po, della maggiore diffusione degli impianti di depurazione delle acque reflue e del divieto di utilizzare fosforo nei detersivi. Questo ha ridotto l'eutrofizzazione dell'Adriatico, in particolare quello settentrionale (Trevisan, 2011).

3.11 Alterazioni del pescato

La rapida alterazione del pescato è facilmente comprensibile, se si tiene conto di una serie di condizioni: le varie modalità di pesca, lo stress e i danni meccanici provocati dalla cattura, la struttura e la composizione del prodotto, la velocità dei cambiamenti biochimici che si verificano in essi dopo la morte, la pressoché inesistente diminuzione del pH tessutale, le temperature di conservazione prima della vendita. Come per le carni degli animali terrestri, l'alterazione di quella degli

animali marini si verifica tramite gli effetti di reazioni chimiche, di attività continue di enzimi endogeni, e per mezzo dell'attività di batteri in crescita.

Poiché gli animali acquatici sono poichilotermi, la popolazione batterica che li attacca è adattata ad agire a basse temperature. Di conseguenza, l'effetto della refrigerazione sugli agenti alteranti ha un effetto inferiore rispetto a quello che si verifica per la carne rossa e il pollame, perché per questi alimenti la popolazione batterica contaminante non è adattata a crescere a basse temperature.

La fase iniziale dell'alterazione dei prodotti ittici è caratterizzata dalla perdita dell'odore caratteristico a causa della degradazione autolitica, mentre la fase successiva è contraddistinta dal rammollimento della carne e dalla formazione di composti volatili di odore sgradevole prodotti dai microrganismi.

In genere la velocità alla quale si verificano l'alterazione autolitica e quella batterica dipendono dalla concentrazione batterica, dalla temperatura di conservazione e dal confezionamento (Kramer e Cantoni, 2011).

3.11.1 Il processo di alterazione batterica di prodotti ittici

I meccanismi regolatori di pesci, molluschi e crostacei che impediscono l'invasione dei tessuti da parte dei batteri cessano di funzionare dopo la morte. I batteri, quindi, invadono il tessuto muscolare e penetrano nelle cavità addominale e ventrale. I composti con basso peso molecolare e le proteine solubili liberati dai tessuti durante i processi autolitici dopo la morte forniscono ricchi nutrienti per lo sviluppo microbico.

I fattori influenzanti la crescita della contaminazione batterica includono la specie e la dimensione del prodotto ittico, il metodo di cattura, le manipolazioni a bordo, lo stato igienico dell'imbarcazione e dei contenitori, le lavorazioni e le condizioni di conservazione.

I prodotti ittici sono soggetti a una rapida contaminazione batterica, se le manipolazioni e la conservazione sono inadeguate. È stato stimato che circa il 10% del pescato vada perduto a causa dell'alterazione batterica (Kramer e Cantoni, 2011).

CAPITOLO 4

OBIETTIVI

La specie *Chamelea gallina*, comunemente definita vongola lupino, è un mollusco presente nell'area mediterranea e nel Mar Nero, prevalentemente in fondali marini sabbiosi di bassa profondità (Moschino e Marin, 2006). Essa è particolarmente diffusa nelle acque litoranee di Italia, Spagna, Turchia e Marocco. In Italia, la pesca di questo mollusco riveste un ruolo economico fondamentale per le zone del medio e alto Adriatico, nelle quali è significativamente aumentata negli ultimi decenni con l'introduzione di draghe idrauliche (Morello et al., 2005; Moschino e Marin, 2006). Tuttavia l'uso metodi di pesca spesso non controllati, insieme ad eventi meteorologici eccezionali, hanno determinato un drastico calo dei molluschi bivalvi presenti nel Mare Adriatico (Moschino e Marin, 2006).

Il crescente interesse verso questo mollusco è dovuto alle sue caratteristiche nutrizionali: esso, infatti, è caratterizzato da un basso contenuto di grassi e colesterolo, dalla presenza di fitosteroli e da un'alta percentuale di acidi grassi polinsaturi (Orban et al., 2006).

I molluschi bivalvi, in virtù della loro attività filtrante, possono accumulare e concentrare dalle acque marine numerosi microrganismi, anche patogeni (Cook, 1991). La microflora acquatica e la capacità filtrante di *C. gallina* sono influenzate da diversi fattori stagionali, climatici e antropici. Temperature al di sotto dei 10°C o superiori a 30°C causano, infatti, una significativa riduzione della sua capacità filtrante e delle attività metaboliche (Ramon e Richardson, 1992).

In Italia, la produzione, raccolta e commercializzazione dei molluschi bivalvi è regolata da normative comunitarie. In particolare si fa riferimento ai Regolamenti CE n. 178/2002 e 852/2004 per le norme generali in materia di igiene dei prodotti alimentari, mentre per i requisiti specifici si fa riferimento ai Regolamenti CE n. 853/2004, 854/2004, 882/2004, 2073/2005 e 2074/2000. Tali normative definiscono la classificazione delle acque nelle quali questi molluschi possono essere raccolti (A, B, e C) e i requisiti necessari per la commercializzazione. I

molluschi bivalvi vivi derivanti da acque di classe A possono essere consumati senza nessun trattamento preventivo e devono rispettare i seguenti requisiti: assenza di *Salmonella* in 25 g di polpa, coliformi fecali < 300 MPN/100 g di polpa e di liquido intravalvare, *Escherichia coli* < 230 MPN/100 g di polpa e di liquido intravalvare.

C. gallina si trova generalmente in banchi naturali posizionati in zone classificate come acque di classe A, per cui viene commercializzata senza nessun trattamento di depurazione. Tuttavia è stato riportato che spesso campioni commerciali non rispondono ai requisiti microbiologici definiti dalla normativa comunitaria (Gardini et al., 2000).

Le acque costiere del medio e alto Adriatico, ricche di materiali derivanti da estuari di fiumi, rappresentano l'habitat ottimale per le vongole, ma contengono spesso residui di scarti urbani ed industriali e/o inquinanti derivanti da correnti, maree, piogge, ecc... Questo ovviamente influenza la qualità microbiologica delle acque e, di conseguenza, delle vongole. I coliformi, considerati per lungo tempo indicatori della qualità delle acque, sono stati sostituiti negli ultimi decenni da parametri più appropriati, quali coliformi fecali ed *Escherichia coli*, anche se l'uso di questi microrganismi come target ha comunque incontrato diverse critiche (Kator e Rhodes, 1991). Tuttavia, la presenza di coliformi fecali o *E. coli* nei prodotti della pesca è ancora considerata un indicatore importante della loro qualità e sicurezza. Infatti questi microrganismi possono essere correlati con la presenza di batteri patogeni (in particolare *Salmonella* spp.), anche se molti autori non hanno rilevato una correlazione evidente tra questi indicatori ed eventuali patogeni (Martinez-Manzanares et al., 1991, 1992).

Sulla base di queste considerazioni, lo scopo di questo elaborato è stato individuare una possibile correlazione tra le condizioni ambientali e la presenza di *Escherichia coli* in vongole lupino. In particolare, i dati relativi a campioni di vongole lupino raccolti nel periodo 2008-2015 nella zona compresa tra Cervia e Fano sono stati messi in relazione con alcuni parametri quali salinità dell'acqua, temperatura, ossigeno di fondo e superficiale, pH e livello del fiume Marecchia. Sono stati presi in considerazione oltre 350 campioni, in cui i risultati ottenuti per *E. coli* sono stati

suddivisi in tre categorie, precisamente: i) cariche basse (inferiori a 50 MPN/100g); ii) cariche intermedie (50-230 MPN/100g) e iii) cariche alte (> 230 MPN/100g). L'eventuale significatività della relazione tra carica microbica e le variabili ambientali prese in considerazione è stata valutata attraverso il test chi-quadrato.

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1 Raccolta dei campioni

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati i risultati analitici relativi a 387 campioni di vongole lupino (*Chamelea gallina* L.), provenienti dalle aree costiere della zona compresa tra Cervia e Fano, prelevati dalle Autorità Competenti negli anni 2008-2015 e conferiti al laboratorio dell'azienda MARE.A srl per il controllo chimico e microbiologico dei molluschi bivalvi vivi per la ricerca di *E.coli*. I campioni sono stati analizzati con il metodo MPN come previsto dalla ISO 16649-3, in cui la presenza di *E. coli* per i prodotti immessi sul mercato nel periodo di conservabilità, non deve superare i 230 MPN su 100g di polpa e liquido intravalvare (Barchiesi et al., 2010).

5.2. Metodo MPN per la determinazione di *Escherichia coli*

La tecnica di conteggio MPN "Most probable number" o tecnica di conteggio con tubi multipli, è una procedura di numerazione utilizzata per stimare la densità di una popolazione di microrganismi vitali in un dato campione. Si tratta di un metodo statistico basato sulla probabilità di rilevare lo sviluppo microbico dopo coltura in tubi multipli di substrato liquido di diluizioni seriali del campione. Lo sviluppo microbico dopo incubazione dei brodi inoculati può essere valutato osservando eventuale intorbidamento della coltura oppure valutando particolari attività metaboliche del microrganismo o della popolazione microbica da numerare (produzione di gas, di acidi ecc.). La tecnica è utilizzata in associazione con una tavola statistica definita dalla ISO 7218/2007 che fornisce il valore del numero più probabile di microrganismi per varie combinazioni di tubi positivi. A questi si assegna il valore 1 mentre a quelli negativi si assegna valore 0, dopodiché si sommano i valori ottenuti per ogni gruppo di 5 tubi alla stessa diluizione e si confrontano con la tavola. Il campione dovrebbe essere diluito in maniera tale che

le diluizioni più spinte non presentino microrganismi (<http://wpage.unina.it/villani/eLAB6.html>).

Nel metodo MPN applicato per la determinazione di *E. coli*, il campione viene preparato prelevando 10g di campione tal quale, in questo caso di polpa delle vongole lupino e diluendolo con 90 ml di APS (Acqua Peptonata Tamponata). I molluschi devono essere vivi al momento dell'analisi e il campione per essere rappresentativo deve essere costituito da una massa compresa tra 75 e 100g di polpa intravalvare. Devono essere aperti sterilmente e posti all'interno di un sacchetto senza retina. Il tutto viene omogeneizzato nello Stomacher per 120 secondi.

Si preparano 3 file di provette a diversa concentrazione sia del terreno che del campione:

- 1) Nella prima serie si prendono cinque provette da 10 mL di terreno Glutamate broth modified a doppia concentrazione e, usando una pipetta sterile da 10mL, si trasferisce la sospensione iniziale nelle provette con diluizione 1:1 (10mL di terreno e 10mL di sospensione contenente il campione).
- 2) Nella seconda serie si prendono altre cinque provette da 10 mL contenente Glutamate broth modified a singola concentrazione e usando una pipetta sterile da 1mL, si trasferisce la sospensione iniziale in diluizione 10:1.
- 3) Infine nell'ultima serie si prendono altre cinque provette da 10mL contenente Glutamate broth modified a singola concentrazione e usando una pipetta sterile da 1mL, si trasferisce 1mL di sospensione diluita, costituita quindi da 9mL di Acqua Peptonata Tamponata e 1mL di sospensione iniziale.

Una volta terminato l'inoculo di tutte le provette sia a singola che doppia concentrazione, queste vengono incubate a 37 °C per 24 ore. In seguito al periodo di incubazione le provette vengono esaminate per la produzione di acido, che è indicata dal viraggio di colore del terreno da viola a giallo. Se le provette risultano positive si effettua un'analisi di conferma su terreno Tryptone Bile X Glucuronide Agar (TBX). Si preleva quindi dalle provette risultate positive un'aliquota di campione con un'ansa sterile e si effettua una semina in triplo striscio su una piastra petri con il terreno TBX. Le piastre vengono incubate a 44 °C per 24 ore

circa. Le piastre vengono quindi esaminate per la presenza o meno di colonie di *E. coli* β -glucuronidasi positive. Le colonie sviluppate presentano colore blu-verde come in figura 5.1.

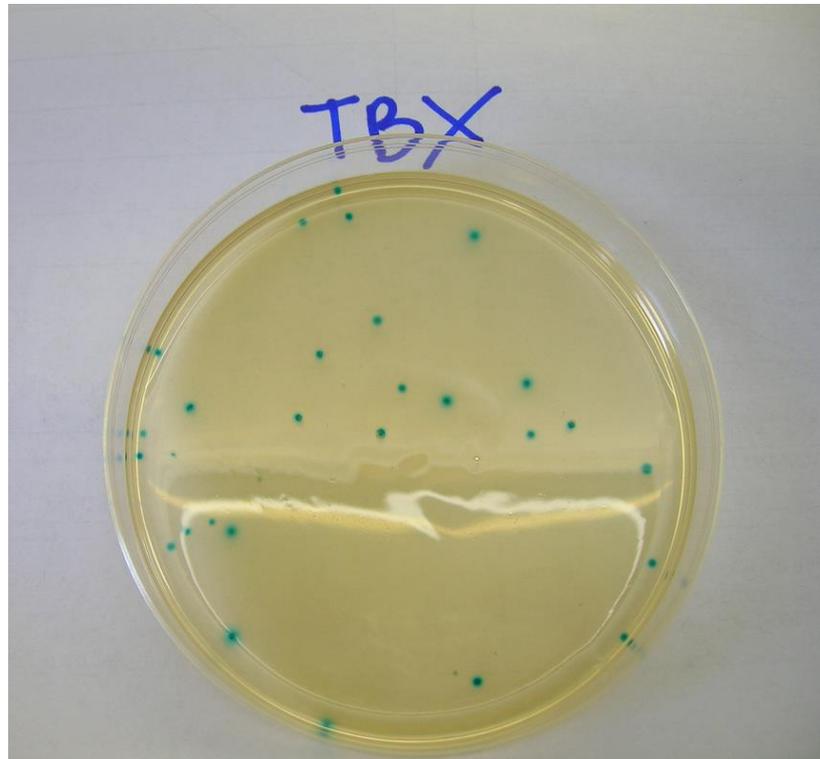


Fig. 5.1 Colonie *E. coli* positivi

5.3 Valutazione dei parametri ambientali

I parametri presi in considerazione per valutare l'influenza ambientale sull'incidenza di *E. coli* in vongole *Chamelea gallina*, raccolte nelle zone Cervia-Fano, sono:

- 1) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
- 2) Salinità (psu: abbreviazione di Practical Salinity Unit, unità di misura standard ottenuta misurando la conducibilità, che è espressa come n° di grammi di sali disciolti per Kg di acqua)
- 3) Ossigeno fondo (mg/L)
- 4) pH
- 5) Livello Marecchia (m)

Questi parametri sono stati tutti, ad eccezione del livello del Marecchia, rilevati dalla struttura Ocean. Daphne, che utilizza 14 stazioni poste a 500 m di distanza dalla riva. I parametri vengono utilizzati per la stesura del bollettino. I dati vengono mediati per 3 sub-aree denominate A, B e C. Tale suddivisione non è artificiale, ma scaturisce dall'individuazione nella fascia costiera (nel corso di 20 anni di elaborazioni dati) di tre zone omogenee che si diversificano tra loro per condizioni chimico-fisiche

(http://www.arpae.it/archivio_bollettini.asp?cerca=si&idlivello=534&pag=14).

I bollettini utilizzati per la valutazione statistica sono 253, comprendenti gli anni che vanno dal 2008 al 2015. In particolari sono stati considerati i dati relativi alla zona C, che comprende il tratto di costa da cui erano stati prelevati i campioni di vongole lupino.

Variabili	Zone		
	Media zone A	Media zone B	Media zone C
Temperatura °C	8,81	7,63	7,42
Salinità psu	34,78	33,54	33,88
Ossigeno di superficie mg/L	8,65	8,84	9,01
Ossigeno fondo mg/L	6,93	8,36	8,8
pH	8,35	8,41	8,33
Trasparenza m.	4,92	5,28	4,18
Clorofilla "a" µg/L	2,42	2,3	1,8

Fig. 5.2 Esempio di bollettino

5.4 Analisi statistica

Per valutare la presenza di una eventuale correlazione tra i parametri ambientali sopra citati e l'incidenza di *E. coli* nei campioni di vongole lupino sono stati utilizzati due tipi di analisi statistiche. In entrambi i casi è stato utilizzato il software R (R Development Core Team, Vienna, Austria).

5.4.1 Test Chi quadrato

Il test chi quadrato di Pearson è una tecnica di statistica inferenziale che permette di testare l'ipotesi nulla di indipendenza tra due variabili nominali. La statistica test su cui si basa tale metodo confronta le frequenze osservate con quelle attese

sotto l'ipotesi di indipendenza. Valori elevati di tale statistica evidenziano la presenza di relazione tra le due variabili; la soglia di significatività statistica è determinata attraverso la distribuzione chi quadrato avente $(r-1)(c-1)$ gradi di libertà, dove r e c sono il numero di modalità delle variabili considerate. Quindi, valori del p-value inferiori al livello di confidenza scelto $\alpha=0.05$ portano al rigetto dell'ipotesi nulla di indipendenza.

Per una corretta convergenza della distribuzione della statistica test alla distribuzione chi quadrato è necessario che la frequenza attesa per ogni cella della tabella a doppia entrata sia superiore a 5. Dato che nei dati analizzati tale requisito non è soddisfatto, si è dovuto ricorrere al calcolo del p-value attraverso simulazioni. Questa procedura è stata compiuta attraverso la funzione di R `chisq.test`, con l'opzione `simulate.p.value=T`.

5.4.2 Test Kruskal-Wallis

Per quanto riguarda l'analisi della varianza, ovvero il confronto dei valori di una variabile numerica in diversi gruppi, determinati da una variabile nominale, si è scelto di utilizzare il test non parametrico di Kruskal-Wallis. Infatti, l'uso delle più diffuse tecniche parametriche richiede una serie di assunzioni non soddisfatte dai dati analizzati in questo lavoro. Il test di Kruskal-Wallis è un metodo non parametrico per verificare l'uguaglianza delle mediane di diversi gruppi; cioè per verificare che tali gruppi provengano da una stessa popolazione (o da popolazioni con uguale mediana).

Questo test confronta le mediane dei diversi gruppi: il valore della statistica test è confrontato con una distribuzione chi quadrato e valori inferiori a 0.05 indicano che è almeno presente una differenza significativa tra due mediane. Per la successiva analisi delle singole differenze tra gruppi, sono stati effettuati i confronti aggiustando i p-values ottenuti per permettere i confronti multipli attraverso la correzione di Holmes-Bonferroni.

Tale procedura è stata effettuata in R con la funzione `kruskal`.

CAPITOLO 6

RISULTATI

In Tabella 6.1 sono riportati i dati relativi ai conteggi di *E. coli*, espressi come MPN/100g di polpa e di liquido intravalvare. I valori sono raggruppati per anno e, all'interno di ogni anno, per stagioni. I conteggi *E. coli* sono poi a loro volta suddivisi a livello di carica (bassa/media/alta).

Tab. 6.1. Conteggi di *E. coli* (espressi come MPN/100g di polpa e di liquido intravalvare) in campioni di vongole lupino nel periodo 2008-2015.

Anno	0→50 MPN	50→230 MPN	>230 MPN	TOTALE
2008				
Primavera	19	2	0	21
Estate	22	4	0	26
Autunno	17	4	1	22
Inverno	13	9	0	22
TOTALE	71	19	1	91
2009				
Primavera	9	0	0	9
Estate	9	4	0	13
Autunno	11	9	0	20
Inverno	10	4	0	14
TOTALE	39	17	0	56
2010				
Primavera	11	2	0	13
Estate	9	6	1	16
Autunno	5	5	5	15
Inverno	6	6	2	14
TOTALE	31	19	8	58
2011				
Primavera	5	2	0	7

Estate	5	0	1	6
Autunno	5	2	0	7
Inverno	3	1	0	4
TOTALE	18	5	1	24
2012				
Primavera	11	6	1	18
Estate	12	4	0	16
Autunno	5	8	2	15
Inverno	4	6	1	11
TOTALE	32	24	4	60
2013				
Primavera	2	3	0	5
Estate	3	3	0	6
Autunno	3	3	2	8
Inverno	6	4	0	10
TOTALE	14	13	2	29
2014				
Primavera	6	1	0	7
Estate	11	0	0	11
Autunno	8	3	1	12
Inverno	5	0	1	6
TOTALE	30	4	2	36
2015				
Primavera	8	1	0	9
Estate	6	1	1	8
Autunno	4	2	1	7
Inverno	8	1	0	9
TOTALE	26	5	2	33
TOTALE	261	106	20	387
COMPLESSIVO				

Occorre ricordare che i campioni caratterizzati da una carica “alta”, cioè non conformi ai requisiti richiesti dalla legislazione (Reg. CE n. 2073/2005), costituiscono un numero estremamente esiguo. Infatti si tratta di 20 campioni, pari

al 5.2% del totale dei campioni considerati negli 8 anni di prelievi. La maggior parte di questi campioni sono stati riscontrati nell'anno 2010, ed in particolare nell'autunno. Complessivamente, la categoria più numerosa è rappresentata dai campioni con una bassa carica (<50 MPN/100g di polpa e di liquido intravalvare), che sono il 67.4% del totale.

Contestualmente a questi dati, sono stati presi in considerazione anche alcuni parametri ambientali che potrebbero avere un'influenza sulla contaminazione microbica delle vongole lupino. Per tali valutazioni sono stati considerati i bollettini pubblicati dalla motonave Daphne relativi alla zona C (tratto di costa tra Cervia e Fano), che sono reperibili sul sito di Arpae Emilia Romagna (http://www.arpae.it/archivio_bollettini.asp?idlivello=534).

In primo luogo è stata considerata la temperatura dell'acqua, i cui risultati sono mostrati in Figura 6.1.

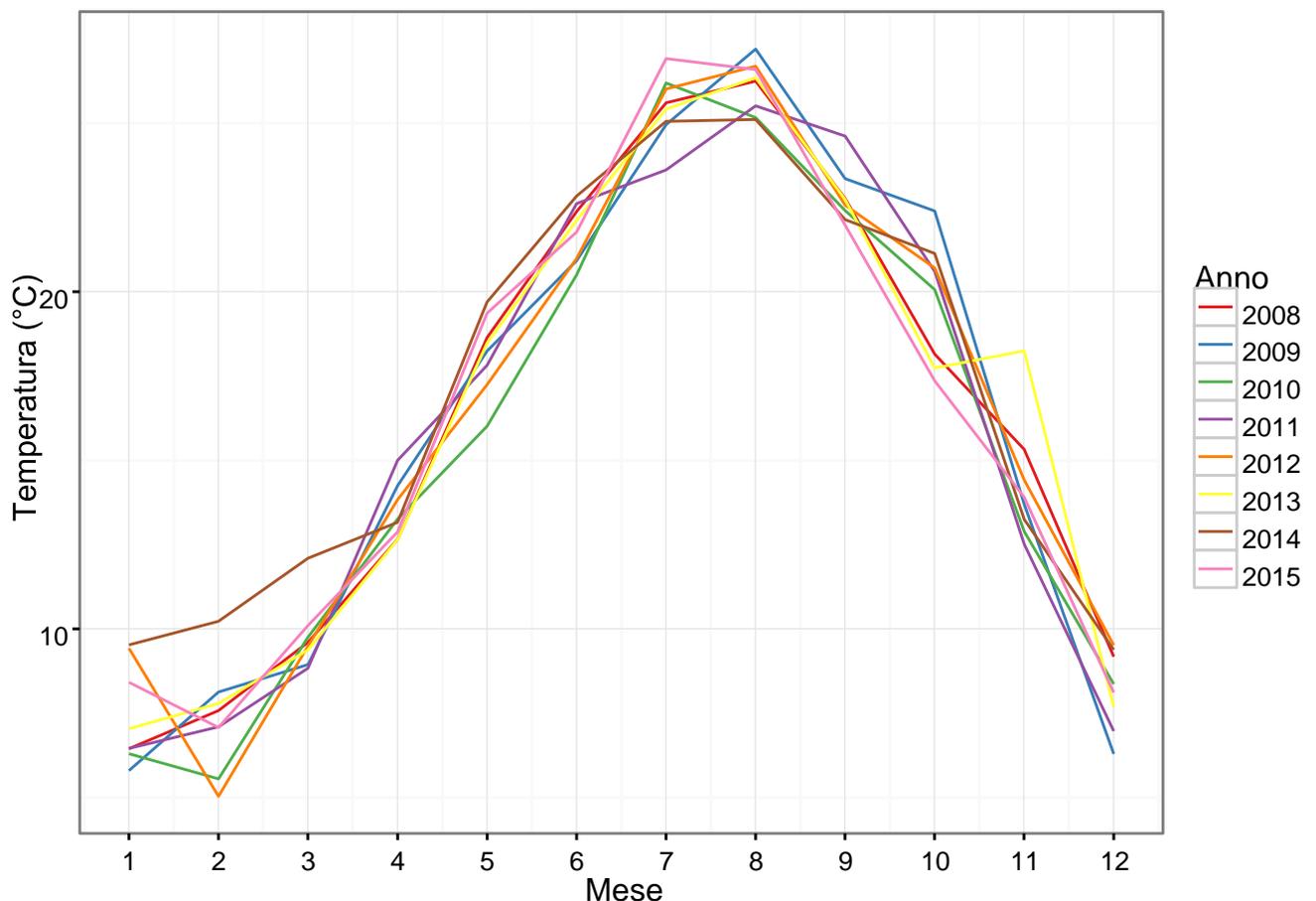


Fig. 6.1 Temperatura dell'acqua nel periodo 2008-2015

Come si può osservare, i valori sono abbastanza omogenei tra i diversi anni, ad eccezione di alcuni campioni invernali, fra cui spiccano le temperature relativamente alte delle acque nei primi mesi dell'anno 2014.

La stessa fonte è stata utilizzata per monitorare il pH dell'acqua marina che, come mostrato in Figura 6.2, si muove in un intervallo tra 8.0 e 8.8. Anche in questo caso in generale i dati sono abbastanza omogenei, ma al loro interno spicca il dato del 2011, in cui i valori di pH sono maggiori nei mesi di aprile e dicembre. Per contro, i valori mediamente più bassi sono riferibili al 2008-2009.

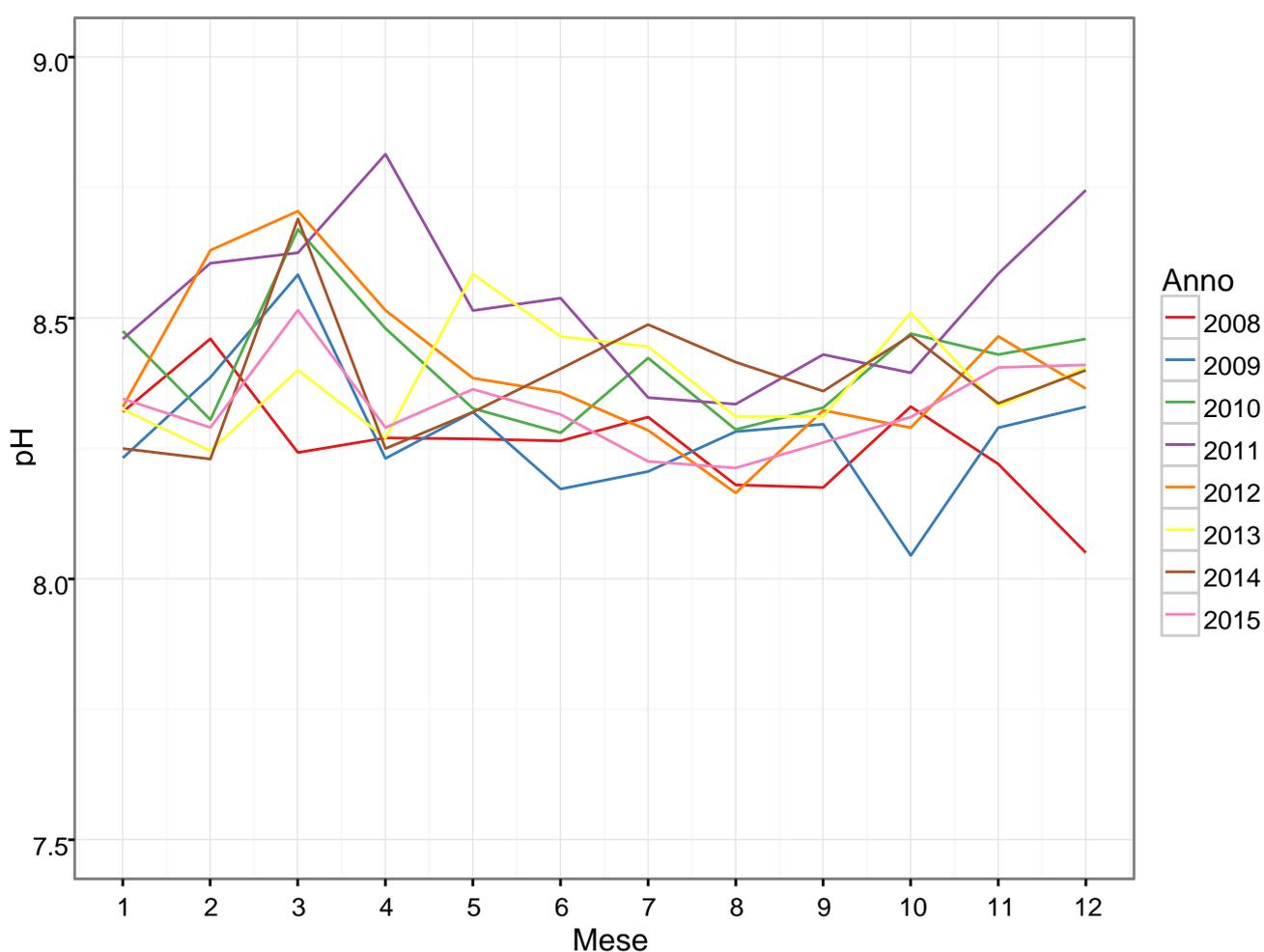


Fig. 6.2 Evoluzione del pH nel periodo 2008-2015

La salinità (Figura 6.3) mostra, come atteso, valori mediamente più elevati da giugno a settembre compresi tra 29 e 35 psu (abbreviazione di Practical Salinity Unit unità di misura standard ottenuta misurando la conducibilità ed è espressa come n° di grammi di sali disciolti per Kg di acqua), mentre le punte più basse si

ottengono in corrispondenza dei mesi più piovosi, ed in particolare a marzo, ottobre e novembre. L'andamento è abbastanza simile per tutte le annate prese in considerazione. L'unico anno che mostra dati che in qualche maniera diversi è il 2013, in cui il picco minimo di salinità nei primi mesi dell'anno si presenta a maggio anziché a febbraio/marzo ed il picco minimo autunnale si presenta ad ottobre anziché novembre, ad indicare per quell'anno un andamento presumibilmente diverso delle portate dei fiumi. L'anno 2008 è quello che è caratterizzato da una maggiore omogeneità dei valori di salinità.

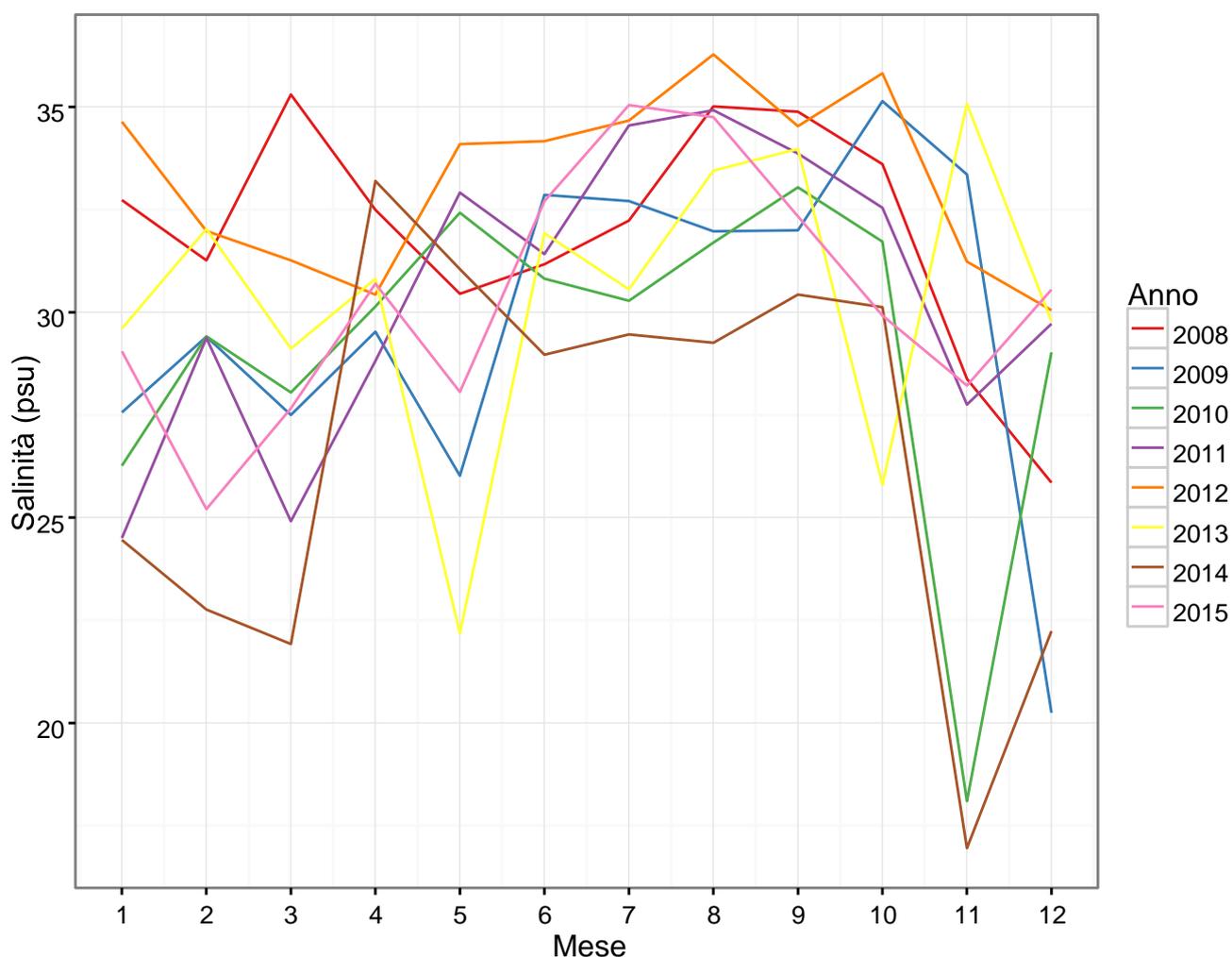


Fig. 6.3 Valori della salinità nel periodo 2008-2015

I valori di concentrazioni di ossigeno (mg/l) rilevati sul fondo sono riportati in Figura 6.4. In questo caso i valori sono abbastanza omogenei con valori minimi osservati tra giugno e ottobre e i picchi massimi collocati tra dicembre e febbraio/marzo.

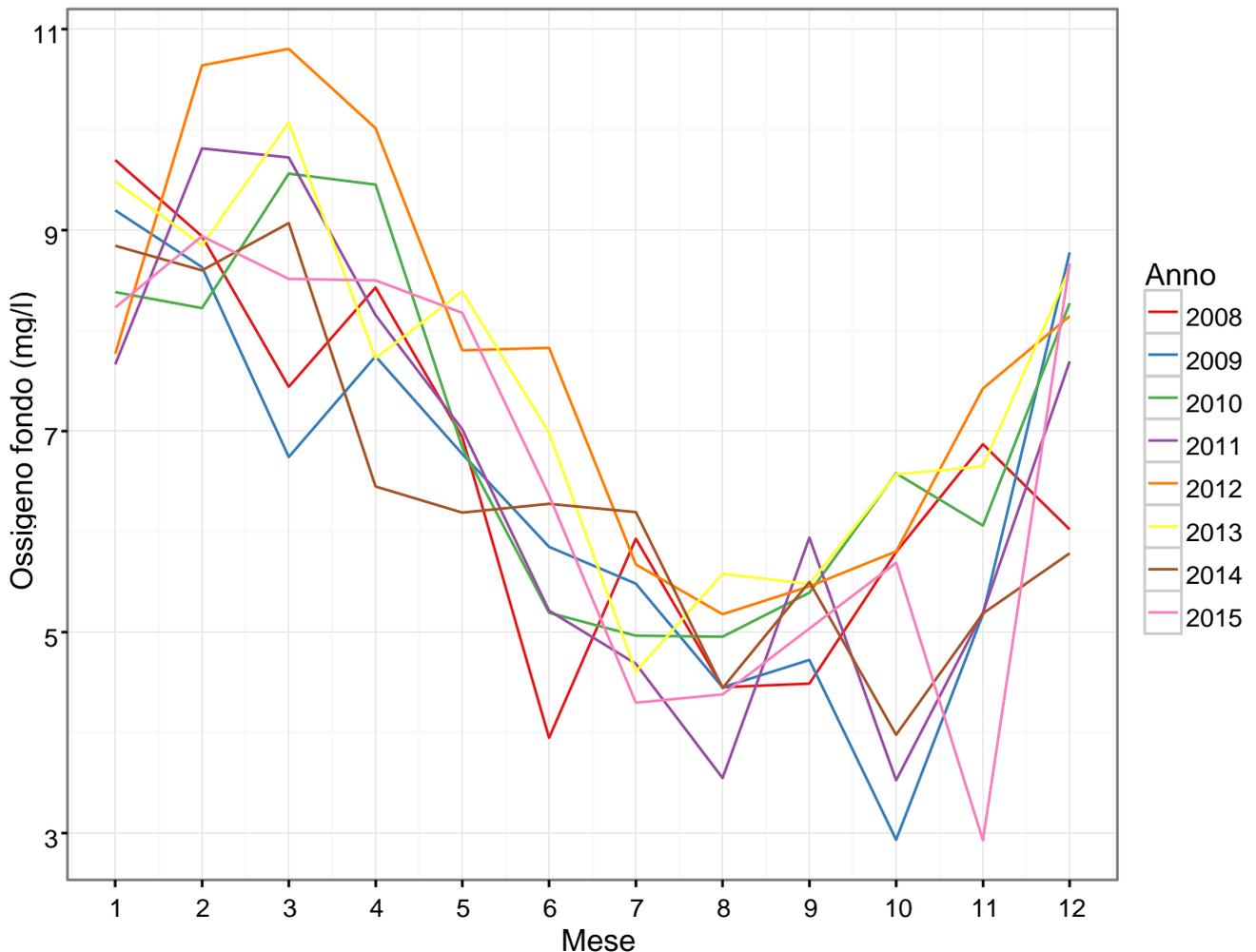


Fig. 6.4 valori dell'ossigeno fondo nel periodo 2008-2015

Per valutare la possibile influenza del regime idrico sono stati presi in considerazione anche i dati della portata del fiume Marecchia, quello più vicino ai punti di raccolta delle vongole nonché al punto di raccolta delle informazioni della Daphne. Questi dati sono riportati in Figura 6.5. Ovviamente i valori minori di portata sono osservati tra maggio e settembre/ottobre. Si può osservare la presenza di tre anni in cui le portate risultano leggermente più alte nel periodo estivo (in particolare 2010 e 2012), anche se l'anno più atipico è il 2013, caratterizzato da portate decisamente più elevate tra aprile e ottobre, con un picco molto elevato a marzo e con valori molto bassi a dicembre. Un altro dato interessante è relativo all'anno 2011, in cui dopo il picco osservato a marzo vi è una diminuzione costante della portata che si prolunga fino a dicembre.

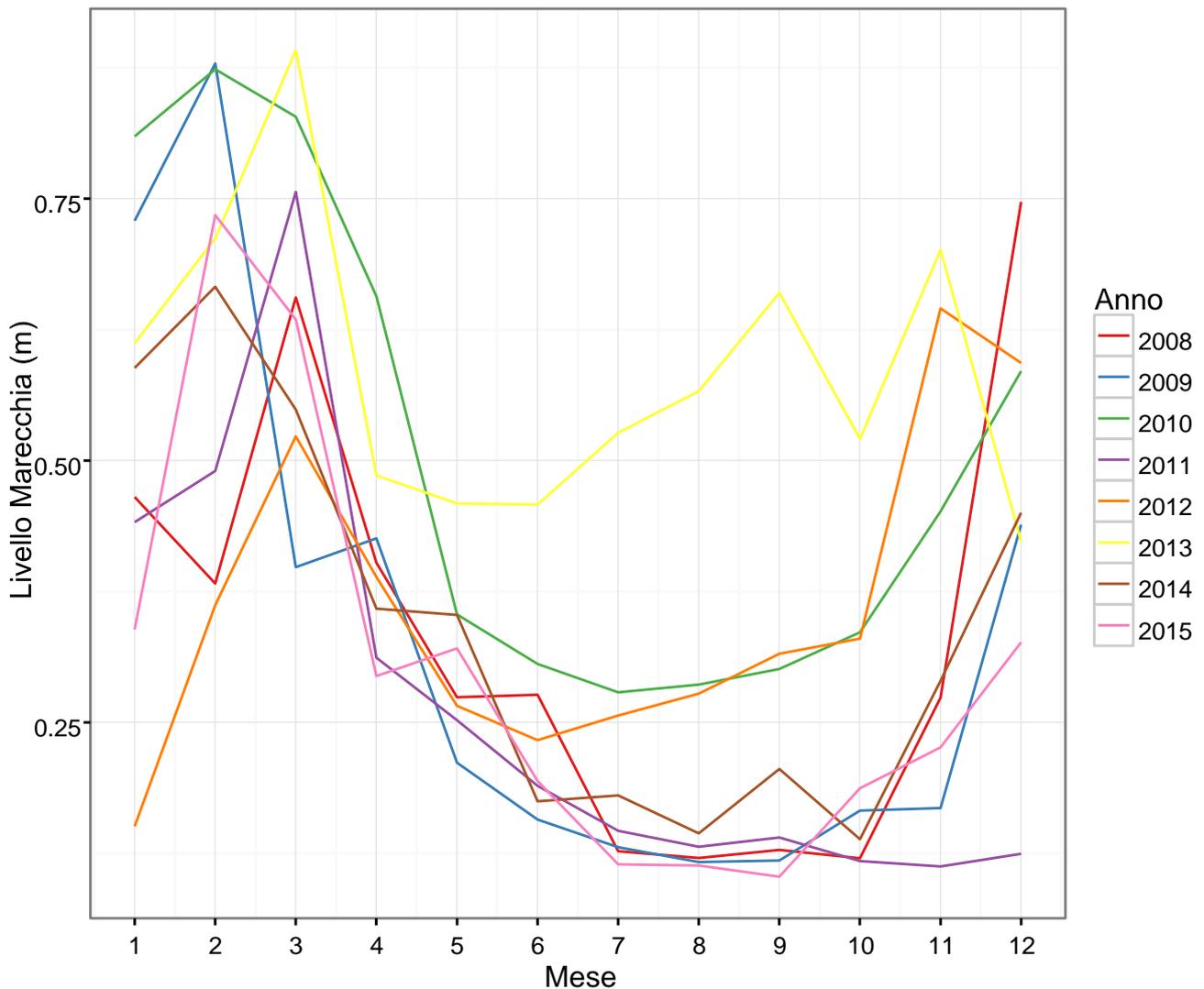


Fig. 6.5 Livello del fiume Marecchia nel periodo 2008-2015

Gli effetti di queste variabili ambientali sulla presenza di *E. coli* nelle vongole lupino sono stati testati utilizzando del test del chi quadrato.

Il test chi quadrato di Pearson è una tecnica di statistica inferenziale che permette di testare l'ipotesi nulla di indipendenza tra due variabili nominali. La statistica test su cui si basa tale metodo confronta le frequenze osservate con quelle attese sotto l'ipotesi di indipendenza. Valori elevati di tale statistica evidenziano la presenza di relazione tra le due variabili; la soglia di significatività statistica è determinata attraverso la distribuzione chi quadrato avente $(r-1)(c-1)$ gradi di libertà, dove r e c sono il numero di modalità delle variabili considerate. Quindi, valori del p -value inferiori al livello di confidenza scelto $\alpha=0.05$ portano al rigetto dell'ipotesi nulla di indipendenza.

Per una corretta convergenza della distribuzione della statistica test alla distribuzione chi quadrato è necessario che la frequenza attesa per ogni cella della tabella a doppia entrata sia superiore a 5. Dato che nei dati analizzati tale requisito non è soddisfatto, si è dovuto ricorrere al calcolo del p-value attraverso simulazioni. Questa procedura è stata compiuta attraverso la funzione di R `chisq.test`, con l'opzione `simulate.p.value=T`.

In Tabella 6.2 sono riportati i risultati del test eseguito in relazione all'anno. Come si può vedere, il valore del chi quadrato (38.027) risulta significativo (p-value = 0.000995) ad indicare un effetto significativo dell'anno sulla frequenza dei 3 livelli di carico.

Tabella 6.2. Risultati del test chi quadrato eseguito in relazione all'anno di raccolta dei campioni

Anno	0→50 MPN	50→230 MPN	>230 MPN	TOTALE
2008	71 (78%)	19 (21%)	1 (1%)	91
2009	39 (70%)	17 (30%)	0 (0%)	56
2010	31 (54%)	19 (33%)	8 (13%)	58
2011	18 (75%)	5 (21%)	1 (4%)	24
2012	32 (53%)	24 (40%)	4 (7%)	60
2013	14 (48%)	13 (45%)	2 (7%)	29
2014	30 (83%)	4 (11%)	2 (6%)	36
2015	26 (79%)	5 (15%)	2 (6%)	33
TOTALE	261	106	20	387
Chi-quadrato = 38.027 p-value = 0.000995				

In particolare si possono evidenziare, come già osservato anche in precedenza, una elevata frequenza di alte carica (>230 MPN/100g di polpa e di liquido intravalvare) nell'anno 2012, ma soprattutto nell'anno 2010. Si può anche osservare come anche per gli anni 2012-2013 ci sia una frequenza relativamente alta di cariche medie (50-230 MPN/100 g di polpa e di liquido intravalvare) che equivalgono o si avvicinano molto alle cariche basse.

Lo stesso test è stato applicato ai campioni in relazione al mese (Tabella 6.3). Anche in questo caso il valore del chi quadrato (74.177) è risultato significativo (p-value = 0.0004998) e si possono fare alcune interessanti osservazioni: in primo luogo, i campioni non conformi alla legislazione (Reg. CE n. 2073/2005) sono concentrati prevalentemente nei mesi di dicembre/novembre e, in misura minore, febbraio. Gli stessi mesi sono altresì caratterizzati dalla maggiore frequenza dei valori “medi” e, per quanto riguarda dicembre, dalla più bassa frequenza dei valori “bassi”.

Tabella 6.3 Risultati del test chi quadrato eseguito in relazione al mese di raccolta dei campioni

Mese	0→50 MPN	50→230 MPN	>230 MPN	TOTALE
Gennaio	27 (77%)	8 (23%)	0 (0%)	35
Febbraio	10 (33%)	17 (57%)	3 (10%)	30
Marzo	28 (74%)	9 (24%)	1 (2%)	38
Aprile	22 (73%)	7 (23%)	1 (4%)	30
Maggio	25 (86%)	4 (14%)	0 (0%)	29
Giugno	21 (78%)	6 (22%)	0 (0%)	27
Luglio	36 (84%)	6 (14%)	1 (2%)	43
Agosto	17	9	0	26

	(65%)	(35%)	(0%)	
Settembre	27 (75%)	7 (19%)	2 (6%)	36
Ottobre	24 (71%)	9 (26%)	1 (3%)	34
Novembre	19 (51%)	13 (35%)	5 (14%)	37
Dicembre	5 (23%)	11 (50%)	6 (27%)	22
TOTALE	261	106	20	387
Chi-quadrato = 74.177 p-value = 0.0004998				

Questi dati ci hanno indotto a valutare la situazione in funzione della stagione (Tabella 6.4). Anche in questo caso il chi quadrato è risultato significativo (24.52 con p-value = 0.001499). Parlando di stagioni, il periodo più critico risulta essere l'autunno (23 settembre - 21 dicembre), in cui si concentrano il 60% dei campioni non conformi al Reg. CE n. 2073/2005 e circa il 35% dei campioni con cariche intermedie (50-230 MPN/100g di polpa e di liquido intravalvare).

Tabella 6.4 Risultati del test chi quadrato eseguito in relazione alla stagione di raccolta dei campioni

Stagioni	0→50 MPN	50→230 MPN	>230 MPN	TOTALE
Primavera	71 (80%)	17 (19%)	1 (1%)	89
Estate	77 (76%)	22 (21%)	3 (3%)	102
Autunno	58 (55%)	36 (34%)	12 (11%)	106
Inverno	55 (61%)	31 (34%)	4 (5%)	90
TOTALE	261	106	20	387
Chi-quadrato = 24.52 p-value = 0.001499				

A questo punto, come indagine successiva, è stata studiata l'influenza sulle cariche rilevate delle variabili ambientali tramite analisi di varianza.

Per quanto riguarda l'analisi della varianza, ovvero il confronto dei valori di una variabile numerica in diversi gruppi, determinati da una variabile nominale, si è scelto di utilizzare il test non parametrico di Kruskal-Wallis. Infatti, l'uso delle più diffuse tecniche parametriche richiede una serie di assunzioni non soddisfatte dai dati analizzati in questo lavoro.

Il test di Kruskal-Wallis confronta le mediane dei diversi gruppi: il valore della statistica test è confrontato con una distribuzione chi quadrato e valori inferiori a 0.05 indicano che è almeno presente una differenza significativa tra due mediane. Per la successiva analisi delle singole differenze tra gruppi, sono stati effettuati i confronti aggiustando i p-values ottenuti per permettere i confronti multipli attraverso la correzione di Holmes-Bonferroni.

Tale procedura è stata effettuata in R con la funzione `kruskal`.

I risultati dei test relativi ai valori di salinità hanno mostrato come questa variabile non sia significativamente correlata alla presenza di *E coli* in *Chamelea gallina* (chi quadrato 4.550, p-value = 0.102778). Questo andamento è confermato dai box plots (Figura 6.6) in cui è riportata la distribuzione delle cariche in funzione della salinità. La linea centrale per ogni box rappresenta la mediana delle osservazioni, la linea inferiore e superiore del box rappresentano rispettivamente il valore del 3° e del 1° quartile. I "baffi" (whiskers) rappresentano quindi il massimo o il minimo del valore raggiunto fino ad un valore di $1.5 \times \text{IQR}$ (dove IQR è il range interquartile ovvero la differenza tra il 25° percentile e il 75° percentile). Ove sussistano valori al di fuori di questo range, essi sono rappresentati nel grafico come punti.

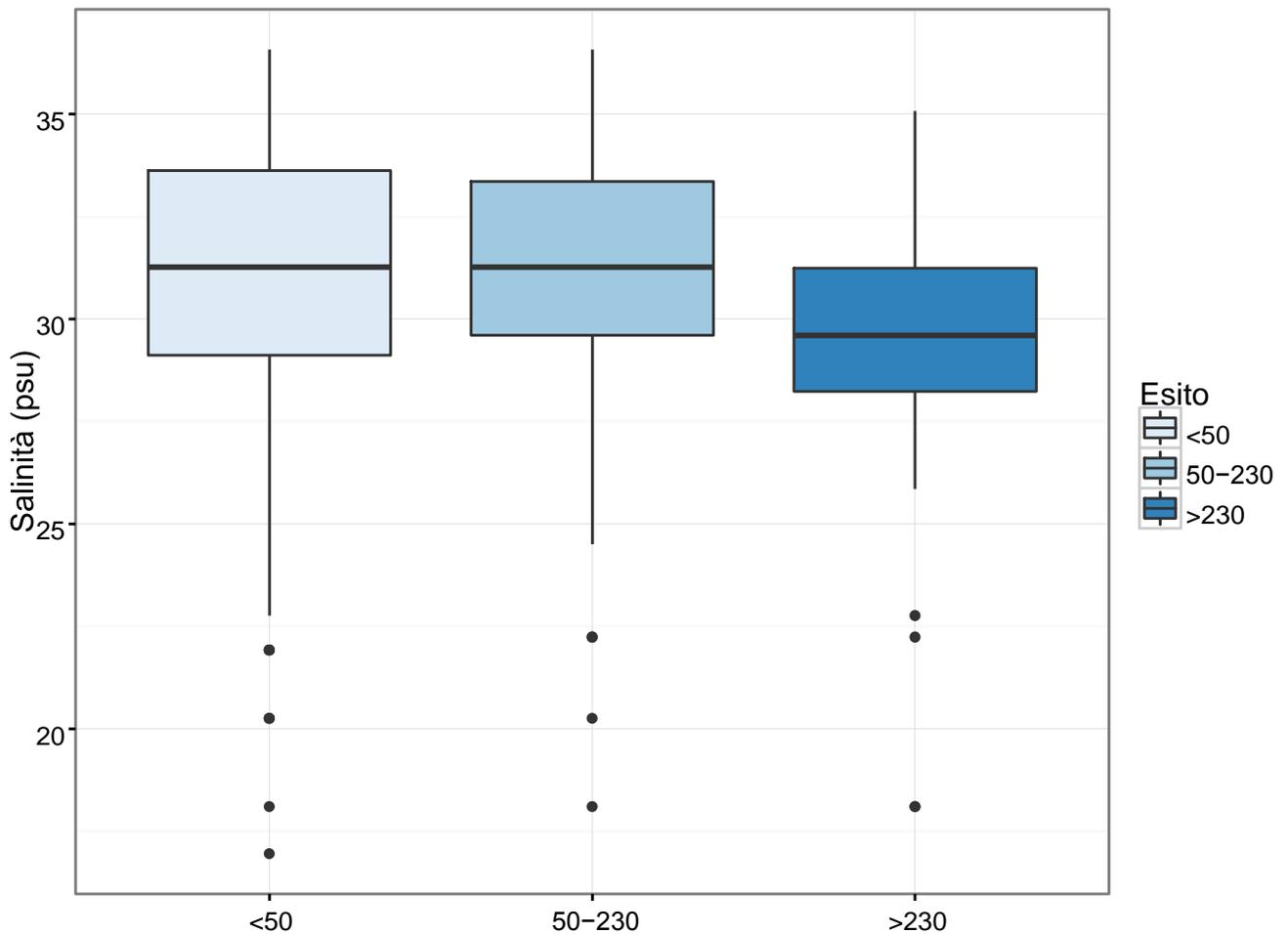


Figura 6.6 Box plot dei test relativi ai valori di salinità

Risultati diversi sono stati osservati per quanti riguarda la temperatura e il livello del Marecchia.

Infatti, le frequenze dei campioni all'interno delle tre categorie (cariche alte/medie/basse) in relazione alla temperatura delle acque sono risultate significativamente diverse fra di loro (chi quadrato 14.590 con p-value = 0.0006788).

I box relativi sono mostrati in Figura 6.7, da cui si evince che, verificando il valore della mediana, le cariche più basse corrispondono a più elevate temperature delle acque mentre, confermando i dati osservati per la distribuzione mensile e stagionale, i campioni non conformi al Reg. CE n. 2073/2005 sono concentrati in periodi in cui la temperatura delle acque del mare era particolarmente bassa.

Secondo i test post hoc applicati (correzione di Holmes-Bonferroni) queste differenze sono attribuibili principalmente alla differenza tra cariche alte/cariche basse e cariche basse/cariche medie, mentre non appare significativamente diversa la situazione per quanto concerne cariche medie/alte.

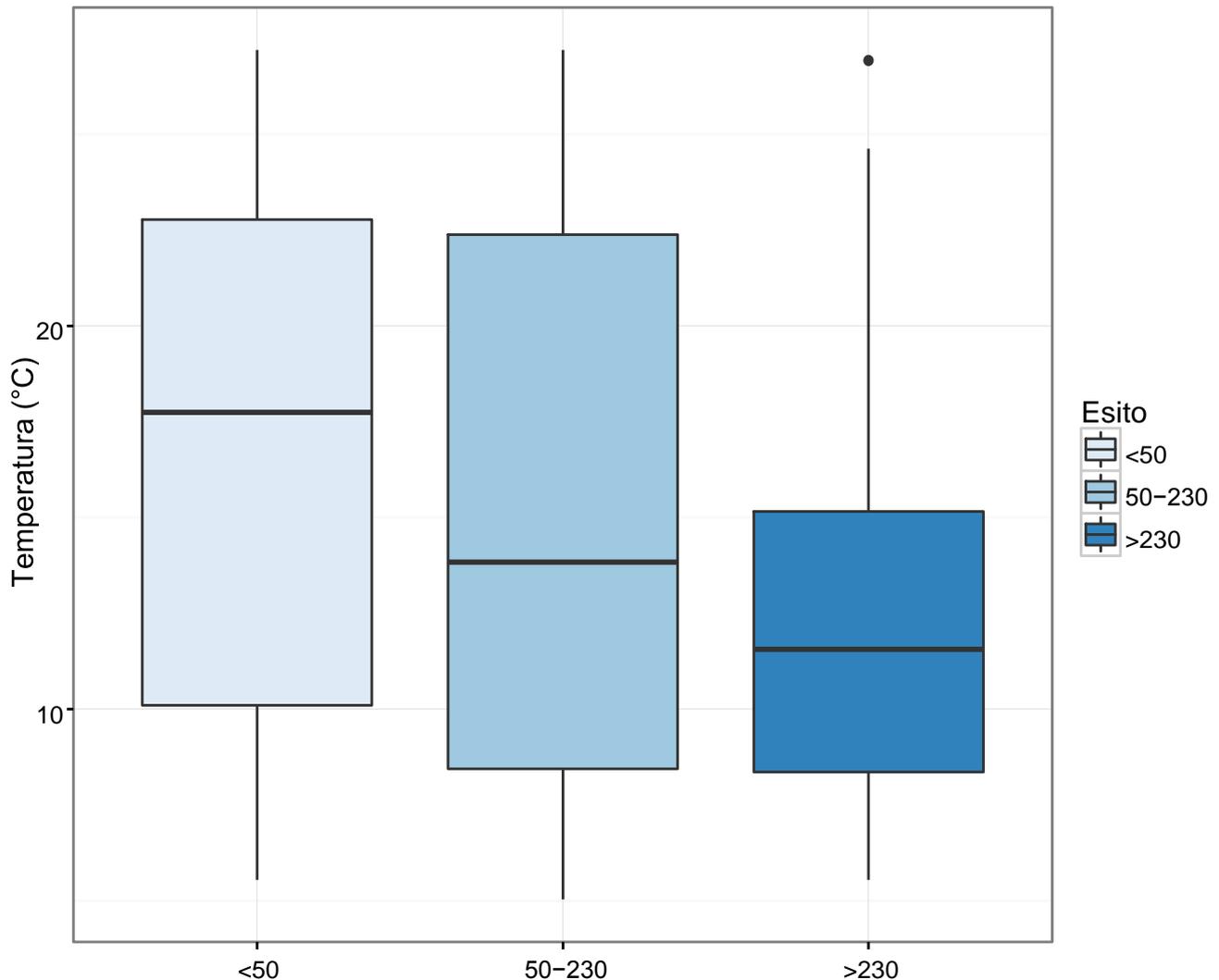


Figura 6.7 Box plot dei test relativi ai valori di temperatura

Infine lo stesso test è stato applicato considerando il livello raggiunto dal fiume Marecchia, e quindi in via indiretta la sua portata. I risultati del test di Kruskal-Wallis hanno mostrato una elevata significatività del test chi quadrato associato (20.688 per un $p\text{-value} = 3.219 \cdot 10^{-5}$). Dal box in Figura 6.8 appare evidente che le vongole con i più alti livelli di contaminazione da *E. coli* sono state pescate in

periodi di alto livello di portata del fiume Marecchia. Risultato opposto nel caso delle vongole caratterizzate dalle cariche più basse. In questo caso, tutte e tre le categorie risultavano significativamente diverse l'una dall'altra, anche se (come visibile anche dalla Figura 6.8) le differenze più significative riguardando cariche basse/alte.

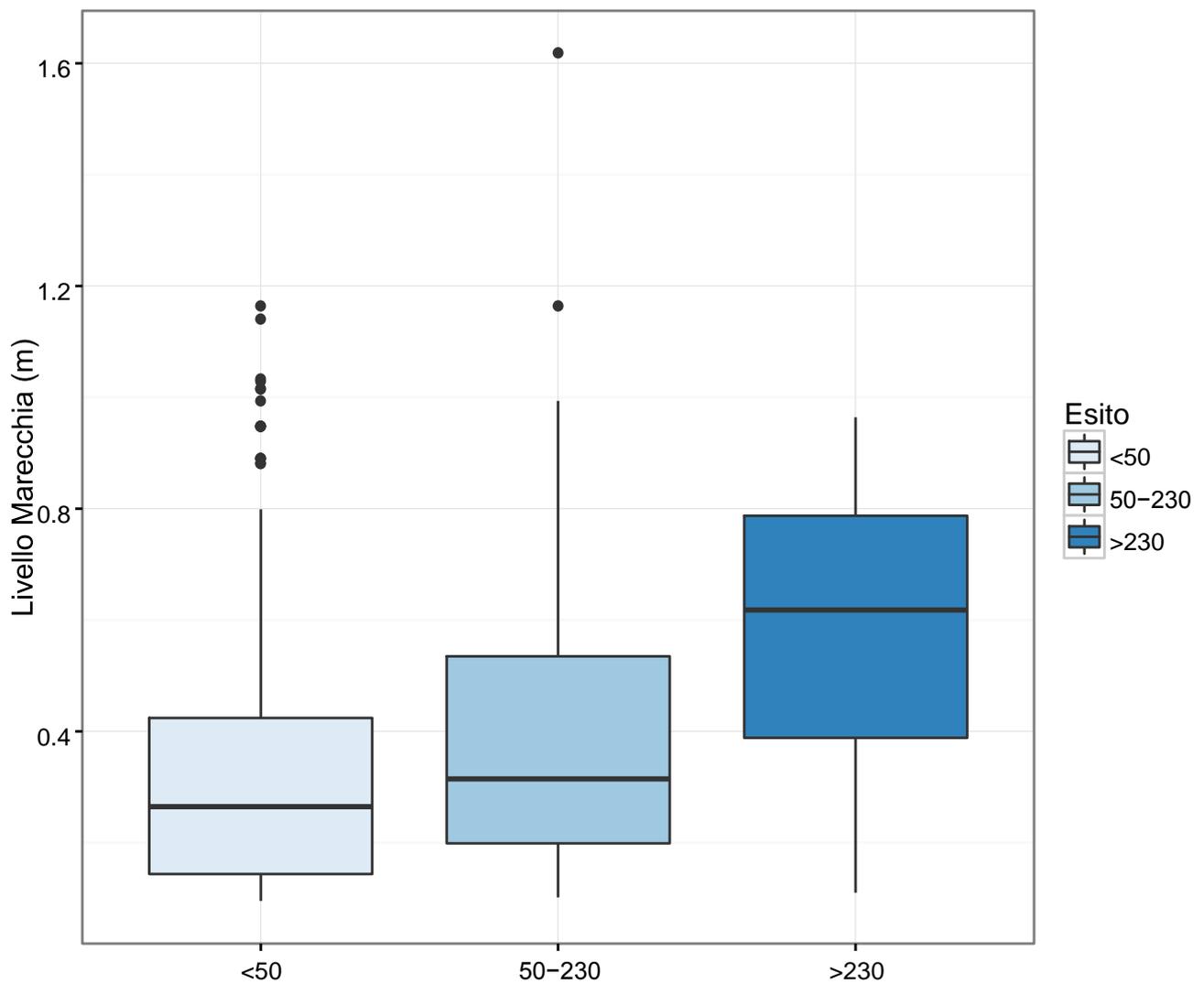


Figura 6.8. Box plot dei test relativi ai valori del livello del Marecchia

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI

Nonostante i controlli sulla qualità dei prodotti ittici siano sempre più stringenti come previsto dalle normative comunitarie, esiste ancora un certo numero di tossinfezioni alimentari di natura microbiologica veicolate dai prodotti della pesca. Questo tipo di problematiche sono spesso associate al consumo di pesce crudo, e questo vale anche per i molluschi. È pur vero che la *Chamelea gallina* oggetto di questa tesi solitamente viene consumata previa cottura. In ogni caso, i parametri imposti dalla comunità per il consumo di questi prodotti senza preventivi trattamenti sono ben chiari.

L'indagine effettuata in questa tesi ha il pregio di considerare campioni raccolti in 8 anni in un areale relativamente ristretto della costa adriatica e quindi i dati forniscono una buona fotografia della qualità microbiologica complessiva delle vongole lupino.

In generale, il numero di campioni che non soddisfano i requisiti minimi (*Escherichia coli* < 230 MPN/100 g di polpa e di liquido intravalvare) sono relativamente pochi (circa il 5%). Non esistono dati di raffronto se non un articolo pubblicato nel 2000 (Gardini et al.) in cui la percentuale di campioni non conformi risultava nettamente più alta.

Nel corso di questo lavoro è stato possibile mettere in relazione la presenza di *E. coli* con alcuni parametri di ordine ambientale che hanno permesso di evidenziare alcuni aspetti interessanti.

In primo luogo i campioni non conformi si sono concentrati prevalentemente nell'anno 2010 e 2012, ma quello che più conta è che dal punto di vista della stagionalità la principale concentrazione di campioni non conformi o con cariche relativamente alte (50-230 MPN/100 g di polpa e di liquido intravalvare) risulta essere l'autunno, ed in particolare i mesi di novembre e dicembre, laddove, invece, i campioni soddisfacenti dal punto di vista microbiologico si concentrano nei mesi che vanno da aprile ad agosto. Questo episodio riflette sicuramente un aspetto

biologico legato al ciclo vitale di *Chamelea gallina* che vive la sua fase riproduttiva nella stagione più calda, diminuendo per queste ragioni la sua attività filtrante. Al contempo questo andamento è anche spiegabile con l'apporto di contaminanti legato al ciclo delle acque, e quindi dalle precipitazioni e dalla portata dei fiumi che, scendendo verso il mare, trascinano sostanze organiche inquinanti di natura antropica che costituiscono poi fonte di nutrimento per le specie microbiche come *E. coli* ed altri enterobatteri.

Questo spiega la relazione osservata tra la presenza di *E. coli* nelle vongole lupino e la portata del fiume Marecchia, che sfocia in mare nella zona prospiciente alla fascia costiera in cui i molluschi sono stati raccolti. Considerando che le portate dei fiumi sono maggiori nei mesi che vanno da ottobre a marzo/aprile e che come già osservato nei mesi più caldi si riduce l'attività filtrante, non stupisce dunque il fatto che i peggiori risultati microbiologici siano stati osservati quando le temperature delle acque era più bassa.

L'approccio utilizzato ha permesso di valorizzare non solo l'aspetto microbiologico riferito all'alimento *Chamelea gallina*, ma anche di mettere in relazione ambientali con la salubrità dei prodotti della pesca, fornendo indicazioni che vanno in entrambe le direzioni.

Una osservazione per concludere può essere il fatto che il miglioramento della qualità delle vongole osservato tra i campioni raccolti fra il 1996-1997 (Gardini et al., 2000) e quelli attuali deve in qualche modo essere riconducibile ai miglioramenti dei controlli delle acque reflue della Pianura Padana. Infatti va per inciso ricordato che negli anni 90 la presenza di depuratori nella zona lombarda era estremamente ridotta. È quindi possibile prevedere che i lavori di completamento degli impianti di depurazione a Rimini, città in cui sfocia il Marecchia, contribuiranno a migliorare ulteriormente la qualità delle vongole lupino.

BIBLIOGRAFIA

Arcangeli G., Baldrati G., Pirazzoli P. (2003) “La trasformazione dei prodotti della pesca: tecnologia, controllo e igiene di lavorazione” Editore: SSICA Stazione sperimentale per l'industria delle conserve alimentari, pp. 442

Arik Colakoglu F., Basri Ormanci H., Berik N., Ender Kunili I., Colakoglu S. 12 gennaio, “Proximate and Elemental Composition of Chamelea gallina from the Southern Coast of the Marmara Sea (Turkey) “2012 143:983–991 pp. 10.

Barchiesi F., Donati D., Ottaviani D., Santarelli S., Masini L., Duranti A., Rocchegiani E., Latini M. (2010): “zone di produzione delle vongole (Chamelea gallina) nella regione marche: analisi preliminare della contaminazione fecale nel triennio 2008-2010” Italian Journal of Food Safety, Vol. 1 N. 3 pp. 4.

Bernardi C. e Cattaneo P. (2010) “Atlante per il riconoscimento delle principali specie commercializzate di molluschi bivalvi e gasteropodi marini” ISSN: 2039-1544 Food in pp. 102

Berrilli F., Caffara M., Capelli G., Di Cave D., Fioravanti M., Frangipane di Regalbono A., Giangaspero A. “Protozoi di interesse zoonosico in molluschi bivalvi: quale rischio per il consumatore?” System Copy pp. 38

Bombace G., Lucchetti A. (2011): “Elementi di biologia della pesca” casa editrice: Il Sole 24 ore edagricole, pp 383

Cattaneo P., Bernardi C. (2008) “Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi” ISSN 2039-1544, Food In N°1, pp. 102

De Filippis G., (2001) “Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti”, Casa editrice: Tecniche Nuove, pp.736.

D.L. n. 530 del 30.12.1992, (1993) "Attuazione della direttiva 91/492/CEE" concernenti norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi”, Gazzetta Ufficiale.

“Disciplinare di produzione integrata; Molluschi bivalvi, Chamelea gallina (Vongola), Mytilus galloprovincialis (Cozza)” pp. 34. A cura di: Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine (NRL) (G.U.C.E. L 120/37 DEL 8/05/99)

Gardini F, Trivisano C, Lanciotti R, Maffei M, Guerzoni ME. 2000. Suitability of the log-linear models to evaluate the microbiological quality of baby clams (*Chamelea gallina* L.) harvested in the Adriatic Sea. *Int J Food Microbiol* 54:3–74.

Giansante C., Foschi G., Tieri E.E., Ferri N., Scattolini M. (2001) “Prove di depurazione di *Chamelea gallina*: risultati preliminari” *L’Igiene marina* 116, pp. 57-64.

Giulini G., Mietti N., Maffei M. (2000) “Determinazione dei parametri qualitativi del prodotto ittico fresco della pesca e dell’acquacoltura nazionale per la definizione di standard di qualità” Consorzio Mediterraneo, Roma.

ISO/TS 16649-3, (2005) “Microbiology of food and animal feeding stuff- Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*”, Part 3: “Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide”.

ISO 7218/2007, “Microbiology of food and animal feeding stuff- General requirements and guidance for microbiological examinations.”, ISO, 2007.

Giansante C. et al. (2006) Relazione finale sulla “Gestione e tutela dei banchi naturali di *Chamelea gallina* (vongola adriatica) nel compartimento marittimo di Pescara” Istituto zooprofilattico dell’Abruzzo e del Molise “Giuseppe Caporale”, Bando di gara 2003/2004- Asse 4- Misura 4.6 (Azioni innovative).

Kator, H., Rhodes, M.W., 1991. Indicators and alternate indicators of growing water. In: Ward, D.R., Ackney, C.H. (Eds.), *Microbiology of Marine Food Products*, AVI Book, Van Nos- trand Reinhold, New York, pp. 135–195.

Kramer J., Cantoni C.: “Alimenti, microbiologia e igiene” 2011 Casa Editrice: Tecniche Nuove, pag. 478

“Le importazioni dei prodotti di acquacoltura nell’UE” Convegno «Qualità e sicurezza dei prodotti d’acquacoltura: regolamenti, controlli e flussi commerciali» Roma, 24 ottobre 2011 ISMEA

Marriott N., Gravani R. B. (2008) “Sanificazione nell’industria alimentare” Springer Science & Business Media, pp 462

Martinez-Manzanares, E., Morinigo, M.A., Castro, D., Balebona, M.C., Munoz, M.A., Boorego, J.J., 1992. Relationship between indicator of fecal pollution in shellfish-growing water and the occurrence of human pathogenic micro-organisms in shellfish. *J. Food Protect.* 55, 609–614.

Mioni R., Bordin P., Boffo L., Francescon I., Fumelli P., Piccoli L., Articolo “Il Pesce nr. 3, 2015” pp. 102, Rubrica: La pagina scientifica

Morello EB, Froglija C, Atkinson RJA, Moore PG. 2005. Hydraulic dredge discards of the clam (*Chamelea gallina*) fishery in the western Adriatic Sea, Italy. *Fisher Res* 76:430–44. Moschino V, Marin MG. 2006. Seasonal changes in

physiological responses and evaluation of “well-being” in the Venus clam *Chamelea gallina* from the Northern Adriatic Sea. *Comp Biochem Physiol Part A* 145:433–40.

Orban E, Di Lena G, Nevigato T, Casini I, Caproni R, Santaroni G, Giulini G. 2006. Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea. *Food Chem* 101:1063–70.

Palese L., Palese A. (1992) “Il controllo sanitario e qualitativo dei prodotti alimentari della pesca” vol. 1, Casa Editrice: Piccin, pp. 579

Pluchino (1988) “Cinetica della Depurazione dei molluschi bivalvi”

Prioli, G. 2001. “Censimento nazionale sulla molluschicoltura”. Unimar Osservatorio tecnico-biologico.

Ramon, M., Richardson, C.A., 1992. Age determination and shell growth of *Chamelea gallina* (Bivalvia: Veneridae) in the western Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 89, 15–23

Reg. (CE) n. 1881/2006 della commissione del 19 dicembre 2006 che definisce “i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari” *Gazzetta ufficiale dell’Unione europea* L 364/5.

Reg. (CE) n. 2073/2005 della commissione del 15 novembre 2005 sui “criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari” *Gazzetta ufficiale dell’Unione europea* L 338/1.

Reg. (CE) n. 2074/2005 della commissione del 5 dicembre 2005 recante “modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e all’organizzazione di controlli ufficiali a

norma dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004, deroga al regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e modifica dei regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004” 2005R2074 IT 01.01.2009 004.001 1, pp.50.

Romanelli M., Cordisco C.A. and Giovanardi O.: “The long-term decline of the *Chamelea gallina* L. (Bivalvia: Veneridae) clam fishery in the Adriatic Sea: is a synthesis possible?” ISSN: 0001-5113 pp.34

Regolamento CE n.178/2002 (2002) del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare, Gazzetta ufficiale delle Comunità europee.

Regolamento CE n.852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull’igiene dei prodotti alimentari,Gazzetta ufficiale dell’Unione europea, 2004.

Regolamento CE n.853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, Gazzetta ufficiale dell’Unione europea, 2004.

Regolamento CE n.854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l’organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano, Gazzetta ufficiale dell’Unione europea,2004.

Trevisan G. 2011: “Le vongole dell’alto adriatico tra ambiente e mercato” Casa editrice: FrancoAngeli, pp. 208

Turolla E., 2007 – “Atlante dei Bivalvi dei mercati italiani”. Grafiche Adriatica S.r.l., Taglio di Po, pp. 95.

SITOGRAFIA

http://www.arpa.emr.it/cms3/documenti/_cerca_doc/mare/progetto_mare/conchiglie.htm

http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/factsheets-aquaculture-species/clam_it.pdf

<http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/4471>

http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/factsheets-aquaculture-species/mussels_it.pdf

http://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaArticolo?art.progressivo=0&art.idArticolo=1&art.versione=1&art.codiceRedazionale=07A01337&art.dataPubblicazioneGazzetta=2007-02-13&art.idGruppo=0&art.idSottoArticolo1=10&art.idSottoArticolo=1&art.flagTipoArticolo=1

<http://www.izsum.it/files%5CDownload%5C83%5C13508%5CDepurazione.pdf>

https://www.politicheagricole.it/flex/files/5/6/e/D.b72e55efc464d3da636c/Piano_di_Gestione_Nazionale_Draghe.pdf

http://www.izs-sardegna.it/raz_ricerca.cfm?idric=74

<http://www.ulssvicenza.it/allegati/1039-ilmangiarbene.pdf>

<http://www.arpa.emr.it/cms3/documenti/daphne/download/bioaccumulo.pdf>

http://www.ismea.it/flex/files/D.4b5f0700280a742f6382/I_consumi_ittici_nei_principali_paesi_europei.pdf

http://www.unite.it/UniTE/Engine/RAServeFile.php/f/File_Prof/PENNISI_194/18_Molluschi_bivalvi.pdf

http://www.arpae.it/archivio_bollettini.asp?idlivello=534

<http://wpage.unina.it/villani/eLAB6.html>

http://www.arpae.it/archivio_bollettini.asp?cerca=si&idlivello=534&pag=14

Ringraziamenti

Eccomi giunta alla fine di questa tesi, e al termine di questi splendidi tre anni universitari, nei quali credo di essere maturata, sia a livello personale che a livello professionale. Desidero ringraziare la mia famiglia per l'appoggio incondizionato, che in questi anni come in tutta la mia vita mi hanno sempre dimostrato. Un grande grazie va al prof. Fausto Gardini, alle assistenti Chiara Montanari, e Giulia Tabanelli, per avermi fornito preziosi suggerimenti, ed avermi aiutato nell'ideare e svolgere la mia tesi di laurea. Grazie ad Aldo Gardini per il suo aiuto e per la sua sincera disponibilità. Un'enorme grazie all'azienda MARE.A srl, per avermi ospitato e permesso di formare il mio tirocinio nel loro laboratorio, in particolare a Chiara Prioli per avermi insegnato ed avermi mostrato quello che mi aspetta nel mondo del lavoro. Un ulteriore grazie a Giovanni per avermi supportato e sopportato in questi anni. Per ultimo ma non per importanza un ringraziamento va a tutti coloro che ho incontrato in questi anni, ai miei compagni, che nel loro piccolo mi hanno dato qualcosa da ricordare e in particolare a Deborah e Sara, senza le quali quest'esperienza non sarebbe stata la stessa.