



UNIVERSITÀ DI PARMA

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

## Scienze della Terra

CICLO XXXII

STUDIO ISOTOPICO DI RESTI MESOLITICI DI *Pila wernei*:  
RICOSTRUZIONE DELLE CONDIZIONI CLIMATICHE E  
AMBIENTALI TRA 8700 E 7500 BP NEL SUDAN CENTRALE

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Mario Tribaudino

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Paola Iacumin

Dottoranda: Antonella Macrì

Anni 2016/2019



## PREFAZIONE

Le variazioni climatiche ad elevata frequenza avvenute nell'Olocene rivestono una grande importanza per la comprensione dei cambiamenti climatici attualmente in corso. La caratterizzazione di tali anomalie permette di indagare il grado di impatto sugli ecosistemi e le risposte di questi ultimi in termini di resilienza. Al-Khiday, un sito preistorico situato nel Sudan centrale particolarmente ben conservato, è un esempio di quanto appena detto. Lo sfruttamento intensivo di molluschi, attestato dal rinvenimento di un interessante shell midden continentale, potrebbe essere inserito in un quadro di resilienza delle società come risposta ai cambiamenti climatici.

L'obiettivo principale di questa ricerca è, quindi, quello di acquisire nuovi dati paleoclimatici relativi all'intervallo temporale 8700-7500 BP, in cui ricade l'anomalia climatica conosciuta come *8200 event*, e che corrisponde in Sudan al periodo culturale Mesolitico Medio, mediante lo studio isotopico di esemplari di *Pila wernei* rinvenuti nello shell midden. Questo particolare gasteropode semiacquatico, nonostante sia stato rinvenuto in diversi contesti preistorici del Sudan, non è mai stato studiato in maniera sistematica.

Essendo questo uno studio pionieristico, si è ritenuto necessario porsi preliminarmente i seguenti interrogativi:

- La specie *Pila wernei* precipita il guscio carbonatico in condizioni prossime all'equilibrio termodinamico? In altre parole, *Pila wernei* può essere considerato un buon archivio di data proxy?
- Se sì, che tipo di informazioni ambientali possiamo ricavare dall'analisi isotopica?
- Sono le stesse di quelle fornite dall'analisi isotopica delle ossa dei pesci rinvenuti nel medesimo contesto?

Per rispondere al primo di tali quesiti è stato progettato un esperimento in laboratorio che ha visto esemplari di *Pila wernei* crescere in acquario sotto controllate condizioni sperimentali. L'esperimento è ancora in corso ma i risultati preliminari ottenuti giustificano il proseguo dello studio e quindi l'analisi isotopica degli esemplari archeologici per ricostruire il paleo-ambiente di al-Khiday. Per rispondere al secondo interrogativo alcuni gasteropodi sono stati prelevati nel loro habitat naturale insieme ad alcuni elementi (campioni di acqua e vegetazione) che hanno permesso di caratterizzare la tipologia delle informazioni ambientali ottenute. Infine, il confronto con i risultati dell'analisi delle ossa dei pesci ha permesso di delineare differenze e analogie tra i due records.

## INDICE

### **Prefazione**

### **PARTE I: ANALISI ISOTOPICA DI CARBONATI BIOGENICI PER CARATTERIZZAZIONI CLIMATICHE E AMBIENTALI.....1**

#### **CAPITOLO 1: I CONCETTI BASE DELLA GEOCHIMICA DEGLI ISOTOPI STABILI.....2**

1.1 Definizione di isotopo.....2

1.2 Definizione di frazionamento isotopico.....3

1.3 Il parametro delta e gli standard internazionali.....4

#### **CAPITOLO 2: GLI ESOSCHELETRI CARBONATICI DEI MOLLUSCHI.....5**

2.1 La biomineralizzazione.....5

2.2 Le equazioni di paleo-temperatura.....6

2.3 Analisi isotopica dell'ossigeno del carbonato dei molluschi di acqua dolce.....8

2.3.1 Fattori che influenzano la composizione isotopica delle precipitazioni.....9

2.4 Analisi isotopica del carbonio del carbonato dei molluschi di acqua dolce.....11

#### **CAPITOLO 3: L'APATITE BIOLOGICA.....14**

3.1 La biomineralizzazione.....14

3.2 Gli isotopi dell'ossigeno dei gruppi  $PO_4^{3-}$  e  $CO_3^{2-}$ .....17

3.3 Gli isotopi del carbonio del gruppo  $CO_3^{2-}$ .....18

### **PARTE II: MATERIALI E**

### **METODI.....21**

#### **CAPITOLO 4: IL SITO ARCHEOLOGICO DI AI-KHIDAY.....22**

4.1 Le variazioni climatiche avvenute durante l'Olocene.....22

4.1.1 Variazioni climatiche e culturali nel Nord Africa.....23

4.2 Il complesso archeologico di al-Khiday.....26

4.2.1 Inquadramento geografico e ambientale.....26

4.2.2 I siti Mesolitici 16D5, 16D4 e 16D4B.....28

4.2.3 Lo shellmidden 16D3.....31

<b>CAPITOLO 5: I CAMPIONI</b> .....	34
5.1 Esemplari attuali di <i>Pila wernei</i> .....	35
5.1.1 Aspetti ecologici della specie.....	35
5.1.2 Campionamento lungo il Nilo Bianco.....	36
5.1.3 Esemplari allevati in laboratorio.....	37
5.2 Il record archeologico: esoscheletri di <i>Pila wernei</i> e resti di fauna ittica.....	39
<b>CAPITOLO 6: METODOLOGIE</b> .....	44
6.1 Valutazione dello stato di conservazione dei campioni.....	44
6.2 Strategia di campionamento.....	46
6.3 Procedure analitiche.....	49
6.3.1 Analisi isotopica del carbonio e dell'ossigeno del gruppo CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> dell'aragonite e dell'apatite.....	49
6.3.2 Analisi isotopica dell'ossigeno del gruppo PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> dell'apatite.....	54
6.3.3 Analisi isotopica del carbonio e dell'azoto di campioni organici.....	56
<b>PARTE III: RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>59</b>
<b>CAPITOLO 7: RISULTATI</b> .....	60
7.1 Risultati relativi agli esemplari attuali allevati in laboratorio.....	60
7.1.1 Stima del tasso di accrescimento del guscio carbonatico.....	61
7.1.2 Stima del fattore di frazionamento $\alpha$ aragonite-acqua a 27°C.....	63
7.2 Risultati relativi agli esemplari attuali campionati in diversi habitat.....	67
7.2.1 Valori isotopici medi dell'ossigeno delle conchiglie e dell'acqua ambientale.....	67
7.2.2 Valori isotopici medi del carbonio delle conchiglie e dell'acqua .....	70
7.2.3 Valori $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ lungo la spirale di crescita della conchiglia.....	74
7.2.4 Valori isotopici medi del carbonio e dell'azoto delle parti molli.....	80
7.2.5 Valori isotopici medi del carbonio e dell'azoto delle piante.....	81
7.3 Risultati relativi al record archeologico.....	82
7.3.1 Valori isotopici medi dell'ossigeno e del carbonio delle conchiglie .....	82
7.3.2 Risultati delle datazioni con radiocarbonio.....	85
7.3.3 Valori $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ lungo la spirale di crescita della conchiglia.....	87

7.3.4 Valori isotopici medi dell'ossigeno e del carbonio delle ossa dei pesci.....	92
<b>CAPITOLO 8: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>95</b>
8.1 Caratterizzazione dei fattori ambientali e non che influenzano la composizione isotopica del guscio aragonitico di <i>Pila wernei</i> .....	96
8.2 Ricostruzione paleoclimatica e paleoambientale del sito mesolitico 16D3 di al-Khiday.....	102
8.3 Conclusioni e sintesi.....	117
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>119</b>
<b>APPENDICE A.....</b>	<b>129</b>
<b>APPENDICE B.....</b>	<b>143</b>

# PARTE I

---

Analisi isotopica di carbonati biogenici per  
caratterizzazioni climatiche e ambientali

## CAPITOLO 1

### I CONCETTI BASE DELLA GEOCHIMICA DEGLI ISOTOPI STABILI

#### 1.1 Definizione di isotopo

Se consideriamo un generico elemento chimico  $E$ , il suo nucleo sarà formato da un certo numero di protoni ( $p$ ), e medesimo numero di elettroni, e da un certo numero di neutroni ( $n$ ). Elementi chimici che possiedono lo stesso numero di protoni (numero atomico,  $Z$ ) ma diverso numero di neutroni prendono il nome di isotopi. Il termine *isotopo* di derivazione greca  $\text{ισος τοπος}$  sta ad indicare che si tratta di elementi che occupano lo stesso posto nella Tavola Periodica. Se definiamo il numero di massa  $A$  come la somma di neutroni e protoni posseduta dall'elemento  $E$ , gli isotopi possono essere definiti come atomi di uno stesso elemento con uguale valore  $Z$  ma diverso valore  $A$ . Il diverso numero di massa conferisce ai diversi isotopi non solo differenti proprietà fisiche ma anche differenti, seppur di minima entità, proprietà chimiche: infatti, le energie libere di formazione per la stessa molecola con isotopi diversi sono diverse, sebbene in piccola misura.

Generalmente gli isotopi vengono suddivisi in isotopi stabili (circa 270) e isotopi non stabili o radioattivi (circa 1200).

ELEMENTO	ISOTOPI	ABBONDANZE
		RELATIVE
Idrogeno	$^1\text{H}$	99,98%
	$^2\text{H}$	0,02%
Carbonio	$^{12}\text{C}$	98,89%
	$^{13}\text{C}$	1,11%
Azoto	$^{14}\text{N}$	99,64%
	$^{15}\text{N}$	0,36%
Ossigeno	$^{16}\text{O}$ $^{17}\text{O}$	99,76%
		0,04%
	$^{18}\text{O}$	0,20%

**Tab.1** Abbondanze relative di alcuni elementi leggeri

Gli isotopi stabili non subiscono decadimento radioattivo o, più correttamente, possiedono emivite troppo lunghe da poter essere misurate; gli isotopi instabili subiscono decadimento radioattivo. In natura, soltanto 21 elementi tra cui il fluoro, il sodio, il berillio, possiedono soltanto un isotopo stabile; nella maggior parte dei casi invece gli elementi chimici sono costituiti da più di un isotopo con una distribuzione che si mantiene mediamente costante (Tab.1)

## 1.2 Definizione di frazionamento isotopico

Il frazionamento isotopico è un processo che comporta la ripartizione di due isotopi dello stesso elemento tra due sostanze o in una stessa sostanza in due fasi diverse. L'entità di questa ripartizione, detta *coefficiente di frazionamento*, viene convenzionalmente indicata con la lettera  $\alpha$ . Se consideriamo, ad esempio, la ripartizione degli isotopi dell'ossigeno del componente chimico  $\text{CaCO}_3$  della fase solida CARBONATO e gli isotopi dell'ossigeno della specie chimica  $\text{H}_2\text{O}$  LIQUIDO, il coefficiente di frazionamento sarà così definito:

$$^{18/16}\alpha_{\text{CaCO}_3\text{-acqua}} = \left( \frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{CO}_3^{2-}, \text{CARBONATO}} / \left( \frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}} \right)_{\text{H}_2\text{O}, \text{LIQUIDO}} = ^{18/16}R_{\text{CO}_3^{2-}, \text{CARBONATO}} / ^{18/16}R_{\text{H}_2\text{O}, \text{LIQUIDO}}$$

dove R esprime il rapporto isotopico dell'ossigeno appartenente al gruppo  $\text{CO}_3^{2-}$  del carbonato e alla molecola  $\text{H}_2\text{O}$  del liquido.

Il fattore di frazionamento può avere diversi significati a seconda delle condizioni termodinamiche.

- 1) Due specie chimiche presenti nella stessa fase (ad esempio  $\text{CO}_2$  nella fase gassosa e  $\text{H}_2\text{O}$  nella fase gassosa);
- 2) una specie chimica e due diverse fasi (ad esempio  $\text{H}_2\text{O}$  nella fase liquida e  $\text{H}_2\text{O}$  nella fase gas);
- 3) due specie chimiche e due diverse fasi (ad esempio  $\text{CO}_2$  nella fase gassosa e  $\text{H}_2\text{O}$  nella fase liquida).
- 4) due specie chimiche sono presenti in due diverse fasi che, però, non esistono contemporaneamente. È il caso degli isotopi dell'ossigeno tra  $\text{CO}_3^{2-}$  della fase carbonato e  $\text{CO}_2$  in fase gassosa derivante per totale dissoluzione del carbonato (*frazionamento acido*, per maggiori dettagli si rimanda all'Appendice A).

Considerando le diverse condizioni termodinamiche del sistema, il processo di frazionamento per 1), 2), 3) può avvenire alle seguenti condizioni:

Equilibrio termodinamico:

- intra-fase (ad esempio isotopi di O tra i gruppi  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  dell'apatite)

- inter-fase (ad esempio isotopi di O tra CO<sub>2</sub> in fase gassosa e H<sub>2</sub>O in fase liquida)

Stato stazionario:

- inter-fase, come accade per gli isotopi dell'ossigeno che si ripartiscono tra le molecole d'acqua dell'acqua marina e quelle dell'atmosfera sovrastante in condizioni di umidità relativa minore di 1.

### 1.3 Il parametro delta e gli standard internazionali

Misurare i rapporti isotopici in termini assoluti è molto complicato. Risulta molto più conveniente misurare il rapporto isotopico R di un campione rispetto ad un materiale di riferimento internazionale.

Il parametro delta è definito come:

$$\delta = \left( \frac{n^{*18}\text{O} / n^{*16}\text{O}}{n^{*18}\text{O} / n^{*16}\text{O}} \right)_{\text{sostanza di interesse}} / \left( \frac{n^{*18}\text{O} / n^{*16}\text{O}}{n^{*18}\text{O} / n^{*16}\text{O}} \right)_{\text{standard}} - 1 \quad (\text{definizione IUPAC})$$

dove tra parentesi tonda sono indicate le abbondanze degli isotopi (numero di atomi o concentrazione di specie atomica). Dal momento che il valore  $\delta$  è in genere piuttosto piccolo, si preferisce riportare i valori come

$$X = 10^3 * \delta.$$

Pertanto,  $\delta = X * 10^{-3} = X\text{‰}$  dove  $\text{‰} = 10^{-3}$ .

Gli standard internazionali, che per convenzione presentano un valore  $\delta=0$ , ai quali sono universalmente riferiti i valori di  $\delta$  delle sostanze analizzate sono:

V-SMOW	Vienna Standard Mean Ocean Water	(specie chimica di interesse: acqua liquida)
V-PDB	Vienna Pee Dee Belemnite	(specie chimica di interesse CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )
AIR		(specie chimica di interesse N <sub>2</sub> )

Ogni laboratorio utilizza degli standard interni la cui composizione isotopica è nota ed è vicina a quella del campione da misurare. L'utilizzo di un materiale standard che sia universalmente riconosciuto fornisce l'enorme vantaggio di permettere il confronto dei risultati di studi condotti in laboratori diversi e di verificare l'accuratezza e la precisione dei metodi analitici. Una sostanza di riferimento ideale deve essere innanzitutto caratterizzata da un'elevata purezza ed omogeneità. Nel caso specifico dell'analisi isotopica è di fondamentale importanza che lo standard non presenti variazione nella composizione isotopica nelle porzioni prelevate in momenti diversi. Oltre a queste caratteristiche legate alla sua natura, uno standard deve essere facilmente reperibile, ampiamente disponibile ed avere costi limitati.

## CAPITOLO 2

### GLI ESOSCHELETRI CARBONATICI DEI MOLLUSCHI

#### 2.1 La biomineralizzazione

La formazione degli esoscheletri carbonatici può essere considerata in termini di processi cellulari di trasporto di ioni, sintesi e secrezione proteica e in termini di processi chimico-fisici di formazione dei cristalli di  $\text{CaCO}_3$  (Wilbur & Saleuddin, 1983).

La deposizione dei cristalli di carbonato e la secrezione proteica avvengono all'interno del mantello, tegumento ciliato, ricoperto da uno strato di epitelio "esterno", in contatto con l'acqua ambientale da un lato e con i tessuti interni dall'altro, e da un epitelio "interno" (calcifying epithelium) che secerne le macromolecole e gli ioni che andranno a costituire la conchiglia. Come è possibile notare dalla Fig.1 il mantello (indicato col termine generico di tessuto) non è direttamente in contatto con la conchiglia ma tra i due vi è uno spazio extrapalliale riempito con un fluido (fluido extrapalliale, EPF), sovrassaturo rispetto al  $\text{CaCO}_3$ , in cui avvengono i processi di mineralizzazione.

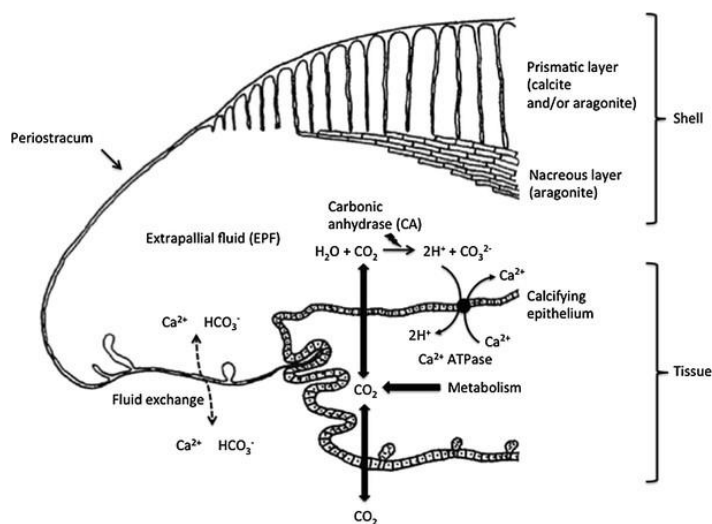


Fig.1 Biomineralizzazione nei molluschi (da Gazeau et al., 2013)

Gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , introdotti all'interno del corpo del mollusco mediante o assorbimento passivo attraverso le parti molli o filtrazione o, ancora, attraverso il sistema digerente, vengono trasportati dal sistema emolinfatico e concentrati nel mantello. Nel caso dei molluschi marini e di acqua dolce,  $\text{Ca}^{2+}$  e gli altri ioni provengono dall'acqua o vengono introdotti mediante il cibo mentre per quanto riguarda i gasteropodi terrestri l'unica fonte di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  è la dieta. A causa delle basse

concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  in ambienti di acqua dolce, gli ioni calcio non vengono assorbiti mediante trasporto passivo ma mediante l'azione dell'ATPasi (Wilbur, 1964).

Gli ioni bicarbonato possono derivare o dall'introduzione di  $\text{HCO}_3^-$  mediante le stesse modalità viste per il calcio oppure a seguito della reazione tra  $\text{CO}_2$  metabolica e  $\text{H}_2\text{O}$  presenti nel fluido extrapalliale. Quest'ultima reazione è catalizzata dall'enzima anidrasi. Cristalli di carbonato vengono assemblati all'interno della conchiglia da una matrice organica derivante dalla fissazione di  $\text{CO}_2$  all'interno di EPF (Wilbur, 1964). La conchiglia è composta esternamente da un sottile strato chiamato periostraco composto da glicoproteine e macromolecole che promuovono la nucleazione, la direzione di crescita dei cristalli e agiscono come strato protettivo nel caso di rottura della conchiglia. Lo strato mediano, detto strato prismatico, è costituito da cristalli di calcite e/o aragonite circondati da una matrice organica mentre lo strato interno, madreperlaceo, è costituito da cristalli di aragonite o carbonato di calcio amorfo depositati come lamelle sottili.

## 2.2 Le equazioni di paleo-temperatura

I carbonati sono tra i minerali più studiati in geochimica isotopica grazie al loro utilizzo -a seguito degli studi pionieristici di McCrea (1950) e Urey (1951) - come paleo-termometri. Un paleotermometro è costruito sul concetto base secondo cui il frazionamento  $\alpha$ , ovvero la ripartizione degli isotopi dell'ossigeno del componente chimico  $\text{CaCO}_3$  della fase solida e gli isotopi dell'ossigeno della specie chimica  $\text{H}_2\text{O}$  nella fase liquida, che avviene in condizioni di equilibrio termodinamico, è funzione della temperatura:

$$1000 \ln(\alpha) = a T^{-2} + b \quad (1)$$

dove la T è espressa in Kelvin e

$${}^{18/16}\alpha_{\text{CaCO}_3\text{-acqua}} = \left(\frac{{}^{18}\text{O}}{{}^{16}\text{O}}\right)_{\text{CO}_3^{2-},\text{CARBONATO}} / \left(\frac{{}^{18}\text{O}}{{}^{16}\text{O}}\right)_{\text{H}_2\text{O},\text{LIQUIDO}} = {}^{18/16}R_{\text{CO}_3^{2-},\text{CARBONATO}} / {}^{18/16}R_{\text{H}_2\text{O},\text{LIQUIDO}}$$

più semplicemente scritto come

$$\alpha_{\text{carbonato-acqua}} = (\delta_{\text{carbonato}} + 1) / (\delta_{\text{acqua}} + 1) \quad (1a)$$

Gli studi condotti sui carbonati biogenici mostrano come la precipitazione dei gusci carbonatici di molti organismi, tra cui i molluschi, avvenga in condizioni di equilibrio isotopico o prossime all'equilibrio isotopico. L'equazione di paleo-temperatura più nota, derivata da studi empirici

effettuati su molluschi marini, è quella di Epstein et al. (1953) per quanto riguarda il sistema calcite-acqua:

$$T (^{\circ}\text{C}) = 16.5 - 4.3 (\delta_{\text{CO}_2, \text{carbonato(PDB)}} - \delta_{\text{CO}_2(\text{acqua})(\text{SMOW})}) + 0.14 (\delta_{\text{CO}_2, \text{carbonato(PDB)}} - \delta_{\text{CO}_2(\text{acqua})(\text{SMOW})})^2 \quad (2)$$

dove  $\delta_{\text{CO}_2, \text{carbonato}}$  è il valore della  $\text{CO}_2$  liberata dalla reazione del carbonato con l'acido fosforico 100% a 25 °C e  $\delta_{\text{CO}_2(\text{acqua})}$  rappresenta il valore della  $\text{CO}_2$  equilibrata con l'acqua a 25°C.

Per l'aragonite, utilizzando i dati di Grossman & Ku (1986), Dettman et al (1999) hanno riformulato l'equazione delle paleotemperature:

$$1000 \ln \alpha = 2.559 (10^6 T^{-2}) + 0.715 \quad (3)$$

$$\text{dove } \alpha = (\delta_{\text{CO}_3^{2-}, \text{aragonite}(\text{SMOW})+1})/(\delta_{\text{H}_2\text{O}, \text{acqua}(\text{SMOW})+1}) = (\delta_{\text{aragonite}(\text{SMOW})+1}) / ((\delta_{\text{acqua}(\text{SMOW})} + 1))$$

Kim et al. (2007) propone un'equazione di calibrazione aragonite sintetica-acqua (4) utilizzando un fattore di frazionamento acido a 25°C pari a 1.01063

$$1000 \ln \alpha_{\text{CO}_2, \text{aragonite-acqua}} = 17.88 \pm 0.13 (10^3/T) - 31.14 \pm 0.46 \quad (4)$$

Per poter confrontare tale equazione con quelle derivate da studi sulla aragonite biogenica, è necessario applicare lo stesso fattore di frazionamento acido. Come riportato da Kim et al. (2007) le rette di regressione dell'aragonite biogenica sono statisticamente uguali a quella proposta per l'aragonite inorganica, compresa all'interno dell'errore standard della regressione.

Presupponendo un frazionamento  $\alpha_{\text{aragonite inorganica-acqua}}$ , tale risultato mostra come anche l'aragonite biogenica delle specie considerate nei diversi studi, precipiti in condizioni prossime all'equilibrio.

Parallelamente, un'equazione di calibrazione calcite-acqua è stata proposta da O'Neil (1969) (5) e rivista successivamente nel 1997 da Kim & O'Neil riconsiderando anche il valore del fattore di frazionamento acido (6)

$$1000 * \ln(\alpha_{\text{calcite-acqua}}) = 2.78 * (10^6/T^2) - 2.89 \quad (5)$$

$$1000 * \ln(\alpha_{\text{calcite-acqua}}) = 18.03 (10^3/T) - 32.42 \quad (6)$$

Il frazionamento  $\alpha_{\text{minerale-acqua}}$  è diverso tra i due polimorfi del carbonato aragonite e calcite. Numerosi studi hanno cercato di quantificare sia il valore del frazionamento sia la direzione, ma non vi è accordo circa i risultati ottenuti. Le osservazioni empiriche mostrano un frazionamento tra aragonite e calcite compreso tra 0.4 e 1.4‰ (Grossman & Ku, 1986; Patterson et al., 1993; Rahimpour-Bonab et al., 1997; Thorrold et al., 1997; White et al., 1999; Bohm et al. 2000); le determinazioni sperimentali di Tarutani et al. (1969) indicano un frazionamento aragonite-calcite di

0.8‰; le determinazioni teoriche di Zheng (1999) indicano un frazionamento aragonite-calcite di -4.44‰.

### 2.3 Analisi isotopica dell'ossigeno del carbonato dei molluschi di acqua dolce

I molluschi di acqua dolce precipitano il loro esoscheletro aggiungendo strati di carbonato in equilibrio con la soluzione acquosa circostante, registrando, in continuo, tutte le variazioni chimiche e isotopiche che avvengono in quella porzione specifica di sistema naturale. Come mostrato nel paragrafo 2.1, i fattori principali che controllano il valore  $\delta^{18}\text{O}$  del carbonato sono la composizione isotopica dell'acqua al momento della deposizione e la temperatura. Ciò significa che conoscendo ad esempio il valore  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  e  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}}$  è possibile stimare la temperatura e quindi utilizzare le conchiglie come archivio di *data proxy* per studi paleo-climatici ad elevata risoluzione. La maggior parte degli studi di ricostruzione climatica mediante i molluschi vedono coinvolti principalmente i molluschi marini in quanto si assume che la composizione dell'acqua marina sia costante. Nel caso invece dei sistemi di acqua dolce, i fattori che possono influenzare la composizione isotopica dell'acqua sono diversi e quindi è necessario conoscere bene il sistema studiato.

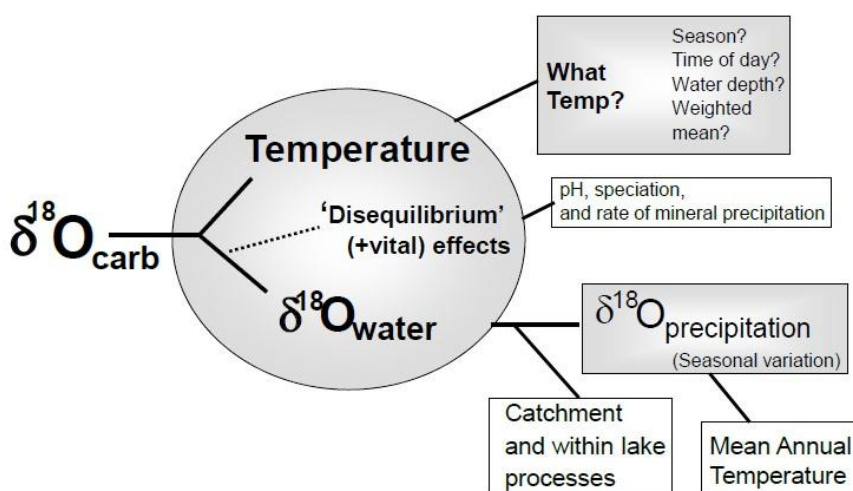


Fig.2 Fattori che influenzano il valore  $\delta^{18}\text{O}$  dell'acqua (da Leng & Marshall, 2004)

Il valore  $\delta^{18}\text{O}$  dell'acqua è funzione, infatti, della composizione isotopica di tutti gli input idrici quali le precipitazioni, fenomeni quali l'evaporazione e delle caratteristiche idrogeologiche del sistema acquatico considerato quali ad esempio il tempo di residenza dell'acqua (Leng & Marshall, 2004) (Fig.2). Le variazioni di temperatura influenzano la composizione isotopica dell'ossigeno durante la precipitazione del carbonato ma influenzano anche la composizione isotopica delle precipitazioni in termini di temperatura di condensazione, e agiscono localmente sui processi di

evaporazione. Piccole deviazioni dalle condizioni di precipitazione del carbonato all'equilibrio sono poi dovute a effetti metabolici legati alla specie in questione (*vital effect*).

### 2.3.1 Fattori che influenzano la composizione delle precipitazioni

Durante i processi che coinvolgono cambiamenti di fase, come l'evaporazione delle acque oceaniche o la condensazione di masse sature di vapore, si verificano frazionamenti isotopici dovuti alle diverse tensioni di vapore delle molecole di acqua costituite da isotopi pesanti rispetto alle molecole di acqua costituite da isotopi leggeri ( $^1\text{H}^1\text{H}^{16}\text{O}$ ,  $^1\text{H}^1\text{H}^{18}\text{O}$ ,  $^1\text{H}^2\text{H}^{16}\text{O}$ ,  $^1\text{H}^1\text{H}^{17}\text{O}$ ). In generale il vapore risulterà impoverito in isotopi pesanti rispetto all'acqua di partenza, mentre la fase condensata sarà arricchita in isotopi pesanti rispetto alla frazione di vapore residuo. Il processo di condensazione, che avviene in condizioni di umidità pari al 100%, è legato all'equilibrio isotopico liquido-vapore e, presupponendo la rimozione della fase condensata, la variazione della composizione isotopica delle piogge si può ricondurre ad una distillazione di Rayleigh.

La composizione isotopica delle precipitazioni dipende dalla composizione isotopica iniziale del vapore, dalla temperatura di condensazione e dalla pressione dell'aria. Le principali conseguenze della dipendenza della composizione isotopica delle precipitazioni dalla temperatura di condensazione del vapore sono:

- *effetto stagionalità*: le precipitazioni che si formano alle medie e alte latitudini in zone caratterizzate da grandi escursioni termiche, risentiranno della differente temperatura di condensazione estiva (valori più alti  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ ) e invernale (valori più bassi  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ )
- *effetto latitudine*: procedendo dalle basse latitudini verso le alte latitudini il vapore, a seguito di condensazioni parziali successive, diverrà impoverito in isotopi pesanti e genererà ai poli piogge caratterizzate da bassi valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ ;
- *effetto continentalità*: assumendo che al procedere dalla costa verso le aree interne la temperatura di condensazione diminuisca progressivamente, si genereranno piogge via via arricchite in isotopi leggeri, cioè con valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  sempre più bassi;
- *effetto altitudine*: in presenza di un rilievo, le masse d'aria tendono a risalire lungo il pendio. Mano a mano che le masse d'aria salgono, a causa dell'espansione adiabatica si raffreddano sempre più; in tal modo si generano precipitazioni con valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  via via più bassi.

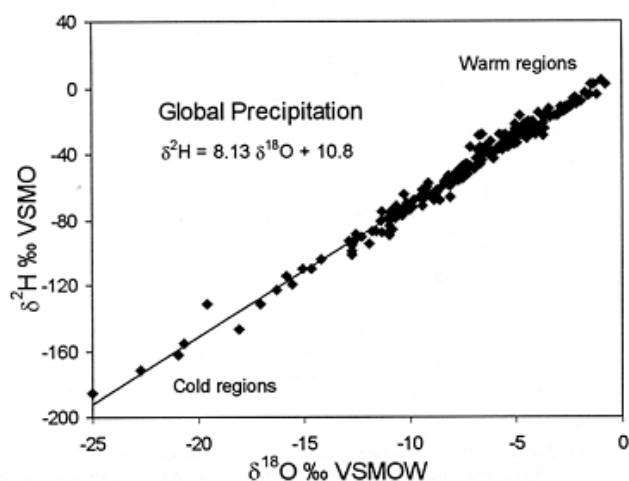


Fig. 3. Retta delle precipitazioni globali (da Rozansky, 1993)

Se si riportano i valori isotopici delle precipitazioni di tutto il mondo in un diagramma  $\delta^2\text{H} / \delta^{18}\text{O}$ , i punti si allineano lungo una retta di regressione con equazione (Fig.3)

$$\delta^2\text{H} = 8.13 * \delta^{18}\text{O} + 10.8\text{‰}$$

La pendenza della retta ( $\approx 8$ ) è data dal rapporto tra i fattori di frazionamento all'equilibrio dell'ossigeno e idrogeno a 25-30 °C durante il passaggio di stato vapore/fase condensata. L'intercetta, chiamata eccesso di deuterio, ha significato fisico ed è un termine legato al "frazionamento cinetico" (condizioni di stato stazionario non di equilibrio termodinamico) durante l'evaporazione di un'acqua oceanica che passa allo stato vapore ad una umidità media dell'85%. Le acque soggette ad evaporazione si collocano nella porzione destra del piano cartesiano, su rette con pendenze inferiori, non spiegabili, quindi, considerando un sistema all'equilibrio. In condizioni di umidità inferiori al 100%, infatti, il fenomeno dell'evaporazione non è governato dall'equilibrio termodinamico.

Lo studio condotto da Zanchetta et al., (2005 su gasteropodi terrestri raccolti in diverse località della penisola italiana, mostra come vi sia una correlazione significativa tra il valore  $\delta^{18}\text{O}$  delle conchiglie e il valore  $\delta^{18}\text{O}$  delle piogge locali (Fig.4) e nel contempo come fattori regionali possano influire su tale relazione. In aree caratterizzate da un'ampia variabilità dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  dell'acqua ambientale, non vi è correlazione tra composizione isotopica delle piogge e carbonato conchigliare. Abell (1985), effettuando uno studio su grande scala su gasteropodi africani, mostra quanto sia complesso determinare in assoluto quale variabile influenza il valore isotopico dell'ossigeno delle precipitazioni e delle conchiglie.

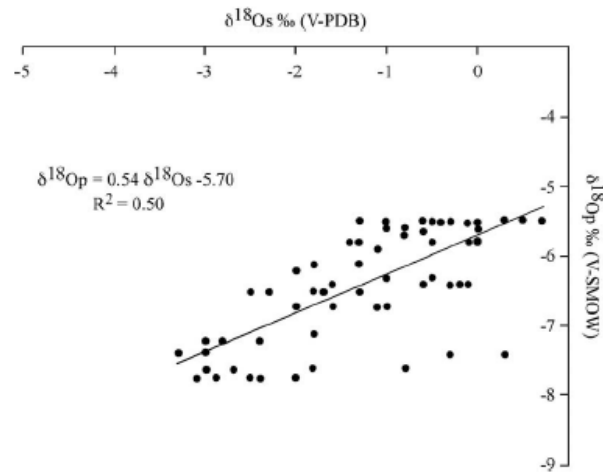


Fig.4. Valori  $\delta^{18}\text{O}$  medi del carbonato di gasteropodi terrestri in funzione dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  delle piogge locali (da Zanchetta et al., 2005)

La correlazione tra valori  $\delta^{18}\text{O}$  del carbonato e  $\delta^{18}\text{O}$  delle precipitazioni è piuttosto di tipo qualitativo: i gasteropodi rinvenuti in aree caratterizzate da una copertura vegetazionale permanente (abbondanti piogge) presentano valori  $\delta^{18}\text{O}$  più bassi rispetto ai gasteropodi cresciuti in aree dove la copertura vegetazionale è di tipo stagionale (Fig.5)



Fig.5 Mappatura della copertura vegetazionale in Africa (da Tucker et al. 1985 modificata da Abell 1985)

#### 2.4 Analisi isotopica del carbonio del carbonato dei molluschi di acqua dolce

Il valore  $\delta^{13}\text{C}$  delle conchiglie dei molluschi di acqua dolce riflette la composizione isotopica del carbonio inorganico disciolto (DIC), come dimostra l'esperimento condotto da Fritz & Poplawski (1974). Tuttavia, non esiste una semplice relazione che leghi  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carbonato}}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ . Il motivo è da

ricercarsi nella variabilità dei fattori che influenzano la composizione isotopica del DIC (Fig.6) ovvero:

- scambio di CO<sub>2</sub> tra atmosfera e acqua
- processi fotosintetici che avvengono all'interno del sistema acquatico
- processi fotosintetici delle piante terrestri
- mineralogia del substrato
- processi di decomposizione della materia organica
- composizione isotopica del carbonio delle acque in ingresso.

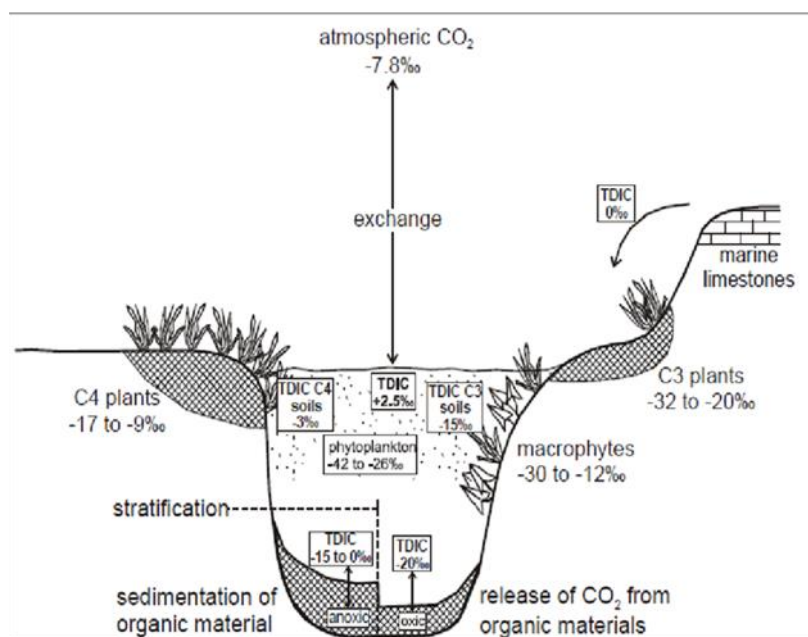


Fig.6 Fattori che influenzano il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  (da Leng & Marshall, 2004)

Il fattore di frazionamento all'equilibrio generalmente usato per gli isotopi del carbonio è quello calcolato empiricamente da Romanek et al. (1992):

$$\alpha_{\text{CaCO}_3, \text{carbonato}-\text{HCO}_3, \text{soluzione}} = 1.0027 \pm 0.00006$$

ed è debolmente dipendente dalla temperatura.

Molti autori riconducono la deviazione dalle condizioni di equilibrio al cosiddetto *vital effect*. McConnaughey (2003) propone un possibile meccanismo che spiegherebbe la deviazione dalle condizioni di equilibrio (*modello cinetico*). In sintesi, il modello "cinetico" è costruito sull'idea che la composizione isotopica dei carbonati biogenici rifletta la CO<sub>2</sub> molecolare contenuta nel fluido extrapalliale. Il fluido è separato dall'acqua ambientale mediante una membrana che è permeabile alla CO<sub>2</sub> ma non agli ioni HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La CO<sub>2</sub> diffonde attraverso la membrana e, reagendo con l'acqua

presente, forma DIC. Queste reazioni producono un abbassamento dei valori  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  nel DIC e nel carbonato della conchiglia (McConnaughey, 2003). La precipitazione dal DIC è molto più rapida al raggiungimento delle condizioni di equilibrio con i fluidi circostanti.

Anche la  $\text{CO}_2$  metabolica, derivante dalla dieta, può essere un fattore importante che controlla il valore  $\delta^{13}\text{C}$  dei carbonati (Tanaka et al., 1986; Dettmann et al., 1999). Il carbonio metabolico ha solitamente un valore  $\delta^{13}\text{C}$  più basso rispetto al DIC. Quando il valore  $\delta^{13}\text{C}$  della conchiglia è più basso di quello stimato mediante il fattore di frazionamento  $\alpha_{\text{CaCO}_3, \text{carbonato}-\text{HCO}_3, \text{soluzione}}$  - si può sospettare un contributo da parte della  $\text{CO}_2$  metabolica.

## CAPITOLO 3

### L'APATITE BIOLOGICA

#### 3.1 La biomineralizzazione

L'osso è un organo complesso la cui struttura e funzione possono essere descritte a diversi livelli gerarchici che vanno dal macroscopico fino ad arrivare al sub-nanostrutturale (Fig.7)

A livello molecolare l'osso è costituito da cristalli di apatite biologica immersi in una matrice organica e acqua. La frazione organica è rappresentata al 90% da collagene.

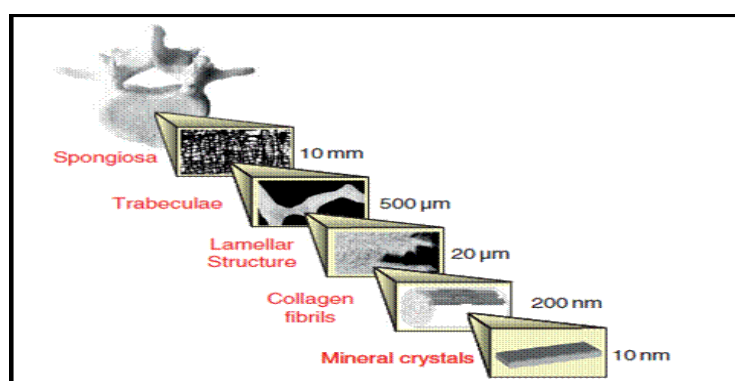


Fig.7 Organizzazione gerarchica delle ossa (da Fratzl, 2012)

Il fosfato di calcio costituisce almeno 2/3 del peso dell'osso e conferisce ad esso resistenza alla compressione. Differenti livelli di rigidità tuttavia caratterizzano le diverse ossa a seconda della loro funzione. Il movimento veloce e la grande agilità di animali quali il cervo richiedono ossa con grande elasticità e relativamente basso contenuto minerale (circa il 50 % del peso). Al contrario, le ossa di grandi mammiferi marini come la balena sono rigide, con un contenuto maggiore dell'80% (Mann, 2001). Studi di diffrazione ai raggi X hanno individuato similarità dei componenti inorganici con il minerale idrossiapatite, membro di una serie di sostanze isomorfe (Fig. 8) con formula semplificata



Tuttavia, la composizione chimica dei biominerali non corrisponde a questa formula ideale; infatti essi contengono il gruppo  $\text{CO}_3^{2-}$  e, inoltre, essi mostrano un rapporto Ca/P che può variare molto dal valore stechiometrico (Rey et al., 2006).

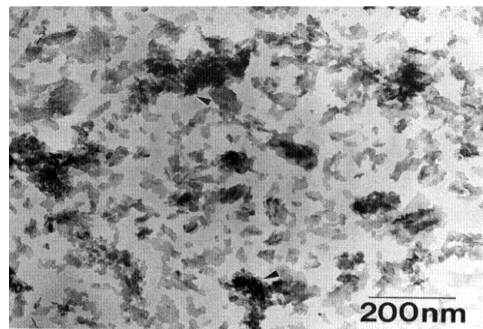
I cristalli dell'idrossiapatite biologica sono in genere piatti (Fig.9), mentre l'apatite non biogenica si presenta prevalentemente in cristalli prismatici.

No.	Name	Molecular formula	Lattice constants (nm)	
			a	c
1	Barium hydroxylapatite	Ba <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	1.019	0.770
2	Cadmium arsenic-chlorapatite	Cd <sub>10</sub> (AsO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub>	1.007	0.726
3	Cadmium hydroxylapatite	Cd <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	0.901	0.661
4	Cadmium chlorapatite	Cd <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub>	0.962	0.649
5	Calcium hydroxylapatite	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	0.942	0.688
6	Carbonate apatite <sup>a</sup>	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> CO <sub>3</sub>	0.956	0.687
7	Chlorapatite	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub>	0.963	0.678
8	Ferromite	Ca <sub>10</sub> (AsO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> F <sub>2</sub>	0.975	0.692
9	Fluorapatite	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> F <sub>2</sub>	0.935	0.658
10	Hydroxylvanadinite	Ca <sub>10</sub> (VO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	0.982	0.698
11	Lead hydroxylapatite	Pb <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	0.990	0.729
12	Magnesium apatite	Mg <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	0.930	0.689
13	Mimetite <sup>b</sup>	Pb <sub>10</sub> (AsO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub>	1.036	0.752
14	Pyromorphite <sup>b</sup>	Pb <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (Cl) <sub>2</sub>	0.995	0.732
15	Strontium hydroxylapatite	Sr <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	0.976	0.728
16	Vanadinite	Pb <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub>	1.047	0.743

<sup>a</sup> Ambiguity exists regarding the molecular formula.

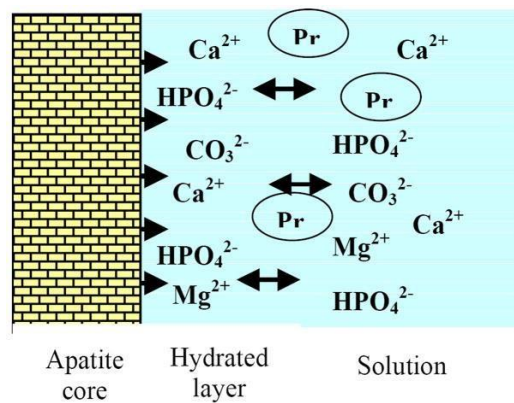
<sup>b</sup> Also reported as members of the pyromorphite series.

**Fig.8** Serie isomorfa dell'apatite (da Narasaraaju and Phebe, 1996)



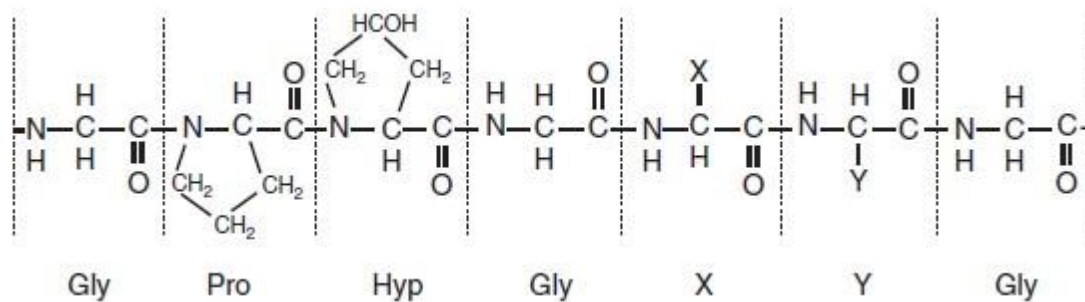
**Fig.9** Cristalli di apatite biologica al microscopio elettronico a trasmissione (da Su et al., 2002)

La superficie del minerale di origine biologica è circondata da uno strato idratato (Fig.10) caratterizzato da diversi ioni molto reattivi (Cazalbou et al., 2004).



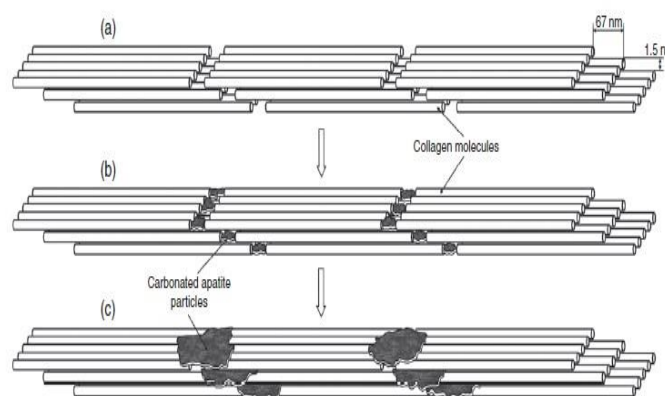
**Fig.10** Presenza di uno strato idratato sulla superficie del cristallo (da Rey et al., 2009).

Le specie ioniche presenti nello strato idratato, caratterizzate da legami deboli, vengono incorporate nel cosiddetto dominio dell'apatite (Rey, 2006), in equilibrio con le condizioni fisiologiche dell'organismo. I cristalli di apatite biologica sono immersi in una matrice organica costituita per lo più da fibre di collagene. Queste conferiscono all'osso resistenza alla trazione. Il collagene di Tipo I, il più abbondante, è costituito da una sequenza ripetuta di amminoacidi (Gly-X-Y)<sub>n</sub> dove X e Y sono generalmente prolina e idrossiprolina (Fig.11).



**Fig.11** Tipica sequenza di amminoacidi nel collagene di tipo I

Il tropocollagene, l'unità strutturale di base, è costituito da tre catene polipeptidiche le quali, stabilendo tra esse legami idrogeno, risultano in una superelica destrorsa. Secondo il modello proposto da Petruska e Hodge, le molecole di tropocollagene sono organizzate in una struttura sfalsata: esiste un vuoto tra NH<sub>2</sub>-terminale di una tripla elica e il gruppo COOH-terminale della successiva. In altre parole, le molecole di collagene sono caratterizzate da zone di *gap* e *overlap*. Il processo di mineralizzazione del collagene inizia nelle zone di *gap* e successivamente i cristalli di bioapatite si estendono nelle zone di *overlap* (Fig.12).



**Fig.12** Mineralizzazione del collagene (da Fratzs 2012).

### 3.2 Gli isotopi dell'ossigeno dei gruppi $PO_4^{3-}$ e $CO_3^{2-}$

I primi studi che videro coinvolto l'ossigeno del gruppo  $PO_4^{3-}$  dell'apatite biogenica furono quelli di Longinelli & Nuti (1973) e Kolodny et al. (1983). Questi ultimi autori, per verificare se l'ossigeno del gruppo fosfato viene incorporato in equilibrio con l'acqua circostante-assumendo che vi sia uno scambio lento tra gli ioni  $PO_4^{3-}$  e la soluzione acquosa- o se piuttosto esso riflette il valore di composizione degli ioni fosfato introdotti con la dieta, analizzarono il valore  $\delta^{18}O$  della bioapatite contenuta nelle ossa di pesci prelevati a diverse profondità in un lago stratificato. I risultati ottenuti hanno mostrato una variazione nel valore  $\delta^{18}O$  coerente con una variazione della temperatura in funzione della profondità, piuttosto che un valore  $\delta^{18}O$  costante coerente, invece, con un'assunzione di ioni fosfato senza riequilibrio interna. Kolodny et al. (1983) propongono, quindi, un'equazione di paleo-temperatura che non differisce da quella proposta qualche anno prima da Longinelli & Nuti (1973) calcolata a partire dall'analisi isotopica dell'ossigeno del gruppo  $PO_4^{3-}$  di conchiglie e altri organismi marini (8):

$$T(^{\circ}C) = 111.4\text{‰} - 4.3 * (10^3 \delta^{18}O_{PO_4^{3-}, \text{apatite}} - 10^3 \delta^{18}O_{H_2O, \text{acqua}} + 0.5) \quad (8)$$

dove  $\delta^{18}O_{PO_4^{3-}}$  e  $\delta^{18}O_{H_2O}$  sono espressi in VSMOW.

La dipendenza del frazionamento  $\alpha_{PO_4^{3-}-H_2O}$  dalla temperatura è molto simile a quella trovata per il carbonato-vi è una differenza di circa 9‰ tra carbonato e fosfato ma tale differenza rimane costante- per cui l'idea di usare il frazionamento  $PO_4^{3-}$  e  $CO_3^{2-}$  per cercare di desumere la temperatura alla quale questi due minerali sono precipitati o parimenti la composizione dell'acqua, e quindi utilizzarlo come paleo-termometro, è stata del tutto abbandonata.

L'utilizzo del fattore di frazionamento  $\alpha_{PO_4^{3-}, \text{bioapatite}-H_2O, \text{acqua}}$  ha trovato ugualmente un grande utilizzo negli studi paleoclimatici. A seguito di studi condotti sui mammiferi (Longinelli & Palladino, 1980; Luz et al. (1984)) è stata trovata una relazione tra  $\delta^{18}O_{\text{fosfato}}$  e  $\delta^{18}O$  dell'acqua ingerita (9). Nel caso di animali che assumono grandi quantitativi di acqua, il valore  $\delta^{18}O$  dell'acqua ingerita riflette il valore  $\delta^{18}O$  dell'acqua meteorica locale. Per i diversi animali omeotermici e non solo, sono state proposte negli anni numerose correlazioni.

Nel caso dei pesci, ad esempio, Pucéat et al (2010) propongono una nuova correlazione:

$$T(^{\circ}C) = 124.6 \text{‰} - 4.52 * (\delta^{18}O_{PO_4^{3-}, \text{bioapatite}} - \delta^{18}O_{H_2O, \text{acqua}})$$

Quando si utilizzano queste rette per ottenere informazioni di carattere paleo-climatico bisogna comunque considerare che l'incertezza associata alla stima del valore  $\delta^{18}O_{H_2O, \text{acqua}}$ , ad esempio nel caso degli umani, è di 2.5‰ (Iacumin & Venturelli, 2015).

Anche l'ossigeno del gruppo  $\text{CO}_3^{2-}$  si equilibra con i liquidi corporei ma con un fattore di frazionamento  $\alpha_{\text{CO}_3^{2-}\text{-carbonato}-\text{H}_2\text{O,acqua}}$  (10) diverso da quello tra fosfato e acqua; infatti:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4^{3-}\text{-bioapatite}} = 1.0691 * \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O,acqua}} + 25.059\text{‰} \quad (9)$$

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{CO}_3^{2-}\text{-carbonato}} = 0.9982 * \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O,acqua}} + 33.623\text{‰} \quad (10)$$

L'esistenza di una buona correlazione tra  $\delta^{18}\text{O}_{\text{CO}_3^{2-}\text{-carbonato}}$  e  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4^{3-}\text{-bioapatite}}$  (Iacumin et al., 1996; Bryant et al., 1996) può fornire informazioni circa lo stato di preservazione della bioapatite. Nel caso dei pesci la composizione isotopica dell'ossigeno del gruppo  $\text{CO}_3^{2-}$  dell'apatite è circa 9.1 ‰ più grande della composizione isotopica dell'ossigeno del gruppo  $\text{PO}_4^{3-}$ , valore in accordo con un frazionamento all'equilibrio tra carbonato e fosfato ma con un valore di deviazione standard di  $\pm 1.5$  ‰ (Vennemann et al., 2001)

### 3.3 Gli isotopi del carbonio del gruppo $\text{CO}_3^{2-}$

La composizione isotopica del carbonio dei tessuti animali riflette quella del carbonio introdotto attraverso la dieta (De Niro and Epstein, 1978). Ogni tessuto avrà un caratteristico valore  $\delta^{13}\text{C}$  in relazione alla sua composizione e al tempo di *turnover* cellulare (Tieszen et al., 1983). Il segnale isotopico del carbonio contenuto nell'apatite biologica e nel collagene delle ossa riflette un valore della dieta integrato lungo tutto il periodo di vita dell'organismo. Nello specifico, il collagene riflette quello della porzione proteica mentre il valore  $\delta^{13}\text{C}$  dell'apatite è influenzato dal catabolismo di tutti i componenti. La differenza tra  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_3^{2-}\text{-apatite}}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  è di circa 7‰ per gli erbivori e del 4‰ per i carnivori (Sullivan and Krueger, 1984). Il valore isotopico del carbonio del collagene è arricchito di circa il 5 ‰ rispetto alla dieta e questo valore si trasmette lungo tutta la catena trofica con un ulteriore arricchimento dell'1‰ per ciascun passaggio di livello trofico (De Niro and Epstein, 1978; Sullivan and Krueger, 1981; Ambrose e Norr, 1993), mentre nel carbonio dell'apatite biologica l'arricchimento è compreso tra 12-14‰ per gli erbivori ungulati e tra 9-10‰ per i carnivori. Tali differenze sono legate sia alla qualità della dieta, intesa come differenti proporzioni di macronutrienti introdotti (gli erbivori hanno una dieta costituita per la maggior parte da carboidrati e derivano le proteine dalle piante e dalla transaminazione di chetoacidi) e differente sorgente di macronutrienti (l'apporto di proteine per i carnivori è rappresentato dalla preda mangiata) sia legate alla fisiologia dell'animale sia alla taglia. Nel caso specifico degli erbivori, numerosi studi hanno evidenziato come sia maggiore l'arricchimento  $\delta^{13}\text{C}$  dell'apatite rispetto alla dieta nel caso di grandi ruminanti (Cerling and Harris, 1999) e minore nel caso di animali di piccola

taglia o che comunque producono insignificanti quantità di metano (Ambrose and Norr, 1993). La taglia dell'animale influisce anche sul valore isotopico del collagene. Infatti, l'arricchimento del 5‰ rispetto alla dieta è un valore medio.

Mammiferi di piccola taglia presentano un arricchimento compreso tra 0,5 e 4,6 ‰, mentre i grandi mammiferi tra 4,7 e 6,6 ‰.

Oltre a fornire informazioni sui diversi livelli trofici della catena alimentare, l'analisi dei valori  $\delta^{13}\text{C}$  dell'apatite biologica e del collagene permette di ricavare informazioni riguardanti la copertura vegetazionale dell'ambiente in cui l'organismo è vissuto. Procedendo infatti lungo la rete trofica in senso *top-down* si arriva alle piante, organismi autotrofi.

A seconda della via metabolica di assimilazione di  $\text{CO}_2$ , le piante vengono suddivise in tre grandi gruppi: piante  $\text{C}_3$ , con ciclo di Calvin, piante  $\text{C}_4$ , con ciclo di Hatch-Slack, e CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Esse sono caratterizzati da specifici intervalli di valori isotopici, che, nel caso delle piante  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , non si sovrappongono, avendo le prime valori compresi tra -35‰ e -22‰ e le seconde valori compresi tra -14 ‰ e -9‰ (Smith and Epstein, 1971). Le CAM invece presentano un intervallo di valori  $\delta^{13}\text{C}$  molto ampio, sovrapponibile a quello degli altri due gruppi (tra -30‰ e -10‰). La  $\text{CO}_2$  atmosferica ha un valore  $\delta^{13}\text{C}$  di circa -7,8‰ (Marino and McElroy, 1991); pertanto, il motivo di valori così diversi nelle piante è da ricercarsi nella discriminazione contro  $^{13}\text{CO}_2$  atmosferica. Le molecole di  $^{12}\text{CO}_2$  atmosferica, infatti, diffondono più velocemente delle molecole  $^{13}\text{CO}_2$  nelle foglie e ciò provoca un frazionamento di tipo diffusivo di circa -4‰ (O'Leary, 1981). Un frazionamento più grande è operato dalla carbossilazione iniziale.

Nelle  $\text{C}_3$ , la via metabolica di fissazione della  $\text{CO}_2$  più comune, la carbossilazione ad opera dell'enzima *ribulosio-1,5-difosfato carbossilasi*, causa un frazionamento di circa 29‰.

Nelle piante  $\text{C}_4$ , tipiche di zone tropicali con clima secco o umido (Fig. 13), la  $\text{CO}_2$  viene fissata ad opera dell'enzima fosfoenolpiruvato carbossilasi, dopo conversione in  $\text{HCO}_3^-$ . La formazione degli acidi  $\text{C}_4$  avviene nelle cellule del mesofillo. L'ossalacetato diffonde poi verso le cellule della guaina del fascio e la  $\text{CO}_2$  entra nel ciclo di Calvin. L'entità del frazionamento cinetico in questo caso è di circa 2‰ (Farquhar et al., 1989).

Il metabolismo CAM è tipico di piante succulenti adattate a condizioni estreme. Esse, infatti, sono caratteristiche di zone in cui l'acqua è il principale fattore limitante. In questo caso la fosfoenolpiruvato carbossilasi di notte cattura la  $\text{CO}_2$  convertendola in ossalacetato, a sua volta convertito in malato e accumulato nel vacuolo. La decarbossilazione avviene di giorno: il malato dal vacuolo viene trasportato nel cloroplasto e decarbossilato e la  $\text{CO}_2$  risultante è fissata dal ciclo di Calvin. L'apertura degli stomi durante la notte riduce la perdita di acqua.

La via metabolica C<sub>4</sub> è favorita in condizioni di elevate temperature e/o basse concentrazioni di CO<sub>2</sub> atmosferica mentre le piante C<sub>3</sub> richiedono un ambiente più umido caratterizzato da temperature minori. Quando la pressione parziale della CO<sub>2</sub> è bassa, infatti, il tasso di fotorespirazione delle C<sub>3</sub> aumenta, causando una diminuzione della produttività.

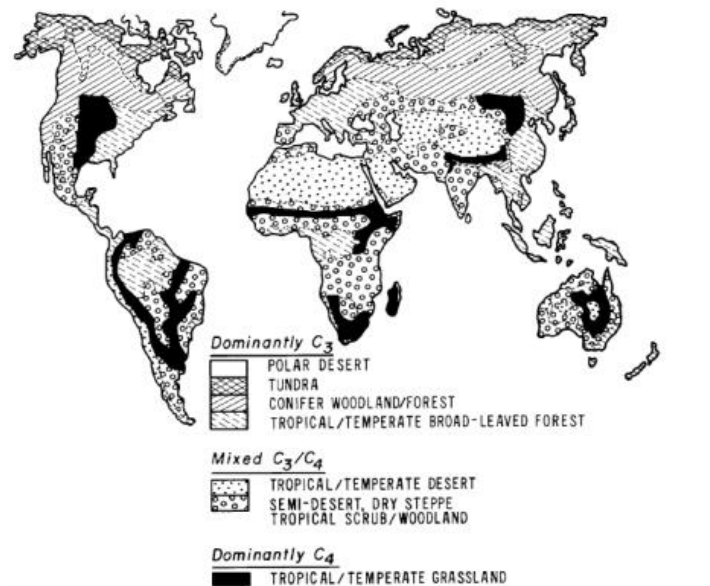


Fig.13 Distribuzione delle piante C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> (da Cerling and Quade, 1993)

Se consideriamo l'ambiente acquatico, il frazionamento dieta-apatite dei mammiferi marini è uguale a quello misurato per i mammiferi terrestri. Da tenere in considerazione è il fatto che le piante acquatiche utilizzano come fonte di carbonio la CO<sub>2</sub> disciolta nelle acque che ha un valore  $\delta^{13}\text{C}$  pari a circa 0‰. Il valore isotopico del carbonio delle piante acquatiche risulterà, quindi, maggiormente positivo di quello delle piante terrestri. Gli animali ectotermi, quali ad esempio i pesci, derivano il carbonio del gruppo CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> sia dalla dieta che dalle specie di carbonio inorganico disciolte nell'acqua (come nel caso dei molluschi).

# PARTE II

---

## Materiali e metodi

## CAPITOLO 4

### IL SITO ARCHEOLOGICO DI AL-KHIDAY

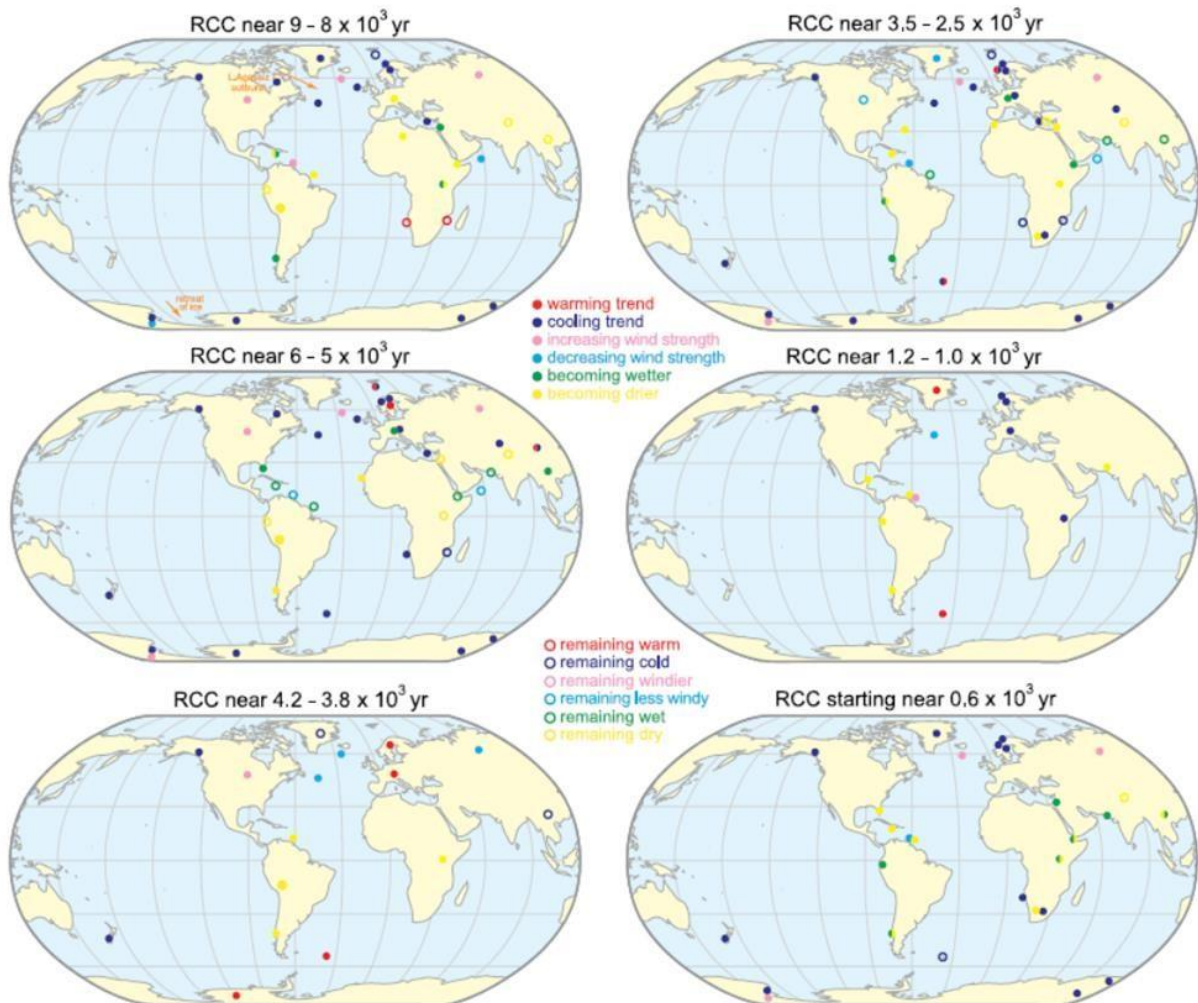
#### 4.1 Le variazioni climatiche avvenute durante l'Olocene

L'Olocene è l'Epoca geologica più recente il cui inizio è stato convenzionalmente fissato a 11.700 BP. Per molto tempo l'Olocene, dal punto di vista climatico, è stato considerato un sistema stazionario che si è susseguito al periodo di alternanza glaciale/interglaciale della seconda fase del Pleistocene.

Mayewski et al. (2004) mostrano come l'Olocene sia stato caratterizzato in verità da frequenti variazioni climatiche (Rapid Climate Change, RCC) che, anche se non paragonabili in termini di magnitudo e rapidità ai cambiamenti avvenuti durante l'ultimo glaciale, hanno apportato drammatici cambiamenti idrologici e compromesso l'accessibilità alle risorse (Gasse, 2000; Nicoll 2004). La caratterizzazione di tali eventi permette, quindi, di comprendere meglio i cambiamenti climatici attualmente in corso e di indagare il grado di impatto sui sistemi naturali e sulle dinamiche delle società umane che si sono sviluppate proprio durante quest'Epoca.

Il lavoro di Mayewski et al. (2004) è consistito nel confrontare tutti i *records* paleoclimatici distribuiti a livello globale partendo dai risultati di Denton & Karle'n, (1973) circa le variazioni dell'estensione dei ghiacciai e le serie chimiche ben datate GISP 2 (Greenland Ice Sheet Project Two) (Fig.14). Sono state così individuate sei brevi fasi caratterizzate da un generale raffreddamento con avanzamento dei ghiacciai alle medie e alte latitudini e decremento delle precipitazioni e desertificazione alle basse latitudini. Questi RCC sono collocati temporalmente a 9000-8000, 6000-5000, 4200-3800, 3500-2500, 1200-1000 e a 600 BP. Se si considera l'intervallo temporale 9000-8000 BP, il più importante evento di deterioramento climatico registrato da numerosi archivi paleo-climatici dell'emisfero Nord è collocato intorno a 8200 BP (Alley et al., 1997; Alley & Agustsdottir, 2005) ed è stato associato a un brusco cambiamento della circolazione atmosferica e oceanica. Alley et al. (1997) ha ipotizzato un indebolimento della circolazione termoalina del Nord Atlantico causata da un incremento di acque dolci nell'oceano. Alle basse latitudini questo evento interrompe un periodo umido iniziato nella prima fase dell'Olocene (deMenocal et al., 2000; Tierney & deMenocal, 2013) e coincide con un indebolimento delle piogge monsoniche (Gasse & Van Campo, 1994). Anomalie climatiche sono state identificate, infatti, in tutte le regioni con regime monsonico delle precipitazioni anche se la collocazione temporale, la durata stimata, il grado di impatto sui diversi ecosistemi, descritti dai diversi archivi risulta a volte differente. Questo ultimo punto sottolinea la complessità dello studio del clima dell'Olocene e

l'importanza di avere numerosi dati paleoclimatici sito-specifici per non commettere l'errore di estrapolare i dati da una zona all'altra. (Mayewski et al. 2004).



**Fig.14** Risultati dei proxy climatici in relazione agli intervalli temporali 9000-8000, 6000-5000, 4200-3800, 3500-2500, 1200-1000 e 600 BP (Mayewski et al. 2004)

#### 4.1.1 Variazioni climatiche e culturali nel Nord Africa

Durante l'Ultimo Massimo Glaciale (LMG) l'Africa attraversa un periodo di estrema aridità causato dall'indebolimento del ciclo idrologico globale. Per la maggior parte dei grandi laghi è stato registrato un cospicuo abbassamento del livello idrico intorno a 22.000-17.500 BP o addirittura un completo disseccamento (Petit- Maire, 1982; Beuning et al., 1997; Gasse et al., 1989; Gasse, 2000). Nella fase di transizione Pleistocene-Olocene si assiste ad un cambio di rotta verso condizioni più umide che segnano l'inizio del cosiddetto African Humid Period (deMenocal et al., 2000) collocato tra 11.000 e 5.500 BP. Il termine African Humid Period (AHP) è un termine generico che viene usato per designare un periodo in cui abbondanti precipitazioni hanno permesso la ricarica delle acque sotterranee (Edmunds & Wright, 1979; Darling et al., 1987), il sostentamento di molti corpi

d'acqua superficiali (Pachur, 1980; Kroepelin, 1993) e il diffondersi di vegetazione tipica delle savane.

L'abbondanza idrica che caratterizza questo periodo è una conseguenza dell'intensificazione del sistema monsonico. Come già evidenziato, in questo trend generale si inseriscono eventi RCC registrati da numerosi archivi paleoclimatici. L'anomalia registrata intorno a 8500-7800 BP nel lago Vittoria, ad esempio, indica un periodo di decremento del bilancio precipitazioni/evaporazione (Gasse, 2000).

Le fluttuazioni climatiche Oloceniche hanno influito anche sul regime idrologico del Nilo che vede nelle precipitazioni monsoniche la sua principale fonte di alimentazione. Durante l'AHP i livelli di piena del Nilo, del Nilo Bianco e del Nilo Azzurro erano più alti di quelli registrati oggi (Williams and Adamson, 1980). A circa 14.500 BP si assiste all'intensificazione del monsone estivo e all'inizio del periodo cosiddetto del "Nilo selvaggio" (Talbot et al., 2000). Wadi Howar e Wadi Malik, oggi completamente prosciugati, a quel tempo erano tributari del Nilo e la valle del fiume era costellata da laghi e aree umide. Un paleo-lago di circa 450 Km<sup>2</sup> si estendeva nel Sudan settentrionale ad ovest del Nilo. Williams (2009) studia la storia deposizionale ben conservata del Nilo Bianco e individua alti livelli di piena a 14700-13100, 9700-9000, 7900-7600, 6300, 3200 e 2800 BP legati appunto alle variazioni del regime delle precipitazioni.



**Fig.15** Siti Mesolitici rinvenuti lungo il fiume Nilo in Sudan (da Salvatori,2012)

Dal punto di vista dell'evoluzione delle società umane, durante l'intervallo temporale 10.000 -7000 BP, che come abbiamo appena detto è stato caratterizzato da una notevole abbondanza idrica e condizioni climatiche più ottimali, si assiste allo sviluppo e diffusione delle comunità Mesolitiche. Lungo la valle del Nilo, aree che per tanto tempo erano rimaste deserte, durante il Mesolitico si popolarono di raccoglitori-cacciatori e pescatori. Come è possibile notare dalla figura 15, numerosi siti archeologici sorgono a pochi Km di distanza dalle sponde di corsi d'acqua.

Il Mesolitico in Sudan è un periodo particolarmente interessante. Qui, a differenza di quanto avveniva nelle contemporanee aree europee e asiatiche, venivano già prodotti vasi in argilla abilmente decorati. L'attività di lavorazione dell'argilla e il suo utilizzo per la conservazione e cottura dei cibi, denotano l'esistenza di società con un certo grado di complessità.

L'ampia varietà degli stili decorativi delle ceramiche (due esempi in Fig. 16) ha permesso agli archeologi di individuare differenti periodi culturali e l'esistenza di relazioni tra le diverse comunità.



**Fig.16** Esempi di ceramica con decorazione Wavy Line (in alto) e Lunula (in basso) rinvenuti ad al-Khiday 16D5 (da Salvatori, 2012)

Il problema principale nel definire gli sviluppi culturali all'interno delle società Mesolitiche e la transizione da comunità di raccoglitori, cacciatori e pescatori in comunità di pastori e allevatori durante il periodo Neolitico, è rappresentato dalla mancanza di sequenze stratigrafiche conservate supportate da datazioni assolute. Gli africanisti della zona Subsahariana devono, infatti, fare i conti con processi post deposizionali di origine naturali, come l'erosione, e con la continua rioccupazione

di uno stesso sito da parte di diverse popolazioni che causano un rimescolamento dei materiali archeologici di diversi periodi. Non è strano, infatti, imbattersi in queste zone in un frammento di ceramica mesolitica accanto a un bifacciale.

## **4.2 Il complesso archeologico di al-Khiday**

Tra i numerosi siti preistorici sparsi lungo le sponde del Nilo Bianco (Salvatori, 2011) vi è un complesso archeologico, chiamato al-Khiday dal nome dell'odierno villaggio che sorge lì vicino, particolarmente interessante per lo stato di conservazione del deposito archeologico e per le sue potenzialità per la ricostruzione paleo-climatica e paleo-ambientale della zona Sub-Sahariana. La lunga attività di scavo condotta da un team di archeologi italiani, diretta da Donatella Usai e co-diretta da Sandro Salvatori (Centro Studi Sudanese e Sub-Sahariani, Treviso), attraverso un approccio di tipo stratigrafico ha permesso la caratterizzazione dei depositi e l'individuazione di numerose fasi culturali, correlate ad artefatti ed ecofatti, producendo una descrizione della realtà preistorica attendibile nella sua varietà e complessità. La ricostruzione delle diverse fasi di occupazione del sito ha fatto emergere, in effetti, un quadro più complesso di quello descritto precedentemente per il periodo Mesolitico in Sudan (Usai & Salvatori, 2005; Salvatori & Usai, 2009; Usai et al., 2010; Salvatori et al., 2011; Salvatori 2012; Salvatori et al., 2014; Usai et al., 2014; Salvatori et al., 2018).

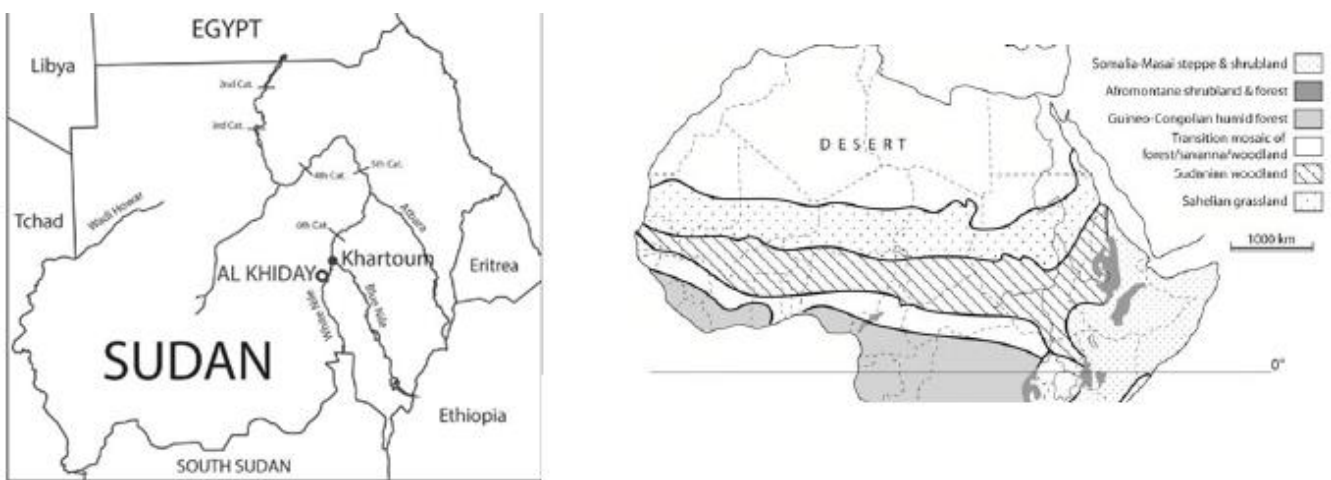
### **4.2.1 Inquadramento geografico e ambientale**

Il complesso archeologico di al-Khiday è situato a pochi chilometri di distanza dalla sponda occidentale del Nilo Bianco, tra la diga di Jebel Aulia e la conurbazione Khartoum-Omdurman (15°27'06.3"N, 32°24'23.5"E). Il Nilo Bianco, proveniente dalla regione dei grandi laghi equatoriali dell'Africa Orientale, il Nilo Azzurro e l'Atbara sono i principali affluenti del fiume Nilo. I due Nili si congiungono presso Khartoum e scorrono in direzione del Mediterraneo. Il Nilo Azzurro contribuisce al deflusso del Nilo per circa il 56%, il Nilo Bianco per circa il 30% ed è il maggior tributario durante la stagione secca, e l'Atbara per circa il 14% (Williams & Adamson 1980). Il contributo delle precipitazioni locali è del tutto trascurabile. Il Nilo Azzurro ha carattere stagionale e presenta un rapporto tra picco massimo e minimo pari a 40:1 mentre il Nilo Bianco presenta un rapporto di 5:2.

L'area in cui sorge il sito archeologico si presenta oggi come una vasta savana iper-arida con sporadici alberi di *Acacia sp.* e poche specie erbacee (Fig.17). Le precipitazioni medie annuali a

Khartoum ammontano a 160 mm e sono concentrate nei soli mesi estivi. Il clima dell’Africa Nord Orientale è governato dalle basse pressioni e dai venti che soffiano sul continente e dalla migrazione stagionale dell’ITCZ (Zona di Convergenza InterTropicale) (Gasse, 2000).

Il sito è costituito da 6 aree distinte, alcune assimilabili a dei mounds, nominate seguendo le regole stabilite da Hinkel (1977), 16D3, 16D4,16D4B, 16D5, 16D6, 16D7 (Usai e Salvatori, 2005). I mounds (16D5 e 16D3) sono situati su relitti di barre fluviali, poste al limite orientale dei sedimenti alluvionali depositati dalle piene del Nilo Bianco durante l’ultima fase del Pleistocene e inizio Olocene (Zerboni, 2011; Williams et al., 2015).

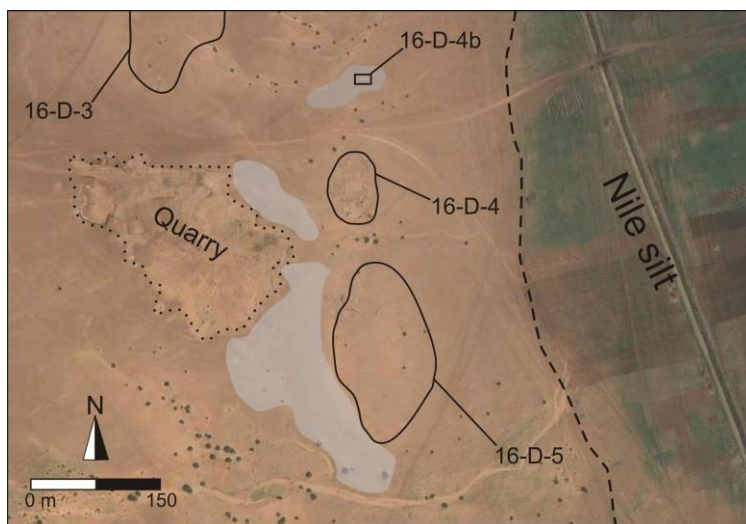


**Fig.17** Localizzazione del sito archeologico (a) e caratterizzazione vegetazionale dell’Africa centrale.

L’area pianeggiante, su cui si ergono i siti, è costellata da sedimenti organici scuri depositati in ambiente paludoso (Zerboni, 2011) (Fig.18). L’attività della paleo-swamp nei pressi del sito è stata collocata temporalmente, mediante datazione al radiocarbonio, tra 8597 e 8420 cal. BP (Zerboni, 2011).

La presenza di queste aree umide interconnesse con il sistema fluviale principale ha permesso alle comunità di raccoglitori, cacciatori, pescatori e produttori di ceramica di al-Khiday di usufruire dei diversi servizi ecosistemici forniti da questi habitat. Densissime concentrazioni di *Pila wernei* (Salvatori et al., 2018; Usai, 2016; Zerboni, 2011), gasteropode semiacquatico che predilige ambienti paludosi e ricchi di vegetazione, insieme a resti di fauna ittica appartenente soprattutto al genere Clariidae, tipica di acque superficiali, dominano il record faunistico finora analizzato (Salvatori et al., 2014). A parte *Pila wernei* e Clariidae, i resti delle faune recuperati nei depositi archeologici del sito sono caratterizzati da una diversità a livello di specie e genere che denota un ambiente molto ricco e

produttivo. Altri esemplari di molluschi rinvenuti appartengono ai generi *Chambardia sp*, *Ostrea sp*, e *Limicolaria sp* (Linseel, comunicazione personale). Tra i resti di fauna ittica ritroviamo altri rappresentanti di ambienti acquatici superficiali (*Protopterus sp.*, Cyprinidae, Mormyridae, Tilapia), taxa tipici di aree umide ben vegetate (*Polypterus sp.*, *Heterotis niloticus*, *Gymnarchus niloticus*, Distichodontidae/Citharinidae) e taxa che preferiscono acque aperte e profonde (*Hydrocynus sp.*, *Synodontis sp*, Bagrid catfish; *Lates Niloticus*,). Sono inoltre presenti alcuni rettili, esemplari di tartarughe terrestri e acquatiche e *Varanus niloticus*, e carnivori, questi ultimi rappresentati da *Panthera leo*, *Canis sp.*, *Felix sp*; gli erbivori includono bovini di diversa taglia (*Kobus kob*, *Syncerus caffer* *Sylvicapra grimmia*), rinoceronti (*Diceros bicornis* o *Cerathotherium simum*) e *Giraffa camelopardalis* (Salvatori et al., 2014).



**Fig.18** Depositi paludosi (indicati in grigio) affioranti nei pressi del complesso archeologico di al-Khiday (da Zerboni, 2011)

#### 4.2.2 I siti Mesolitici 16D5, 16D4 e 16D4B

Il complesso preistorico di al-Khiday rappresenta un esempio di come la buona conservazione e l'applicazione rigorosa del metodo di scavo stratigrafico possa portare alla costruzione di sequenze cronologiche e culturali più dettagliate. Contrariamente alla lunga storia dell'archeologia del Mesolitico Sudanese che vede la fase del Mesolitico, circa tremila anni, suddivisa in due soli sottoperiodi (Antico e Tardo Mesolitico), ad al-Khiday sono state individuate quattro diverse fasi: Tardo Mesolitico Antico (7000-6700 BC), Mesolitico Medio A (6700-6500 BC), Mesolitico Medio B (6500-6250 BC), Mesolitico Medio C (6250-6000 BC) e Tardo Mesolitico (5700-5350 BC). I siti che costituiscono il complesso archeologico differiscono per dimensione, caratteristiche e periodo di occupazione (Fig.19).

Il sito 16D5 è un insediamento Mesolitico disturbato dal successivo riutilizzo durante il periodo Neolitico (4500-3500 BC) e Post Meroitico (156 BC-300AD). Qui il deposito antropico è costituito da una parte sommitale colluviale e notevolmente disturbata, e da una parte sottostante relativamente ben conservata (Salvatori et al.,2011, 2014; Zerboni, 2011) nella quale sono state individuate due fasi diverse. Alla prima fase (Mesolitico Antico) appartengono aree funzionali adibite a focolari e discariche in cui è stata rinvenuta un'interessante concentrazione di resti di molluschi appartenenti alla sola specie *Pila wernei* (Salvatori et al., 2011,2014; Zerboni, 2011) (Fig.20).

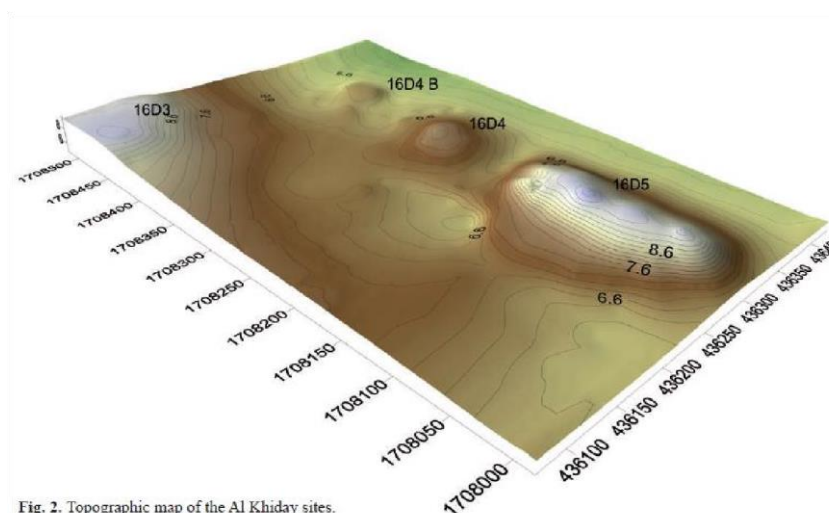


Fig. 2. Topographic map of the Al Khiday sites.

**Fig.19** Topografia di 4 siti archeologici che costituiscono il complesso mesolitico di al-Khiday (da Usai 2014)

La seconda fase è caratterizzata dalla presenza di muri di argilla, focolari associati (Salvatori et al., 2014), coevi alla fase dell'insediamento 16D4 (Mesolitico Medio). Lo studio della ceramica, confortata da datazioni  $^{14}\text{C}$ , inoltre, ha permesso di delineare una sequenza culturale di due sotto-fasi (Mesolitico A e B) all'interno della seconda fase (Salvatori, 2012).

L'area occupata dal sito 16D4, finora scavata, è pari a 1600 m<sup>2</sup>; questa è stata utilizzata principalmente come cimitero durante i periodi Pre-Mesolitico, Neolitico e Tardo Meroitico (Usai et al., 2010). Inoltre, durante il Mesolitico, quest'area è stata utilizzata come area funzionale connessa all'abitato di seconda fase rinvenuto a 16D5, come attesta il rinvenimento di circa 150 pits utilizzati principalmente come focolari e rifiutaie (Usai, 2014). I pits si presentano come depressioni circolari riempite con ossa di pesci, spesso in connessione anatomica, esoscheletri di *Pila wernei* e *Limicolaria sp.*, artefatti litici e ceramici (Salvatori, 2012; Zerboni et al., 2011).



**Fig.20** Pit rinvenuto nel sito Mesolitico 16D4 (da Salvatori 2012)

Come per il sito 16D5, lo studio della ceramica, confortato da una congrua serie di datazioni  $^{14}\text{C}$ , ha permesso l'attribuzione di queste strutture a tre fasi cronologiche e culturali diverse, Mesolitico A, B e C.

Associato al sito 16D4 è il 16-D-4B che è costituito da un'ulteriore serie di pozzetti (prevalentemente databili al Mesolitico Medio B) (Fig.21) ricchi di resti faunistici per lo più pesci, utilizzati come discariche di rifiuti alimentari (Usai, 2014; Zerboni, 2014; Salvatori, 2012; Zerboni, 2011).



**Fig. 21** Distribuzione di alcuni pits del sito 16D4B (da Zerboni, 2011)

Analisi micromorfologiche, mineralogiche e chimiche effettuate sulle ossa dei pesci hanno fornito la prima prova diretta dell'utilizzo della tecnica della salatura per la conservazione del cibo (Maritan et al.,2018).

### 4.2.3 Lo shellmidden 16D3

Per stabilire lo stato di conservazione dell'altro grande mound presente nell'area di al-Khiday, il sito 16D3, è stata scavata nel 2013 una prima trincea esplorativa di 4 x 4 m<sup>2</sup>. Verificata la presenza di un deposito archeologico particolarmente interessante, sia per l'eccellente stato di conservazione che per lo spessore, due ulteriori campagne di scavo stratigrafico e sistematico hanno avuto luogo nel 2016 e nel 2017.

La novità più rilevante di questo sito, che tra l'altro è quello situato alla distanza maggiore dal corso del fiume, è la presenza, al disotto di due distinti depositi colluviali, di una densa concentrazione di conchiglie di circa 40 cm di spessore (US1) per la maggior parte appartenenti alla specie *Pila wernei*, che rappresenta un raro caso di shell midden continentale.

Le analisi geoarcheologiche hanno confermato l'interpretazione del deposito come di un accumulo di ceneri associate a rifiuti domestici (midden) in cui le conchiglie prevalgono (shell midden), ma caratterizzato anche dalla presenza di ossa animali, soprattutto pesci, e formatosi in situ. Un secondo shell midden è stato individuato anche alla base della trincea compare un ulteriore shell midden (US9/US19); questo si differenzia dal primo non solo per lo spessore, più contenuto, ma anche perché include una maggiore quantità di ossa di pesci e mammiferi (Salvatori et al., 2018). Le datazioni al radiocarbonio effettuate sulle conchiglie attribuiscono l'US1 al



© Missione Archeologica al-Khiday, Centro Studi Sudanese e Sub-Sahariani

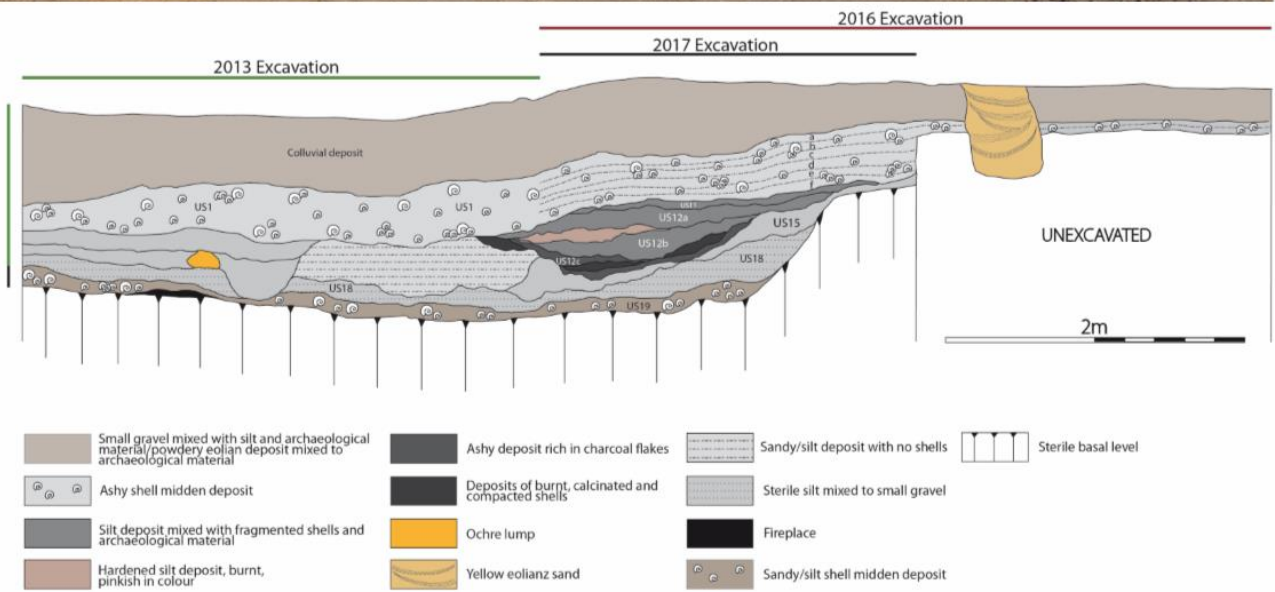
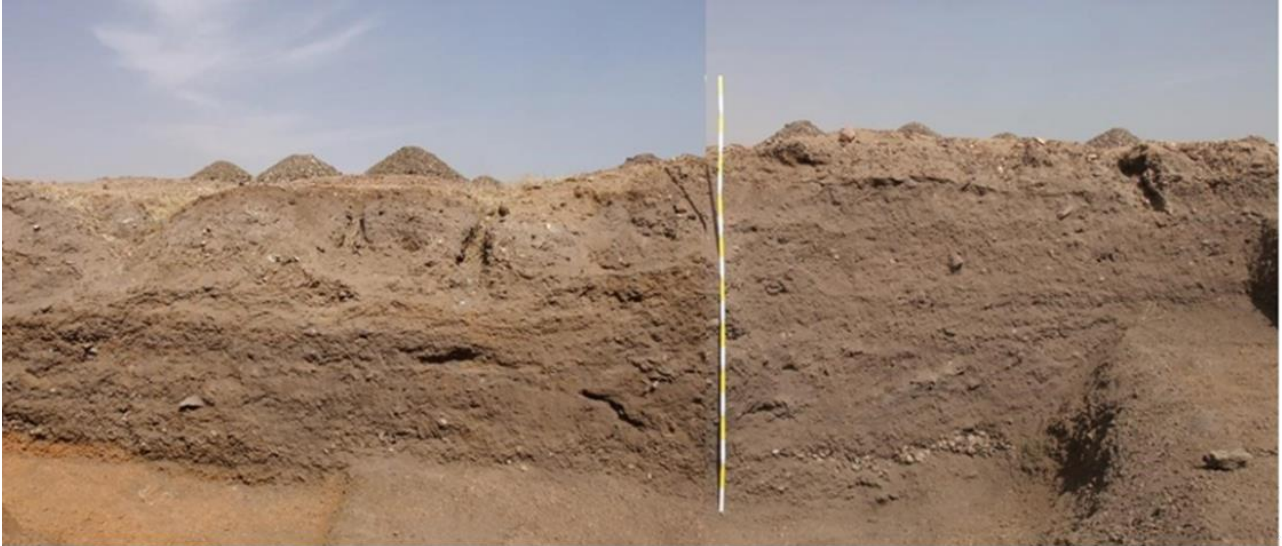
**Fig.22** Il sito 16D3 durante la campagna di scavo 2016

Mesolitico Medio e l'US9/US19 al Mesolitico Antico. Dallo studio preliminare della ceramica, risultano consistenti analogie con il sito 16D5. Sono stati, infatti, rinvenuti nell'US9/US19 frammenti ceramici tipici del Mesolitico Antico caratterizzati dalla presenza del motivo decorativo Lunula, un motivo che non è più presente nei depositi più recenti della sequenza stratigrafica, sia di 16D5 che di 16D3 (Salvatori et al., 2018; Salvatori et al., 2014). Lo scavo sistematico avvenuto negli anni 2016 (Fig.22) e 2017 con maggiore attenzione agli aspetti di micro-stratigrafia, ha permesso di individuare all'interno del deposito anche ulteriori strutture corrispondenti ad una fase di frequentazione intermedia tra lo shell-midden sommitale (Mesolitico Medio C) e quello basale (Mesolitico Antico): si tratta di una struttura legata all'uso del fuoco (US12) e per questo ricco di ceneri e limo rosato, resti macrobotanici, un'assoluta novità nel quadro della preistoria sudanese. Questa struttura era stata, in prima istanza, legata alla lavorazione della ceramica, anche per il rinvenimento di blocchi di ocre rossa, usati per trattare la superficie esterna dei vasi, e strumenti usati per allisciare la ceramica con tracce di ocre ancora visibili (Fig.23). Questa interpretazione è però adesso in discussione.



**Fig.23** Pietra in arenaria con tracce di ocre rossa (da Salvatori et al., 2018)

In analogia con tutti i siti di al-Khiday, 16D3, si presenta, quindi, come un deposito multistratificato (Fig.24) che rappresenta diverse fasi di occupazione del sito. Lo shell midden sommitale (US1) rappresenta la fase più recente di occupazione se escludiamo i depositi colluviali fortemente disturbati. All'interno del deposito, la presenza di sottili strati di limo di circa 3-5 cm denotano interruzioni nell'accumulo delle conchiglie. La data dello shell-midden cade verso la fine del 7 millennio BC, che corrisponde grosso modo alla crisi climatica dell'8200 BP, che in altri contesti, sembra essere stata responsabile di cambiamenti nella struttura socio-economica del gruppo afferente; lo sfruttamento intensivo dei molluschi, non attestato negli altri depositi ad al-Khiday, sembra possa essere inserito in un quadro di resilienza delle società come risposta a dei cambiamenti climatici, elemento che questo progetto si propone di indagare con lo studio isotopico delle conchiglie di Pila.



© Missione Archeologica al-Khiday, Centro Studi Sudanese e Sub-Sahariani

**Fig.24** Dettaglio stratigrafico del deposito rinvenuto nel sito 16D3

## CAPITOLO 5

### I CAMPIONI

#### *Premessa*

In questo studio gasteropodi appartenenti alla specie *Pila wernei* (Philippi, 1851) vengono studiati per la prima volta in maniera sistematica per ottenere informazioni di carattere climatico e ambientale. La scelta del materiale da sottoporre ad analisi è ricaduta su questo particolare gasteropode per diversi motivi:

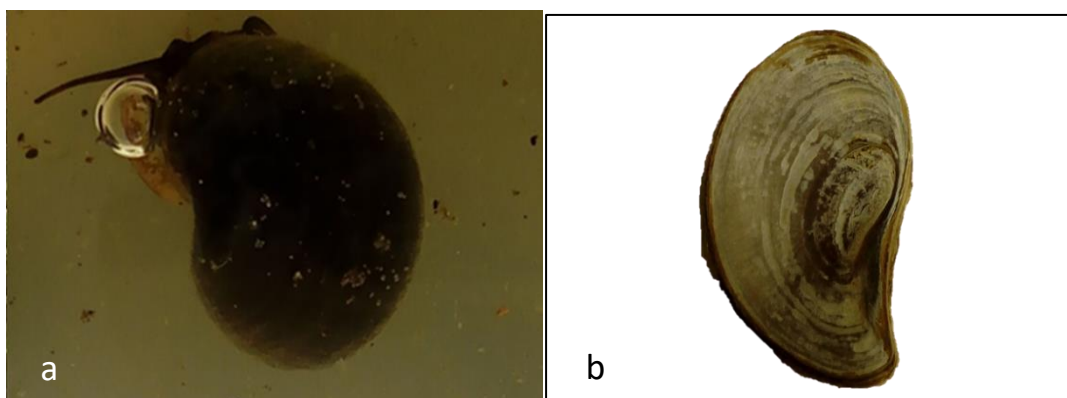
- 1) presenza costante in quasi tutti i contesti Mesolitici del Sudan Centrale, in aree oggi completamente aride. Questa caratteristica fa sì che si possano effettuare in futuro dei confronti spaziali e temporali e quindi individuare possibili fattori locali che agiscono sul trend climatico generale.
- 2) è una specie non estinta che è possibile studiare dal punto di vista della sua autoecologia. Un approccio di tipo attualistico permette di interpretare in maniera corretta i risultati ottenuti dall'analisi di esemplari sub-fossili. A tal proposito esemplari attuali di *Pila wernei* sono stati campionati nel loro habitat naturale e alcuni di essi sono stati allevati in laboratorio.
- 3) un numero cospicuo di esoscheletri di *Pila wernei* è stato rinvenuto in uno shell midden continentale ben conservato e che presenta una chiara stratigrafia antropogenica. La possibilità di integrare i risultati dell'analisi degli isotopi stabili con lo studio stratigrafico e geocronologico permetterebbe di implementare lo studio di questi depositi complessi che presentano grandi potenzialità nella caratterizzazione di paleo-climi e paleo-ambienti. Lo shell midden è stato rinvenuto in un complesso archeologico nel Sudan Centrale. Il record archeologico analizzato è costituito da esemplari di *Pila wernei* prelevati nelle diverse US del deposito insieme a resti di fauna ittica che costituiscono un record indipendente con cui confrontare i risultati dati dall'analisi delle conchiglie.
- 4) implementare lo studio dei molluschi di acqua dolce e avvalorare il loro utilizzo come archivi climatici e ambientali.

## 5.1 Esempari attuali di *Pila wernei*

### 5.1.1 Aspetti ecologici della specie

Alla famiglia delle Ampullariidae appartengono circa 120 specie di gasteropodi diffusi nelle zone tropicali e subtropicali dell'Africa, nell'America centrale e meridionale, e nell'Asia.

L'areale del genere *Pila sp.* è circoscritto all'Africa e all'Asia, mentre *Pila wernei* è una specie puramente africana rinvenuta in Sudan, Somalia, Chad, Congo, Kenia, Nigeria, Mali (Brown, 1994). Gli habitat prediletti da *Pila wernei*, e dalle Ampullariidae in genere, sono swamps interconnesse con sistemi fluviali, laghi, golene e tutte le tipologie di aree umide caratterizzate da acque lente e stagnanti che possono seccarsi durante alcuni periodi dell'anno (Van Damme, 1984). Trattandosi per lo più di habitat stagionali o comunque effimeri e sottoposti a fattori di disturbo, questi gasteropodi hanno sviluppato meccanismi di adattamento peculiari. La combinazione polmoni/branchie, e quindi una respirazione aerea e acquatica, riflette un adattamento a condizioni di bassi livelli di ossigeno che spesso caratterizzano ambienti quali swamps e acque superficiali a causa della decomposizione di abbondante materiale vegetale. *Pila wernei* presenta inoltre un sifone tubolare (Fig. 25.a) che le permette di inglobare ossigeno senza dover emergere in superficie ed essere così meno vulnerabile alla predazione. Un altro meccanismo di adattamento è rappresentato da periodi di dormienza, conosciuti con il termine di estivazione, innescati in condizioni di stress idrico e/o in condizioni di basse temperature. Durante l'estivazione i gasteropodi si ritraggono all'interno della conchiglia mediante l'opercolo e si infossano nel fango rimanendo in questo stato fino a che l'acqua e/o la temperatura non rappresentano più un fattore limitante la crescita. *Pila wernei* è l'unica Ampullariidae che presenta un opercolo carbonatico (Fig25.b)



**Fig.25** Dettaglio del sifone elongato fuori dalla colonna di acqua per inglobare ossigeno (a) opercolo carbonatico (b)

Per quanto riguarda le preferenze alimentari, sono generalisti e capaci di nutrirsi sia di perifiton che di macrofite emergenti, sommerse o flottanti.

Sebbene non si conosca il tempo di vita di *Pila wernei* – alcuni studi condotti su altre Pilidae indicano un tempo di vita di circa 4 anni - la conchiglia, che segue la crescita del mollusco, può raggiungere dimensioni superiori a 127\*125 mm (Van Damme, 1984).

### **5.1.2 Campionamento lungo il Nilo Bianco**

Esemplari attuali di *Pila wernei* sono stati rinvenuti presso Ed Dueim (13°58'43.4"N, 32°19'04.6"E) e Jebel Aulia (15°14'48.20"N, 32°28'32.62"E). Entrambe le località sono situate lungo la sponda occidentale del Nilo Bianco e distano rispettivamente 25 km e 180 km a sud dal villaggio di al-Khiday. Nei pressi del sito archeologico, area completamente arida e collocata lontano dall'attuale corso del Nilo Bianco, questa specie non è più presente. Il regime idrologico del Nilo Bianco, alterato dalla presenza di numerose dighe quale quella di Jebel Aulia, non favorisce lo sviluppo di aree umide in cui *Pila wernei* possa proliferare. A differenza di al-khiday, nei pressi di Ed Dueim, situato a monte della diga, è possibile rinvenire aree umide collegate con il fiume e diversi canali irrigui. La presenza delle diga crea a Jebel Aulia, la formazione di un bacino artificiale caratterizzato da acque basse popolate da questo gasteropode.

Il campionamento a Ed Dueim è stato effettuato nel Novembre 2015 (n=2), presso un canale artificiale destinato all'irrigazione agricola, e nel Novembre 2017 (n=6). Durante la campagna di campionamento del 2017 i gasteropodi sono stati rinvenuti presso un'area umida interconnessa con il sistema fluviale principale. Si tratta di uno specchio d'acqua non profondo, con substrato fangoso, colonizzato da *Eichornia crassipes* in associazione con altre specie vegetali tipiche delle aree umide interne. Le dimensioni delle conchiglie misurate con un calibro vanno da 17.4\*13.3 mm a 41.1\*37.3 mm per gli esemplari raccolti nel novembre 2017 mentre i due raccolti nel novembre 2015 presso un canale di irrigazione presentano altezze pari a 55.1\*49.2 e 42.5\*36.0 mm. Nel campionamento a Jebel Aulia, gli esemplari sono stati raccolti nel dicembre 2017 (n=4) presso la zona rivierasca del bacino idrico formatosi a causa della presenza della diga e nel dicembre 2018 (n=32) presso un canale interconnesso al bacino e utilizzato per la pesca. Il canale, scavato qualche tempo prima del prelievo dei gasteropodi, è caratterizzato da uno specchio d'acqua profondo solamente 70 cm con substrato fangoso e vegetazione tipica delle aree umide africane. Le dimensioni delle conchiglie sono comprese tra un minimo di 63.5\*56.3 mm a un massimo di 77.4\*64.8 mm per gli esemplari raccolti presso la zona rivierasca e da un minimo di 23,8\*20.3 mm a un massimo di 64,0\*53.6 mm per gli esemplari raccolti nel canale (vedi Appendice B per ulteriori dettagli).

In entrambe le località sono stati raccolti, inoltre, campioni di acqua e qualche esemplare di pianta acquatica da sottoporre anch'essi ad analisi isotopica per meglio caratterizzare il contesto ambientale in cui *Pila wernei* vive.

### 5.1.3 Esemplari allevati in laboratorio

I molluschi di acqua dolce precipitano il loro esoscheletro addizionando strati di carbonato in equilibrio con la soluzione acquosa circostante, registrando, in continuum, tutte le variazioni chimiche e isotopiche che avvengono in quella porzione specifica di sistema naturale. In generale, i fattori principali che controllano il valore del  $\delta^{18}\text{O}$  del carbonato sono la composizione isotopica dell'acqua al momento della deposizione e la temperatura. Ciò significa che conoscendo ad esempio il valore  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  e  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}}$  è possibile stimare la temperatura e quindi utilizzare le conchiglie come archivio di data proxy per studi paleo-climatici ad elevata risoluzione. Per effettuare uno studio robusto in tal senso è necessario conoscere a pieno le caratteristiche idrologiche del corpo d'acqua considerato come ad esempio la stagionalità delle precipitazioni, l'intensità dei processi evaporativi, il tempo di residenza dell'acqua, insieme al cosiddetto effetto vitale che è legato puramente alla specie in questione. Detto in altre parole, vuol dire conoscere la sistematica del frazionamento effettuando studi di calibrazione in laboratorio.

Tre esemplari di *Pila wernei* sono stati allevati in un acquario riempito con un volume di acqua pari a 3 litri e substrato sabbioso, in condizioni sperimentali controllate al fine di:

- 1) stimare il fattore di frazionamento  $\alpha_{\text{carbonato-acqua}}$  variando la composizione isotopica dell'acqua e la temperatura
- 2) stimare il tasso di crescita della conchiglia
- 3) determinare se il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carbonato}}$  riflette il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  e/o  $\delta^{13}\text{C}_{\text{dieta}}$
- 4) implementare le conoscenze relative all'ecologia di questa specie

Il disegno sperimentale progettato prevede diverse fasi, per ognuna delle quali le condizioni sperimentali del sistema sono conosciute.

Fase I: i gasteropodi vengono allevati in un'acqua dalla composizione isotopica nota, mantenendo costanti la temperatura a 27°C e l'umidità relativa al 25 % e viene fornito loro una fonte di cibo di cui si conosce il valore  $\delta^{13}\text{C}$  (*Lactuca sativa longifolia*).

Fase II: i gasteropodi vengono allevati in un'acqua dalla composizione isotopica nota ma molto diversa da quella della Fase I, mantenendo costante la Temperatura a 27°C e l'umidità relativa al 25% e viene fornita loro una fonte di cibo di cui si conosce il valore  $\delta^{13}\text{C}$  e uguale a quello della Fase I.

Fase III: i gasteropodi vengono allevati in un'acqua dalla composizione isotopica nota e uguale a quella fornita durante la Fase I, mantenendo costanti la temperatura a 27°C e l'umidità relativa al 25% e viene fornita loro una fonte di cibo di cui si conosce il valore  $\delta^{13}\text{C}$  ma diversa da quella fornita durante la Fase I e II (mangime utilizzato generalmente per pesci erbivori che si nutrono sul fondo).

Fase IV: i gasteropodi vengono allevati in un'acqua dalla composizione isotopica nota e uguale a quella utilizzata durante la Fase I, mantenendo costante la temperatura a 20°C e l'umidità relativa al 25 % e viene fornita loro una fonte di cibo di cui si conosce il valore  $\delta^{13}\text{C}$  (pianta C4).

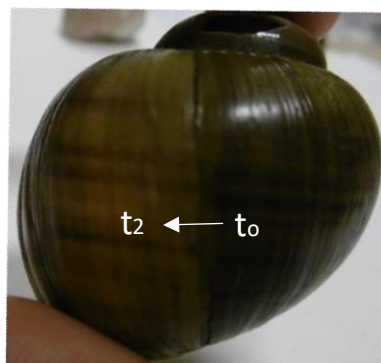
Fase V: i gasteropodi vengono allevati in un'acqua dalla composizione isotopica nota e uguale a quella utilizzata durante la Fase II, mantenendo costante la temperatura a 20°C e l'umidità relativa al 25 % e viene fornita loro una fonte di cibo di cui si conosce il valore  $\delta^{13}\text{C}$  (pianta C4).

Durante le prime cinque fasi, l'acqua viene sostituita ogni due giorni per minimizzare i processi di evaporazione del liquido e decomposizione della sostanza organica.

Per calcolare il fattore di frazionamento  $\alpha_{\text{aragonite-acqua}}$  ad una determinata temperatura e determinare se il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carbonato}}$  riflette il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  e/o  $\delta^{13}\text{C}_{\text{dieta}}$  è necessario conoscere la composizione isotopica dell'acqua, la temperatura, il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  e il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{dieta}}$  al momento della deposizione del carbonato. Utilizzando un pennarello indelebile viene segnato sulla superficie della conchiglia il  $t_0 = 0$  del processo di precipitazione del carbonato. Dopo due giorni ( $t_2$ ) viene prelevata la porzione di conchiglia cresciuta. Per quanto riguarda l'acqua, viene prelevato un campione al  $t_0 = 0$ , uno al  $t_1$  e uno al  $t_2$  per misurare il valore  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  e viene misurato il valore  $\delta^{13}\text{C}$  della fonte della dieta fornita.

Durante l'ultima fase (Fase VI) si cercherà di ricreare il sistema naturale per cui verranno inseriti nell'acquario delle piante acquatiche e l'acqua verrà fatta evaporare per verificare l'innesco del processo di estivazione con conseguente chiusura all'interno dell'opercolo e cessazione della deposizione di carbonato.

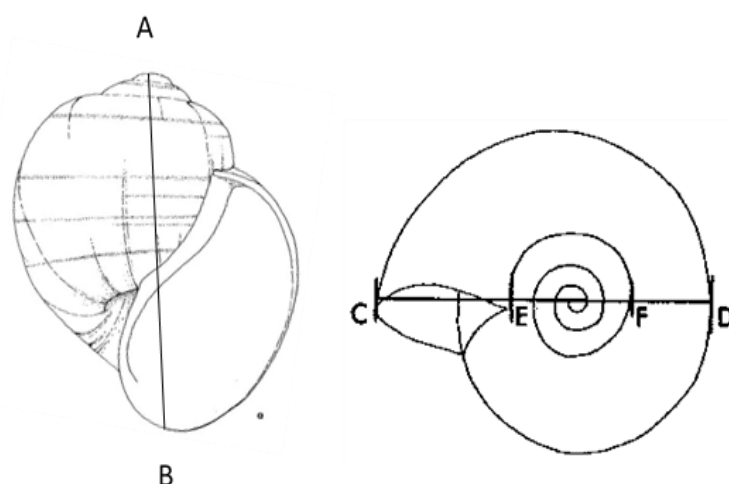
Per stimare il tasso di crescita della conchiglia, periodicamente vengono misurate l'altezza, il diametro (Fig. 27) e la crescita incrementale misurata come mostrato in Fig. 26



**Fig.26** Crescita incrementale della conchiglia

## 5.2 Il record archeologico: esoscheletri di *Pila wernei* e resti di fauna ittica

La scelta della numerosità del campione, per quanto riguarda gli esemplari di *Pila wernei*, è stata fatta prediligendo conchiglie intere (o quasi) che non presentavano evidenti segni di abrasione o dissoluzione. Seguendo tale criterio il numero di campioni non risulta essere uguale per tutte le US considerate. Nella Tab.2 si riporta il numero esatto di campioni prelevati nelle diverse US con le relative dimensioni delle conchiglie. È da precisare che le dimensioni degli esemplari analizzati non sono rappresentativi delle dimensioni di tutte le conchiglie presenti nello shell midden. Al contrario, frammenti di numerose conchiglie e opercoli, denotano dimensioni molto grandi fino a 13 cm in altezza.



**Fig.27** Dimensioni in altezza (A-D) e diametro (C-D) dei gasteropodi (da Van Damme, 1984 modificata)

Le dimensioni in altezza e diametro delle conchiglie sono state misurate mediante un calibro seguendo le modalità indicate nella Fig.27

Tab.2 Record archeologico di esemplari di *Pila wernei* analizzati in questo studio

Campagna di scavo	US	Dimensioni in mm (altezza*diametro)	Numero totale di campioni per US	
2013	1 upper	30.0*27,3	3	
		24.0*21.3		
		> 46		
2016	1B	44.6*37.5	2	
		25.0*22.0		
	1C	51.2*44.6	1	
	1D	59.3*54.5	1	
	1E	49.9*42.0	1	
	11		80.0*68.0	13
			35,1*30.2	
			34.0*29.0	
			>76	
			>45	
			>67	
			>48	
			>61	
>55				
>58				
> 55				
> 48				
>53				
2017	12B	46.5*42.3	10	
		>52.7*48.5		
		47.3*44.6		
		>71		
		>61		
		>55		
		>62		
		>30		
		>40		
	>39			
	12F		54.4*62.0	9
			> 51	
			> 67	
			> 42	
			> 67	
			> 67	
			> 71	
	> 45			
	> 49			
19		83.0*76.1	10	
		>49		
		>54		
		>60		
		>50,3		
		>52,0		
		>52,3		
		>51,0		
>35				
>49.3				

La scelta dei campioni di pesci più rappresentativi della popolazione si basa sull'esclusione di campioni di dubbia integrità e sulla scelta di una medesima tipologia di osso. Il record analizzato è

formato da vertebre di pesci appartenenti a specie diverse per un totale di 64 campioni. Lo studio archeozoologico è ancora in fase di completamento per cui disponiamo della classificazione tassonomica solo di alcuni degli esemplari analizzati (Tab.3a e 3b).

Tab.3a Record archeologico analizzato in questo studio

Campagna di scavo	US	Specie/Genere	Lunghezza (mm)	Numero totale di campioni per US
2016	1B	Cyprinidae	60-70	17
	1B	<i>Lates niloticus</i>	20-30	
	1B	<i>Lates niloticus</i>	50-60	
	1B	<i>Lates niloticus</i>	70-80	
	1B	<i>Lates niloticus</i>	80-90	
	1B	<i>Lates niloticus</i>	110-120	
	1B	Clariidae Clar-	50-60	
	1B	iidae	70-80	
	1B	Clariidae	70-80	
	1B	<i>Synodontis sp.</i>	nd	
	1B	<i>Heterotis niloticus</i>	30-40	
	1B	<i>Heterotis niloticus</i>	40-50	
	1B	<i>Heterotis niloticus</i>	50-60	
	1B	<i>Heterotis niloticus</i>	60-70	
	1B	<i>Heterotis niloticus</i>	70-80	
	1B	Distichodontidae	70-80	
	1B	Tilapiini	30-40	
	1C	Cyprinidae	40-60	6
	1C	<i>Lates niloticus</i> Clar-	80-90	
	1C	iidae	70-80	
1C	<i>Synodontis sp.</i>	30-40		
1C	Distichodontidae	60-70		
1C	Tilapiini	30-40		
1D	Cyprinidae	40-60	6	
1D	<i>Lates niloticus</i> Clar-	90-100		
1D	iidae	70-80		
1D	<i>Synodontis sp.</i>	30-40		
1D	Distichodontidae	60-70		
1D	Tilapiini	30-40	11	
1E	<i>Lates niloticus</i>	20-30		
1E	<i>Lates niloticus</i>	30-40		
1E	<i>Lates niloticus</i>	40-50		
1E	<i>Lates niloticus</i>	70-80		
1E	<i>Lates niloticus</i>	80-90		
1E	Clariidae	50-60		
1E	Clariidae	80-90		
1E	<i>Heterotis niloticus</i>	30-40		
1E	<i>Heterotis niloticus</i>	40-50		
1E	<i>Heterotis niloticus</i>	70-80		
1E	<i>Heterotis niloticus</i>	80-90		

Tab.3b Record archeologico analizzato in questo studio

Campagna di scavo	US	Specie/Genere	Lunghezza (mm)	Numero totale di campioni per US
2016	11	nd	nd	6
	11	nd	nd	
	11	nd	nd	
	11	nd	nd	
	11	nd	nd	
	11	nd	nd	
2017	12f	nd	nd	6
	12f	nd	nd	
	12f	nd	nd	
	12f	nd	nd	
	12f	nd	nd	
	12f	nd	nd	
	12b	nd	nd	6
	12b	nd	nd	
	12b	nd	nd	
	12b	nd	nd	
	12b	nd	nd	
	12b	nd	nd	
2013	9	Cyprinidae	60-70	6
	9	<i>Lates niloticus</i>	90-100	
	9	Clariidae	70-80	
	9	<i>Synodontis sp.</i>	30-40	
	9	Distichodontidae	60-70	
	9	Tilapiini	30-40	

## CAPITOLO 6

### METODOLOGIE

#### *Premessa*

Nel capitolo che segue vengono descritte le condizioni sperimentali dello studio.

L'accuratezza e la precisione del dato analitico possono essere condizionate da varie cause. Un primo gruppo comprende, ad esempio, il *campionamento non rappresentativo*, difficile da identificare, e i *processi diagenetici* sui quali, però, è possibile agire direttamente escludendo, su base motivata, alcuni campioni dal Campione statistico. Su altre cause di errore, legate ai limiti delle metodologie (*riproducibilità e ripetibilità delle misure, mancanza di standard condivisi a livello internazionale*) non è possibile intervenire *a priori*. Si può, tuttavia, cercare di ridurre l'entità dell'errore mediante intervento chimico opportuno (*preparazione opportuna dell'acido ortofosforico, retta di taratura con più di uno standard*) e introducendo opportune correzioni (*diversi valori dei coefficienti di frazionamento acido per i diversi minerali*). Nel caso specifico dell'analisi isotopica dell'ossigeno del gruppo carbonatico, in Appendice A si riportano alcune considerazioni delle quali si tiene conto presso il Laboratorio di Geochimica degli Isotopi Stabili circa il diverso frazionamento acido dell'aragonite rispetto alla calcite.

#### **6.1 Valutazione dello stato di conservazione dei campioni**

##### *Gli esoscheletri carbonatici di Pila wernei*

I reperti archeologici possono essere soggetti ad agenti tafonomici che producono alterazioni nella struttura e/o nella composizione chimica dei reperti stessi. I rapporti isotopici del carbonio e ossigeno dei minerali carbonatici possono essere modificati da processi diagenetici post-deposizionali quali la cementazione, la dissoluzione e la ricristallizzazione. La cementazione è il processo mediante il quale minerali depositati da un fluido esterno occludono pori e cavità del materiale originario, formando nuovi cristalli la cui orientazione è generalmente differente da quella originaria. L'analisi isotopica di carbonati biogenici cementificati riflette la composizione isotopica del carbonato inalterato e anche quella dei cristalli di neoformazione. La dissoluzione e ricristallizzazione sono processi chimico-fisici per i quali un carbonato metastabile, quale per esempio l'aragonite, ri-precipita in uno stato più stabile e a più bassa energia libera, con possibile conseguente variazione della composizione isotopica originaria. I fattori che incidono su questi processi sono: la temperatura, la composizione isotopica dell'acqua e specie chimiche presenti nei fluidi, il rapporto fluido/solido, la suscettibilità del carbonato a ricristallizzare in una fase più stabile

(Sharp, 2006). In riferimento a quest'ultimo fattore, le conchiglie degli esemplari attuali di *Pila wernei* raccolti presso diverse località del Nilo Bincò e le conchiglie archeologiche prelevate nelle diverse US del sito 16D3, sono state sottoposte a Diffrazione a raggi x per caratterizzarne la composizione mineralogica.

I campioni sono stati lavati con acqua bidistillata in un bagno ad ultrasuoni e delicatamente abrasi mediante un trapano da dentista per eliminare i residui di sedimenti adesi alla superficie. Sono stati lasciati ad asciugare a temperatura ambiente e successivamente polverizzati in un mortaio d'agata. I diffrattogrammi ottenuti hanno rivelato una composizione aragonitica sia per gli esemplari attuali che per quelli archeologici. L'assenza dei picchi della calcite indica che l'aragonite non ha modificato il suo stato strutturale, ciò che spinge ad assumere, ragionevolmente, che la composizione isotopica possa essersi mantenuta dal momento della precipitazione del carbonato. Un ulteriore indicatore di assenza di ricristallizzazione del carbonato è la presenza di valori  $\delta^{18}\text{O}$  con andamento stagionale lungo la spirale di crescita dei campioni analizzati. È alquanto improbabile, infatti, che processi diagenetici agiscano in ugual misura nelle diverse porzioni di conchiglia tanto da ricreare andamenti ciclici dei valori.

#### *La bioapatite delle ossa dei pesci*

Le condizioni di seppellimento possono alterare la composizione isotopica sia della frazione minerale che della frazione organica della bioapatite contenuta nelle ossa. La perdita del collagene è strettamente legata a condizioni di umidità, pH, temperatura e attività microbica. Le reazioni di idrolisi, ad esempio, che portano alla depolimerizzazione delle fibre, vengono accelerate in condizioni di pH basico mentre l'elevata porosità delle ossa garantisce un maggior successo dell'attacco microbico. I processi di diagenesi che generalmente riguardano la frazione minerale della bioapatite sono: precipitazione di minerali esogeni, come ad esempio calcite nel tessuto osseo fratturato, sostituzioni ioniche nel reticolo cristallino, dissoluzione della bioapatite in funzione del pH delle soluzioni circolanti e ricristallizzazione.

I campioni osteologici provenienti da al-Khiday non contengono collagene ben conservato come dimostrato da precedenti studi effettuati su ossa umane e animali (Di Matteo, 2011). Per valutare se anche la frazione minerale è stata compromessa da processi diagenetici, è stato effettuato uno studio comparato dei gruppi carbonatici e fosfatici. L'esistenza di una buona correlazione tra  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonato}}$  e  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}}$  viene, infatti, usata per escludere alterazione del campione in quanto è altamente improbabile che processi diagenetici agiscano allo stesso modo su entrambi i gruppi anionici (Iacumin et al., 1996).

Iacumin et al. (in press) propongono di usare la dispersione dei dati intorno alla regressione di  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}} + 1$  (coordinata Y) su  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonato}} + 1$  (coordinata X) per individuare i campioni che potrebbero aver subito processi di diagenesi. I campioni che ricadono al di fuori dell'intervallo

$$|Y_j - \hat{Y}_j| = 2 * s(yx),$$

dove  $\hat{Y}$  è il valore predetto di Y per un dato X,

sono convenzionalmente ritenuti poco attendibili.

In Fig.28 viene riportata la retta di regressione riferita ai valori ottenuti dall'analisi della biopatite dei pesci assumendo l'equilibrio termodinamico tra il gruppo carbonatico e fosfatico. L'area colorata in azzurro rappresenta la zona di *non rifiuto* dei dati isotopici

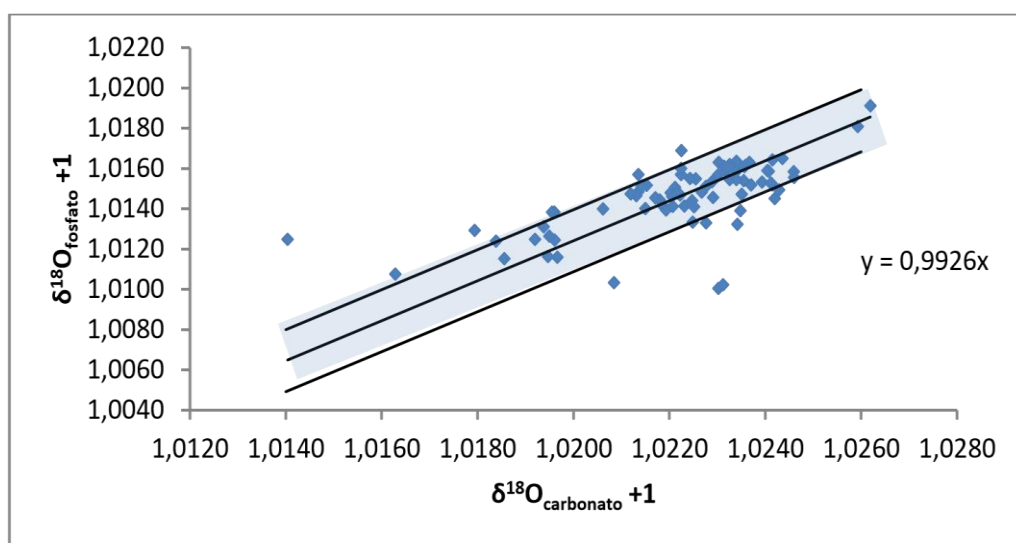


Fig.28 Retta di regressione  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}} + 1$  su  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonato}} + 1$

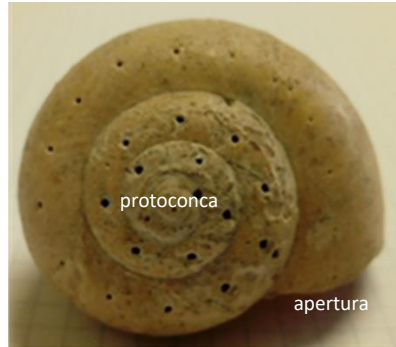
## 6.2 Strategia di campionamento

### *Esoscheletri di Pila wernei*

Il materiale analizzato in questo studio è costituito da 39 esemplari attuali e 50 esemplari provenienti dal sito di al-Khiday. Come è stato già detto nel capitolo precedente, la “numerosità” del campione statistico archeologico è dipesa dalla selezione di esoscheletri il più possibile interi che non presentavano evidenti segni di abrasione o dissoluzione. Per quanto riguarda invece i campioni attuali, il numero è dipeso dalla casualità di rinvenimento nei diversi ambienti naturali.

La maggior parte delle conchiglie ( $n = 77$ ) sono state omogenizzate per ottenere un valore medio di composizione isotopica. Inoltre, per stimare la variabilità intra-individuo dei valori dell'ossigeno e del carbonio, e nel contempo individuare possibili variazioni stagionali nei valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  del carbonato, 6 esemplari attuali e 7 esemplari archeologici sono stati sottoposti ad un campionamento puntuale lungo la spirale di crescita. Il campionamento è stato eseguito bucando la superficie della

conchiglia ogni 5 mm con un trapano da dentista (diametro della punta di 0.6 mm) e procedendo dall'apertura (ultimo carbonato depositato) fino alla protoconca (prima deposizione di carbonato) come mostrato in Fig.29. La polvere è stata recuperata e conservata in piccoli portacampioni di vetro.



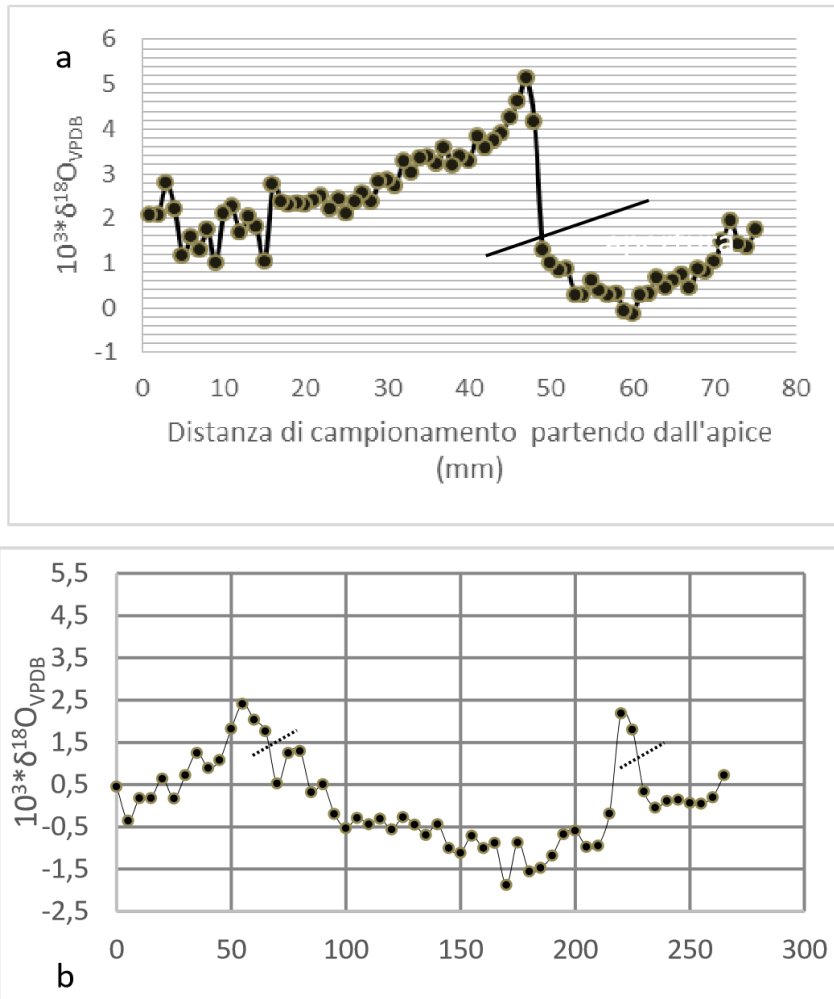
**Fig.29** Direzione del campionamento partendo dall'apertura verso la protoconca

La scelta di campionare ogni 5 mm, del tutto arbitraria, rappresenta un ottimo compromesso tra il grado di risoluzione ricercato e il numero di analisi da effettuare per ogni esemplare. Un passo di campionamento di 1 mm, effettuato durante un test iniziale, ha infatti prodotto una ridondanza di valori isotopici uguali in porzioni adiacenti di carbonato (Fig.30) ben visibile macroscopicamente.

Per spirale di crescita si intende una sorta di linea immaginaria, scelta tra tante possibili, che traccia la direzione del campionamento lungo tutte le spire della conchiglia. È stato quindi verificato se, considerando un campionamento perpendicolare all'asse di crescita, i valori isotopici dell'ossigeno e del carbonio, subivano variazioni. L'assunzione che si fa, infatti, è che lungo una stessa linea di crescita il carbonato sia stato depositato nello stesso momento. I valori di deviazione standard calcolati su una media di 3 campioni ( $n = 5$ ) sono dell'ordine di  $\pm 0.2\%$  per l'ossigeno e  $\pm 0.5\%$  per il carbonio.

#### *Le vertebre dei pesci*

La scelta dei campioni di pesci più rappresentativi della popolazione si è basata sull'esclusione di campioni di dubbia integrità, sulla scelta di una medesima tipologia di osso e sulla possibilità di accesso al materiale archeologico ancora in fase di studio presso altri istituti di ricerca. I campioni ( $n = 64$ ) sono stati completamente omogenizzati per ottenere un valore medio di composizione isotopica.



**Fig.30** Andamenti dei valori  $\delta^{18}O$  ottenuti utilizzando una risoluzione di 1 mm (a) e di 5 mm (b). Le rette che intersecano i grafici rappresentano l'interruzione della deposizione del carbonato.

## 6.3 Procedure analitiche

### 6.3.1 Analisi isotopica del carbonio e dell'ossigeno del gruppo $\text{CO}_3^{2-}$ dell'aragonite e apatite

*Procedure di trattamento fisico e chimico dell'aragonite biogenica destinata all'analisi del carbonio e dell'ossigeno del gruppo  $\text{CO}_3^{2-}$*

I carbonati destinati all'analisi isotopica vengono sottoposti generalmente a procedure chimiche al fine di eliminare la sostanza organica eventualmente presente. Dalla disamina di numerosi studi che vedono coinvolti gusci aragonitici o calcitici di molluschi, è emerso che non vi è un protocollo standardizzato. Si è pensato, quindi, di provare su 10 conchiglie attuali di *Pila wernei* alcune delle procedure chimiche utilizzate; nello specifico il trattamento con  $\text{NaClO}$  al 2-3 % per 24 ore, il trattamento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% per 24 ore e la pirolizzazione sottovuoto del campione a 350 °C per 45 minuti. Le conchiglie sono state pulite mediante l'ausilio di un bagno ad ultrasuoni e un trapano da dentista per eliminare i residui di sedimento e materiale organico adesi alla superficie. Sono state quindi polverizzate, accuratamente omogenizzate e la polvere è stata divisa in 4 parti. Un'aliquota è stata analizzata senza aver subito alcun trattamento chimico e le altre tre aliquote sono state sottoposte ai diversi trattamenti chimici. Nel caso dei campioni analizzati in questo studio il valore della deviazione standard, calcolato sulla media dei valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  relativi ai campioni sottoposti a trattamento chimico o solo trattamento meccanico, oscilla tra  $\pm 0.1\%$  e  $\pm 0.2\%$  (Tab.4). La deviazione standard sperimentale degli standard internazionali NBS19 e NBS18 è dell'ordine di  $\pm 0.25\text{-}0.30\%$  per l'ossigeno e  $\pm 0.20\%$ . Possiamo affermare che per quanto riguarda il carbonio i valori di deviazione standard rientrano nell'errore associato alla precisione della misura. Come vedremo meglio in seguito, i valori  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  vengono determinati a seguito della reazione del carbonato con acido  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . La mancata differenza qui riscontrata nei valori del carbonio può voler indicare o che la sostanza organica non reagisce con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  o che la quantità di sostanza organica presente nei 0.10.2 mg di campione necessari per l'analisi non è tale da provocare una variazione nel valore isotopico del carbonio. Per quanto riguarda l'ossigeno, il valore di deviazione standard dei campioni analizzati è più alto di quello del carbonio e oscilla tra  $\pm 0.1\%$  e  $\pm 0.3\%$  e un solo campione presenta un valore di  $\pm 0.4\%$ . Inoltre, è possibile notare come le aliquote di polvere di 8 campioni trattate con  $\text{H}_2\text{O}_2$  presentino sistematicamente valori  $\delta^{18}\text{O}$  più elevati rispetto a quelli ottenuti con altre procedure.

**Tab.4** Valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  di conchiglie attuali di *Pila wernei* sottoposte a diversi trattamenti chimici

Campione	Senza trattamento	Pirolizzazione sottovuoto a 350°C per 45 minuti	NaClO al 2-3 % per 24 ore	H2O2 al 30% DEV.ST. per 24 ore	MEDIA	
$10^3 * \delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$						
1	1,1	0,9	1,1	1,2	1,1	0,1
2	-0,1	-0,3	0,2	0,4	0,0	0,3
3	0,0	-0,1	0,4	0,5	0,2	0,3
4	-0,1	-0,6	0,1	0,3	-0,1	0,4
5	4,3	4,5	4,3	5,0	4,5	0,3
6	0,2	0,1	0,0	0,4	0,2	0,2
7	0,2	-0,2	-0,1	0,1	0	0,2
8	-0,2	-0,2	-0,6	-0,1	-0,3	0,2
9	0,6	0,2	0,7	0,4	0,5	0,2
10	0,4	0,3	0,0	0,6	0,3	0,2
$10^3 * \delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$						
1	-5,5	-5,3	-5,3	-5,2	-5,3	0,1
2	-4,4	-4,6	-4,4	-4,4	-4,5	0,1
3	-4,5	-4,7	-4,7	-4,6	-4,6	0,1
4	-5,5	-5,5	-5,5	-5,4	-5,5	0,1
5	-5,9	-5,8	-6,4	-5,9	-6,0	0,2
6	-3,7	-3,8	-3,7	-3,9	-3,8	0,1
7	-4,8	-4,7	-5,0	-4,8	-4,8	0,1
8	-6,8	-6,6	-7,0	-6,6	-6,7	0,2
9	-4,0	-4,0	-4,3	-3,9	-4,0	0,2
10	-5,2	-5,3	-5,2	-5,3	-5,2	0,1

La strategia di campionamento discussa nel paragrafo 6.2 prevede che alcune conchiglie vengano sottoposte ad un campionamento di tipo puntuale. Tenendo conto, quindi, dei risultati ottenuti e della strategia di campionamento scelta, si è deciso di non sottoporre i campioni ad alcun trattamento chimico. Le conchiglie attuali e sub-fossili sono state, quindi, sottoposte al solo trattamento meccanico e lavate con acqua distillata utilizzando un bagno a ultrasuoni; inoltre, la loro superficie è stata abrasa con un trapano da dentista al fine di rimuovere residui di sedimenti e materiale organico adesi.

*Procedura di trattamento fisico e chimico per la purificazione della bioapatite destinata all'analisi del carbonio e dell'ossigeno del gruppo  $CO_3^{2-}$*

La procedura di trattamento della bioapatite, destinata all'analisi del carbonio del gruppo  $CO_3^{2-}$  in essa contenuto, prevede una pulitura fisica dell'osso mediante una piccola fresa montata su un trapano da dentista per rimuovere i macrocontaminanti presenti; a questo primo trattamento fanno seguito diversi trattamenti chimici. Frammenti di circa 200-250 mg vengono accuratamente triturati in un mortaio d'agata fino ad ottenere una polvere dalla granulometria finissima e omogenea (l'aumento dell'area superficiale di contatto con i reagenti e l'omogeneizzazione del campione migliorano la precisione dell'analisi). Seguendo una procedura chimica standardizzata (Lee-Thorp et al., 1989; Bocherens et al., 1991), la polvere, inserita in una provetta da 15 ml, è fatta reagire con una soluzione di NaClO al 2-3 % per 24 ore su agitatore rotante per rimuovere la frazione organica dell'osso. Con l'ausilio di una centrifuga (4000 giri/min per 5 minuti) e una pipetta, il supernatante viene rimosso.

Il precipitato viene risciacquato con acqua bidistillata, mediante l'ausilio della centrifuga, fino a valori di pH prossimi alla neutralità, e fatto reagire per 24 ore, sempre su agitatore rotante, con una soluzione tampone 1 M di acido acetico al fine di eliminare il carbonato non strutturale eventualmente presente formatosi durante i processi di seppellimento. Nel caso specifico delle vertebre dei pesci provenienti dal sito di al-Khiday, la procedura è stata lievemente modificata a causa dei molti carbonati di adsorbimento riscontrati nella matrice minerale (Di Matteo, 2011). La polvere è stata fatta reagire con la soluzione di acido acetico per 5 ore dopodiché la soluzione acida è stata sostituita con una nuova soluzione di acido acetico. Dopo 4 ore, la soluzione acida viene nuovamente sostituita con una soluzione di acido acetico. Il tempo di reazione totale è pari a 24 ore. Il campione, riportato in condizioni di neutralità mediante ripetuti sciacqui con acqua distillata, viene seccato a 60°C.

*Estrazione della  $CO_2$  proveniente dal gruppo  $CO_3^{2-}$*

La procedura eseguita per la purificazione ed estrazione della  $CO_2$  è quella descritta da McCrea (1950) che prevede la dissoluzione acida del carbonato utilizzando una soluzione di  $H_3PO_4$  100%. Per entrambe le tipologie di campione, aragonite e bioapatite, è stato utilizzato il sistema GasBench II (Finnigan). I campioni sono stati inseriti in fiale di borosilicato da 10 ml successivamente sigillate con tappi a vite che presentano setti di gomma butilica all'interno; alla fine, le fiale sono poste all'interno di un termostato mantenuto a 72°C.

Prima dell'inserimento di  $H_3PO_4$  100% all'interno delle fiale viene fatto fluire He (grado di purezza 5.5) con una velocità di 100 ml /min mediante un ago a doppio foro che penetra nei setti per

rimuovere l'aria. Basandoci sui protocolli analitici di Paul e Skrzpek (2006) è stato applicato un tempo di flussaggio pari a 600 s. Nel caso dell'aragonite ai 0.1-0.2 mg di campione è stato addizionato un volume di acido pari a 0.1 ml con un tempo di reazione di 3 ore. Per quanto riguarda invece i campioni di bioapatite, dato il basso contenuto di carbonato, la quantità di campione richiesta è maggiore e pari a 2 mg. Pertanto, per dissolvere completamente il carbonato presente, è stato addizionato un volume di acido pari a 0.2 ml con un tempo di reazione superiore alle 8 ore (Iacumin et al., in stampa). Insieme ai campioni vengono analizzati, alle stesse condizioni sperimentali, dei materiali di riferimento che come verrà spiegato nei paragrafi successivi serviranno per costruire la retta di calibrazione. La CO<sub>2</sub> prodotta viene aspirata dall'ago a doppio foro e convogliata all'interno di un capillare verso lo spettrometro di massa (DELTA PLUS XP, Finnigan) sotto costante flusso di He. Durante il percorso verso lo spettrometro, la CO<sub>2</sub> attraversa prima una *Nafion Trap* per la rimozione delle molecole di acqua presenti nel gas campione, poi una colonna cromatografica di silice fusa per separare la CO<sub>2</sub> da altri possibili contaminanti gassosi; infine, la CO<sub>2</sub> viene ulteriormente purificata attraverso una seconda *Nafion Trap*.

#### *Problemi inerenti all'analisi isotopica dell'ossigeno del gruppo CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>*

La determinazione della composizione isotopica del carbonato viene effettuata in maniera indiretta misurando il valore δ<sup>18</sup>O e δ<sup>13</sup>O della CO<sub>2</sub> prodotta a seguito della dissoluzione del minerale in una soluzione di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100% ad una certa temperatura (McCrea, 1950). Tutti gli atomi di carbonio della fase solida costituita da un unico componente (ad es. calcite), a seguito della reazione, passano alla fase gassosa sotto forma di CO<sub>2</sub>. Il valore δ<sup>13</sup>C della CO<sub>2</sub> è quindi uguale al valore di δ<sup>13</sup>C del gruppo CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> del minerale. Invece, il valore di δ<sup>18</sup>O<sub>carbonato</sub> non è uguale al valore di δ<sup>18</sup>O<sub>CO2</sub> misurato. La causa di questa discrepanza è da ricercarsi nel fatto che non tutti gli atomi dell'ossigeno del gruppo CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> passano in fase gassosa, ma parte di essi rimane disciolta in soluzione per cui avviene un frazionamento (*frazionamento acido*) definito come:

$$\alpha_{\text{CO2-carbonato}} = (\delta^{18}\text{O}_{\text{CO2}} + 1) / (\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonato}} + 1)$$

Si tratta di una tipologia di frazionamento che non può essere definita in termini di condizioni di equilibrio termodinamico o condizioni di stato stazionario tra il carbonato e la CO<sub>2</sub> prodotta in quanto queste due sostanze non esistono contemporaneamente.

L'applicabilità di questa metodologia per la determinazione dei valori δ<sup>18</sup>O dei campioni presenta alcuni fattori che bisogna considerare in quanto essi influenzano l'analisi isotopica dei carbonati:

- 1) presenza di molecole di acqua nella soluzione iniziale di H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, acqua prodotta durante le reazioni di polimerizzazione, vapor acqueo adsorbito sulle pareti dei *vials*
- 2) scambio isotopico dell'ossigeno fortemente dipendente dalla temperatura

- 3) diversa redistribuzione degli isotopi dell'ossigeno tra minerale e CO<sub>2</sub> di neoformazione a seconda della composizione mineralogica del primo

Per quanto riguarda il primo punto, l'ossigeno delle molecole di acqua presenti nel sistema scambiano gli isotopi di questo elemento con la CO<sub>2</sub> formatasi a seguito della dissoluzione del carbonato; pertanto, l'ossigeno della CO<sub>2</sub> non deriva solo dall'anione CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.

Per quanto riguarda la problematica espressa al terzo punto, essa sarà affrontata in maniera approfondita nell'appendice A nella quale verranno presi in esame i diversi fattori di frazionamento acido  $\alpha_{\text{CO}_2\text{-aragonite}}$  e  $\alpha_{\text{CO}_2\text{-calcite}}$  e proposto un fattore di correzione di - 0.3‰ per i campioni di aragonite analizzati in questo studio.

Per quanto riguarda invece il minerale bioapatite non si dispone di dati sperimentali che permettano di quantificare il diverso frazionamento  $\alpha_{\text{CO}_2\text{-bioapatite}}$  e  $\alpha_{\text{CO}_2\text{-calcite}}$  per cui i dati isotopici qui riportati vanno considerati come valori apparenti.

#### *Determinazione dei valori $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ della CO<sub>2</sub>*

La stima dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  della CO<sub>2</sub> prodotta dalla dissoluzione acida del carbonato è effettuata mediante la costruzione di una retta di taratura che utilizza materiali di riferimento sottoposti anch'essi a dissoluzione acida nelle medesime condizioni sperimentali dei campioni.

Per retta di taratura si intende l'espressione geometrica della regressione  $Y = \delta_{\text{st,m/w}} + 1$  su  $X = \delta_{\text{st,o}} + 1$  che permette di stimare  $\delta_{\text{i/o}}$  mediante il valore misurato  $\delta_{\text{i,m/w}}$ . Il significato dei simboli usato è il seguente:  $\delta_{\text{st,m/w}}$ : valore di delta dello standard internazionale secondario fornito da IAEA (International Atomic Energy Agency) misurato contro lo standard di lavoro del laboratorio  $\delta_{\text{st,o}}$ : valore di delta dello standard internazionale secondario fornito da IAEA (International Atomic Energy Agency) rispetto allo standard internazionale primario utilizzato come base della scala  $\delta$  accettata a livello internazionale  $\delta_{\text{i,m/w}}$ : valore di delta della sostanza alla quale appartiene la specie chimica di interesse misurato contro lo standard di lavoro del laboratorio

$\delta_{\text{i/o}}$ : valore di delta della sostanza alla quale appartiene la specie chimica di interesse misurato rispetto allo standard internazionale primario utilizzato come base della scala  $\delta$  accettata a livello internazionale.

Il *modus operandi* del Laboratorio di Geochimica degli Isotopi Stabili dell'Università di Parma, presso il quale sono stati analizzati i campioni di carbonato, prevede per l'analisi isotopica dei carbonati l'utilizzo dei due standard internazionali secondari NBS18 e NBS19 costituiti ambedue da calciti a basso contenuto di Mg. I valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  di NBS19 sono rispettivamente -2.20‰ e +1.95‰ e sono assunti senza incertezza (IAEA considera il campione NBS19 come uno standard internazionale primario). I valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  di NBS18 sono rispettivamente  $-23.2 \pm 0.1$  e  $-5.014$

$\pm 0.035$ . Lo standard di lavoro,  $w$ , è CO<sub>2</sub> in bombola. Inoltre, come standard di laboratorio, viene utilizzato un campione di marmo di Carrara, una calcite povera in Mg di cui si conosce il valore  $\delta$  quale valore medio di decine e decine di misure effettuate contro gli standard NBS19 e NBS18.

Date le  $n_1$  coppie di valori ( $\delta_{\text{NBS19/VPDB}} + 1$ ,  $\delta_{\text{NBS19mis/w}} + 1$ ) per lo standard NBS19 e  $n_2$  ( $\delta_{\text{NBS18/VPDB}} + 1$ ,  $\delta_{\text{NBS18mis/w}} + 1$ ) per lo standard NBS18, si fa una regressione Y su X con le  $n$  coppie di dati imponendo il passaggio della retta per l'origine. Si ottiene così la retta di regressione  $Y = B \cdot X$ . Se la linearità è verificata si utilizza la retta rovesciata  $X = 1/B \cdot Y$  per la stima di  $\delta_{i/\text{VPDB}}$  per un nuovo individuo generico  $i$  ( $\delta_{\text{aragonite/VPDB}}$  e  $\delta_{\text{bioapatite/VPDB}}$ ).

Per la verifica della linearità si considerano le deviazioni standard dei dati sperimentali  $s(\delta_{\text{NBS19mis/w}})$  e  $s(\delta_{\text{NBS18mis/w}})$  e la loro media pesata.

Se  $s(xy) \leq 1.5 \cdot (n_1 \cdot (\delta_{\text{NBS19mis/w}}) + n_2 \cdot (\delta_{\text{NBS18mis/w}})) / (n_1 + n_2)$  allora la linearità è verificata.

### *Riproducibilità e ripetibilità*

La deviazione standard sperimentale calcolata su misure ripetute nel tempo di campioni di NBS18 e NBS19 è di  $\pm 0.2\%$  il carbonio e 0.25-0.30% per l'ossigeno (*riproducibilità*)

La deviazione standard calcolata sulla media dei 10 prelievi di CO<sub>2</sub> da uno stesso campione all'interno di uno stesso run di analisi è pari a  $\pm 0.08$  sia per il carbonio che per l'ossigeno (*ripetibilità*)

### **6.3.2 Analisi isotopica dell'ossigeno del gruppo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> dell'apatite**

*Procedura di trattamento chimico e fisico per la purificazione della bioapatite destinata all'analisi dell'ossigeno del gruppo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> in essa contenuto*

La procedura di trattamento della bioapatite, destinata all'analisi dell'ossigeno del gruppo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> in essa contenuto, prevede una pulitura fisica dell'osso mediante una piccola fresa montata su un trapano da dentista per rimuovere i macrocontaminanti presenti. Frammenti di circa 50-60 mg vengono accuratamente tritati in un mortaio d'agata. Seguendo una procedura chimica standardizzata (Stephan, 2000), la polvere è fatta reagire con 2 ml di NaClO al 2-3 % a temperatura ambiente per 24 ore su agitatore rotante per rimuovere la frazione organica dell'osso. Con l'ausilio di una centrifuga (4000 giri/min per 5 minuti) e una pipetta, il supernatante viene rimosso. Il precipitato viene risciacquato con acqua bidistillata, mediante l'ausilio della centrifuga, fino a valori di pH prossimi alla neutralità. Per essere sicuri di aver eliminato tutti gli ioni cloruro dalla soluzione, vengono aggiunte alcune gocce di AgNO<sub>3</sub> 1M; la eventuale presenza di cloro è indicata dalla formazione di un precipitato biancastro di cloruro d'argento. Per dissolvere gli acidi umici il

campione viene fatto reagire con 2 ml di NaOH 0.125M per 48 ore a temperatura ambiente su agitatore rotante. Il supernatante viene eliminato mediante una pipetta e con l'ausilio della centrifuga (4000 giri/min per 5 minuti). Il precipitato viene risciacquato con acqua bidistillata fino a valori di pH prossimi alla neutralità. Quindi, al campione vengono aggiunti 2 ml di HF 2 M in modo da disciogliere l'apatite. Il calcio presente nella soluzione viene fatto precipitare come  $\text{CaF}_2$  mediante aggiunta di HF. Il campione trattato con HF viene centrifugato e risciacquato più volte e il supernatante viene trasferito in un beaker della capacità di 200 ml. Si aggiungono 3 ml di KOH 2M per basificare la soluzione ( $\text{pH} = 10$ ) e viene aggiunta acqua bidistillata fino a raggiungere un volume finale di 200 ml. A questo punto si aggiungono 30 ml di  $\text{AgNO}_3$  0.2M. Il bicchiere contenente la soluzione è posto in un bagno termostatico a  $T = 70^\circ\text{C}$  per 5 ore al buio. La soluzione finale ( $\text{pH} = 7$ ) viene fatta raffreddare lentamente fino a raggiungere la temperatura ambiente e i cristalli di  $\text{AgPO}_4$  formati vengono filtrati mediante filtri di acetato di cellulosa ( $0.2\mu$ ). Dopo parecchi lavaggi, i filtri vengono seccati a  $50^\circ\text{C}$  per circa 3 ore e i cristalli di  $\text{AgPO}_4$  recuperati e riposti in piccole provette.

#### *Conversione in CO dell'ossigeno contenuto nei cristalli di $\text{AgPO}_4$*

Circa 0.30 mg di  $\text{AgPO}_4$ , riposti all'interno di capsule di argento ( $3.3 * 5$  mm) insieme a 0.3 mg di glassy carbon e 0.5-1 mg di AgCl. Mediante TC-EA (Thermal conversion-elemental analyser) l'ossigeno del fosfato d'argento si combina con il carbonio per formare CO; il CO formato viene analizzato mediante lo spettrometro di massa a flusso continuo di He. La conversione a CO (pirolisi) avviene all'interno di un tubo di carbonio vetroso (diametro esterno 12 mm, diametro interno 7 mm, lunghezza 355 mm) circondato esternamente da allumina, in cui vengono fatte cadere le capsule di argento mediante un autocampionatore. All'interno del reattore viene inserito un crogiolo di grafite e la temperatura mantenuta a  $1400-1420^\circ\text{C}$ . A queste elevate temperature il carbonio presente nel reattore interno, riempito con frammenti di carbonio vetroso, induce la riduzione dei composti presenti con conseguente formazione di CO e residui che vengono bloccati da apposite trappole. Il CO, sotto flusso di He, viene confluito verso la colonna cromatografica e poi verso lo spettrometro di massa DELTA PLUS XP (Finnigan). Il TC/EA è accoppiato allo spettrometro mediante l'interfaccia ConFloIII.

#### *Determinazione del valore $\delta^{18}\text{O}$ del gruppo $\text{PO}_4^{3-}$*

La determinazione del valore  $\delta^{18}\text{O}$  del gruppo fosfatico dell'apatite viene effettuata mediante taratura con tre standard e imponendo il passaggio per lo zero (si rimanda al paragrafo precedente per dettagli sulla retta di regressione).

Non essendo disponibili standard internazionali di natura fosfatica vengono utilizzati per la calibrazione i seguenti standard internazionali:

- IAEA-CH-6, uno zucchero il cui valore  $\delta^{18}\text{O}$  è pari a  $36.4 \pm 0.6 \text{ ‰}$  - IAEA 601, acido benzoico il cui valore  $\delta^{18}\text{O}$  è pari a  $20.3 \pm 0.3 \text{ ‰}$ .
- IAEA 600, caffeina il cui valore  $\delta^{18}\text{O}$  è pari a  $-3.48 \pm 0.53 \text{ ‰}$

È evidente che usando questi standard si deroga al principio per il quale le matrici degli standard devono essere uguali a quella del campione. È evidente che in questo modo può essere introdotto un piccolo errore d'accuratezza. Tuttavia, l'uso di standard internazionali riconosciuti consente un corretto confronto tra i dati, fatto che non si verifica se ogni laboratorio usufruisce di un suo standard interno.

#### *Riproducibilità*

La riproducibilità delle analisi dell'ossigeno del gruppo fosfato è pari a 0.25-0.30 ‰.

### **6.3.3 Analisi isotopica del carbonio e azoto di campioni organici**

#### *Procedura di trattamento dei tessuti molli dei gasteropodi ed estrazione del collagene*

I tessuti molli dei gasteropodi sono stati seccati all'aria aperta per eliminare il contenuto di acqua che, come mostrato dagli studi di Meenakshi (1964), rappresenta l'80% della massa totale. A seguito dell'evaporazione del liquido, si è verificata la formazione di precipitati di aragonite e calcite, individuati mediante diffrazione ai raggi X, a partire dagli ioni bicarbonato concentrati nel liquido extrapalliale. La demineralizzazione del campione è eseguita mediante attacco con HCl 0.5 M per tre giorni a 4°C, sostituendo l'acido dopo il secondo giorno. Dopo avere eseguito ripetuti lavaggi con acqua bidistillata per raggiungere condizioni di pH prossime alla neutralità, il campione è stato suddiviso in due aliquote una delle quali, destinata all'analisi per la caratterizzazione isotopica di tutti i tessuti dell'animale, è stata seccata in stufa a 30°C e macinata con un mortaio d'agata, mentre l'altra aliquota è stata sottoposta ad ulteriori trattamenti chimici per estrarre il collagene. In riferimento a quest'ultima, il campione viene fatto reagire con NaOH 0.125 M per 20 ore a temperatura ambiente per eliminare gli acidi umici insieme alla porzione lipidica. A seguito di ripetuti lavaggi con acqua bidistillata, il campione residuo, con aggiunta di nuova acqua bidistillata, viene posto in stufa a 100°C per 17 ore. La soluzione ottenuta viene trasferita in *vials* di pyrex, congelata e liofilizzata al fine di rimuovere le molecole di acqua presenti. Alla fine del trattamento, il collagene estratto appare come una massa ovattata e filamentosa di colore biancastro.

### *Procedura di trattamento dei campioni vegetali*

I campioni vegetali sono stati seccati in stufa alla temperatura di 30 °C per 24 ore e macinati con un pestello in un mortaio di agata.

### *Conversione del carbonio e azoto contenuto nella materia organica in CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>*

I campioni di collagene, muscolo e piante sono stati riposti all'interno di capsule di stagno dopo essere stati accuratamente pesati mediante una bilancia microanalitica. Nello specifico le quantità pesante sono:

- 0.05-0.06 mg per l'analisi isotopica del carbonio contenuto nel collagene, tessuto molle e nelle piante
- 0.2-0.3 mg per l'analisi dell'azoto contenuto nel collagene e nel muscolo e 2-3 mg per l'analisi di azoto contenuto nelle piante.

L'analizzatore elementare è uno strumento che permette di determinare sia la composizione chimica, sia l'abbondanza isotopica degli elementi investigati. Il principio su cui si basa tale tecnica è la successione di reazioni di ossidazione catalitica e riduzione. Tramite un autocampionatore -un distributore su tamburo rotante-, i campioni di collagene inseriti nelle microcapsule di stagno, vengono fatti cadere in un primo reattore mantenuto alla temperatura di 1025 °C attraversato da un continuo flusso di elio arricchito in ossigeno. La presenza di ossigeno e l'innalzamento della temperatura a 1800 °C garantiscono una completa e rapida combustione (*flash combustion*). Nello specifico il reattore è costituito da una colonna di quarzo contenente triossido di cromo e ossido di cobalto argentato che catalizzano l'ossidazione e trattengono sostanze interferenti. I prodotti, ossidi di carbonio e di azoto ed acqua, vengono trascinati dal flusso d'elio in un secondo reattore, tenuto alla temperatura di 650 °C in cui gli ossidi di azoto vengono ridotti ad azoto elementare su di uno strato di rame elementare. L'acqua e l'ossigeno in eccesso vengono intrappolati in un filtro assorbente di magnesio perclorato anidro, noto col nome di anidrone. N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> vengono separati all'interno di una colonna gascromatografica dalla quale i singoli gas vengono eluiti in funzione della loro massa e trasportati mediante il gas *carrier* allo spettrometro di massa secondo la seguente sequenza:



### *Determinazione dei valori $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ della materia organica*

La determinazione del valore  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  della materia organica viene effettuata mediante taratura con tre standard con imposizione del passaggio per lo zero.

Gli standard secondari utilizzati comunemente sono:

IAEA-CH-6	zucchero il cui valore $\delta^{13}\text{C}$ è pari a $-10.45 \pm 0.03 \text{ ‰}$
NBS22	olio minerale il cui valore $\delta^{13}\text{C}$ è pari a $-30.03 \pm 0.04 \text{ ‰}$
USGS24	grafite il cui valore $\delta^{13}\text{C}$ è pari a $-16.05 \pm 0.04 \text{ ‰}$
IAEA N-1	solfo di ammonio il cui valore $\delta^{15}\text{N}$ è pari a $+0.4 \pm 0.2\text{‰}$
IAEA -N-2	solfo di ammonio il cui valore $\delta^{15}\text{N}$ è pari a $+20.3 \pm 0.2\text{‰}$
IAEA-NO-3	nitrato di potassio il cui valore $\delta^{15}\text{N}$ è pari a $+4.7 \pm 0.2 \text{ ‰}$

### *Riproducibilità*

La riproducibilità delle analisi del carbonio e dell'azoto dei composti organici è pari a 0.20 ‰.

# PARTE III

---

## Risultati e Discussione

## CAPITOLO 7

### RISULTATI

#### *Premessa*

Per poter utilizzare test statistici parametrici è necessario rispettare le seguenti condizioni:

- 1) Le osservazioni devono essere indipendenti
- 2) La distribuzione dei dati deve essere normale
- 3) La varianza deve essere omogenea (omoschedasticità)

Quando si hanno pochi dati è difficile dimostrare che essi hanno una distribuzione normale. I test t-Student e Anova sono robusti rispetto alla normalità quando il numero di dati è maggiore di 30. Per il teorema del limite centrale, infatti, anche se i dati non hanno una distribuzione normale ma si suddividono in gruppi e se ne calcola la media, la distribuzione delle medie, all'aumentare del numero di campioni, tenderà alla normalità.

Nonostante la maggior parte dei gruppi di dati isotopici ottenuti in questo studio soddisfano le tre condizioni di validità della statistica parametrica, il numero esiguo di dati a confronto e la presenza di outliers ci fa protendere verso la statistica non parametrica. Nello specifico i test applicati sono stati:

- Test Mann-Whitney (due gruppi a confronto)
- Test Kruskal Wallis (più gruppi a confronto)
- Test post hoc Dunn (applicato solo nel caso in cui il test Kruskal Wallis sia risultato significativo)

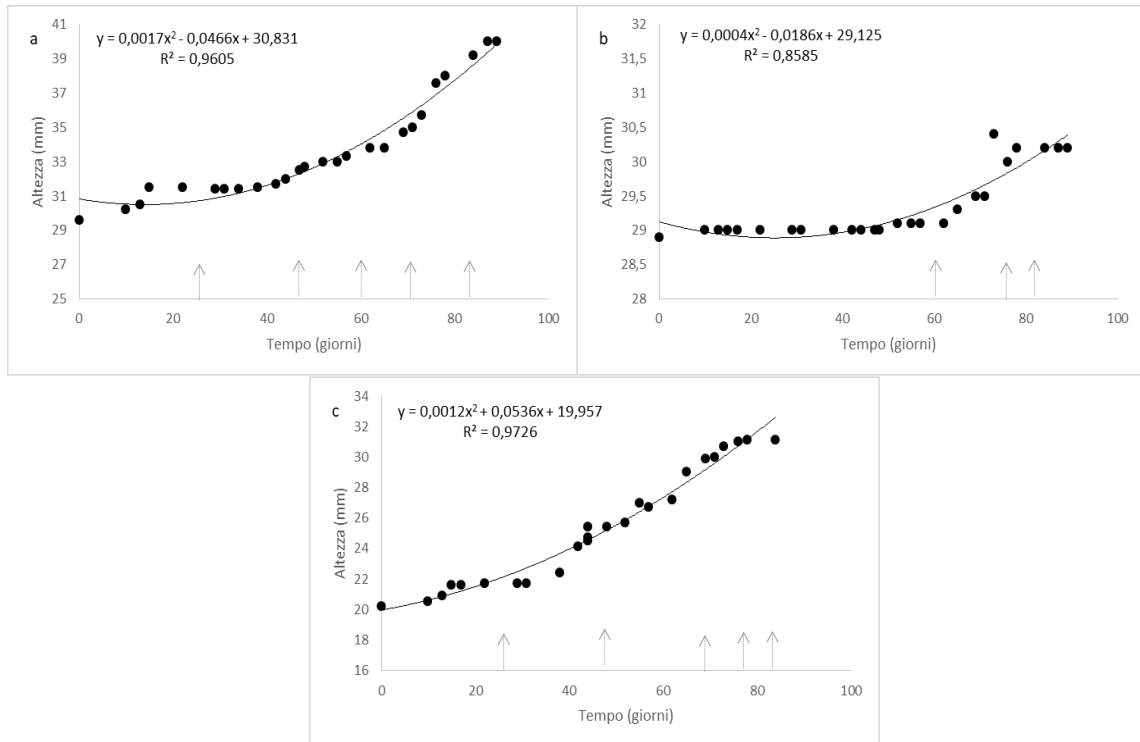
Il livello di significatività  $\alpha$  scelto è 0.05

#### **7.1 Risultati relativi agli esemplari attuali allevati in laboratorio**

Di seguito vengono riportati i primi risultati ottenuti durante la crescita in laboratorio di tre esemplari di *Pila wernei*. Il sistema, costituito da un acquario riempito con un volume di acqua pari a 3 litri e substrato sabbioso, è stato mantenuto ad una temperatura costante pari a  $27 \pm 0.2$  °C e umidità relativa pari a  $25 \pm 3\%$ . Per tutta la durata dell'esperimento l'ossigenazione dell'acqua è avvenuta mediante scambio di O<sub>2</sub> con l'atmosfera.

Durante la prima fase, i gasteropodi sono stati allevati in un'acqua con composizione isotopica media dell'ossigeno di  $-7\%$  (tutti i valori misurati sono riportati in tabella 5 e argomentati nel prossimo paragrafo) e nutriti con *Lactuca sativa longifolia* acquistata sempre dallo stesso produttore locale con un valore  $\delta^{13}\text{C}$  pari a  $-30,4 \pm 0.8$  ‰ (3 misure). Successivamente è stata fornita acqua

dal valore medio  $\delta^{18}\text{O}$  pari a +5‰ e non è stata apportata alcuna variazione alla dieta. La terza fase vede invece un ritorno ad un'acqua dal valore isotopico medio dell'ossigeno di -7‰ e una fonte nutrizionale completamente differente, costituita da un mangime -utilizzato generalmente per pesci erbivori che si nutrono sul fondo- con valore isotopico del carbonio di  $-23.6 \pm 0.1$  ‰ (3 misure). Riportiamo di seguito solo i risultati relativi al segnale isotopico dell'ossigeno in quanto quelli relativi al carbonio sono ancora in fase di elaborazione.



**Fig.31** Altezze delle conchiglie degli esemplari a, b, c in funzione del tempo. Le frecce in grigio indicano la sottrazione di parte del carbonato depositato. Valori di errore standard della regressione pari a 0,6 per l'esemplare a, 0,2 per l'esemplare b e 0,6 per l'esemplare c.

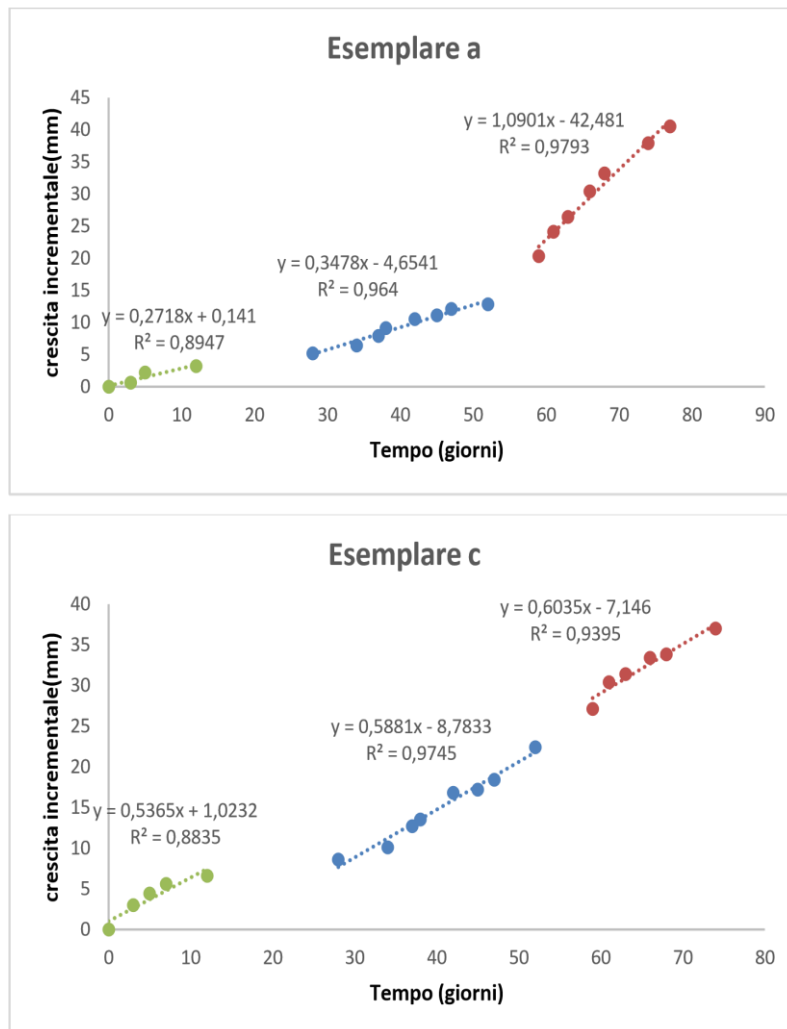
### 7.1.1 Stima del tasso di accrescimento del guscio carbonatico

I grafici in Fig.31 mostrano i valori dell'altezza della conchiglia, misurata con un calibro, in funzione del tempo per tutti e tre gli esemplari allevati.

L'andamento della crescita è descritto da una polinomiale di secondo ordine i cui coefficienti sono statisticamente diversi da zero.

In alcuni tratti delle curve si nota un rallentamento nella crescita o addirittura una regressione. Ciò è dovuto al fatto che periodicamente è stata prelevata una porzione di guscio da sottoporre ad analisi isotopica.

L'individuo *b* è cresciuto meno nel tempo in termini di altezza della conchiglia forse perché meno resiliente degli altri due o forse perché affetto da qualche malattia. Durante il primo mese, infatti, è stata registrata una crescita pari a zero.



**Fig.32.**Crescita incrementale in funzione del tempo

Per gli individui *a* e *c* è stato inoltre misurato lo strato di carbonato depositato lungo l'apertura, in un determinato intervallo temporale, che abbiamo definito crescita incrementale (vedi paragrafo 5.13). Nei grafici in Fig.32 si riporta la crescita incrementale in funzione del tempo per gli esemplari *a* e *c* evidenziando, mediante una diversa colorazione, il tasso di crescita registrato durante la Fase I (verde), Fase II (azzurro), Fase III (rosso). Come è possibile notare i due esemplari forniscono una risposta diversa.

L'esemplare *c* non mostra differenza nel tasso di crescita durante le diverse fasi mentre l'esemplare *a* incrementa decisamente la crescita durante la terza fase dell'esperimento. Le motivazioni possono riguardare la diversa velocità di adattamento, la diversa taglia, dimorfismo sessuale.

### 7.1.2 Stima del fattore di frazionamento $\alpha_{\text{aragonite-acqua}}$ a 27°C

Per calcolare il fattore di frazionamento  $\alpha_{\text{aragonite-acqua}}$  ad una determinata temperatura, è necessario conoscere la composizione isotopica dell'acqua al momento della deposizione del carbonato.

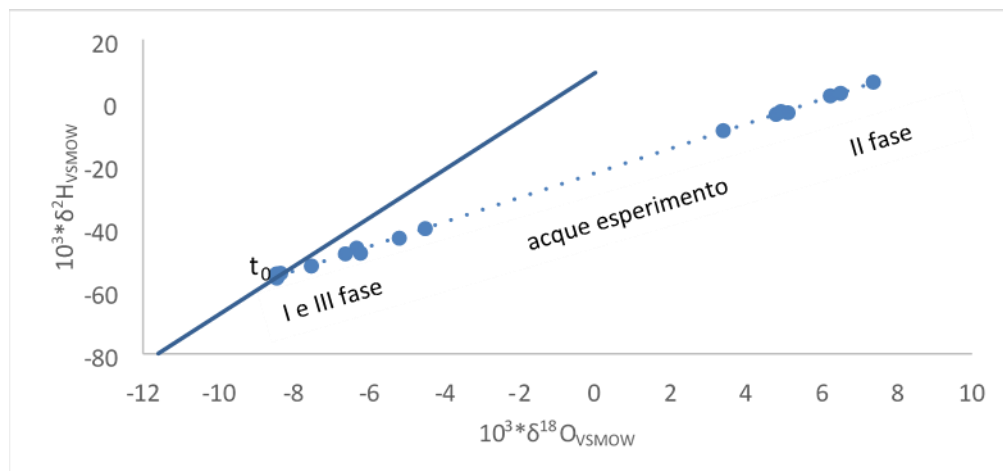


Fig.33 Retta delle precipitazioni globali e valori di composizione isotopica delle acque utilizzate durante l'esperimento

Utilizzando un pennarello indelebile è stato quindi indicato sulla conchiglia il  $t_0 = 0$  del processo di precipitazione del carbonato. Dopo due giorni ( $t_2$ ) è stata prelevata la porzione di conchiglia cresciuta. Il valore  $\delta^{18}\text{O}$  misurato sul frammento rappresenta il valore medio di composizione isotopica del carbonato depositato in 48 ore. Per calcolare il valore medio  $\delta^{18}\text{O}$  dell'acqua è stato prelevato un campione a  $t_0$ , uno a  $t_1$  e, infine, uno a  $t_2$  (Tab.5).

Se proiettiamo i valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^2\text{H}$  delle acque sperimentali sulla retta delle precipitazioni globali, vediamo come le acque prelevate a  $t_1$  e  $t_2$  della prima e terza fase dell'esperimento (acque dell'acquedotto di Parma) e le acque a  $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  della seconda fase (acque evaporate) si distribuiscono sulla destra del grafico in quanto si tratta di acque che hanno subito un processo di evaporazione secondario (Fig.33). I punti che ricadono sulla retta invece corrispondono alle acque  $t_0$  della prima fase ovvero all'acqua dell'acquedotto.

In soli due giorni, con una umidità del 25% e temperatura di 27 °C, il volume di acqua iniziale di 3 litri si è ridotto del 10 % e il valore  $\delta^{18}\text{O}$  è variato di circa 3‰.

Ammettiamo che l'evaporazione avvenga con immediata rimozione della quantità infinitesima di vapore che si forma ad un certo istante per evaporazione. Il conseguente processo di frazionamento isotopico può essere modellato mediante l'equazione di Rayleigh

$$= \frac{\delta_{H_2O,l}+1}{\delta_{H_2O,l_0}+1} = f_{H_2O}^{(\alpha_{H_2O,v-H_2O,l} - 1)}$$

dove  $f_{H_2O} = Q_{H_2O,l}/Q_{H_2O,l_0}$  (con  $Q_{H_2O,l}$  e  $Q_{H_2O,l_0}$  massa di molecole d'acqua liquida ad un certo istante dell'evaporazione e all'inizio del processo di evaporazione, rispettivamente),  $\delta_{H_2O,l}$  e  $\delta_{H_2O,l_0}$  il valore isotopico nelle condizioni con  $f_{H_2O}$  e  $f_{H_2O} = 1$ ,  $\alpha_{H_2O,v-H_2O,l}$  è il coefficiente di frazionamento acqua vapore-acqua liquida. Possiamo definire due diverse condizioni al contorno durante l'evaporazione:

- 1) a) L'umidità relativa,  $h$ , dell'atmosfera sovrastante la superficie di evaporazione è  $h = 1 = 100\%$ ; b) non vi è flusso di materia tra lo strato che si forma e l'atmosfera sovrastante con  $h = 1$ .

Il frazionamento isotopico che ne deriva può essere efficacemente descritto utilizzando un coefficiente di frazionamento  $\alpha_{(H_2O,v-H_2O,l)} = \alpha_{(H_2O,v-H_2O,l)}^{eq}$ , dove eq indica le condizioni di equilibrio termodinamico. Pertanto:

$$= \frac{\delta_{H_2O,l}+1}{\delta_{H_2O,l_0}+1} = f_{H_2O} \left( \frac{1}{\alpha_{H_2O,l-H_2O,v}^{eq}} - 1 \right)$$

- 2) L'umidità relativa,  $h$ , dell'atmosfera sovrastante la superficie di evaporazione è  $h < 1$  e, quindi, vi è flusso di materia tra lo strato che si forma e l'atmosfera sovrastante con  $h < 1$ .

Tra la superficie di evaporazione e l'atmosfera sovrastante si instaura un gradiente isotopico che resta costante nel tempo:

$$\text{grad} = \frac{\partial \delta_{H_2O,v}}{\partial z} \quad \text{con} \quad \frac{\partial \text{grad}}{\partial t} = 0$$

dove  $z$  è l'altezza sopra la superficie in evaporazione e  $t$  è il tempo. In questo caso il coefficiente di frazionamento non è più riferito a condizioni di equilibrio ma ad uno stato stazionario, ss:

$$\alpha_{H_2O,l-H_2O,v} = \alpha_{H_2O,l-H_2O,v}^{ss} \cdot \text{Gonfiantini (1986) ha suggerito una relazione empirica tra } \alpha_{H_2O,l-H_2O,v}^{ss} \text{ e } \alpha_{H_2O,l-H_2O,v}^{eq}$$

**Tab. 5** Valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^2\text{H}$  delle acque prelevate nell'acquario nelle diverse fasi dell'esperimento a  $t_0, t_1, t_2$

Fase esperimento	TEMPO	$10^3 \cdot \delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$	$10^3 \cdot \delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$
I FASE (acqua acquedotto)	$t_0$	-8,5	-55,0
	$t_2$	-5,3	-44,6
	$t_0$	-8,5	-55,0
	$t_1$	-6,7	-49,8
II FASE (acqua evaporata)	$t_2$	-5,4	-44,5
	$t_0$	3,7	-8,8
	$t_1$	5,1	-3,3
	$t_2$	7,4	6,5
	$t_0$	3,4	-11,2
	$t_1$	4,8	-3,8
	$t_2$	6,2	2,1
	$t_0$	3,4	-9,0
	$t_1$	4,9	-2,9
$t_2$	6,5	2,9	
III FASE (acqua acquedotto)	$t_0$	-8,5	-54,6
	$t_1$	-6,3	-46,3
	$t_2$	-4,5	-40,2
	$t_0$	-8,3	-54,4
	$t_1$	-6,6	-48,1
	$t_2$	-5,2	-43,2
	$t_0$	-8,4	-55,9
	$t_1$	-7,5	-52,1
	$t_2$	-6,2	-48,0

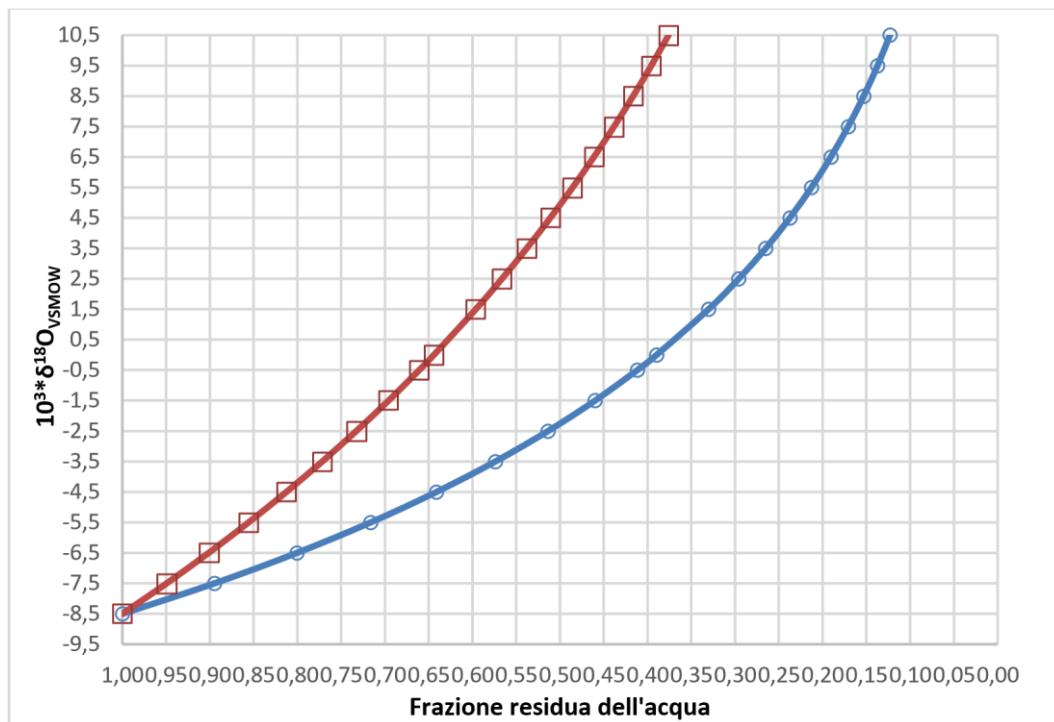
Per gli isotopi dell'ossigeno essa risulta:

$$\alpha_{\text{H}_2\text{O},\text{l}-\text{H}_2\text{O},\text{v}}^{\text{ss}} = \alpha_{\text{H}_2\text{O},\text{l}-\text{H}_2\text{O},\text{v}}^{\text{eq}} + 0.0142 (1-h)$$

Pertanto:

$$\frac{\delta_{H_2O,l+1}}{\delta_{H_2O,l_0+1}} = f_{H_2O} \left( \frac{1}{\alpha_{H_2O,l-H_2O,v}^{ss}} - 1 \right)$$

Nella Fig. 34 sono riportati gli andamenti calcolati mediante l'equazione di Rayleigh in condizioni di equilibrio e di stato stazionario con  $h = 25\%$  per  $T = 27^\circ\text{C}$ :  $\alpha_{H_2O,l-H_2O,v}^{eq} = 1.009142$  (Horita & Wesolewski, 1994);  $\alpha_{H_2O,l-H_2O,v}^{ss} = 1.019792$ . Partendo da un valore  $\delta_{H_2O,l_0} = -8.5\%$ , per  $f_{H_2O} = 0.85$



**Fig.34** Distillazione di Rayleigh per condizioni di equilibrio termodinamico (linea blu) e per stato stazionario (linea arancione). Per ulteriori dettagli vedi testo.

si ottiene un valore  $\delta_{H_2O,l_0} = 5.5 \%$ . Si noti come il frazionamento sia più marcato in condizioni di equilibrio termodinamico che nelle condizioni di stato stazionario assunte.

Il valore  $\delta^{18}O$  del carbonato misurato sui frammenti depositatosi nei due giorni, riflette la composizione isotopica media dell'acqua calcolata come:

$$(\delta^{18}O_{t0} + 2 * \delta^{18}O_{t1} + \delta^{18}O_{t2}) / 4$$

I risultati ottenuti sono riportati in Tab.6. Il valore medio di  $\alpha$  calcolato considerando tutte e tre gli esemplari è pari a  $1,02979 \pm 0.0005$ . Il valore medio calcolato considerando i singoli individui è pari a  $1.0299 \pm 0.0005$  per l'individuo *a*,  $1.0297 \pm 0.0008$  per il *b* e  $1.0298 \pm 0.0002$  per il *c*.

**Tab. 6** Stima del fattore di frazionamento  $\alpha_{\text{aragonite-acqua}} 27\text{ }^{\circ}\text{C}$  per i tre gasteropodi allevati in laboratorio

campione	$\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite} +1}$	$\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua} +1}$	$\alpha_{\text{aragonite-acqua}} 27\text{ }^{\circ}\text{C}$
INDIVIDUO a	1,02308	0,99318	1,03011
	1,02344	0,99360	1,03003
	1,02290	0,99330	1,02980
	1,02276	0,99257	1,03042
	1,03446	1,00533	1,02898
INDIVIDUO b	1,02341	0,99360	1,03000
	1,02335	0,99330	1,03025
	1,03420	1,00533	1,02872
INDIVIDUO c	1,02297	0,99318	1,02999
	1,02325	0,99360	1,02984
	1,02297	0,99330	1,02987
	1,03516	1,00533	1,02967
	1,03470	1,00494	1,02961

## 7.2 Risultati relativi agli esemplari attuali campionati in diversi habitat

### 7.2.1 Valori isotopici medi dell'ossigeno delle conchiglie e dell'acqua ambientale

Gli esoscheletri carbonatici degli esemplari attuali analizzati presentano valori medi  $\delta^{18}\text{O}$  che oscillano tra -1.47 e 2,49‰ con una variabilità intraspecifica di 3.7  $\delta$ . Nello specifico, le conchiglie raccolte a Ed Dueim nel novembre 2015 e novembre 2017, rispettivamente presso un canale di irrigazione e un'area umida, entrambi interconnessi con il Nilo Bianco, presentano un valore medio  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  di  $-0.3 \pm 1.0\text{‰}$  (mediana = -0.4, n = 8). Gli esemplari prelevati invece durante novembre 2017 e dicembre 2018 presso le rive del bacino idrico di Jebel Aulia e un canale scavato per la pesca ad esso collegato, presentano valori medi  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  pari a  $0.7 \pm 0.6\text{‰}$  (mediana = 0.8, n = 31) (Fig.35). I due gruppi mostrano una differenza statisticamente significativa per l'ossigeno (test Mann-Whitney, p = 0.007; Monte Carlo p = 0.005).

Sebbene i campioni di Ed Dueim mostrino una mediana  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  più bassa se confrontata con quella di Jebel Aulia, siamo di fronte a valori dell'ossigeno che indicano che l'acqua in cui il carbonato si è depositato ha subito evaporazione. Le acque del Nilo Bianco, infatti, sono soggette

a forti perdite per evaporazione lungo il percorso dalla sorgente fino alla confluenza con il Nilo Azzurro presso Khartoum. Prima di attraversare la vasta distesa di *swamps* del Sudd, il Nilo Bianco presenta valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  delle acque con una mediana di  $-2.05\text{‰}$  e  $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$  pari a  $-4.8\text{‰}$  (Langman, 2015). Il valore isotopico dell'acqua meteorica in Uganda e Sudan meridionale è di circa  $-2\text{‰}$  (Williams et al., 2000).

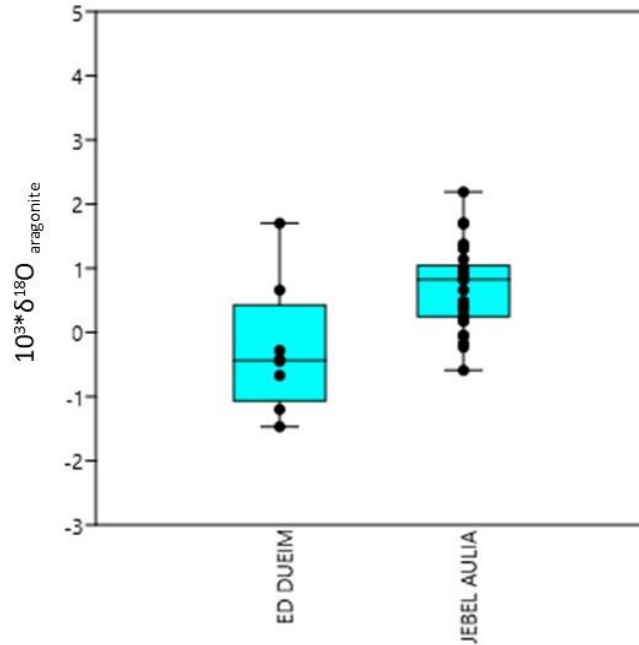
Subito dopo aver attraversato il Sudd il valore della mediana varia bruscamente ed è pari a  $2.43\text{‰}$  per  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  e  $21.8\text{‰}$  per  $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ .

**Tab.7** Valori di  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$ ,  $\delta^{12}\text{H}_{\text{acqua}}$   $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  dei campioni di acqua prelevati in diversi siti di campionamento.

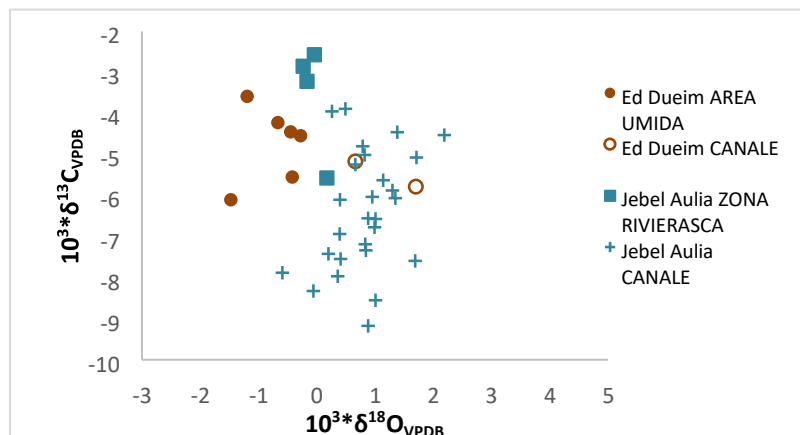
Sito di campionamento lungo il Nilo Bianco		Periodo di campionamento	$10^3 \cdot \delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}(\pm 0.5)$	$10^3 \cdot \delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}(\pm 1)$	$10^3 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}(\pm 0.2)$
Ed Dueim (13°58'43.4" N 32°19'04.6" E)	Area	Novembre	2.5	22.2	-7.1
	umida	2017	1.6	17.5	-7.9
	Fiume	Novembre 2017			
Jebel Aulia (15°14'48.20"N 32°28'32.62"E)	Canale	Dicembre 2018	5.5	33	-6.9
	Zona	Dicembre 2018	2.8	-	-10.3
	rivierasca	Novembre 2017	2.4	20.7	-
	Zona rivierasca				
al-Khiday (15°27'06.3"N 32°24'23.5"E)	Fiume	Novembre	3.3	25.8	-6.7
	Fiume	2017	3.3	27.6	-
	Pozzo	Novembre 2015	2.4	22.0	-9.7
		Novembre 2015			

\*la profondità del pozzo è di circa 7 m e la distanza dal fiume circa 500 m

I valori isotopici dei campioni di acqua prelevati nei siti di raccolta dei gasteropodi e nel sistema fluviale principale rivelano anch'essi forte evaporazione (Tab.7).



**Fig.35** Box plots con data plots dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  medi delle conchiglie attuali raggruppati secondo il sito di campionamento lungo il Nilo Bianco.



**Fig.36** Valori medi  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}(\text{V-PDB})$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}(\text{V-PDB})$  dei campioni attuali di *Pila wernei* prelevati in diversi habitat presso Ed dueim e Jebel Aulia

Confrontando i valori relativi alle zone rivierasche del Nilo Bianco presso Jebel Aulia e al-Khiday e l'area umida di Ed Dueim è possibile notare un aumento dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  procedendo da Sud (Ed Dueim) verso Nord (al-Khiday). I valori riportati in Tab.7 si riferiscono alla stagione umida (giugno-ottobre); durante la stagione secca i valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{12}\text{H}$  dell'acqua del Nilo Bianco presso Khartoum misurati nel mese di maggio da Cockerton et al. (2013) sono rispettivamente +7‰ e 47.5‰.

Il valore di +5.45‰ dell'ossigeno, misurato nelle acque del canale presso Jebel Aulia, scavato probabilmente qualche settimana prima del prelievo dei campioni, è dovuto a processi evaporativi che hanno interessato uno specchio d'acqua profondo soltanto 70 cm.

La suddivisione dei campioni in base al diverso sito di campionamento lungo il Nilo Bianco (Fig.35) non tiene conto del fatto che esistono differenze tra i diversi habitat indagati per la medesima località, come evidenziato dai valori  $\delta^{18}\text{O}$  dell'acqua. Come è possibile notare dal grafico in Fig.36, i valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  dei gasteropodi prelevati presso i canali sia di Jebel Aulia che di Ed Dueim presentano valori più alti. In Appendice B vengono riportati i risultati dell'analisi isotopica di tutti gli esemplari attuali mentre nella Tab.8 vengono esplicitati alcuni parametri di statistica descrittiva tenendo conto della diversità degli habitat considerati.

Per stimare la variabilità all'interno di uno stesso habitat e tra habitat diversi consideriamo i singoli valori misurati presso l'apertura della conchiglia perché essi rappresentano l'ultima deposizione di carbonato e ci permettono di superare la variabilità dei dati dovuta alla diversa dimensione. I campioni prelevati presso l'area umida di Ed Dueim presentano dimensioni in altezza compresi tra 17.4 mm e 20.2 mm e un solo individuo presenta dimensioni in termini di altezza della conchiglia pari a 41.1 mm. Al contrario, i campioni prelevati presso la zona rivierasca di Jebel Aulia presentano altezze comprese tra 63.5 e 77.4 mm (Appendice B). La dimensione della conchiglia potrebbe influire sul valore medio misurato in quanto, a parità di altre condizioni di crescita, la variabilità stagionale è meglio ben rappresentata dalle conchiglie di dimensioni maggiori. Il valore isotopico medio misurato su un esemplare di piccole dimensioni rappresenta, infatti, il valore medio di un ristretto intervallo temporale mentre il valore medio di un esemplare di grandi dimensioni potrebbe essere rappresentativo di più stagioni. In tabella 9 sono riportati sia i valori medi  $\delta^{18}\text{O}$  della conchiglia sia il valore  $\delta^{18}\text{O}$  all'apertura degli esemplari prelevati nei diversi ambienti. Per quanto riguarda i campioni prelevati presso il canale a Jebel Aulia riportiamo i risultati relativi a solo 11 individui in quanto soltanto di questi possediamo il valore isotopico del carbonato depositato all'apertura. Se consideriamo quindi i soli valori  $\delta^{18}\text{O}$  all'apertura la variabilità intraspecifica, calcolata come semplice differenza tra valore massimo e valore minimo, si aggira intorno a 1-2 ‰ per tutti gli habitat considerati.

### **7.2.2 Valori isotopici medi del carbonio delle conchiglie e dell'acqua ambientale**

Gli esoscheletri carbonatici degli esemplari attuali analizzati presentano valori  $\delta^{13}\text{C}$  che oscillano tra -2.57‰ e -9.17 ‰ con una variabilità intraspecifica di circa 7  $\delta$ . Nello specifico, i campioni di Ed Dueim mostrano un intervallo di valori  $\delta^{13}\text{C}$  della conchiglia compreso tra -6.1‰ e -3.6‰ con un valore medio di  $-4.9 \pm 0.9$  ‰ (mediana = -4.9 n = 8), mentre quelli di Jebel Aulia mostrano un

intervallo più ampio compreso tra -9.2‰ e -2.6‰ e un valore medio di  $-6.0 \pm 1.7$  ‰ (mediana = -6.1, n = 31) (Fig.37).

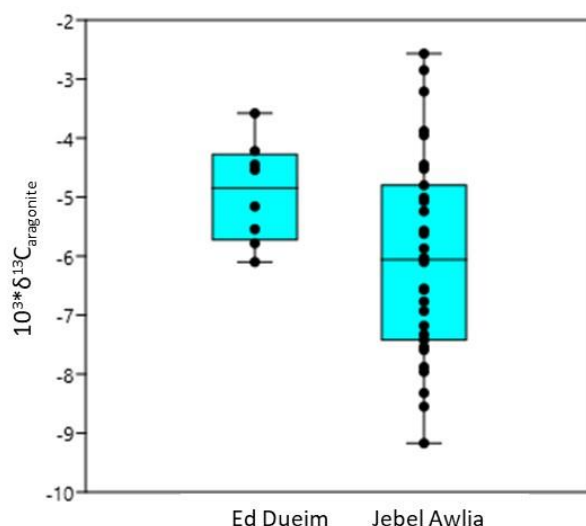
**Tab.8** Variabilità dei valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}$  di esemplari attuali di *Pila wernei* in funzione dei diversi siti di campionamento

	<b>Canale</b> Ed Dueim Novembre 2015	<b>Area umida</b> Ed Dueim Novembre 2017	<b>Zona rivierasca</b> Jebel Aulia Dicembre 2017	<b>Canale</b> JebelAulia Dicembre 2018
<b><math>10^3 * \delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}</math> (VPDB)</b>				
N	2	6	4	27
Min	0,7	-1,5	-0.2	-0,6
Max	1,7	-0,3	0,2	2,2
Intervallo	-	<b>1,2</b>	<b>0,4</b>	<b>2,8</b>
Media	1,2	-0,8	-0.07	0.8
Errore St.	-	0,2	0,1	0,1
Varianza	-	0,2	0,03	0,3
Dev.st.	0,74	0,5	0,2	0,6
Mediana	1,2	-0,6	-0.1	0.8
25 percentile	-	-1.3	-0.2	0,4
75 percentile	-	-0,4	0,1	1,1
<b><math>10^3 * \delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}</math> (VPDB)</b>				
N	2	6	4	27
Min	-5,8	-6,1	-5,6	-9,2
Max	-5,2	-3,6	-2,6	-3,9
Intervallo	-	<b>2,5</b>	<b>3,0</b>	<b>5,3</b>
Media	-5,5	-4,7	-3,4	-6,4
Errore St.	-	0,4	0,7	0,3
Varianza	-	0,9	1,9	2,1
Dev.st.	0,5	0,9	1,4	1,5
Mediana	-5,5	-4,5	-3,0	-6,6
25 percentile	-	-5,7	-5.0	-7,5
75 percentile	-	-4,1	-2,6	-5,1

**Tab.9** Composizione isotopica dell'ossigeno e del carbonio dell'intera conchiglia e della porzione di carbonato all'apertura.

Località	Habitat	$10^3 \cdot \delta^{18}\text{O}_{\text{conchiglia}}$	$10^3 \cdot \delta^{18}\text{O}_{\text{apertura}}$	$10^3 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}}$	$10^3 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$
ED DUEIM	area umida	-1,5	-0,3	-6,1	-7,0
	area umida	-1,2	0,1	-3,6	-4,1
	area umida	-0,3	-0,3	-4,5	-4,3
	area umida	-0,4	-0,7	-5,5	-6,0
	area umida	-0,5	-1,0	-4,5	-4,7
	canale	1,7	-1,3	-5,8	-5,0
	canale	0,7	0,5	-5,2	-4,9
JEBEL AULIA	zona rivierasca	-0,2	0,4	-2,8	-5,7
	zona rivierasca	-0,2	0,2	-3,2	-2,5
	zona rivierasca	0,2	1,4	-5,6	-5,1
	zona rivierasca	-0,04	0,4	-2,6	-3,2
	canale	1,3	2,6	-5,9	-6,3
	canale	2,2	2,6	-4,5	-4,2
	canale	0,8	2,9	-5,0	-4,5
	canale	0,5	1,3	-3,9	-3,6
	canale	0,9	1,9	-9,2	-7,4
	canale	0,8	1,6	-7,3	-7,0
	canale	1,0	2,6	-8,6	-6,0
	canale	0,9	2,4	-6,6	-5,5
	canale	0,8	1,4	-7,2	-5,7
canale	-0,6	1,0	-7,9	-7,3	
canale	0,4	2,5	-8,0	-5,9	

Se consideriamo un valore di significatività  $\alpha = 0.05$ , i due gruppi non mostrano una differenza statisticamente significativa per il carbonio (Mann –Whitney  $p = 0.070$  Monte Carlo  $p = 0.062$ ). In Tab.8 sono riportati gli intervalli di valori  $\delta^{13}\text{C}$  misurati sugli individui prelevati in habitat diversi.



**Fig.37** Box plots con data plots dei valori  $\delta^{13}\text{C}$  medi delle conchiglie attuali raggruppati secondo il sito di campionamento lungo il Nilo Bianco.

Gli esemplari raccolti nel canale di Jebel Aulia mostrano la variabilità maggiore con valori che vanno da  $-9.2\%$  a  $-3.4\%$ . Tale variabilità può essere dovuta al fatto che il canale era stato scavato poco tempo prima della raccolta dei gasteropodi per cui non è dato conoscere l'effettivo habitat in cui gli esemplari hanno depositato il carbonato. Se guardiamo però ai dati riportati in Tab.9 e consideriamo i valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$ , l'intervallo dei valori misurati si restringe e nel caso di Jebel Aulia è compreso tra  $-7.4\%$  e  $-3.6\%$ . La variabilità intraspecifica, calcolata come differenza tra valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$  massimo e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$  minimo, è dell'ordine di 3-4 ‰.

I valori  $\delta^{13}$  del carbonio inorganico disciolto (DIC) delle acque campionate, è pari a  $-7.1\%$  per i siti di campionamento dei gasteropodi presso Ed Dueim e  $-6.9\%$  per il campione d'acqua raccolto nel canale a Jebel Aulia. A differenza di quanto abbiamo visto per l'ossigeno, non vi è variazione nei valori isotopici del DIC delle acque del Nilo Bianco procedendo da Ed Dueim verso al-Khiday. La differenza riscontrata è dovuta al ciclo del carbonio nei diversi habitat. I valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  più bassi della zona rivierasca di Jebel Aulia e del pozzo di al-Khiady indicano un maggior contributo dei processi derivanti dalla degradazione della sostanza organica nel suolo (Tab.7).

In Tab.10 sono riportati i valori medi  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  e il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$ . Sebbene il valore del pH dei campioni di acqua raccolti non sia noto, considerato che il valore medio del pH del Nilo Bianco presso Khartoum è di circa 8.3 (Rzoska, 2012), possiamo ragionevolmente assumere che, anche nei nostri campioni, la forma molecolare predominante del DIC dell'acqua sia  $\text{HCO}_3^-$ .

Il fattore  $\alpha$  aragonite-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, calcolato da Romanek et al (1992) per quanto riguarda l'aragonite inorganica, è pari a  $1.0027 \pm 0.0006$ . La differenza tra il valore misurato  $\delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$  e quello calcolato utilizzando il fattore di Romanek et al. (1992) ( $\Delta^{13}\text{stimato-misurato}$ ) è riportata in Tab.10.

**Tab. 10** Valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ ,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$  misurato e stimato

Località	Altezza (mm)	$10^3 * \delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$	$10^3 * \delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$ misurato	$10^3 * \delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$ stimato	$\Delta^{13}\text{stimato-misurato}$
ED DUEIM	41,1	-7,1	-7,0	-4,4	2,5
	17,4	-7,1	-4,1	-4,4	<b>-0,3</b>
	18,4	-7,1	-4,3	-4,4	<b>-0,1</b>
	19,8	-7,1	-6,0	-4,4	1,6
	27	-7,1	-4,7	-4,4	<b>0,3</b>
JEBEL AULIA	27,5	-6,9	-6,3	-4,2	2,0
	28,2	-6,9	-4,2	-4,2	<b>0,0</b>
	29,3	-6,9	-4,5	-4,2	<b>0,3</b>
	30	-6,9	-3,6	-4,2	<b>-0,6</b>
	31,7	-6,9	-7,4	-4,2	3,2
	36	-6,9	-7,0	-4,2	2,8
	37,1	-6,9	-6,0	-4,2	1,8
	43,8	-6,9	-5,5	-4,2	1,2
	48,8	-6,9	-5,7	-4,2	1,4
	49,4	-6,9	-7,3	-4,2	3,0
50,9	-6,9	-5,9	-4,2	1,7	

### 7.2.3 Valori $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ lungo la spirale di crescita della conchiglia

Sei esemplari attuali sono stati sottoposti ad un campionamento puntuale lungo la spirale di crescita partendo dall'apertura fino all'apice.

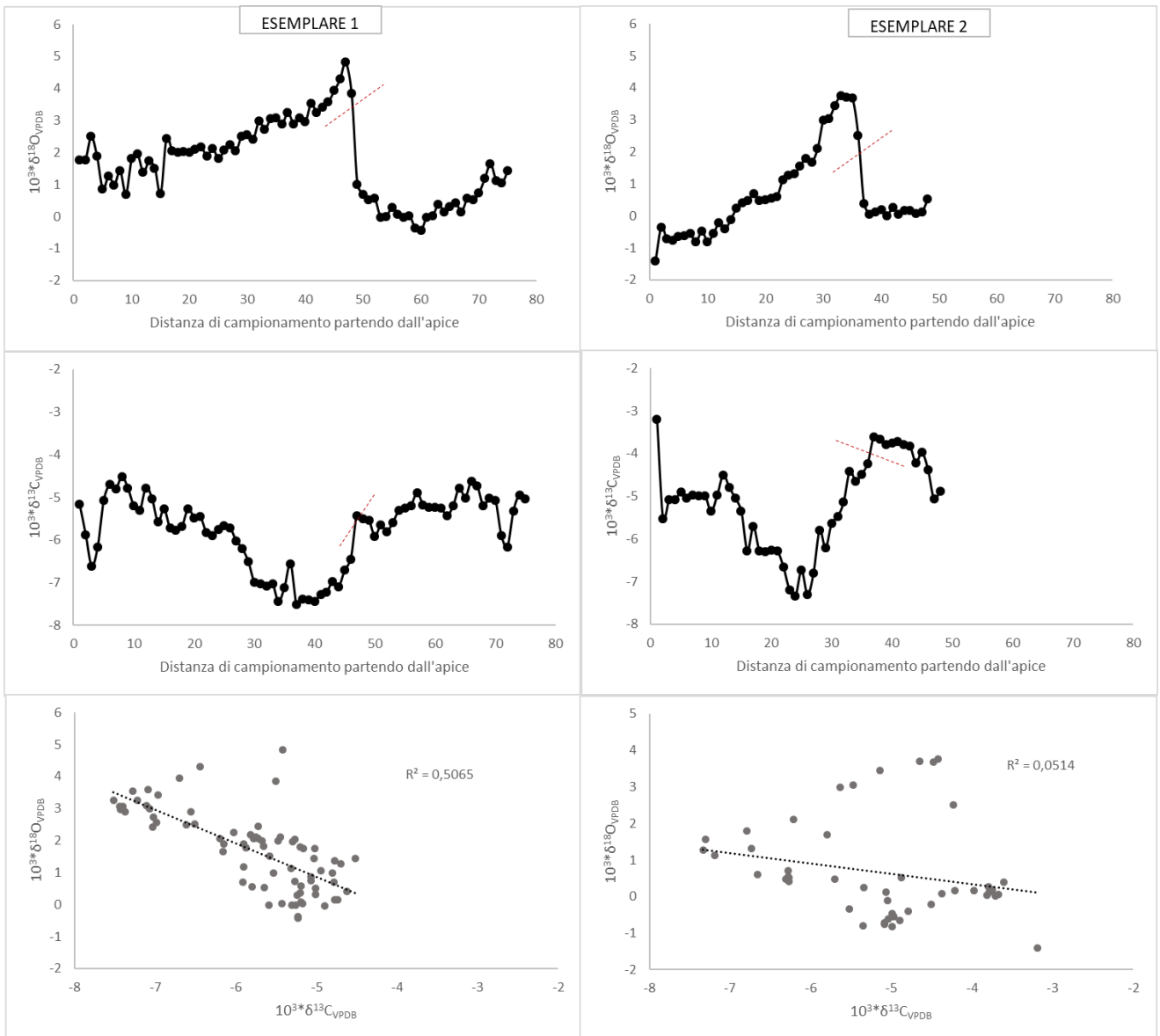
Come è possibile notare dai dati riportati nella Tabella 11, la variabilità dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  all'interno di uno stesso individuo oscilla tra 4.3‰ e 5.9 ‰, mentre la variabilità intra-individuo del carbonio

**Tab.11** Variabilità dei valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}$  all'interno di uno stesso individuo

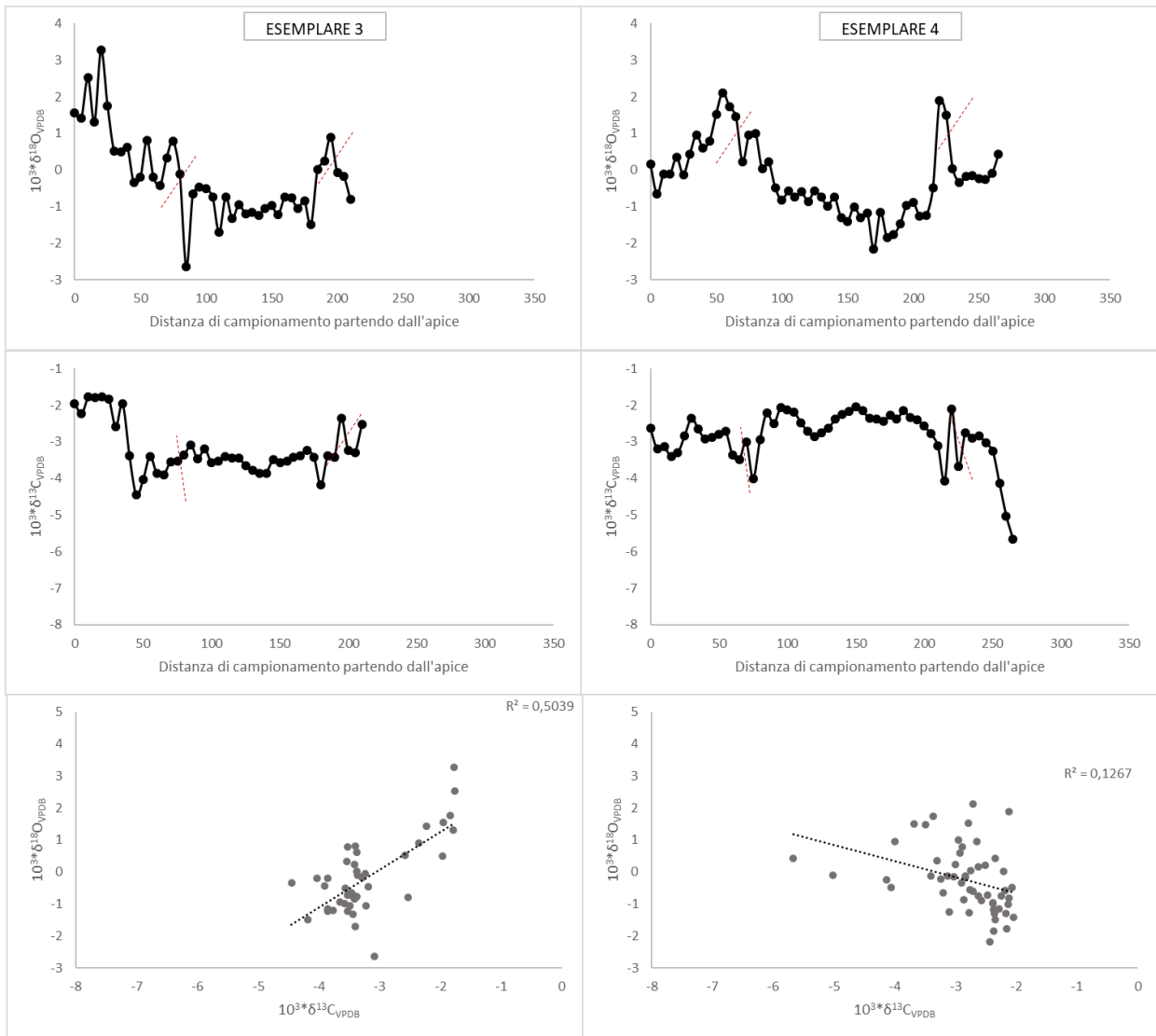
Esemplari	Ed Dueim (canale)		Jebel Aulia (zona rivierasca)			
	1	2	3	4	5	6
$10^3 * \delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$ (VPDB)						
N	75	48	43	54	64	64
Min	-0,4	-1,4	-2,6	-2,2	-1,6	-2,3
Max	4,8	3,8	3,3	2,1	3,4	2,3
Intervallo	<b>5,3</b>	<b>5,2</b>	<b>5,9</b>	<b>4,3</b>	<b>5,0</b>	<b>4,6</b>
Media	1,7	0,7	-0,2	-0,2	-	0,2
					0,04	
Errore St.	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
Varianza	1,5	1,8	1,4	1,0	1,0	0,6
Dev.st.	1,2	1,3	1,2	1,0	1,0	0,8
Mediana	1,8	0,3	-0,4	-0,3	-0,3	0,1
25 percentile	0,6	-0,3	-0,7	-1,0	-0,7	-0,3
75 percentile	2,5	1,3	0,8	0,4	0,7	0,7
$10^3 * \delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}$ (VPDB)						
N	75	48	43	54	64	64
Min	-7,5	-7,3	-4,5	-5,7	-6,4	-7,4
Max	-4,5	-3,2	-1,8	-2,0	-1,8	-1,1
Intervallo	<b>3,0</b>	<b>4,1</b>	<b>2,7</b>	<b>3,6</b>	<b>4,6</b>	<b>6,2</b>
Media	-5,8	-5,2	-3,2	-2,8	-3,0	-5,6
Errore St.	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Varianza	0,7	1,1	0,5	0,5	1,3	1,3
Dev.st.	0,8	1,1	0,7	0,7	1,1	1,1
Mediana	-5,6	-5,0	-3,4	-2,7	-2,5	-5,8
25 percentile	-6,4	-6,1	-3,6	-3,1	-3,0	-6,3
75 percentile	-5,2	-4,4	-3,1	-2,4	-2,4	-5,0

va da un minimo di 2.7 ‰ a un massimo di 6.2‰. I grafici in Fig.38, 39, 40 mostrano dati isotopici puntuali dell'ossigeno e del carbonio ottenuti in funzione del campionamento della conchiglia dei 6 esemplari. La linea tratteggiata indica la presenza di un'interruzione nella deposizione dell'aragonite. Come è possibile notare, in maniera più evidente per i due esemplari di Ed Dueim, l'interruzione è preceduta da un andamento crescente dei valori  $\delta^{18}\text{O}$ .

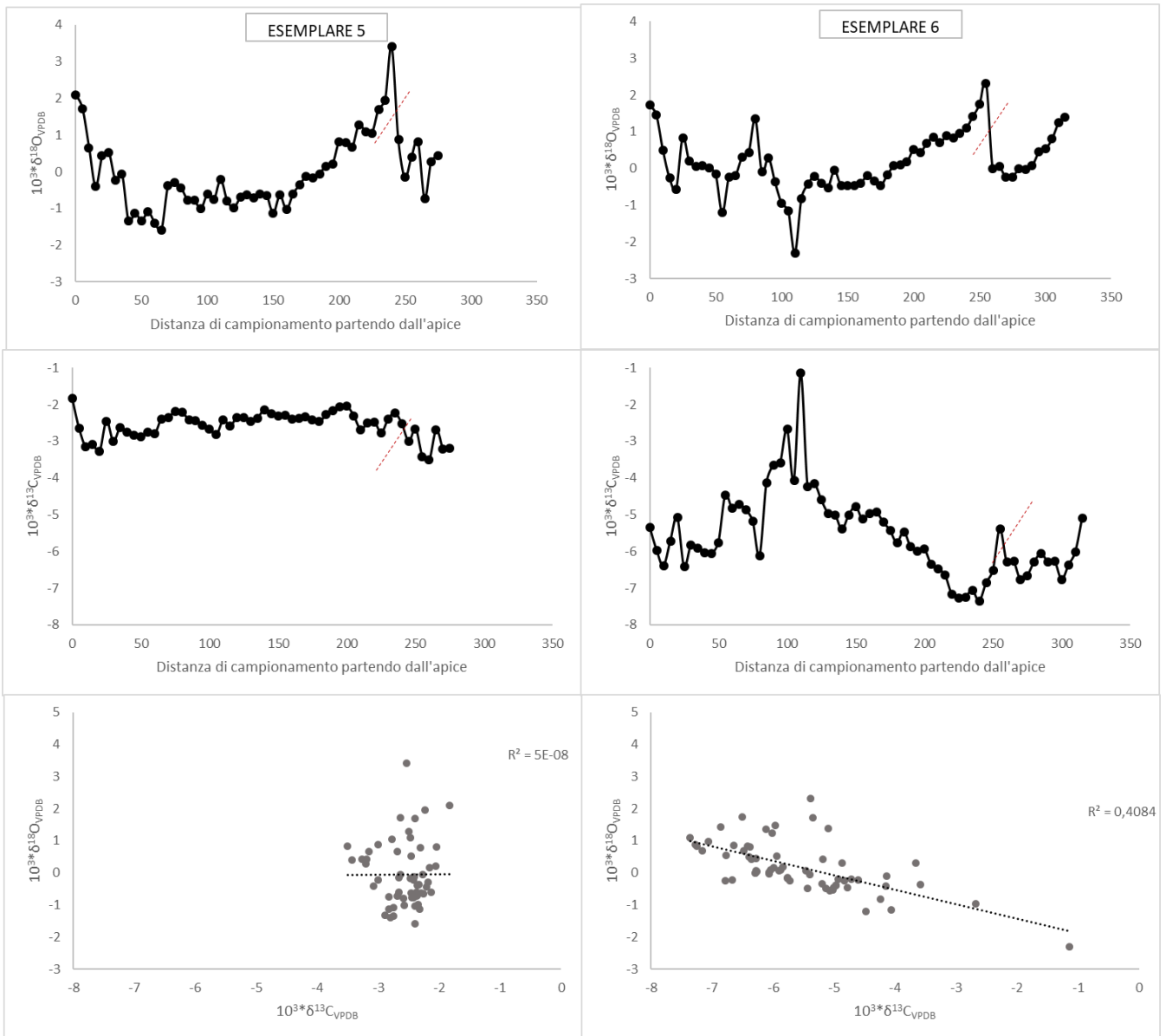
Il carbonio presenta *patterns* diversi anche per esemplari prelevati nello stesso habitat, come mostrano ad esempio i risultati relativi agli esemplari 5 e 6. I valori di  $R^2$  riportati nei grafici in Fig. 38, 39, 40 in accordo con i risultati della regressione, ci indicano che in alcuni casi vi è una relazione tra i valori isotopici dell'ossigeno e i valori isotopici del carbonio (esemplari 1,3,4,6) che potrebbe voler dire che entrambi i segnali isotopici sono influenzati dalle stesse variabili, mentre in altri casi (esemplari 2 e 5) non vi è alcun tipo di relazione.



**Fig. 38** Valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  in funzione del campionamento lungo la spirale di crescita partendo dall'apice fino all'apertura e valori  $\delta^{18}\text{O}$  in funzione dei valori  $\delta^{13}\text{C}$  per gli esemplari 1 e 2 prelevati a Ed Dueim. Il passo di campionamento è di 1 mm. La linea tratteggiata indica la presenza di un'interruzione nella deposizione del carbonato.



**Fig. 39** Valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  in funzione del campionamento lungo la spirale di crescita partendo dall'apice fino all'apertura e valori  $\delta^{18}\text{O}$  in funzione dei valori  $\delta^{13}\text{C}$  per gli esemplari 3 e 4 prelevati a Jebel Aulia. Il passo di campionamento è di 5 mm. La linea tratteggiata indica la presenza di un'interruzione nella deposizione del carbonato.



**Fig. 40** Valori  $\delta^{18}O$  e  $\delta^{13}C$  in funzione del campionamento lungo la spirale di crescita partendo dall'apice fino all'apertura e valori  $\delta^{18}O$  in funzione dei valori  $\delta^{13}C$  per gli esemplari 5 e 6 prelevati a Jebel Aulia. Il passo di campionamento è di 5 mm. La linea tratteggiata indica la presenza di un'interruzione nella deposizione del carbonato.

## 7.2.4 Valori isotopici medi del carbonio e dell'azoto delle parti molli

Nella tabella 12 sono riportate le statistiche descrittive relative ai risultati dell'analisi isotopica effettuata sulle parti molli (muscolo e collagene) di 27 individui prelevati lungo il canale a Jebel Aulia mentre in Appendice B vengono riportati tutti i risultati ottenuti. I valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  vanno da un minimo di -22.4‰ a un massimo di -14.4‰ mentre i valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{muscolo}}$  vanno da un minimo di -23.8‰ a un massimo di -15.8‰. Anche l'azoto presenta un intervallo ampio di valori e precisamente di 8‰ per il collagene e 7‰ per il muscolo.

**Tab.12** Risultati dell'analisi isotopica del muscolo e del collagene

	$10^3 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$	$10^3 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{muscolo}}$	$10^3 \cdot \delta^{15}\text{N}_{\text{collagene}}$	$10^3 \cdot \delta^{15}\text{N}_{\text{muscolo}}$
Esemplari raccolti nel canale a Jebel Aulia				
N	27	27	27	27
Min	-22,4	-23,8	2,5	2,0
Max	-14,4	-15,8	10,3	8,7
Intervallo	<b>8,1</b>	<b>8,0</b>	<b>7,8</b>	<b>6,7</b>
Media	-17,7	-18,9	7,8	6,7
Errore St.	0,8	0,4	0,3	0,3
Varianza	4,0	4,6	2,4	2,1
Dev.st.	2	2,1	1,5	1,5
Mediana	-17,4	-18,4	8,2	6,9
25 percentile	-18,8	-20,1	7,0	6,3
75 percentile	-16,7	-17,6	8,8	7,4
<u>Esemplare raccolto presso la zona rivierasca di Jebel Aulia</u>				
N =1	-11,8	-	3,8	-
Esemplare raccolto presso l'area umida di Ed Dueim				
N=1	-22,7	-	4,9	-

L'analisi statistica evidenzia una differenza significativa tra la mediana dei valori del collagene e la mediana dei valori del muscolo per entrambi i segnali isotopici (carbonio: test Mann-Whitney  $p=0.020$ , Monte Carlo  $p=0.021$ ; azoto: test Mann-Whitney  $p=0.002$ , Monte Carlo  $p=0.00$ ). Come mostrato in Fig.41, i valori  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  del collagene sono più alti di quelli misurati nel muscolo.

Ciò è dovuto alla differente composizione biochimica del collagene e del muscolo. Le proteine, di cui è costituito il collagene, presentano infatti valori più alti rispetto, ad esempio, ai lipidi e ai glucidi presenti in altri tessuti.

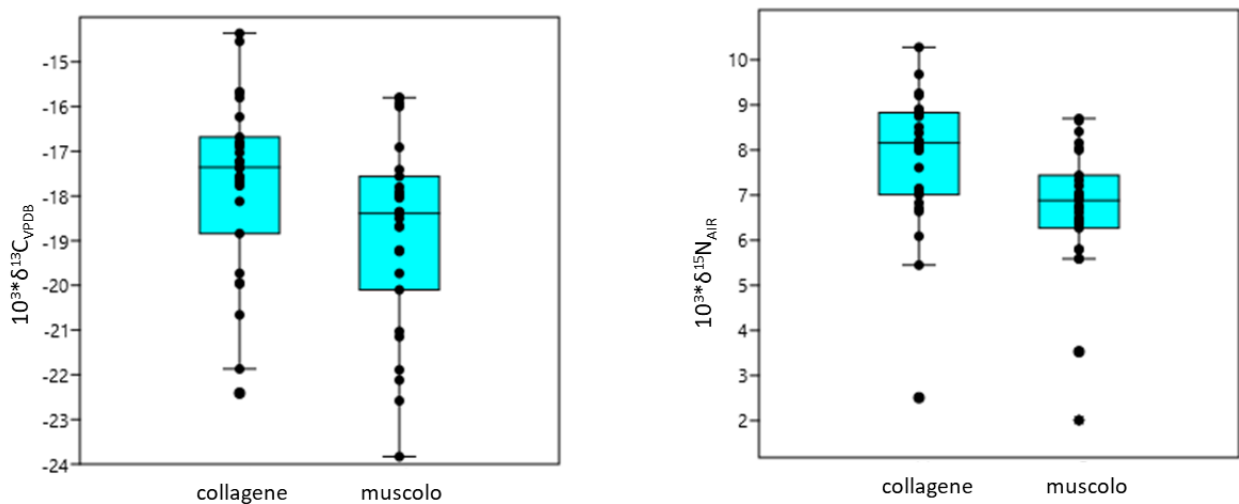


Fig.41 Valori di  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  misurati nel collagene e nel muscolo

### 7.2.5 Valori isotopici medi del carbonio e dell'azoto delle piante

I risultati dell'analisi isotopica di campioni di vegetazione raccolti in diverse località lungo il Nilo Bianco rivelano la presenza di piante  $C_3$  e piante  $C_4$  (Fig.42).

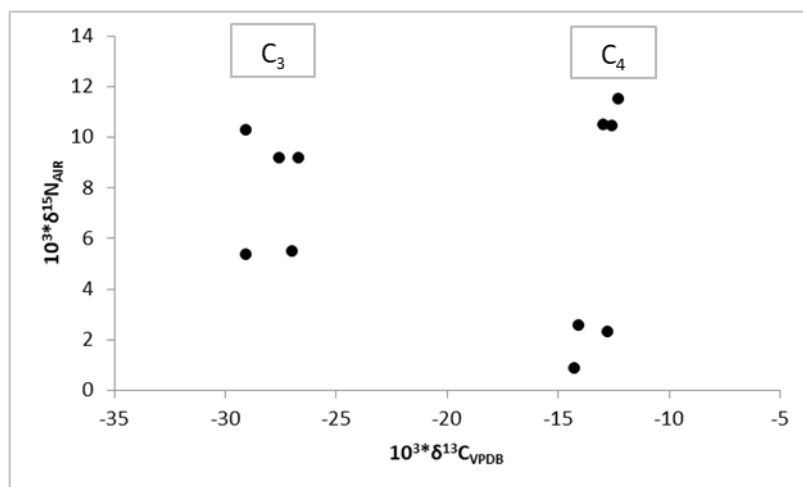


Fig.42 Valori medi  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  delle piante prelevate in diverse località lungo il Nilo Bianco

**Tab.13** Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  dei campioni di vegetazione raccolti in diverse località. L'asterisco indica che nel medesimo sito sono stati campionati i gasteropodi analizzati in questo studio

LOCALITA'	CAMPIONE	$10^3 * \delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	$10^3 * \delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$
Ed Dueim	<i>Eichornia crassipes</i>	-27,0	5,5
(area umida)*	pianta semi-acquatica	-13,0	10,5
Ed Dueim	vegetazione ripariale	-26,7	9,2
(zona rivierasca)	vegetazione ripariale	-27,6	9,2
Jebel Awlia (canale)*	pianta semi-acquatica	-12,3	11,5
Jebel Awlia (zona	pianta semi-acquatica	-12,8	2,3
rivierasca)	pianta semi-acquatica	-14,3	0,9
	<i>Cyperus rotundus</i> (infiorescenze)	-12,2	11
Al Khiday (distanza	<i>Cyperus rotundus</i> (fusto)	-12,1	9,9
dal Nilo 500 m)	<i>Cyperus rotundus</i> (foglie laterali)	-12,7	9,2
	<i>Cyperus rotundus</i> (rizoma)	-13,7	11,8
Al Khiday (presso il	<i>Acacia sp.</i>	-29,1	5,4
sito archeologico)	pianta erbacea	-14,1	2,6
	arbusto	-29,1	10,3

In tabella 13 sono riportati i valori  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  delle piante specificando il contesto ambientale in cui sono state rinvenute. Come è possibile notare, se consideriamo, ad esempio, la vegetazione campionata presso il sito archeologico di al-Khiday, in un'area di pochi metri quadrati, è possibile rivenire piante  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  caratterizzati, inoltre, da diversi valori di azoto.

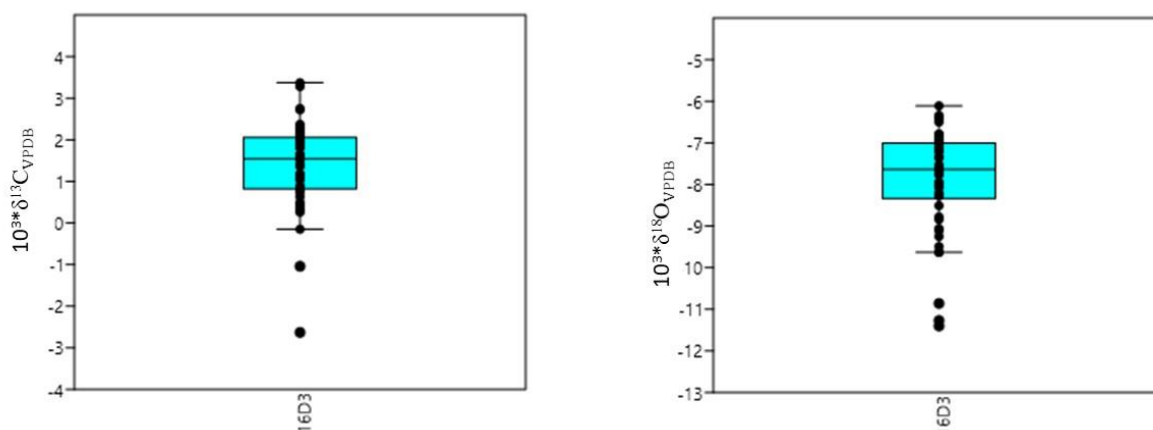
Per stimare la variabilità dei valori isotopici presenti all'interno di una stessa pianta, sono stati analizzati vari organi di un esemplare di *Cyperus rotundus*. Come è possibile notare dai risultati riportati in Tab.13, il rizoma presenta un valore  $\delta^{13}\text{C}$  più basso rispetto agli altri organi e valori  $\delta^{15}\text{N}$  più alti rispetto al fusto e alle foglie laterali, ma simile a quello misurato per le infiorescenze.

## 7.3 Risultati relativi al record archeologico

### 7.3.1 Valori isotopici medi dell'ossigeno e del carbonio delle conchiglie

I *box plots* con *data plots* raffigurati in Fig.43 mostrano i valori isotopici del carbonio e dell'ossigeno delle conchiglie provenienti dal contesto 16D3 di al-Khiday. I valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}$  sono compresi tra un minimo di -2.6 ‰ e un massimo di +3.4‰ con un valore medio di  $1.4 \pm 1.0\%$

(mediana = 1.6, n = 50) mentre i valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  oscillano tra -11.4‰ e -6.1‰ con valore medio di  $-7.9 \pm 1.2$  (mediana = -7.6, n = 50). L'intervallo dei valori misurati per i due segnali isotopici è molto simile ed è pari a 6‰ per il carbonio e 5‰ per l'ossigeno. Se si escludono gli *outliers*, l'intervallo misurato è pari a 3.5‰ sia per il carbonio che per l'ossigeno.



**Fig.43** Box plots con data plots dei valori  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  delle conchiglie archeologiche

Considerando le diverse unità stratigrafiche del deposito da cui provengono i campioni analizzati, si nota come le US 12B e 11 siano quelle caratterizzate da una dispersione maggiore dei valori dell'ossigeno e del carbonio (Tab.14). L'US 11 è un piano di calpestio individuato al disotto del chiocciolaio che, presumibilmente, separa due fasi di occupazione del sito.

Il test statistico Kruskal Wallis, applicato alle sole US 11, 12B, 12F e 19, in quanto caratterizzate da un numero maggiore di dati, rivela una differenza significativa tra le mediane dei gruppi per quanto riguarda il valore  $\delta^{18}\text{O}$  ( $p = 0.035$ ) e nessuna differenza per quanto riguarda invece il carbonio ( $p = 0.28$ ). Il test *post hoc* di Dunn confronta i diversi gruppi a coppie per vedere tra quali vi è una differenza significativa. Il risultato del test è riportato di seguito:

	US19	US12F	US 12B	US11
US19		0,4414	<b>0,01916</b>	<b>0,01314</b>
US12F	0,4414		0,131	0,1119
US 12B	<b>0,01916</b>	0,131		0,9917
US11	<b>0,01314</b>	0,1119	0,9917	

**Tab.14** Valori  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  delle conchiglie archeologiche in funzione dell'unità stratigrafica

	US19	US12F	US 12B	US11	US1E	US1D	US1C	US1B	US1upper
$10^3 * \delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$ (VPDB)									
N	10	9	10	13	1	1	1	2	3
Min	-8,3	-9,1	-11,4	-10,9	-7,1	-7,2	-7,1	-9,7	-6,9
Max	-6,1	-6,4	-6,8	-7,0	-7,1	-7,2	-7,1	-9,3	-6,4
Intervallo	<b>2,2</b>	<b>2,7</b>	<b>4,6</b>	<b>3,8</b>				<b>0,4</b>	<b>0,5</b>
Media	-7,2	-7,6	-8,5	-8,3				-9,5	-6,6
Errore St.	0,2	0,3	0,5	0,3				0,2	0,2
Varianza	0,5	0,9	2,5	1,2				0,1	0,1
Dev.st.	0,7	0,9	1,6	1,1				0,3	0,3
Mediana	-7,1	-7,6	-7,9	-8,0				-9,5	-6,5
25 percentile	-7,6	-8,4	-9,7	-9,2				-7,3	-6,9
75 percentile	-6,8	-6,8	-7,6	-7,6				-9,0	-6,4
$10^3 * \delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}$ (VPDB)									
N	10	9	10	13	1	1	1	2	3
Min	0,3	0,5	-2,6	0,5	0,6	1,2	0,8	0,3	0,7
Max	2,4	3,3	2,2	3,4	0,6	1,2	0,8	1,1	1,5
Intervallo	<b>2,1</b>	<b>2,8</b>	<b>4,9</b>	<b>2,9</b>				<b>0,8</b>	<b>0,8</b>
Media	1,4	2,0	0,8	1,7				0,7	1,2
Errore St.	0,2	0,3	0,5	0,2				0,4	0,2
Varianza	0,5	0,8	2,5	0,6				0,4	0,2
Dev.st.	0,7	0,9	1,6	0,8				0,6	0,4
Mediana	1,6	1,9	1,3	1,8				0,7	1,4
25 percentile	0,9	1,2	-0,4	0,9				0,2	0,7
75 percentile	1,9	2,7	2,1	2,1				1,2	1,5

La composizione isotopica dell'ossigeno dei campioni rinvenuti nell'US 19 è quindi diversa da quella dei campioni prelevati dalle US 12B e 11.

È interessante notare inoltre come la probabilità che i campioni dell'US 12B siano uguali a quelli prelevati nell'US11 è pari al 99%. Quest'ultimo dato potrebbe indicare una contaminazione tra le due US.

### 7.3.2 Risultati delle datazioni con radiocarbonio

In Tab.15 sono riportati i risultati delle datazioni al radiocarbonio effettuate su 7 conchiglie prelevate da alcune US individuate all'interno del deposito (vedi Appendice B per maggiori dettagli). Per escludere un possibile effetto *reservoir* è stato datato anche l'esoscheletro di un esemplare attuale di *Pila wernei*. La percentuale di carbonio moderno (pMC) per questo campione è risultato essere pari a 101,5, valore pienamente attuale e compatibile con il 2018.

**Tab.15** Datazioni al radiocarbonio di esemplari di *Pila wernei* rinvenuti ad al-Khiday effettuate presso il laboratorio CIRCE di Caserta

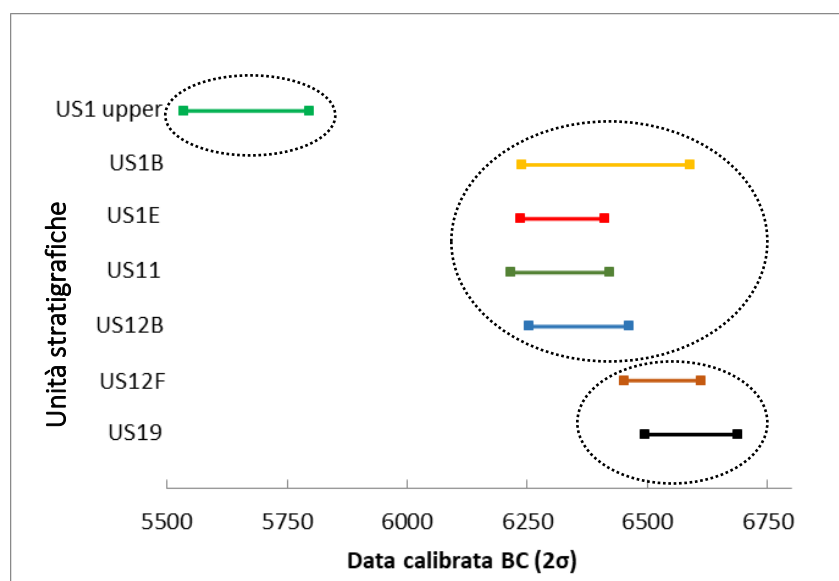
Sito	US	Data	Data	Data	Periodo culturale
		convenzionale (1σ) BP	calibrata (1σ) BC	calibrata (2σ) BC	
16D3	1upper	6763±73	5726-5622	5798-5536	Tardo Mesolitico
	1B	7553±82	6478-6266	6588-6238	Mesolitico medio B
	1E	7448±44	6381-6255	6412-6235	Mesolitico medio B
	11	7423±50	6364-6244	6421-6216	Mesolitico medio B
	12B	7525±48	6452-6368	6463-6255	Mesolitico medio B
	12F	7689±43	6587-6473	6611-6452	Mesolitico medio B
	19	7779±45	6652-6532	6688-6496	Mesolitico medio A

I risultati della datazione sono in buon accordo con la caratterizzazione stratigrafica del deposito. Lo studio stratigrafico, però, risulta essere più potente nel discriminare i limiti della sequenza temporale rispetto alla geocronologia isotopica e ciò è dovuto ai limiti della tecnica di datazione al radiocarbonio. La data convenzionale fornita dal radiocarbonio è infatti una misura sperimentale e quindi soggetta ad errori. La calibrazione del dato sperimentale poi, necessaria per ottenere la stima

migliore dell'età vera, peggiora notevolmente la precisione per cui quello che si ottiene è un intervallo di date di calendario entro cui si ha la probabilità del 95,4% di ritrovare l'età vera dell'oggetto in analisi. Nel nostro caso l'intervallo è di circa 200 anni tranne nel caso del campione di *Pila wernei* proveniente dall'US1B per il quale l'intervallo è di circa 300 anni.

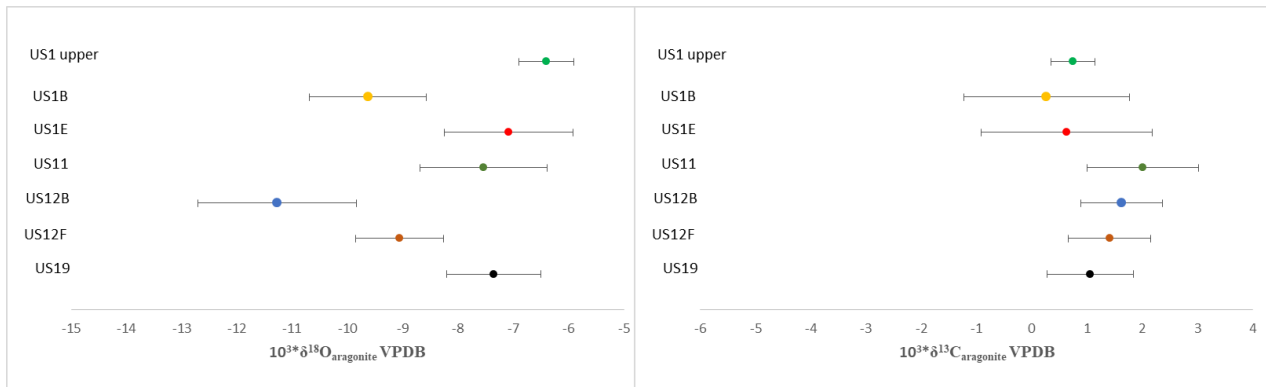
Il gruppo con datazione 5798-5536 BC è costituito dai campioni provenienti dall'US 1upper, il gruppo con datazione 6588-6216 BC è costituito dai campioni provenienti dalle US 1B (6588-6238 BC), US1E (6412-6235 BC), US11 (6411-6216 BC), US 12B (6463-6255 BC), e infine il gruppo con datazione 6688-6452 BC che è costituito dalle US 12F (6611-6452 BC) e US 19 (6688-6496 BC) (Fig.44).

Le conchiglie datate sono state campionate in maniera puntuale lungo la spirale di crescita per ottenere valori di  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  che siano rappresentativi di quell'intervallo temporale e di quella unità stratigrafica. Otteniamo così tre informazioni indipendenti (isotopiche, stratigrafiche e geocronologiche) che ci permettono di caratterizzare il deposito con un approccio di tipo diacronico.



**Fig.44** Unità stratigrafiche e cronologia

I valori medi  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  delle singole conchiglie sottoposte a datazione in funzione delle US sono riportati in Fig.45.



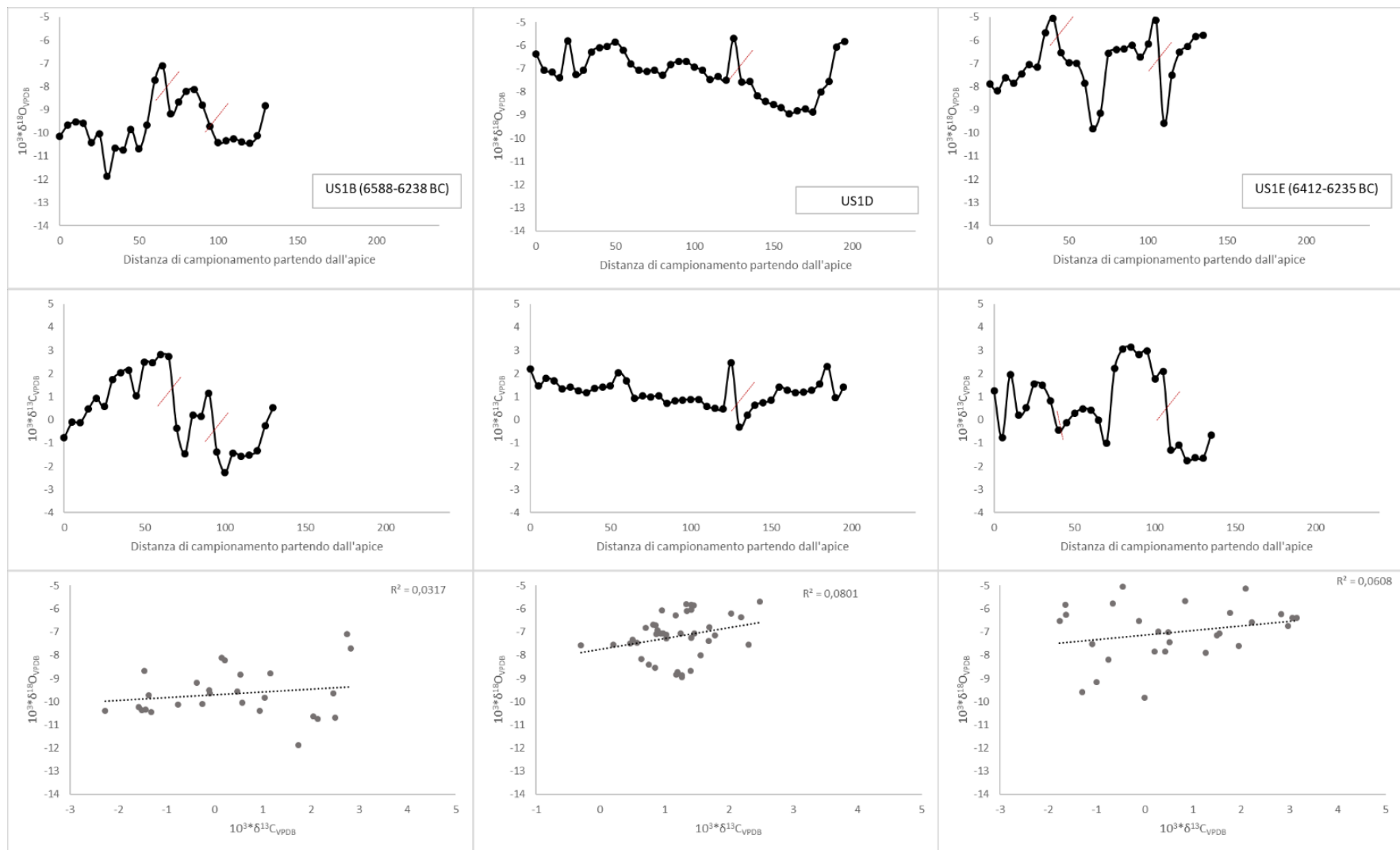
**Fig.45** Valori medi  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  e deviazione standard delle conchiglie datate in funzione dell'US

### 7.3.3 Valori $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ lungo la spirale di crescita della conchiglia

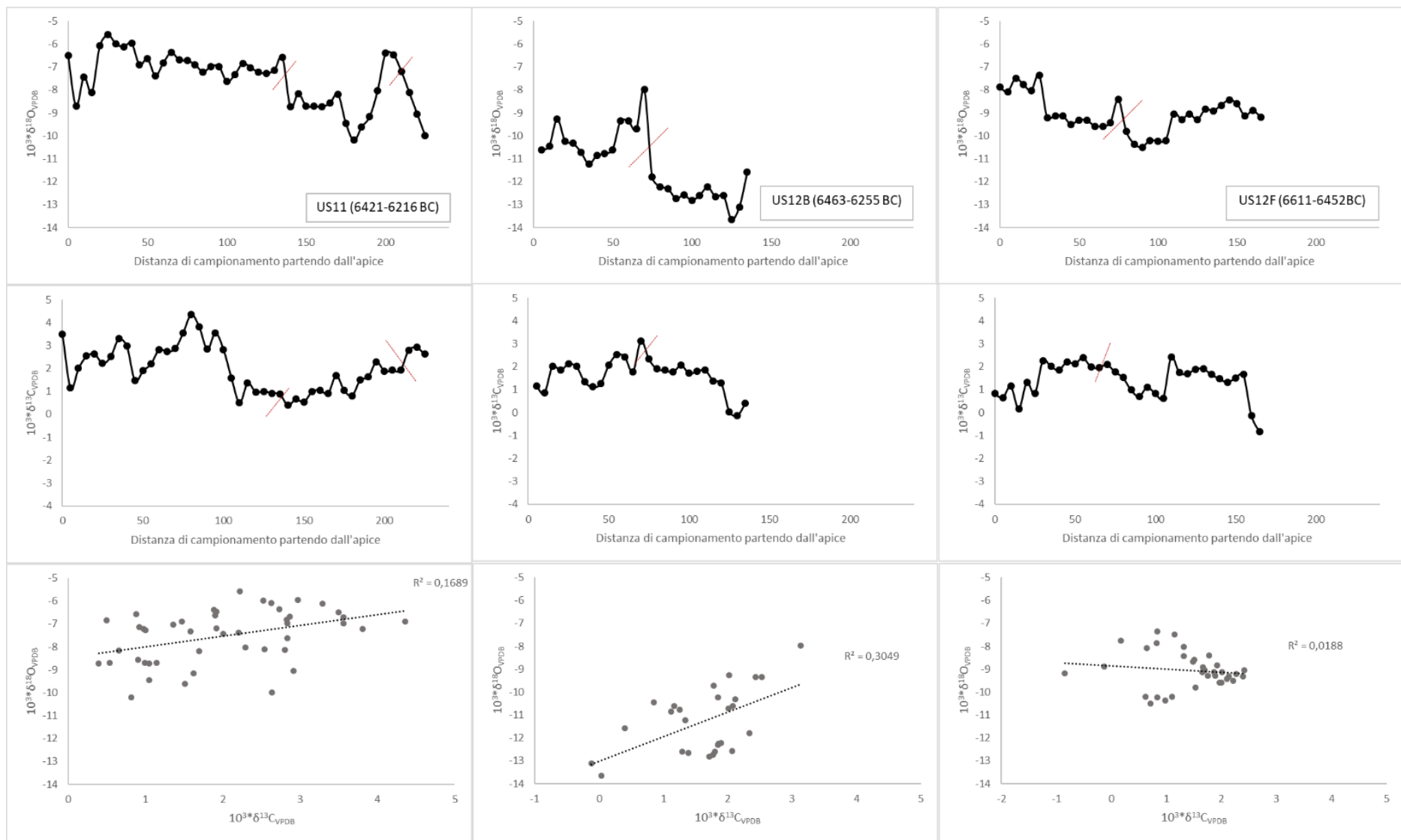
Sette esemplari archeologici di *Pila wernei*, sei dei quali datati, sono stati sottoposti ad un campionamento puntuale lungo la spirale di crescita partendo dall'apertura fino all'apice. Come è possibile notare dai dati riportati nella Tabella 16, i valori  $\delta^{18}\text{O}$  all'interno di uno stesso individuo oscillano tra 3.1‰ e 5.7 ‰, mentre i valori intra-individuo del carbonio vanno da un minimo di 2.8‰ a un massimo di 5.1‰. I grafici in Fig.46-48 mostrano dati isotopici puntuali dell'ossigeno e del carbonio ottenuti in funzione del campionamento della conchiglia dei 7 esemplari. La linea tratteggiata indica la presenza di una o più interruzioni della deposizione del carbonato della conchiglia.

**Tab.16** Variabilità dei valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}$  all'interno di uno stesso individuo per 7 esemplari mesolitici

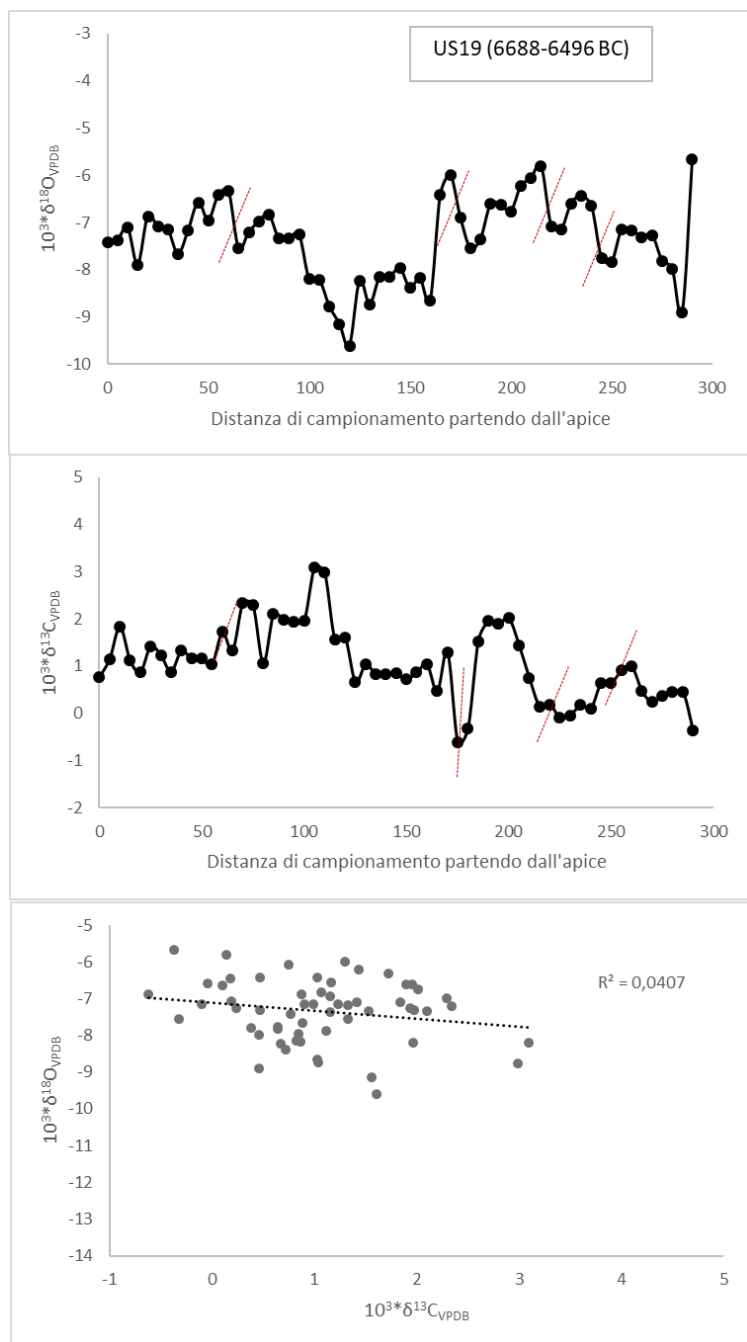
	US19	US12F	US 12B	US11	US1E	US1D	US1B
<b><math>10^3 * \delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}</math> (VPDB)</b>							
N	59	34	27	46	28	40	27
Min	-9,6	-10,5	-13,6	-10,2	-9,8	-8,9	-11,9
Max	-5,7	-7,4	-8,0	-5,6	-5,1	-5,7	-7,1
Intervallo	<b>3,9</b>	<b>3,1</b>	<b>5,7</b>	<b>4,6</b>	<b>4,8</b>	<b>3,2</b>	<b>4,8</b>
Media	-7,4	-9,1	-11,3	-7,5	-7,0	-7,2	-9,7
Errore St.	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2
Varianza	0,7	0,6	2,0	1,3	1,4	0,9	1,1
Dev.st.	0,8	0,8	1,4	1,2	1,2	0,9	1,1
Mediana	-7,2	-9,1	-11,2	-7,2	-6,8	-7,1	-9,8
25 percentile	-8,0	-9,5	-12,6	-8,6	-7,8	-7,6	-10,4
75 percentile	-6,8	-8,6	-10,3	-6,7	-6,2	-6,4	-8,8
<b><math>10^3 * \delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}</math> (VPDB)</b>							
N	59	34	27	46	28	40	27
Min	-0,6	-0,8	-0,1	0,4	-1,8	-0,3	-2,3
Max	3,1	2,4	3,1	4,4	3,1	2,5	2,8
Intervallo	<b>3,7</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>4,0</b>	<b>4,9</b>	<b>2,8</b>	<b>5,1</b>
Media	1,1	1,4	1,6	2,0	0,6	1,2	0,3
Errore St.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3
Varianza	0,6	0,6	0,5	1,0	2,4	0,3	2,3
Dev.st.	0,8	0,8	0,7	1,0	1,5	0,6	1,5
Mediana	1,0	1,6	1,8	1,9	0,4	1,2	0,2
25 percentile	0,5	0,8	1,3	1,0	-0,7	0,9	-1,3
75 percentile	1,6	2,0	2,1	2,8	1,9	1,4	1,7



**.Fig. 46** Valori  $\delta^{18}O$  e  $\delta^{13}C$  in funzione del campionamento lungo la spirale di crescita partendo dall'apice fino all'apertura e valori  $\delta^{18}O$  in funzione dei valori  $\delta^{13}C$  per gli esemplari prelevati nelle US 1B, 1D e 1E dello shellmidden sommitale del contesto archeologico 16D3. Il passo di campionamento è di 5 mm. La linea tratteggiata indica la presenza di un'interruzione nella deposizione del carbonato



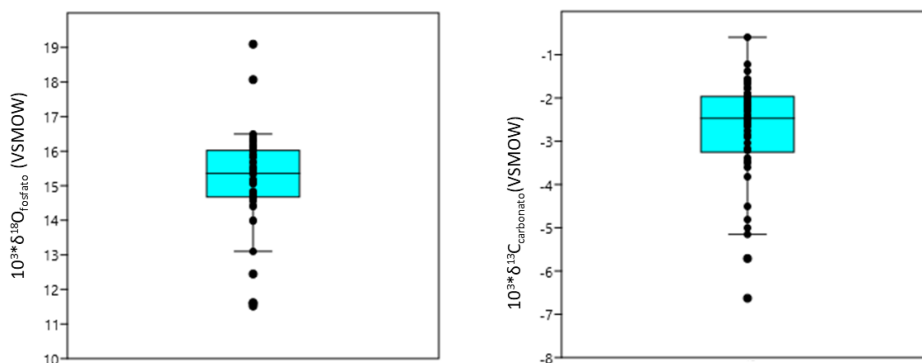
**Fig. 47** Valori  $\delta^{18}O$  e  $\delta^{13}C$  in funzione del campionamento lungo la spirale di crescita partendo dall'apice fino all'apertura e valori  $\delta^{18}O$  in funzione dei valori  $\delta^{13}C$  per gli esemplari prelevati nelle US 11, 12B e 12F del contesto archeologico 16D3. Il passo di campionamento è di 5 mm. La linea tratteggiata indica la presenza di un'interruzione nella deposizione del carbonato.



**Fig. 48** Valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  in funzione del campionamento lungo la spirale di crescita partendo dall'apice fino all'apertura e valori  $\delta^{18}\text{O}$  in funzione dei valori  $\delta^{13}\text{C}$  per gli esemplari prelevati nell'US 19 del contesto archeologico 16D3. Il passo di campionamento è di 5 mm. La linea tratteggiata indica la presenza di un'interruzione nella deposizione del carbonato

### 7.3.4 Valori isotopici medi dell'ossigeno e del carbonio delle ossa dei pesci

A seguito dell'applicazione del metodo suggerito da Iacumin et al, (in press), riguardo l'individuazione dei possibili campioni alterati da processi diagenetici (paragrafo 6.1) 16 campioni non sono stati considerati nell'analisi dei risultati. Inoltre, il rendimento di 3 campioni, misurato a seguito delle procedure di trattamento del campione, non è stato sufficiente per procedere con l'analisi isotopica. I *box plots* con *data plots* riportati in Fig.49 mostrano i valori isotopici dell'ossigeno del gruppo  $\text{PO}_4^{3-}$  e del carbonio del gruppo  $\text{CO}_3^{2-}$ . I valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}}$  sono compresi tra 11.5‰ e 19.1‰ con un valore medio di 15.1 ‰ (mediana = 15.4‰, n = 46). I valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carbonato}}$  oscillano tra un valore minimo di -6.6 ‰ e un valore massimo di -0.6 ‰, con un valore medio di -2.7‰ (mediana = -2.5, n = 46)



**Fig.49** Box plots con data plots dei valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carbonato}}$  dei pesci di al-Khiday

In Appendice B si riportano tutti i valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carbonato}}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}}$  e  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonato}}$  dei campioni analizzati. La composizione isotopica dell'ossigeno del gruppo  $\text{CO}_3^{2-}$  dell'apatite è circa  $7.5\text{‰} \pm 0.7\text{‰}$  più grande della composizione isotopica dell'ossigeno del gruppo  $\text{PO}_4^{3-}$  piuttosto che  $9\text{‰}$  come previsto da un frazionamento all'equilibrio dell'ossigeno dei due gruppi. Vennemann et al. (2001), in uno studio effettuato sui denti di squali attuali, ottengono una differenza di  $9.1\text{‰}$  con un valore di deviazione standard di  $\pm 1.5 \text{‰}$ .

Dai dati riportati in tabella 17 è possibile notare come ci sia una grande variabilità nei valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}}$  all'interno di una stessa unità stratigrafica. Per la US 1E, ad esempio, la differenza tra il valore minimo e il valore massimo misurato è di quasi  $8\text{‰}$ . Per il carbonio la dispersione maggiore dei valori si riscontra nelle US 1D e US 1B. Tale dispersione dei dati potrebbe trovare giustificazione nel fatto che il record archeologico analizzato è costituito da diverse specie appartenenti a diversi habitat, ipotesi già proposta da Vennemann et al. (2011) che hanno riscontrato

un range di valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}}$  pari a 2.5 ‰ analizzando denti di diverse specie di squali rinvenuti in un'area ristretta.

**Tab.17** Valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carbonato}}$

	US9	US12F	US 12B	US11	US1E	US1D	US1C	US1B
$10^3 * \delta^{18}\text{O}_{\text{FOSFATO}} (\text{VSMOW})$								
N	6	4	5	5	7	4	4	11
Min	14,0	14,4	11,6	15,4	11,5	12,4	15,9	11,6
Max	16,3	16,4	16,1	16,3	19,1	18,1	16,3	16,5
Intervallo	<b>2,3</b>	<b>2,0</b>	<b>4,5</b>	<b>0,9</b>	<b>7,6</b>	<b>5,6</b>	<b>0,4</b>	<b>4,9</b>
Media	15,2	15,1	14,4	15,9	14,9	15,1	16,1	15,1
Errore St.	0,4	0,5	0,8	0,2	0,8	1,2	0,1	0,4
Varianza	0,7	0,8	2,9	0,1	5,0	5,3	0,0	2,1
Dev.st.	0,9	0,9	1,7	0,3	2,2	2,3	0,2	1,4
Mediana	15,2	14,7	14,7	15,9	15,1	14,9	16,1	15,5
25 percentile	14,6	14,5	13,1	15,6	14,0	13,0	15,9	14,8
75 percentile	16,0	16,0	15,6	16,2	15,2	17,3	16,3	15,8
$10^3 * \delta^{13}\text{CCARBONATO} (\text{VPDB})$								
N	6	4	5	5	7	4	4	11
Min	-3,8	-3,5	-5,2	-2,4	-3,5	-6,6	-3,2	-5,7
Max	-1,6	-2,6	-1,9	-1,6	-1,2	-2,3	-0,6	-1,4
Intervallo	<b>2,2</b>	<b>0,9</b>	<b>3,3</b>	<b>0,9</b>	<b>2,2</b>	<b>4,3</b>	<b>2,6</b>	<b>4,3</b>
Media	-2,4	-2,9	-2,7	-1,9	-2,5	-4,1	-2,1	-3,2
Errore St.	0,3	0,2	0,6	0,2	0,3	1,0	0,5	0,4
Varianza	0,7	0,2	1,9	0,2	0,5	4,2	1,2	2,1
Dev.st.	0,8	0,4	1,4	0,4	0,7	2,1	1,1	1,4
Mediana	-2,4	-2,8	-2,1	-1,8	-2,7	-3,7	-2,3	-3,2
25 percentile	-3,0	-3,3	-3,7	-2,4	-3,0	-6,2	-3,0	-4,5
75 percentile	-1,6	-2,6	-1,9	-1,6	-2,0	-2,4	-1,0	-1,9

I pesci analizzati in questo studio possono essere suddivisi in base all'habitat in tre gruppi. Il primo gruppo è costituito da taxa tipici di acque superficiali, bene adattate a basse concentrazioni di ossigeno, alte temperature e salinità (Clariidae, Cyprinidae, Tilapia). Il secondo gruppo è formato

da taxa che abitano aree umide ben vegetate (*Heterotis niloticus*, Distichodontidae) e il terzo ed ultimo gruppo da taxa che preferiscono acque aperte e profonde (*Lates niloticus*, *Synodontis sp* )  
Purtroppo, non possiamo verificare quanto la diversità specifica possa incidere sui valori  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  perché non possediamo per tutti i campioni la classificazione tassonomica e perché il numero dei campioni sarebbe in ogni caso troppo esiguo. Il test statistico Kruskal Wallis applicato ai campioni prelevati nelle diverse US non è risultato significativo né per il segnale dell'ossigeno ( $p=0.18$ ) né per il carbonio ( $p=0.28$ ).

## CAPITOLO 8

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

#### *Premessa*

I molluschi di acqua dolce precipitano il loro esoscheletro addizionando strati di carbonato in condizioni prossime all'equilibrio con la soluzione acquosa circostante. Il valore  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonato}}$  riflette principalmente la composizione isotopica dell'acqua e la temperatura alla quale il carbonato si è formato. Come descritto ampiamente da Leng & Marshall (2004), queste due variabili in gioco sottendono una realtà molto complessa. La composizione isotopica dell'acqua è funzione, infatti, della composizione isotopica di tutti gli input idrici quali le precipitazioni, delle perdite causate da fenomeni quali l'evaporazione e delle caratteristiche idrogeologiche del sistema acquatico considerato. Variazioni di temperatura influenzano la composizione isotopica dell'ossigeno durante la precipitazione del carbonato ma influenzano anche la composizione isotopica delle precipitazioni in termini di temperatura di condensazione, e agiscono localmente sui processi di evaporazione. Piccole deviazioni dalle condizioni di precipitazione del carbonato all'equilibrio sono poi dovute a effetti metabolici legati alla specie in questione (*vital effect*).

Il valore  $\delta^{13}\text{C}$  delle conchiglie dei molluschi di acqua dolce riflette la composizione isotopica del carbonio inorganico disciolto (DIC) (Fritz & Poplawski, 1974) sebbene non esista una semplice relazione che leghi  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carbonato}}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ . Il motivo è da ricercarsi nella variabilità dei fattori che influenzano la composizione isotopica del DIC da una parte (scambio di  $\text{CO}_2$  tra atmosfera e acqua, processi fotosintetici che avvengono all'interno del sistema acquatico, mineralogia del substrato, processi di decomposizione della materia organica, valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  delle acque in ingresso) e nella possibile incorporazione di carbonio metabolico dall'altra (Dettman et al., 1999).

L'interpretazione dei *patterns* isotopici dell'ossigeno e carbonio dei carbonati non può quindi prescindere dalla piena conoscenza di quali siano tutte le variabili in gioco e come queste si relazionino l'una con l'altra. In quest'ottica, prima di procedere all'interpretazione in chiave climatica e ambientale dei risultati ottenuti dall'analisi isotopica di conchiglie archeologiche di *Pila wernei* e quindi contribuire alla caratterizzazione del sito mesolitico al-Khiday, è opportuno iniziare dai risultati ottenuti dall'analisi dei campioni attuali allevati in laboratorio e prelevati in contesti naturali.

## 8.1 Caratterizzazione dei fattori ambientali e non che influenzano la composizione isotopica del guscio aragonitico di *Pila wernei*

### *Composizione isotopica dell'ossigeno*

Lo studio condotto in laboratorio ha permesso di valutare la dinamica del frazionamento degli isotopi dell'ossigeno in un sistema semplificato (numero di variabili ridotto) e controllato (numero di incognite ridotto). Gli esemplari di *Pila wernei*, allevati in acquario, presentano dimensioni diverse della conchiglia, ciò per valutare possibili effetti ontogenetici e metabolici sia sul tasso di deposizione sia sul frazionamento carbonato-acqua all'equilibrio. Il tasso di crescita delle conchiglie è variato nel caso dell'esemplare *a*, mentre è rimasto circa costante per l'esemplare *c*. Per l'esemplare *b*, inoltre, è stata registrata una crescita pari a zero durante il primo mese. Questa diversa risposta individuale potrebbe indicare un possibile effetto ontogenetico nella crescita oppure un diverso periodo di adattamento ad un nuovo ambiente o ancora potrebbe legato al sesso degli esemplari.

Il fattore di frazionamento  $\alpha_{\text{aragonite-acqua}}$  calcolato alla temperatura di 27°C è pari a  $1,02979 \pm 0.0005$  (mediana= 1.02987, n = 13). Ricordiamo che i valori  $\delta^{18}\text{O}$  del carbonato delle conchiglie sono stati corretti di un fattore -0.3‰ a causa del diverso fattore di frazionamento acido dell'aragonite dei campioni e della calcite degli standard di calibrazione usati. Inserendo i nostri dati sperimentali nell'equazione di Dettman et al. (1999) il fattore  $\alpha_{\text{aragonite-acqua}}$  calcolato a 27°C è risultato pari a 1.02953, valore del tutto simile a quello ottenuto in questo studio.

Il valore medio di  $\alpha$ , calcolato considerando i singoli individui, è pari a  $1.0299 \pm 0.0005$  (mediana= 1.0300) per l'individuo *a*,  $1.0297 \pm 0.0008$  (mediana= 1.0300) per il *b* e  $1.0298 \pm 0.0002$  per il *c* (mediana= 1.0298). L'esemplare *b* presenta il valore più grande di deviazione standard; ciò può essere dovuto al fatto che esso è stato calcolato soltanto su tre misure. L'esemplare *c*, il più piccolo in taglia, presenta invece una minore dispersione dei dati intorno alla media. Il test Kruskal Wallis rivela che non vi è differenza significativa tra i tre gruppi ( $p = 0.56$ ).

Se invece consideriamo le diverse condizioni sperimentali, ovvero l'utilizzo di acqua impoverita di isotopi pesanti e acqua evaporata e quindi arricchita in isotopi pesanti, si riscontra una differenza significativa nei valori di  $\alpha$  misurati (Mann Whitney  $p = 0.007$ , Monte Carlo permutation  $p = 0.003$ ).

Il valore medio di  $\alpha$  calcolato per il gruppo di acque non arricchite è pari a  $1.0300 \pm 0.0002$  (mediana = 1.0300, n = 9) e a  $1.0292 \pm 0.0005$  (mediana = 1.0293, n = 4) per le acque evaporate. La causa di tale discrepanza, che risulta essere indipendente comunque dalla temperatura, può essere dovuta al contributo di:

- 1) errore sulla stima del valore  $\delta^{18}\text{O}$  del carbonato e dell'acqua ottenuta per estrapolazione dall'intervallo degli standard (nel caso delle acque evaporate)
- 2) fattori metabolici

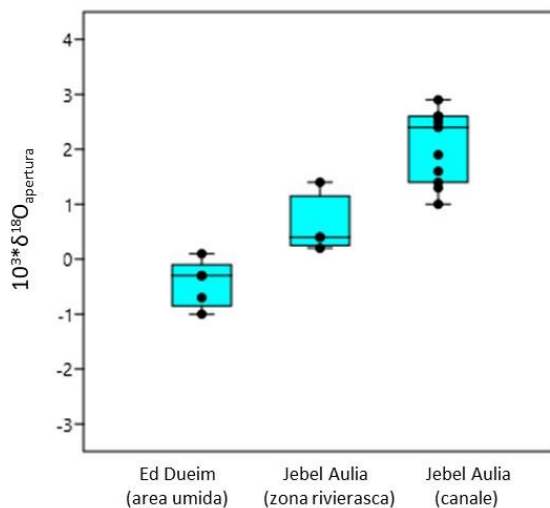
L'errore al punto (1), che al massimo potrebbe essere di 0.3‰, non è comunque sufficiente a giustificare la variazione del coefficiente di frazionamento. Possiamo concludere che il guscio carbonatico di *Pila wernei* precipita in condizioni di equilibrio con l'acqua ambientale ma va verificato se i valori  $\delta^{18}\text{O}$  dell'aragonite di *Pila wernei* possano essere condizionati in qualche misura dalla composizione isotopica dell'acqua ambientale e l'esistenza di una piccola deviazione dalle condizioni di equilibrio dovuta a fattori metabolici. Inoltre, va valutato come i valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  riflettano i valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  in funzione della temperatura.

Il campionamento di esemplari di *Pila wernei* nel loro habitat naturale ha permesso di caratterizzare meglio l'ecologia di questa specie e di considerare tutte quelle variabili che un sistema semplificato, quale può essere un esperimento in laboratorio, non permette di fare.

*Pila wernei* predilige acque lente e stagnanti, come le zone rivierasche di fiumi e laghi, paludi e altre tipologie di aree umide (Van Damme, 1984). I valori  $\delta^{18}\text{O}$  dei campioni di acqua, raccolti presso un canale artificiale e lungo la zona rivierasca del Nilo Bianco, sono un chiaro esempio di come due microhabitat riferibili ad un simile sistema acquatico presentino caratteristiche idrologiche differenti. In condizioni di stessa temperatura e stessa umidità relativa, le acque prelevate nel canale presentano un valore  $\delta^{18}\text{O}$  pari a +5.5 ‰ e le acque della zona rivierasca presentano invece valori pari a +2.8‰. Il canale e la zona rivierasca si distinguono per il fatto che l'evaporazione ha una maggiore influenza sulla composizione isotopica dell'ossigeno dei corpi d'acqua stagnanti. Ciò non vuol dire che, anche se non rappresentativi del sistema idrico principale, i gasteropodi cresciuti in questi ambienti non possano fornire informazioni di carattere ambientale dal momento che precipitano il loro guscio in condizioni prossime all'equilibrio con il microambiente in cui vivono.

I valori medi  $\delta^{18}\text{O}_{\text{conchiglia}}$  degli esemplari campionati presso Ed Dueim e Jebel Aulia, due località lungo il Nilo Bianco, sono rispettivamente  $-0.3 \pm 1.0\text{‰}$  e  $0.7 \pm 0.6\text{‰}$  e indicano che questi gasteropodi sono cresciuti in acque soggette ad evaporazione. In Figura 50 sono riportati i valori isotopici dell'ossigeno del carbonato depositato nei pressi dell'apertura della conchiglia che, come è stato già detto, fornisce una migliore stima della variabilità intraspecifica all'interno di uno stesso habitat e tra habitat diversi. Il test Kruskal-Wallis rivela che vi è una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi di valori ( $p = 0.0007$ ) e il test post hoc di Dunn ci indica che tale differenza vede da una parte i campioni prelevati a Ed Dueim area umida e Jebel Aulia zona

rivierasca e dall'altra i campioni prelevati nel canale di Jebel Aulia. Il risultato dei test statistici ci indica che l'analisi isotopica dei gusci di *Pila wernei* permette di discriminare ambienti con diverse caratteristiche ecologiche.



**Fig. 50** Valori  $\delta^{18}\text{O}$  del carbonato all'apertura della conchiglia in funzione del contesto ambientale

I valori  $\delta^{18}\text{O}$  dei campioni di acqua, infatti, prelevati nei medesimi siti di campionamento dei gasteropodi indicano chiaramente che le variazioni dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  della conchiglia riflettono le variazioni nella composizione isotopica delle acque in cui il gasteropode vive. Tali valori sono +2.45‰ e +2.35‰ per i campioni di Ed Dueim e Jebel Aulia della zona rivierasca e +5.45‰ per i campioni d'acqua prelevati nel canale.

I valori dell'ossigeno intra-individuo oscillano tra 4,3‰ e 5,9‰. Come è possibile notare dai grafici riportati nelle Figure.38,39,40, in corrispondenza di un'interruzione della deposizione del carbonato, visibile macroscopicamente, vi è una brusca diminuzione dei valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{conchiglia}}$ . Il salto isotopico è più pronunciato per i campioni di Ed Dueim che vivono in corpi d'acqua poco profondi e che rimangono isolati dal sistema fluviale principale per gran parte dell'anno. L'interruzione della crescita è dovuta alla chiusura del mollusco all'interno della conchiglia durante il periodo di estivazione. I molluschi possono interrompere la deposizione del carbonato per diversi motivi: temperatura non ottimale, mancanza di cibo, condizioni di stress idrico, raggiungimento della maturità. Esperimenti condotti in laboratorio mostrano come il genere *Pila sp.* in condizioni di stress idrico vada in estivazione chiudendo l'opercolo e riducendo il metabolismo, per poi ritornare in piena attività nel momento in cui l'acqua non rappresenta più un fattore limitante. Osservazioni in natura mostrano come durante i periodi secchi è possibile rinvenire esemplari di *Pila sp.* vivi scavando nel substrato fangoso. In ultimo, gli esemplari di *Pila wernei* allevati in cattività, alla

costante temperatura di 27°C, hanno mostrato lo stesso comportamento nel momento in cui l'acquario è stato disseccato. Questo particolare meccanismo di adattamento unito alla capacità di inglobare aria dall'atmosfera nei momenti in cui si verificano condizioni anossiche nel sistema acquatico, ha permesso a questo particolare gasteropode di diffondersi nelle zone in cui i sistemi acquatici presentano variazioni stagionali del regime idrico con periodi secchi alternati a periodi umidi.

Considerando quindi il contesto ambientale, l'autoecologia della specie, le evidenze sperimentali e l'entità della variazione dei valori dell'ossigeno (fino a 5‰), possiamo ipotizzare che la variabile principale che influenza il valore  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  è la composizione isotopica dell'acqua che ovviamente è anch'essa dipendente dalla temperatura.

L'andamento ciclico dei valori mostrato nei grafici in Fig. 38-40 può quindi essere interpretato in termini di stagionalità con periodi più umidi, caratterizzati da valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  più bassi, alternati a periodi in cui i processi evaporativi sono marcati.

La presenza dell'interruzione, in ultimo, fa sì che si possa conoscere esattamente il momento in cui l'opercolo si riapre perché è ritornata acqua nel sistema.

#### *Composizione isotopica del carbonio*

La composizione isotopica del carbonio dei gusci di *Pila wernei*, campionati in diverse località del Nilo Bianco, mostra una grande variabilità nonostante i valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  dei campioni di acqua prelevati nei siti di rinvenimento dei gasteropodi si mantengano costanti e pari a circa -7‰. Sebbene per alcuni esemplari il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}}$  misurato coincida con il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}}$  stimato mediante l'utilizzo del fattore di frazionamento  $\alpha_{\text{aragonite-HCO}_3^-}$  di Romanek (1992) (Tab.18), non vi è una chiara relazione tra valore isotopico dell'aragonite e valore isotopico del DIC, come già evidenziato da diversi studi.

Dettman et al. (1999) speculano sulla possibile deviazione dall'equilibrio adducendo al fatto che la concentrazione dello ione bicarbonato nel fluido extrapalliale tende ad essere più grande di quella dell'acqua ambientale: ciò indicherebbe che i molluschi esercitano un controllo sulla quantità di bicarbonato nel sito di precipitazione della conchiglia. I dati di Gillikin et al. (2007) suggeriscono che i bivalvi marini non precipitano la conchiglia in condizioni di equilibrio con il DIC presente nel sistema emolinfatico e che il valore  $\delta^{13}\text{C}$  della conchiglia può risultare più basso a causa del contributo della  $\text{CO}_2$  metabolica.

Dai valori  $\delta^{13}\text{C}$  della conchiglia della maggior parte degli esemplari analizzati in questo studio risulta chiaro che una fonte di carbonio impoverita di isotopi pesanti vada a contribuire alla formazione del guscio.

Per stimare il possibile contributo della  $\text{CO}_2$  metabolica al valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}}$  utilizziamo l'equazione di bilancio di massa proposta da McConnaughey et al. (1997):

$$\% \text{ C}_{\text{metabolico}} = (\delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}} - \varepsilon_{\text{aragonite-HCO}_3^-} - \delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{R}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}})$$

dove  $\delta^{13}\text{C}_{\text{R}}$  è approssimato da  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  e  $\varepsilon = 2.7 \text{ ‰}$  (Romanek et al. 1992).

I risultati ottenuti indicano che il contributo della  $\text{CO}_2$  metabolica per alcuni esemplari è pari a zero mentre per altri oscilla tra il 10% e il 30%.

Se consideriamo la natura semi-acquatica del gasteropode *Pila wernei*, non possiamo escludere che i processi di biomineralizzazione del guscio, in termini di incorporazione del carbonio, possano essere assimilabili a quelli dei gasteropodi terrestri. È stato ampiamente dimostrato come il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}}$  dei gasteropodi terrestri rifletta il valore  $\delta^{13}\text{C}$  della dieta (Yapp 1979; Stott 2002; Goodfriend and Ellis, 2002; Metref et al. 2003).

I valori  $\delta^{13}\text{C}$  della vegetazione raccolta presso l'area umida di Ed Dueim sono di  $-27\text{‰}$  e  $-13\text{‰}$  e l'unico esemplare per il quale disponiamo di valori isotopici del collagene ha un  $\delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}}$  pari a  $-6.0\text{‰}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  pari a  $-22.7\text{‰}$ . Considerando una differenza tra  $\delta^{13}\text{C}$  della dieta e  $\delta^{13}\text{C}$  dei tessuti molli del mollusco di  $\approx 1.5\text{‰}$  (De Niro & Epstein 1978) si può dedurre che, molto probabilmente, questo esemplare si nutriva per lo più di piante  $\text{C}_3$ . I valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  misurati sui campioni prelevati presso il canale di Jebel Aulia mostrano un'ampia variabilità dei valori con un intervallo che va da  $-22.4\text{‰}$  a  $-14.4 \text{‰}$  mentre i valori  $\delta^{13}\text{C}$  della vegetazione raccolta nei pressi del canale vanno da  $-14.3\text{‰}$  a  $-12.3\text{‰}$ . In questo caso i valori  $\delta^{13}\text{C}$  della vegetazione non possono però essere considerati come rappresentativi della dieta dei gasteropodi. Il canale, infatti, era stato scavato poco tempo prima del prelievo dei gasteropodi per cui esso non rappresenta la nicchia ecologica di questi esemplari. La variabilità dei dati del carbonio e dell'ossigeno, misurati considerando solo la porzione all'apertura, quindi l'ultima deposizione di carbonato, è infatti minore della variabilità dei valori medi del carbonio e dell'ossigeno.

Se tutto il carbonio della conchiglia fosse derivato dalla dieta, ci si aspetterebbe di riscontrare una differenza tra valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  (o  $\delta^{13}\text{C}_{\text{muscolo}}$ ) e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}}$  pressoché costante. Invece, come è possibile notare dai dati riportati in tabella 13 il valore di  $\Delta^{13}_{\text{conchiglia-collagene}}$  è molto variabile e va da un valore di 16.4 a un valore di 9.3. Se si correla però il valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  con  $\Delta^{13}_{\text{conchiglia-collagene}}$ ,

calcolato considerando i valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{apertura}}$ , la regressione risulta significativa ( $p_{\text{pendenza}=0} = 8,5 \cdot 10^{-5}$ ) con un errore standard,  $s(yx)$ , sulla regressione di 1.1 (Fig.51). La relazione che intercorre tra questi due parametri indica che il valore  $\Delta^{13}_{\text{conchiglia-collagene}}$  diminuisce all'aumentare del valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  e quindi all'aumentare della percentuale di piante  $\text{C}_4$  nella dieta. Metref et al. (2003) in uno studio condotto su *Helix aspersa*, un gasteropode terrestre, hanno riscontrato valori  $\Delta^{13}_{\text{conchiglia-dieta}}$  differenti a seconda della tipologia del cibo ingerito.

**Tab.18**  $\Delta^{13}_{\text{conchiglia-collagene}}$  di alcuni esemplari attuali di *Pila wernei*

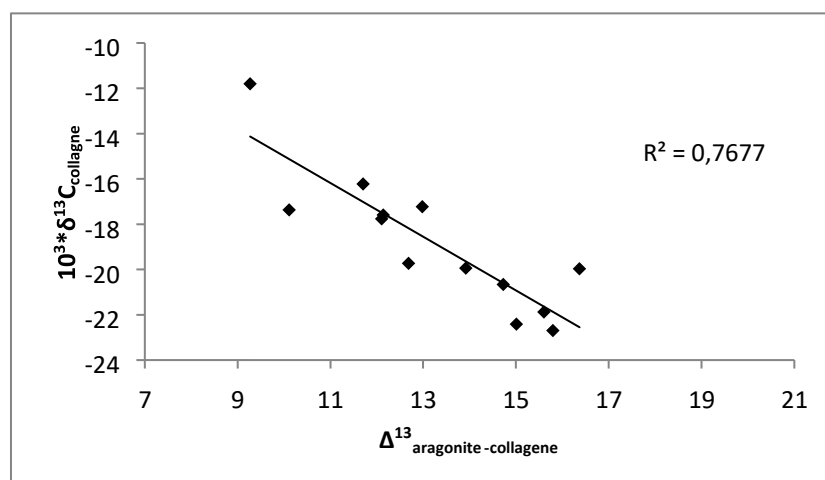
Località	Altezza (mm)	$10^3 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}$ (apertura)	$10^3 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$	$\Delta^{13}_{\text{aragonite-collagene}}$	$\Delta^{13}_{\text{aragonite stimata-misurata}}$ (apertura)
ED DUEIM (area umida)	41.1	-6.9	-22.7	15.8	2.5
JEBEL AULIA (zona rivierasca)	68.2	-2.5	-11.8	9.3	-
	27.5	-6.3	-21.9	15.6	2.0
	28.2	-4.2	-17.2	13.0	<b>0.0</b>
	29.3	-4.5	-16,2	11.7	<b>0.3</b>
	30.0	-3.6	-20.0	16.4	<b>-0.6</b>
JEBEL AULIA (canale)	31.7	-7.4	-22.4	15.0	3.2
	36.0	-7.0	-19.7	12.7	2.8
	37.1	-6.0	-19.9	13.9	1.8
	43.8	-5.5	-17.6	12.1	1.2
	48.8	-5.7	-17.8	12.1	1.4
	49.4	-7,3	-17.4	10.1	3.0
	50.9	-5.9	-20.7	14.7	1.7

Per una dieta a base di piante  $\text{C}_3$  100% tale differenza è di  $13.5 \pm 0.52$  ‰ e per una dieta a base di piante  $\text{C}_4$  al 100% è invece  $4.89 \pm 0.87$  ‰. Le ipotesi fornite dagli autori dello studio per spiegare questo comportamento riguardano la diversa qualità delle due diete o il diverso tasso di *turnover* associato alle due diete.

Secondo McConnaughey & Gillikin (2008) il valore  $\Delta^{13}_{\text{conchiglia-dieta}}$  oscilla tra 8 e 19 ‰ e tale differenza è più tanto più grande quanto più il valore isotopico della materia organica si discosta

dal valore isotopico della CO<sub>2</sub> atmosferica. Detto in altre parole, anche la CO<sub>2</sub> atmosferica contribuisce alla costruzione della conchiglia.

A questo livello dello studio non siamo in grado di interpretare a pieno il significato dei valori  $\delta^{13}\text{C}$  conchiglia. I risultati finora ottenuti indicano soltanto che *Pila wernei* per la costruzione della conchiglia utilizza sia il carbonio inorganico disciolto nell'acqua sia una percentuale consistente di carbonio metabolico. I risultati ottenuti dall'analisi isotopica dei campioni allevati in acquario permetteranno di delineare quali variabili determinano la composizione isotopica del carbonio del carbonato.



**Fig.51** Valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  e  $\Delta^{13}\text{ aragonite-collagene}$  degli esemplari prelevati presso Jebel Aulia e Ed Dueim

## 8.2 Ricostruzione paleoclimatica e paleoambientale del sito mesolitico 16D3 di al-Khiday

*$\delta^{18}\text{O}$  stimato dell'acqua del Nilo durante il periodo Mesolitico*

La composizione isotopica dei resti carbonatici di *Pila wernei* rinvenuti ad al-Khiday dipinge uno scenario ambientale completamente differente da quello descritto dagli esemplari attuali. Come è possibile osservare, infatti, dal grafico riportato in Fig.52, i valori medi di tutti i campioni analizzati si distribuiscono in due gruppi ben distinti: valori  $\delta^{18}\text{O}$  più bassi e valori  $\delta^{13}\text{C}$  più alti per gli esemplari antichi e, al contrario, valori  $\delta^{18}\text{O}$  più alti e valori  $\delta^{13}\text{C}$  più bassi per gli esemplari moderni. I valori  $\delta^{13}\text{C}$  degli esemplari attuali sono stati corretti di un fattore +1.5‰ per poterli confrontare con i campioni archeologici. L'uso dei combustibili fossili ha infatti impoverito il valore  $\delta^{13}\text{C}$  della CO<sub>2</sub> atmosferica attuale di circa 1,5 ‰.

Se consideriamo i valori medi  $\delta^{18}\text{O}$  dei campioni Mesolitici, otteniamo informazioni circa la composizione isotopica delle acque delle paleo-swamps abitate da *Pila wernei* e alimentate dal Nilo Bianco (Zerboni, 2011). Valori così negativi, compresi tra -11.4 ‰ e -6.1‰, indicano che, durante il periodo di occupazione di al-Khiday da parte di comunità di raccoglitori, cacciatori e pescatori, il regime idrologico del fiume era completamente differente da quello attuale e che il bilancio P/E (Precipitazione- Evaporazione) era positivo. L'analisi isotopica del guscio di un esemplare terrestre (*Limicolaria flammata.*), inoltre, rinvenuto nell'US 11, mostra un valore  $\delta^{18}\text{O}$  di -10.2‰ che può essere correlato al valore delle precipitazioni locali (Zanchetta, 2005) o comunque alle condizioni di umidità.

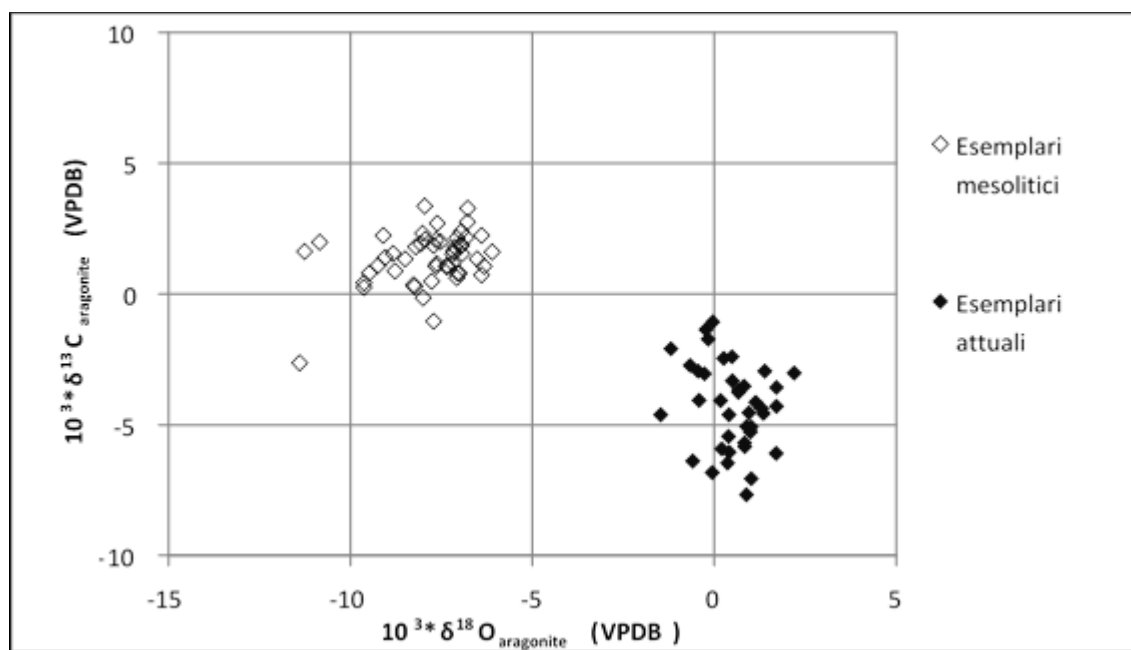
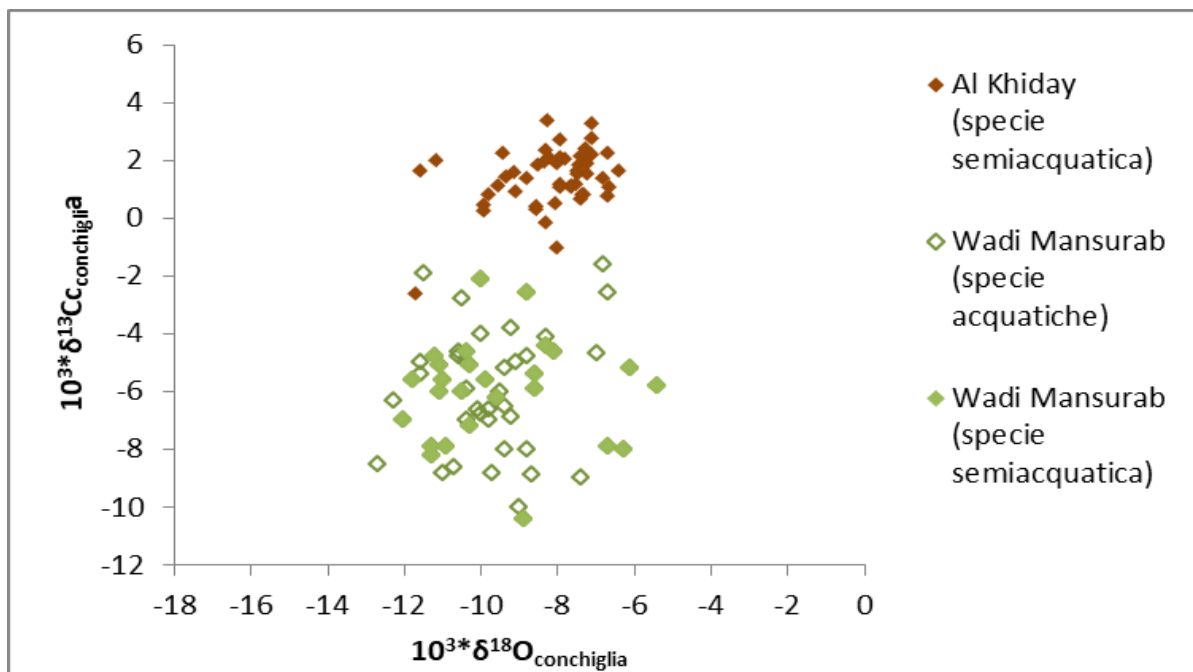


Fig.52  $\delta^{13}\text{C}$  aragonite versus  $\delta^{18}\text{O}$  aragonite dei campioni mesolitici e attuali di *Pila wernei*.

Le analisi isotopiche condotte da Ayliffe et al. (1996) su gasteropodi acquatici (*Cleopatra bulimoides*, *Lymnaea natalensis*, *Melanoides tuberculata*) e semi-acquatici (*Biomphalaria sudanica*) rinvenuti in livelli argillosi induriti presenti all'interno del suolo (*claypan*), distanti 10-12 Km a ovest del Nilo Bianco e a pochi Km a nord di Wadi Mansurab (15°23'N, 32°22'E) rivelano anch'esse valori  $\delta^{18}\text{O}$  molto bassi come mostrato nel grafico in Fig.53 (ai valori  $\delta^{18}\text{O}$  delle conchiglie di al-Khiday è stato sottratto un fattore di 0.6‰ piuttosto che 0.3‰ per poter confrontare i due gruppi di dati). È interessante notare come a Wadi Mansurab l'abbondanza di specie semiacquatiche, tra cui anche *Pila wernei* nonostante non sia stata sottoposta ad analisi isotopiche, ammonta a più dell'80% del totale. Le datazioni radiometriche effettuate sulle conchiglie di Wadi Mansurab ricadono nell'intervallo temporale 9.900-7600 BP e più precisamente 9000-8400 BP

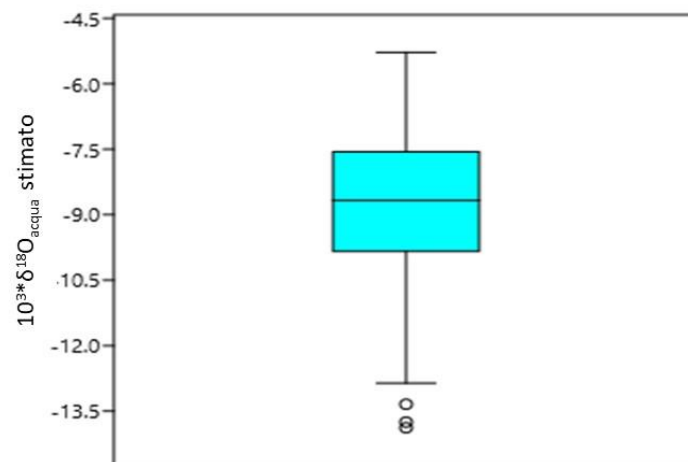
(Williams & Jacobsen, 2011; Williams et al., 2015), mentre quelle effettuate su *Pila wernei* in questo studio ricadono nell'intervallo temporale 8700-7500 BP. Il test Mann Whitney applicato ai dati di Ayliffe et al. (1996) non rivela differenze significative tra i dati relativi alla specie semiacquatica e alle specie acquatiche sia per quanto riguarda l'ossigeno ( $p = 0.99$ ; Monte Carlo permutation  $p = 0.99$ ) sia per il carbonio ( $p = 0.91$ ; Monte Carlo  $p = 0.91$ ) e questo potrebbe indicare una condivisione di habitat. Nonostante non si possa fare un confronto diretto tra i dati relativi a *Pila wernei* di al-Khiday e i dati presi in prestito da Ayliffe et al. (1996), perché non conosciamo l'intervallo temporale a cui determinati valori isotopici appartengono, possiamo comunque notare come l'intervallo dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  dei due record sia simile e possa essere interpretato in entrambi i casi in termini di precipitazioni più abbondanti e tasso di evaporazione annuale più basso di quello presente oggi (Ayliffe et al., 1996).



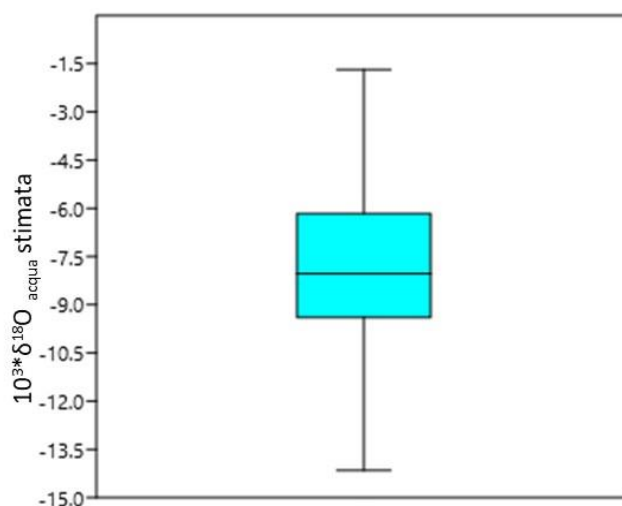
**Fig.53**  $\delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}}$  versus  $\delta^{18}\text{O}_{\text{conchiglia}}$  dei campioni provenienti da al- Khiday (questo studio) e Wadi Mansurab (da Ayliffe et al. 1996)

Per avere una stima della composizione isotopica delle acque delle paleo-swamps e quindi del Nilo Bianco, inseriamo i valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonato}}$  nell'equazione di paleotemperatura di Dettman et al. (1999) assumendo un intervallo di temperatura compreso tra 15 e 30 °C che rappresenta l'escursione termica annuale del Nilo Bianco oggigiorno (Sinada & Abdel-Rahman, 2013) e che comprende l'intervallo di temperatura ottimale per la crescita di *Pila wernei* e ovvero 18-28 °C. I valori  $\delta^{18}\text{O}$

dell'acqua stimati sono molto bassi (Fig.54) e congruenti con i valori  $\delta^{18}\text{O}$  delle acque antiche campionate negli acquiferi profondi del Sudan Nord Occidentale, valori compresi tra -10‰ e -11‰ (Thorweihe et al., 1990; Iacumin et al., 2016;) e riferiti ad abbondanti precipitazioni avvenute durante l'Olocene Antico. Le indagini geochimiche condotte da Darling et al. (1987) relative al sistema acquifero nubiano nella zona del bacino del Wadi Hawad, tra il fiume Atbara e il Nilo, rivelano che la ricarica dei pozzi indagati sia avvenuta durante antichi episodi pluviali, forse tra 8000-6000 BC, quando le piogge erano derivate principalmente dall'Oceano Atlantico piuttosto che dall'Oceano Indiano come avviene ora. Il valore  $\delta^{18}\text{O}$  di tali acque è dell'ordine di -10‰ e implicherebbe, infatti, un frazionamento isotopico delle masse di vapor d'acqua durante l'attraversamento del continente prima di raggiungere il Sudan (*effetto continentale*). È stato stimato che durante l'Olocene, il limite della ITCZ (Zona di Convergenza InterTropicale) fosse più spostato a nord di circa 500-800 Km rispetto al fronte attuale e ciò avrebbe permesso ad aree oggi completamente aride di sperimentare condizioni più umide. Livelli di piena più alti durante la prima fase dell'Olocene, causati da abbondanti piogge, avrebbero quindi alimentato le paleo-swamps di al-Khiday e le numerose aree umide individuate lungo il Nilo Bianco (Williams & Adamson, 1980; Williams et al., 2015).

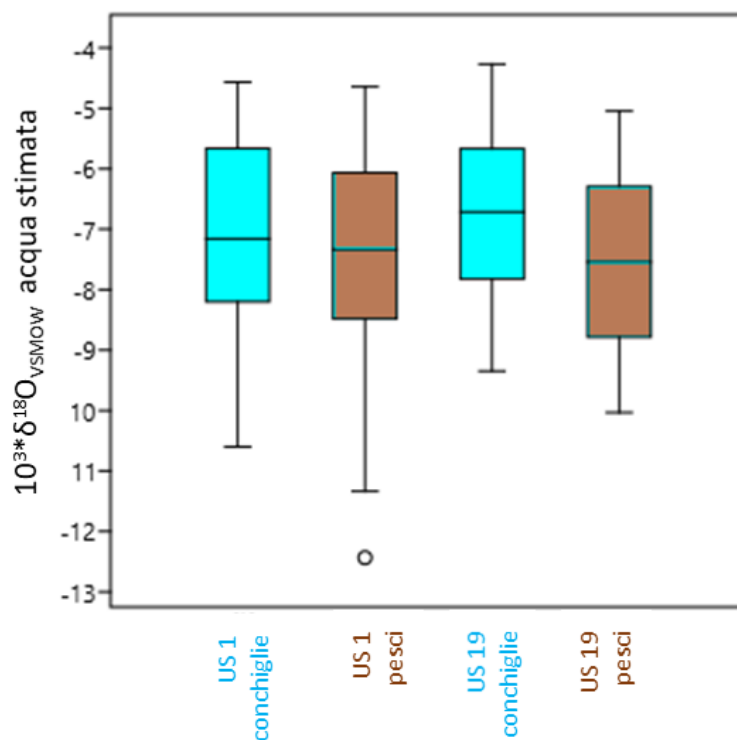


**Fig.54** Valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  stimati a partire dai valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$



**Fig.56** Valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  stimati a partire dai dati di  $\delta^{18}\text{O}_{\text{bioapatite}}$

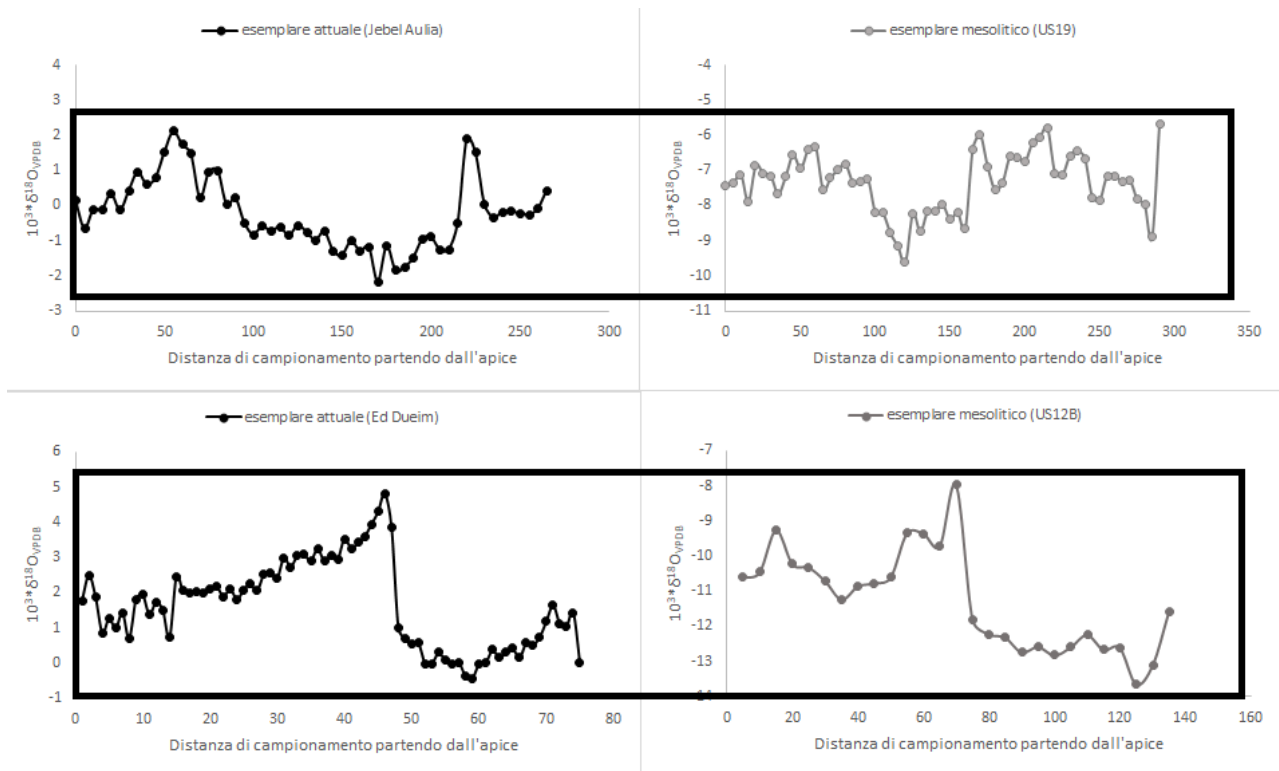
Utilizzando l'equazione di Pucéat et al (2010), e considerando sempre un intervallo di temperatura di 15-30°C, abbiamo stimato il valore  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  a partire dai valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{fosfato}}$  misurati sui resti di fauna ittica. Il valore mediano  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  è pari a -8‰ perfettamente congruente con quello ottenuto dall'analisi isotopica dell'ossigeno delle conchiglie. I due records differiscono per il valore massimo stimato che per le conchiglie è di circa -4.5‰ e per i pesci è di -1.5‰. (Fig.56). Per una più corretta comparazione tra i due records, escludiamo dal confronto le specie ittiche il cui habitat è rappresentato dalle acque profonde di fiumi e laghi come ad esempio *Lates niloticus* e *Synodontis sp.* Tale habitat, infatti, non è frequentato dalle pilidae. Come è possibile notare dal grafico in Fig.57 i valori mediani  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$ , stimati a partire dai valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  e  $\delta^{18}\text{O}_{\text{bioapatite}}$  e considerando un intervallo di temperatura di 15 °C, sono rispettivamente -7.1 ‰ e -7.4‰ per quanto riguarda l'US1 e -7.5‰ e -6.7‰ per quanto riguarda l'US9/US19. Il test Mann-Whitney non rivela alcuna differenza significativa tra i valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  stimati utilizzando i due records ( $p = 0.78$ , Monte Carlo permutation  $p = 0.78$  per gli esemplari dell'US 1;  $p = 0.13$ , Monte Carlo permutation  $p = 0.13$  per gli esemplari dell'US9/US19). Inoltre, il risultato del test Kruskal Wallis indica che non vi è differenza nei valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  stimati caratterizzanti le due US ( $p = 0.36$ ).



**Fig.57** Valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$  stimati per i campioni di *Pila wernei* e pesci raccolti nell'US 1 e US 19/9

### *Stagionalità delle piene del Nilo Bianco durante l'intervallo temporale 8700-7500 BP*

La variabilità intra-individuo dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  delle conchiglie è interpretabile in termini di maggiore e minore disponibilità idrica. L'interruzione della crescita delle conchiglie indica, infatti, l'inizio della fase di estivazione innescata in condizioni di stress idrico. Un deposito sabbioso e argilloso ricco di sostanza organica, depositatosi in ambiente paludoso, è stato rinvenuto ad al-Khiday. L'attività della paleo-swamp è stata collocata temporalmente, mediante datazione al radiocarbonio, intorno a 8597– 8420 BP (Zerboni, 2011). La presenza di questo tipo di sedimento richiede una maggiore disponibilità di acqua di quella presente oggi e un regime idrologico di tipo stagionale come dimostra la presenza di vertisuoli. Durante le stagioni umide piccoli bacini venivano inondati dal Nilo mentre nelle stagioni secche una riduzione nella disponibilità di acqua causava un abbassamento del livello dei bacini ed essiccazione delle paludi (Williams et al., 2015; Zerboni, 2011). Gli andamenti dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  registrati all'interno di uno stesso individuo indicano variazioni stagionali del livello idrico delle paleo-swamps e indirettamente descrivono il carattere monsonico delle precipitazioni.



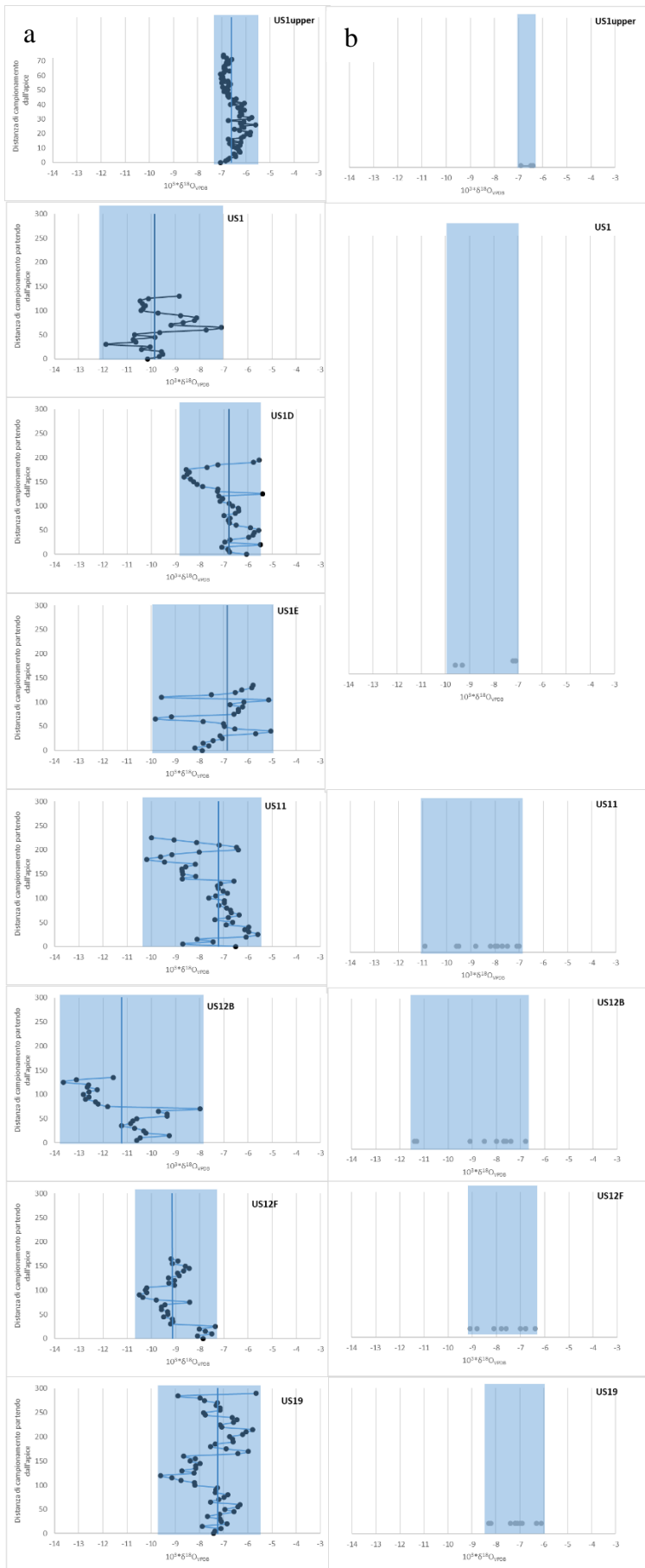
**Fig.58** Valori  $\delta^{18}O_{VPDB}$  in funzione del campionamento per esemplari attuali e mesolitici. Il riquadro evidenzia l'intervallo di valori registrato all'interno di singoli individui.

Rodrigues et al. (2000) in uno studio isotopico condotto su un solo esemplare di *Etheria elliptica* rinvenuto nella zona di Wadi Howar, ipotizzano l'esistenza di stagioni umide più lunghe di quelle attuali durante il primo Olocene. Nello specifico, ipotizzano l'esistenza di due stagioni umide di differente durata: una stagione umida più lunga che copre 3 o 4 mesi, seguita da una stagione più corta di 1-2 mesi. Nel nostro caso, non conoscendo esattamente il tasso di crescita della conchiglia e considerando soprattutto il fatto che esso è dipendente da una serie di variabili ambientali quali disponibilità di risorse, temperatura ecc., e ancora, considerando le piccole dimensioni della maggior parte dei campioni analizzati, non siamo in grado di speculare circa la durata delle stagioni secche e umide.

L'intervallo dei valori misurato per gli esemplari mesolitici oscilla tra 3 e 6 ‰ e non è dissimile da quello registrato dagli esemplari attuali che oscilla tra 4 e 6 ‰. In termini del tutto qualitativi, è possibile notare dai grafici riportati in Fig.58, che mettono a confronto esoscheletri attuali e antichi di dimensioni paragonabili, come l'andamento dei valori dell'ossigeno dell'esemplare attuale prelevato a Jebel Aulia (intervallo di 4.3‰) possa essere assimilabile a quello raccolto nell'US 19

dello shell midden (intervallo di 3,9‰) e quello relativo all'esemplare prelevato presso il canale di Ed Dueim (intervallo di 5.3‰) a quello dell'US 12B (intervallo di 5.7‰). La differenza negli andamenti isotopici dei due gasteropodi attuali era stata imputata al diverso tipo di habitat e ovvero un canale di irrigazione e una zona rivierasca.

Dai trend isotopici puntuali è possibile ricavare un'interessante informazione ai fini della caratterizzazione delle comunità mesolitiche di al-Khiday: con molta probabilità la raccolta dei molluschi veniva effettuata alla fine della stagione delle piogge o inizio della stagione secca. I valori  $\delta^{18}\text{O}$  misurati nella porzione finale delle conchiglie, infatti, tranne il campione dell'US11, tendono a diventare più alti (inizio stagione secca) e sono preceduti da una serie di valori  $\delta^{18}\text{O}$  più bassi che potrebbero rappresentare i valori isotopici delle acque del Nilo Bianco/ piogge non soggette a pesanti processi evaporativi (stagione umida). Questi valori isotopici così bassi sono sempre, tra l'altro, preceduti a loro volta dalla presenza di un'interruzione della deposizione della conchiglia che, secondo i nostri risultati, coincide con la chiusura di *Pila wernei* all'interno dell'opercolo in condizioni di stress idrico (stagione secca inoltrata). Questa evidenza porta a prendere in considerazione la possibilità di un regime alimentare da parte degli uomini Mesolitici dipendente dalle risorse disponibili e quindi dalle stagioni come, d'altronde, avviene ancora oggi per la popolazione nilotica dei Nuer.



**Fig.59** (a) Valori  $\delta^{18}\text{O}$  misurati all'interno dei singoli esemplari prelevati nelle diverse US. L'area colorata in azzurro rappresenta l'intervallo di valori misurati; la retta in blu rappresenta la mediana. (b) Valori  $\delta^{18}\text{O}$  medi degli individui prelevati in una stessa US. L'area colorata in azzurro rappresenta l'intervallo dei valori misurati in una medesima US.

### *Studio diacronico dei valori $\delta^{18}\text{O}$ delle conchiglie di al-Khiday*

L'analisi degli isotopi dell'ossigeno dell'esoscheletro aragonitico di *Pila wernei* e dell'apatite dei pesci ha evidenziato l'esistenza di condizioni più umide lungo la valle del Nilo Bianco durante la prima fase dell'Olocene, ciò in accordo con numerosi archivi paleoclimatici. Questo studio aggiunge un'ulteriore informazione climatica ad elevata risoluzione, ovvero un periodo di maggiore umidità lungo la sequenza, ottenuta dall'integrazione dei risultati dell'analisi isotopica delle conchiglie con la caratterizzazione stratigrafica e geocronologica.

L'approccio isotopico ha permesso innanzitutto di quantificare l'intervallo dei valori dell'ossigeno intra-individuo e la variabilità dei valori ottenuti dall'analisi di campioni rivenuti in una stessa US. Come è possibile notare dai grafici riportati in Fig.59 la variabilità dei valori dell'ossigeno registrata all'interno di una stessa US, imputabile a oscillazioni nei valori  $\delta^{18}\text{O}$  dell'acqua del Nilo su base annuale o pluriennale (non è possibile comunque escludere la possibilità di contaminazioni tra US dato che gli shell midden sono tra i contesti archeologici più complessi da scavare), è compresa nella variabilità dei valori misurata all'interno di un singolo individuo (su base stagionale) appartenente a quella stessa US. Il valore  $\delta^{18}\text{O}$  mediano più basso misurato appartiene all'esemplare dell'US12B ed è pari a -11,3‰ mentre il valore  $\delta^{18}\text{O}$  mediano più alto appartiene all'esemplare dell'US1upper ed è pari a -6,6‰. L'intervallo dei valori isotopici intra-US è più ristretto per gli esemplari prelevati nell'US1upper (0,5‰) e più ampio per gli esemplari prelevati nell'US 12B (4,6‰). Come è possibile notare dal grafico riportato in Fig.60a è possibile individuare un andamento nei valori  $\delta^{18}\text{O}$  mediani in funzione dell'US. Procedendo infatti dall'US19 verso i livelli superiori, si assiste ad una graduale negativizzazione dei valori dell'ossigeno (US12F, US12B, US11) a cui fa seguito una positivizzazione dei valori (US1, US1upper). I campioni provenienti dall'US1upper sono quelli che presentano i valori  $\delta^{18}\text{O}$  più alti.

Se consideriamo i risultati delle datazioni ottenute con la tecnica del radiocarbonio riportate in Tab.15, è possibile individuare all'interno del deposito tre intervalli temporali: 6700-6400 BC corrispondente al periodo culturale Mesolitico medio A e che raggruppa i campioni dell'US 19 e 12F, 6500-6200 BC o più probabilmente 6400-6200 BC (la datazione radiometrica di 3 campioni su 4 ha fornito un intervallo temporale 6400-6200 BC, e un solo campione 6500-8200 BC) corrispondente al periodo culturale Mesolitico medio B a cui appartengono i campioni provenienti dalle US 1, US11 e US12B, e infine l'intervallo 5800-5500 BC corrispondente al Tardo Mesolitico a cui appartengono i campioni dell'US1upper. I *box plots* con *data plots* riportati in Fig.60b mostrano i valori isotopici medi dell'ossigeno dei campioni considerando i tre diversi intervalli temporali riportati in BP per poterli confrontare con gli altri record paleoclimatici.

I valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  dei campioni dei tre intervalli temporali 8700-8400 BP, 8400-8200 BP, 7800-7500 BP risultano diversi ( $p = 0.001$ ). Il test post hoc Dunn indica che i campioni appartenenti all'intervallo 8400-8200 BP sono diversi dagli altri due gruppi. All'interno dei diversi intervalli temporali considerati possiamo notare la variabilità dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  legata ad eventi, come già detto, più umidi/piovosi e più secchi. I valori isotopici dell'ossigeno discriminano, quindi, in maggior dettaglio rispetto alle datazioni. Nei 300 anni di incertezza dell'età radiometrica dei livelli 19 e 12F, la variabilità dell'ossigeno è di circa 3‰ con un valore mediano di -7.2 ‰. Passando dall'US 19 all'US 12F vi è una tendenza verso valori più negativi, che ritroviamo anche nei successivi livelli 12B-1. Quest'ultimo intervallo presenta una variabilità di 4.6‰, un valore mediano di -8‰ e valore negativo estremo di -11.4‰. Per confronto sono state analizzate, inoltre, quattro conchiglie provenienti dal contesto archeologico 16D4 di al-Khiday e appartenenti al periodo Mesolitico medio B. Anch'esse presentano valori  $\delta^{18}\text{O}$  medi molto bassi e pari a -9.3‰ (US 101), -8.6‰ e -9,7‰ (US155), -9.5‰ (US155).

Il livello più superficiale, con risoluzione di circa 200 anni, ci indica chiaramente che si è passati ormai ad una fase più secca (valore mediano di -6.5‰) corrispondente al Tardo Mesolitico.

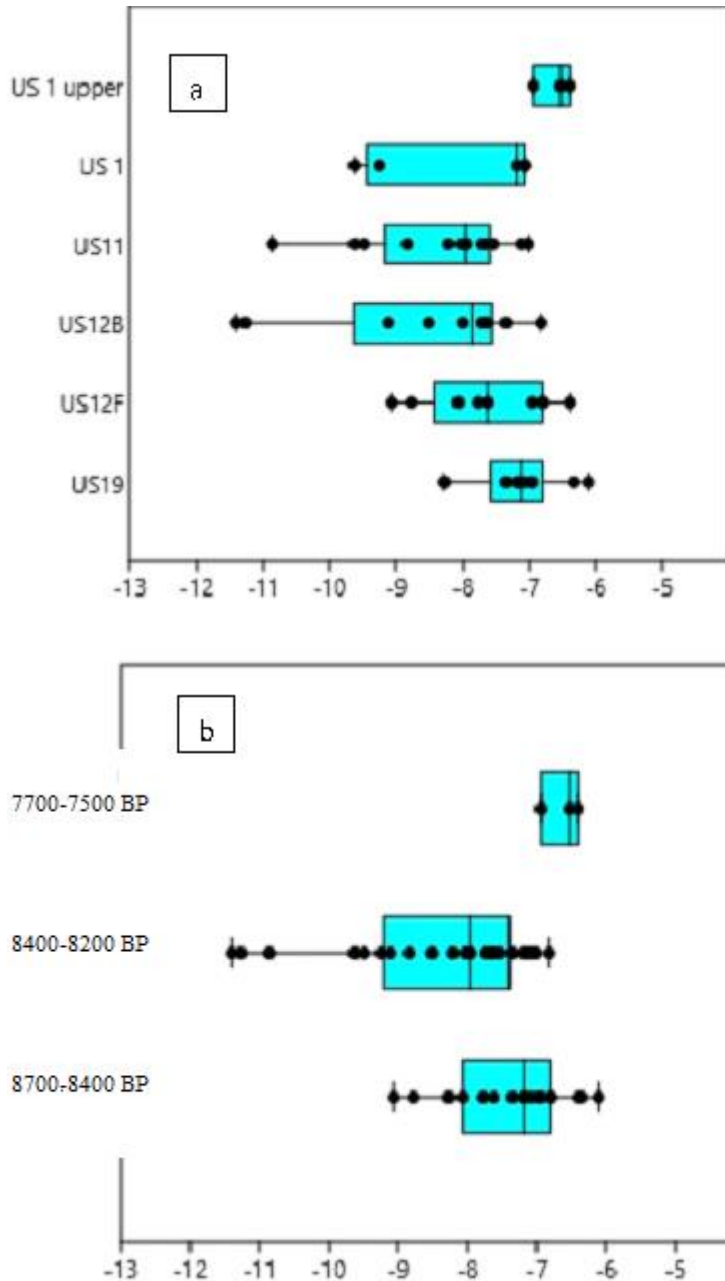
Passando dalla prima fase dell'Olocene (11.500-11.000 BP), caratterizzata da grandi livelli di piena sia del Nilo Bianco che del Nilo Azzurro, al Medio Olocene, si assiste ad un trend climatico regionale che procede verso maggiori condizioni di aridità. Episodi di grandi portate del fiume si sovrappongono a questo trend (Williams et al., 2000). Tra gli alti livelli di piena registrati lungo il Nilo Bianco quello avvenuto tra 8500 e 7000 BP (Williams & Adamson, 1980) potrebbe trovare una ulteriore conferma dai risultati qui presentati.

L'analisi isotopica della bioapatite dei pesci non ha permesso invece di riscontrare differenze nei valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{apatite}}$  nei diversi intervalli temporali, probabilmente a causa di una variabilità interna troppo grande causata dalla diversità specifica e dalle differenti taglie degli esemplari analizzati.

L'anomalia climatica, registrata intorno a 8200 BP da numerosi records paleoclimatici a scala globale, potrebbe o essersi verificata a cavallo dei due intervalli 8400-8200BP e 7700-7400 BP e quindi non essere stata registrata dagli esemplari di *Pila wernei* analizzati in questo studio, oppure potrebbe essere inserita proprio nell'intervallo appena citato ma non si è in grado di individuare l'anomalia a causa del basso potere risolutivo della datazione al radiocarbonio.

La prima datazione effettuata su una conchiglia raccolta durante la prima campagna di scavo suggerisce che lo shell midden sommitale si sia formato durante l'intervallo temporale 6200-6000 BC (Usai & Salvatori 2019) in piena crisi climatica. Sarebbe interessante analizzare dal punto di

vista isotopico esemplari appartenenti a tale intervallo per verificare l'esistenza o meno di un brusco cambiamento nei valori  $\delta^{18}\text{O}$  del carbonato che, come abbiamo visto, sono correlati alla composizione isotopica delle acque del Nilo. A tal proposito, degno di nota, è un esemplare



**Fig.60** Box plots e data plots dei valori  $\delta^{18}\text{O}$  delle conchiglie in funzione della stratigrafia (a) e della geocronologia isotopica (b)

prelevato nello shell midden sommitale (US1 conc.E) il quale ancora non è stato sottoposto a datazione ma che presenta il più basso valore  $\delta^{18}\text{O}$  medio ( $-3.95\text{‰}$ ) registrato in tutta la sequenza.

Da un punto di vista archeologico, la caratterizzazione degli ecofatti e artefatti rinvenuti nel deposito, individua per così dire tre macrostrutture: lo shell midden sommitale (US1), le sottostanti *features* contenenti grandi quantità di artefatti e resti organici (US12) e infine lo shell midden basale (US19).

È in corso un accurato studio delle ceramiche prelevate nei diversi livelli del deposito ma dai risultati preliminari è già emersa una chiara differenziazione culturale procedendo dall'US19 verso l'US1 (Salvatori et al., 2018).

La presenza di una così grande quantità di gusci di *Pila wernei* rinvenuta nell'US1, mai registrata prima ad al-Khiday e associata al rinvenimento di un nuovo tipo di ceramica (Laqyia), è di per sé un fatto di notevole importanza perché denota un cambiamento nelle strategie di sussistenza adottate dalle comunità mesolitiche (Usai & Salvatori, 2019). I molluschi, durante questa fase, non rappresentano più un pasto complementare come era stato delineato dall'analisi archeologica dei contesti 16D4 e 16D5, ma sono una componente importante della dieta umana. La ricerca di nuove risorse potrebbe essere il risultato di una risposta adattativa a condizioni ambientali meno favorevoli o comunque diverse da quelle che caratterizzavano i periodi precedenti.

#### *$\delta^{13}\text{C}$ del DIC e/o $\delta^{13}\text{C}$ della vegetazione palustre durante il periodo Mesolitico*

L'intervallo di valori  $\delta^{13}\text{C}$  registrato negli esemplari mesolitici di *Pila wernei* di al-Khiday è completamente differente da quello misurato per gli esemplari attuali. I valori  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti sono compresi tra un minimo di  $-2.63\text{‰}$  a un massimo di  $+3.37\text{‰}$  con un valore medio di  $1.38 \pm 1 \text{‰}$  (mediana = 1.54). Alti valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{conchiglia}}$  riflettono alti valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  e/o la preponderanza di piante  $\text{C}_4$  nella dieta dei gasteropodi e quindi nell'ambiente. Allo stesso modo, gli alti valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{apatite}}$  dei pesci, compresi nell'intervallo  $-6.60\text{‰}$  e  $-0.60\text{‰}$ , indicherebbero alti valori  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  e/o la preponderanza di piante  $\text{C}_4$  nella dieta.

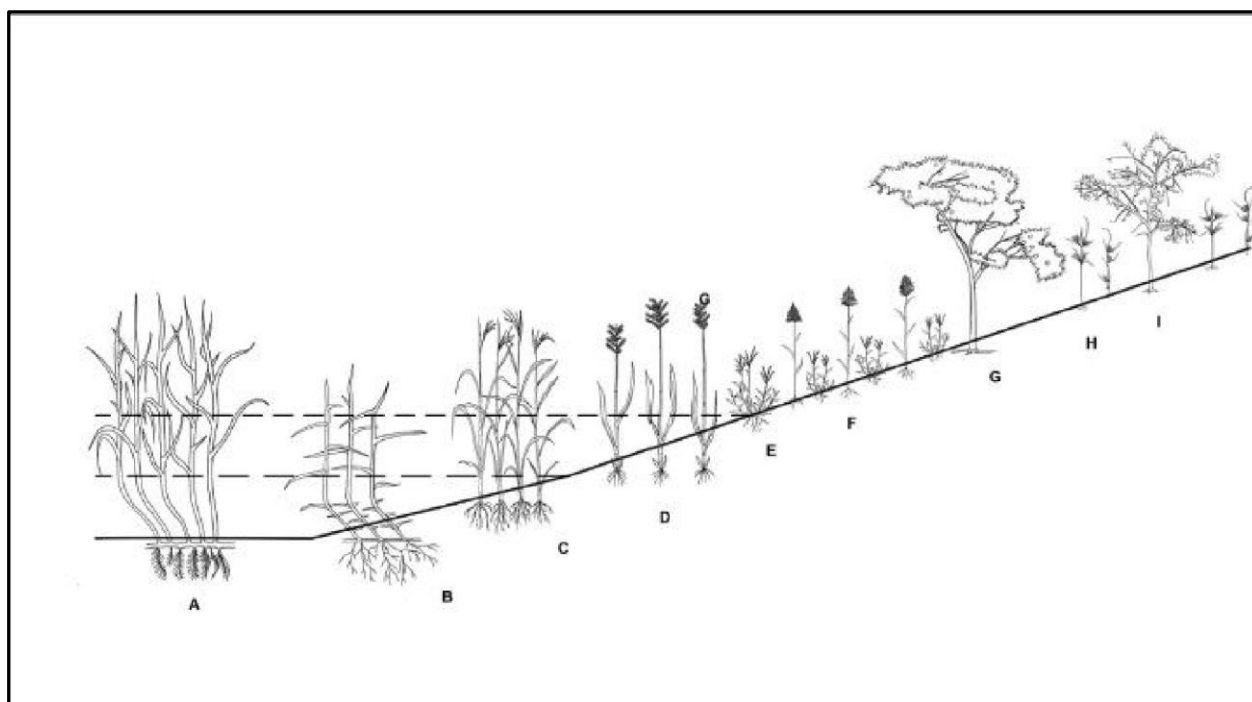
Se consideriamo l'unico esemplare attuale di *Pila wernei* che presenta un valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagene}}$  di  $11.8\text{‰}$  e che indicherebbe una dieta principalmente a base di piante  $\text{C}_4$ , notiamo come esso presenti un valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}$  all'apertura pari a  $-2.5\text{‰}$  e un valore medio di  $-3.2 \text{‰}$ . Se al valore di  $-3.2\text{‰}$  sottraiamo il fattore di correzione  $+1.5\text{‰}$  che tiene conto della negativizzazione del valore  $\delta^{13}\text{C}$  della  $\text{CO}_2$  atmosferica, otteniamo un valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{aragonite}}$  per questo campione di  $-1.7\text{‰}$  che si avvicina molto a quello ottenuto per i campioni mesolitici. La presenza massiccia di piante  $\text{C}_4$  nell'ambiente potrebbe influire indirettamente anche sul valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  aumentandone il valore, sia

per quanto riguarda i processi fotosintetici che avvengono all'interno dello specchio d'acqua e nelle zone ripariali, sia per quanto riguarda i processi di ossidazione della sostanza organica.

I risultati dell'analisi di campioni di vegetazione raccolti in diverse località del Sudan Centrale indicano la convivenza di piante C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> nella stessa nicchia ecologica. Generalmente, infatti, in habitat occupati da piante C<sub>4</sub> sono presenti anche piante C<sub>3</sub>. I suoli edafici però (margini di laghi e fiumi, aree alluvionali, delta, *swamps*), stagionalmente inondati, sono dominati da piante C<sub>4</sub> (Stewart, 2014) (Fig. 62). I suoli edafici di Ed Dueim, in cui abbiamo prelevato alcuni esemplari, sono colonizzati da *Eichhornia crassipes* (pianta C<sub>3</sub>) che è però una pianta alloctona e infestante che ha colonizzato ormai diversi ambienti acquatici del Sudan.

Iacumin et al. (2016) stimano un contributo del 60% da parte di piante C<sub>4</sub>, o di animali che mangiano piante C<sub>4</sub>, nella dieta delle comunità Mesolitiche di al-Khiday; per i bovini il contributo delle piante C<sub>4</sub> nella dieta è dell'ordine del 70% con un valore  $\delta^{13}\text{C}_{\text{dieta}}$  stimato di  $-12\text{‰} \pm 2\text{‰}$ . La presenza di piante a ciclo fotosintetico C<sub>4</sub> è stata inoltre confermata dall'analisi di calcoli dentali rimossi dai denti di alcuni individui sepolti ad al-Khiday che ha rivelato la presenza di fibre di *Cyperus rotundus* (Buckley et al., 2014). Questa cyperacea ancora oggi colonizza la zona rivierasca nei pressi del Nilo

Bianco ad al-Khiday e presenta un valore medio  $\delta^{13}\text{C}$  di  $-12.1\text{‰}$  che corrisponde a un valore di  $-10,6\text{‰}$  se riferito al periodo Mesolitico.



**Fig. 62** Zona alluvionale con tipica successione ecologica. A. *Vossia*, B. *Echinochloa*, C. *Cyperus*, D. *Miscanthidium*, E. *Cynodon*, F. *Panicum*, G. *Acacia*, H. *Themeda*, I. *Old Acacia* (da Stewart, 2014)

Tutti i *records* analizzati ad al-Khiday indicano un paesaggio mesolitico dominato da piante C<sub>4</sub> tipiche di aree umide inondate stagionalmente. La mancata differenza nei valori  $\delta^{13}\text{C}$  delle conchiglie prelevate nelle diverse US del sito 16D3 indica inoltre una certa stabilità vegetazionale durante il periodo 8700-7500 BP.

I bassi valori  $\delta^{13}\text{C}$  delle conchiglie “contemporanee” a quelle di al-Khiday, prelevate vicino Wadi Mansurab, in aree interne, indicano un contesto ambientale completamente diverso da quelle di al-Khiday confermato tra l’altro dalla presenza di *Melanoides tuberculata* che abita diversi sistemi di acqua dolce eccetto *swamps* con dominanza di piante di papiro, e corpi d’acqua che stagionalmente seccano (Van Damme, 1984).

Quest’ultima evidenza pone enfasi su quanto sia riduttivo interpretare il segnale del carbonio come semplice dicotomia piante C<sub>4</sub>-clima arido e piante C<sub>3</sub>-clima umido.

### 8.3 Conclusioni e sintesi

I siti preistorici sono tra i contesti archeologici più difficili da caratterizzare. La sfida diviene ancora più ardua se tali siti sorgono in aree sottoposte a disturbi post deposizionali dovuti a processi erosivi o ripetute occupazioni dello stesso luogo da parte di diverse comunità umane con conseguente rimescolamento dei materiali archeologici. L'oggetto preso in esame in questa tesi di dottorato, uno shell midden continentale eccezionalmente ben conservato, con lo scopo di acquisire nuovi dati paleoclimatici relativi alla prima fase dell'Olocene e nel contempo cercare di collegare possibili mutamenti ambientali all'evoluzione della "civiltà" delle comunità preistoriche, richiede quindi un approccio scientifico rigoroso in modo da ridurre, per quanto possibile, lo spazio alle interpretazioni.

I risultati ottenuti mediante l'analisi isotopica applicata a resti carbonatici di gasteropodi hanno dimostrato come la specie *Pila wernei* possa fornire preziose informazioni climatiche ed ambientali relativi al proprio microhabitat che però possono essere di aiuto nel caratterizzare i sistemi ecologici circostanti di cui l'uomo è ovviamente parte integrante.

L'allevamento in cattività di alcuni esemplari ha chiarito, seppur preliminarmente, la dinamica del frazionamento isotopico dell'ossigeno nel sistema carbonato-acqua. Il guscio aragonitico di *Pila wernei* precipita in condizioni prossime all'equilibrio con l'acqua circostante e quindi può essere utilizzato come record ambientale.

Il confronto tra i risultati ottenuti dall'analisi degli esemplari Mesolitici e attuali ha rivelato una differenza significativa nei valori isotopici dell'ossigeno e del carbonio con intervalli che vanno da -11‰ a -6‰ e da -2‰ a +2‰ rispettivamente e dimostra come un processo di aridità si sia sviluppato nel tempo lungo l'area nilotica. Nonostante *Pila wernei* fornisca informazioni circa le variazioni ambientali verificatesi durante una o più stagioni di piena e i pesci invece integrino le condizioni ambientali del fiume durante un sostanziale periodo di tempo, entrambi i records evidenziano condizioni più umide di quelle presenti oggi. La stima del valore  $\delta^{18}\text{O}$  dell'acqua del Nilo Bianco durante il periodo Mesolitico, a partire dai valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  e  $\delta^{18}\text{O}_{\text{apatite}}$ , indica un bilancio idrologico Precipitazioni/Evaporazione positivo.

Il campionamento incrementale lungo la spirale di crescita ha permesso di valutare la variabilità intra-individuo, informazione necessaria quando si effettuano dei confronti per far emergere diversità o uguaglianze. I patterns isotopici dell'ossigeno così ottenuti rivelano variazioni stagionali del valore  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  dell'acqua in linea con un regime monsonico delle precipitazioni. Inoltre, il campionamento puntuale ha permesso di individuare la stagione di raccolta di *Pila wernei* da parte delle popolazioni Mesolitiche. Dopo il periodo delle piogge, quando le acque iniziano a

ritirarsi e i livelli idrici delle paleo-swamps ad abbassarsi, questi gasteropodi probabilmente erano maggiormente esposti alla predazione umana.

La presenza di una così grande quantità di gusci di *Pila wernei* rinvenuta nello shell midden sommitale del sito 16D3 e mai registrata prima ad al-Khiday è la prova di una mutazione nelle strategie di sussistenza adottate dalle comunità mesolitiche. La ricerca di nuove risorse, in contesti marginali, potrebbe essere il risultato di una risposta adattativa a condizioni ambientali meno favorevoli.

L'integrazione dei metodi geochimici, stratigrafici e geocronologici, con le relative risoluzioni, ha ragionevolmente individuato un periodo caratterizzato da valori  $\delta^{18}\text{O}_{\text{aragonite}}$  più bassi. Nell'arco temporale 8400-8200 BP vi sono stati degli anni in cui i valori isotopici dell'acqua del Nilo presentavano valori decisamente più bassi e quindi collegati a condizioni climatiche decisamente più piovose.

La composizione isotopica del carbonio delle conchiglie e dei pesci indicherebbe una copertura vegetazionale di tipo C<sub>4</sub> tipica delle aree umide tropicali, ipotesi avvalorata anche dai risultati isotopici relativi ai resti umani e di faune di al-Khiday. Inoltre, la mancanza di variazione lungo la sequenza del deposito indicherebbe una certa stabilità vegetazionale durante l'intervallo temporale 8700-7500 BP.

## BIBLIOGRAFIA

- ABELL, P. I. 1985. Oxygen isotope ratios in modern African gastropod shells: a data base for palaeoclimatology. *Isotope Geoscience* 58, 183–93.
- ABELL P.I., HOELZMANN P., 2000. Holocene paleoclimate in northwestern Sudan: stable isotope studies on molluscs. *Global and Planetary Change*, 26, 1-12
- ALLEY, R.B., MAYEWSKI, P.A., SOWERS, T., STUIVER, M., TAYLOR, K.C., CLARK, P.U., 1997. Holocene climatic instability: a prominent widespread event 8200 years ago. *Geology* 25, 483 – 486.
- ALLEY R.B., AGUSTSDOTTIR A.M., 2005. The 8k event cause and consequences of a major Holocene abrupt climate change. *Quaternary Science Reviews*, 24, 1123-1149
- AMBROSE S.H., DeNiro M.J., 1986. The isotope ecology of East African mammals. *Oecologia* 69, 395-409
- AMBROSE S.H., 1990. Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. *Journal of Archaeological Science*, 17(4), 431-451.
- AMBROSE S.H., 1991. Effect of diet, climate and physiology on nitrogen isotope abundances in terrestrial foodwebs. *Journal of Archaeological Science* 18, 293-317
- AMBROSE S.H., NORR L., 1993. Experimental evidence for the relationship of the carbon isotope ratios of whole diet and dietary protein to those of bone collagen and carbonate. In: *Prehistoric human bone*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-37.
- AYLIFFE D., WILLIAMS M.A.J., SHELDON F., 1996. Stable carbon and oxygen isotopic composition of early-Holocene gastropods from Wadi Mansurab, north-central Sudan. *The Holocene* 6, 157-169
- BEUNING, K.R.M., TALBOT, M.R., KELTS, K., 1997. A revised 30,000-year paleoclimatic and paleohydrologic history of Lake Albert, East Africa. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 136, 259-279.
- BOCHERENS H., FIZET M., MARIOTTI A., LANGE-BADRE B., VANDERMEERSCH B., BOREL J. P., BELLON, G., 1991. Isotopic biogeochemistry ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) of fossil vertebrate collagen: application to the study of a past food web including Neandertal man. *Journal of Human Evolution*, 20,481-492
- BOHM F., JOACHIMSKI M. M., DULLO W. C., EISENHAUER A., LEHNERT H., REITNER J. AND WORHEIDE G.,2000. Oxygen isotope fractionation in marine aragonite of coralline sponges. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 1695–1703.

BRAUNECK J., MEES F., BAUMHAUER R., 2012 A record of early to middle Holocene environmental change inferred from lake deposits beneath a sabkha sequence in the Central Sahara (Seggedim, NE Niger) *J Paleolimnology*, 49 (4)

BRYANT D. J., FROELICH P. N., 1995. A model of oxygen isotope fractionation in body water of large mammals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59. 4523-4537.

BRYANT JD, KOCH PL, FROELICH PN, SHOWERS WJ, GENNA BJ, 1996. Oxygen isotope partitioning between phosphate and carbonate in mammalia apatite. *Geochimica Cosmochimica Acta* 60,5 145-5148

BROECKER W.S., PETEET DM, RIND D. 1985. Does the ocean atmosphere system have more than one stable mode of operation? *Nature* 315, 21-26

CAZALBOU S., CHRISTELE C., EICHERT D., REY C., GLIMCHER M.J., 2004. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 22, 310-317

CERLING T. E., WANG Y., QUADE J., 1993. Expansion of C4 ecosystems as an indicator of global ecological change in the late Miocene. *Nature*, 361(6410), 344-345.

CERLING T.E., HARRIS J.M., 1999. Carbon isotope fractionation between diet and bioapatite in ungulate mammals and implications for ecological and paleoecological studies. *Oecologia* 120, 347-363

COCKERTON H.E., STREET-PERROTT F.A., LENG M.J., BARKER P.A., HORSTWOOD M.S.A., PASHLEY V., 2013. Stable-isotope (H, O, and Si) evidence for seasonal variations in hydrology and Si cycling from modern waters in the Nile Basin: implications for interpreting the Quaternary record. *Quaternary Science Reviews* 66, 4–21.

D'ANGELA D., LONGINELLI A., 1990. Oxygen isotopes in living mammals bone phosphate: further results. *Chemical Geology* 86, 75-82

DANSGAARD W., 1964. Stable isotopes in precipitation. *Tellus* 16, 436-468

DARLING, W.G., EDMUNDS, W.M., KINNIBURGH, D.G., KOTOUB, S. ET AL., 1987. Sources of recharge to the basal Nubian Sandstone aquifer, Butana region, Sudan. In: *Isotope Techniques in Water Resources Development*. IAEA, Vienna, Proceedings Series STI/PUB/757, pp. 205-224.

DeMENOCA, P., ORTIZ, J., GUILDERSON, T., ADKINS, J., SARNTHEIN, M., BAKER, L., YARUSINSKY, M., 2000. Abrupt onset and termination of the African humid period: rapid climate responses to gradual insolation forcing. *Quaternary Science Reviews* 19, 347 – 361.

DeMENOCA P., ORTIZ J., GUILDERSON T., ADKINS J., SARNTHEIN M., BAKER L., YARUSINSKY M., 2000. Abrupt onset and termination of the African humid period: rapid climate response to gradual insolation forcing, *Quaternary Science Reviews* 19, 347-3261

DE NIRO M.J., EPSTEIN S., 1978. Influence of diet on the distribution of the carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495-506

DE NIRO M.J., EPSTEIN S., 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 341-351

DE NIRO M.J., HASTORF C.A., 1985. Alteration of  $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$  ratios of plant matter during the initial stages of diagenesis: studies utilizing archaeological specimens from Peru. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49, 97-115

DENTON, G.H., KARLEN, W., 1973. Holocene climatic variations: their pattern and possible cause. *Quaternary Research* 3, 155 – 205

DETTMAN D., REISCHE A., LOHMANN C., 1999 Controls on the stable isotope composition of seasonal growth bands in aragonitic fresh-water bivalves (unionidae) *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63, 1049-1057

DI MATTEO A., 2011 La geochimica isotopica applicata a reperti scheletrici fossili di mammiferi terrestri: considerazioni paleoclimatiche e paleoambientali. Tesi di dottorato

EDMUNDS W.M. & WRIGHT E.P., 1979. Groundwater recharge and paleoclimate in the Sirte and Kufra basins, Libya. *Journal of Hydrology* 40: 215

FARQUHAR G.D., EHLERINGER J.R., HUBICK K.T., 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 503-37

FRATZL P., GUPTA H.S., PASCHALIS E.P., ROSCHGER P., 2012. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *Journal of Materials Chemistry* 14, 21152123

FRITZ P., POPLAWSKI S., 1974.  $^{18}\text{O}$  and  $^{13}\text{C}$  in the shells of freshwater molluscs and their environments. *Earth and Planetary Science Letters*, 24, 91-98

GASSE, F., 1977. Evolution of Lake AbheH (Ethiopia and T.F.A.I.) from 70,000 B.P. *Nature* 2, 42-45.

GASSE F. & VAN CAMPO E., 1994. Abrupt post-glacial climate events in West Asia and North Africa monsoon domains, *Earth and Planetary Science Letters* 126, 435-456

GASSE F., 2000. Hydrological changes in the African tropics since the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews* 19, 189-211

GAZEAU F., PARKER L., COMEAU S., GATTUSO J.P., O'CONNOR W., 2013 Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*, 160, 2207-2245

GILLIKIN DP, LORRAIN A, MENG L, DEHAIRS F. 200. A large metabolic carbon contribution to the  $\delta^{13}\text{C}$  record in marine aragonitic bivalve shells. *Geochim Cosmochim Acta* 71, 2936–2946

GONFIANTINI R., 1986 - Environmental isotopes in lake studies. In P. Fritz & J.C. Fontes (eds.), *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry, The Terrestrial Environment*. Elsevier, Amsterdam, 113-168.

GOODFRIEND, G. A. AND ELLIS, G. L. 2002. Stable carbon and oxygen isotopic variations in modern *Rabdotus* land snail shells in the southern Great Plains, USA, and their relation to environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 1987–2002

GROSSMAN E. L. AND KU T. L. 1986. Oxygen and carbon isotope fractionation in biogenic aragonite: temperature effects. *Chem. Geol. (Isotope Geosciences Section)* 59, 59–74.

HINKEL F. 1977. The archaeological map of Sudan. A guide to its use and explanations of its principles. Berlin: Verlag.

HORITA.J., WESOLOWSKI D.J, 1994. Liquid-vapor fractionation of oxygen and hydrogen isotopes of water from the freezing to the critical temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 3425-3437

IACUMIN P., BOCHERENS H., MARIOTTI A., LONGINELLI A., 1996. Oxygen isotope analyses of coexisting carbonate and phosphate in biogenic apatite: A way to monitor diagenetic alteration of bone phosphate?. *Earth and Planetary Sciences Letters* 142, (1-2): 1-6

IACUMIN P, VENTURELLI G., 2015. The  $\delta^{18}\text{O}$  of phosphate of ancient human biogenic apatite can really be used for quantitative palaeoclimate reconstructions? *European Scientific Journal* 11, 221-235

IACUMIN P., DI MATTEO A., USAID., SALVATORI S., VENTURELLI G., 2016. Stable isotope study on Ancient Populations of Central Sudan: Insights on their diet and environment. *American Journal of Physical Anthropology* 160, 498–518

JAHAN S., AKTER S., SARKER M., RAHMAN R., PRAMANIK N., 2001. Growth Ecology of *Pila globosa* (Swainson) (Gastropoda: Pilidae) in simulated habitat. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4, 581-584

KIM S.-T. AND O'NEIL J. R. 1997. Equilibrium and nonequilibrium oxygen isotope effects in synthetic carbonates. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 3461–3475.

KIM S-T., O'NEIL J.R. HILLAIRE-MARCEL C., MUCCIO C., 2007 Oxygen isotope fractionation between synthetic aragonite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 4704–4715 and water: Influence of temperature and  $\text{Mg}^{2+}$  concentration

KIM S-T, MUCCI A, TAYLOR B.E., 2007. Phosphoric acid fractionation factors for calcite and aragonite between 25 and 75°C revisited. *Chem Geol* 246, 135-146.

KIM S-T, COPLEN TB, HORITA J., 2015. Normalization of stable isotope data for carbonate minerals: implementation of IUPAC guidelines. *Geochim Cosmochim Acta* 158, 276-289

KOLODNY, Y., LUZ, B., AND NAVON, O. 1983. Oxygen isotope variations in phosphate of biogenic apatites, I. Fish bone apatite-rechecking the rules of the game. *Earth and Planetary Science Letters* 64, 393--404.

KROEPELIN S., 1993. Late Quaternary environments at the Lower Wadi Howar (Southeastern Sahara /NW Sudan) *Berliner Geographische Abhandlungen* 54,1-193

LANGMAN J.B., 2015. Spatial distribution of  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values in the hydrologic cycle of the Nile Basin *Journal of Arid Land*, 7, 133-145

LEE-THORP JA, SEALY JC, VAN DER MERWE NJ. 1989. Stable carbon isotope ratio differences between bone collagen and bone apatite and their relationship to diet. *J Archaeol Sci* 16, 585–599.

LENG, M. J. AND MARSHALL, J. D. 2004. Palaeoclimate interpretation of stable isotope data from lake sediment archives. *Quaternary Science Reviews* 23, 811–31.

LENG M.J., LEWIS J.P., 2015. Oxygen isotopes in molluscan shell applications in environmental archaeology. *Environmental Archaeology*, 1-12

LONGINELLI A, NUTI S., 1973. Oxygen isotope measurements of phosphate from fish, teeth and bones. *Earth and Planetary Science Letters* 19:373-376

LONGINELLI, A. 1974. Preliminary oxygen-isotope measurements of phosphate from mammal teeth and bones. *Colloque International du CNRS* 219, 267-271.

LONGINELLI A., PERETTI PALADINO A., 1980. Oxygen isotope composition of water from mammal blood: first results. *Mass Spectrometry in Biochemical Medical and Environmental Research* 1, 135-139

LONGINELLI A, 1984. Oxygen isotopes in mammal bone phosphate: a new tool for paleohydrological and paleoclimatological research? *Geochim Cosmochim Acta* 48, 385-390.

LUZ B., KOLODNY Y., HOROWITZ M., 1984. Fractionation of oxygen isotopes between mammalian bone-phosphate and environmental drinking water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 1689-1693

MANN S., 2001. *Biom mineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry* (Vol. 5). Oxford University Press.

MARINO B D., MCELROY M.B., 1991. Isotopic composition of atmospheric CO<sub>2</sub> inferred from carbon in C<sub>4</sub> plant cellulose. *Nature*, 349.6305: 127-131.

MARITAN L., IACUMIN P., ZERBONI A., VENTURELLI G., DAL SASSO G., LINSEELE V., TALAMO S., SALVATORI S., USAI D., 2018. Fish and salt: The successful recipe of White Nile Mesolithic hunter-gatherer fishers. *Journal of Archaeological Science* 92, 48-62

MAYEWSKI, P.A., ROHILING E.E., STAGER J.C., KARLEN W.K., MAASCH K.A., MEEKER L.D., MEYERSON E.A., GASSE F., VAN KREVELD S., HOLMGREN K., LEE-THORP J., ROSQVIST G., RACK F., STAUBWASSER M., SCHNEIDER R.R., STEIG E. J., 2004 Holocene climate variability, *Quaternary Research* 62, 243-255

McCONNAUGHEY T. A. 2003 Sub-equilibrium oxygen-18 and carbon-13 levels in biological carbonates: carbonate and kinetic models. *Coral Reefs* 22, 316–327.

McCONNAUGHEY T. A. & GILLIKIN D.P., 2008. Carbon isotopes in mollusk shell carbonates. *Geo-Marine Letters* 28, 287-299

McCREA JM ,1950 On the isotopic chemistry of carbonates and a paleotemperature scale. *J Chem Phys* 18, 849-853.

METREF, S., ROUSSEAU, D.-D., BENTALEB, I., LABONNE, M. AND VIANEY-LIAUDA, M. 2003. Study of the diet effect on  $\delta^{13}\text{C}$  of shell carbonate of the land snail *Helix aspersa* in experimental conditions. *Earth and Planetary Science Letters* 211, 381–393.

MEENAKSHY V.R., 1964. Aestivation in the Indian apple snail *Pila*. I. Adaptation in natural and experimental conditions. *Comp. Biochem. Physiology* 11, 379-386

NARASARAJU, T. S. B.; PHEBE, D. E., 1996. Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. *Journal of Materials Science* 31.1, 1-21

NICOLL K. 2004. Recent environmental change and prehistoric human activity in Egypt and Northern Sudan. *Quat Sci Rev* 23, 561–580.

O'LEARY M.H., 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 20.4: 553-567.

O'NEIL, J.R., CLAYTON, R.N. AND MAYEDA, T.K., 1969. Oxygen isotope fractionation in divalent metal carbonates. *J. Chem. Phys.*, 61, 5547

PACHURE H-J., 1980 Climatic history in the late Quaternary in southern Libya and western Libyan Desert, in M.J. Salem and M.T. Busrewil. *The Geology of Libya Vol III*, 781-788

PATTERSON W. P., SMITH G. R. AND LOHMANN K. C., 1993. Continental paleothermometry and seasonality using the isotopic composition of aragonitic otoliths of freshwater fishes. In *Climate Change in Continental Isotopic Records*, (eds. P. K. Swart, K. C. Lohmann, J. McKenzie and S. Savin). *Geophys. Monogr. Ser.*, 78, 191–202.

PETIT-MAIRE N., 1982. *Le Shati, lac Pleistocene du Fezzan (Libye)*, Marseille, CNRS.

PRENDERGAST, A. L. AND STEVENS, R. E. 2013. Molluscs (Isotopes): analyses in environmental archaeology, in Smith, C. (ed.), *Encyclopaedia of Global Archaeology*. New York: Springer.

PUCEAT E, JOACHIMSKI MM, BOUILLOUX A, MONNA F, BONIN A, MONTREUIL S, MORINIE`RE P, HENARD S, MOURIN J, DERA G, QUESNE D. 2010. Revised phosphate-water fractionation equation reassessing paleotemperatures derived from biogenic apatite. *Earth Planet Sci Lett* 298,135–142.

RAHIMPOUR-BONAB H., BONE Y. AND MOUSSAVI-HARAMI R. 1997. Stable isotope aspects of modern molluscs, brachiopods, and marine cements from cool-water carbonates, Lacedpede Shelf, South Australia. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 207–218

REY H., 2006. Chemical Diversity of Apatites. *Advances in Science and Technology* 49, 27-36

RODRIGUES D., ABELL P.I., KROPELIN S. Seasonality in the early Holocene climate of Northwest Sudan: interpretation of *Etheria elliptica* shell isotopic data. *Global Planet Change*. 2000;26:181–187.

ROMANEK C. S., GROSSMAN E. L. AND MORSE J. W. 1992. Carbon isotope fractionation in synthetic aragonite and calcite: Effects of temperature and precipitation rate. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56, 419–430.

ROZANSKI K.; ARAGU´AS-ARAGU´AS L.; GONFIANTINI R., 1993. Isotopic patterns in modern global precipitation. *Climate change in continental isotopic records*,. 1–36.

RZOSKA, 2012 *The Nile, Biology of an Ancient River: Biology of an Ancient River*

SALVATORI, S. AND D. USAI 2009. ‘El Salha Project 2005: New Khartoum Mesolithic Sites from Central Sudan’, *Kush* 19, 87-96.

SALVATORI S., USAI D., ZERBONI A., 2011. Mesolithic Site Formation and Palaeoenvironment along the White Nile (Central Sudan). *Afr Archaeol Rev* 28:177–211

SALVATORI, S. ,2012. “Disclosing archaeological complexity of the Khartoum Mesolithic.” *African Archaeological Review* 29(4): 399–472.

SALVATORI, S., USAI, D., FAROUG, M. A., DI MATTEO, A., IACUMIN, P., LINSEELE, V. AND KHALID MAGZOUN, M. 2014. Archaeological evidence at Al Khiday: New insight on the prehistory and history of Central Sudan.” In the Fourth Cataract and beyond. Proceedings of the 12th International Conference of Nubian Studies, edited by J. R. Anderson and D. A. Welsby, pp. 243–257. Leuven: Peeters.

SALVATORI S., USAI D., ZERBONI A., 2018 New Evidence from the Prehistoric sites at Al Khiday. In: Desert and the Nile. Prehistory of the Nile Basin and the Sahara, Papers in honour of Fred Wendorf. Studies in African Archaeology 15

SCHONE B.R., SURGE D.M., 201 Part N, REVISED, Volume 1, Chapter 14: Bivalve sclerochronology and geochemistry. Treatise online, 46, 1-24

SHARP Z., 2006 Principle of Stable Isotope Geochemistry

SINADA F., ABDEL-RAHMAN M, 2013. Water chemistry and quality of the White Nile at Khartoum. Sudan Journal of Science (SJS) 5: 1-14

SMITH B. N., EPSTEIN S., 1971. Two Categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Ratios for Higher Plants. Plant Physiology 47, 380-384

SOLIANI L, 2015. Statistica di base. Piccin, Padova.

STEPHAN, E., 2000. Oxygen Isotope analysis of animal bone phosphate: method refinement, influence of consolidants, and reconstruction of paleotemperatures for Holocene sites, Journal of Archaeological Science, .27, .523-535.

STEWART KM., 2014. Environmental change and hominin exploitation of C4-based resources in wetland / savanna mosaics. Journal of Human Evolution 77, 1-16

STOTT L. D., 2002. The influence of diet on the  $\delta^{13}\text{C}$  of shell carbon in the pulmonate snail *Hlix aspersa*. Earth and Planetary Science Letters 195: 249-259

SU X., SUN K., CUI F.Z., LANDIS W.J., 2003. Organization of apatite crystals in human woven bone. Bone 32, 150-162

SULLIVAN C.H., KRUEGER H.W., 1981. Carbon isotope analysis of separate chemical phases in modern and fossil bone. Nature, 292, 333-5.

TANAKA N., M. C. MONAGHAN AND RYE D. M. 1986. Contribution of metabolic carbon to mollusc and barnacle shell carbonate. Nature 320, 520–523.

TARUTANI T., CLAYTON R. N. AND MAYEDA T. K. 1969. Effect of polymorphism and magnesium substitution on oxygen isotope fractionation between calcium carbonate and water. *Geochim. Cosmochim. Acta* 33, 987–996

TIERNEY J.E., dE MENOCA P.B., 2013 Abrupt Shifts in Horn of Africa Hydroclimate Since the Last Glacial Maximum, *Scienceexpress* pag.5

THORROLD S. R., CAMPANA S. E., JONES C. M. AND SWART P. K. 1997. Factors determining  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  fractionation in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 2909–2919

THORWEIHE U., 1990. The Nubian aquifer system. In Said, R. (ed), *The Geology of Egypt*. Balkeema, Rotterdam pp 601-611

TIESZEN L.L., BOUTTON T.W., TESDAHL K.G., SLADE N.A., 1983. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. *Oecologia* 57, 3237

TUCKER, C.J., TOWNSHEND, J.R.G. AND GOFF, T.E., 1985. African land-cover classification using satellite data. *Science*, 227, 369-375 Yurtsever, Y., 1975. Worldwide surv

UREY H. C. 1947. The thermodynamical properties of isotopic substances. *J. Chem. Soc.* 562–581.

USAI D. AND SALVATORI S., 2005. The IsIAO archaeological project in the El Salha area (Omdurman South, Sudan): results and perspectives. *Africa (Lond)*. 60, 474–493.

USAI D., S. SALVATORI, P. IACUMIN, A. DI MATTEO, T. JAKOB AND A. ZERBONI 2010. ‘Excavating a Unique Pre-Mesolithic Cemetery in Central Sudan’, *Antiquity* 84, 323.

USAI, D., 2014. “Recent advances in understanding the prehistory of Central Sudan.” In *The Fourth Cataract and Beyond*. Proceedings of the 12th International Conference for Nubian Studies, edited by J. R. Anderson and D. A. Welsby, pp. 31–44. Leuven: Peeters.

USAI, D., SALVATORI, S., JAKOB, T., AND DAVID, R. 2014. The Al Khiday cemetery in Central Sudan and its “Classic/Late Meroitic” period graves.” *Journal of African Archaeology* 12(2): 183–204.

USAI D., 2016 *A Picture of Prehistoric Sudan: The Mesolithic and Neolithic Periods*. Oxford Handbooks online

USAI D. & SALVATORI S., 2019 The Mesolithic period on the White Nile region and the al-Khiday sites, *Azania: Archaeological Research in Africa*, 54:4, 445-467

VAN DAMME, 1984 *The Freshwater mollusca of Northern Africa. Distribution, Biogeography and Palaeoecology*

- VENNEMANN T.W., HEGNER E., CLIFF G., BENZ G.W., 2001. Isotopic composition of recent shark teeth as a proxy for environmental conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 1583-1599
- WHITE R. M. P., DENNIS P. F. AND ATKINSON T. C. 1999. Experimental calibration and field investigation of the oxygen isotopic fractionation between biogenic aragonite and water. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 1242–1247
- WILBUR K. M ,1964. Shell formation and Regeneration. *Physiol. Mollusc.* Vol. 1
- WILBUR K. M. AND SALEUDDIN S. M.,1983. Shell Formation. In *Physiology* Vol. 4.
- WILLIAMS M.A.J., ADAMSON D.A., 1980.Late Quaternary depositional history of the Blue and White Nile rivers in central Sudan. In: *Quaternary Environments and Prehistoric Occupation in Northern Africa*. A.A., Balkema, Rotterdam, pp 281-304
- WILLIAMS, M.A.J., ADAMSON, D., COCK, B. AND MCEVEDY, R.,2000. Late Quaternary environments in the White Nile region, Sudan. *Global and Planetary Change*, 26, 305–316.
- WILLIAMS M.A.J., USAI D., SALVATORI S., WILLIAMS F.M., ZERBONI A., MARITAN L, LINSEELE V., 2005. Late Quaternary environments and prehistoric occupation in the lower White Nile valley, Central Sudan. *Quaternary Science Reviews*, 130, 72-88
- WILLIAMS M.A.J., 2009. Late Pleistocene and Holocene environments in the Nile Basin. *Glob. Planet. Chang.* 69,1-15
- WILLIAMS, M. A. J., USAI, D., SALVATORI, S., WILLIAMS, F. M., ZERBONI, A., MARITAN, L., AND LINSEELE, V. 2015. Late quaternary environments and prehistoric occupation in the lower White Nile valley, central Sudan.” *Quaternary Science Reviews* 130: 72–88.
- YAPP, C.J. 1979. Oxygen and carbon isotope measurements of land snail shell carbonate. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 23, 629-35
- ZANCHETTA, G., LEONE, G., FALLICK, A. E. AND BONADONNA, F. P. 2005. Oxygen isotope composition of living land snail shells: data from Italy. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 223, 20–33.
- ZERBONI, A. 2011. ‘Micromorphology Reveals *in situ* Mesolithic Living Floors and Archaeological Features in Pluristratified Sites in Central Sudan’, *Geoarchaeology* 26, 3, 365-391
- ZHENG Y. F.,1999. Oxygen isotope fractionation in carbonate and sulfate minerals. *Geochem. J.* 33, 109–126.

## APPENDICE A

### Il fattore di frazionamento acido

a cura del Laboratorio di Geochimica degli isotopi stabili di Parma

#### Introduzione generale

Data una certa temperatura  $T$ , il “fattore di frazionamento acido” degli isotopi dell’ossigeno,  $\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^T$ , per un minerale generico ( $\Theta$ ) contenente il gruppo carbonatico  $\text{CO}_3^{2-}$  (es.: carbonati, apatite contenente  $\text{CO}_3^{2-}$ ) è definito come

$$\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^T = \frac{{}^{18/16}\delta_{\text{CO}_2(\Theta)/\text{RF}}^T + 1}{{}^{18/16}\delta_{\Theta/\text{RF}} + 1} \quad (1)$$

dove  ${}^{18/16}\delta_{\Theta/\text{RF}}$  e  ${}^{18/16}\delta_{\text{CO}_2(\Theta)/\text{RF}}^T$  sono i valori isotopici per l’ossigeno totale del gruppo  $\text{CO}_3^{2-}$  del minerale  $\Theta$  e per  $\text{CO}_2$  gas prodotto da dissoluzione della fase  $\Theta$  in soluzione concentrata di  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $\geq 100\%$  del componente chimico  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ad una data temperatura  $T$ , e RF è un materiale di riferimento (standard internazionale primario,  $o$ , o secondario, standard interno di laboratorio, standard di lavoro,  $w$ , del laboratorio).

Per i carbonati, il rapporto isotopico dell’ossigeno totale di  $\text{CO}_3^{2-}$  può essere determinato per decarbonatazione/fluorinazione, come descritto, ad esempio, da Sharma & Clayton (1965). Normalmente, però, gli isotopi dell’ossigeno del gruppo carbonatico presente in un minerale che si scioglie in  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , sono determinati indirettamente misurando l’ossigeno del prodotto  $\text{CO}_2$  gas, un metodo introdotto negli anni Cinquanta del secolo scorso (McCrea 1950).

In generale, la retta di calibrazione usata per determinare il rapporto  ${}^{18/16}\delta$  è calcolata usando standards di *calcite povera in Mg* (es.: NBS19, NBS18, IAEA 603). Nel caso in cui gli standard si comportino tutti nello stesso modo durante la dissoluzione, che gli standard non abbiano errori sistematici e le loro misure non siano sottoposte a errori casuali e che la linearità strumentale sia ideale, ogni standard dovrebbe fornire la stessa retta di regressione passante per un punto di coordinate ( ${}^{18/16}\delta_{\text{CO}_2(\text{st})/w}^T + 1$ ,  ${}^{18/16}\delta_{\text{st}/o} + 1$ ) e per l’origine delle coordinate, dove  ${}^{18/16}\delta_{\text{st}/o}$  è il valore accettato per lo standard riferito ad uno standard primario internazionale  $o$  (per lo più VPDB in questo testo). Indicando con STcal lo standard ( $o$  gli standard) di calcite bassa in Mg, la retta di regressione risulta

$$^{18/16}\delta_{m,CO_2(\theta)/w}^T + 1 = B_{STcal} ( ^{18/16}\delta_{\theta/o} + 1) \quad (2a)$$

dove  $^{18/16}\delta_{m,CO_2(\theta)/w}^T$  indica il valore misurato ( $m$ ) contro lo standard di lavoro  $w$ . La retta rovesciata

$$^{18/16}\hat{\delta}_{\theta/o} + 1 = \frac{1}{B_{STcal}} ( ^{18/16}\delta_{CO_2(\theta),m/w}^T + 1) = \frac{k}{B_{STcal}} ( ^{18/16}\delta_{CO_2(\theta),m/o}^T + 1) \quad (2b)$$

-dove  $k$  è una costante che lega i valori  $\delta$  riferiti a  $w$  ai valori riferiti a  $o$ - ci consente di calcolare  $^{18/16}\hat{\delta}_{\theta/o}$ , come stima di  $^{18/16}\delta_{\theta/o}$ , dal valore misurato  $^{18/16}\delta_{m,CO_2(\theta)/w}^T$ .

Se il campione in analisi non si comporta come  $STcal$  (calcite chimicamente diversa da  $STcal$ , dolomite, ankerite, apatite con gruppi  $CO_3^{2-}$  et cetera) si ottiene un valore *apparente*

$$^{18/16}\delta_{\theta/o}^{\#,T} + 1 = \frac{1}{B_{STcal}} ( ^{18/16}\delta_{m,CO_2(\theta)/w}^T + 1) \quad (3)$$

Il valore  $^{18/16}\delta_{\theta/o}^{\#,T}$  rappresenta il valore per la fase  $\theta$  nel caso in cui essa non si comporti come  $STcal$  durante la dissoluzione e produca  $CO_2$  con valore  $^{18/16}\delta_{CO_2(\theta)/w}^T$ . Pertanto, possiamo scrivere

$$\alpha_{ACID(STcal)}^T = \frac{^{18/16}\delta_{CO_2(\theta)/o}^T + 1}{^{18/16}\delta_{\theta/o}^{\#,T} + 1} \quad (4)$$

Inoltre, per definizione è

$$\alpha_{ACID(\theta)}^T = \frac{^{18/16}\delta_{CO_2(\theta)/o}^T + 1}{^{18/16}\delta_{\theta/o} + 1} \quad (5)$$

Pertanto, dividendo la (4) per la (5),

$$\frac{\alpha_{ACID(STcal)}^T}{\alpha_{ACID(\theta)}^T} = \frac{^{18/16}\delta_{\theta/o} + 1}{^{18/16}\delta_{\theta/o}^{\#,T} + 1} \rightarrow ^{18/16}\delta_{\theta/o} + 1 = \frac{\alpha_{ACID(STcal)}^T}{\alpha_{ACID(\theta)}^T} ( ^{18/16}\delta_{\theta/o}^{\#,T} + 1) \quad (6)$$

Teoricamente, per correggere il valore apparente è necessario conoscere ambedue i valori del coefficiente di frazionamento acido.

## Fattore di frazionamento acido per i carbonati

### Concetti generali

Molti importanti lavori riportano dati di  $\alpha_{ACID(\theta)}^T$  o di  $\delta_{CO_2(\theta)}^T$  per carbonati a diverse temperature  $T$  (es.: Sharma & Clayton 1965, Rosembaum and Sheppard 1986, Boettcher 1996, Swart et al 1997, Kim & O'Neil 1997, Carothers et al 1998, Das Sharma et al 2002, Gilg et al 2003, Ghosh et al 2005, Kim et al 2007, Crowley 2010; per un elenco di valori di  $\alpha_{ACID(\theta)}^{25^\circ C}$  vedi Kim et al 2015). Alcuni di questi lavori dimostrano la scarsa ripetibilità a  $25^\circ C$  (e.g.: Gilg et al 2003, Kim et al 2007). Gilg et al

(2003) sia per  $^{18/16}\delta$  sia per  $^{13/12}\delta$  attribuiscono l'ampia dispersion dei dati alla resa analitica senza però essere del tutto convincenti.

Anche Kim et al (2007) per la calcite bassa in Mg e l'aragonite riportano dispersione di dati a 25°C molto più alta che alle altre temperature. Questi autori usano i valori  $^{13/12}\delta_{\text{cal/PDB}}$  (calcite bassa in Mg) e  $^{13/12}\delta_{\text{arag/PDB}}$  (aragonite) per una selezione dei valori accettabili dell'ossigeno. Essi considerano le medie  $^{13/12}\bar{\delta}_{\text{cal/PDB}} = -4.62 \text{ ‰} \pm 0.06 \text{ ‰}$  (deviazione standard, s) e  $^{13/12}\bar{\delta}_{\text{arag/PDB}} = -12.88 \text{ ‰} \pm 0.08 \text{ ‰}$  ed eliminano i valori  $^{18/16}\delta_{\text{CO}_2(\text{cal})/\text{PDB}}^{\text{T}}$  dei campioni per i quali risulta  $10^3 |^{13/12}\delta_{\text{calc/PDB}} - ^{13/12}\bar{\delta}_{\text{cal/PDB}}| > 0.06$  per la calcite e  $10^3 |^{13/12}\delta_{\text{arag/PDB}} - ^{13/12}\bar{\delta}_{\text{arag/PDB}}| > 0.08$  per l'aragonite. Questo metodo, sebbene molto efficiente, è del tutto inusuale per l'identificazione di valori aberranti.

1) Innanzi tutto, per quanto riguarda l'eliminazione dei dati ricordiamo la “regola d'oro” di Burke (Burke 1998): “Nessun valore può essere rimosso da un insieme di dati soltanto su base statistica” (p. 20) e “Eliminare i valori estremi soltanto quando si è identificata una causa tecnica del loro carattere aberrante” (p. 23). Anche nel caso in cui questa regola restrittiva non sia accettata, potremmo eliminare soltanto dati che hanno bassissima probabilità di emergere (indicativamente con probabilità 0.05 or 0.01).

2) I dati  $^{13/12}\delta$  riportati da Kim et al (2007) non hanno una distribuzione normale (Shapiro-Wilk test:  $p_{\text{normal}} = 0.014$  per la calcite,  $p_{\text{normal}} = 0.007$  per l'aragonite). In questo caso, la deviazione standard del campione statistico non esprime in modo corretto la distribuzione dei valori intorno al loro valore centrale. Nel caso di una distribuzione non normale, l'uso di metodi non parametrici, come Box-and-Wiskers (Tukey 1977), è del tutto preferibile. Questo test indica che non uno dei valori riportati da Kim et al (2007) per la calcite e l'aragonite è un “outlier”.

Per dettagli intorno ai criteri di eliminazione dei dati, si rimanda alle semplici discussioni riportate in Snedecor & Cochran (1968), Burke (2001), Zar (2010), Soliani (2015, e riferimenti bibliografici).

### ***Regressioni usate***

Con l'utilizzo dei dati riportati dai vari autori per i diversi campioni analizzati, è stato verificato che la relazione lineare del tipo  $\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^{\text{T}}$  su  $T^{-2}$  (in kelvin se non indicato diversamente) generalmente fornisce un errore di regressione inferiore a quello ottenuto mediante la regressione  $\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^{\text{T}}$  su  $T^{-1}$ .

Pertanto, possiamo scrivere

$$\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^T = \frac{^{18/16}\delta_{\text{CO}_2(\Theta)/\text{o}}^{\text{ac,T}} + 1}{^{18/16}\delta_{\Theta/\text{o}} + 1} = b' \left( \frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2} \right) + a' \quad (7)$$

dove l'intercetta  $a'$  rappresenta un valore “pesato” di  $\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^T$  a  $T = 298.15 \text{ K}$  ( $25^\circ\text{C}$ ).

Dal momento che molti autori non riportano i valori  $^{18/16}\delta_{\Theta/\text{o}}$  per i campioni analizzati, i confronti tra i diversi gruppi di dati sono stati fatti utilizzando la relazione,

$$\frac{\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^{25^\circ\text{C}}} - 1 = \frac{^{18}\delta_{\text{CO}_2(\Theta)/\text{o}}^T + 1}{^{18}\delta_{\text{CO}_2(\Theta)/\text{o}}^{25^\circ\text{C}} + 1} - 1 = b \left( \frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2} \right) + a \quad (8)$$

che, teoricamente, rappresenta una linea retta con probabilità  $p_{a=0} = 1$ , cioè una linea retta passante per l'origine. *Praticamente*, la regressione (8) dovrebbe mostrare una probabilità molto alta per  $a = 0$ .

### **Selezione dei dati**

I dati sono stati selezionati in base ai due seguenti criteri:

- 1) Solo insiemi di dati riferiti a più di due temperature diverse.
- 2) Solo dati ottenuti con tecnica IAB (Individual–Acid Bath, bagno acido individuale).

Sfortunatamente, gli autori frequentemente non riportano singoli dati ma, piuttosto, medie ottenute alle diverse temperature. Per questa ragione si è deciso di usare i valori medi perdendo in tal modo importanti informazioni statistiche.

I risultati statistici sono riportati in Tabella 1 da dove emerge un fatto molto importante: i vari campioni di calcite bassa in Mg non hanno lo stesso comportamento al variare della temperatura dal momento che i coefficienti angolari delle rette di regressione sono sensibilmente diversi gli uni dagli altri. Per l'aragonite disponiamo soltanto di un solo insieme di dati e pertanto la retta di regressione è riferita soltanto a questo.

### **Fattore di frazionamento acido $\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^T$ e suo valore a $25^\circ\text{C}$**

#### *Calcite bassa in Mg e aragonite*

I valori misurati a  $25^\circ\text{C}$  ricoprono un ampio intervallo in dipendenza del campione di calcite analizzato. Accettando i suggerimenti di Kim et al (2015), consideriamo  $\alpha_{\text{ACID}(\text{acc cal})}^{25^\circ\text{C}} = 1.01025$ , valore accettato. Questo valore accettato, tuttavia, è stato scelto tra vari valori sperimentali ottenuti per  $\alpha_{\text{ACID}(\text{cal})}^{25^\circ\text{C}}$  (da 1.01015 a 1.01058, 5 dati, Kim et al 2015) non su base strettamente scientifica, ma in quanto comunemente utilizzato (Kim et al 2015). La stessa cosa può essere detta per l'aragonite;

in base ai suggerimenti di Kim et al (2015), si ha  $\alpha_{\text{ACID}(\text{acc arag})}^{25^\circ\text{C}} = 1.01063$ , valore accettato scelto nell'intervallo di valori 1.01034-1.01107 (3 valori, Kim et al 2015). Dal momento che i valori bibliografici variano, è evidente che potremo considerare il valore accettato come valore sottoposto ad incertezza.

Non ci sono ragioni teoriche e sperimentali per assumere che a 25°C si abbia una distribuzione i cui valori tendono a concentrarsi intorno al valore centrale, come, ad esempio, accade per la distribuzione normale. Pertanto, possiamo assumere che la popolazione dei valori a 25°C per tutte le possibili calciti naturali abbia una distribuzione uniforme, per la quale ogni valore entro un intervallo ha la medesima probabilità di essere osservato.

Teoricamente, per una distribuzione uniforme valgono le seguenti relazioni:

$$\bar{x} = \frac{x^+ - x^-}{2}$$

$$u(x) = \frac{x^+ - x^-}{2\sqrt{3}}$$

dove  $x^+$  e  $x^-$  sono i valori massimo e minimo della popolazione di valori  $x$ ,  $\bar{x} = (x^+ - x^-)/2$  e  $u(x)$  la media e la deviazione standard dei valori  $x$ , rispettivamente. Si noti che, nel caso di questa distribuzione l'intervallo

$$\bar{x} - u(x) \leq x \leq \bar{x} + u(x)$$

include il 57% dei dati, non il 68% circa come si verifica nella distribuzione normale. Per i campioni di calcite e aragonite, il valore  $x_{\text{acc}}$  non corrisponde esattamente alla media  $\bar{x}$  dei valori  $x$ . Pertanto, per essere prudenti nella valutazione dell'incertezza invece dell'intervallo  $x^+ - x^-$  considereremo un intervallo più ampio corrispondente a  $2|x - x_{\text{acc}}|_{\text{max}}$ , cioè due volte la differenza massima in valore assoluto tra  $x$  e  $x_{\text{acc}}$ . Per la calcite otteniamo:

$$u(\alpha_{\text{ACID}(\text{cal acc})}^{25^\circ\text{C}}) \approx \frac{|\alpha_{\text{ACID}(\text{cal})}^{25^\circ\text{C}} - \alpha_{\text{ACID}(\text{acc cal})}^{25^\circ\text{C}}|_{\text{max}}}{\sqrt{3}} = \frac{1.01058 - 1.01025}{\sqrt{3}} = 0.00019 \approx 0.2 \text{ ‰}$$

Per l'aragonite,

$$u(\alpha_{\text{ACID}(\text{acc arag})}^{25^\circ\text{C}}) \approx \frac{|\alpha_{\text{ACID}(\text{arag})}^{25^\circ\text{C}} - \alpha_{\text{ACID}(\text{acc arag})}^{25^\circ\text{C}}|_{\text{max}}}{\sqrt{3}} = \frac{1.01107 - 1.01063}{\sqrt{3}} = 0.000254 \approx 0.3 \text{ ‰}$$

### **Relazione tra il rapporto $\alpha_{\text{ACID}(\theta)}^T / \alpha_{\text{ACID}(\theta)}^{25^\circ\text{C}}$ e la temperatura**

Per la calcite sono stati usati i dati riportati in Swart et al (1991; Islandic spar low-Mg calcite PSU-4, Pleistocene Key Largo formation low-Mg calcite LMC: 11 data), Böttcher (1996; CaCO<sub>3</sub> Merck, synthetic carbonate: 3 data), Kim et al (2007; Calcite H, natural calcite with MgO = 0.77: 20

data), e Crowley (2010; low-Mg calcite NBS19, NBS18, IAEA-CO-1, IAEA-CO-8, LIVM, LIVF, LIVC, PCC, CM, BCS, CHALK: 55 data). I dati di Kim et al (2007) si riferiscono soltanto ad un campione per il quale sono stati riportati parecchi dati per diverse temperature; pertanto, per il confronto con i dati medi riportati da altri autori, ho utilizzato i valori medi per le diverse temperature.

Poi, per ogni campione di calcite bassa in Mg, è stata calcolata una retta di regression tipo (8) (Tabella 1) e, seguendo le indicazioni di Zar (2010), sono state confrontate le pendenze,  $\mathbf{b}$ , e le altezze,  $\mathbf{E}$  (posizione verticale sul grafico), determinando la probabilità delle ipotesi nulle  $H_0: \mathbf{b}_1 = \mathbf{b}_2 = \dots = \mathbf{b}_k$  e  $H_0: \mathbf{E}_1 = \mathbf{E}_2 = \dots = \mathbf{E}_k$  dove 1, 2, ..., k si riferiscono alle regressioni per i campioni analizzati dai diversi autori. Le probabilità (p) per l'ipotesi nulla  $H_0: \mathbf{b}_1 = \mathbf{b}_2 = \dots = \mathbf{b}_k$  e per  $H_0: \mathbf{E}_1 = \mathbf{E}_2 = \dots = \mathbf{E}_k$  sono ambedue molto basse ( $p < 0.001$ ). Ciò suggerisce che le diverse calciti basse in Mg considerate si comportino in modo diverso durante il processo di dissoluzione. La ragione di questo comportamento non è ben nota (vedi discussione in Crowley 2010), sebbene risulti evidente che le specie cationiche rappresentano un importante fattore. Grazie ai dati riportati da Crowley (2010), si può ragionevolmente supporre che la diminuzione di Ca e l'aumento di Sr nella struttura cristallina giochino un ruolo molto importante sulla variazione della pendenza della retta di regressione: mano a mano che la concentrazione di Ca diminuisce, il valore di  $\mathbf{b}_{\text{cal}}$  decresce, mentre  $\mathbf{b}_{\text{cal}}$  cresce al crescere della concentrazione di Sr.

Come già affermato precedentemente, i dati della pendenza  $\mathbf{b}_{\text{cal}}$  e, inoltre dell'intercetta  $\mathbf{a}_{\text{cal}}$ , indicano che ogni campione di calcite si comporta in modo diverso quando viene trattato con la soluzione di acido fosforico. Anche per queste grandezze misurate su tutte le possibili calciti basse in Mg presenti in natura, non c'è ragione di attendersi una distribuzione dei valori concentrata intorno al valore centrale. Di fatto, possiamo ragionevolmente supporre che i valori abbiano una distribuzione uniforme.

Table 1. Dati statistici per le regressioni  $(\alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^T / \alpha_{\text{ACID}(\Theta)}^{25^\circ\text{C}}) - 1 = b [(1/T^2) - (1/298.15^2)] + a$  ottenute per differenti campioni di calcite bassa in Mg e per un campione di aragonite

	n	<i>b</i>	s( <i>b</i> )	10 <sup>5</sup> * <i>a</i>	10 <sup>5</sup> *s( <i>a</i> )	p( <i>a</i> =0)	10 <sup>5</sup> *s( <i>yx</i> )
<i>Crowley (2010)</i>							
Θ = low-Mg calcite (cal)							
NBS19	5	576	20	3.6	5.9	0.59	6.8
NBS18	5	540	18	-3.7	5.1	0.52	5.9
IAEA-CO-1	5	514	16	4.4	4.7	0.41	5.3
LIVM	5	540	13	1.4	3.9	0.74	4.4
LIVF	5	541	30	8.1	8.7	0.42	9.9
PCC	5	566	8.1	1.5	2.3	0.56	2.7
CM	5	549	16	0.7	4.5	0.89	5.1
IAEA-CO-8	5	652	24	-1.6	6.8	0.83	7.8
LIVC	5	636	24	4.2	7.0	0.59	8.0
BLS	5	618	9.0	1.7	2.6	0.56	3.0
CHALK	5	601	21	1.8	6.2	0.79	7.1
NBS18+NBS19 = STcal	10	558	14	- 0.07	3.9	99	6.3
<i>Kim et al (2007)</i>							
Calcite H <sup>(1)</sup>	3	606	3.5	-0.3	0.7	0.77	0.7
Calcite H <sup>(2)</sup>	20	604	17	-0.2	3.0	0.95	9.8
<i>Böttcher (1996)</i>							
Calcite MERK	4	574	34	1.6	2.7	0.55	13
<i>Swart et al (1991)</i>							
LMC	5	552	12	-2.8	2.7	0.37	3.7
PSU-4	6	558	28	2.4	5.8	0.70	8.6
<i>Kim et al (2007)</i>							
Θ = aragonite (AR)							
Aragonite <sup>(1)</sup> Ara-Nat-ST-1	3	576	29	-2.2	5.7	0.77	6.1
Aragonite <sup>(2)</sup> Ara-Nat-ST-1	16	579	20	- 0.85	3.3	0.80	10

<sup>(1)</sup> Valori ottenuti usando le medie alle diverse temperature; <sup>(2)</sup> Valori ottenuti usando i singoli dati

Dall'equazione (8) risulta

$$\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}}} - 1 = \mathbf{b}_{\text{STcal}} \left( \frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2} \right) + \mathbf{a}_{\text{STcal}}$$

L'incertezza standard di predizione per  $\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}}}$  è facilmente calcolabile (Snedecor and Cochran 1968):

$$u\left(\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}}}\right) = s(yx)_{\text{STcal}} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(X - \bar{X}_{\text{STcal}})^2}{\sum(X_{\text{STcal}} - \bar{X}_{\text{STcal}})^2}} \quad (9)$$

dove  $X =$  qualsiasi valore  $\left(\frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2}\right)$ ,  $X^\circ_{\text{STcal}} = \left(\frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2}\right)$  valori usati nelle regressioni di Tabella 1,  $\bar{X}_{\text{STcal}} =$  media dei valori  $\left(\frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2}\right)$  usati per la regressione,  $n = 10$ , numero di coppie di dati usate nella regressione,  $s(yx)_{\text{STcal}} = 0.000063$  errore standard della regressione con gradi di libertà  $\nu = (10 - 2) = 8$ . Si noti che  $u\left(\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}}}\right)$  non è costante ma dipende da  $X$ . Nell'intervallo 25-100°C, il valore risultante varia da circa 0.000066 a 0.00081 (0.000066 a 72°C, temperature da noi utilizzata durante le misure).

Facciamo ora una valutazione dell'incertezza standard  $u(\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T)$  partendo dalla stima di

$$\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}}}. \text{ Scriviamo l'identità}$$

$$\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T = \alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}} \frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}}}$$

Consideriamo  $\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}} = \alpha_{\text{ACID}(\text{acc cal})}^{25^\circ\text{C}} = 1.01025$  con incertezza 0.2 % calcolata in precedenza.

Pertanto scriviamo:

$$u(\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T) \approx \sqrt{u^2(\alpha_{\text{ACID}(\text{acc cal})}^{25^\circ\text{C}}) + u^2\left(\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}}}\right)}$$

Come calcolato in precedenza, a 72°C è  $u\left(\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{72^\circ\text{C}}}{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^{25^\circ\text{C}}}\right) = 0.000066 \approx 0.07 \%$ ; quindi,

$$u(\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T) \approx \sqrt{0.0002^2 + 0.00007^2} = 0.00021 \approx 0.2 \%$$

Per l'aragonite è

$$\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{AR})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{AR})}^{25^\circ\text{C}}} = \mathbf{b}_{\text{AR}} \left( \frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2} \right) + (\mathbf{a}_{\text{AR}} + 1)$$

con

$$u\left(\frac{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{25^\circ\text{C}}}\right) = s(yx)_{\text{AR}} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(X - \bar{X}_{\text{AR}})^2}{\sum (X_{\text{AR}} - \bar{X}_{\text{AR}})^2}} \quad (10)$$

$n = 3$ ,  $s(yx)_{\text{AR}} = 0.000061$  con  $\nu = (n-2) = 1$  per  $s(yx)$  (Tabella 1). Nell'intervallo 25-100°C, il valore risultante varia tra circa 0.000071 e 0.00084 (0.000071 a 72°C). Dal momento che, come visto precedentemente, è  $u(\alpha_{\text{ACID(acc arag)}}^{25^\circ\text{C}}) \approx 0.3 \text{ ‰}$ , risulta

$$u(\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{72^\circ\text{C}}) \approx \sqrt{u^2(\alpha_{\text{ACID(acc arag)}}^{25^\circ\text{C}}) + u^2\left(\frac{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{25^\circ\text{C}}}\right)}$$

Pertanto, a 72°C, è  $u\left(\frac{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{25^\circ\text{C}}}\right) = 0.00071$  e quindi,

$$u(\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{72^\circ\text{C}}) \approx \sqrt{0.00025^2 + 0.000071^2} = 0.00026 \approx 0.3 \text{ ‰}$$

### ***Calibrazione con standard di calcite bassa in Mg e errore sistematico su nuovi dati analitici per l'aragonite***

Per la determinazione dei valori  $^{18/16}\delta$  nel gruppo carbonatico dei minerali, è raccomandato l'uso degli standard NBS19 and NBS 18 (vedi ad esempio, Kim et al 2015, e riferimenti bibliografici). Accettata questa scelta, usando gli standard NBS19 and NBS18 (indicati sinteticamente con *STcal*), la pendenza della retta ottenuta per regressione lineare tipo (8) è  $\mathbf{b}_{\text{STcal}} = 558$  (Tabella 1). Consideriamo ora le relazioni tipo (8) riferite a *STcal* e ad un campione generico di calcite bassa in Mg (*cal*):

$$\frac{\alpha_{\text{ACID(STcal)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(STcal)}}^{25^\circ\text{C}}} = \mathbf{b}_{\text{STcal}} \left(\frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2}\right) + (\mathbf{a}_{\text{STcal}} + 1) \quad (11a)$$

$$\frac{\alpha_{\text{ACID(cal)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(cal)}}^{25^\circ\text{C}}} = \mathbf{b}_{\text{cal}} \left(\frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2}\right) + (\mathbf{a}_{\text{cal}} + 1) \quad (11b)$$

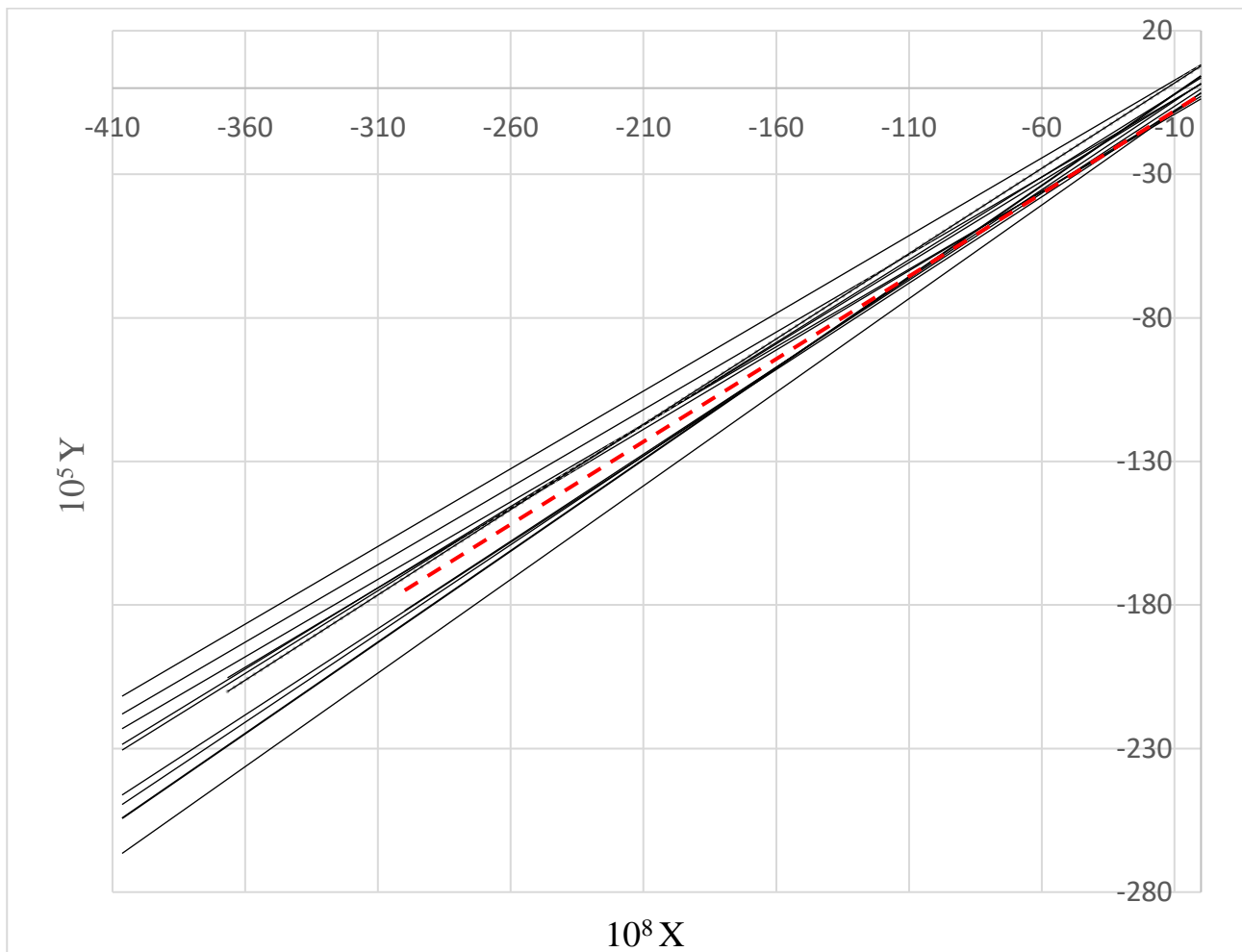
dove  $\alpha_{\text{ACID(STcal)}}^T$ ,  $\alpha_{\text{ACID(STcal)}}^{25^\circ\text{C}}$ ,  $\mathbf{b}_{\text{STcal}}$ , and  $\mathbf{a}_{\text{STcal}}$  sono noti, mentre  $\alpha_{\text{ACID(cal)}}^T$ ,  $\alpha_{\text{ACID(cal)}}^{25^\circ\text{C}}$ ,  $\mathbf{b}_{\text{cal}}$ , e  $\mathbf{a}_{\text{cal}}$  per un generico campione di calcite bassa in Mg in analisi sono sconosciuti. I valori  $\frac{\alpha_{\text{ACID(cal)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(cal)}}^{25^\circ\text{C}}}$  alle diverse temperature possono essere stimati mediante usando  $\mathbf{b}_{\text{STcal}}$ , e  $\mathbf{a}_{\text{STcal}}$  in luogo  $\mathbf{b}_{\text{cal}}$ , and  $\mathbf{a}_{\text{cal}}$ :

$$\frac{\alpha_{\text{ACID(cal)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(cal)}}^{25^\circ\text{C}}} \approx \mathbf{b}_{\text{STcal}} \left(\frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2}\right) + (\mathbf{a}_{\text{STcal}} + 1) \quad (11c)$$

In tal modo, però, si introduce un ulteriore errore nella stima di  $\frac{\alpha_{\text{ACID(cal)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(cal)}}^{25^\circ\text{C}}}$ .

Dalla Tabella 2 e dalla Fig. 1 risulta evidente che la dispersione dei valori  $b_{\text{cal}}$  e  $a_{\text{cal}}$  intorno ai valori  $b_{\text{STcal}}$  e  $a_{\text{STcal}}$  non è simmetrica. Pertanto, per essere prudenti, la distribuzione dei valori  $b_{\text{cal}}$  e  $a_{\text{cal}}$  intorno a  $b_{\text{STcal}}$  e  $a_{\text{STcal}}$  saranno stimate usando il massimo valore assoluto (max) della differenza tra  $b_{\text{cal}}$  and  $b_{\text{STcal}}$  e tra  $a_{\text{cal}}$  and  $a_{\text{STcal}}$ , rispettivamente. Sulla base di questa assunzione, si può scrivere approssimativamente:

Fig. 1. Rette di regressione  $Y = \frac{\alpha_{\text{ACID}(\theta)}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\theta)}^{25^\circ\text{C}}} - 1$  su  $X = \frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2}$  per varie calciti basse in Mg (linee continue) e un campione di aragonite (linea tratteggiata)



$$u(\mathbf{b}_{\text{cal}}) \approx \frac{|b_{\text{cal}} - b_{\text{STcal}}|_{\text{max}}}{\sqrt{3}} = \frac{652 - 558}{\sqrt{3}} = 54$$

e

$$u(\mathbf{a}_{\text{cal}}) \approx \frac{|a_{\text{cal}} - a_{\text{STcal}}|_{\text{max}}}{\sqrt{3}} = \frac{[8.1 - (-0.07)] * 10^{-5}}{\sqrt{3}} = 4.7 * 10^{-5}$$

Dal momento che tutti i valori  $\alpha_{\text{ACID}}^T$  sono prossimi all'unità, l'incertezza su  $(\frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2})$  è zero, e i valori sperimentali di  $\mathbf{b}_{\text{cal}}$  e  $\mathbf{a}_{\text{cal}}$  per le calciti considerate non sono correlati ( $p_{\text{slope} = 0} = 0.60$ ), approssimativamente in base all'equazione (10c) scriviamo:

$$u\left(\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{cal})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{cal})}^{25^\circ\text{C}}}\right) \approx \sqrt{u^2(\mathbf{b}_{\text{cal}}) + u^2(\mathbf{a}_{\text{cal}})}$$

A 72°C è  $(\frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2}) = 2.855 * 10^{-6}$ ; pertanto,

$$u\left(\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{cal})}^{72^\circ\text{C}}}{\alpha_{\text{ACID}(\text{cal})}^{25^\circ\text{C}}}\right) \approx \sqrt{(2.855 * 10^{-6} * 54)^2 + (4.7 * 10^{-5})^2} = 0.00016 \approx 0.2 \text{ ‰}$$

Questa incertezza è dovuta soltanto al diverso comportamento dei vari campioni di calcite povera in Mg durante la dissoluzione acida.

Per l'aragonite, si possono utilizzare soltanto i dati di Kim et al (2007), che sono riferiti ad un solo campione di aragonite (AR, Tabella 1). Dal momento che il campione è soltanto uno, sono stata costretta ad accettare una condizione fortemente restrittiva, cioè che l'aragonite (AR) analizzata rappresenti tutte le possibili aragoniti (arag) in natura; allora,  $\mathbf{b}_{\text{AR}} = \mathbf{b}_{\text{arag}}$ ,  $\mathbf{a}_{\text{AR}} = \mathbf{a}_{\text{arag}}$ ,  $\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{AR})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{AR})}^{25^\circ\text{C}}} =$

$\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{arag})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{arag})}^{25^\circ\text{C}}}$ . We write:

$$\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{arag})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{arag})}^{25^\circ\text{C}}} = \mathbf{b}_{\text{AR}} \left( \frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2} \right) + (\mathbf{a}_{\text{AR}} + 1)$$

A 72°C, come già visto, è  $u\left(\frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{arag})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{arag})}^{25^\circ\text{C}}}\right) = 0.071 \text{ ‰}$ . Se -come è probabile- anche per i diversi campioni di aragonite esistesse una dispersione di valori analoga a quella verificata per le calciti basse in Mg, il valore dell'incertezza riportato per l'aragonite sarebbe fortemente sottovalutato.

Consideriamo ora l'equazione (6),

$$^{18/16}\delta_{\text{arag/o}} + 1 = \frac{\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T}{\alpha_{\text{ACID}(\text{AR})}^T} ( ^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#,T} + 1 )$$

Dal momento che sia i valori  $\alpha_{\text{ACID}}^T$  e  $^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#,T} + 1$  valgono circa uno, l'incertezza composta su  $^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}$  risulta approssimativamente

$$u(^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}) \approx \sqrt{u^2(\alpha_{\text{ACID}(\text{STcal})}^T) + u^2(\alpha_{\text{ACID}(\text{AR})}^T) + u^2(^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#,T})}$$

A 72°C, assumendo un'incertezza di predizione  $u(^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#,72^\circ\text{C}}) = 0.2 \text{ ‰}$  e tenendo conto dei risultati riportati più sopra, cioè  $u^2(\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{72^\circ\text{C}}) = 0.3 \text{ ‰}$  e  $u^2(^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#,72^\circ\text{C}}) = 0.2$ , si ottiene l'incertezza combinata

$$u(^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}) = \sqrt{0.0002^2 + 0.0002^2 + 0.0003^2} = 0.00041 = 0.4 \text{ ‰}$$

Anche nel caso in cui l'incertezza di predizione  $u(^{18/16}\delta_{\text{AR/o}}^{\#,72^\circ\text{C}})$ , fosse assai più piccola (es. 0.1 ‰), il valore  $u(^{18/16}\delta_{\text{arag/o}})$  sarebbe ancora alto ( $\approx 0.33 \text{ ‰}$ ).

### Correzione per $\alpha_{\text{ACID(arag)}}^{\#,T}$

Per la fase aragonite, vediamo quale errore sistematico introduciamo considerando  $^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#,72^\circ\text{C}}$  al posto di  $^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{72^\circ\text{C}}$ :

$$\begin{aligned} \Delta &= (^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{72^\circ\text{C}} + 1) - (^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#,72^\circ\text{C}} + 1) = (^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#,72^\circ\text{C}} + 1) \left( \frac{\alpha_{\text{ACID(STcalc)}}^{72^\circ\text{C}}}{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{72^\circ\text{C}}} - 1 \right) \\ &\approx \left( \frac{\alpha_{\text{ACID(STcalc)}}^{72^\circ\text{C}}}{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{72^\circ\text{C}}} - 1 \right) \end{aligned}$$

Utilizzando i valori calcolati mediante le equazioni (parametri in Tabella 1)

$$\alpha_{\text{ACID(STcalc)}}^T \approx \alpha_{\text{ACID(acc cal)}}^{25^\circ\text{C}} \frac{\alpha_{\text{ACID(STcalc)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(STcalc)}}^{25^\circ\text{C}}} = \alpha_{\text{ACID(acc cal)}}^{25^\circ\text{C}} [b_{\text{STcalc}} \left( \frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2} \right) + (a_{\text{STcalc}} + 1)]$$

e

$$\alpha_{\text{ACID(AR)}}^T \approx \alpha_{\text{ACID(acc arag)}}^{25^\circ\text{C}} \frac{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^T}{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{25^\circ\text{C}}} = \alpha_{\text{ACID(acc arag)}}^{25^\circ\text{C}} [b_{\text{AR}} \left( \frac{1}{T^2} - \frac{1}{298.15^2} \right) + (a_{\text{AR}} + 1)]$$

a 2°C si ottiene

$$\Delta \approx \left( \frac{\alpha_{\text{ACID(STcalc)}}^{72^\circ\text{C}}}{\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{72^\circ\text{C}}} - 1 \right) = \frac{1.00864}{1.00895} - 1 = -0.00031 \approx -0.3 \text{ ‰}$$

Dal momento che il valore  $(^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#,72^\circ\text{C}} + 1)$  e i valori dei coefficienti di frazionamento sono molto prossimi a uno, possiamo scrivere:

$$u(\Delta) \approx \sqrt{u^2(\alpha_{\text{ACID(STcalc)}}^{72^\circ\text{C}}) + u^2(\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{72^\circ\text{C}})}$$

Mediante i calcoli effettuati in precedenza abbiamo ottenuto  $\alpha_{\text{ACID(STcalc)}}^{72^\circ\text{C}} \approx 0.2 \text{ ‰}$  e  $\alpha_{\text{ACID(AR)}}^{72^\circ\text{C}} \approx 0.3 \text{ ‰}$ . Pertanto,

$$u(\Delta) = \sqrt{0.0002^2 + 0.0003^2} = 0.00036 \approx 0.4 \text{ ‰}.$$

Il valore assoluto della differenza è molto simile al valore dell'incertezza sulla differenza. Pertanto, prudenzialmente, questa differenza deve essere tenuta in conto per il calcolo di  $^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{72^\circ\text{C}}$  dal valore apparente  $^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{\#72^\circ\text{C}}$ ; cioè:  $^{18/16}\delta_{\text{arag/o}}^{72^\circ\text{C}} = ^{18/16}\delta_{\text{arag,o}}^{\#72^\circ\text{C}} - 0.0003$

## BIBLIOGRAFIA

- Böttcher ME (1996)  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation during reactions of carbonates with phosphoric acid: effect of cationic substitution and reaction temperature. *Isotope Environ. Health Stud* 32:299- 305.
- Burke S (2001) Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods. LC GG Europe Online Supplement, *Statistics and Data Analysis*, 19-24
- Carothers WW, Adami LH, Rosenbauer RJ (1988) Experimental oxygen isotope fractionation between siderite-water and phosphoric acid liberated  $\text{CO}_2$ -siderite. *Geochim Cosmochim Acta* 52: 2445-2450.
- Crowley SF (2010) Effect of temperature on the oxygen isotope composition of carbon dioxide ( $\delta_{\text{CO}_2}^{18\text{O}}$ ) prepared from carbonate minerals by reaction with polyphosphoric acid: an example for the rhombohedral  $\text{CaCO}_3$  -  $\text{MgCO}_3$  group minerals. *Geochim Cosmochim Acta* 74: 6406-6421.
- Das Sharma S, Patil DT, Gopalan K (2002) Temperature dependence of oxygen isotope fractionation of  $\text{CO}_2$  from magnesite-phosphoric acid reaction. *Geochim Cosmochim Acta* 66: 589-593.
- Ghosh P, Patecki M, Rothe M, Brand WA (2005) Calcite- $\text{CO}_2$  mixed into  $\text{CO}_2$ -free air: a new  $\text{CO}_2$ -in air stable isotope reference material for the VPDB scale. *Rapid Comm Mass Spectrom* 19: 1097-1119.
- Gilg HA, Struk U, Vennemann T, Boni M (2003) Phosphoric acid fractionation factors for siderite and cerussite between 25 and  $72^\circ\text{C}$ . *Geochim Cosmochim Acta* 67: 4049-4055.
- Kim S-T, Mucci A, Taylor BE (2007) Phosphoric acid fractionation factors for calcite and aragonite between 25 and  $75^\circ\text{C}$  revisited. *Chem Geol* 246: 135-146.
- Kim S-T, Coplen TB, Horita J (2015) Normalization of stable isotope data for carbonate minerals: implementation of IUPAC guidelines. *Geochim Cosmochim Acta* 158: 276-289
- McCrea JM (1950) On the isotopic chemistry of carbonates and a paleotemperature scale. *J Chem Phys* 18:849-853.

- Rosembaum J & Sheppard SNF (1986) An isotopic study of siderites, dolomites and ankerites at high temperatures. *Geochim Cosmochim Acta* 50: 1147-1150.
- Sharma T & Clayton RN (1965) Measurements of  $O^{18}/O^{16}$  ratios of total oxygen of carbonates. *Geochim Cosmochim Acta* 29: 1347-1353.
- Snedecor GW, Cochran WG (1967) *Statistical methods*. Iowa State University Press, Ames (Iowa)
- Soliani L (2015) *Statistica di base*. Piccin, Padova.
- Swart PK, Burns SJ, Leder JJ (1997) Fractionation of the stable isotopes of oxygen and carbon in carbon-dioxide during reaction of calcite with phosphoric acid as a function of temperature and technique. *Chem Geol* 52: 365-374.
- Tukey JW (1977) *Exploratory data analysis*. Addison-Wesley, Reading
- Zar JH (2010) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall/Pearson.

## **APPENDICE B**

Le tabelle con i dati completi non sono disponibili nella versione on line.

Per informazioni scrivere a:

[antonella\\_macri@yahoo.it](mailto:antonella_macri@yahoo.it)