



Consorzio per la Gestione del Centro
di Coordinamento delle Attività di Ricerca
inerenti il Sistema Lagunare di Venezia

Palazzo Franchetti S. Marco 2847 30124 Venezia

Tel. +39.041.2402511 Fax +39.041.2402512

Progetto **STUDIO B.6.72 B/3**

**ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL
MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI
DALLA COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE
BOCCHIE LAGUNARI**

Contratto prot.n. 16514 si/gce/fbe

Documento **MACROATTIVITÀ: AVIFAUNA**

**RAPPORTO FINALE DELL'ANALISI DI
PARAMETRI BIOCHIMICI INDICATORI DI
STRESS NELL'AVIFAUNA**

Versione **1.0**

Emissione **15 Marzo 2008**

Redazione

Dott.ssa Cecilia Soldatini

Verifica

Prof. Natale Emilio
Baldaccini

Verifica

Prof.ssa Patrizia
Torricelli

Approvazione

Ing. Pierpaolo Campostrini

CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI

Indice

1. INTRODUZIONE	3
2. L'USO DEGLI ORMONI DELLO STRESS COME MISURA DELL'EFFETTO DEL DISTURBO SULL'AVIFAUNA	4
3. PROTOCOLLO PER LE ATTIVITÀ DI CAMPO	6
4. ANALISI DEI CAMPIONI	8
5. ANALISI DEI DATI.....	9
6. RISULTATI	10
6.1 Test preliminari e di acclimatazione.....	10
6.2 Test sperimentali	10
7. DISCUSSIONE	15
8. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	17
ALLEGATI	19

1. INTRODUZIONE

Ad integrazione delle attività previste dai Disciplinari Tecnici degli Studi B.6.72 B/1 e 2, di conteggio e descrizione ecologico-comportamentale delle comunità presenti nelle aree dei SIC lagunari confinanti con i cantieri, nello Studio B.6.72 B/3 è stata effettuata un'indagine sperimentale sull'uso degli ormoni come indicatori di stress negli uccelli. Tale indagine è da intendersi come attività di ricerca applicata a supporto ed integrazione dei dati del monitoraggio, con l'intento di evidenziare gli andamenti del livello di ormoni corticosteroidi (vedi oltre), indicanti una situazione di stress, in uccelli mantenuti in cattività in siti prossimi ai cantieri. Tutto ciò nell'ottica di meglio verificare eventuali effetti dell'attività dei cantieri sulla componente avifaunistica delle cenosi. Pertanto i risultati servono a dare più spessore scientifico al monitoraggio in corso.

Per questo fine, esemplari di verdone (naturalmente presente nell'area) allevati in cattività sono stati posti nei tre siti già oggetto di monitoraggio (Punta Sabbioni, Alberoni e Ca' Roman) cui è stato aggiunto un sito di controllo lontano dalle aree di cantiere (Celestia). A differenza di quanto scritto sul Disciplinare Tecnico, il sito del Bacan di Sant'Erasmus è stato escluso dalla sperimentazione poiché in quest'area la presenza dei passeriformi è limitata, in quanto non sussistono caratteristiche ecologiche tali da poterne ospitare popolazioni stabili.

In base al protocollo sperimentale di seguito descritto (Rapporto di Pianificazione Operativa, agosto 2007), verranno paragonati i valori di glucocorticosteroidi rilevati negli escrementi di uccelli tenuti in cattività nelle zone di influenza dei cantieri con quelli degli uccelli lasciati nel sito di controllo. È importante sottolineare che tali risposte fisiologiche restano evidenti anche in situazioni di assuefazione e quindi sono un tipo di informazione di maggiore dettaglio, che costituisce un valido supporto alle altre attività di monitoraggio in corso.

2. L'USO DEGLI ORMONI DELLO STRESS COME MISURA DELL'EFFETTO DEL DISTURBO SULL'AVIFAUNA

Nei vertebrati, gli ormoni prevalentemente prodotti nelle situazioni di stress sono glucocorticoidi (GCs) e catecolamine. L'aumento della loro secrezione migliora le risposte adattative fisiologiche dell'animale. I principali GCs prodotti dalle ghiandole surrenali sono il cortisolo e il corticosterone, quest'ultimo predominante negli uccelli.

Il corticosterone, il miglior indicatore ormonale dello stress negli uccelli, aumenta a seguito di eventi stressanti [Harvey, Phillips *et al.*, 1984; Mostl and Palme, 2002]. Il corticosterone presente nel plasma può indicare una situazione di stress negli uccelli, ma la cattura e la manipolazione dell'animale, essendo eventi stressanti, possono influenzare il risultato. In alternativa, qualora le concentrazioni di corticosterone nelle feci riflettessero la concentrazione del siero, questo permetterebbe di determinare i livelli di corticosterone negli uccelli in maniera non invasiva e non stressante. Studi sulle galline [Schwartz, Gross *et al.*, 1992] e su rapaci notturni *Strix occidentalis caurina* [Wasser, Bevis *et al.*, 1997; Wasser and Hunt, 2005] suggeriscono la validità di questa ipotesi.

Gli steroidi sono metabolizzati dal fegato e secreti attraverso la bile nell'apparato digerente. Di conseguenza, le quantità di steroidi fecali misurate riflettono eventi passati; questa caratteristica permette la separazione temporale tra la fase sperimentale ed il momento della raccolta. La misura di metaboliti steroidei immunoreattivi rinvenuti negli escrementi ha notevoli vantaggi rispetto al più tradizionale prelievo di sangue. La raccolta di campioni fecali permette un monitoraggio continuo dello stesso individuo, anche per lunghi periodi, non influenzando le sue attività e le relazioni sociali. Non è necessaria la manipolazione dell'animale, fatto di particolare importanza nel caso di studi centrati sullo studio degli ormoni adrenalinici. A differenza del prelievo di sangue, la raccolta degli escrementi non richiede capacità particolari. Tipicamente, i campioni possono essere raccolti con grande facilità, l'attività di campionamento non interferisce con il benessere dell'animale e non richiede permessi particolari. Grazie a questi benefici ed al progresso nello sviluppo dei reagenti per le analisi chimiche, l'approccio non invasivo sta riscuotendo un sempre maggiore interesse da parte dei ricercatori.

Il cortisolo è un indicatore accurato dello stress fisiologico. Questo ormone è secreto in grande quantità in risposta a stimoli cronici di stress [Jurke, Czekala *et al.*, 1997]. Un'esposizione costante ad alti livelli di ormoni dello stress può significare una diminuzione della fitness individuale a causa di immunosoppressione e atrofia dei tessuti muscolari. In animali sottoposti a stress, i glucocorticoidi sono secreti dal surrene. La concentrazione di questi ormoni nel sangue è stata diffusamente utilizzata per documentare gli effetti di varie fonti di stress. Comunque, visto che la raccolta di campioni ematici causa stress e può essere pericolosa, se non impossibile nel caso di alcune specie selvatiche o presenti negli zoo, i metodi non invasivi per la determinazione di corticosteroidi (o loro metaboliti) sono essenziali per lo studio dello stress in questi animali.

Questo tipo di analisi è stato sviluppato a partire dai primi anni '90. Sebbene l'obiettivo dei primi studi in cui si misuravano i metaboliti delle feci fosse la valutazione dello status riproduttivo delle renne [Monfort, Schwartz *et al.*, 1993], in seguito la tecnica è stata adattata allo studio di animali sotto stress. I test immunitari dei GC sono stati testati con successo su diverse specie di mammiferi e uccelli. Hanno funzionato molto bene nel caso delle oche selvatiche (*Anser anser*) e le oche da allevamento (*A. domesticus*) [Hirschenhauser, Kotrschal *et al.*, 2005]. Sono stati utilizzati con successo anche nel caso di gru del Canada (*Grus canadensis pratensis*) [Staley, Blanco *et al.*, 2007], falco pellegrino (*Falco peregrinus*) e aquila reale (*Aquila*

CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI

chrysaetos) [Staley, Blanco *et al.*, 2007], gallo (*Gallus domesticus*), cormorano (*Phalacrocorax carbo*), astore (*Accipiter gentilis*) [Dehnhard, Schreer *et al.*, 2003], gallo cedrone (*Tetrao tetrix*) [Baltic, Jenni-Eiermann *et al.*, 2005] e Paridi (*Poecile carolinensis*) [Lucas, Freeberg *et al.*, 2006]. Nei mammiferi sono stati impiegati nello studio di iene (*Hyaena hyaena*) [Goymann, Mostl *et al.*, 1999], cervo (*Cervus elaphus*) [Huber, Palme *et al.*, 2003; Sauerwein, Muller *et al.*, 2004], bertuccia (*Macaca sylvanus*) [Wallner, Mostl *et al.*, 1999], tasso (*Meles meles*) [Schutz, Agren *et al.*, 2006], e lepre (*Oryctolagus cuniculus*) [Monclus, Rodel *et al.*, 2006].

Un individuo sotto stress avrà livelli elevati di corticosterone nel proprio organismo; se l'evento stressante si protraesse, potrebbe avere conseguenze negative sulle condizioni fisiche e sul successo riproduttivo. Se gli ormoni coinvolti nella risposta all'evento di stress fossero presenti nell'organismo a lungo, produrrebbero effetti negativi [Mostl and Palme, 2002]; gli effetti dovuti ad alti livelli di ormoni dello stress vanno dalla perdita di peso [Mullner, Linsenmair *et al.*, 2004], alla riduzione del successo riproduttivo [Carney and Sydeman, 1999], alla riduzione della crescita dei pulcini [Saffer, Bradley *et al.*, 2000].

Lo studio degli ormoni dello stress fornisce un metodo più accurato rispetto a quelli comportamentali per determinare se un individuo è in una situazione di disturbo; infatti l'uso delle sole osservazioni comportamentali può essere fuorviante poiché un individuo che ha a disposizione un sito non disturbato si sposterà, ma, qualora non fosse disponibile un sito non disturbato alternativo, resterà dove si trova cercando di sopportare il disturbo [Gill, Norris *et al.*, 2001] e probabilmente sottoponendosi ad un aumento dei livelli degli ormoni dello stress. Ad esempio è stato osservato che i pinguini di Magellano (*Spheniscus magellanicus*) non mostrano risposte comportamentali verso un turista che si avvicini, ma il loro battito cardiaco aumenta significativamente come risultato dell'aumento dei livelli di corticosterone [Fowler, 1999].

3. PROTOCOLLO PER LE ATTIVITÀ DI CAMPO

Nei siti di Punta Sabbioni, Alberoni e Ca' Roman sono stati installati gruppi di quattro gabbie contenenti un uccello ciascuna. La specie utilizzata per gli esperimenti è il verdone, *Carduelis chloris*, in quanto esemplari selvatici sono regolarmente presenti nei tre siti costieri ed è possibile l'approvvigionamento di esemplari allevati in cattività.

Il verdone è un piccolo passeriforme della famiglia dei Fringillidi. È una specie diffusa in Europa, Nord Africa e nel sud ovest asiatico. In Italia la specie è residente mentre le popolazioni più settentrionali hanno caratteristiche migratorie. Gli habitat elettivi sono zone boscate, siepi nelle campagne coltivate e giardini con vegetazione folta. Al di fuori del periodo riproduttivo la specie forma grandi stormi spesso misti con altri fringillidi e zigoli. Sono prevalentemente granivori, sebbene alimentino i nidiacei con insetti. Sono animali comunemente allevati in cattività.

Non esistendo nell'ambiente circostante i cantieri aree sicure da atti vandalici a carico degli animali, ad eccezione di Punta Sabbioni le gabbie sono state poste all'interno dei cantieri stessi, nel punto più distante rispetto a dove operano le macchine e/o in aree riparate (ad esempio dietro i prefabbricati). Gli animali si trovavano quindi ad una distanza di poco inferiore dei primi cespugli dell'area SIC. È stata così garantita l'esclusione di eventi perturbatori incontrollati, come passaggio di moto o disturbo da parte di curiosi. A Punta Sabbioni le gabbie sono state posizionate presso il Circolo SO.CI.VE. adiacente al cantiere, ad Alberoni sono state posizionate all'interno del cantiere alle spalle (rispetto al cantiere) del container utilizzato come ufficio/spogliatoio presso la rete che delimita il cantiere stesso, a Ca' Roman sono state posizionate all'interno del cantiere alle spalle (rispetto al cantiere) del container del generatore alternativo di corrente presso la rete che delimita il cantiere stesso (Allegati 1-2).

Come sito di controllo è stato scelto un cortile interno della sede della Celestia del Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università Ca' Foscari, al quale è stato proibito l'accesso nel periodo degli esperimenti.

Sono stati utilizzati in totale 16 verdoni provenienti da allevamenti e per i quali, quindi, la presenza dell'uomo non è una fonte di stress significativo [O'Dwyer, Buttemer *et al.*, 2006]. Gli animali, suddivisi in gruppi di 4 individui per ogni stazione, sono stati alloggiati in gabbie separate. Una struttura metallica unica sostiene 4 gabbie (Allegato 2) (dimensioni della singola gabbia: 45x30x36, dimensioni della struttura: 150x36x168cm). Ad essa è stata aggiunta una gabbia esterna di rete metallica per mantenere eventuali predatori (uccelli, gatti o topi) a distanza di sicurezza.

Definizione dei periodi di monitoraggio:

- Fase 1:
 - periodo iniziale: tutti gli uccelli vengono lasciati nel sito di "controllo" per l'acclimatazione iniziale, dopo il trasporto. Un primo set pilota di analisi delle feci è stato svolto dopo 10 giorni;
 - gli animali sono assortiti casualmente in quattro gruppi; tre gruppi vengono spostati nei siti di indagine, un gruppo rimane nel sito di controllo (4 uccelli per sito) ove sono lasciati per 10 giorni, contemporaneamente. I prelievi delle feci sono stati fatti in tre riprese: terzo, sesto e ultimo giorno di permanenza presso i 4 siti;
- Fase 2: l'esperimento compiuto in Fase 1 viene ripetuto riassortendo casualmente i vari esemplari per siti e posizione nelle gabbie.

CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI

- Fase 3: l'esperimento compiuto in Fase 1 viene ripetuto riassortendo casualmente i vari esemplari per siti e posizione nelle gabbie.

I periodi di monitoraggio sono stati:

- Fase 1: dal 10 al 30 giugno 2007,
- Fase 2: dal 5 al 25 settembre 2007,
- Fase 3: dal 5 al 25 ottobre 2007.

Ogni gabbia era fornita di un adeguato foglio di carta bibula da filtro, su cui si depositavano le feci, raccolte alla fine di ogni periodo di cinque giorni. Gli escrementi così raccolti da ciascun esemplare sono stati conservati in provette sterili a -20°C. Al termine di ciascuna fase sperimentale le provette sono state inviate, con spedizione in ghiaccio secco, al laboratorio della facoltà di Veterinaria dell'Università di Vienna dove si è provveduto all'analisi di laboratorio (vedi oltre).

Rispetto a quanto previsto nel Disciplinare Tecnico, vista la riduzione del numero di animali e l'eliminazione di un ulteriore fase di controllo post esperimento, si è ritenuto utile pianificare tre fasi di ripetizione dell'esperimento per ottenere un maggior numero di campioni utili all'analisi.

4. ANALISI DEI CAMPIONI

Le analisi sono state effettuate presso il Dip. Di Scienze Naturali - Biochimica, Università di Medicina Veterinaria di Vienna, in accordo con le tecniche introdotte da Möstl e Palme nel 2002.

Per maggiori dettagli sull'attività del Prof Möstl e del suo gruppo di ricerca si consulti il sito web: www.vu-wien.ac.at/biochemie/content/e7/e737/index_ger.html

5. ANALISI DEI DATI

I dati sono stati archiviati in un DB (Allegato 3) e successivamente analizzati. Poiché i dati non sono risultati distribuiti in maniera normale, è stata effettuata una loro trasformazione in scala logaritmica. Per descrivere il comportamento degli uccelli nel sito di controllo e quindi escludere l'influenza della variabilità individuale nei risultati dei test, è stato applicato il test di omogeneità di Levene il quale indica, allorché non significativo, l'omogeneità dei dati.

È stato quindi utilizzato un modello lineare generalizzato (GLM) per determinare quali fossero i fattori che influenzano la concentrazione degli ormoni dello stress. Come variabile dipendente è stata usata la concentrazione degli ormoni riscontrata dall'analisi delle feci, come fattori sono stati considerati il sito, il numero del campione e la data. Infine, poiché, come si vedrà nei risultati, il sito è l'unico fattore ad influenzare significativamente la concentrazione degli ormoni dello stress, è stato utilizzato il test dell'ANOVA per l'identificare differenze tra i siti in base all'analisi della varianza. Il livello di significatività è stato fissato al 95%.

Il metodo ANOVA permette di investigare l'effetto della variazione dei fattori sulla variabilità dei risultati sperimentali del sistema sotto osservazione, determinando quale variazione è imputabile ai fattori stessi e quale ad effetti casuali. Questo strumento statistico permette di confrontare gli effetti di differenti "trattamenti", e le diverse fasi di questi, sugli animali oggetto di studio. Nel caso specifico, permette di confrontare le concentrazioni di ormoni riscontrate nei siti sperimentali e nel sito di controllo durante le diverse fasi sperimentali, e durante i diversi test. Ciò significa che il soggetto stesso è il proprio controllo quando posizionato nel luogo senza elementi di disturbo (sito di controllo) in confronto alla fase di test del disturbo nei siti di cantierati (Allegato 1).

Giacché gli individui presenti a Ca' Roman durante la prima fase sperimentale sono stati attaccati da predatori, si è tenuto conto di tale perturbazione nel commento dei risultati ottenuti. Si è, inoltre, provveduto ad applicare un'ulteriore gabbia di protezione alle strutture utilizzate (Allegato 2 B e D).

6. RISULTATI

6.1 Test preliminari e di acclimatazione

Prima dell'acquisto degli animali sono stati effettuati dei test preliminari (presso l'allevamento e quindi nell'ambiente in cui sono nati e vissuti) per permettere le necessarie calibrazioni sui set biochimici di analisi.

All'arrivo dei verdoni nella sede di acclimatazione (e di controllo), è stato fatto il test preliminare con una prima raccolta di campioni (Fase 1). Si è potuto constatare che nel sito di controllo i valori registrati erano inferiori rispetto a quelli registrati presso il sito di allevamento; infatti, la media del dosaggio dell'ormone nel sito di controllo è stata di 44,72 ng/g mentre quella all'allevamento era di 69,08 ng/g. Non è possibile contestualizzare minori valori registrati nel sito di acclimatazione se non invocando fattori di particolare idoneità ambientale del sito stesso.

Se ne deduce, tuttavia, che la capacità di adattamento di questa specie al nuovo ambiente è particolarmente alta, cosa che facilita la programmazione delle campagne degli esperimenti, e che i dieci giorni indicati per l'acclimatazione sono un periodo di tempo sufficiente.

6.2 Test sperimentali

Dal confronto dei dati ottenuti nelle tre fasi sperimentali presso il sito di controllo della Celestia, si osserva un andamento statisticamente omogeneo (Levene's test $P=0,06$), indice che non sono intervenuti eventi tali da provocare apprezzabili disuguaglianze nei livelli di ormoni dello stress durante gli esperimenti e che tutti gli individui rispondono in modo comparabile. All'interno di ciascuna delle singole fasi sperimentali si osserva, generalmente, una tendenza alla diminuzione dei livelli degli ormoni, sebbene non significativa, alla fine del periodo di test rispetto al primo prelievo (Figura 1).

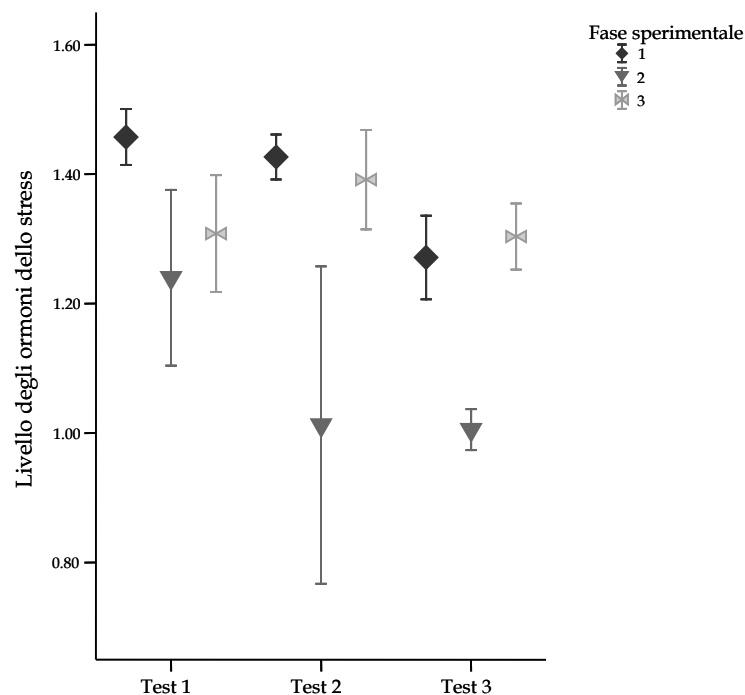


Figura 1. Differenze tra i tre campioni presi durante ogni ripetizione (terzo, sesto e ultimo giorno di permanenza) presso il sito di controllo.

CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI

Da un confronto generale tra il sito di controllo e ciascuno dei tre siti sperimentali si osservano differenze significative in due casi su tre ad Alberoni (Fasi 1 e 3) e a Punta Sabbioni (Fasi 1 e 2) (Tabella1).

Tabella 1 Risultati del confronto tra i valori medi registrati nelle tre stazioni e nel sito di controllo durante le tre fasi sperimentali (Test Anova). I valori evidenziati sono significativi.

Controllo <i>vs</i>	Fase 1		Fase 2		Fase 3	
	F	P	F	P	F	P
Punta Sabbioni	12,490	0,002	12,854	0,004	1,086	0,315
Alberoni	13,420	0,002	0,972	0,340	5,702	0,027
Ca' Roman	1,119	0,295	2,390	0,144	1,880	0,185

Come risultato del General Linear Model è stato osservato che l'unico fattore che influenza la concentrazione di ormoni dello stress nei campioni è il "sito" ($R^2=0.764$, $P<0.001$), mentre la "data" e il "numero del campione" non hanno alcun effetto.

6.2.1 Alberoni

Da un'analisi più dettagliata dei dati emergono elementi utili all'interpretazione di tali differenze. I livelli degli ormoni dello stress nel sito di controllo sono significativamente più alti rispetto ad Alberoni durante la prima fase sperimentale ($F_{1,20}=13,42$; $P=0,002$; Tabella 1). Tale risultato è principalmente dovuto ai primi due campioni ($P<0.05$ in entrambi i casi; Figura 2).

Confrontando i livelli di corticosteroidi considerando questa volta i singoli campioni raccolti (vedi per comodità di lettura la Tabella 2 e Figura 2), si rileva che ad Alberoni nella Fase 1 in corrispondenza dei primi due campionamenti gli individui nel sito di controllo hanno livelli ormonali significativamente maggiori; nella Fase 2 i livelli non sono significativamente differenti sebbene il terzo campione di Alberoni risulti maggiore rispetto al controllo ($F_{1,4}= 7,28$, $P= 0,074$); nella Fase 3, sebbene da un confronto generale Alberoni sembri avere risultati significativamente inferiori rispetto al controllo ($F_{1,20}= 5,702$, $P= 0,027$), considerando i singoli campionamenti le differenze tra i valori registrati nei due siti non sono significative (Fig. 2).

Tabella 2 Casi in cui il valore di corticosteroidi registrati nei siti sperimentali superano (+) o sono inferiori (-) rispetto a quelli registrati nel sito di controllo per la corrispondente fase e numero di test.

Controllo <i>vs</i>	Fase 1			Fase 2			Fase 3		
	test 1	test 2	test 3	test 1	test 2	test 3	test 1	test 2	test 3
Punta Sabbioni	-	-	ns	ns	+	+	ns	ns	+
Alberoni	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ca' Roman	ns	ns	+	ns	ns	-	ns	ns	ns

CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI

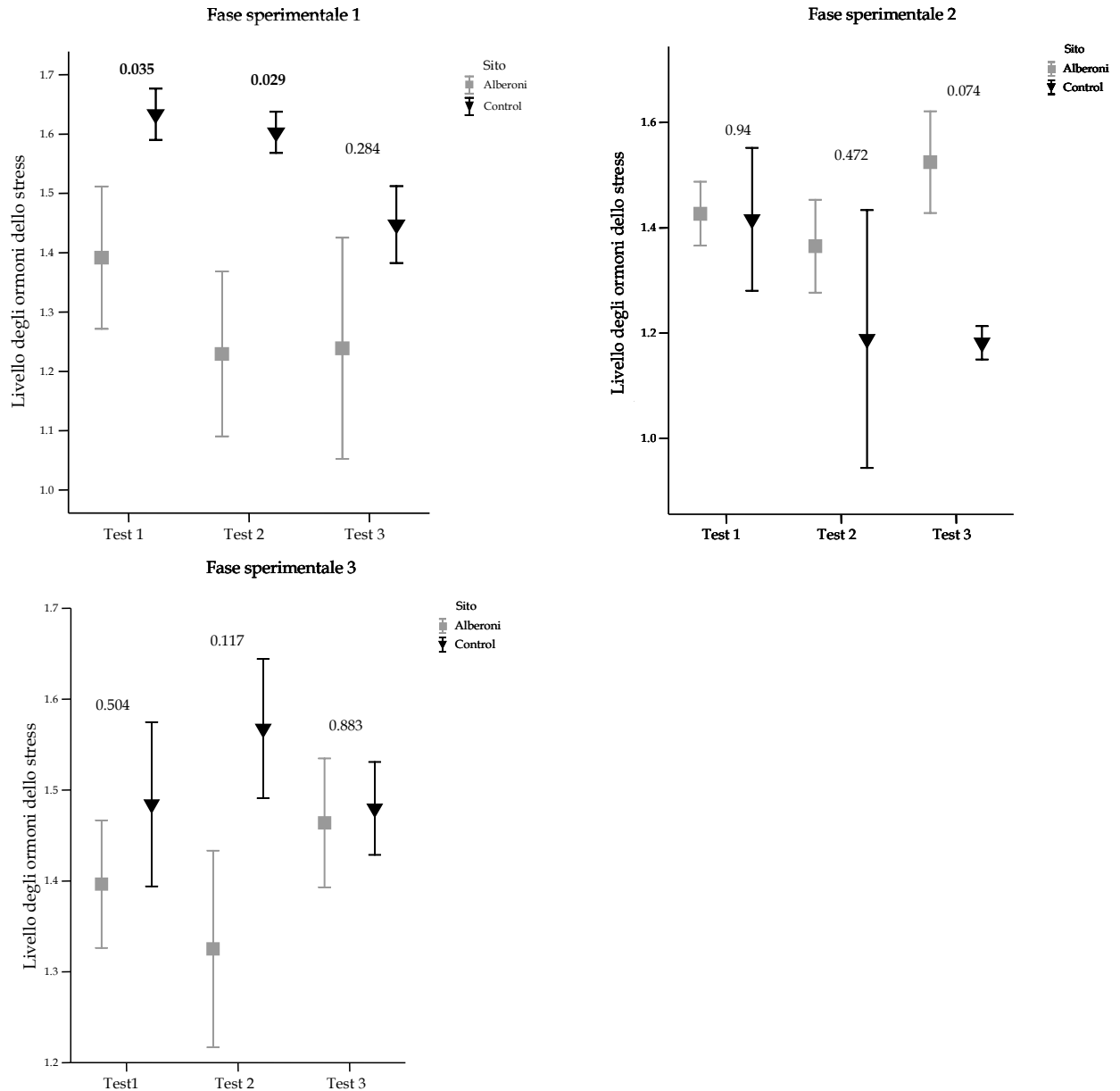


Figura 2. Differenze nei livelli di corticosteroidi tra Alberoni e il sito di controllo. A) Fase 1: gli individui nel sito di controllo hanno livelli ormonali significativamente più alti durante i primi due test; B) Fase 2: i livelli non sono significativamente differenti sebbene il valore del terzo test di Alberoni sia più alto rispetto al controllo; C) Fase 3: le differenze tra i valori registrati nei due siti non sono significative. I numeri dei grafici corrispondono ai valori di significatività, P.

6.2.2 Ca' Roman

Considerando il confronto del sito sperimentale Ca' Roman con il sito di controllo, il terzo campione della Fase 1 è risultato avere una concentrazione significativamente maggiore di ormoni dello stress ($F_{1,18}=8,52$, $P=0,035$). Durante la seconda fase i valori rilevati a Ca' Roman sono risultati uguali o inferiori, sebbene non significativamente, rispetto a quelli del sito di controllo ($F_{1,15}= 2,39$, $P= 0,144$). Osservando i dati con maggiore dettaglio si osserva che l'unico campione in cui i valori di Ca' Roman sono significativamente inferiori è il terzo ($F_{1,4}=3,790$, $P= 0,047$) (Figura 3-B). Durante la terza fase non si riscontrano differenze significative.

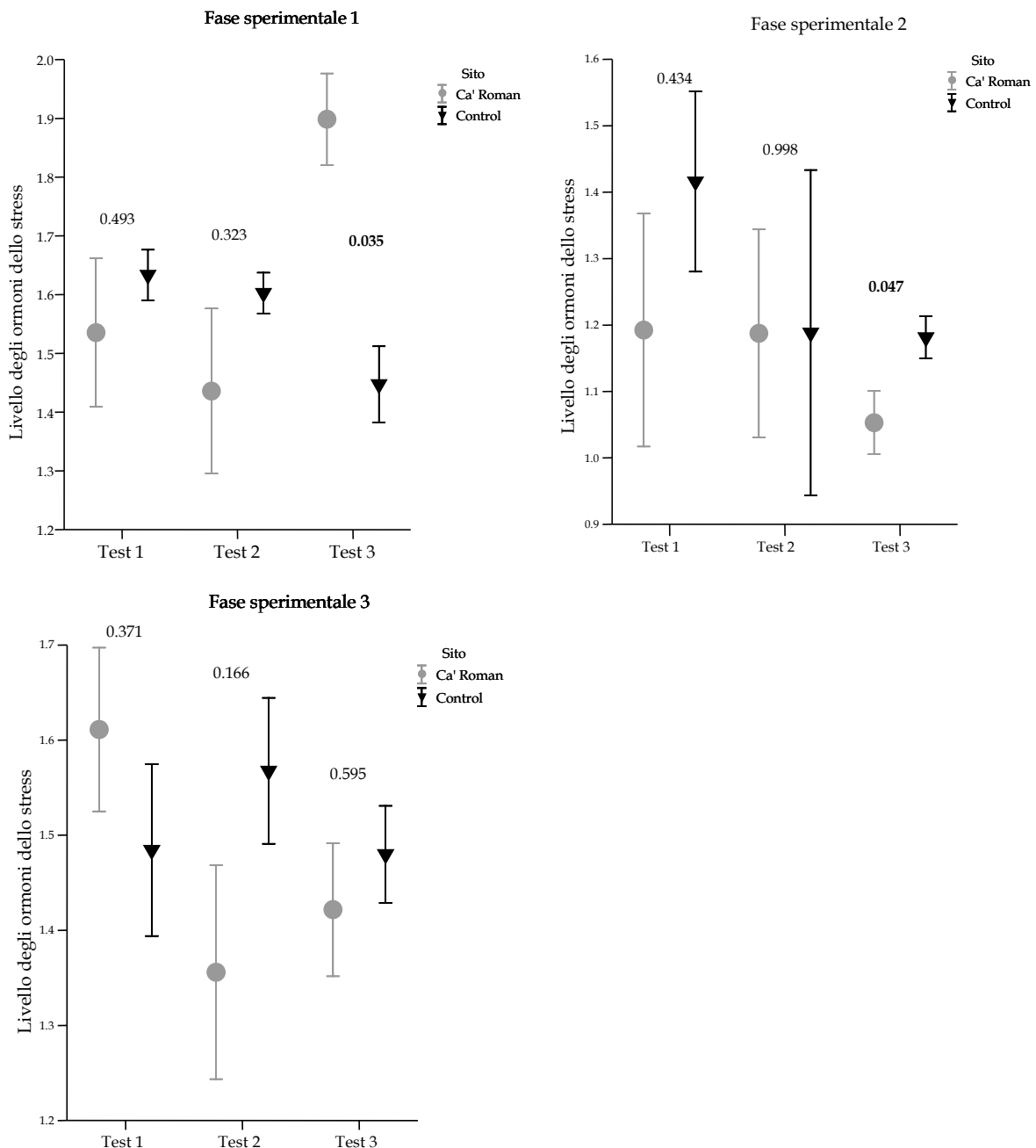


Figura 3. Differenze nei livelli di corticosteroidi tra Ca' Roman e il sito di controllo considerando i singoli test. A) Fase 1: nel terzo test i livelli ormonali sono significativamente più alti rispetto al controllo; B) Fase 2: il terzo test del controllo ha valori significativamente più alti; C) Fase 3: le differenze tra i valori registrati nei due siti non sono significative.
 I numeri dei grafici corrispondono ai valori di significatività, P.

6.2.3 Punta Sabbioni

Per quanto riguarda il confronto del sito sperimentale Punta Sabbioni con il sito di controllo, i primi due campioni della Fase 1 presso il controllo sono risultati avere una concentrazione significativamente maggiore di ormoni dello stress ($F_{1,6}=4,516$, $P=0,047$, $F_{1,6}=4,73$, $P=0,042$). Durante la seconda e la terza fase i valori rilevati a Punta Sabbioni sono risultati generalmente superiori rispetto a quelli rilevati presso il controllo. Nella fase 2 nel secondo e terzo campione i valori registrati a Punta Sabbioni sono significativamente superiori ($F_{1,3}=9,47$, $P=0,011$ e $F_{1,3}=180,03$, $P=0,009$), come nella Fase 3, dove il terzo campione ha valori significativamente superiori ($F_{1,3}=12,09$, $P=0,014$) rispetto a quelli del sito di controllo (Figura 4).

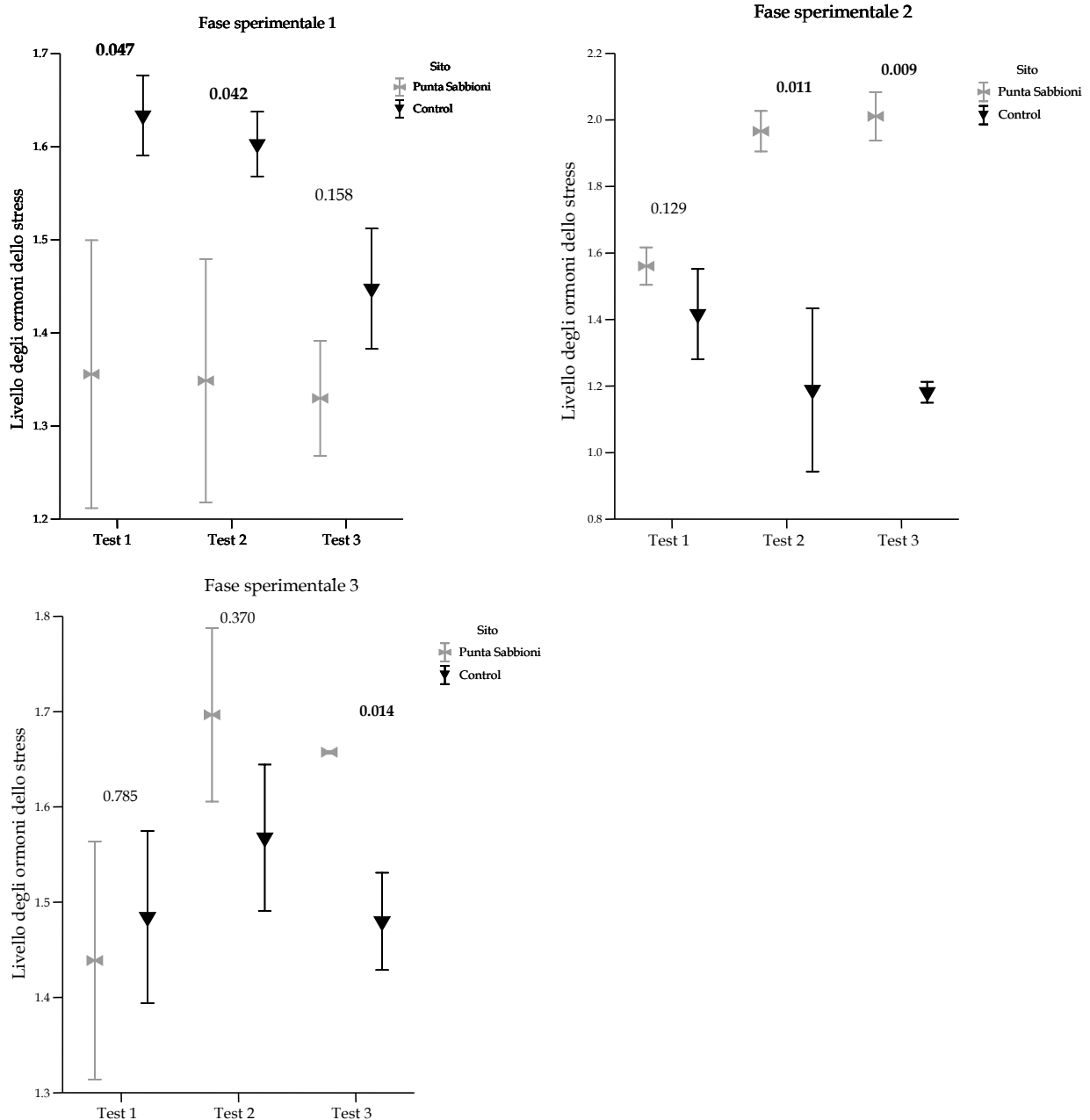


Figura 4. Differenze nei livelli di corticosteroidi tra Punta Sabbioni e il sito di controllo considerando i singoli campioni. A) Fase 1: nel primo e secondo test i livelli ormonali sono significativamente più alti nel controllo; B) Fase 2: nel secondo e terzo test i livelli ormonali sono significativamente più alti a Punta Sabbioni; C) Fase 3: nel terzo test i valori registrati a Punta Sabbioni sono significativamente più alti. I numeri dei grafici corrispondono ai valori di significatività, P.

7. DISCUSSIONE

Un primo punto importante da sottolineare è relativo alla qualità dei dati ottenuti; infatti nel modello sperimentale prescelto i livelli fecali di corticosteroidi sono stati rilevabili e consistenti attraverso le differenti localizzazioni e periodi, indipendentemente dalla composizione dei gruppi sperimentali, dimostrando la piena applicabilità della metodologia anche ai fini del monitoraggio ambientale.

Di cruciale importanza nella validazione dei dati raccolti è stato il risultato ottenuto nel sito di controllo della Celestia; qui i livelli di corticosteroidi rilevati durante le tre fasi in cui si è articolato il periodo di sperimentazione sono risultati del tutto omogenei dal punto di vista statistico, al di là di fluttuazioni stocastiche interfase (Figura 1). Ciò significa che la risposta dei soggetti sperimentali agli stimoli esterni presenti e rilevabili (sebbene non nulli) è rimasta costante, ovvero che non ci sono stati eventi tali da provocare fluttuazioni significative di tale risposta endocrina. Questo ha permesso di poter operare un corretto confronto con quanto rilevato nei tre siti sperimentali, nella presunzione che variazioni qui riscontrabili non potessero avere che un'origine esterna.

La lettura dei risultati comparativi, riportati nel complesso delle tre fasi in Tabella 1 ed in Tabella 2 per quanto attiene ai singoli test delle rispettive fasi, permette di vedere come tali livelli risultino spesso inferiori nei siti sperimentali rispetto a quanto accade per il controllo. Qui, come detto, si erano mantenute condizioni di "quiete ambientale" limitando al massimo il disturbo diretto umano (fornitura di cibo, ritiro dei campioni di feci), ma sussistevano tutti gli stimoli dell'ambiente urbano in generale.

Desumendo dai dati generali e specifici di letteratura che livelli più bassi di corticosteroidi corrispondano ad un minor stato di stress dei soggetti sperimentali, si può ammettere che nei siti di Ca' Roman e secondariamente di Alberoni, i verdoni abbiano vissuto situazioni ambientali tali da ingenerare in essi un minor stato di stress rispetto ai controlli (Tabella 1). Un momento in cui si è registrata una situazione inversa è rappresentato dal terzo campionamento della seconda fase ad Alberoni e dal terzo campionamento della prima fase a Ca' Roman, durante i quali vengono rilevati valori significativamente più elevati rispetto al controllo (Figure 2 e 3) ed anche alla media registrata nei siti durante la fase sperimentale stessa, fatto quest'ultimo di particolare rilievo (Figure 2 e 3 e Tabella 2).

Per quanto riguarda Punta Sabbioni, nella prima fase di test (giugno) tale sito sperimentale si è rivelato essere quello in cui venivano generati i livelli ormonali più bassi e quindi definibile come "il più tranquillo dei tre". Nei mesi di settembre e ottobre (Fasi 2 e 3), ad eccezione del primo campionamento, i valori dei livelli ormonali si sono invece rilevati più alti rispetto al controllo e generalmente più alti rispetto a quelli registrati nello stesso sito nel mese di giugno. In altri termini, questo sito registra un andamento dei livelli ormonali non omogeneo a livello di interperiodo e superiore in termini comparativi rispetto a quanto registrato per i controlli.

In linea con il ruolo di bioindicatore dei livelli di corticosteroidi, tali risultati permettono di affermare la possibilità che nei tre siti siano intervenuti eventi transitori tali da indurre disturbo negli animali in diversi momenti della sperimentazione; in particolare nei giorni antecedenti il 29 giugno a Ca' Roman, nei giorni tra il 20 e il 22 settembre ad Alberoni, nei giorni tra il 17 e il 22 settembre e tra il 13 e il 18 ottobre a Punta Sabbioni.

Nel primo caso (giugno a Ca' Roman) sappiamo con certezza che gli animali hanno ricevuto ripetuti attacchi da parte di predatori, in seguito ovviati con successo (dimostrato dai risultati delle successive campagne a Ca' Roman) col posizionamento delle protezioni esterne alle gabbie di stabulazione nelle fasi successive (Allegato 2). Tale fatto è assai indicativo perché

CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI

all'occorrere di tale "incidente metodologico", che deve aver fortemente stressato gli animali in osservazione, ha corrisposto un rilevabile aumento del tasso di ormoni.

Per quanto riguarda Alberoni e Punta Sabbioni non sono state rilevate tracce di predatori nell'area delle gabbie; si può quindi escludere questa come causa di disturbo. Nel caso di Alberoni il disturbo rilevato potrebbe essere la conseguenza dell'accumulo di stimoli nel lungo periodo (vista la tendenza ad aumentare dei livelli di corticosterone), ma tale eventualità non appare al momento consistentemente supportata dai risultati. È quindi ipotizzabile la presenza di eventi di disturbo, assenti nel mese di giugno, che siano successivamente intervenuti provocando modificazioni leggibili dei livelli ormonali.

È noto che alcune variazioni nelle concentrazioni degli ormoni dello stress possono essere influenzate dalle variabili ambientali, come la temperatura, il periodo dell'estro o il tipo di cibo [Touma and Palme, 2005]. Tuttavia tali effetti esterni appaiono del tutto trascurabili nel caso presente per precise ragioni:

- 1) gli esperimenti sono avvenuti fuori dalla stagione riproduttiva lasciando quindi escludere possibili perturbazioni indotte dal periodo di estro;
- 2) agli uccelli è stato fornito lo stesso cibo *ab libitum* permettendo di escludere anche questo elemento dai possibili turbatori;
- 3) la temperatura, che può indurre differenze in condizioni di ipotermia [Goymann, Trappschuh *et al.*, 2006], è un fattore pure trascurabile grazie alla pianificazione degli esperimenti in periodi in cui le temperature sono elevate, ma non tanto da provocare un disturbo per gli animali.

Ricordiamo inoltre che gli esperimenti si sono svolti contemporaneamente nei tre siti quindi, ad eccezione di trascurabili differenze, in condizioni climatiche assolutamente uguali. Comunque se questi fattori avessero avuto effetti sui risultati ottenuti, ciò sarebbe emerso nei risultati del GLM. Sono così da escludere fonti di variazione dei livelli ormonali imputabili a fattori ambientali quali la temperatura, il modo di mantenimento dei soggetti o dipendenti dal loro ciclo vitale annuale.

In conclusione si può affermare che la misurazione dei metaboliti fecali di cortisolo risulta essere un metodo adatto per il monitoraggio dell'attività surrenale e di conseguenza degli effetti del disturbo esterno nei soggetti sperimentali qui impiegati.

I livelli di cortisolo fecale si sono mantenuti per lunghi periodi inferiori nei siti sperimentali rispetto al controllo. Questo permette di affermare come le condizioni generali di disturbo che i verdoni hanno sperimentato nei siti di cantiere non siano spesso superiori a quelle sperimentate dai soggetti mantenuti nel sito urbano di controllo. Un tale elemento empirico può essere di conseguenza indice del fatto che in aree urbane gli uccelli sperimentino condizioni di stress superiore a quelle di ambienti rurali.

Nei siti sperimentali, a parte causalità dirette di stress come l'esposizione a predatori od a altri fattori di disturbo transitorio, non paiono sussistere, in linea con i risultati qui ottenuti, situazioni croniche di stress nei soggetti testati.

8. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

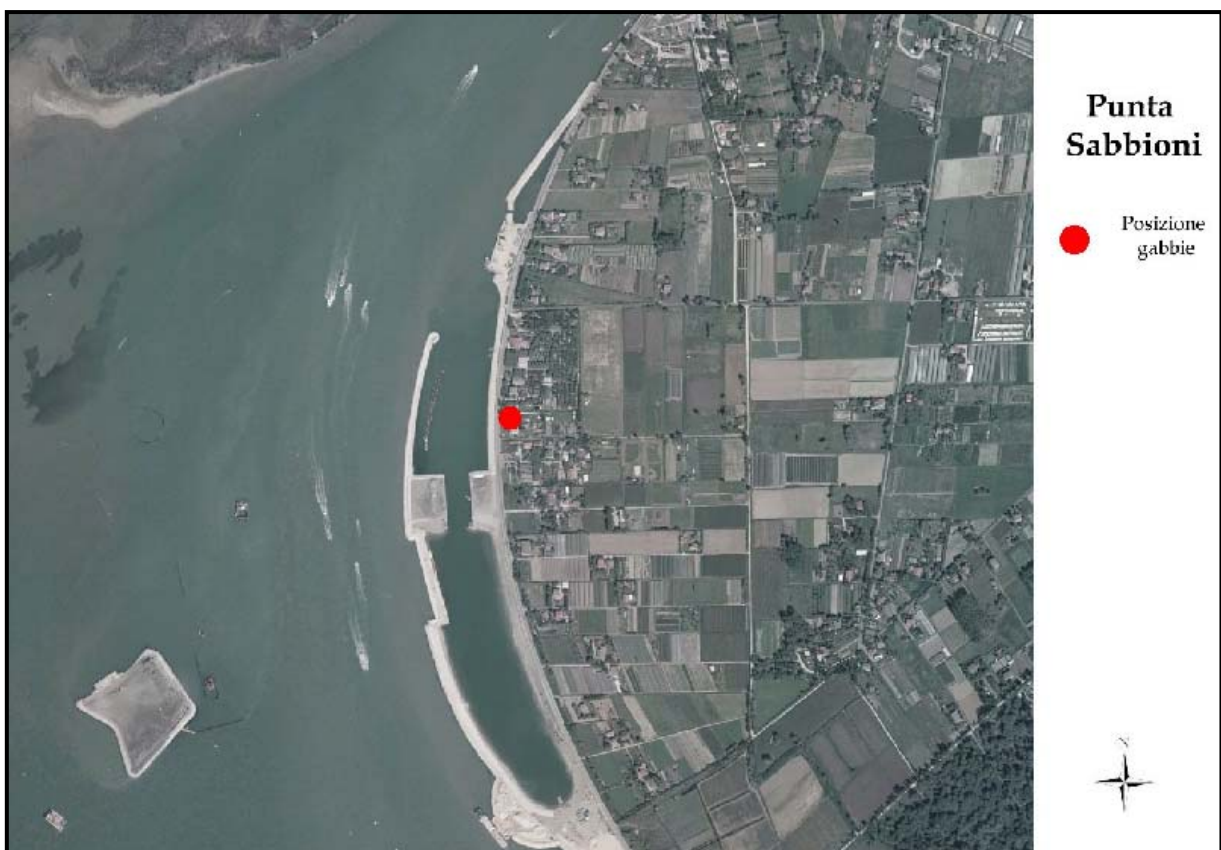
- Baltic, M., S. Jenni-Eiermann, et al. (2005). A noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the black grouse. *Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration*. **1046**: 81-95.
- Carney, K. M. and W. J. Sydeman (1999). "A review of human disturbance effects on nesting colonial waterbirds." *Waterbirds* **22**(1): 68-79.
- Dehnhard, M., A. Schreer, et al. (2003). "Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*)." *General and Comparative Endocrinology* **131**(3): 345-352.
- Fowler, G. S. (1999). "Behavioral and hormonal responses of Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) to tourist and nest visitation." *Biological Conservation* **90**: 143-149.
- Fraisse, F. and J. F. Cockrem (2006). "Corticosterone and fear behaviour in white and brown caged laying hens." *British Poultry Science* **47**(2): 110-119.
- Gill, J. A., K. Norris, et al. (2001). "Why behavioural responses may not reflect the population consequences of human disturbance?" *Biological Conservation* **97**: 265-268.
- Goymann, W., E. Mostl, et al. (1999). "Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*." *General and Comparative Endocrinology* **114**(3): 340-348.
- Goymann, W., M. Trappschuh, et al. (2006). "Low ambient temperature increases food intake and dropping production, leading to incorrect estimates of hormone metabolite concentrations in European stonechats." *Hormones and Behavior* **49**(5): 644-653.
- Harvey, S., J. G. Phillips, et al. (1984). "Stress and adrenal function." *Journal of Experimental Zoology* **232**: 633-645.
- Hirschenhauser, K., K. Kotrschal, et al. (2005). Synthesis of measuring steroid metabolites in goose feces. *Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration*. **1046**: 138-153.
- Huber, S., R. Palme, et al. (2003). "Non-invasive monitoring of the adrenocortical response in red deer." *Journal of Wildlife Management* **67**(2): 258-266.
- Jurke, M. H., N. M. Czekala, et al. (1997). "Fecal corticoid metabolite measurement in the cheetah (*Acinonyx jubatus*)." *Zoo Biology* **16**(2): 133-147.
- Lane, J. (2006). "Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals?" *Animal Welfare* **15**(4): 331-342.
- Lucas, J. R., T. M. Freeberg, et al. (2006). "Fecal corticosterone, body mass, and caching rates of Carolina chickadees (*Poecile carolinensis*) from disturbed and undisturbed sites." *Hormones and Behavior* **49**(5): 634-643.
- Monclus, R., H. G. Rodel, et al. (2006). "Non-invasive measurement of the physiological stress response of wild rabbits to the odour of a predator." *Chemoecology* **16**(1): 25-29.
- Monfort, S. L., C. C. Schwartz, et al. (1993). "Monitoring reproduction in moose using urinary and fecal steroid metabolites." *Journal of Wildlife Management* **57**: 400-407.

CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI

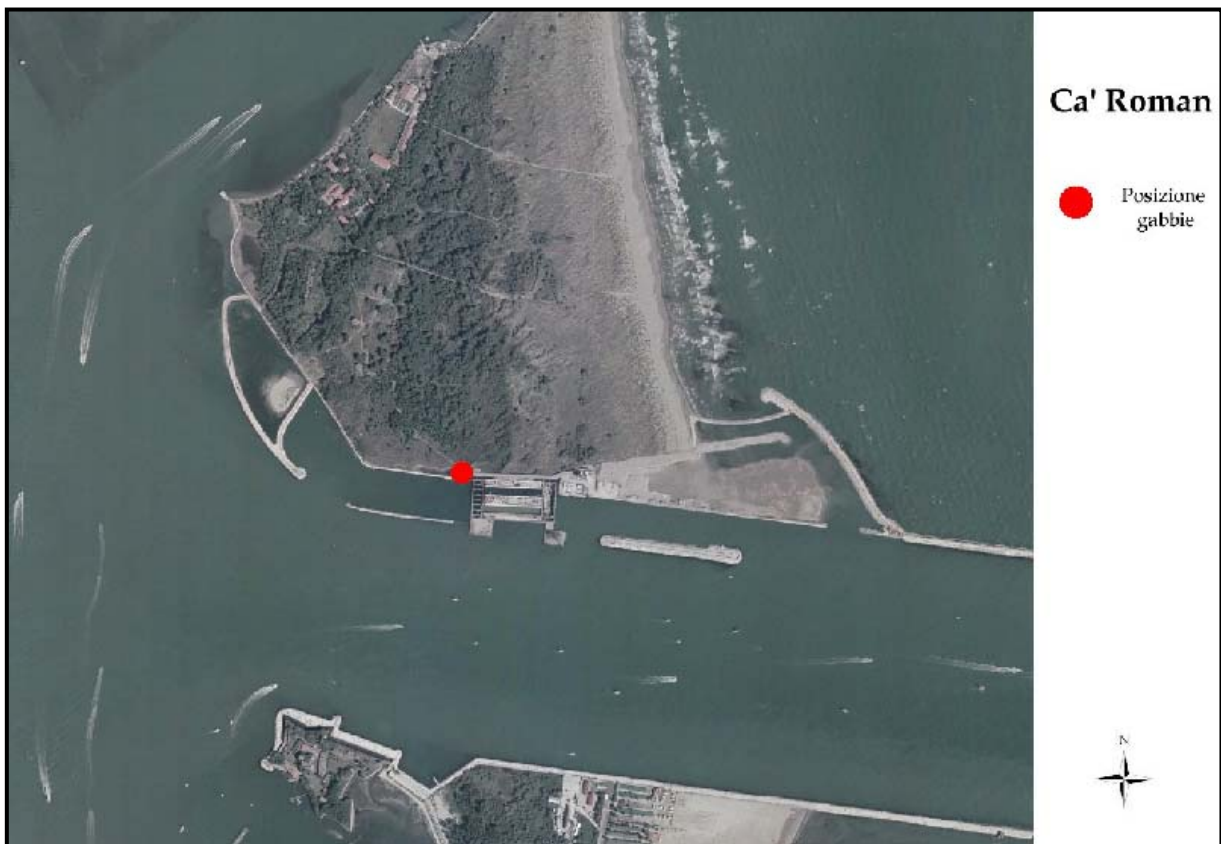
- Mostl, E. and R. Palme (2002). "Hormones as indicators of stress." Domestic Animal Endocrinology **23**(1-2): 67-74.
- Mullner, A., K. E. Linsenmair, et al. (2004). "Exposure to ecotourism reduces survival and affects stress response in hoatzin chicks (*Opisthocomus hoazin*)." Biological Conservation **118**(4): 549-558.
- O'Dwyer, T. W., W. A. Buttemer, et al. (2006). "Investigator disturbance does not influence chick growth or survivorship in the threatened Gould's Petrel *Pterodroma leucoptera*." Ibis **148**(2): 368-372.
- Partecke, J., I. Schwabl, et al. (2006). "Stress and the city: Urbanization and its effects on the stress physiology in European Blackbirds." Ecology **87**(8): 1945-1952.
- Romero, L. M. and R. C. Romero (2002). "Corticosterone responses in wild birds: The importance of rapid initial sampling." Condor **104**(1): 129-135.
- Saffer, V. M., J. S. Bradley, et al. (2000). "The effect of human activity on the growth rates of short-tailed shearwater *Puffinus tenuirostris* chicks." Emu **100**: 49-53.
- Sauerwein, H., U. Muller, et al. (2004). "Establishing baseline values of parameters potentially indicative of chronic stress in red deer (*Cervus elaphus*) from different habitats in western Germany." European Journal of Wildlife Research **50**(4): 168-172.
- Schutz, K. E., E. Agren, et al. (2006). "Behavioral and physiological responses of trap-induced stress in European badgers." Journal of Wildlife Management **70**(3): 884-891.
- Schwartz, J. R., T. S. Gross, et al. (1992). "Fecal corticosterone: Non invasive stress monitoring." Poultry Science **71**: 255.
- Silverin, B. (1998). "Behavioural and hormonal responses of the pied flycatcher to environmental stressors." Animal Behaviour **55**: 1411-1420.
- Staley, A. M., J. M. Blanco, et al. (2007). "Fecal steroid monitoring for assessing gonadal and adrenal activity in the golden eagle and peregrine falcon." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **177**(6): 609-622.
- Touma, C. and R. Palme (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration*. **1046**: 54-74.
- Wallner, B., E. Mostl, et al. (1999). "Fecal glucocorticoids document stress in female Barbary macaques (*Macaca sylvanus*)." General and Comparative Endocrinology **113**(1): 80-86.
- Wasser, S. K., K. Bevis, et al. (1997). "Noninvasive physiologic measures of disturbance in the Northern spotted owl." Conservation Biology **11**(4): 1019-1022.
- Wasser, S. K. and K. E. Hunt (2005). "Noninvasive Measures of Reproductive Function and Disturbance in the Barred Owl, Great Horned Owl, and Northern Spotted Owl." Annals of the New York Academy of Sciences **1046**(1): 109-137.

CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCCHE LAGUNARI

ALLEGATI



CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI



Allegato 1 Posizionamento delle gabbie (pallino rosso) rispettivamente presso il sito di controllo de i tre siti sperimentali di Punta Sabbioni, Alberoni e Ca' Roman. Foto volo MAV ottobre 2006.

CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI



CORILA
ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCCHE LAGUNARI



Allegato 2 Gabbie in posa presso i tre siti sperimentali. A: posizione delle gabbie a Punta Sabbioni presso il Circolo SO.CI.VE.; B: posizione delle gabbie ad Alberoni, dietro un container e rivolte verso gli alberi della confinante area SIC; C: posizione delle gabbie a Ca' Roman dietro un container al margine estremo del cantiere; D: gabbie montate con rete di protezione presso Ca' Roman.

CORILA
 ATTIVITÀ DI RILEVAMENTO PER IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI PRODOTTI DALLA
 COSTRUZIONE DELLE OPERE ALLE BOCHE LAGUNARI

Allegato 3 - Nella tabella sono riportati i livelli ormonali come risultati dei test effettuati nei tre siti sperimentali e nel sito di controllo nelle tre fasi sperimentali (tre test per Fase). I valori riportati sono i livelli ormonali registrati (ng/g) \pm l'errore standard (non trasformati logaritmicamente).

Sito/ Test	Fase 1			Fase 2			Fase 3		
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3
Controllo	43.6 \pm 4.0	27.3 \pm 8.3	32.3 \pm 5.4	40.4 \pm 3.4	17.9 \pm 9.1	38.6 \pm 6.5	28.8 \pm 3.7	15.2 \pm 1.1	30.4 \pm 3.5
Punta Sabbioni	25.4 \pm 8.8	36.6 \pm 4.7	28.6 \pm 8.0	24.6 \pm 8.0	93.3 \pm 13.0	50.8 \pm 10.5	21.7 \pm 3.0	104.0 \pm 17.3	45.4 \pm 0.15
Alberoni	26.7 \pm 7.7	27.2 \pm 3.5	25.5 \pm 3.7	18.9 \pm 6.5	24.2 \pm 5.2	22.5 \pm 6.0	20.1 \pm 6.4	35.1 \pm 7.5	29.8 \pm 4.4
Ca' Roman	37.4 \pm 11.3	17.9 \pm 5.6	42.4 \pm 8.3	30.5 \pm 10.7	17.7 \pm 7.0	24.1 \pm 5.6	81.8 \pm 15.0	11.4 \pm 1.1	27.1 \pm 4.5