# Corso di Laurea in Scienze Ambientali

anno accademico 2012-2013

# BIOCHIMICA E FISIOLOGIA, STATO TROFICO E CONTAMINAZIONE DA METALLI NELLA VONGOLA FILIPPINA E NELL'AMBIENTE DEL BACINO CENTRALE DELLA LAGUNA DI VENEZIA


**Laureando: Andrea Sfriso**

**Matricola: 816877**

**Relatore: Prof. Emanuele Argese**

## Indice


**Abstract** ..... 3

**1. Introduzione** ..... 4

**2. Materiali e metodi** ..... 9

**2.1. Campionamento** ..... 9

**2.2. Parametri biochimici nel biota** ..... 12

***2.2.1. Carboidrati totali*** ..... 12

***2.2.2. Proteine totali*** ..... 12

***2.2.3. Lipidi Totali*** ..... 13

***2.2.4. Ceneri*** ..... 13

***2.2.5. Alcali-lable phosphate (Fosforo alcalino-labile)*** ..... 14

**2.3. Test in vivo sulle vongole** ..... 15

***2.3.1. Test del riaffossamento*** ..... 15

***2.3.2. Test di sopravvivenza all'aria*** ..... 15

***2.3.3. Indice di condizione*** ..... 16

***2.3.4. Rapporto femmine mature/totale*** ..... 16

**2.4. Metalli totali: estrazione ed analisi** ..... 17

**2.5. Parametri Ambientali** ..... 19

***2.5.1. Clorofilla-a e feopigmenti*** ..... 19

***2.5.2. Nutrienti nelle acque*** ..... 20

***2.5.3. Fosforo totale ed inorganico nel sedimento*** ..... 21

***2.5.4. Clorinità*** ..... 21

***2.5.5. Granulometria e densità*** ..... 22

***2.5.6. Particolato*** ..... 23

**2.6. Analisi Statistica** ..... 24

**3. Risultati** ..... 25

**3.1. Biomasse, densità e fisiologia** ..... 25

**3.2. Test in vivo** ..... 31

**3.3. Parametri biochimici** ..... 33

**3.4. Parametri ambientali** ..... 35

**3.5. Metalli nel sedimento e nelle vongole** ..... 42

**3.6. Analisi Statistica** ..... 53
*3.6.1. Analisi delle correlazioni* ..... 53
**3.6.1.1. Parametri dell'acqua** ..... 53
**3.6.1.2. Parametri del sedimento** ..... 53
**3.6.1.3. Test in vivo** ..... 54
**3.6.1.4. Parametri biochimici e fisiologici** ..... 54
**3.6.1.5. Metalli nelle vongole** ..... 55
**3.6.1.6. Metalli nel sedimento** ..... 55
*3.6.2. Analisi delle componenti principali* ..... 56
**4.1. Raffronto con i dati di letteratura** ..... 60
*4.1.1. Parametri dell'acqua e del sedimento* ..... 60
*4.1.2. Test in vivo* ..... 60
*4.1.3. Parametri biochimici e fisiologici* ..... 61
*4.1.4. Metalli nel sedimento e nelle vongole* ..... 62
**4.2. Stato complessivo delle stazioni** ..... 64
**5. Conclusioni** ..... 72

# Abstract

Un'indagine multiparametrica per la valutazione dello stato di sedimenti, acque e vongole (*Ruditapes philippinarum*, Adams and Reeve), per l'individuazione di fattori di stress per l'ambiente e il biota e per chiarire le complesse relazioni che si instaurano tra questi bivalvi filtratori e il loro ambiente oltre che la produttività delle aree indagate.
Lo studio valuta lo stato trofico della colonna d'acqua e dei sedimenti in due diverse stagionalità in quattro stazioni del bacino centrale della Laguna di Venezia, la contaminazione da metalli nei sedimenti e nelle vongole e lo stato fisiologico dei bivalvi attraverso la determinazione dei rapporti biochimici di proteine, carboidrati e lipidi totali e delle risposte ai test di sopravvivenza all'aria e di riaffossamento.

A multiparametric research for the evaluation of the state of sediment, water and Manila clam (Ruditapes philippinarum, Adams and Reeve), to evaluate the stress factors that influence environment and animals, to clear the complex relations between clams and environment. In addition clam density and sizes were recorded.
The study evaluates the trophic state of water and sediment in four stations of the central basin of the Venice Lagoon in April and July. The most common metal contamination was determined in sediments and clams. Their physiological state was determined as protein, carbohydrate and lipid biochemical ratios and by means of the air survival and reborrowing tests.

# 1. Introduzione

La Laguna di Venezia è tra gli ambienti di transizione più studiati al mondo, un ambiente eterogeneo e complesso, con un importante ruolo storico, economico ed ecologico. Questo bacino ha subito storicamente numerose modifiche e trasformazioni ad opera dell'uomo, già dai tempi della Repubblica Serenissima con le opere di deviazione dei fiumi tributari (Brenta, Piave e Sile) e di consolidamento dei lidi, con la reclamazione di aree agricole e il confinamento delle valli da pesca sino all'industrializzazione, alla costruzione di Porto Marghera e all'escavazione dei canali Malamocco-Marghera (Canale dei Petroli) e Vittorio Emanuele II nel secolo scorso. L'area industriale di Porto Marghera estesa su una superficie di circa 2000 ha, suddivisa in tre aree, includeva tra i suoi processi: la distillazione del carbone; la produzione di acido solforico, alluminio, fertilizzanti fosfati, pesticidi e prodotti del legno; la costruzione di attrezzature meccaniche e navi e la raffinazione e lo stoccaggio degli oli minerali, il cui ruolo è aumentato con la costruzione dell'area del petrolchimico e la produzione di derivati del petrolio, fertilizzanti e prodotti chimici. L'area industriale dall'inizio del suo sviluppo negli anni '20, ha sfruttato le acque sotterranee e scaricato inquinanti, nutrienti (fosforo e composti azotati) e acque riscaldate che hanno influenzato e spesso compromesso la qualità ambientale. Il centro storico e le aree di Mestre, Marghera e del Miranese, dotati di un sistema fognario incompleto, contribuivano con lo scarico delle acque reflue nei canali (il carico globale di nutrienti era di circa 8200 t/anno per l' azoto e di circa 1100 t/anno per il fosforo, Marcomini *et al.*, 1995).

Le alterazioni chimico-fisiche di acque e sedimenti nel bacino centrale hanno portato alla progressiva sostituzione delle popolazioni bentoniche tipiche degli ambienti incontaminati con specie algali tionitrofile opportuniste, facendo arretrare le praterie di fanerogame (Marcomini *et al.*, 1995). Negli anni '70 e '80, in seguito allo sviluppo di frequenti fenomeni iperdistrofici, caratterizzati da una crescita abnorme di Ulvaceae e Gracilariaceae (5-20 kg fw/mq per decine di $km^2$ con una produzione lorda di ca. 18 milioni di tonnellate), sono seguite la degradazione di biomassa e l'instaurarsi di condizioni anossiche, che hanno

profondamente trasformato l'ambiente lagunare alterando i cicli dei nutrienti e riducendo la biodiversità (Facca *et al.*, 2011). Contemporaneamente le concentrazioni medie annuali di azoto e fosforo nei sedimenti superficiali sono aumentate rispettivamente di 2,4 e 30 volte (Giordani-Soika & Perin, 1974; Perin, 1975), a causa soprattutto delle macroalghe che durante la degradazione trasferivano gran parte dei nutrienti assimilati dalla colonna d'acqua con bruschi incrementi estivi (Sfriso *et al.*, 1988). Queste ampie produzioni primaverili interrotte da lunghi periodi di decomposizione algale ed anossia provocarono estese morie della macrofauna bentonica ed ittica stanziale e l'incremento di specie anaerobiche: come il dittero *Chironomus salinarius* Kieffer e il bivalve *Scapharca inaequivalvis* Bruguière, tra le uniche specie in grado di sopravvivere in condizioni ipo-anossiche. Negli anni '80 gli intensi sfarfallamenti dei chironomidi hanno fermato treni ed aerei, creando un enorme disagio alla popolazione veneziana, mentre l'iperproduzione di *Scapharca* rompeva le reti dei pescatori. Questi fenomeni si sono interrotti dopo il declino della biomassa macroalgale e la quasi completa scomparsa dei fenomeni anossici avvenuti dall'inizio degli anni '90, anche a causa dei cambiamenti climatici: con la scomparsa delle stagioni intermedie e delle fioriture di macroalghe.

Quest'anno in luglio si è sviluppata un'anossia di ca. 10.000 t di macroalghe nell'area di Campalto e San Giuliano, i cui effetti si sono manifestati anche nel centro storico di Venezia con la moria di pesci e crostacei, lo sviluppo di esalazioni maleodoranti ($H_2S$ e composti solforati ridotti) e la ricomparsa dei Chironomidi, anche se con densità trascurabili rispetto al passato.

Negli anni '90, un complesso di concause fra cui: cambiamenti climatici; l'aumento della risospensione dei sedimenti, dovuto alla riduzione della biomassa algale; l'incremento del pascolo degli invertebrati erbivori, per la riduzione e scomparsa delle anossie; la raccolta delle macroalghe da parte degli enti pubblici e la progressiva diminuzione degli sversamenti di nutrienti in laguna, sia dall'area industriale che dall'entroterra (a seguito della costruzione degli impianti di trattamento delle acque di Fusina e Campalto), hanno portato a una progressiva riduzione dei nutrienti in laguna (Marcomini *et al.*, 1995; Sfriso & Marcomini, 1996). La concentrazione di ammoniaca, che negli anni '60 nei

canali industriali aveva raggiunto 3800 µM, si aggira oggigiorno attorno a 10-20 µM (Cossu & de Fraja Frangipane, 1985) mentre il fosforo reattivo si è così ridotto da divenire fortemente limitante (Facca *et al.*, 2011; Sfriso *et al.*, 2012). L'applicazione del decreto Ronchi-Costa (DM del 23 aprile 1998) ha notevolmente contribuito alla riduzione dell'apporto di nutrienti e sostanze tossiche in laguna (con una riduzione dell'azoto a circa 1000 t/anno e del fosforo a 380 t/anno nel 1999).

Dopo la riduzione della biomassa delle macroalghe avvenuta durante i primi anni '90, i fondali lagunari sono stati colonizzati dalla vongola filippina *Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, una specie alloctona introdotta con scopi commerciali nel 1983 (Cesari & Pellizzato, 1985), che ha soppiantato la vongola verace locale *Ruditapes decussatus* Linnaeus. Questa nuova specie ha svolto un ruolo fondamentale sull'evoluzione della Laguna di Venezia in quest'ultimo ventennio: una risorsa ittica preziosa ad ampia diffusione, resistente e a rapido accrescimento, che ha colonizzato velocemente gli ambienti di transizione dell'alto Adriatico, la cui pesca per mezzo di rasche meccaniche ed idrauliche ha modificato la tessitura dei sedimenti aumentandone la risospensione, cambiandone la granulometria e i popolamenti fitobentonici (Sfriso *et al.*, 2005b; Facca *et al.*, 2011). La pesca delle vongole ha inoltre contribuito a ridurre le concentrazioni di nutrienti e di inquinanti nei primi centimetri di sedimento, disperdendoli in tutta la laguna ed in mare, e ad aumentare le concentrazioni di particolato sospeso nella colonna d'acqua. Nei primi 5 cm di sedimento nelle aree di Sacca Sessola e San Giuliano nel '98-'99 si è avuto un decremento medio da 1,29 e 2,79 mg $g^{-1}$ a 0,69 e 1,47 mg $g^{-1}$ per l'azoto e da 401 e 626 µg $g^{-1}$ a 360 e 455 µg $g^{-1}$ per il fosforo (Sfriso *et al.*, 2005a).

Contemporaneamente la quantità di pescato di vongole che nella laguna veneta ha evidenziato un trend crescente a partire dalla fine degli anni '80, culminando in ca. 40000 t annue tra il 1995 e il 2000, ha iniziato a diminuire. Tra il 2002 e il 2007 il pescato si è attestato a valori compresi tra 16000 t e 27000 t per diminuire repentinamente a poco più di 2000t nel 2012 (*www.venetoagricoltura.org*).

Già dal '95 il Magistrato alle Acque di Venezia aveva autorizzato l'utilizzo di spazi lagunari complessivi di 275 ha da adibire all'allevamento di molluschi eduli. Questi più volte rivisti e ridefiniti giungono a 3221 ha nel 2007 affidati al G.R.A.L. (Gestione delle Risorse Alieutiche Lagunari), di cui solo circa 2000 si sono rivelati validi dal punto di vista produttivo (Torricelli *et al.,* 2009). Questo importante tentativo di conversione della raccolta di vongole in libero accesso (spesso abusiva) a prodotto di allevamento non si è mai affermato completamente poiché soffre dello stringente problema della provvigione del seme di vongola da destinarsi alla crescita. Il seme impiegato è prevalentemente seme selvatico (15-25mm) raccolto con rasche nelle aree limitate dove il seme è ancora presente: tra queste l'area del Verto Nord e quella del Verto Sud, studiate nella presente indagine e recentemente concesse dal G.R.A.L. per la raccolta del seme avvenuta a cavallo tra la campagna di campionamento di aprile e quella di luglio.

Al fine di valutare lo stato di salute della vongola filippina nel bacino centrale della Laguna di Venezia è stato sviluppato questo studio multi-parametrico, sondando lo stato fisico-chimico dei sedimenti e delle acque, determinando la biomassa di fitoplancton e lo stato fisiologico della vongola filippina in quattro aree adiacenti al porto industriale di Marghera, notoriamente riconosciute come le più produttive, oltre che le uniche in cui le vongole potessero essere agevolmente raccolte in quantità tali da permetterne lo studio. Nelle acque sono stati misurati i principali nutrienti responsabili della crescita del plancton e delle macroalghe, il pH, l'Eh, la salinità, la temperatura, la clorofilla-*a* e il particolato; nel sedimento invece sono stati misurati la granulometria, la densità, il fosforo e i principali metalli. Lo stato di salute della vongola è stato studiato sotto differenti aspetti, sono stati misurati:

**a)** la densità degli individui (le tre principali specie di bivalvi rinvenute e conteggiate: *Ruditapes philippinarum, Cerastoderma glaucum* Bruguière & Poiret e *Musculista senhousia* Benson in Cantor, per cercare indizi sulle relazioni tra la vongola e altri bivalvi filtratori fossori);

**b)** le tre dimensioni (lunghezza, altezza, spessore) e il peso;

**c)** l'indice di condizione;

**d)** il tempo di riaffossamento e quello di sopravvivenza all'aria per valutare le condizioni di stress del biota;

**e)** la percentuale di femmine mature sul totale;

**f)** i rapporti biochimici e l'Alkali-lable phosphate, per rilevare potenzialmente la presenza di agenti estrogenici;

**g)** correlazioni o alterazioni dei parametri legati alla riproduzione;

**h)** la concentrazione dei metalli nei tessuti molli delle vongole per monitorare l'influenza di eventuali contaminati inorganici sugli organismi oggetto di studio.

# 2. Materiali e metodi

## 2.1. Campionamento

Il campionamento di sedimenti, acque e biota si è svolto in quattro stazioni del bacino centrale della Laguna di Venezia, adiacenti a Fusina e al Porto industriale di Marghera. La scelta delle stazioni è giustificata dall'accessibilità e dalla presenza della vongola *Ruditapes philippinarum* oggetto di indagine, la cui disponibilità nel bacino centrale si è drasticamente ridotta rendendone altrimenti difficoltosa e notevolmente impegnativa la raccolta.

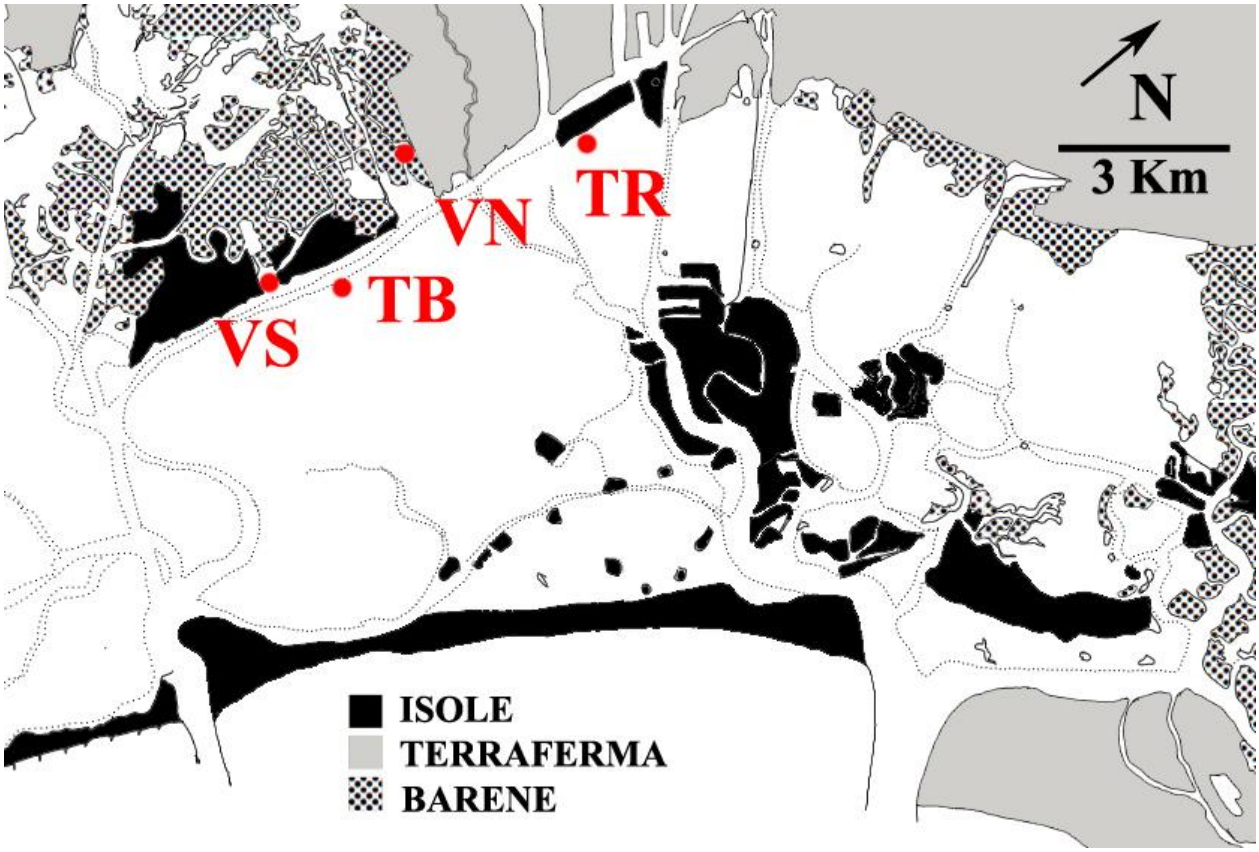



***Fig. 1:*** ***Mappa del bacino centrale della laguna di Venezia con dettaglio delle stazioni di campionamento.***

Il campionamento è stato effettuato in due diverse stagionalità: in aprile e a luglio, rispettivamente al termine del periodo invernale (temperatura media 20°C) e nel pieno dell'estate (temperatura media 29°C). La caratterizzazione di un ambiente di transizione ad alta variabilità stagionale non può che prevedere

almeno due fasi di campionamento, per escludere fenomeni temporanei di disturbo o condizioni di stress dovute al ciclo riproduttivo o alla dieta, oltre che per meglio descrivere lo stato trofico in tempi diversi delle aree di studio e le caratteristiche biochimiche delle vongole nelle due diverse stagioni.

*Aree di studio:*

*Le quattro stazioni scelte sono rispettivamente:* ***Torretta bianca (TB)*** *(45° 23' 35.6"N, 12° 15' 49.3"E) di fronte alle Casse di Colmata lato est della diga di sbarramento che delimita il margine del "Canale dei Petroli"; le* ***Tresse (TR)*** *(45° 26' 09.2"N, 12° 16' 12.2"E) davanti al porto industriale di Marghera, l'isola dove vengono smaltiti i fanghi inquinati di Venezia, recentemente ampliata; il* ***Verto Nord (VN)*** *(45° 24' 37.3" N, 12° 15' 01.8" E) e il* ***Verto Sud (VS)*** *(42° 22' 59.4" N, 12° 15' 09.6" E), che fiancheggiano le Casse di Colmata adiacenti a Fusina, nei quali è stata aperta la campagna di raccolta del seme di vongola filippina nel mese di aprile* **(Fig. 1)**.

*Raccolta vongole:*

*La raccolta delle vongole è stata effettuata manualmente nelle 4 stazioni sino al raggiungimento del chilo e mezzo di peso. Parte di queste sono state campionate tre volte con un quadrato 50x50 cm di lato, corrispondente a ¼ di mq, per la stima della densità e delle classi dimensionali della popolazione locale: larghezza, altezza, spessore (mm) e peso (g)* (Penzo & Pellizzato, 2005). *Dal "pool" globale, per ogni stazione, il giorno stesso del campionamento, 25 + 25 vongole "adulte" sono state prelevate per effettuare i due test in vivo, il test di sopravvivenza all'aria e il test del riaffossamento, che la letteratura attesta debbano essere realizzati il prima possibile dalla raccolta (Moschino et al., 2011b; Phelps, 1989), mentre tutte le altre sono state lasciate a depurarsi per 48 ore. In seguito 25 vongole sono state analizzate per il calcolo dell'indice di condizione, le rimanenti sono state aperte, asciugate e sgusciate e a 25 di queste sono state sezionate le gonadi per l'identificazione della percentuale di femmine mature. Infine sono state raccolte in un barattolo di polietilene, congelate a -18°C, liofilizzate e macinate con mulino meccanico per tutte le successive analisi (FRITSCH Rotor Speed Mill pulverisette 14).*

*Raccolta sedimento:*

*Un carotatore manuale in plexiglass (Ø 10cm) è stato utilizzato per il campionamento dei primi 5 cm di sedimento: tre "pool" di tre carote, per*

*indagare la variabilità locale di ogni stazione, dalle quali, prima di essere omogeneizzate, sono stati prelevati i primi 3 mm superficiali, congelati e liofilizzati per l'analisi delle clorofille nel sedimento. Per ogni stazione i tre campioni sono stati trattati e analizzati separatamente e di ognuno sono stati misurati in campo pH ed Eh con pH-metro portatile (modello HD 8705, Delta HHM). Da ogni campione sono stati prelevati e congelati due sottocampioni: uno per la determinazione in laboratorio di densità e granulometria e uno per le analisi dei metalli totali e del fosforo totale ed inorganico. Quest'ultimo è stato liofilizzato e macinato/omogenizzato prima delle successive analisi. Nel campionamento di* luglio *è stato campionato un solo pool di tre carote per ogni stazione.*

*Raccolta acque:*

*In campo sono stati misurati: temperatura, pH ed Eh con pH-metro portatile (modello HD 8705, Delta HHM) mentre la saturazione di ossigeno è stata misurata con un ossimetro (modello Oxi 196 della Wissenschaftlich–Technische Werkstatten GmbH). Campioni d'acqua sono stati raccolti e congelati per la determinazione della salinità e per la quantificazione dei nutrienti: per i quali l'acqua è stata filtrata con filtri Whatman GF/F (porosità: 0.7 µm) in fibra di vetro, conservati a -18°C per l'analisi della clorofilla nelle acque. Per la quantificazione del particolato sospeso sono stati usati filtri in nitrocellulosa della Millipore (porosità: 0.45 µm) seccati a 130 °C per un 'ora e pesati in bilancia analitica. Dopo filtrazione questi sono stati lavati con acqua bidistillata, liofilizzati e ripesati.*

# 2.2. Parametri biochimici nel biota

## 2.2.1. Carboidrati totali

I carboidrati (CHO) sono una frazione significativa della biomassa cellulare, presenti in numerose macromolecole, sono composti organici di carbonio, idrogeno e ossigeno in rapporto 1:2:1. Nella vongola il glicogeno, un omopolimero di glucosio che costituisce la maggior riserva energetica a breve termine di molti organismi animali, è il carboidrato predominante e può arrivare fino al 90% dei carboidrati totali (Plana *et al.*, 1996). Poiché i carboidrati fungono principalmente da riserva energetica primaria nella vongola, la loro determinazione diviene un elemento chiave per interpretare lo stato di salute dell'organismo in termini di investimento e/o stoccaggio di energia.

*Iter sperimentale:*

*La determinazione dei carboidrati totali è stata eseguita per via spettrofotometrica utilizzando il metodo del "Phenol-Sulfuric acid" proposto da Dubois (1956), che prevede la formazione di un composto arancione in presenza di carboidrati, acido solforico e fenolo (Cui, 2005; Sadasivam & Manickam, 2010), previa digestione della biomassa animale in una soluzione di $H_2SO_4$ 72% a 100°C per 60 minuti. La quantificazione avviene per lettura dell'assorbanza a 490 nm e confronto con una curva di calibrazione realizzata con diluizioni di una soluzione nota di glucosio. L'analisi colorimetrica è stata realizzata in triplicato su due estrazioni in giorni diversi.*

## 2.2.2. Proteine totali

Le proteine (PRT) sono polimeri di amminoacidi coinvolte nella catalisi di tutte le reazioni biologiche e sono l'unità costitutiva fondamentale di numerose strutture cellulari e la frazione quantitativamente più consistente nei tessuti molli dei bivalvi (Pérez *et al.*, 2003). Il contenuto proteico permette quindi di stimare l'effettivo investimento energetico dell'organismo per la crescita e la sopravvivenza.

*Iter sperimentale:*

*Per la quantificazione delle proteine totali è stato utilizzato il metodo spettrofotometrico proposto da Bradford (1976): una soluzione acida bruna di Coomassie Brilliant Blue G-250 lega le proteine generando un complesso blu con massima assorbanza a 595 nm.*
*L'estrazione delle proteine totali dalla biomassa animale è stata effettuata in una soluzione alcalina di NaOH 0,5 M in bagno a ultrasuoni per 60 minuti (Nunn & Keil, 2006). L'aggiunta del reagente di Bradford ad un'aliquota di tale estratto genera un complesso stabile tra i 5 e i 20 minuti e l'assorbanza misurata è stata confrontata con una retta di taratura realizzata con uno standard di BSA (Bovine serum albumin). L'analisi colorimetrica è stata realizzata in triplicato su due estrazioni in giorni diversi.*

### 2.2.3. Lipidi Totali

I lipidi (LPD) oltre ad essere i principali costituenti delle membrane cellulari sono la principale riserva energetica negli organismi animali e sono una frazione importante degli oociti dei bivalvi (Pérez *et al.*, 2003).

*Iter sperimentale:*

*Per la quantificazione dei lipidi totali è stato utilizzato un metodo gravimetrico, estraendo i lipidi con un solvente. I Lipidi sono stati misurati come differenza di peso su capsule di alluminio in seguito a totale evaporazione del solvente completata in stufa a 80° per un'ora. Il metodo di estrazione utilizzato è quello di Hara & Radin (1978) che prevede l'utilizzo di una soluzione di Esano:Isopropanolo (3:2) la cui efficienza di estrazione è incrementata dall'utilizzo del bagno a ultrasuoni per 30 min (Metherel et al., 2009). Il metodo di estrazione è stato applicato due volte alla stessa matrice per estrarre anche i lipidi residui. L'analisi è stata realizzata in triplicato.*

### 2.2.4. Ceneri

Le ceneri (CNR) indicano quello che è il contenuto residuale minerale nella matrice biologica, essenziali nei rapporti percentuali delle frazioni biochimiche.

*Iter sperimentale:*

*Le ceneri sono state determinate per combustione di 0,5 g di vongole polverizzate a 550°C per 2 ore e successiva pesatura in crogioli a peso noto. L'analisi è stata realizzata in duplicato.*

## 2.2.5. Alcali-lable phosphate (Fosforo alcalino-labile)

Un parametro biochimico recentemente riconosciuto ed utilizzato come specifico biomarker di esposizione agli xeno-estrogeni nei bivalvi è il fosfato labile ottenuto col metodo dell' Alkali-lable phosphate (ALP) (Blaise *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2004), per la stima di vitellogenine (Vtg), proteine vitelline (Vn) e proteine del tuorlo d'uovo, generalmente riconosciute e misurate sotto la dicitura comune di proteine "Vn-like". Queste glicolipofosfoproteine, che costituiscono la riserva energetica per lo sviluppo dell'embrione negli organismi ovipari, sono prodotte naturalmente nel "fegato" delle femmine, in risposta ad estrogeni endogeni, e rilasciate nel flusso sanguigno/linfatico dell'organismo, accumulandosi infine negli oociti. In seguito all'esposizione a xeno-estrogeni i livelli di "Vn-like" aumentano rispetto alla norma nelle femmine e possono venire sintetizzate anche nei maschi nei quali solitamente tali proteine sono assenti (Matozzo & Marin, 2007).

*Iter sperimentale:*

*Il Metodo per la quantificazione degli ALP si basa sul metodo di estrazione di Quinn et al. (2006).*
*Le proteine sono state estratte da 0,1g di biomassa animale con un buffer salino: 10 mM TrisHCl, 50 mM NaCl, 1mM EDTA corretto con NaOH 0,5 a pH 7,5. Un'aliquota di tale soluzione, centrifugata e chiarificata dalla biomassa sospesa, è stata prelevata per la precipitazione delle proteine con l'aggiunta di acetone freddo (in rapporto 5ml/3,5ml di soluzione/acetone). Le pellet così ottenute per ulteriore centrifugazione sono state ridisciolte in 10 ml di NaOH 0,5M per 30 minuti a 70°C. Nella soluzione alcalina il fosforo legato alle proteine si libera divenendo così disponibile per la determinazione con il metodo colorimetrico di Strickland & Parsons (1972), contemporaneamente nella medesima soluzione è stata quantificata la concentrazione di proteine con il saggio di Bradford (1976). Gli ALP sono stati normalizzati rispetto alle proteine ed espressi come µg P/mg PRT.* La procedura di analisi è stata ripetuta 4 volte per campione in giorni diversi, con lettura in triplicato di proteine e fosforo reattivo.

## 2.3. Test in vivo sulle vongole

### *2.3.1. Test del riaffossamento*

Il test del riaffossamento valuta la capacità delle vongole di scavare ed infossarsi nel sedimento; tale attività può essere inibita da condizioni ambientali avverse indicando una risposta comportamentale a breve termine a xeno-biotici ambientali o a perturbazioni fisico-chimiche (Moschino *et al.*, 2011*a*) .

*Iter sperimentale:*

*Il test prevede l'allestimento di vaschette con 4-6 cm di sabbia pulita e il riempimento con acqua di mare (Phelps, 1989). Entro 12 ore dal campionamento 24 vongole sono state disposte ordinatamente nelle vaschette e monitorate ogni 15 minuti per tre ore e successivamente ogni ora registrando il numero di individui infossati sul totale. Dai dati sul riaffossamento è stato calcolato l'ET50, il tempo necessario al 50% degli individui per riaffossarsi.*

### *2.3.2. Test di sopravvivenza all'aria*

Il test di sopravvivenza all'aria è una misura della capacità naturale degli organismi bivalvi di tollerare l'esposizione all'aria e di sopravvivere ad eventi di anossia (Moschino *et al.*, 2011*a*), questo test si è inoltre dimostrato un biomarker utile per evidenziare fenomeni di stress nella vongola dovuti: a fenomeni "simulati" di raschiatura dei fondali, a variazioni delle temperature e al ciclo riproduttivo (Moschino *et al.*, 2008).

*Iter sperimentale:*

*Per la realizzazione del test sono state lasciate all'aria 24 vongole monitorandole ogni 12 ore e registrando il numero di individui deceduti sul totale. Gli organismi vengono considerati morti quando stimoli esterni non generano la chiusura delle valve (Moschino et al., 2011a). Dalle curve di sopravvivenza è stato ricavato l'LT50, il tempo necessario per la morte del 50% degli individui.*

### 2.3.3. Indice di condizione

Esistono numerosi indici di condizione utilizzati in letteratura con sfumature di significato differenti, ma fondamentalmente si riducono ad espressioni di rapporto tra l'organismo e la sua conchiglia. L'indice di condizione forse più semplice, oltre che uno dei più consueti è il rapporto tra il peso secco dell'organismo e il peso secco della conchiglia (C.I.= dry flesh weight/dry shell weight) espresso come percentuale (Walne & Mann, 1975; Anibal *et al.*, 2011; Tsangaris *et al.*, 2010 ). Suja & Muthiah (2010) affermano che ad una variazione del peso senza una variazione della lunghezza corrisponde una variazione nel peso delle gonadi che fluttua stagionalmente.

*Iter sperimentale:*

L'indice di condizione è stato misurato su 25 esemplari. Le conchiglie e gli organismi sono stati seccati separatamente a 80 °C per una notte e pesati.

### 2.3.4. Rapporto femmine mature/totale

Su un sottocampione di 25 vongole, sono state sezionate le gonadi ed è stato osservato il liquido seminale al microscopio ottico per l'identificazione del numero di femmine mature sul totale, chiaramente distinguibili per gli oociti di dimensioni ragguardevoli (**Fig. 1 allegato A**). Tale parametro non permette una chiara identificazione del rapporto Maschi/Femmine poiché individui immaturi o che hanno completato l'emissione dei gameti non sono chiaramente distinguibili. I maschi non presentano visivamente caratteristiche peculiari chiare come le femmine e gli spermatozoi per le loro dimensioni ridotte o per lo stadio riproduttivo/stagionale prematuro non sono sempre riconoscibili, è quindi più corretto esprimere tale rapporto come numero di femmine mature sul totale (F/TOT).

## 2.4. Metalli totali: estrazione ed analisi

La quantificazione dei metalli totali e dell'arsenico è stata effettuata nel sedimento e nella vongola, per verificare fenomeni di contaminazione ambientale e di bioaccumulo, oltre che potenziali fonti di stress per gli organismi bivalvi. I metalli analizzati nei sedimenti superficiali e nei tessuti molli della vongola sono: **As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb** e **Zn.**

*Iter sperimentale:*

*Le digestioni delle matrici, le diluizioni e le soluzioni sono state preparate con reagenti di grado analitico ed acqua Milli-Q (18,2Ω di resistività), mentre i contenitori e la vetreria sono rimasti in bagno acido 0,1 M $HNO_3$ per 48 ore e sono stati sciacquati con acqua Milli-Q per rimuovere ogni traccia di metallo residuo.*
*L'estrazione dei metalli totali avviene in contenitori di teflon con l'aggiunta a 0,1 g di sedimento di 5 ml di acqua bidistillata, 3 ml di acqua regia ($HCl/HNO_3$ 3:1) e 1,5 ml di HF sottoposti a un programma di microonde (CEM MDS-2000) di temperature crescenti (Bettiol et al., 2008). Terminata la prima digestione l'acido fluoridrico viene neutralizzato con una soluzione di $H_3BO_3$ al 2%. Seguono un secondo ciclo in microonde, la diluizione a 50 ml e il trasferimento in contenitori di polietilene (Sfriso et al., 2008).*
*La digestione della vongola invece, per l'analisi dei metalli totali, prevede l'estrazione di 0,1g di biomassa animale con: 2ml di Milli-Q, 3ml di $HNO_3$ e 3 ml di $H_2O_2$. Alla scomparsa dell'effervescenza i contenitori di teflon subiscono un programma di estrazione in microonde, vengono quindi diluiti a 25 ml e trasferiti in contenitori di polietilene (Sfriso et al., 2008).*
*La digestione dell'arsenico è realizzata con un'estrazione acida di 0,15 g di matrice con microonde, sia per i sedimenti che per le vongole, in bombe di teflon con 4 ml di $H_2O$, 2 ml di $H_2O_2$ e 2 ml di $H_2SO_4$. Le soluzioni digerite vengono portate a volume in matracci da 25 ml, trasferite in contenitori di polietilene e conservate a 4°C fino al momento dell'analisi.*
*Le estrazioni sono state realizzate in triplicato in giorni diversi sia per i sedimenti che per le vongole. Le analisi sono state eseguite in assorbimento atomico con lo strumento Spectra 250 Plus Varian a doppio raggio con correttore di fondo a sorgente continua (lampada a deuterio) equipaggiato con una torretta rotante con 4 lampade a catodo cavo. Lo strumento è stato utilizzato nella configurazione a fiamma aria/acetilene per gli elementi a concentrazioni maggiori (mg/L). Per concentrazioni inferiori (µg/L) è stato configurato con il fornetto di grafite (GTA-96 Varian) combinato con auto-campionatore rotante. Le concentrazioni dei metalli nei sedimenti e nelle vongole sono stati espressi*

*come mg/kg in peso secco e sono stati confrontati con i valori limite per i microinquinanti organici del protocollo del Ministero dell'Ambiente dell'8 aprile 1993.* Nelle vongole, il cadmio, il mercurio e il piombo sono espressi sia su peso secco che su peso fresco, per la classificazione sul tenore medio di metalli presenti nei molluschi secondo il regolamento CE n. 1881/2006.
Per validare la metodologia analitica e verificare l'accuratezza dell'analisi sono stati utilizzati materiali di riferimento certificati: il PACS-2 (sedimento marino liofilizzato) il e (NIST)-SRM 2976 (mitili liofilizzati) della National Institute of Standards and Technology che hanno subito le medesime estrazioni dei campioni.

# 2.5. Parametri Ambientali

## *2.5.1. Clorofilla-a e feopigmenti*

La clorofilla-*a* e i feopigmenti sono stati quantificati nelle acque (*Strickland & Parsons, 1972)* e nei sedimenti superficiali, quali stime della biomassa fitoplanctonica e microfitobentonica attive ed inattive: fonti primarie di nutrimento per i bivalvi filtratori tra i quali è annoverata la vongola filippina. La frazione planctonica dei pigmenti totali rappresenta una misura istantanea della disponibilità di nutrimento per la vongola nella colonna d'acqua, invece la frazione bentonica della clorofilla descrive quello che è il nutrimento potenzialmente disponibile (Magni *et al.*, 2000; Sin *et al.* 2009). Questa sebbene legata al sedimento può risospendersi nella colonna d'acqua ed è a contatto diretto con il bivalve fossorio. Inoltre, a causa della limitata motilità rispetto alla biomassa planctonica, rappresenta un parametro più integrato nel tempo e maggiormente caratteristico dell'aria di studio.
I principali organismi che contribuiscono alla biomassa fitobentonica superficiale in Laguna di Venezia, non tutti direttamente fonte di nutrimento per i bivalvi, ma comunque produttori primari fondamentali alla base della catena trofica, sono: i cianobatteri filamentosi, le diatomee bentoniche (Facca *et al.*, 2007) e gli stadi giovanili di macroalghe.

*Iter sperimentale:*

*La clorofilla-a e i feopigmenti sono stati quantificati per analisi spettrofotometrica utilizzando il metodo proposto da Lorenzen (1967), che prevede l'estrazione dei pigmenti con acetone al 90%, in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti e la quantificazione cumulativa di feofitina (Pheo-a) e clorofilla-a(Chl-a) a 665 nm. Segue l'acidificazione con HCl 1% e la totale conversione a feofitine con lettura nuovamente alla medesima lunghezza d'onda. Un'ulteriore misura di assorbanza a 750 nm costituisce un valore correttivo per la torbidità. I valori di assorbanza, i volumi filtrati d'acqua (500ml) o la massa (0,5g) di sedimento estratta (Brito et al., 2009) e il volume di solvente per l'estrazione (10 ml), integrati nelle equazioni di Lorenzen, restituiscono rispettivamente i µg/L e/o i µg/g di clorofilla-a e feofitine. Le estrazioni ed analisi nei sedimenti superficiali sono state realizzate in triplicato in giorni diversi.*

## 2.5.2. Nutrienti nelle acque

La catena trofica parte dai produttori primari che per crescere necessitano di assimilare nutrienti quali azoto indagato nei tre diversi stati di ossidazione più comuni: ione ammonio ($NH_4^+$), nitrito ($NO_2^-$) e nitrato ($NO_3^-$), fosfati ($PO_4^{3-}$) e silicati ($SiO_4$) per la crescita delle diatomee. La quantità di tali sostanze influenza direttamente la crescita di micro e macroalghe che traggono il proprio nutrimento dalle sostanze disciolte nella colonna d'acqua. Il fitoplancton è un parametro di interesse soprattutto per quanto riguarda la vongola, perché spesso è la sua principale se non unica fonte di nutrimento è quindi importante non solo stimare la biomassa di plancton presente, ma quantificare anche quanto nutrimento, in termine di nutrienti, hanno a disposizione i produttori primari per crescere e nutrire a loro volta i bivalvi filtratori.

*Iter sperimentale:*

*I nutrienti nelle acque sono stati determinati in seguito alla filtrazione delle acque con filtri in fibra di vetro Whatman GF/F (porosità: 0,7 µm) secondo la procedure di analisi spettrofotometriche riportate in Strickland & Parsons (1972). La quantificazione alle diverse lunghezze d'onda di fosfati, silicati e composti inorganici dell'azoto avviene per confronto con una retta di taratura realizzata con acqua di mare .Le analisi colorimetriche sono state realizzate in triplicato.*

*Il **fosforo reattivo** (RP) è stato determinato utilizzando il metodo spettrofotometrico di Murphy & Riley (1962) basato sulla reazione dello ione ortofosfato ($PO_4^{3-}$) con ammonio eptamolibdato ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$). La reazione, catalizzata dallo ione antimonile ($SbO^+$) in ambiente acidificato con acido solforico porta alla formazione di un composto fosfomolibdico giallo ridotto dall'acido ascorbico ad un composto colorato di blu con massima assorbanza a 885 nm.*

*Il **silicato reattivo** è stato quantificato utilizzando il metodo spettrofotometrico secondo Mullin & Riley (1965) modificato da Strickland & Parsons (1972). Il silicato reagisce con l'ammonio eptamolibdato, con il metolo-solfito e l'acido ossalico, in ambiente acidificato con acido solforico, portando alla formazione di un composto colorato di blu con assorbanza massima a 830 nm.*

*La determinazione dell'**ammoniaca** è avvenuta con il metodo spettrofotometrico del fenolo-ipoclorito di Riley (1953) modificato da Solarzano (1969) che prevede la formazione in ambiente alcalino del blu di indofenolo per reazione tra ammoniaca, ipoclorito e fenolo catalizzata dal sodio nitroprussiato.*

*L'aggiunta del citrato trisodico previene l'interferenza dovuta alla precipitazione dell'idrossido di magnesio portando allo sviluppo della colorazione azzurra con massima assorbanza a 640 nm.*

*La contemporanea determinazione di **nitriti e nitrati** prevede la riduzione dei secondi per passaggio attraverso una colonna di cadmio ramato e quantificazione dei nitriti per formazione di un sale di diazonio in presenza di sulfanilammide e nitrito in ambiente acido (Wood et al., 1967). Il sale reagisce con la N-(1naftil)etildiammina portando alla formazione di un composto colorato di rosa con massima assorbanza a 543 nm.*

### 2.5.3. Fosforo totale ed inorganico nel sedimento

Il sedimento è un serbatoio per il fosforo che può essere restituito alla colonna d'acqua sia al variare delle condizioni red-ox che ad opera di pressioni antropiche di raschiatura dei fondali o può essere influenzato dai bivalvi filtratori che ad alte densità sono in grado di stimolare il trasferimento dei nutrienti (Sfriso *et al.*, 2005a). La presenza di fosforo nelle acque è strettamente legata alla disponibilità di fosforo nel sedimento, soprattutto in un bacino come quello della laguna di Venezia in cui gli apporti di fosforo sono strettamente limitati e regolamentati, divenendo un parametro di importanza rilevante per la comprensione dello stato trofico delle aree di studio.

*Iter sperimentale:*

*Il fosforo inorganico è stato determinato nel sedimento secondo la procedura descritta in Aspila et al. (1976) agitando 0,4 g di sedimento polverizzato in 50 ml di una soluzione 1N HCl. Le concentrazioni sono state misurate con il metodo descritto da Strickland & Parsons (1972) per la determinazione dell' RP. Analoga è la procedura per la determinazione del fosforo totale che prevede la combustione del sedimento a 550°C per almeno 2 h prima dell'estrazione acida e dell'analisi colorimetrica. Il fosforo organico è stato determinato per differenza. L'estrazione è stata realizzata in duplicato in giorni diversi mentre la determinazione colorimetrica è stata realizzata in triplicato.*

### 2.5.4. Clorinità

Un ambiente di transizione come la laguna di Venezia presenta uno spettro variabile di salinità, dovuto all'apporto di piccoli corsi d'acqua e canali che

sfociano lungo il perimetro lagunare; nel caso specifico, i corsi d'acqua limitrofi alle stazioni oggetto di studio sono: Naviglio del Brenta che sfocia a lato di Fusina e il canale dell'idrovia, che sfocia a lato di Dogaletto a ovest del Lago del Duro. Benché gli ambienti di transizione tollerino variabili condizioni di salinità, tale parametro può comunque essere riconducibile a fenomeni di apporto di inquinanti e nutrienti da parte dei corsi d'acqua, influenzando così la qualità ambientale delle aree limitrofe.

La determinazione della salinità in acqua di mare è basata sulla quantificazione della clorinità la quale, per effetto della costanza della composizione ionica dell'acqua di mare, è direttamente proporzionale alla salinità. In ambienti di transizione con apporti di acque dolci ciò non corrisponde sempre al vero, si è quindi preferito esprimere sia la salinità che la clorinità.

*Iter sperimentale:*

*Il metodo per la determinazione della clorinità è la titolazione argentometrica di Oxner (1962) che si basa sulla precipitazione dei cloruri di Mohr, adattata da Knudsen all'acqua di mare. Un volume noto di acqua di mare viene titolato con una soluzione a titolo noto di nitrato d'argento, utilizzando come indicatore il* $K_2CrO_4$*, monitorando con il viraggio dal giallo al rosso il termine della reazione. Un fattore di correzione viene ricavato per titolazione dell'acqua di Copenaghen a titolo noto. L'analisi è stata fatta in doppia replica.*

## 2.5.5. Granulometria e densità

La granulometria è forse il parametro più rappresentativo di una matrice di sedimento e ne influenza radicalmente le proprietà chimico-fisiche, lo stato di ossidazione, spesso legato al grado di contaminazione (Zonta *et al.,* 1994), la quantità di nutrienti e di inquinanti e le comunità bentoniche che lo abitano. La densità invece è un parametro che indica il contenuto di sedimento per unità di volume, descrivendo quindi il suo grado di diluizione, che accompagna qualsiasi parametro legato al sedimento.

*Iter sperimentale:*

*La granulometria ( è stata determinata per setacciatura "a umido" con maglia da 63 µm per la suddivisione della frazione pelitica e di quella sabbiosa*

*quantificate come valore di peso secco su peso secco totale. La densità invece è stata determinata per differenza di peso del sedimento su crogioli di peso e volume noto dopo l'essicazione in stufa a 110°C, quantificando così il peso secco per unità di volume (Sfriso et al., 2005b).*

### 2.5.6. Particolato

Il particolato sospeso, composto da sedimenti risospesi, materia organica, batteri e fitoplancton, indica quella che è la torbidità dell'acqua, inoltre stima quella frazione che i bivalvi filtratori ingeriscono ma spesso non assimilano, perché priva di qualità nutritive o perché di dimensioni non idonee per l'ingestione da parte delle specie in questione. Il particolato può avere un ruolo importante nel nutrimento dei bivalvi solo se ricco di sostanza organica ed influisce sulla crescita dei produttori primari, condizionando direttamente la quantità di luce che ricevono nella colonna d'acqua o sul fondale.

*Iter sperimentale:*

*Alcuni filtri in nitrocellulosa della Millipore (porosità: 0,45 µm), preessiccati a 130°C e pesati in bilancia analitica sono stati utilizzati per quantificare il particolato sospeso in acqua, filtrando 100-500 $cm^3$ di acqua e lavandoli successivamente con acqua distillata per rimuovere i sali. I filtri sono stati congelati, trasportati in laboratorio, riessiccati e pesati per la determinazione del particolato come differenza in peso (Facca et al., 2002). L'analisi è stata effettuata in doppio.*

## 2.6. Analisi Statistica

Per il calcolo degli ET50 di riaffossamento (tempo in cui si riaffossa il 50% degli individui) e degli LT50 di sopravvivenza all'aria (tempo in cui muoiono il 50% degli individui) è stata effettuata un'analisi di sopravvivenza con il metodo del product-limit di Kaplan e Meyer.

Al fine di valutare quali elementi presentassero una significativa correlazione è stata effettuata un'analisi di correlazione di Pearson con successiva regressione lineare del minimo valore significativo con una probabilità del 95% e del 99,9% per i valori altamente significativi.

L'elaborazione è stata effettuata utilizzando il programma Microsoft Office Excel 2007 sui parametri congiunti di Aprile e Luglio, escludendo così la variabilità stagionale. Per una comprensione più sintetica dei parametri che descrivono la maggior parte della variabilità dei dati analizzati è stata fatta un'analisi delle componenti principali mediante il programma Statistica, versione 7.1 della StatSoft Inc. Tulsa, USA. I pesi fattoriali dei vettori sono stati considerati significativi con valori > 0,7.

# 3. Risultati

## 3.1. Biomasse, densità e fisiologia

Le **biomasse** e le **densità** maggiori di ***Ruditapes philippinarum*** sono state rinvenute nel VN nel mese di aprile **(Fig. 2a e 3a)** con 1089±25 g/mq per 383±34 individui/mq, seguono TB con 297±46 g/mq per 63±44 individui/mq, le TR e il VS con 210±24 e 189±40 g/mq per 35±24 e 36±19 individui/mq. Nel campionamento di luglio **(Fig. 2b e 3b)** si riscontra una riduzione del 60% e del 62% per la densità e del 33% e 56% per la biomassa a TB e nel VN mentre una contrazione del 25% nella densità di individui nel VS viene compensata da un aumento del 15% nella biomassa, alle TR invece la situazione si capovolge con un aumento deciso di densità (4 volte) e biomasse (3 volte).

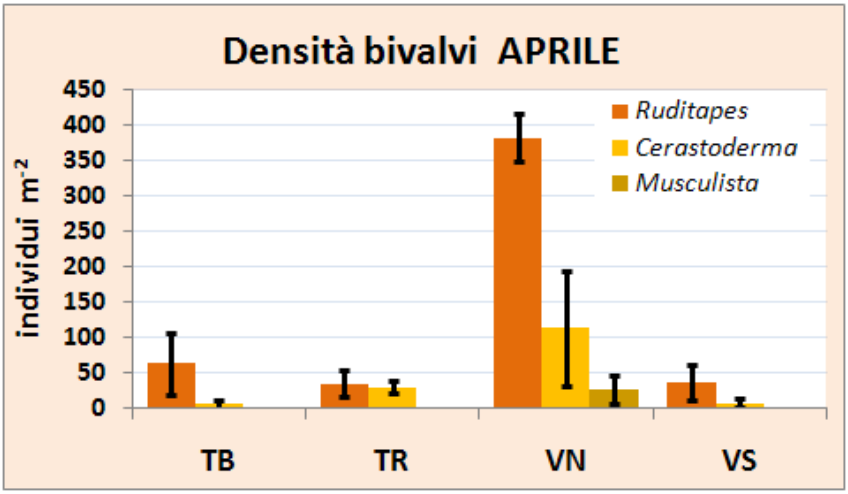



***Fig. 2a:*** ***Istogrammi delle densità in individui su mq di Ruditapes philippinarum, Cerstoderma glaucum e Musculista senhousia nelle quattro stazioni nel mese di aprile.***

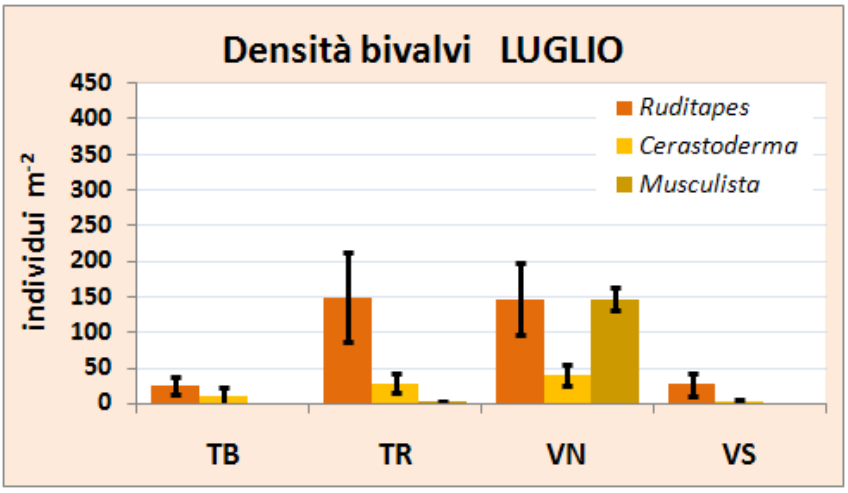



***Fig. 2b:*** ***Istogrammi delle densità in individui su mq di Ruditapes philippinarum, Cerstoderma glaucum e Musculista senhousia nelle quattro stazioni nel mese di luglio.***

Le densità e biomasse dei ***Cerastoderma glaucum*** sono massime in aprile **(Fig. 2a e 3a)** nel VN come per le vongole filippine, con 261±52 e 126±10 g/mq nel VN e alle TR per 113±41 e 29±9 individui/mq in TB e VS con densità e biomassa trascurabili. In luglio **(Fig. 3b)** le biomasse raddoppiano a TB, invece alle TR e nel VN rimangono approssimativamente invariate. Le densità analogamente restano inalterate salvo per il VN, in cui malgrado la biomassa resti costante, c'è una riduzione del 65% nel numero degli individui/mq **(Fig. 2a e 2b)**. Il ***Musculista senhousia*** presenta densità e biomasse assenti o trascurabili in tutte le stazioni salvo per il VN con 21 g/mq per 25 individui/mq nel mese di aprile **(Fig. 2a e 3a)**. Questo bivalve incrementa la sua biomassa e densità di 6 volte a luglio **(Fig. 2b e 3b)** a fronte di una riduzione di *Ruditapes philippinarum* e *Cerastoderma glaucum* nel medesimo sito. Benché in tutte le stazioni fossero presenti anche esemplari del genere *Solen marginatus* Pulteney questi non sono stati conteggiati per la difficoltà di prelievo e conteggio degli stessi.

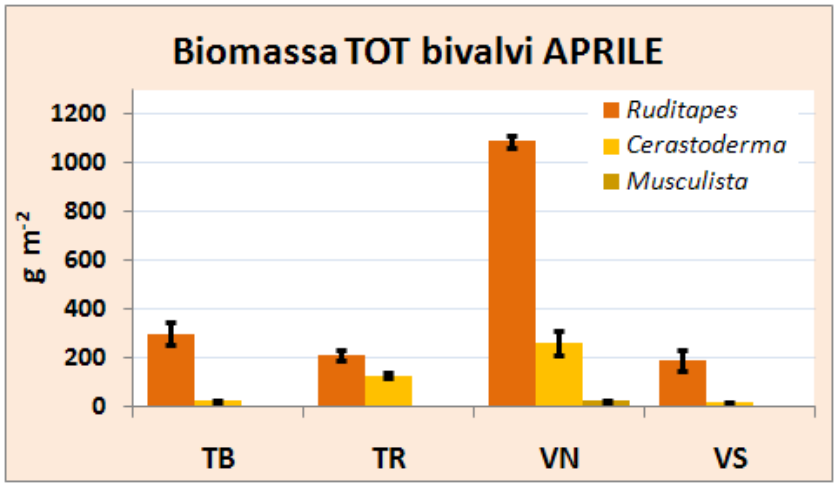



***Fig. 3a:*** ***Istogrammi delle biomasse totali in g (a vivo) su mq di Ruditapes philippinarum, Cerstoderma glaucum e Musculista senhousia nelle quattro stazioni nel mese di aprile.***

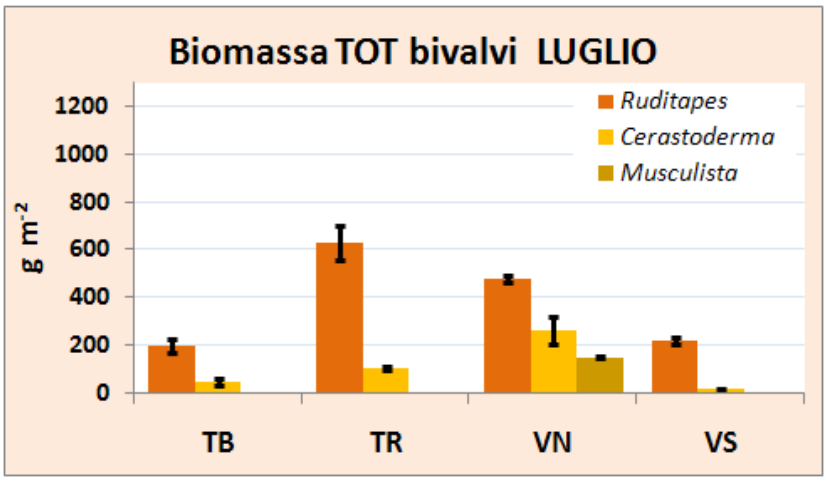



***Fig. 3b:*** ***Istogrammi delle biomasse totali in g (a vivo) su mq di Ruditapes philippinarum, Cerstoderma glaucum e Musculista senhousia nelle quattro stazioni nel mese di luglio.***

Le vongole filippine sono state raggruppate in sette **classi dimensionali**: con intervalli di 5 mm da un minimo di 5 a un massimo di 40mm (non sono mai state rinvenute vongole di taglia 0-5 mm, probabilmente per i limiti dettati dalla metodologia di campionamento manuale). Le percentuali delle diverse taglie ad aprile **(Fig. 4a)** nel VS sono uniformemente rappresentate benché sia la sola stazione a presentare un 10% di individui di taglia maggiore tra i 35 e i 40 mm. La stazione di TB presenta un 30% di individui di taglia 20-25 mm nella frazione del seme e un 50% di giovani adulti nei 25-30 mm. Le TR invece hanno solo un 15% di vongole di 20-25 mm contro un 50% di 25-30 mm e un 30% nei 30-35 mm con prevalenza di individui adulti. Nel VN le percentuali sono uniformemente distribuite tra la taglia 10-15 mm e la 30-35 mm con una media del 15% per taglia e un massimo nella frazione del seme di 15-20 mm che arriva al 40%. Le classi di età delle popolazioni cambiano radicalmente in luglio **(Fig. 4b)** con la totale scomparsa delle taglie del seme nel VS e a TB, nella quale si presenta invece un aumento deciso degli individui adulti soprattutto nella taglia di 30-35 mm che raggiungono il 70% del totale. Nel VN si nota una contrazione delle percentuali nella taglia di 20-25 mm e la comparsa di pochi individui nella taglia di 35-40 mm. Le TR a luglio presentano una distribuzione meno marcata negli individui adulti suddividendosi omogeneamente tra le taglie di 15-20 mm e 30-35 mm.

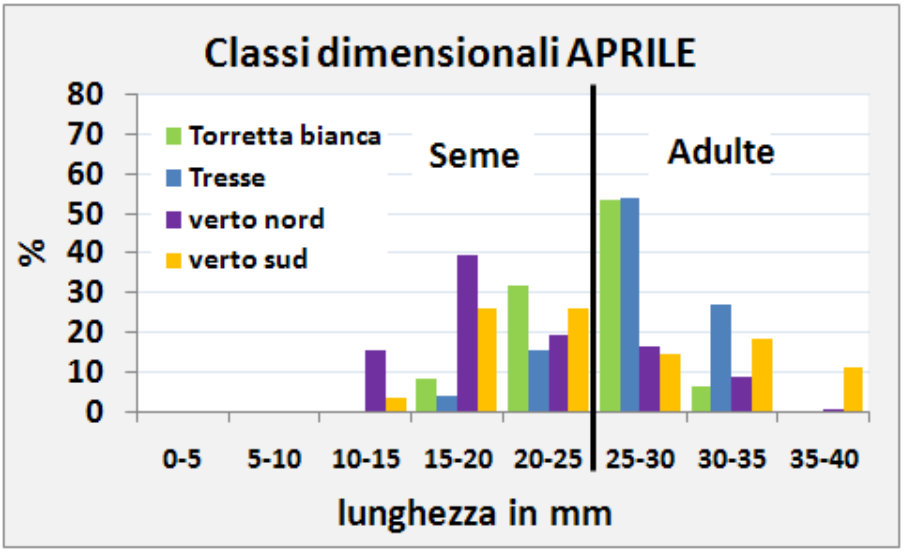



***Fig. 4a:*** ***Istogrammi delle percentuali di organismi delle diverse stazioni suddivisi per intervalli di taglia da 5 mm in aprile.***

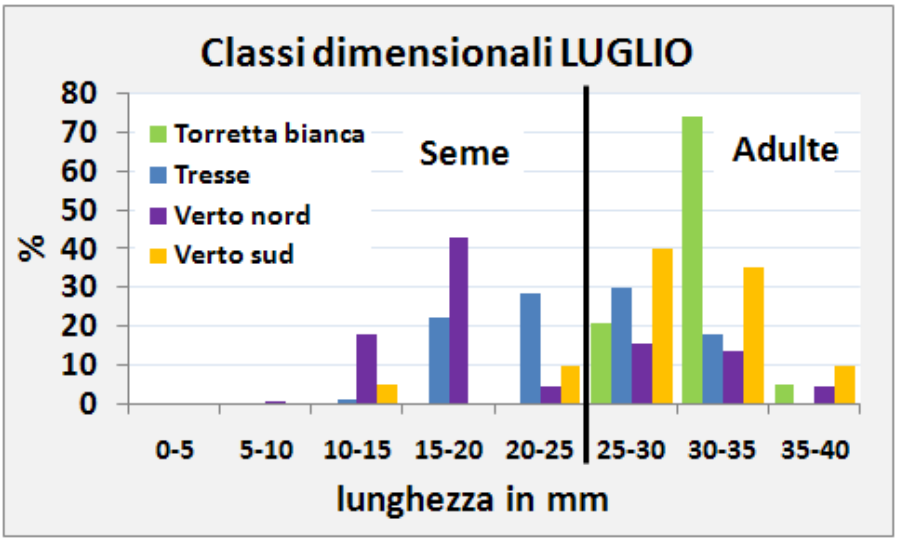



***Fig. 4b:*** ***Istogrammi delle percentuali di organismi delle diverse stazioni suddivisi per intervalli di taglia da 5 mm in luglio.***

L'**indice del seme (Fig. 5)** è un parametro che permette di sintetizzare brevemente i cambiamenti nei rapporti di taglia seme/adulti. Nelle Stazioni di TB, VN e VS da aprile a luglio c'è stata una riduzione del rapporto seme/adulti. A TB si è passati da un rapporto di 0,68 a 0,00 a TB con la totale scomparsa del seme, al VN si è osservata una riduzione da 2,87 a 1,97 e al VS si è passati da 1,25 a 0,18. Viceversa, il rapporto è aumentato alle TR passando da 0,24 a 1,08 con un complessivo aumento delle taglie del seme, equivalenti in estate agli organismi adulti.

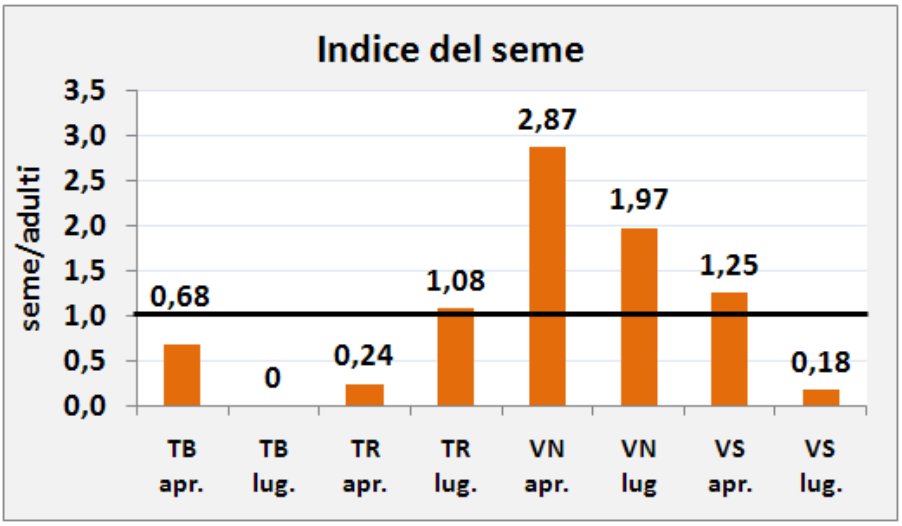



***Fig. 5:*** ***Istogrammi del rapporto seme/adulti nelle diverse stazioni in aprile e in luglio.***

L'**indice di condizione (Fig. 6)**, il rapporto tra il peso secco della vongola e il peso del suo guscio, raggiunge il 10% e il 12% in TB e TR durante il mese di aprile, mentre fluttua in un intorno del 6 % per i due Verti. In luglio l'indice di condizione di TB e TR si è dimezzato raggiungendo rispettivamente il 6,7 % e il 4,5%, mentre è rimasto invariato nei Verti.

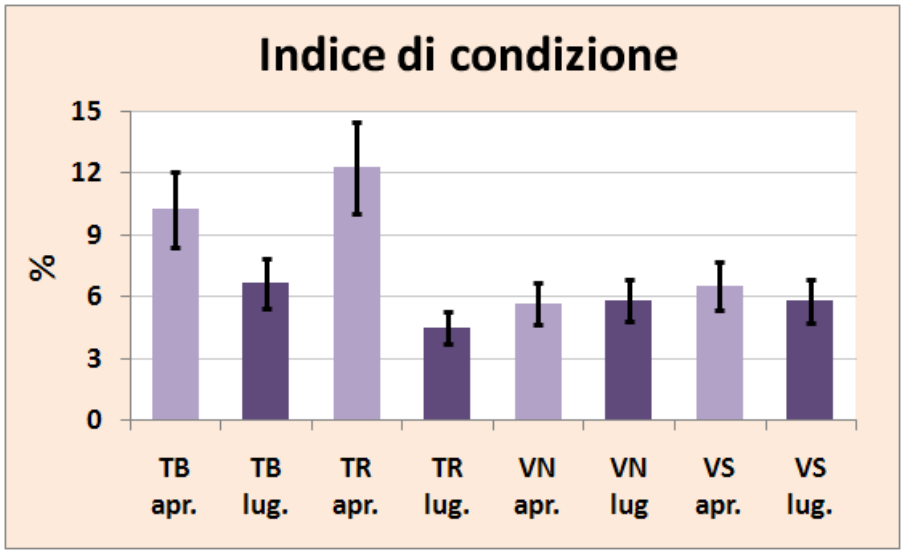



***Fig. 6:*** ***Istogrammi dell'indice di condizione: il rapporto tra peso secco dell'organismo rispetto al peso della conchiglia nelle diverse stazioni in aprile e in luglio.***

La **percentuale di femmine mature sul totale** si è mantenuta costante in aprile **(Fig. 7a)** per tutte le stazioni con valori intorno al 56% per TB, il VN, e il VS e un 60% per le TR (benché tale differenza corrisponda ad una singola vongola). La situazione a luglio **(Fig. 7b)** si capovolge e il numero di femmine mature diminuisce in TB al 32% e alle TR e nel VN al 40%, mentre aumenta leggermente nel VS raggiungendo il 60%. A differenza degli organismi campionati in aprile, in cui solo le femmine erano chiaramente distinguibili, in luglio gli organi riproduttivi erano tutti maturi ed è stato possibile discernere chiaramente i maschi dalle femmine (**Fig. 1, allegato A**).

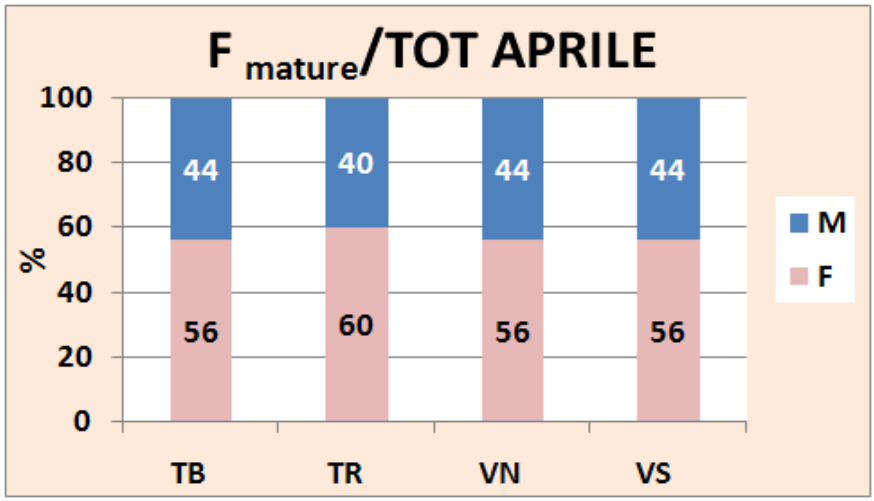



***Fig. 7a:*** *istogramma della percentuale di femmine mature sul totale degli organismi conteggiati nel mese di aprile.*

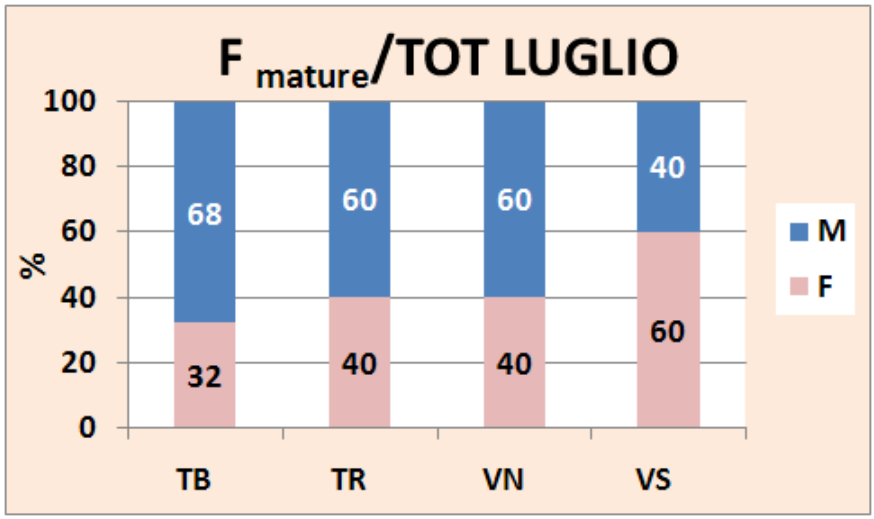



***Fig. 7b:*** *istogrammi della percentuale di femmine mature sul totale degli organismi conteggiati nel mese di luglio.*

## 3.2. Test in vivo

Il **test di riaffossamento (Fig. 8)** delle vongole nel mese di aprile restituisce alti ET50 per TB e le TR entrambi con più di 200 minuti, i valori per i Verti sono invece più bassi con 75 min per il VN e 30 min per il VS. In luglio la situazione resta pressoché inalterata per TB, migliora invece per le TR che passano ad appena 38 min, analogamente i tempi necessari al riaffossamento si riducono anche al VN raggiungendo 30 min e peggiorano al VS passando da 30 a 80 minuti. Complessivamente, secondo il test, TB si dimostra essere sia in aprile che in luglio la stazione più compromessa. Le TR benché con ET50 molto alti in aprile sembrano rivelare segni di miglioramento in luglio. In aprile le vongole del VN sembrano essere più stressate rispetto a quelle del VS mentre la situazione in estate si capovolge.

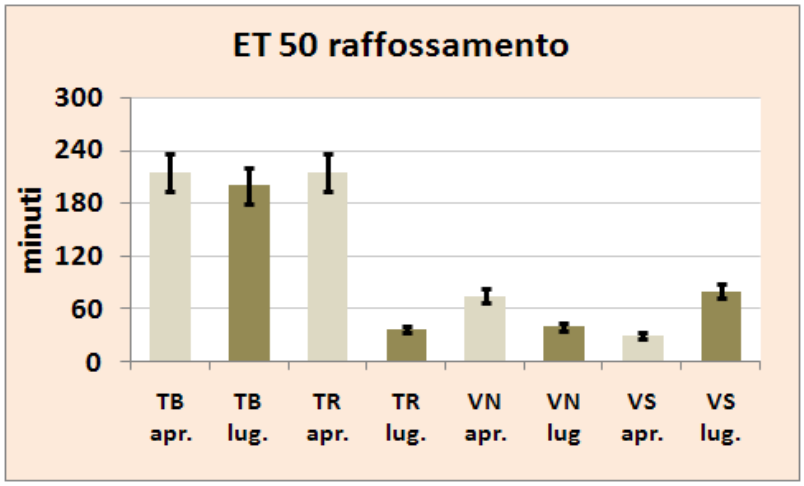



***Fig. 8:*** ***Istogrammi degli ET50 di riaffossamento delle vongole in aprile e in luglio nelle diverse stazioni. Maggiore il tempo necessario a riaffossarsi maggiore è lo stress.***

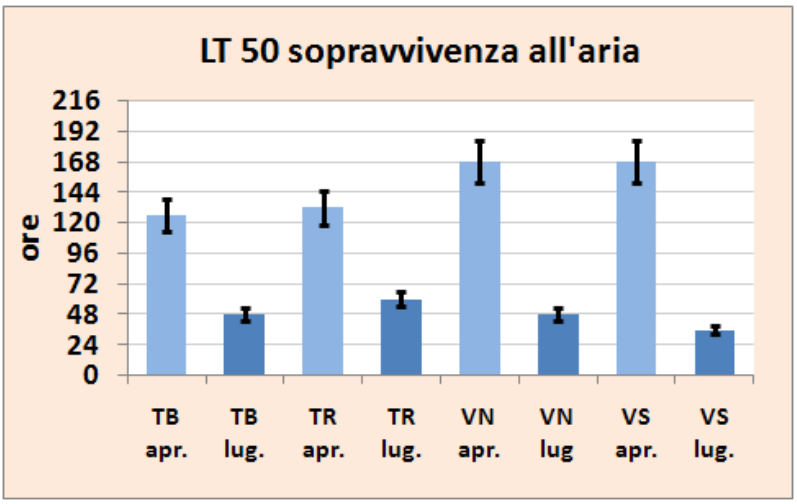



***Fig. 9:*** ***Istogrammi degli LT50 di sopravvivenza all'aria delle vongole in aprile e in luglio nelle diverse stazioni. Maggiore il tempo che sopravvivono esposte al'aria minore è lo stress.***

Il **test di sopravvivenza all'aria (Fig. 9)** mostra alti valori di LT50 per le vongole dei Verti che sopravvivono per 168 ore, più bassi per le TR con 132 ore e per TB con 126 ore. In luglio i tempi di sopravvivenza all'aria si riducono fortemente passando a 60 ore come valore massimo per le TR, a 48 ore per TB e il VN e ad appena 36 ore per il VS. Secondo il test le vongole dei Verti in aprile sono le meno stressate mentre quelle di TB sono le più compromesse. In luglio i tempi si riducono, a causa dell'incremento della temperatura di svolgimento del test e benché non siano direttamente confrontabili con i valori di aprile, tracciano comunque un andamento in cui la stazione del VS si dimostra essere la più stressata. TB e il VN sono simili mentre la stazione migliore sembra essere quella delle TR.

## 3.3. Parametri biochimici

L'**ALP (Fig. 10)** è massimo ad aprile in TB con 4,3±1,2 µg/mg, si dimezza alle TR e nel VN e presenta i valori più bassi nel VS con 1,8±0,8 µg/mg. A luglio benché permanga il medesimo andamento le differenze si assottigliano in un intorno di 3±1 così che TB continua a presentare i valori più alti con 3,7±0,82 µg/mg e il VS i valori più bassi con 2,6±0,94 µg/mg. Malgrado l'attenuazione della sensibilità del metodo nel periodo estivo, forse dovuta all'effetto della riproduzione, gli ALP presentano un andamento decrescente da TB al VS indicando la prima stazione come la più compromessa e l'ultima come la migliore.

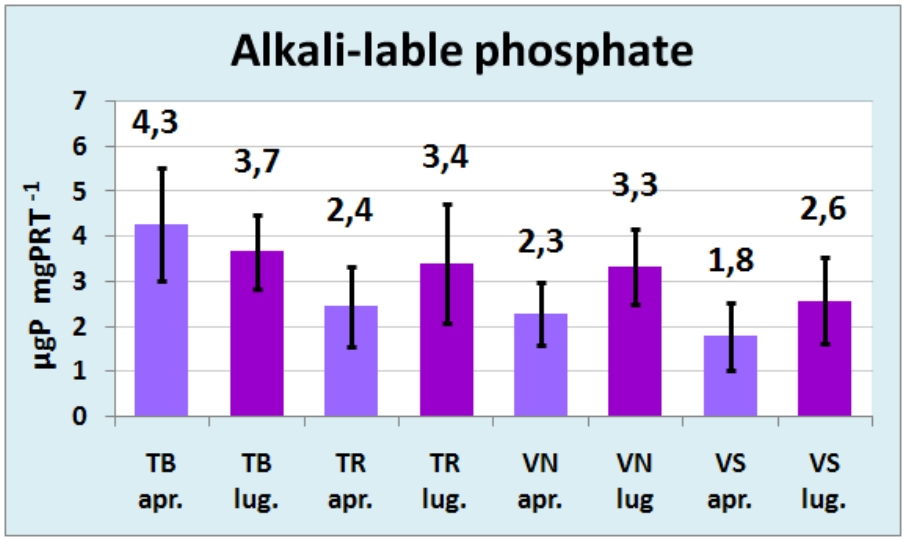



***Fig. 10:*** ***Istogrammi delle concentrazioni di alkali-lable phosphate, in aprile e in luglio nelle diverse stazioni espresse, in µg di fosforo su mg di proteine estratte con soluzione buffer.***

Nelle **frazioni biochimiche** di aprile **(Fig. 11a)** la percentuale globale di recupero si attesta sul 93+5% del peso secco totale mentre in luglio raggiunge il 94±6%. Le ceneri presentano valori medi compresi in un intorno del 16±2%, massimi in TB (19%) e al VN (17%). Le proteine con una media del 37±2% sono anch'esse percentualmente più alte in TB e nel VN dove raggiungono il 39%. I lipidi si mantengono invariati in tutte le stazioni con un valore medio dell'8% mentre i carboidrati sono massimi alle TR (38%) e minimi in TB (28%) aggirandosi tra il 30% e il 33% nei due Verti. Nel mese di luglio **(Fig. 11b)**, a fronte di una pressoché inalterata percentuale dei lipidi e delle ceneri che incrementano del 7% nel solo VS, si assiste ad un significativo incremento delle percentuali proteiche in tutte le

stazioni a discapito dei carboidrati. Così le proteine passano da un valore medio del 37% in aprile al 45% in luglio con valori minimi alle TR (33%) e massimi nel VS (39%) mentre i carboidrati mediamente decrescono dal 32% al 24%.

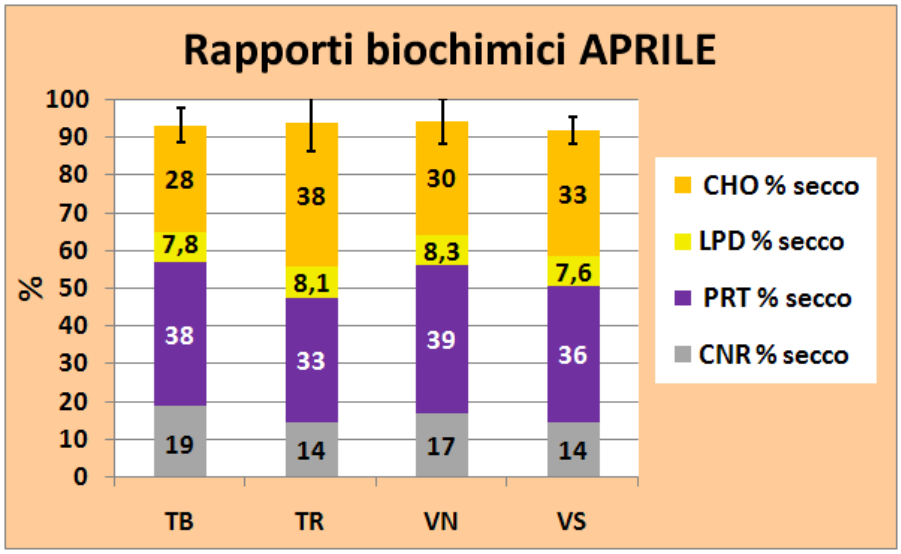



***Fig. 11a:*** ***Istogramma delle percentuali di ceneri, carboidrati, proteine e lipidi totali nelle vongole delle stazioni in aprile.***

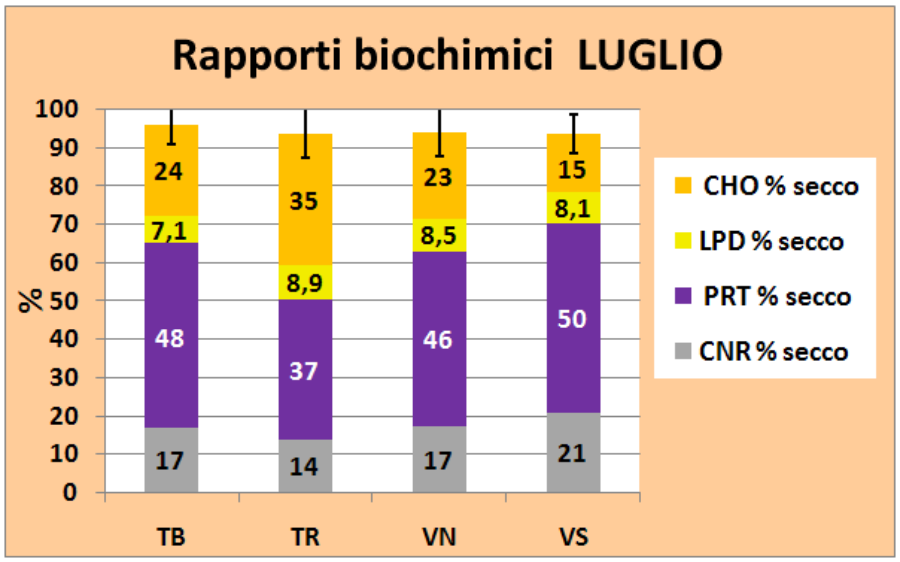
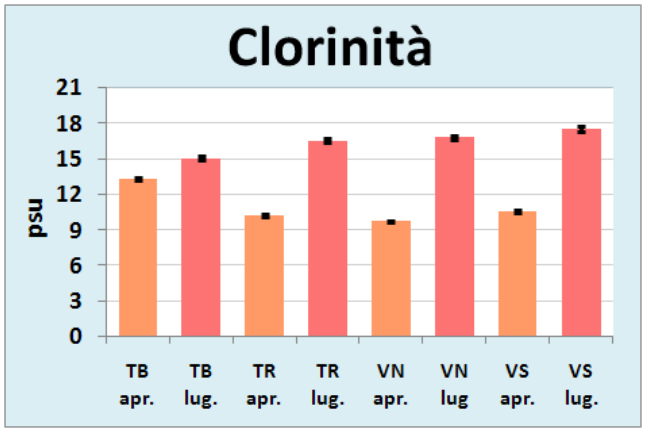



***Fig. 11b:*** ***Istogramma delle percentuali di ceneri, carboidrati, proteine e lipidi totali nelle vongole delle stazioni in luglio.***

## 3.4. Parametri ambientali

La **salinità** (poiché ottenuta dalla clorinità, ne mima gli andamenti**) (Fig. 12° e 12b)** presenta i valori minimi in primavera, probabilmente legati alle intense precipitazioni verificatesi tra marzo e aprile con valori leggermente sotto 20 psu alle TR, e nei Verti, mentre raggiunge 24 psu in TB. In luglio la salinità aumenta raggiungendo mediamente 29 psu. Il valore minimo è stato registrato a TB con 27 psu mentre si sono raggiunti 31 psu in VS.



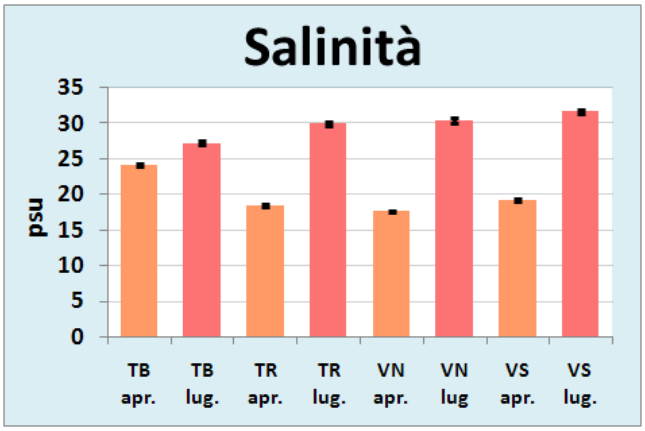




***Fig. 12a:*** ***Clorinità delle diverse stazioni in aprile e in luglio.***

***Fig. 12b:*** ***Salinità delle diverse stazioni in aprile e in luglio.***

I **silicati reattivi (Fig. 13)** nella colonna d'acqua oscillano intorno a 8 µM con lievi variazioni stagionali: diminuiscono di appena 2 µM in VN e aumentano di 4 µM al VS, mentre i valori più bassi sono stati rinvenuti alle TR dove non superano le 5 µM.

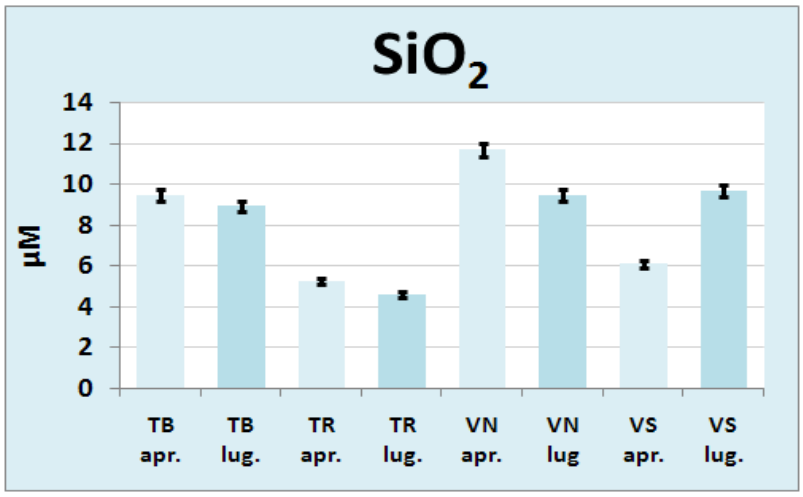



***Fig. 13:*** ***Istogramma dei silicati reattivi in acqua nelle stazioni in aprile e in luglio.***

Il **DIN (dissolved inorganic nitrogen = somma di ammonio nitiriti e nitrati) (Fig. 14)** è massimo in aprile con poco più di 18 µM a TB, diminuendo a 10 µM al VN e a ca. 8 µM alle TR e al VS. Il contributo maggiore al DIN in primavera è dato dall' $NO_3^-$, che contribuisce mediamente per il 78%, contro il 17% dell'$NH_4^+$ ed appena il 5% dei $NO_2^-$. In luglio il DIN diminuisce del 52% e del 56% in TB e alle TR mentre si riduce molto meno ai Verti (16% e 18 % al VN al VS, rispettivamente). Anche i contributi percentuali dei diversi stati di ossidazione dell'azoto cambiano, con un maggiore contributo dell'$NH_4^+$ che raggiunge il 52%, a scapito del $NO_3^-$ che scende al 43% e dei nitriti che restano invariati.

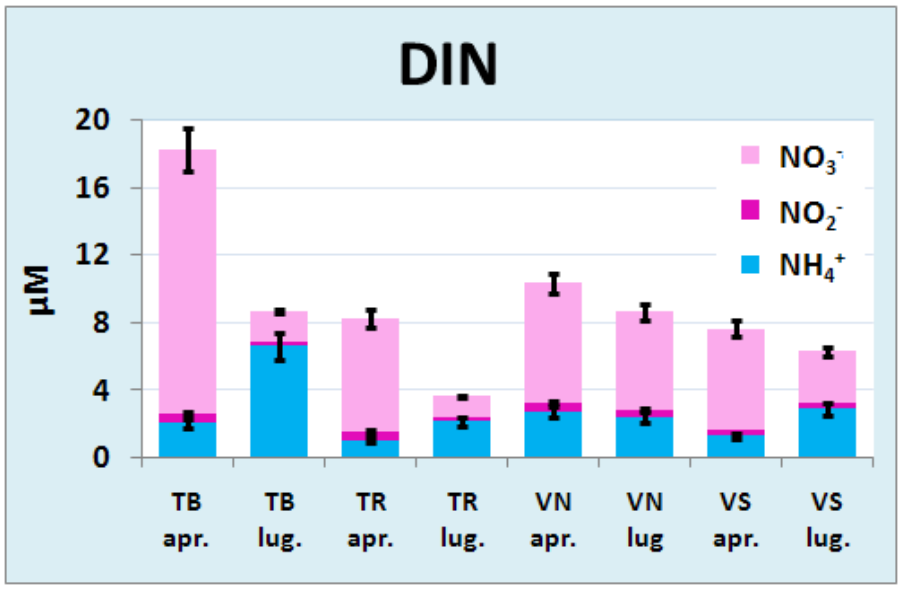



***Fig. 14:*** ***Istogrammi delle frazioni del dell'azoto inorganico disciolto (nitrati, nitriti e ammonio) nelle stazioni in aprile e in luglio.***

Il **fosforo reattivo (RP) (Fig. 15)** presenta concentrazioni molto basse, al limite della rilevabilità e non molto variabili in aprile (mediamente 0,2 µM). In luglio invece, a fronte di una riduzione del DIN c'è un aumento dell'RP in tutte le stazioni, con il valore massimo alle TR (1,5±0,1 µM), mentre raggiunge appena le 0,8 µM in VN e non supera le 0,6 µM in TB e in VS.

Una più chiara rappresentazione delle variazioni è rappresentata dal rapporto molare DIN/RP (N/P) che mostra una notevole variazione stagionale **(Fig. 16)**, dovuta all' aumento del fosforo e alla contemporanea riduzione dell'azoto, con una riduzione media dei rapporti di 4 volte in TB, al VN e al VS e di 14 volte alle TR.

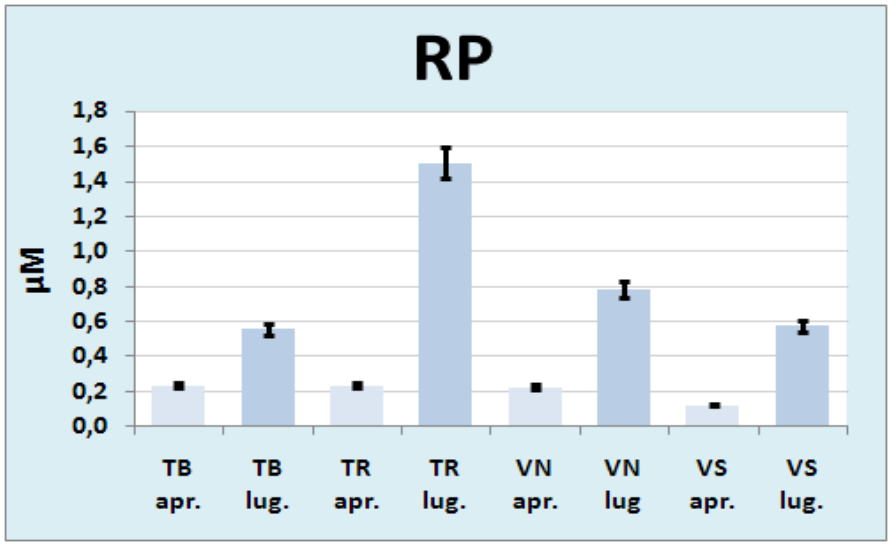



***Fig. 15:*** ***Istogrammi del fosforo reattivo nelle acque nelle stazioni in aprile e in luglio.***

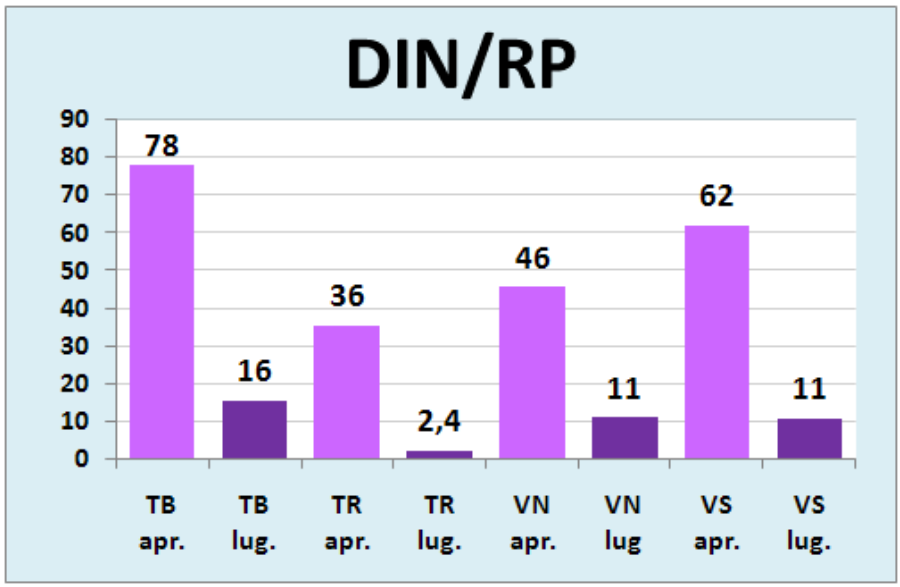



***Fig. 16:*** ***Istogrammi del rapporto DIN/RP in aprile e in luglio nelle stazioni oggetto di studio.***

La **clorofilla-*a* tot** nelle acque ad aprile **(Fig. 17a)** mostra i valori più alti alle TR dove raggiunge 4,9 µg/L, seguono il VS e il VN con mediamente 3 µg/L e TB in cui la concentrazione è al limite del livello di rilevabilità. Analogamente in luglio **(Fig. 17b)** i valori massimi per feofitine e clorofilla-*a* si osservano alle TR con 6,8 µg/L e i minimi al VS con appena 2,4 µg/L mentre oscillano intorno a 3 µg/L a TB e nel VN. Le concentrazioni dei pigmenti nel sedimento, sebbene molto maggiori, non seguono lo stesso andamento delle acque, soprattutto ad aprile **(Fig. 18a)** in cui sono massime nel VN con oltre 60 µg/g e minime alle TR, 5 volte più basse, mentre i Verti si assestano su un valore medio di 37 µg/g. In luglio **(Fig. 18b)** le

clorofille al VN e al VS si riducono rispettivamente del 60% e del 70% incrementano invece in TB del 35% e più di 5 volte alle TR.

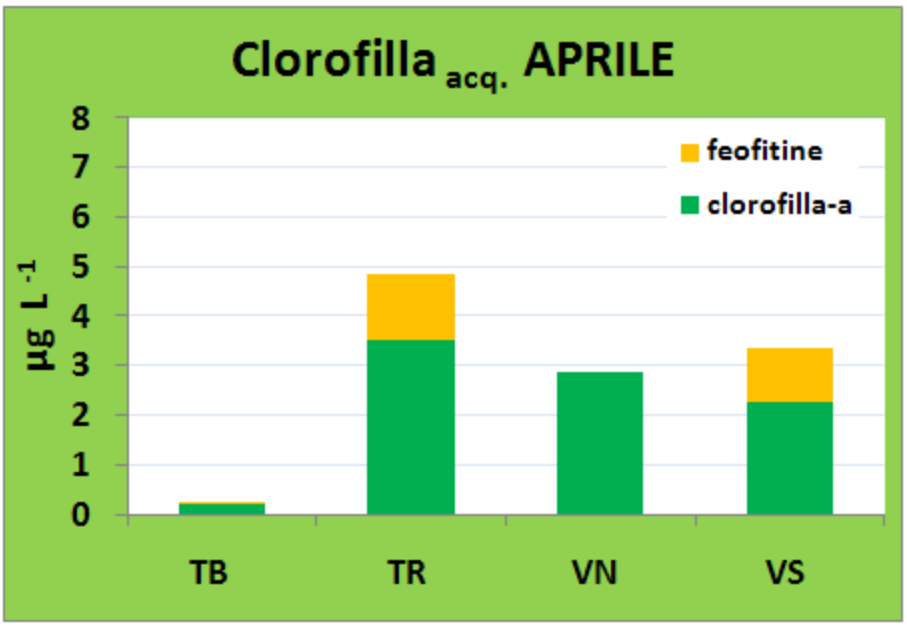



***Fig. 17a:*** ***Isogrammi delle frazioni della clorofilla-a e della feofitina-a nelle acque delle stazioni nel mese di aprile.***

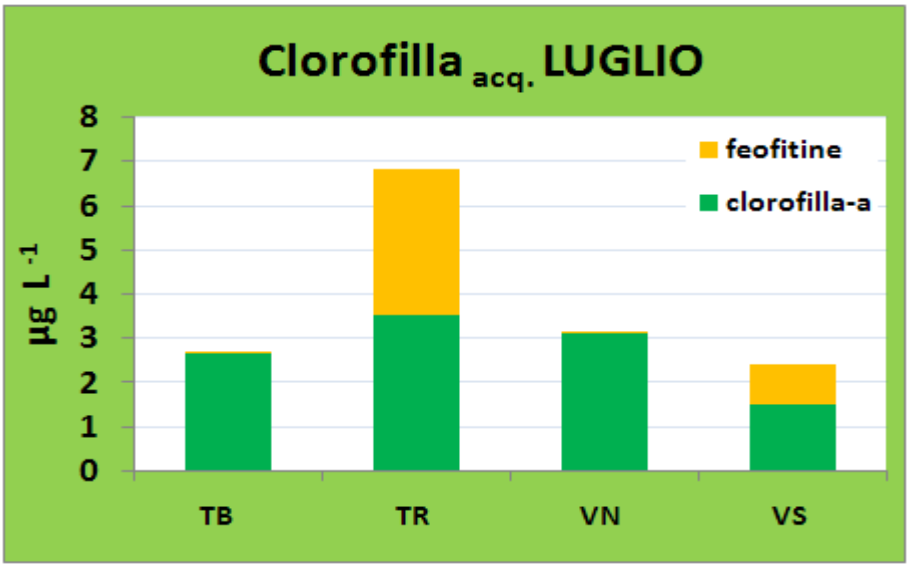



***Fig. 17b:*** ***Isogrammi delle frazioni della clorofilla-a e della feofitina-a nelle acque delle stazioni nel mese di luglio.***

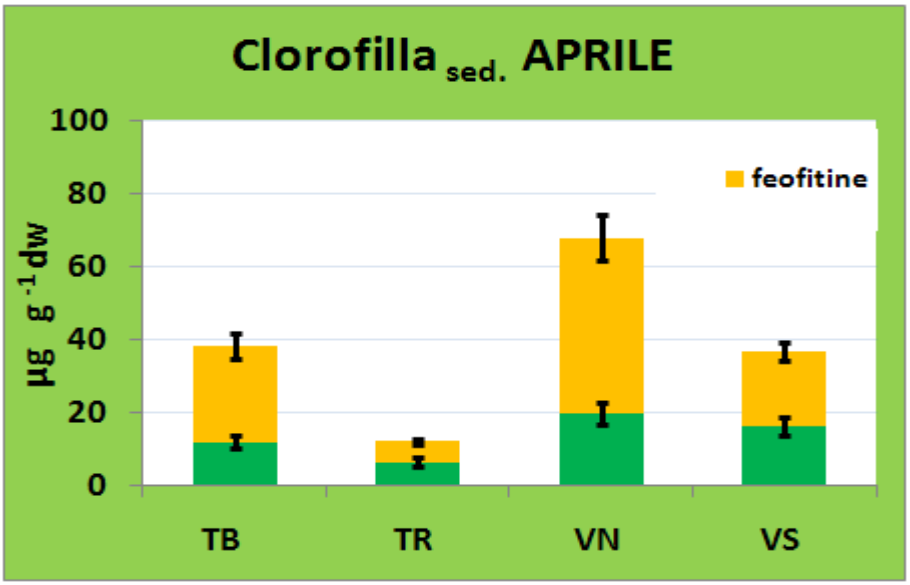



***Fig. 18a:*** ***Isogrammi delle frazioni della clorofilla-a e della feofitina-a nei sedimenti superficiali (primi 3 mm) delle stazioni nel mese di aprile.***

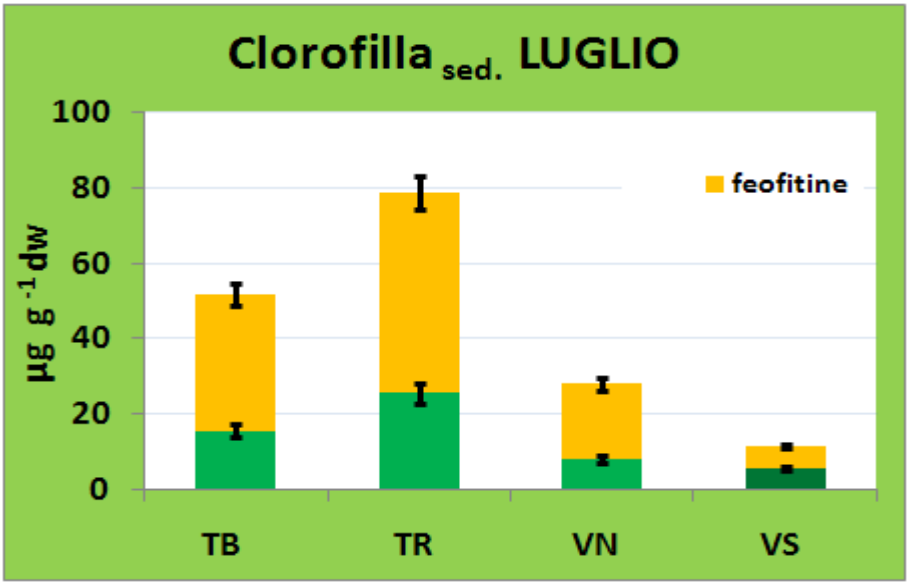



***Fig. 18b:*** ***Isogrammi delle frazioni della clorofilla-a e della feofitina-a nei sedimenti superficiali (primi 3 mm) delle stazioni nel mese di luglio.***

Nel mese di aprile per ogni stazione sono stati prelevati tre pool di tre carote per indagare la variabilità locale di metalli, fosforo e granulometria. Tale variabilità, espressa percentualmente come rapporto tra la deviazione standard e la media (errore standard) dei valori medi ottenuti per ogni stazione, che corrisponde alla dispersione naturale dei parametri (e non ad un errore metodologico), è stata confrontata con l'errore standard analitico. Globalmente c'è un 8% di variabilità analitica considerando tutti i parametri del sedimento contro un 15% di variabilità ambientale. Poiché la seconda è appena il doppio della prima è stato ritenuto sufficiente per il campionamento di luglio un solo pool di tre carote per descrivere efficacemente il sito. Per confrontare i dati delle due stagionalità i

valori di aprile per ogni stazione sono stati mediati e come errore è stato indicato l'errore medio analitico per quell'analisi.

La **granulometria (Fig. 19)** mostra in tutte le stazioni una percentuale di sabbia sopra il 60%, pressoché inalterata nelle due stagionalità. Questa percentuale tra aprile e luglio si aggira intorno al 76% per TB e al 65% per le TR (la più pelitica), seguono i due Verti con alte percentuali di sabbia, rispettivamente: 90% per il VN e 93% per il VS. Benché le stazioni siano tutte molto sabbiose l'Eh del sedimento presenta variazioni notevoli, salvo per TB che oscilla mediamente intorno -12 mV. La stazione delle TR passa da 96 mV a -122 mV e il VN già negativo con -26 mV scende a quasi -100 mV. Il VS invece è la stazione con il sedimento più ossidato e non varia sensibilmente da aprile a luglio oscillando intorno 200 mV.

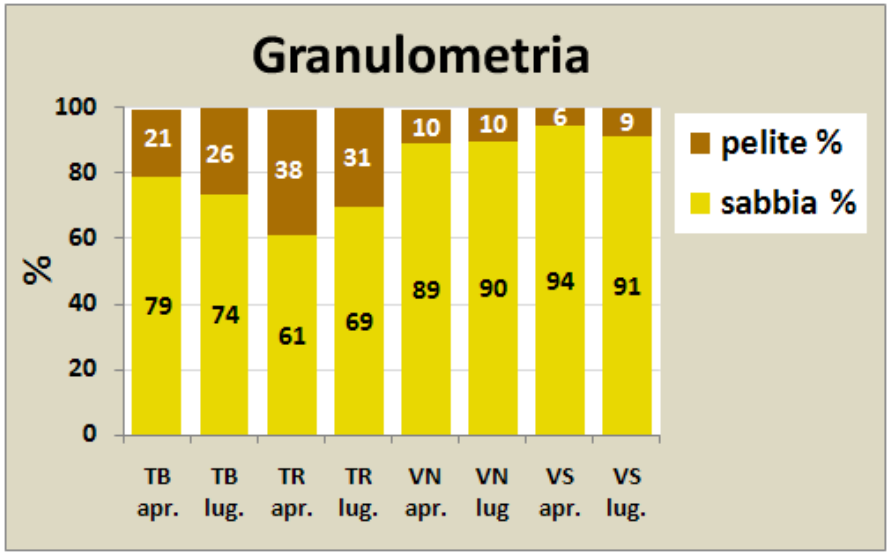



***Fig. 19:*** ***Istogrammi percentuali delle frazioni granulometriche di sabbia (>63µm) e pelite (<63µm) nei primi 5 cm di sedimento delle stazioni in aprile e in luglio.***

Il **fosforo nel sedimento (Fig. 20)** presenta una frazione organica media di 24 µg/g, il totale invece con un valore medio di 288 µg/g esibisce i suoi valori massimi alle TR con oltre 325 µg/g e nel VS a luglio con 318 µg/g. Queste concentrazioni incrementano mediamente del 14% in Luglio in TB, alle TR e al VS mentre diminuiscono del 7% nel VN.

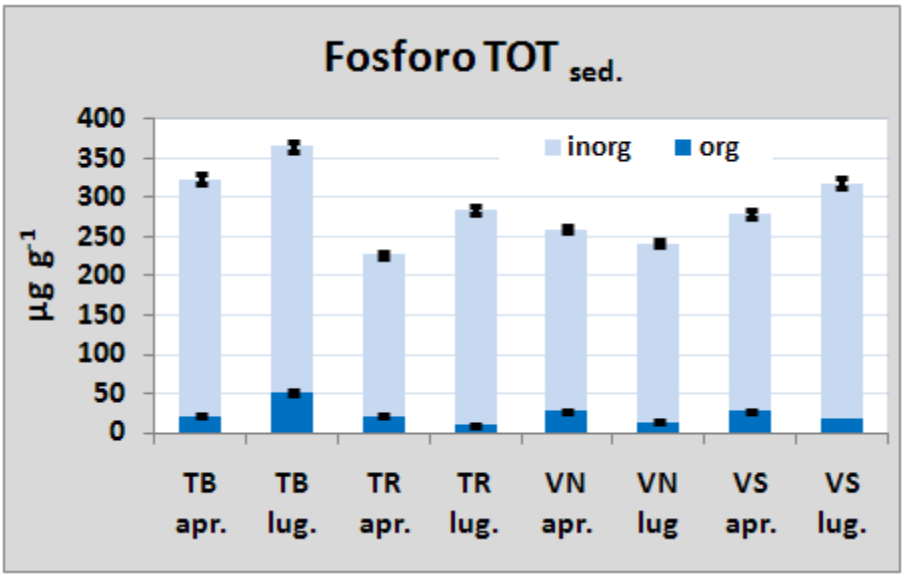



***Fig. 20:*** *Istogrammi delle frazioni di fosforo organico ed inorganico nei primi 5 cm di sedimento delle stazioni oggetto di studio in aprile e in luglio.*

# 3.5. Metalli nel sedimento e nelle vongole

Per validare la metodologia analitica e verificare l'accuratezza dell'analisi dei metalli sono stati utilizzati materiali di riferimento certificati. Le percentuali di recupero ottenute dai materiali di riferimento certificati PACS-2 e (NIST)-SRM sono state superiori al 93%.

L'**arsenico (Fig. 21a)** sfiora 10 mg/kg nei sedimenti delle TR e del VN mentre oscilla intorno a 7 mg/kg in TB e nel VS; rientra nella categoria A (<15 mg/kg) per l'arsenico del protocollo del Ministero dell'Ambiente dell'8 aprile 1993 come sedimento non inquinato. L'arsenico nelle vongole **(Fig. 21b)** invece è massimo nel VN in aprile con 0,94±0,01 mg/kg dw, minore a TB e nel VS dove supera 0,6 mg/kg dw e minimo alle TR con 0,49±0,02 mg/kg dw. In luglio le concentrazioni aumentano mediamente del 30% raggiungendo 1 mg/kg dw nei due Verti.

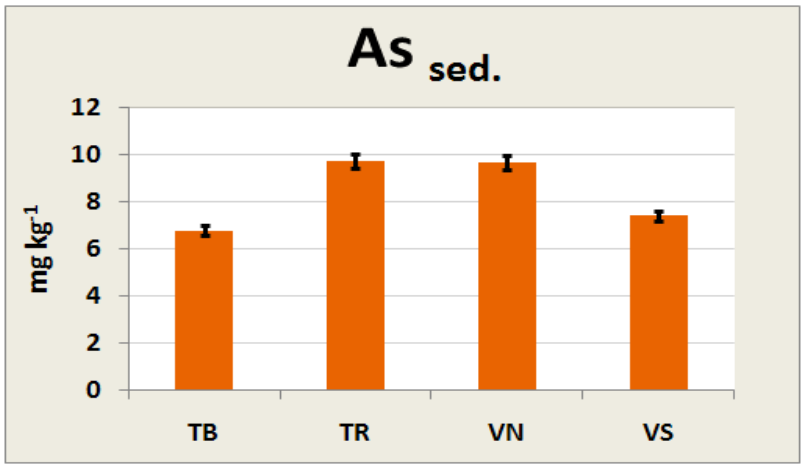



**Fig. 21a: Isogrammi delle concentrazioni di arsenico in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate.**

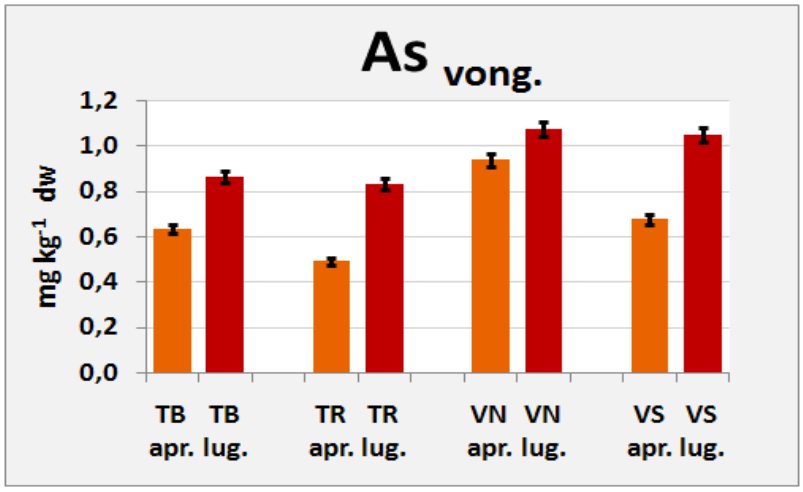



**Fig. 21b: Isogrammi delle concentrazioni di arsenico nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.**

Il **cromo (Fig. 22a)** è massimo nei sedimenti di TB con 331±43 mg/kg e raggiunge 200 mg/kg al VS, è appena la metà al VN, mentre è minimo alle TR con 72±9 mg/kg. Nessuna delle stazioni rientra in classe A (<20mg/kg), le TR rientrano nei limiti della classe B mentre il VN, il VS e TB rientrano in classe C ( 100< C <500 mg/kg). La concentrazione di cromo nelle vongole **(Fig. 22b)** mostra un andamento diverso con valori massimi alle TR in aprile che raggiungono 14 mg/kg dw e un valore medio per le rimanenti di 3,6 mg/kg dw. In luglio si verifica un aumento del 24% a TB, del 41% nel VN e del 61% nel VS mentre i valori alle TR diminuiscono del 36%.

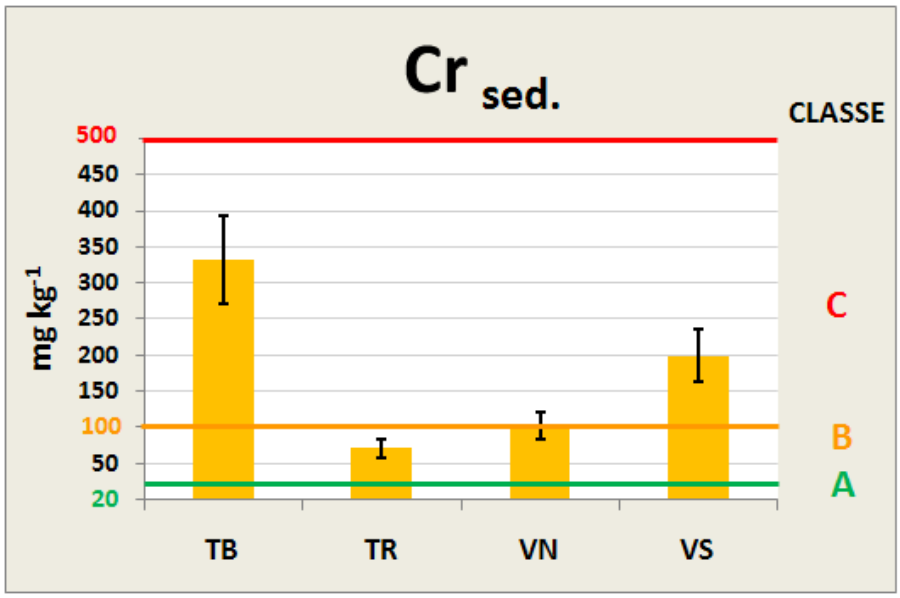



**Fig. 22a: Isogrammi delle concentrazioni di cromo in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate. In verde arancione e rosso sono segnalati i limiti normativi delle classi di inquinamento "A" (200 mg/kg) , "B" (100 mg/kg) e "C" (500 mg/kg).**

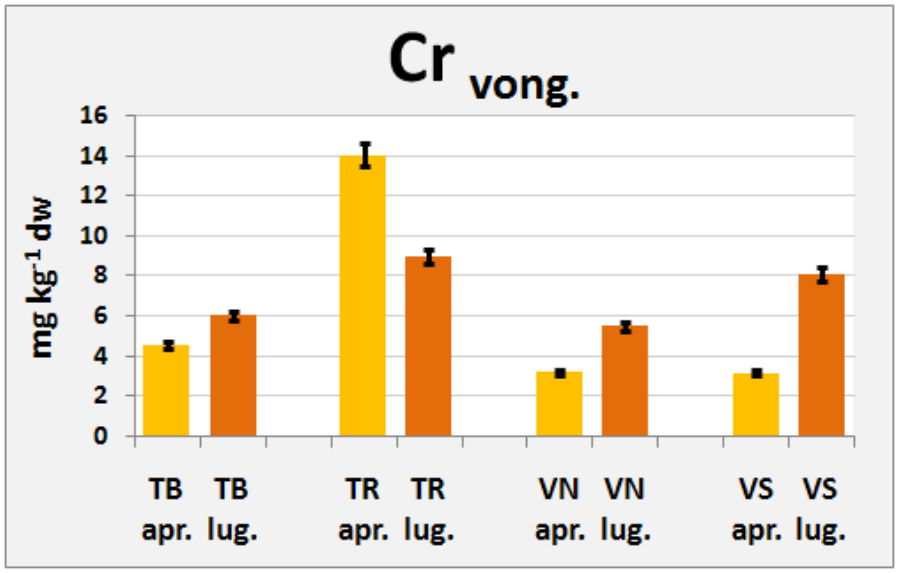



**Fig. 22b: Isogrammi delle concentrazioni di cromo nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.**

Il **rame** nel sedimento **(Fig. 23a)** è massimo in TB con 9,1±1,0 mg/kg, seguono il VN con 8 mg/kg e le TR e il VS che oscillano intorno a un valore medio di 5,7 mg/kg, rientrando tutti nella classe A (< 40 mg/kg). Il contenuto di rame nelle vongole **(Fig. 23b)** invece è un valore medio pressoché costante di 7,9 mg/kg dw.

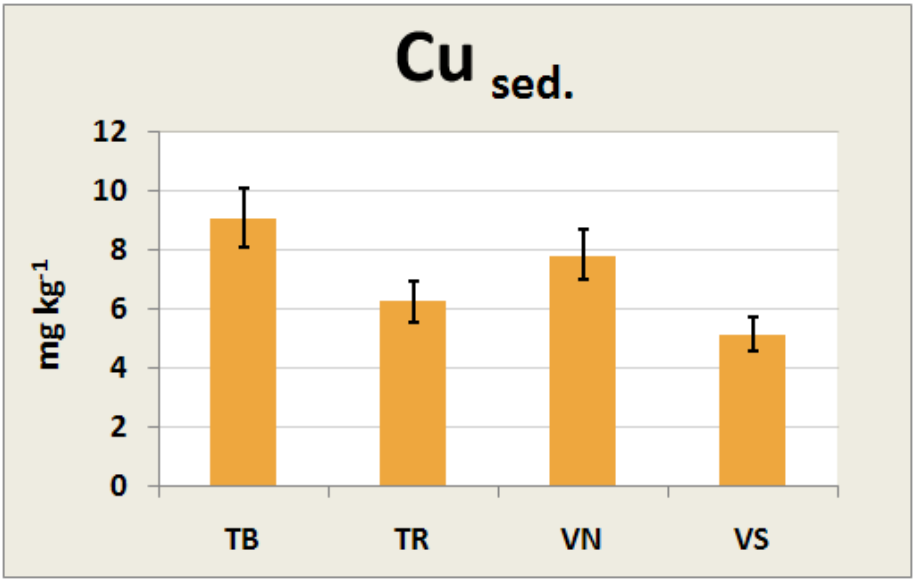



**Fig. 23a: Isogrammi delle concentrazioni di rame in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate.**

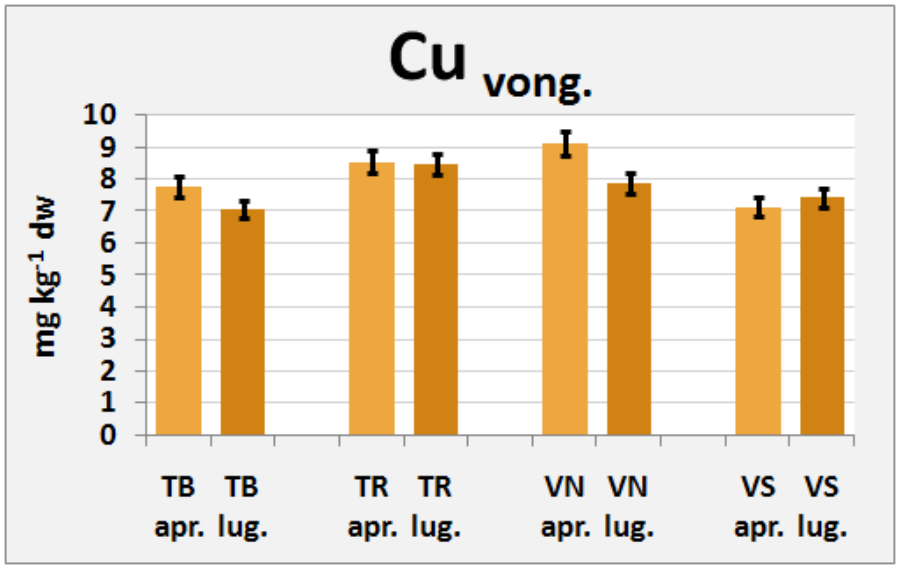



**Fig. 23b: Isogrammi delle concentrazioni di rame nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.**

Il **ferro** nel sedimento **(Fig. 24a)** è massimo a TB con 15784±631 mg/kg mentre è mediamente costante nelle altre stazioni con ca. 10600 mg/kg. Il Ferro nelle vongole **(Fig. 24b)** raggiunge 600 mg/kg dw in TB, 450 mg/kg al VN e oscilla intorno a 400 mg/kg alle TR e nel VS. In luglio i valori restano inalterati in TB e decrescono del 31% alle TR contro un aumento del 34% nel VN e del 56 % al VS.

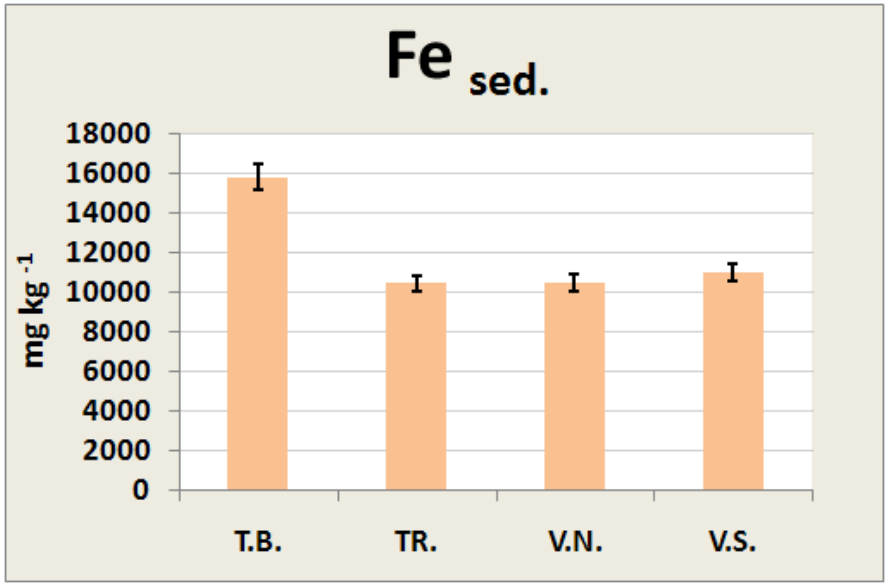



**Fig. 24a: Isogrammi delle concentrazioni di ferro in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate.**

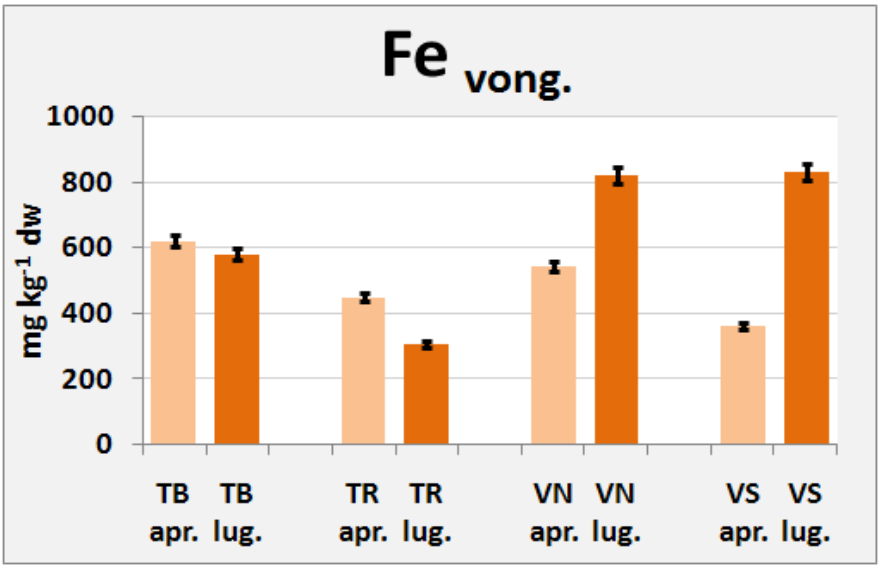



**Fig. 24b: Isogrammi delle concentrazioni di ferro nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.**

Il **manganese** nel sedimento **(Fig. 25a)** varia poco, benché massimo in TB con 359±7 mg/kg, nelle rimanenti stazioni presenta un valore medio di ca. 300 mg/kg. Nelle vongole **(Fig. 25b)** in aprile raggiunge 18 mg/kg dw in TB e ca. 10 mg/kg dw nelle rimanenti stazioni e mentre a luglio si riduce del 40% in TB, resta invariato alle TR ed incrementa mediamente del 50% in VN e in VS.

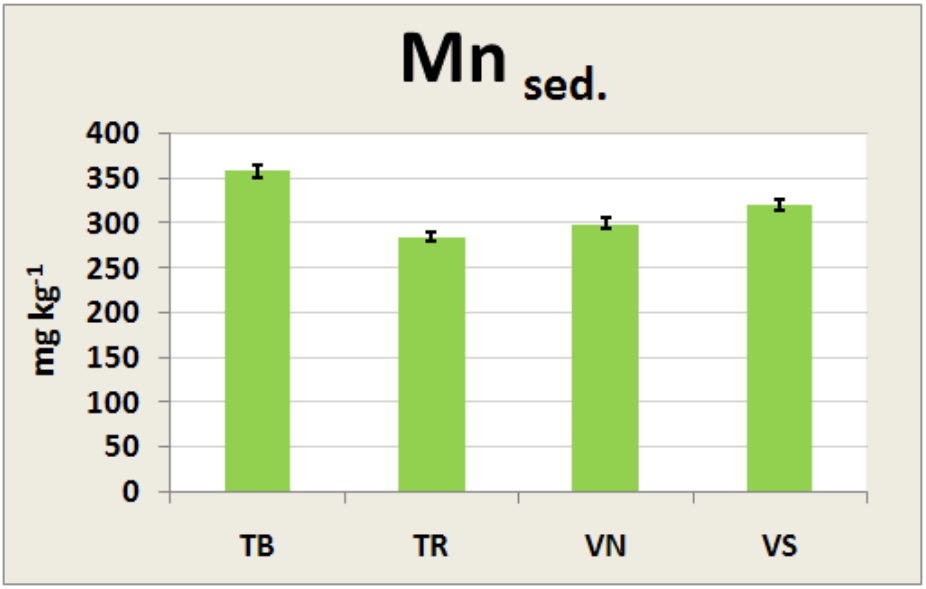



**Fig. 25a: Isogrammi delle concentrazioni di manganese in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate.**

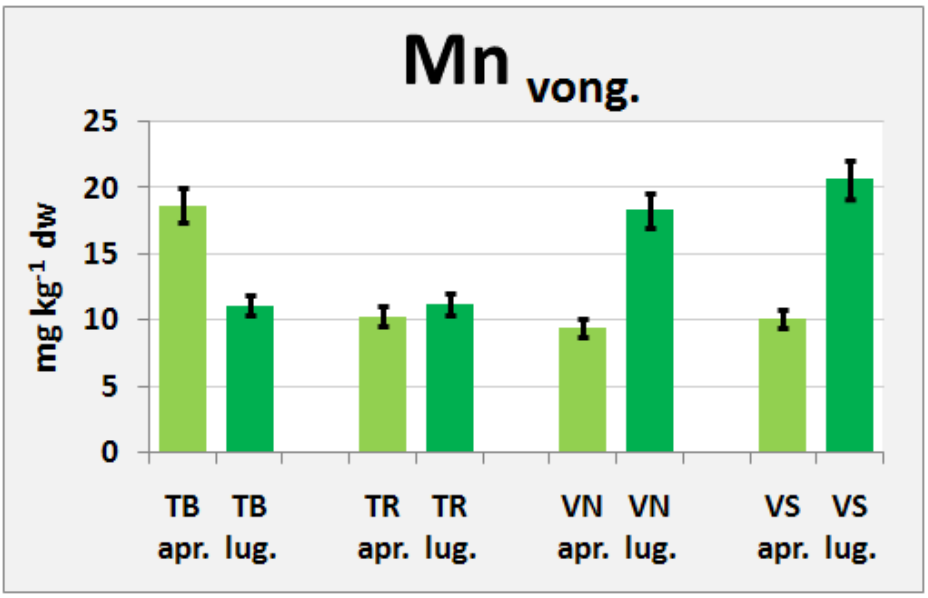



**Fig. 25b: Isogrammi delle concentrazioni di manganese nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.**

Il **nickel** nel sedimento **(Fig. 26a)** è massimo a TB con 104±13 mg/kg, è mediamente inferiore del 40% alle TR e in VS ed è minimo in VN con 37±4,8 mg/kg. Il VN rientra in classe A (< 45 mg/kg) mentre tutte le altre stazioni sono in classe C ( 50< C <150 mg/kg). La concentrazione nelle vongole **(Fig.26b)** è massima in aprile alle TR dove raggiunge 7 mg/kg dw, mentre nelle altre stazioni è compresa tra 4 e 5 mg/kg dw. In luglio le concentrazioni si riducono del 15% alle TR, restano pressoché invariate in TB ed aumentano mediamente del 36% nei Verti.

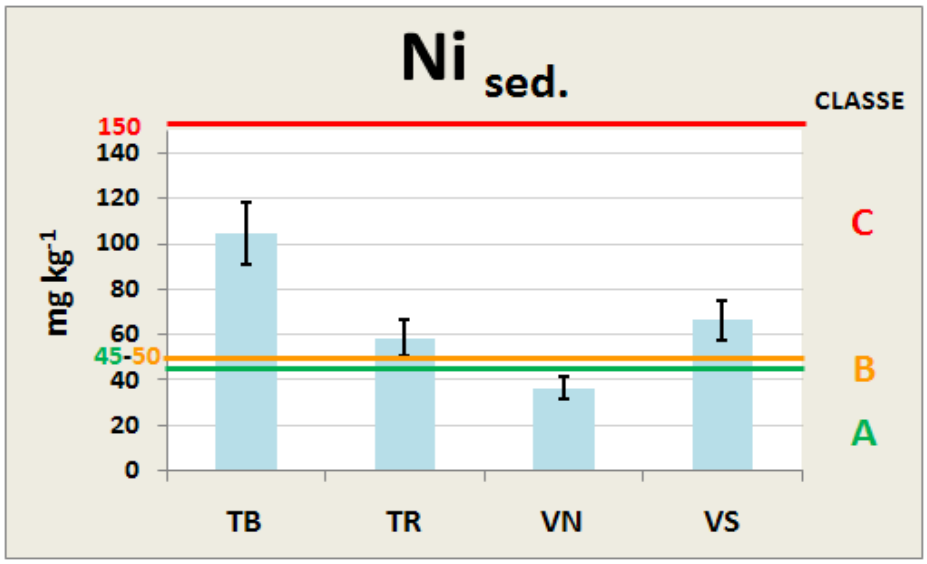



**Fig. 26a: Isogrammi delle concentrazioni di nickel in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate. In verde arancione e rosso sono segnalati i limiti normativi delle classi di inquinamento "A" (45 mg/kg), "B" (50 mg/kg) e "C" (150 mg/kg).**

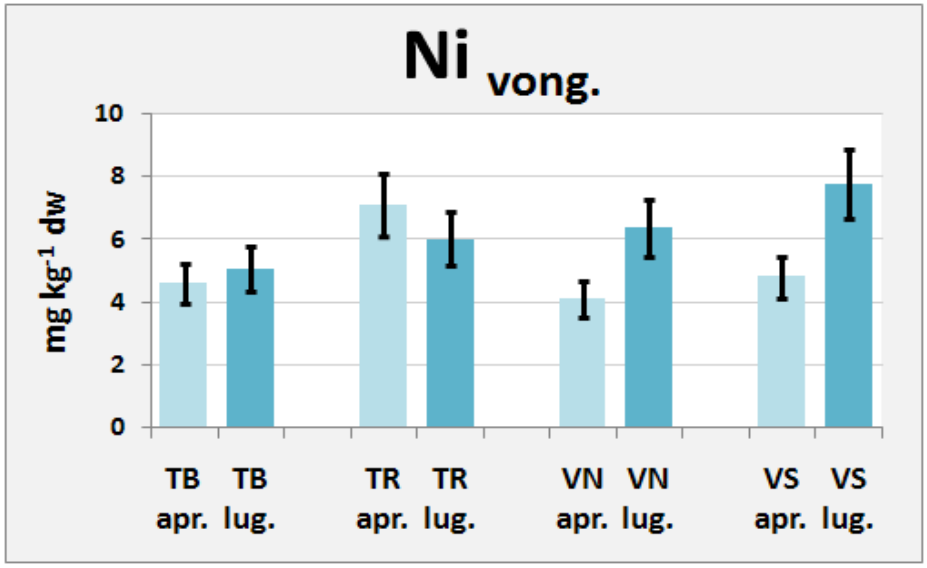



**Fig. 26b: Isogrammi delle concentrazioni di nickel nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.**

Lo **zinco** è massimo nei sedimenti di TB con 90±8 mg/kg, seguono il VN con 80±7 mg/kg e le TR e il VS con una media di 64 mg/kg rientrando tutti in classe A (<200 mg/kg) come sedimento non inquinato **(Fig. 27a)**. Lo zinco nelle vongole riflette l'andamento del sedimento, è massimo in aprile a TB con oltre 200 mg/kg dw, segue il VN con più di 170 mg/kg dw e le TR e il VS con mediamente 140 mg/kg dw. In luglio le concentrazioni si riducono **(Fig. 27b)** a un valore medio di 116 mg/kg dw per TB e le TR e a 137 mg/kg dw per i Verti.

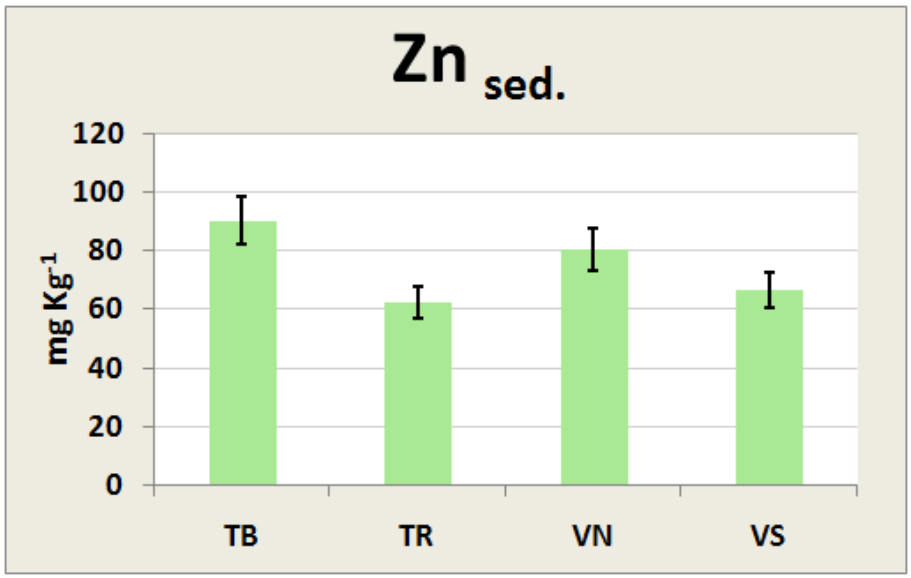



**Fig. 27a: Isogrammi delle concentrazioni di nickel in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate.**

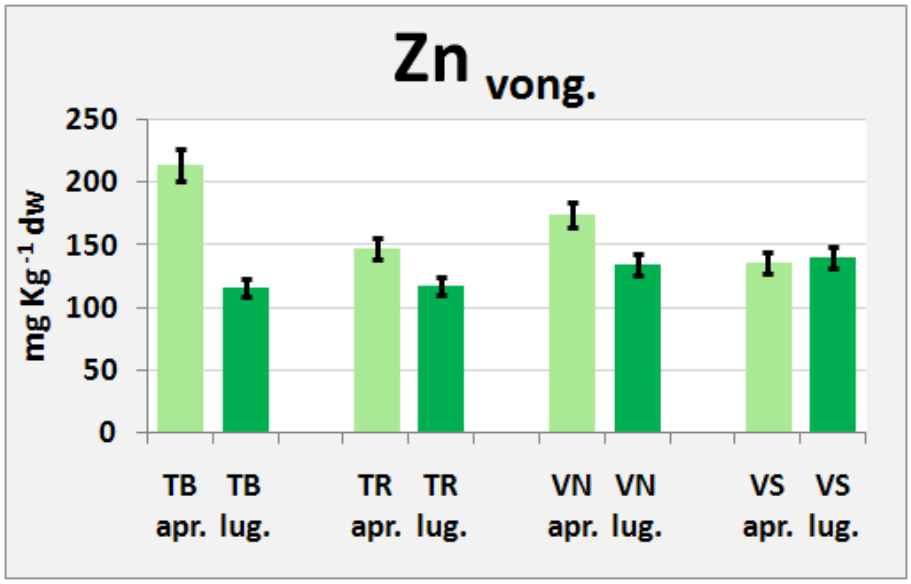



**Fig. 27b: Isogrammi delle concentrazioni di nickel nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.**

Il **cadmio** nel sedimento **(Fig. 28a)** è massimo in TB raggiungendo 0,5±0,1 mg/kg, seguono il VN che raggiunge 0,3 mg/kg e le TR e il VS che oscillano in un intorno di 0,2 mg/kg, rientrano quindi tutti nella categoria A (<1 mg/kg). Nelle vongole i valori di TB in peso secco **(Fig. 28b)** restano invariati intorno a 1 mg/kg dw in entrambe le stagionalità; simile la situazione in aprile per le TR dove in luglio il Cd diminuisce del 52%. Una leggera contrazione dei valori estivi si verifica anche nel VN rispetto ai 2 mg/kg dw primaverili, mentre si verifica un incremento di quasi 7 volte nel VS (da meno di 1 mg/kg dw raggiunge 5,1±0,4 mg/kg dw). La situazione si riflette nel peso umido (poiché il peso secco corrisponde a ca. il 20% del peso umido, le concentrazioni dei metalli riportate al peso umido si riducono dell'80% rispetto al peso secco) con concentrazioni di cadmio nel VS a luglio che raggiungono 0,9±0,1 mg/kg fw rasentando il limite di 1,00 mg/kg valore soglia europeo per la normativa relativa ai molluschi bivalvi **(Fig. 28c)**.

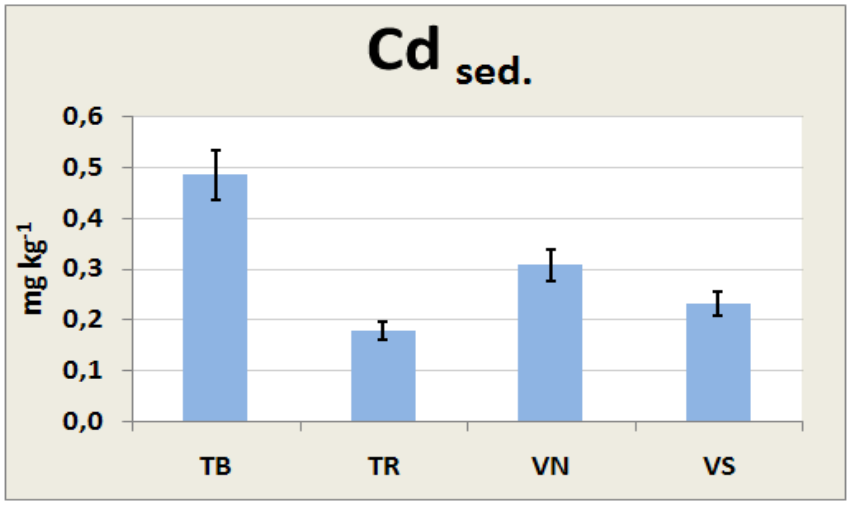



**Fig. 28a: Isogrammi delle concentrazioni di cadmio in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate.**

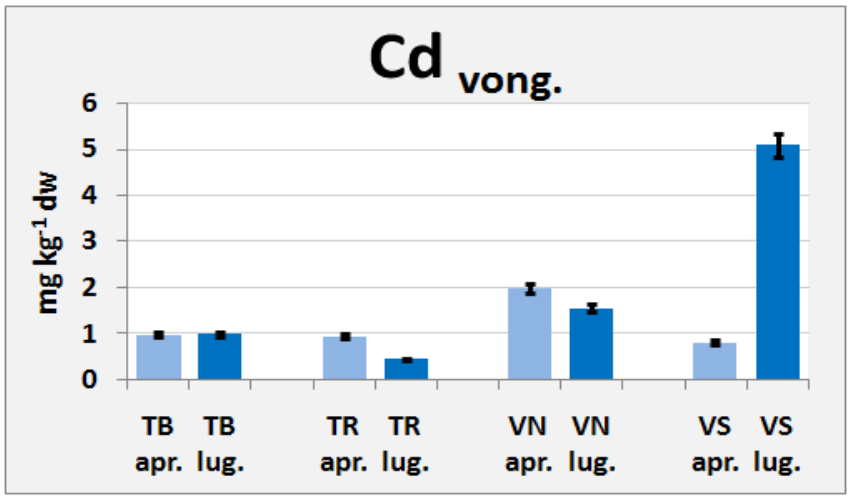



**Fig. 28b: Isogrammi delle concentrazioni di cadmio nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.**

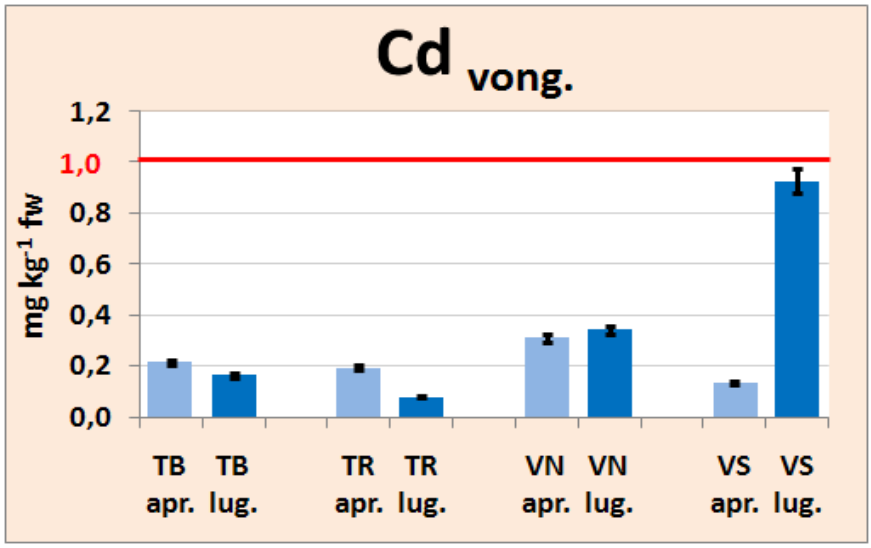



**Fig. 28c: Isogrammi delle concentrazioni di cadmio nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso umido, in aprile e in luglio. In rosso il limite normativo di 1 mg/kg fw.**

Il **mercurio** presenta valori molto bassi nei sedimenti **(Fig. 29a)**, al limite della rilevabilità strumentale e rientra nella classe A (<0,5 mg/kg). Le concentrazioni raggiungono il valore massimo in VN con 0,4±0,1 mg/kg, in TB sono del 27% più basse, e mentre superano di poco 0,1 mg/kg alle TR non li raggiungono in VS. Il tenore di mercurio nelle vongole su base secca **(Fig. 29b)** è massimo in VN dove raggiunge 5,3±0,9 mg/kg dw in aprile mentre rimane costantemente intorno a 0,9 mg/kg dw nelle altre stazioni. In luglio il mercurio si riduce in tutte le stazioni passando mediamente a ca. 0,5 mg/kg dw. Sul peso umido **(Fig. 29c)** gli andamenti di abbassano dell'80%, malgrado questo il mercurio al VN in aprile raggiunge 0,8±0,1 mg/kg fw contro il limite di legge di 0,5 mg/kg fw.

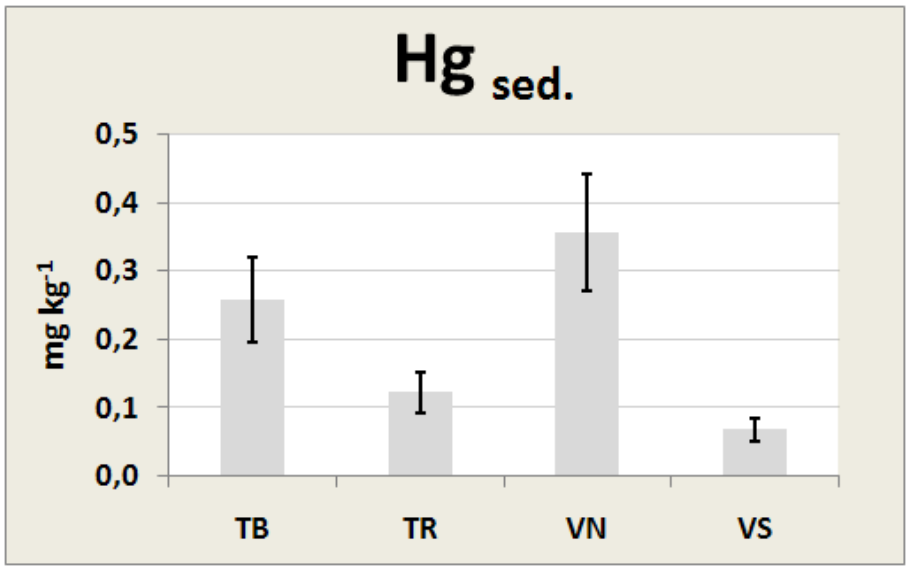



**Fig. 29a: Isogrammi delle concentrazioni di mercurio in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate.**

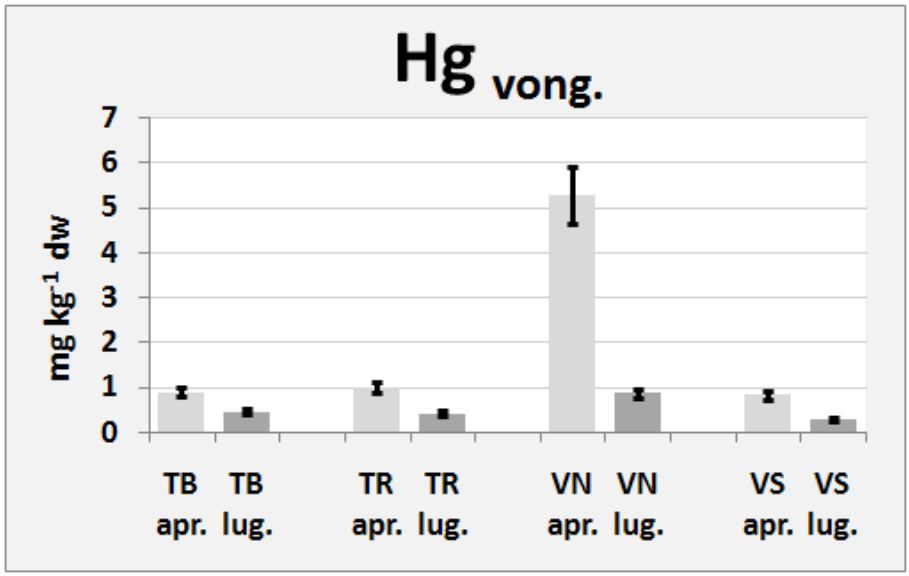



**Fig. 29b: Isogrammi delle concentrazioni di mercurio nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.**

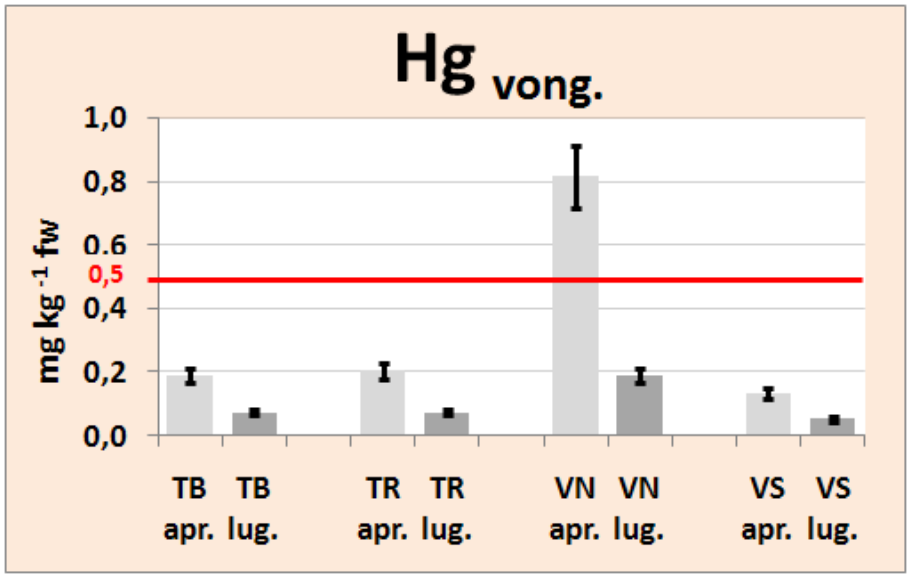



**Fig. 29c: Isogrammi delle concentrazioni di mercurio nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso umido, in aprile e in luglio. In rosso il limite normativo di 0,5 mg/kg fw.**

Il **piombo** nei sedimenti di aprile è minimo alle TR con 5,1±0,2 mg/kg e massimo in TB con 9,4±0,5 mg/kg mentre è simile nei due Verti dove raggiunge mediamente i 7,5 mg/kg **(Fig. 30a)**. Tutte le stazioni si mantengono quindi in classe A (< 45 mg/kg) per i sedimenti. Il Piombo nelle vongole in peso secco **(Fig. 30b)** raggiunge 0,5 mg/kg dw nel VN e si dimezza nel VS, analogamente il metallo raggiunge 0,45 mg/kg dw in TB e si dimezza alle TR. In luglio le concentrazioni sono stabili per TB e per le TR mentre c'è un incremento del 17% nel VN e del 31% nel VS. Le concentrazioni espresse in peso umido, malgrado lievi variazioni, rispecchiano quelle in peso secco e rientrano nei limiti normativi di 1,5 mg/kg fw **(Fig. 30c)**.

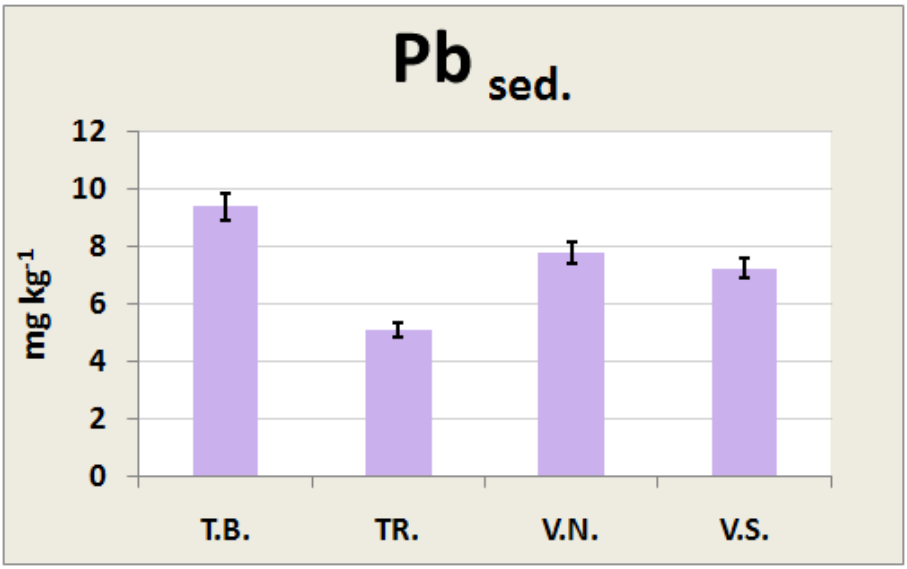



**Fig. 30a:** Isogrammi delle concentrazioni di piombo in aprile nei primi 5 cm di sedimento nelle diverse stazioni indagate.

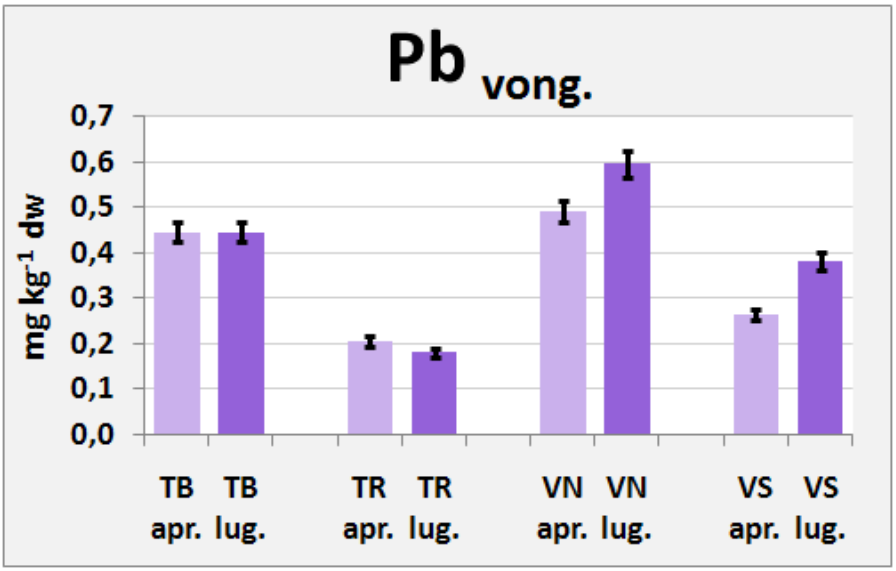



**Fig. 30b:** Isogrammi delle concentrazioni di piombo nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso secco, in aprile e in luglio.

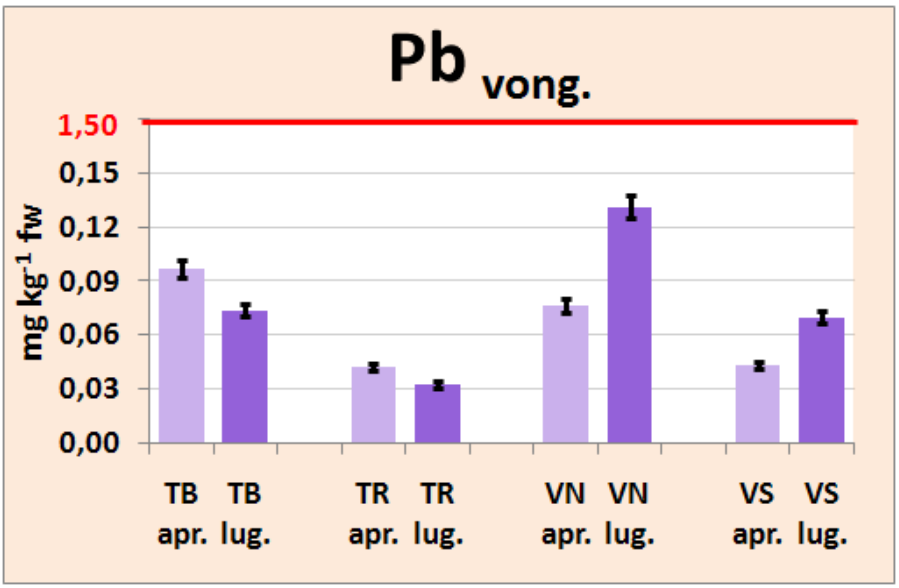



**Fig. 30c:** Isogrammi delle concentrazioni di piombo nei tessuti molli delle vongole delle diverse stazioni, espresse su peso umido, in aprile e in luglio. In rosso il limite normativo di 1,50 mg/kg fw.

# 3.6. Analisi Statistica

Benché siano state effettuate l'analisi di correlazione e l'analisi delle componenti principali è necessario premettere un cauto approccio all'interpretazione dei risultati che benché appaiano significativi sono il risultato di interpolazioni su 8 valori per parametro salvo per i metalli nei sedimenti che sono solo 4 in aprile. L'analisi di correlazione è stata sviluppata sui dati congiunti delle due stagionalità e una regressione per la significatività dei i metalli nel sedimento è stata fatta a parte perché relativa a soli 4 punti.

## *3.6.1. Analisi delle correlazioni*

### *3.6.1.1. Parametri dell'acqua*

Il coefficiente di Pearson più alto e significativo è la temperatura (sia dell'aria che dell'acqua) che (come atteso) mostra una correlazione inversa con ossigeno e nitrati e una diretta con la salinità, indicando un'ingerenza delle acque marine sull'ecologia del sistema **(Tab. 1, allegato A)**. Segue l'Eh dell'acqua che mostra correlazioni significative dirette con nitriti, nitrati e particolato e inversa con il fosforo reattivo e la clorofilla totale. Un particolato inverso alla clorofilla suggerisce che questo parametro sia influenzato da fattori non naturali (transito di navi e pesca). Desta interesse anche la forte correlazione inversa tra silicati disciolti e la clorofilla-a totale, indicando che il principale contributo al plancton è dato dalle diatomee a guscio siliceo.

### *3.6.1.2. Parametri del sedimento*

La sabbia mostra una correlazione inversa altamente significativa con la profondità **(Tab. 2, allegato A)** e, come atteso, Il fosforo organico è inversamente correlato con la densità del sedimento (un sedimento sabbioso, quindi molto denso presenta una minore frazione organica). Contrariamente alle attese il fosforo nei sedimenti mostra invece una correlazione negativa con il pH dell'acqua, suggerendo una deviazione dagli equilibri naturali.

### *3.6.1.3. Test in vivo*

Il test di sopravvivenza all'aria, espresso come LT50, mostra una correlazione diretta con la quantità di ossigeno disciolto ed una correlazione inversa con la temperatura dell'aria e dell'acqua e con la salinità **(Tab. 3, allegato A)**, ma non rivela alcuna correlazione con i contaminanti inorganici misurati. Il test del riaffossamento non evidenzia alcuna correlazione con i parametri ambientali, mentre c'è una correlazione con l'indice di condizione delle vongole **(Tab. 5 allegato A)**.

### *3.6.1.4. Parametri biochimici e fisiologici*

Il parametro più significativo è la correlazione inversa tra proteine e carboidrati totali **(Tab. 4, allegato A)**. Le vongole bruciano le riserve di glicogeno nel periodo riproduttivo estivo per produrre le uova altamente proteiche così si verifica un aumento di proteine e una riduzione dei carboidrati **(Fig. 11a e 11b)**. Tale variazione sarà quindi influenzata dalla temperatura con cui le proteine sono correlate, viceversa il quantitativo di carboidrati è legato alla quantità di ossigeno disciolto. La percentuale delle ceneri è direttamente proporzionale al quantitativo di silicati in acqua e alla quantità di proteine mentre è inversamente proporzionale ai carboidrati e al quantitativo di clorofilla-*a*. L' ALP non mostra correlazioni con i contaminanti inorganici, biologici o ambientali benché vi sia una correlazione inversa con il pH dell'acqua.

Il rapporto F/TOT è correlato solo con l'Eh dell'acqua e l'indice di condizione con l'ossigeno disciolto e l'ET50 **(Tab. 5, allegato A)**. La densità di *Cerastoderma* è correlata all'indice del seme e alla densità di *Ruditapes*. Questo è probabilmente dovuto al peso statistico del VN che era la stazione più ricca di seme ed anche la più densamente popolata di *Cerastoderma*. Analogamente si trovano correlazioni significative ed altamente significative tra la densità di *Musculista*, alta anch'essa nel VN, e le taglie di 10-15 e 5-10 mm, che sono le taglie inferiori.
Per quanto concerne le vongole di taglia maggiore: c'è una correlazione inversa delle taglie di 20-25 mm con la temperatura e con la percentuale di sabbia e

una correlazione diretta con profondità, ossigeno disciolto ed ET50. Le taglie maggiori sono legate alla concentrazione di ammonio nell'acqua e al fosforo organico nel sedimento.

### 3.6.1.5. Metalli nelle vongole

Tra I metalli tossici, sia quelli soggetti alla normativa europea (Hg, Cd, Pb) che quelli non regolamentati (As, Cr), quello che presenta le maggiori correlazioni nelle vongole è l'arsenico. Questo è direttamente correlato alla temperatura e al contenuto proteico mentre è inversamente correlato con l'ossigeno disciolto, la percentuale di carboidrati, l'indice di condizione e la taglia di 25-30 mm. Il cromo è direttamente correlato solo con la profondità **(Tab. 6, allegato A)**.
Il cadmio mostra una relazione negativa con i carboidrati mentre è direttamente correlato al contenuto di ceneri. Il piombo è inversamente correlato al pH del sedimento e quindi (come già sottolineato) anche alle feofitine in acqua, mentre è direttamente correlato alla quantità di silicati nelle acque e al ferro nelle vongole. Il mercurio nelle vongole appare correlato con l'indice del seme, con la densità di vongole e *Cerastoderma* (relazione probabilmente influenzata dalle alte concentrazioni di mercurio nelle vongole presenti nel VN).
Tra i metalli meno tossici o fisiologici nelle vongole, il ferro è quello che rivela il maggior numero di correlazioni (legate soprattutto alle variazioni biochimiche stagionali) dirette con proteine, ceneri e silicati disciolti e naturalmente inverse con i carboidrati. Il manganese è correlato con il ferro e ne imita le correlazioni. Lo zinco mostra una correlazione altamente significativa con i nitrati in acqua invece il nickel è correlato alla concentrazione di cromo.

### 3.6.1.6. Metalli nel sedimento

I metalli nel sedimento di aprile sono stati correlati solo con i parametri di aprile e poiché la significatività delle correlazioni è debole (le stazioni sono solo quattro) vengono considerati solo i parametri altamente significativi. Il cromo nel sedimento mostra una correlazione con il manganese. Quest'ultimo a sua volta

mostra una buona correlazione con il fosforo inorganico e il rame è direttamente correlato al ferro nelle vongole **(Tab. 7, allegato A)**.

### 3.6.2. Analisi delle componenti principali

L'analisi delle componenti principali (PCA) restituisce 5 fattori che descrivono l'86.8% della varianza **(Tab. 8, allegato A)**. I fattori 1 e 2 e i fattori 3 e 4 sono stati utilizzati per costruire due prospetti bidimensionali dello spazio vettoriale che descrivono il 45.5% e il 31.6% della varianza rispettivamente. Questi due grafici congiunti permettono di interpretare agevolmente il 77% della varianza.

Nel primo grafico **(Fig. 31a)** il fattore 1 evidenzia un'elevata significatività positiva per la salinità, la temperatura, la percentuale di proteine e la concentrazione di ferro ed arsenico nelle vongole. I valori significativi negativi per il fattore 1 sono invece la percentuale di carboidrati, l'ossigeno disciolto, l'LT50 di sopravvivenza all'aria, le taglie di 20-25 mm e di 25-30mm. Per quel che concerne il fattore 2 i valori significativi positivi sono la densità di *Ruditapes* e di *Cerastoderma*, le taglie giovanili di 10-15 e 15-20 mm e il mercurio nelle vongole, mentre quelli negativi sono le tre lunghezze (altezza, lunghezza e spessore). Nel secondo grafico **(Fig. 31b)** sono rappresentati i fattori 3-4. I valori significativi e positivi per il fattore 3 sono: l'Eh dell'acqua e il particolato sospeso mentre i valori negativi sono l'RP e la clorofilla nelle acque. Il fattore 4 ha come valori significativi positivi la densità del sedimento e la concentrazione di nickel nelle vongole mentre come valore negativo ha il solo fosforo organico nel sedimento. Il quinto fattore infine, non rappresentato graficamente, presenta un solo valore significativo positivo: l' ALP.

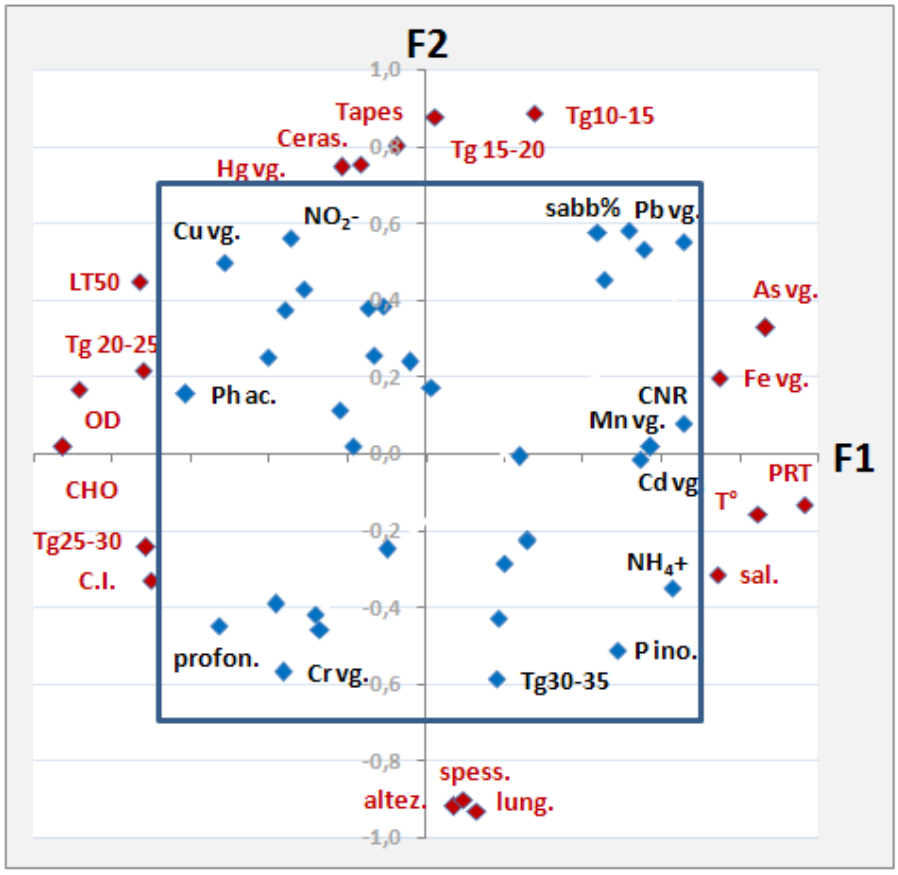



**Fig. 31a:** prospetto bidimensionale dei fattori 1 e 2 della PCA. In rosso i pesi fattoriali > 0.70.

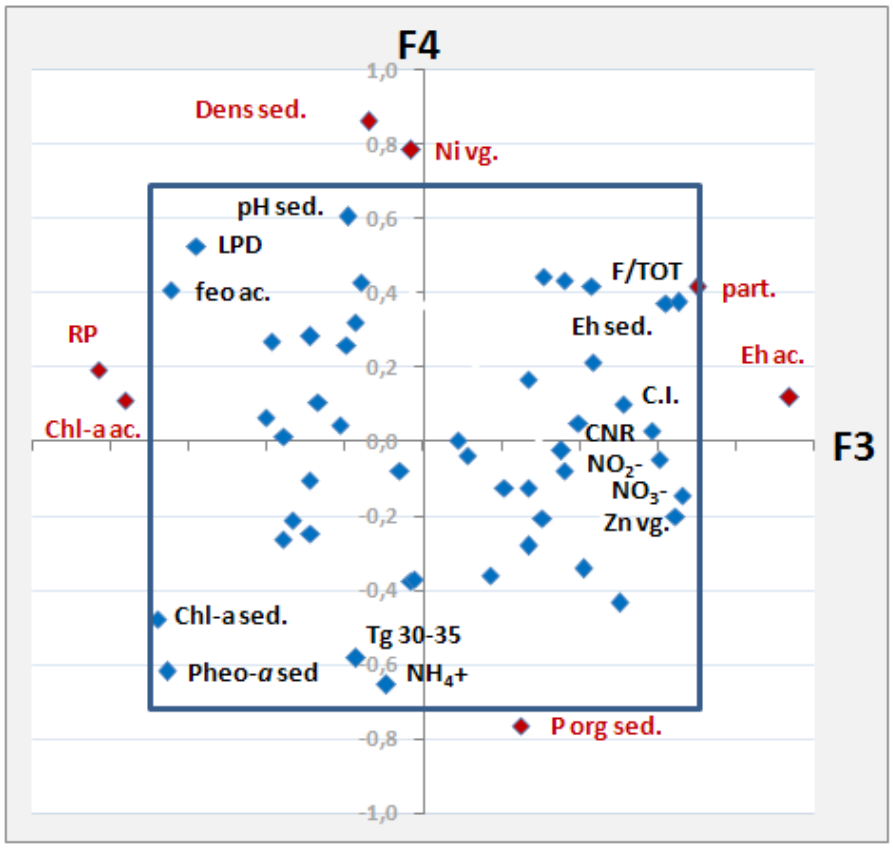



**Fig.31b:** prospetto bidimensionale dei fattori 3 e 4 della PCA. In rosso i pesi fattoriali > 0.70.

# 4. Discussione

Questo studio si prefigge di valutare lo stato di salute complessivo delle aree in cui è ancora possibile trovare la vongola filippina nel bacino centrale della laguna di Venezia e di verificare le condizioni della stessa in questi ultimi habitat rifugio.

Come si evince dalla PCA, sia dai parametri significativi più importanti che dalle variabili prossime alla significatività, è possibile distinguere sul grafico **(Fig. 31a)** due importanti gruppi di parametri che si muovono insieme, cosicché le vongole ricche di carboidrati, di taglia maggiore nel seme (20-25 mm) e di adulti (25-30 mm), con alta resistenza al test di sopravvivenza all'aria vivono in ambienti ossigenati con pH alcalini e sono più ricche di rame nei tessuti. Viceversa all'aumentare delle temperature, passando alla stagione estiva, le vongole bruciano i carboidrati per produrre i gameti, soprattutto le femmine, e aumentano le percentuali di Proteine e Ceneri. Tali parametri sono associati a maggiori concentrazioni di ferro e arsenico e (non significativamente) di cadmio e manganese nei tessuti molli. Le vongole si trovano in ambienti più ricchi di ammonio nelle acque e con più fosforo inorganico nel sedimento. Osservando il primo grafico della PCA dal basso verso l'alto, seguendo il secondo fattore, si nota come le tre misure, (lunghezza, altezza e spessore) siano strettamente legate tra loro e come siano invece inversamente correlate ai parametri della parte alta del grafico, che sono le taglie del seme dei 15-20 mm e dei 10-15 mm e le densità di *Ruditapes* e *Cerastoderma*, indicando che nelle stazioni con le densità maggiori prevalgono le taglie più piccole e quindi di "misura" ridotta. Tali stazioni, riconducibili principalmente al VN, considerato nelle due stagionalità, hanno una maggior concentrazione di mercurio e (non significativamente) di piombo nei tessuti molli delle vongole. Il secondo grafico della PCA **(Fig. 31b)** completa le informazioni descritte nel primo e svela attraverso altri due fattori nuove tendenze, cosicché le stazioni con le densità del sedimento più basse hanno più fosforo organico e una minore quantità di nickel nelle vongole, sono più ricche di ammonio nelle acque così come di clorofilla-*a* e di feofitine nel

sedimento. Viceversa seguendo il grafico orizzontalmente, dove c'è meno clorofilla-*a* e meno RP nelle acque, il particolato sospeso è più alto e c'è un maggior numero di femmine mature sul totale, l'acqua ha un Eh più ossidato ed è più ricca di nitriti e nitrati, la concentrazione di zinco nelle vongole è maggiore come pure l'indice di condizione e l'LT50. Globalmente si passa da ambienti con condizioni più riducenti e ricchi di clorofilla-*a* e fosforo ad ambienti più ossidati e ricchi di azoto.

# 4.1. Raffronto con i dati di letteratura

## *4.1.1. Parametri dell'acqua e del sedimento*

I valori dei parametri fisico-chimici nelle due stagioni sono stati confrontati con quelli descritti in Sfriso *et al.* (2005a) che fanno riferimento ai valori medi degli anni '92-'93 e '98-'99 nell'area di Fusina, a metà strada tra i Verti e le Tresse. Il pH e l'Eh dell'acqua sono negli intervalli di variazione stagionale. Si nota un andamento decrescente nelle concentrazioni di DIN e di RP nelle acque dall'inizio degli anni '90, fino all'anno 2000 e al 2013. La clorofilla-*a* tot decresce progressivamente dal '92-'93 al '98-'99 riducendosi di ca. 3 e 8 volte rispettivamente. I sedimenti invece benché le stazioni siano vicine hanno percentuali di sabbia molto diverse data la variabilità dell'area in questione, ciò comporta che il contenuto di nutrienti ed inquinanti sia sensibilmente diverso. Infatti alle TR le concentrazioni delle tre frazioni di fosforo sono dalle 2 alle 3 volte inferiori a quelle rilevate da Sfriso *et al.*(2005a). Globalmente si osserva una riduzione dei valori medi dei nutrienti anche nelle acque **(Tab. 9, allegato A ).**

## *4.1.2. Test in vivo*

I test tossicologici messi a punto da Phelps (1989) con *Mya arenaria* Linnaeus rivelano dei tempi di riaffossamento di 45 minuti nei sedimenti di controllo. Da Ros *et al.* (2005a) hanno effettuato test in vivo su *Ruditapes philippinarum* proveniente dalle aree di concessione e da Marghera in marzo ed agosto, con valori di ET50 che si assestano rispettivamente in marzo su 35 e 139 minuti e in agosto su 15 e 25 minuti. I valori di ET50 rinvenuti nelle stazioni in aprile sono confrontabili con i valori di marzo citati nell'articolo, mentre i valori di luglio, escludendo i 200 minuti di TB, vanno da 38 a 80 minuti sono quindi mediamente superiori a quelli indicati per il mese di agosto dagli autori. I dati per l'LT50 nel medesimo lavoro si attestano intorno a 8-5 giorni per le concessioni e a 4 giorni per Marghera. In aprile i valori degli LT50 sono di 5 giorni per TB e di 7 giorni per le altre stazioni, indicando ai Verti un livello di stress paragonabile a quello delle concessioni e per TB e le TR con i livelli di Marghera. I dati di luglio sono

difficilmente confrontabili perché compromessi dalle temperature più alte in cui è stato effettuato il test. Moschino *et al*. (2012) suggeriscono che valori inferiori ai 6 giorni siano indicativi di uno stato di deterioramento.

### 4.1.3. Parametri biochimici e fisiologici

Carboidrati e proteine hanno dimostrato avere una correlazione inversa altamente significativa cosicché al sopraggiungere dell'estate, quando i fenomeni di stress dovuti alla riproduzione stessa e alla raccolta delle vongole sono più intensi e c'è una maggiore richiesta energetica, i carboidrati sono le riserve che vengono consumate per prime, e subiscono sebbene con diversa entità, una drastica riduzione al cambio di stagione. Tale riduzione viene compensata da un aumento nella percentuale di proteine, che sono il maggior costituente dei tessuti molli dei bivalvi e degli oociti, mentre i lipidi rimangono pressoché inalterati. In Plana *et al.* (1996) viene confermato l'utilizzo preferenziale dei carboidrati (il glicogeno è il primo componente ad essere catabolizzato) sulle proteine e Perez *et al.* (2003) sottolineano come i lipidi siano una riserva principe che comincia ad essere consumata solo quando la maggior parte dei carboidrati è stata utilizzata venendo mantenuta il più a lungo possibile anche in condizioni di bilancio energetico negativo. Gli autori sottolineano l'utilità di separare i maschi dalle femmine per le determinazioni biochimiche poiché i due sessi hanno approcci diversi all'accumulo e all'uso delle riserve e allo scopo di evidenziare eventuali correlazioni dei parametri è stato stimato il rapporto F/TOT che non ha rivelato alcuna correlazione significativa con i parametri biochimici, benché nella stazione con il maggior numero di femmine ci sia stato il maggior consumo di carboidrati. L'indice di condizione come rappresentato in Da Ros *et al*. (2005b) è minimo in gennaio con il 3-4% a sant'Angelo e Chioggia

Per quel che concerne gli ALP Matozzo & Marin (2005 e 2007) concordano nell'attribuire alle femmine di *Ruditapes philippinarum* un maggior incremento nelle quantità di ALP rispetto ai maschi. Gli organismi campionati in Laguna di Venezia in gennaio evidenziano un contenuto che oscilla tra 2 e 4,5 µg/mg; in giugno i maschi e le femmine aumentano le concentrazioni portandosi fino a

circa 13 e 15 µg/mg, rispettivamente. Considerando che i valori di letteratura sono spesso riferiti a concentrazioni nell'emolinfa o in specifici tessuti, i valori trovati non sono facilmente confrontabili con le concentrazioni nel pool globale di organismi anche se le concentrazioni rinvenute in aprile rientrano nel "range" dei valori delle ghiandole digestive. Benché in luglio subiscano un lieve incremento non è così marcato come quello rivenuto da Matozzo e Marin, è quindi possibile che tale variazione nel "pool" di vongole venga mascherata. Questo viene confermato dall'assenza di correlazioni con i parametri legati alla riproduzione, mentre è visibile una correlazione con il pH: all'aumentare del pH nell'acqua gli ALP diminuiscono.

### *4.1.4. Metalli nel sedimento e nelle vongole*

I valori mediati dei metalli sono stati tabulati e confrontati **(Tab. 10, allegato A)**: con le concentrazioni medie trovate da Sfriso *et al*. (2008) sui sedimenti superficiali nell'area di Fusina; con i dati di Zonta *et al*. (2007), che media i valori dei sedimenti superficiali dell'area antistante il porto industriale di Marghera dal VN ad oltre le TR; con le informazioni fornite da Moschino *et al*. (2011a) sul tenore di metalli delle vongole e del sedimento davanti alle TR e con le concentrazioni che fornisce Zhao *et al*. (2012) su alcuni metalli nei bivalvi e nel sedimento superficiale della costa cinese di Dalian.

Le differenze più evidenti rispetto agli autori suddetti riguardano il cromo e il mercurio nelle vongole in cui le concentrazioni sono mediamente 2-3 e 4-25 volte maggiori di quelle trovate a Fusina e sulla costa di Dalian, rispettivamente. Seguono per i sedimenti il cromo rispettivamente 2, 6, 4 e 6 volte più alto che in Sfriso *et al*., Zonta *et al*., Moschino *et al*. e Zhao *et al*. Il nickel è 3 e 4 volte più alto che in Zonta *et al*. e Moschino *et al*. e il cadmio e il mercurio sono rispettivamente 3 e 25 volte più alti rispetto a quelli indicati nei lavori di Moschino *et al*. e Zhao *et al*. Globalmente è possibile dedurre una maggior concentrazione rinvenuta in questo studio di cromo e mercurio sia nei sedimenti che nelle vongole e di nickel nel solo sedimento. Il piombo nei sedimenti e nelle vongole e

il cadmio nei sedimenti sono mediamente inferiori rispetto ai dati della letteratura.

L'analisi di correlazione **(Tab. 7, allegato A)** non ha rivelato correlazioni significative tra i metalli totali nelle vongole e nel sedimento salvo per lo zinco, fatto confermato nello studio di Moschino *et al*. (2012).

## 4.2. Stato complessivo delle stazioni

Partendo da Venezia e avvicinandosi alla linea di costa della terraferma si giunge alla stazione delle **Tresse**, un sito che dalla primavera all'estate cambia radicalmente, soprattutto in virtù del suo maggior livello di confinamento e della vicinanza alle zone compromesse dall'anossia estiva di quest'anno. Questa stazione, benché sia quella che è cambiata di più, non ha subito tra aprile e luglio la raccolta meccanica delle vongole, fatto visibile anche a occhio nudo, per le elevate biomasse macroalgali uniformemente presenti (**Fig. 32**). L'operazione non è permessa e solitamente non viene effettuata per motivi igenico-sanitari, in quanto l'isola non solo fronteggia il porto industriale di Marghera ma è anche la sede di deposito definitivo dei fanghi inquinati (classe "C") di Venezia, ciò si riscontra soprattutto nell'aumento delle densità e delle biomasse di vongole, che decrescono invece in tutte le altre stazioni, dimostrando così che le vongole filippine hanno resistito all'ipo-anossia e che questa, rispetto alle operazioni di dragaggio dei fondali, è stata pressoché ininfluente sulla densità di vongole che sono addirittura incrementate. Per quanto riguarda i contaminati inorganici nel sedimento è complessivamente la stazione meno inquinata, benché rientri in classe B per la concentrazione di cromo nel sedimento e ancorché l'ALP, l'ET50 e l'LT50 indichino, soprattutto in aprile, la presenza di un agente stressante per le vongole. Tutti questi parametri in luglio si capovolgono rendendola una delle stazioni migliori per la vita dei bivalvi. Curiosamente ci si aspetterebbe una maggior variazione dei rapporti biochimici, anche in base all'ampia variazione dell'indice di condizione, che invece rimangono nella stazione pressoché inalterati, malgrado una piccola riduzione nella percentuale dei carboidrati che sono comunque i più alti tra tutte le stazioni, indicando un ridotto impatto sulle riserve energetiche nel cambio di stagione (anossia + riproduzione). Per quanto riguarda lo stato trofico la stazione presenta le concentrazioni maggiori di clorofilla-*a* tot nelle acque sia in aprile che in luglio, quindi è la stazione più ricca di plancton, inoltre soprattutto a causa dei fenomeni ipo-anossici, l'RP nelle acque disponibile per la crescita delle microalghe (in seguito al declino delle biomasse macroalgali) è incrementato più

che in tutte le altre stazioni. Globalmente la stazione non presenta, almeno per quel che concerne i metalli pesanti, le pessime condizioni attese e si rivela un sito produttivo e tutto sommato idoneo alla crescita dei bivalvi, benché rientri in classe "C" per il nickel nei sedimenti (**Tab. 11, allegato A**) e malgrado i dati di letteratura segnalino la presenza di inquinamento di natura organica nei sedimenti e nelle vongole (parametri che non sono stati misurati in questo studio). Moschino *et al*. (2011a) evidenziano per l'estate del 2004 la presenza rispettivamente nei bivalvi e nei sedimenti di 0,312 e 1,782 mg/kg di idrocarburi policiclici aromatici (PAH) (classe "B": 1-10 mg/kg per ΣPAH) e di 0,071 e 0,006 mg/kg di policlorobifenili (PCB) (classe "A": valori < 0,01 mg/kg per ΣPCB). Zonta *et al*. (2007) indicano per i sedimenti superficiali del il porto industriale una concentrazione di 0,168 e 0,011 mg/kg per ΣPAH e ΣPCB, rispettivamente.

**Fig. 32: Tresse in aprile e in luglio con dettaglio della copertura algale.**

Seguendo la linea del Canale dei Petroli venendo da Porto Marghera si giunge a lato delle "dighette" nella stazione di **Torretta Bianca**, l'area con le densità e le biomasse minori di vongole dopo il VS. In questa stazione la quantità di *Ruditapes* è diminuita tra aprile e luglio rendendone difficoltoso il campionamento. Tale stazione è seriamente influenzata dalla raccolta delle vongole, ben visibile per il fondo nudo sfregiato da profondi solchi e per la totale scomparsa selettiva delle taglie del seme passando dalla primavera all'estate. La stazione risente dell'influenza fisica del passaggio delle navi nel "Canale dei Petroli" che, malgrado lo sbarramento delle "dighette" ormai parzialmente sprofondate, generano onde molto alte che a loro volta posso incidere sulle popolazioni bentoniche. Inoltre le acque del Naviglio del Brenta e dei canali dell'area industriale (e relativi inquinanti) seguendo le correnti di marea uscenti defluiscono oltre le "dighette" e si disperdono in quest'area venendo poi filtrate dai bivalvi **(Fig. 33)**.

**Fig. 33: Immagine satellitare da Google maps, indicato dalla freccia il "plume" che oltrepassa lo sbarramento delle "dighette" disperdendosi verso Torretta bianca.**

I rapporti biochimici per le vongole di quest'area si modificano in favore della componete proteica come per le altre stazioni e l' ALP è massimo sia in aprile che in luglio (non influenzato quindi dalla riproduzione) segnalando la presenza di un possibile agente estrogenico per i bivalvi. Analogamente i valori di LT50 sono minimi e quelli di ET50 sono massimi in entrambe le stagionalità e concordando nell'attribuire alla stazione le peggiori condizioni di stress tra i siti esaminati. Per quanto riguarda lo stato trofico dell'area in aprile sono state rinvenute quantità infinitesimali di plancton, che sono aumentate in luglio rientrando nella norma delle altre stazioni, mentre i nitrati alti in primavera si riducono a un valore medio comune in estate. L'influenza dell'anossia in TB è stata molto minore rispetto alle TR, visibile soprattutto per la minore variazione nella quantità di RP nelle acque. Per quanto riguarda lo stato trofico dell'area, in aprile sono state rinvenute quantità infinitesimali di plancton che sono aumentate in luglio rientrando nella norma delle altre stazioni, mentre i nitrati alti in primavera si sono ridotti a un valore medio comune in estate. L'influenza dell'anossia avvenuta nell'area di san Giuliano e Campalto in TB è stata molto minore rispetto alle TR ed è risultata visibile soprattutto per la minore variazione nella quantità di RP nelle acque.

Per quanto riguarda i metalli nei sedimenti, eccetto arsenico e mercurio, sono risultati maggiori che nelle altre stazioni. Per il cromo e il nickel i sedimenti rientrano in classe "C" come sedimenti inquinati (**Tab. 11, allegato A**); malgrado ciò non sono state rinvenute correlazioni con i test in vivo che lascino supporre che lo stress segnalato sia giustificato solamente dalla presenza di questi inquinanti. Non si esclude la possibile presenza di contaminanti organici, che nella limitrofa area industriale sono notoriamente piuttosto elevati e potrebbero aver compromesso lo stato della stazione. Sommariamente TB **(Fig. 34)** è il sito che risulta più impattato e che più risente degli agenti stressanti presenti (Sfriso *et al.*, 2012; Guerzoni *et al.*, 2007; Racanelli *et al.*, 2004).

**Fig. 34 : Immagine della stazione di Torretta bianca.**

A lato di Fusina e del Naviglio del Brenta, si trova la stazione del **Verto Nord (Fig. 35)**, la più produttiva tra i siti esaminati per tutte le specie di bivalvi conteggiate e l'unica in cui sono stati ritrovati alcuni individui di *Ruditapes decussatus*, ormai molto raro in Laguna di Venezia. Queste alte densità e biomasse, costituite in aprile prevalentemente da organismi di 25-30 mm, si riducono più del 50% in luglio favorendo la crescita del bivalve invasivo *Musculista*. Il VN tra i campionamenti di aprile e di luglio è stato impattato dalla raccolta del seme di vongola con una riduzione del 51% del seme presente, mentre il numero di vongole adulte si è ridotto del 28%. I valori di LT50, al VS sono i migliori tra le stazioni campionate in aprile e sono simili ai valori delle TR di luglio; similmente gli ET50 sono tra i più bassi, leggermente più alti in aprile indicando una potenziale fonte di disturbo, ma designando sommariamente la stazione come una delle meno stressate. La disponibilità di plancton, stimata attraverso la clorofilla-*a* nelle acque è risultata sulla media e pressoché uguale a quella del VS e si è mantenuta inalterata nelle due stagionalità mentre la concentrazione di

clorofilla-*a* nel sedimento superficiale, che era la più alta in aprile, ha mostrato una brusca contrazione in luglio, testimoniando un probabile disturbo nel sedimento. Le vongole in questa stazione presentano valori di ALP sulla media in entrambe le stagionalità così come una brusca riduzione nel contenuto di carboidrati totali, che indica l'avvenuta attività riproduttiva.

**Fig. 35 : Immagine del Verto Nord in luglio.**

La stazione complessivamente rientra in classe "B" per il cromo, benché al limite inferiore della classe "C", risulta quindi la migliore quanto a contaminazione da metalli nel sedimento ma è l'unica che in aprile ha superato il limite normativo per il mercurio nei tessuti dei bivalvi (**Tab. 11, allegato A**), che si è poi drasticamente ridotto in luglio rientrando nei limiti. Malgrado le concentrazioni del mercurio nei sedimenti fossero entro il limite della classe "A", nel VN erano le più alte, favorendo probabilmente un bioaccumulo di mercurio da parte dei bivalvi (nelle vongole il metallo è di un ordine di grandezza più alto rispetto al sedimento), benché l'analisi di correlazione non riveli relazioni significative tra le concentrazioni del mercurio totale nei bivalvi e nei sedimenti. L'area

globalmente è la più produttiva e ricca di seme ed è l'unica in cui è stata rinvenuta la vongola verace *Ruditapes decussatus* che designa la stazione come una delle migliori per la vita dei molluschi bivalvi.

Proseguendo oltre la prima "Cassa di Colmata" si incontra una seconda rientranza il **Verto Sud (Fig.36)**, l'ultima stazione di campionamento. Quest'area presenta altissime densità di *Solen marginatus*, specialmente nell'area più esterna, ma le densità di vongole più basse tra quelle misurate, con una distribuzione percentualmente costante tra tutte le taglie. In luglio si osserva la totale scomparsa delle taglie del seme e un deciso incremento delle taglie sopra i 25 mm, questo è giustificato dal fatto che anche questo bassofondo sabbioso è stato adibito, assieme al VN, alla raccolta del seme di vongola. Tali operazioni disturbano anche i *Solen marginatus* che, benché non vengano raccolti dalle rasche meccaniche perché troppo profondi, hanno dimostrato segni di sofferenza ed estrema difficoltà a riaffossarsi per parecchi giorni successivi alle campagne di raccolta. L'ET50 è il più basso in aprile e l'LT50 il più alto, indicando per i bivalvi una condizione di stress minima. In estate gli ET50 si alzano e gli LT50 sono minimi indicando una situazione di stress dovuta molto probabilmente al disturbo provocato dai bagnanti e dalla raccolta intensiva di bivalvi da parte della popolazione veneziana e dei pescatori. Questa stazione è l'unica in cui il rapporto F/TOT aumenta in luglio, in cui i carboidrati sono diminuiti di più a favore delle proteine, raggiungendo il 50% del peso secco degli organismi e in cui l'ALP è minimo, suggerendo che questa sia la stazione più fertile quanto ad attività riproduttiva delle vongole. Tale affermazione è tuttavia parzialmente contraddetta dall'indice di condizione, del quale ci si aspetterebbe una diminuzione (a seguito dell'espulsione delle uova), questo invece resta sommariamente invariato e mostra una correlazione inversa con l'arsenico nelle vongole che è massimo nei Verti (tra 0,6 e 1 mg/kg dw), suggerendo una possibile influenza del metallo sullo stato di salute e sulla riproduzione.
Quanto alla contaminazione da metalli, c'è un bioaccumulo di cadmio nei tessuti molli delle vongole che raggiunge quasi il limite normativo di 1 mg/kg fw in luglio, di un ordine di grandezza maggiore rispetto al sedimento, malgrado le

concentrazioni di cadmio nel sedimento rientrino nei limiti della classe "A". Il cromo e il nickel nel sedimento sono i più alti dopo TB e rientrano nel VS nella categoria "C" (**Tab. 11, allegato A**).

Il VS, scelto inizialmente come stazione bianco per questo studio, in virtù degli alti ricambi d'acqua e dei sedimenti ossidati (Eh medio 200 mV in entrambi i campionamenti) oltre che per gli indici di stress migliori in aprile, mostra una significativa contaminazione da metalli nei sedimenti e nelle vongole e ha subito numerosi impatti antropici diretti per la raccolta dei bivalvi che non possono che comprometterne lo stato e non permettono di attribuirgli il titolo di bianco.

**Fig. 36: Panoramica del Verto Sud verso le Casse di Colmata.**

# 5. Conclusioni

I quattro siti esaminati, benché geograficamente limitrofi, presentano condizioni ambientali differenti, un'alta variabilità stagionale e una contaminazione da metalli simile.

Le maggiori densità e biomasse di vongole (seme ed adulti) sono state rinvenute nel VN. I dati ambientali a disposizione non sono sufficienti a giustificare questa differenza, tuttavia esiste un'ampia letteratura a supporto del fatto che il VN sia una delle aree a maggior trofia dell'intera Laguna (Cossu *et al.*, 1985, Sfriso *et al.*, 2012). I campionamenti mostrano un elevato livello trofico anche alle TR, soprattutto in termini di biomassa macroalgale, che ha protetto l'area dalla pesca alle vongole, favorendo l'accrescimento di un'elevata densità e biomassa di bivalvi anche in luglio, quando altrove sono notevolmente diminuite. Il test di riaffossamento, dimostra che TB in entrambi i campionamenti stagionali è la più compromessa, viceversa le TR mostrano una tendenza al miglioramento tra aprile e luglio e i Verti esibiscono un minore livello di stress influenzato dalla stagionalità. Il test di sopravvivenza all'aria conferma queste osservazioni, attribuendo ai Verti le condizioni migliori in aprile e a TB le peggiori. In luglio la situazione cambia: le TR presentano le condizioni migliori e il VS le peggiori. Le vongole si sono dimostrate, come atteso, poco suscettibili alla presenza degli inquinanti inorganici o alle variazioni dei parametri ambientali e più disturbate dagli impatti antropici di calpestamento e rascatura dei fondali. Tutte le stazioni presentano almeno una moderata contaminazione da metalli pesanti nel sedimento: TB e VS rientrano in classe "C" per il cromo e il nickel; le TR in classe "C" per il cromo ( con il nickel che rientra nel limite della classe "B") mentre il VN per il cromo è in classe "B" (sebbene al limite con la classe "C") (**Tab. 11, allegato A**). L'andamento spesso simile di cromo e nickel suggerisce che questi abbiano un'origine comune o che si muovano insieme tra i diversi comparti ambientali. Nel VN e nel VS le vongole hanno bioaccumulato il mercurio e il cadmio, rispettivamente, ma tali concentrazioni hanno mostrato sensibili variazioni stagionali, legate alla riproduzione o alla disponibilità dei metalli. Al fine di confermare questa ipotesi, sarebbe opportuno verificare la biodisoponibiltà, per accertarsi se vi sono correlazioni tra i fenomeni di bioaccumulo e la frazione disponibile dei metalli nel sedimento.

# Bibliografia

**ANIBAL, J., ESTEVES, E., ROCHA, C. (2011).** Seasonal Variations in gross biochemical composition, percentage edibility and condition index of the clam *Ruditapes decussatus*, cultivated in the Ria Formosa (South Portugal). *Journal of shellfish Research*, 30(**1**): 17-23.

**ASPILA, K., AGEMIAN, H., CHAIR, A.S.J. (1976).** A semi-automated method for the determination of inorganic , organic and total phosphorus in sediments. *Analyst*, **101**:187-197.

**BETTIOL, C., STIEVANO, L., BERTELLE, M., DELFINO, F., ARGESE, E. (2008).** Evaluation of microwave-assisted acid extraction procedures for the determination of metal content and potential bioavailability in sediments. *Applied Geochemistry*, **23**: 1140-1151.

**BLAISE, C., GAGNE, F., PELLERIN, J., HANSEN, P.D. (1999).** Determination of Vitellogenin-like Properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): a potential biomarker for endocrine disruption. *Environ. Toxicol.*, **14**: 455-465.

**BRADFORD, M.M. (1976).** A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry,* **81**: 481-484.

**BRITO, A., NEWTON, A., TETT, P., FERNANDES, T.F. (2009).** Development of an optimal methodology for the extraction of microphytobenthic chlorophyll. *J. Int. Environmental Application & Science*, 4(**1**): 42-54.

**CESARI, P., PELLIZZATO, M. (1985).** Mollusk spreading in Venice Lagoon for voluntary or random anthropogenic introduction. *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughely, 1933) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) acclimatization (In Italian). *Boll. Malacologico*, 21(**10-12**): 237-274.

**COSSU, R., DE FRAJA FRANGIPANE, E. (1985).** Fulfillment of the Guide Plan for the Venice Lagoon Restoration. *Consorzio Venezia Nuova*, Venezia. 4 vol.

**Cui, S.W. (2005).** Food carbohydrates: chemistry, physical properties and applications. Taylor & Francis Group. Boca Raton, London, New York, Singapore. pp. 70-74.

**Da Ros, L., Moschino, M., Meneghetti, F., Penzo, P., Pellizzato, M. (2005a).** La qualità nell'allevamento di *Tapes philippinarum* in Laguna di Venezia: proposta per un approccio biologico. In: Boatto, V., Pellizzato, M. (Eds.). *La filiera della vongola*. Tapes philippinarum *in Italia*. Franco Angeli srl., Milano, pp. 113-115.

**Da Ros, L., Moschino, M., Meneghetti, F., Penzo, P., Pellizzato, M. (2005b).** Aspetti del ciclo riproduttivo e del metabolismo energetico di *Tapes philippinarum* in Laguna di Venezia. In: Boatto, V., Pellizzato, M. (Eds.). *La filiera della vongola*. Tapes philippinarum *in Italia*. Franco Angeli srl., Milano, pp. 77-88.

**Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Biochemistry*, **28**: 350-356.

**Facca, C., Sfriso, A., Socal, G. (2002).** Changes in Abundance and composition of Phytoplankton and Microphytobenthos due to Increased Sediment Fluxes in the Venice Lagoon, Italy. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **54**: 773-792.

**Facca, C., Sfriso, A. (2007).** Epipelic diatom spatial and temporal distribution and relationship with the main environmental parameters in coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **75**: 35-49.

**Facca, C., Pellegrino, N., Ceoldo, S., Tibaldo, M., Sfriso, A. (2011).** Trophic conditions in the waters of the Venice Lagoon (Northern Adriatic sea, Italy). *The Open Oceanography Journal*, **5**:1-13

**Giordani-Soika, A., Perin, G. (1974).** L'inquinamento della laguna di Venezia: studio delle modificazioni chimiche e del popolamento sottobasale dei sedimenti lagunari degli ultimi vent'anni. Boll. Mus. Civ. Stor. Nat. Venezia, 26(1,2): 25-68.

**GUERZONI, S., ROSSINI, P., SARRETTA, A., RACANELLI, S., FERRARI, G., MOLINAROLI, E. (2007).** POP's in the Lagoon of Venice; budgets, and pathways. *Chemosphere*, **67**:1776-1785.

**LORENZEN, C.J. (1967).** Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography,* **12**: 343-346.

**MAGNI, P., ABE, N., MONTANI, S. (2000).** Quantification of microphytobenthos biomass in intertidal sediments: layer-dependant variation of chlorophyll a content determined by spectrophotometric and HPLC methods. *La Mer*, **38**: 57-63.

**MARCOMINI, A., SFRISO, A., PAVONI, B., ORIO, A.A. (1995).** Eutrophication of the Lagoon of Venice: Nutrient Loads and Exchanges. In: Mc Comb, A.J. (Ed.). *Eutrophic Shallow Estuaries and Lagoons*. CRC Press, Boca Raton, pp. 59-80.

**MATOZZO, V., MARIN, M.G. (2005).** Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*?. *Environmental Research*, **97**:43-49.

**MATOZZO, V., MARIN, M.G. (2007).** First evidence of alterated vitellogenin-like protein levels in clam *Tapes philippinarum* and in cockle *Cerastoderma glaucum* from Venice Lagoon. *Marine Pollution Bulletin*, **55**: 494-504.

**METHEREL, A.H., TAHA, A.Y., IZADI, H., STARK, K.D. (2009).** The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(**5**): 417-423.

**MOSCHINO, V., CHICHARO, L.M.Z., MARIN, M.,G. (2008).** Effects of hydraulic dredging on the physiological responses of the target species *Chamaelea gallina* (Mollusca:Bivalvia) : laboratory experiments and field surveys. *Scientia Marina,* 72(**3**): 493-501.

**MOSCHINO, V., DELANEY, E., MENEGHETTI, F., DA ROS, L. (2011*a*).** Biomonitoring approach with mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum*

(Adams and Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice. *Environ. Monit. Assess.*, **177**: 649-663.

**MOSCHINO, V., CHICHARO, L., MARIN, M.G. (2011*b*).** Long-term effects of fishing on physiological performance of the manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in the Lagoon of Venice. Scientia *Marina*, 75(**1**): 103-110.

**MOSCHINO, V., DELANEY, E., DA ROS, L. (2012).** Assessing the significance of *Ruditapes philippinarum* as sentinel for sediment pollution: bioaccumulation and biomarker responses. Environmental Pollution, **171**:52-60.

**MULLIN, J.B., RILEY, J.P. (1965).** The spectrophotometric determination of silicate-silicon in natural waters with special reference to seawater. *Analytica Chimica Acta*, **46**: 491-501.

**MURPHY, J., RILEY, J.P. (1962).** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta,* **27**: 31-36.

**NUNN, B.L., KEIL, R.G. (2006).** A comparison of non-hydrolytic methods for extracting amino acids and proteins from coastal marine sediments. *Marine Chemistry* **98**: 31-42.

**OXNER, M.R. (1962).** The determination of chlorinity by the Knudsen method and hydrographical tables. *G.M. Manufactoring Co.* New York. p.63.

**PENZO, P., PELLIZZATO, M. (2005).** Morfometria e qualità in Tapes philippinarum. In: Boatto, V., Pellizzato, M. (Eds.). *La filiera della vongola.* Tapes philippinarum *in Italia*. Franco Angeli srl., Milano, pp. 113-115.

**PÉREZ, A.C., DELGADO, M., FERNANDEZ-REIRIZ, M.J., LABARTA, U. (2003).** Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **258**: 133-145.

**PERIN, G. (1975).** L'inquinamento chimico della laguna di Venezia. Sintesi di sette anni di ricerche. *Consorzio per la Depurazione delle Acque della Zona*

*Industriale di Porto Marghera*, Tavola Rotonda su "Problemi dell'inuinamento lagunare", Venezia. pp. 47-90.

**PHELPS, H.L. (1989).** Clam burrowing bioassay for estuarine sediment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **43**: 838-845.

**PLANA, S., SINQUIN, G., MAES, P., PAILLARD, C., LE PENNEC, M. (1996).** Variations in biochemical composition of juvenile *Ruditapes philipinarum* infected by *Vibrio* sp. *Dis. Aquat. Org.*, **24**: 205-213.

**QUINN, B., GAGNÉ, F., COSTELLO, M., MCKENZIE, C., WILSON,J., MOTHERSILL, C. (2004).** The endocrine disrupting effect of the municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, **66**: 279-292.

**QUINN, B., GAGNÉ, F., BLAISE, C., COSTELLO, M.J., WILSON, J.G., MOTHERSILL, C. (2006).** Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **142**: 118-127.

**RACANELLI, S., PASTRES, R., FAVOTTO, M., VIO, P. (2004).** Correlation between POP's in sediment and edible bivalve in the lagoon of Venice and estimation of the daily intake. *Organohal. Comp.*, **66**: 1823-1828.

**RILEY, J.P. (1953).** The spectrophotometric determination of ammonia in natural waters with particular reference to sea-water. *Analytica Chimica Acta*, **9**: 575-589.

**SADASIVAM, S., MANICKAM, A. (2010).** Biochemical methods. *New Age International*. Delhi. pp. 7-9.

**SIN, Y., RYU, S.O., SONG, E. (2009).** Characteristics of benthic Chlorophyll a and sediment properties in the tidal Flats of Kwangyang Bay, Korea. *Algae*, 24 (**3**): 149-161.

**SFRISO, A., PAVONI, B., MARCOMINI, A., ORIO, A.A. (1988).** Annual variation of nutrients in the lagoon of Venice. *Marine Pollution Bulletin*, **19**: 54-60.

**SFRISO, A., MARCOMINI, A. (1996).** Chap.15 Italy - The Lagoon of Venice. In: Schramm, W., Nienhuis, P.N. (Eds.). *Marine Benthic Vegetation. Ecological Studies,* Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Vol. 123, pp. 339-368

**SFRISO, A., FACCA, C., CEOLDO, S., MARCOMINI, A. (2005*a*).** Recording the occurrence of trophic level changes in the lagoon of Venice over the '90s. *Environment International*, **31**: 993-1001.

**SFRISO, A., FACCA,C., CEOLDO,S., PESSA, G. (2005*b*).** Sedimentation rates, erosive processes, grain-size, and sediment density changes in the Lagoon of Venice. In: Campostrini, P. (Ed.). *Scientific Research and safeguarding of Venice*. CORILA Research Program 2003 Results, IVSLA, La Garangola, pp. 2003-2013.

**SFRISO, A., ARGESE, E., BETTIOL, C., FACCA, C. (2008).** *Tapes philippinarum* seed exposure to metals in polluted areas of the Venice Lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **79**: 581-590.

**SFRISO, A., SFRISO, A.A., CAMPOLIN, M., STOCCO, M., BUOSI, A., FACCA, C. (2012).** Piano di monitoraggio dei corpi idrici della laguna di Venezia finalizzato alla definizione dello stato ecologico, ai sensi della direttiva 2000/607CE. Linea 5 monitoraggio dell'elemento di qualità biologica 'Natura e composizione del substrato'. DAIS, I rapporto, pp. 20 + tabelle.

**SOLARZANO, L. (1969).** Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. Limnol. Oceanogr., **14**: 799-801

**STRICKLAND, J.D.H., PARSONS, T.R. (1972).** A practical handbook of seawater analyses. *Ottawa Fisheries Research Board*. Canada. pp. 310.

**SUJA, N., MUTHIAH, P. (2010).** Variations in gross biochemical composition in relation to the gametogenic cycle of the baby clam, *Marcia opima* (Gmelin) from two geographically separated areas. *Indian J. Fish.*, 57(**1**): 53-59.

**TORRICELLI, P., BOATTO, V., FRANZOI, P., PELLIZZATO, M., SILVESTRI, S. (2009).** Piano per la gestione delle risorse alieutiche nelle lagune della Provincia di Venezia: In:

Provincia di Venezia (Ed.), Arti Grafiche Zoppelli, Dosson di Casier (Treviso) pp. 203.

**Tsangaris, C., Kormas, K., Strogyloudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral, B., Galgani, F. (2010).** Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **151**: 369-378.

**Zonta, R., Zaggia,L., Argese,E. (1994).** Heavy metal and grain-size distributions in estuarine shallow water sediments of Cona Marsh (Venice Lagoon, Italy). *The Science of Total Environment*, **151**: 19-28.

**Zhao, L., Yang, F., Yan, X., Huo, Z., Zhang, G. (2012).** Heavy metal concentrations in surface sediments and manila clams (Ruditapes philippinarum) for the Dalian coast, China after the Dalian Port Oil Spill. *Biol. Trace Elem. Res.*, **149**: 241-247.

**Walne, P.R., Mann, R. (1975).** Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Cassostrea gigas*. In: Barnes, H. (Ed.). *Proc. 9th Eur. Mar. Biol. Symp*. Aberdeen Univ, Aberdeen Press. pp. 587-607.

**Wood, E.D., Armstrong, F.A.J., Richards, F.A. (1967).** Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. mar. boil. Ass.*, **47**: 23-31.

***www.venetoagricoltura.org***

# Allegato A

**Tabelle dell'analisi di correlazione, della PCA e di raffronto con la letteratura e foto al microscopio ottico di gameti di *Ruditapes philippinarum***

***Tab. 1**: Coefficienti di correlazione dei parametri dell'acqua, valori significativi in rosso con $p < 0,05$ per $r \geq |0,71|$ e altamente significativi (sottolineati e in rosso) con $p < 0,001$ per $r \geq |0.94|$.*

| Parametri | T° aria | T° acq. | OD | pH sed | Eh acq | $NO_3^-$ | RP | $SiO_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T° acq. | **0,98** | | | | | | | |
| profon. | | | | | | | | |
| OD | -0,93 | -0,90 | | | | | | |
| pH acq. | | | 0,73 | | | | | |
| $NO_3^-$ | -0,71 | -0,73 | | | 0,78 | | | |
| $NO_2^-$ | | | | | 0,73 | 0,83 | | |
| RP | | | | | -0,86 | | | |
| $SiO_2$ | | | | | | | | |
| salin. | 0,84 | 0,81 | | | | | 0,72 | |
| partic. | | | | | 0,87 | | -0,74 | |
| Chl-*a* acq. | | | | | | | | |
| Phaeo-*a* acq . | | | | 0,81 | | | | -0,82 |
| Chl-*a* tot acq. | | | | | -0,77 | | | -0,74 |

***Tab. 2**: Coefficienti di correlazione dei parametri del sedimento, valori significativi in rosso con $p < 0,05$ per $r \geq |0,71|$ e altamente significativi (sottolineati e in rosso) con $p < 0,001$ per $r \geq |0.94|$.*

| Parametri | prof. | pH acq. | $NH_4^+$ | Dens. |
|---|---|---|---|---|
| sabbia % | **-0,98** | | | |
| Phaeo-*a* sed . | | | | |
| Chl-*a* tot sed. | | | | |
| P tot sed. | | -0,72 | 0,74 | |
| P inorg sed. | | -0,77 | | |
| P org. sed. | | | 0,77 | -0,79 |

***Tab. 3**: Coefficienti di correlazione dei test in vivo, valori significativi in rosso con $p < 0,05$ per $r \geq |0,71|$ e altamente significativi (sottolineati e in rosso) con $p < 0,001$ per $r \geq |0.94|$.*

| Parametri | T° aria | T° acq. | OD | salin. |
|---|---|---|---|---|
| ET 50 raffoss. | -0,34 | -0,43 | 0,42 | -0,23 |
| LT 50 air surv. | -0,90 | -0,86 | 0,79 | **-0,95** |

***Tab. 4**: Coefficienti di correlazione dei parametri biochimici, valori significativi in rosso con $p < 0,05$ per $r \geq |0,71|$ e altamente significativi (sottolineati e in rosso) con $p < 0,001$ per $r \geq |0.94|$.*

| Parametri | T° aria | T° acq. | OD | pH acq. | $SiO_2$ | Chl-*a* tot ac. | P org. sed. | PRT | CHO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PRT | 0,83 | 0,81 | -0,83 | | | | | | |
| LPD | | | | | | | -0,87 | | |
| CHO | | | 0,71 | | | | | **-0,95** | |
| CNR | | | | | 0,77 | -0,76 | | 0,72 | -0,87 |
| ALP | | | | -0,72 | | | | | |

***Tab. 5**: Coefficienti di correlazione dei parametri fisiologici, valori significativi in rosso con p < 0,05 per r ≥ |0,71| e altamente significativi (sottolineati e in rosso) con p < 0,001 per r ≥ |0.94|.*

| Parametri | T° aria | T° acq. | prof. | OD | Eh acq. | $NH_4$ | sabb. % | P org. sed. | ET50 raff. | C.I. | lung. | alt. | spes. | S.I. | *Rudita pes* | *Muscu lista* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| F/TOT | | | | | 0,72 | | | | | | | | | | | |
| C.I. | | | | 0,82 | | | | | 0,74 | | | | | | | |
| *Cerastoderma* | | | | | | | | | | | | -0,74 | | 0,83 | **0,96** | |
| 5-10 mm | | | | | | | | | | | | | | | | **0,99** |
| 10-15 mm | | | | | | | | | | | -0,84 | | -0,83 | 0,88 | 0,73 | 0,82 |
| 15-20 mm | | | | | | | | | | | **-0,95** | **-0,96** | **-0,96** | **0,94** | 0,73 | |
| 20-25 mm | -0,75 | -0,76 | | | | | | | | | | | | | | |
| 25-30 mm | | | 0,74 | 0,74 | | | -0,75 | | 0,73 | 0,87 | | | | | | |
| 30-35 mm | | | | | | 0,79 | | 0,81 | | | | | | | | |

***Tab. 6**: Coefficienti di correlazione dei metalli nelle vongole, valori significativi in rosso con p < 0,05 per r ≥ |0,71| e altamente significativi (sottolineati e in rosso) con p < 0,001 per r ≥ |0.94|.*

| Parametri | T° aria | T° acq. | prof. | OD | pH sed. | $NO_3$ | $NO_2$ | $SiO_2$ | Phaeo-*a* acq. | PRT | CHO | CNR | C.I. | S.I. | *Rudita pes* | *Cerast od.* | Tg. 25-30 | Cr vong. | Fe vong. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hg vong. | | | | | | | | | | | | | | 0,78 | 0,90 | **0,94** | | | |
| Cd vong. | | | | | | | | | | | -0,77 | 0,76 | | | | | | | |
| Pb vong. | | | | | -0,83 | | | 0,88 | -0,84 | | | | | | | | | | 0,77 |
| As vong. | 0,80 | 0,83 | | -0,83 | | | | | | 0,79 | -0,78 | | -0,84 | | | | -0,81 | | |
| Cr vong. | | | 0,72 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cu vong. | | | | | | | | | | | | | | | | 0,81 | | | |
| Fe vong. | | | | | | | | 0,72 | | 0,78 | -0,88 | 0,87 | | | | | | | |
| Mn vong. | | | | | | | | | | | -0,74 | 0,82 | | | | | | | 0,82 |
| Ni vong. | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0,75 | |
| Zn vong. | | | | | | **0,94** | 0,86 | | | | | | | | | | | | |

***Tab. 7: Coefficienti di correlazione dei metalli nelle vongole, valori significativi in blu con p < 0,05 per r ≥ |0,95| e altamente significativi (sottolineati) con p < 0,001 per r ≥ |0.99|.***

| Parametri | pH acq. | pH sed. | Eh acq. | $NH_4^+$ | $NO_2^-$ | $SiO_2^-$ | salin. | Chl-*a* acq. | Chl-*a* tot ac. | Dens. | P tot sed. | P inorg | CHO | CNR | F/TOT | Tg. 20-25 | Tg. 30-35 | Fe vong. | Mn vong. | Zn vong. | As sed. | Cd sed. | Cr sed. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **As** sed. | | | | | | | | | | | | | | | | -0,96 | | | | | | | |
| **Cd** sed. | | | | | | | | | -0,99 | | | | | 0,97 | | | | | | 0,95 | | | |
| **Cr** sed. | | | | | | | | -0,99 | | | 0,97 | 0,99 | | | | 0,98 | | | | | -0,95 | | |
| **Cu** sed. | | -0,95 | | | 0,89 | | | | | | | | | 0,96 | | | | 1,00 | | 0,98 | | | |
| **Fe** sed. | | | | | | | 0,99 | -0,96 | | | | | | | 0,99 | | | | 0,99 | | | | |
| **Hg** sed. | | -0,95 | | 0,95 | | 0,96 | | | | -0,97 | | | | | | | | | | | | | |
| **Mn** sed. | | | | | | | | -0,99 | | | 0,99 | 1,00 | | | | 0,99 | | | | | | | 1,00 |
| **Ni** sed. | | | 0,99 | | | | 0,97 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Pb** sed. | 1,00 | | | | | | | | -0,97 | | | | -0,97 | | | | -0,95 | | | | | | |
| **Zn** sed. | | | | | | | | | -0,94 | | | | | 0,99 | | | -0,95 | | | 0,95 | | 0,97 | |

| Variabili | Fattori 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| T° acqua | 0,85 | -0,16 | -0,39 | 0,27 | -0,02 |
| Profondità | -0,53 | -0,45 | -0,34 | -0,21 | 0,51 |
| OD | -0,88 | 0,17 | 0,40 | 0,05 | 0,11 |
| pH acq. | -0,61 | 0,16 | 0,31 | 0,45 | -0,20 |
| pH sed. | -0,28 | -0,42 | -0,19 | 0,61 | -0,40 |
| Eh acq. | -0,13 | 0,26 | 0,94 | 0,12 | -0,04 |
| Eh sed. | -0,10 | -0,25 | 0,62 | 0,37 | -0,61 |
| $NH_4^+$ | 0,63 | -0,35 | -0,09 | -0,66 | -0,01 |
| $NO_3^-$ | -0,36 | 0,37 | 0,66 | -0,14 | 0,36 |
| $NO_2^-$ | -0,34 | 0,56 | 0,60 | -0,05 | 0,41 |
| RP | 0,26 | -0,22 | -0,83 | 0,19 | 0,30 |
| $SiO_2$ | 0,56 | 0,53 | 0,41 | -0,34 | 0,16 |
| Salinità | 0,74 | -0,31 | -0,29 | 0,28 | 0,34 |
| Particolato | -0,11 | 0,38 | 0,70 | 0,42 | -0,30 |
| Chl-a acq. | -0,18 | 0,02 | -0,76 | 0,11 | -0,12 |
| Pheo-*a* acq. | -0,38 | -0,39 | -0,65 | 0,41 | -0,07 |
| Sabbia % | 0,52 | 0,58 | 0,27 | 0,17 | -0,48 |
| Densità sed. | 0,02 | 0,17 | -0,14 | 0,86 | 0,03 |
| Chl-a sed. | -0,22 | 0,11 | -0,68 | -0,48 | -0,24 |
| Pheo-a sed. | -0,04 | 0,24 | -0,65 | -0,62 | 0,02 |
| P inorg sed. | 0,49 | -0,51 | 0,17 | -0,36 | 0,05 |
| P org. sed. | 0,20 | -0,29 | 0,25 | -0,76 | -0,35 |
| ET 50 raffoss. | -0,27 | -0,46 | 0,50 | -0,43 | 0,46 |
| LT 50 air surv. | -0,73 | 0,45 | 0,30 | -0,21 | -0,36 |
| PRT | 0,97 | -0,13 | 0,11 | -0,04 | 0,02 |
| LPD | -0,15 | 0,38 | -0,58 | 0,53 | 0,38 |
| CHO | -0,93 | 0,02 | -0,29 | -0,10 | -0,09 |
| CNR | 0,66 | 0,08 | 0,59 | 0,03 | 0,32 |
| ALP | 0,26 | -0,23 | -0,03 | -0,37 | 0,74 |
| Lunghezza | 0,13 | -0,93 | 0,27 | -0,13 | -0,08 |
| Altezza | 0,07 | -0,92 | 0,36 | -0,08 | -0,04 |
| Spessore | 0,10 | -0,90 | 0,35 | -0,03 | -0,06 |
| F/TOT | -0,40 | 0,25 | 0,65 | 0,37 | -0,12 |
| C.I. | -0,70 | -0,33 | 0,51 | 0,10 | 0,34 |
| Densità *Ruditap.* | -0,07 | 0,80 | -0,36 | -0,26 | 0,07 |
| Densità *Cerast.* | -0,17 | 0,75 | -0,29 | -0,25 | 0,05 |
| Densità *Muscul.* | 0,44 | 0,58 | -0,20 | 0,26 | 0,26 |
| Taglia mm 5-10 | 0,46 | 0,45 | -0,17 | 0,32 | 0,27 |
| Taglia mm 10-15 | 0,28 | 0,89 | -0,21 | 0,05 | 0,01 |
| Taglia mm 15-20 | 0,02 | 0,88 | -0,40 | 0,06 | -0,13 |
| Taglia mm 20-25 | -0,72 | 0,22 | -0,06 | -0,08 | 0,00 |
| Taglia mm 25-30 | -0,71 | -0,24 | 0,21 | -0,12 | 0,57 |
| Taglia mm 30-35 | 0,18 | -0,59 | -0,17 | -0,58 | -0,15 |
| Taglia mm 35-40 | 0,24 | -0,01 | 0,09 | 0,00 | -0,81 |
| As vong. | 0,87 | 0,33 | -0,27 | 0,11 | 0,01 |
| Cd vong. | 0,55 | -0,02 | 0,36 | 0,43 | -0,03 |
| Cr vong. | -0,37 | -0,57 | -0,16 | 0,43 | 0,37 |
| Cu vong. | -0,51 | 0,50 | -0,36 | 0,01 | 0,37 |
| Fe vong. | 0,75 | 0,20 | 0,43 | 0,21 | 0,36 |
| Hg vong. | -0,21 | 0,75 | -0,02 | -0,37 | -0,08 |
| Mn vong. | 0,57 | 0,02 | 0,43 | 0,42 | 0,46 |
| Ni vong. | 0,19 | -0,43 | -0,03 | 0,78 | 0,23 |
| Pb vong. | 0,66 | 0,55 | 0,27 | -0,28 | 0,26 |
| Zn vong. | -0,31 | 0,43 | 0,65 | -0,20 | 0,39 |
| Varianza % | 24,0 | 21,5 | 18,8 | 12,8 | 9,69 |
| Var cumul. % | 24,0 | 45,6 | 64,4 | 77,1 | 86,8 |

***Tab. 8:** Fattori della PCA, pesi fattoriali significativi per i valori > 0,70.*

***Tab. 9:*** ***Parametri ambientali per un confronto con la letteratura:*** ***Sfriso et al. (2005).***

| Parametri | (Sfriso et al., 2005) '92-'93 | (Sfriso et al., 2005) '98-'99 | Questo lavoro |
|---|---|---|---|
| pH acqua | 8,3 | 8,0 | 8,2 |
| Eh acqua (mV) | 293 | 296 | 234 |
| $NH_4^+$ (µM) | 20,5 | 13,8 | 2,65 |
| $NO_3^-$ (µM) | 25,9 | 22,0 | 5,92 |
| $NO_2^-$ (µM) | 2,19 | 1,52 | 0,42 |
| RP (µM) | 1,6 | 1,0 | 0,5 |
| Salinità (psu) | 28,9 | 30,3 | 24,9 |
| Chl-a acq. Tot (µg/L) | 25,6 | 9,6 | 3,3 |
| Sabbia (%) | 19% | 19% | 81% |
| Eh sed. (mV) | 12 | -64 | 28 |
| pH sedimento | 7,6 | 7,7 | 7,6 |
| P tot sed. (µg/g) | 516 | 536 | 288 |
| P inorg sed. (µg/g) | 395 | 455 | 264 |
| P org. sed. (µg/g) | 122,0 | 82,0 | 23,8 |

***Tab. 10**: Metalli nel sedimento e nelle vongole per un confronto con la letteratura: Zonta et al. (2007); Sfriso et al. (2008); Moschino et al. (2011) e Zhao et al. (2012).*

| mg/kg | (Zonta *et al.*, 2007) Porto Industrial | (Sfriso *et al.*, 2008) Fusina | (Moschino *et al.* 2011) Tresse | (Zhao *et al.*, 2012) Dalian coast | Questo lavoro |
|---|---|---|---|---|---|
| As vong. | - | 24,8 | - | 3,28 | 0,82 |
| Cd vong. | - | 1,48 | - | 0,67 | 1,67 |
| Cr vong. | - | 2,77 | - | 1,96 | 6,69 |
| Cu vong. | - | 21,1 | - | 6,09 | 7,92 |
| Fe vong. | - | 659 | - | - | 563 |
| Hg vong. | - | 0,30 | - | 0,05 | 1,25 |
| Mn vong. | - | 13,7 | - | - | 13,7 |
| Ni vong. | - | 2,68 | - | - | 5,74 |
| Pb vong. | - | 1,75 | - | 1,52 | 0,38 |
| Zn vong. | - | 101 | - | 100 | 147 |
| As sed. | - | 9,45 | 16,6 | 3,95 | 8,41 |
| Cd sed. | 1,8 | 0,36 | 2,8 | 0,09 | 0,30 |
| Cr sed. | 34 | 76,5 | 45 | 30,1 | 176 |
| Cu sed. | 37 | 6,70 | 54 | 16,8 | 7,10 |
| Fe sed. | 30750 | 15695 | - | - | 11932 |
| Hg sed. | 1,7 | 0,16 | 1,7 | 0,008 | 0,20 |
| Mn sed. | 490 | 315 | - | - | 316 |
| Ni sed. | 24 | 46,5 | 19 | - | 66,5 |
| Pb sed. | 78 | 10,7 | 36,5 | 12,5 | 7,37 |
| Zn sed. | 231 | 76,5 | 429 | 48,1 | 75,0 |
| ΣPAH sed. | 0,168 | | 1,782 | | |
| ΣPCB sed. | 0,011 | | 0,006 | | |
| ΣPAH vg. | | | 0,312 | | |
| ΣPCB vg. | | | 0,071 | | |

***Tab. 11**: Confronto delle stazioni con i valori limite delle classi di inquinamento dei sedimenti del Protocollo Ministeriale dell'8 aprile 1993 espressi in mg/kg su peso secco (in cui è ammesso il superamento del 10% del limite per un unico parametro) e con i limiti del Regolamento CE n. 1881/2006 per i molluschi bivalvi espressi in mg/kg su peso umido.*

| mg/kg | | limite sedimenti Prot. Min. 8 apr. 1993 (peso secco) | | | limite molluschi regolamento CE n. 1881/2006 (peso umido) | Questo lavoro | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | A | B | C | | TB | TR | VN | VS |
| VONGOLE | Cd | - | - | - | 1,00 | < | < | < | < |
| | Hg | - | - | - | 0,50 | < | < | > | < |
| | Pb | - | - | - | 1,50 | < | < | < | < |
| SEDIMENTI | As | 15 | 25 | 50 | - | A | A | A | A |
| | Cd | 1 | 5 | 20 | - | A | A | A | A |
| | Cr | 20 | 100 | 500 | - | C | B | B-C* | C |
| | Cu | 40 | 50 | 400 | - | A | A | A | A |
| | Hg | 0,5 | 2 | 10 | - | A | A | A | A |
| | Ni | 45 | 50 | 150 | - | C | C | A | C |
| | Pb | 45 | 100 | 500 | - | A | A | A | A |
| | Zn | 200 | 400 | 3000 | - | A | A | A | A |

***(entro il ±10%)***

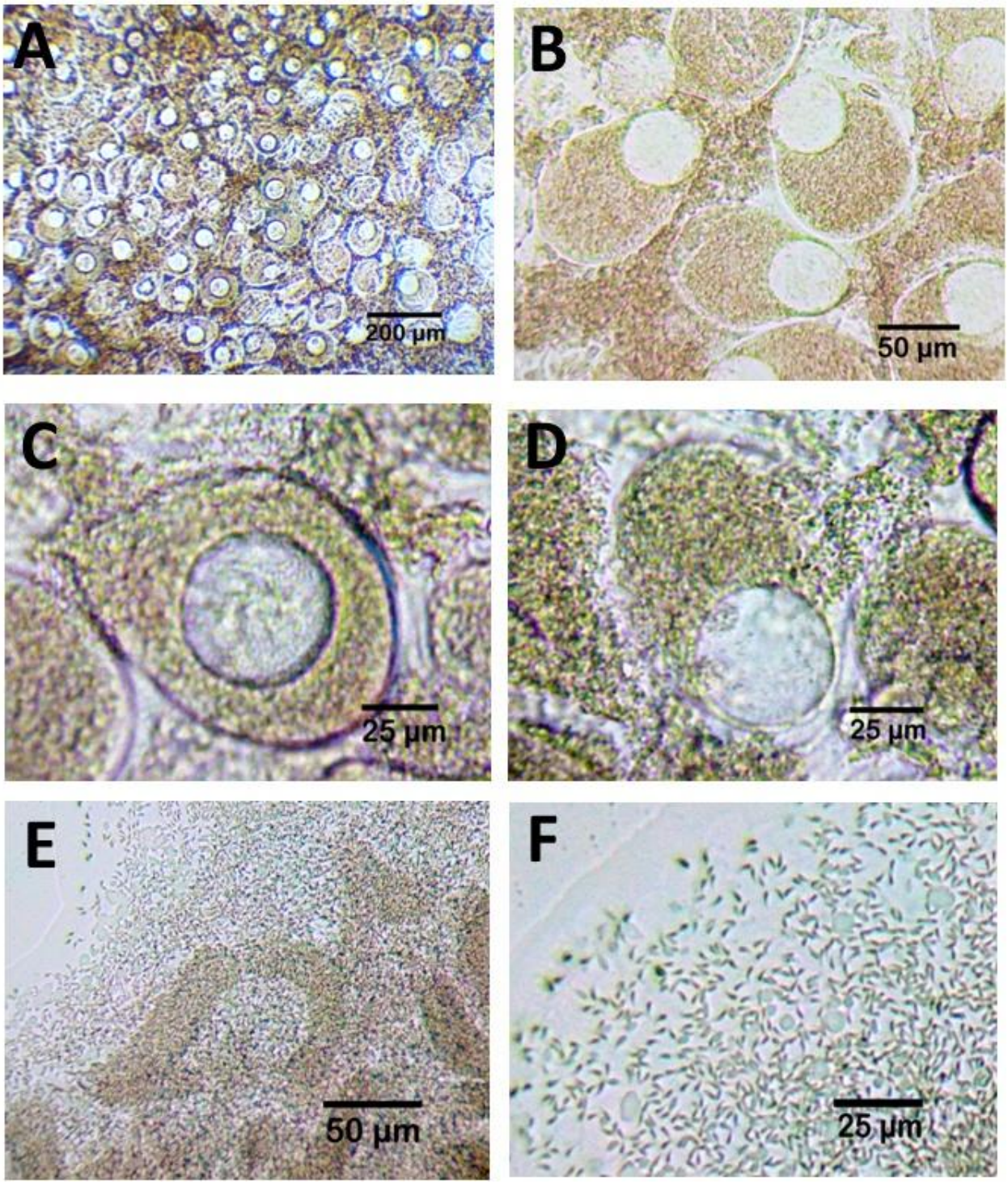



**Fig.1 : Foto al microscopio ottico a colori naturali dei gameti di *Ruditapes philippinarum* raccolti alle Tresse in luglio. Nelle figure A, B, C e D ingrandimenti degli oociti maturi, nelle foto E ed F ingrandimenti degli spermatozoi.**