



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : BIOSCIENZE E BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO: BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA

CICLO: XXIV

RISPOSTE ADATTATIVE IN MOLLUSCHI BIVALVI IN UNO SCENARIO DI CAMBIAMENTI CLIMATICI

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Supervisore : Prof. Maria Gabriella Marin

Dottorando : Andrea Chinellato

Riassunto

L'aumento della concentrazione atmosferica di CO₂ prodotta dalle attività umane è responsabile dei cambiamenti climatici che si stanno manifestando con un progressivo innalzamento dei valori termici sulla superficie terrestre e negli oceani e con il fenomeno dell'acidificazione delle acque marine. In particolare, l'acidificazione potrebbe avere conseguenze particolarmente negative per tutti quegli organismi che costruiscono strutture calcaree, non solo alterando le loro principali attività fisiologiche, la sopravvivenza e la crescita, ma anche riducendone la capacità di calcificazione. In questo contesto, sono state scelte quattro specie di bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*, *Chamelea gallina*, *Callista chione*, *Mimachlamys varia*) per valutare, secondo quanto previsto dai futuri scenari di cambiamento climatico, gli effetti della diminuzione del pH, dell'aumento di temperatura e di variazioni di salinità sulle risposte fisiologiche, biochimiche ed immunologiche, nonché sul danno alla conchiglia, in quanto struttura formata da carbonato di calcio. Gli organismi oggetto di studio sono stati scelti in funzione del loro habitat, in modo tale da valutare gli effetti dei cambiamenti climatici in specie costiere (*M. galloprovincialis*, *C. gallina*) e in specie tipicamente marine (*C. chione*, *M. varia*). Sono state condotte sperimentazioni a breve termine sugli adulti delle quattro specie e sperimentazioni a lungo termine sui giovanili di *M. galloprovincialis* e *C. gallina*. Per valutare simultaneamente sugli adulti gli effetti della temperatura e del pH è stato progettato un impianto sperimentale che ha consentito di saggiare sei diverse combinazioni di tre valori di pH (8.1, 7.7, 7.4) e di due temperature (22, 28°C: *M. galloprovincialis*, *C. gallina*; 16, 22°C: *C. chione*; 18, 26°C: *M. varia*). In *M. galloprovincialis* e *C. gallina*, le stesse combinazioni di temperatura e pH sono state saggiate a tre salinità (28, 34, 40 psu). Per testare l'effetto di un pH ridotto (7.4) sui giovanili, è stato costruito un impianto sperimentale in un vascone posizionato all'aperto, alimentato in continuo da acqua proveniente dal mare, esposto in questo modo alle variazioni ambientali presenti in natura. Sono state condotte due sperimentazioni, la prima della durata di sei mesi per *M. galloprovincialis* e *C. gallina* e la seconda di tre mesi solo per *M. galloprovincialis*.

Sono stati quindi valutate risposte biologiche a breve e a lungo termine sia a livello cellulare che di organismo. In particolare, risposte immunologiche, quali numero di emociti circolanti (THC), loro capacità di assumere il Rosso Neutro (NRU) e di esprimere l'attività del lisozima, sono state misurate gli adulti; risposte fisiologiche, come i tassi di filtrazione, di respirazione e di escrezione, sono state determinate sia negli adulti che nei giovanili; risposte biochimiche, come l'attività della superossido dismutasi (SOD), della catalasi (CAT), della

glutazione S-transferasi (GST) e i livelli di perossidazione lipidica (TBARS) sono stati misurati nelle branchie e nella ghiandola digestiva per gli adulti, nell'intero organismo per i giovanili. Nella ghiandola digestiva degli adulti di *M. galloprovincialis* e *C. gallina* è stata valutata anche l'espressione delle *heat shock proteins* HSP70.

Nei giovanili durante le sperimentazioni sono stati rilevati mensilmente la mortalità, la lunghezza ed il peso. Inoltre, per valutare l'effetto dell'acidificazione sulla conchiglia ne è stata quantificata la corrosione della superficie esterna mediante un indice di danno, dopo tre e sei mesi di esposizione a pH ridotto nella prima sperimentazione ed al termine del primo e del terzo mese nella seconda. Negli adulti la valutazione dei diversi parametri fisiologici, immunologici e biochimici ha permesso di evidenziare diverse modalità di risposta al fenomeno dell'acidificazione e dell'aumento della temperatura per tutte e quattro le specie studiate e l'influenza della salinità per *M. galloprovincialis* e *C. gallina*. E' interessante sottolineare come i parametri immunologici di mitili e vongole mostrino un effetto più marcato sia della temperatura che del pH alle salinità estreme. *C. chione* è sembrata rispondere alla temperatura e all'acidificazione aumentando i propri tassi metabolici, mentre al contrario *M. varia* li ha ridotti. Anche se le risposte biochimiche per tutte le specie non hanno permesso di rilevare sempre chiari pattern di variazione, l'andamento delle attività enzimatiche sembra generalmente mostrare una loro induzione nei trattati rispetto ai controlli, soprattutto in presenza di un aumento termico. Nei giovanili tutti i parametri indagati risultano indicare un effetto dell'acidificazione per entrambe le specie, seppur con modalità differenziate. Il pH sperimentale ha causato una riduzione in lunghezza e peso in *C. gallina*, ma non in mitilo. La vongola risulta meno tollerante rispetto al mitilo e ha mostrato inoltre una dissoluzione della conchiglia più marcata in tempi più brevi. Per entrambe le specie, a confermare le indicazioni tratte dai dati morfologici, anche i parametri fisiologici hanno mostrato condizioni di stress negli animali trattati a pH ridotto, seppure con effetti più marcati nelle vongole.

Sebbene i risultati ottenuti suggeriscano per le specie studiate diverse condizioni di tolleranza alle variazioni ambientali, gli effetti negativi messi in luce in questo studio indicano potenziali condizioni di rischio per le comunità di bivalvi nel Nord Adriatico in un futuro scenario di cambiamenti climatici. Ne potrebbero derivare conseguenze anche molto gravi, sia in termini di perdita della biodiversità, sia a livello economico a causa di una riduzione dell'abbondanza di specie commercialmente importanti.

Abstract

The increment of atmospheric CO₂ produced by human activities is responsible for both global warming and progressive acidification of oceans. In particular, ocean acidification has negative consequences for all those organisms that build calcareous structures, modifying their physiological activities, survival, and growth, and causing reduction in calcification rate. In this context, the bivalves *Mytilus galloprovincialis*, *Chamelea gallina*, *Callista chione*, *Mimachlamys varia* were chosen to investigate the effects of decreased pH, increased temperature and variations in salinity, as predicted in climate change scenarios, on physiological, immunological, biochemical responses, growth and shell damage. The choice of these species took into account their different habitats, which may make them differently susceptible to climate change effects: two inshore (*M. galloprovincialis*, *C. gallina*) and two offshore (*C. chione*, *M. varia*) species were studied. Short-term experiments on adults were performed for all species and long-term experiments were performed on juveniles of *M. galloprovincialis* and *C. gallina*. An experimental plant was set up in the laboratory to test simultaneously the effects of temperature and pH on adult bivalves. Six combinations were tested, three values of pH (8.1, 7.7, 7.4) and two temperatures (22, 28°C: *M. galloprovincialis*, *C. gallina*; 16, 22°C: *C. chione*; 18, 26°C: *M. varia*). In *M. galloprovincialis* and *C. gallina* the same combinations of temperature and pH were tested at three salinities (28, 34, 40 psu). To test the effect of reduced pH (7.4) on juvenile mussels and clams, an outdoor experimental plant was set up, supplied with sea water flowing in continuous from the sea. Two experiments were carried out, the former, on both *M. galloprovincialis* and *C. gallina*, lasted six months, the latter, on *M. galloprovincialis* only, was three-month long. The aim of this outdoor experiment was to operate in experimental conditions as similar as possible to mesocosms, except for pH value in treated bivalves.

Short- and long-term biological responses were evaluated at both cellular and whole organism level. In particular, immune responses, such as total haemocyte count (THC), Neutral Red uptake, and lysozyme activity, were measured in haemocytes of adult bivalves; physiological responses, such as filtration, respiration and excretion rates, were determined in both adults and juveniles; biochemical responses, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S transferase (GST) and lipid peroxidation (TBARS) were measured in gills and digestive gland of adults and in the whole organism of juveniles. The expression of heat shock proteins HSP70 was evaluated in digestive gland of *M. galloprovincialis* and *C. gallina*.

During the experiments on juveniles, mortality was monthly checked and length and weight were measured. Moreover, to evaluate the effects of seawater

acidification on shell integrity after 1, 3 and 6 months of exposure to reduced pH, damage was defined on both mussel and clam shells by specific damage indices.

The evaluation of several physiological, immunological and biochemical responses on adults allowed us to highlight different ways to cope with acidification and increased temperature in all the species studied. Effects of salinity were also revealed in *M. galloprovincialis* and *C. gallina*. For mussels and clams, it was interesting to note that immunological parameters were mainly influenced by both temperature and pH at the extreme salinities tested. Moreover, *C. chione* demonstrated to respond to increased temperature and acidification by increasing its metabolic rates, whereas *M. varia* reduced them. Even if biochemical responses not always revealed clear patterns of variation in the studied species, enzymatic activities generally showed an induction at higher temperature. In juveniles, all parameters analysed indicated effects of acidification in both mussels and clams, though to a different extent. Experimental pH negatively affected growth in juvenile clams, but this effect was not found in mussels. Physiological and biochemical responses were more negatively affected in *C. gallina* than in *M. galloprovincialis*. In addition, shell dissolution in clams was more evident and occurred in a shorter time.

Although the results obtained suggest differing tolerance of bivalves to changing environmental conditions, detrimental effects generally revealed in all species, and most of all in juveniles, pose a great concern for the maintenance of the bivalve communities in the Northern Adriatic Sea under a future global change scenario. Dramatic consequences can be hypothesised, such as lost in biodiversity and stock reduction of economically relevant species.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Cambiamenti climatici globali	1
1.2 Variazioni termiche e aline	2
1.3 Acidificazione	3
1.4 Effetti della temperatura e della salinità sugli organismi marini	5
1.5 Effetti dell'acidificazione sugli organismi marini	7
1.6 La formazione della conchiglia nei bivalvi	11
1.7 Il problema della calcificazione	13
1.8 Biomarkers nei bivalvi	15
2. SCOPO DELLA TESI	20
3. MATERIALI E METODI	22
3.1 SPERIMENTAZIONE A BREVE TERMINE SU BIVALVI ADULTI	22
3.1.1 Allestimento dell'impianto e sperimentazione	22
3.1.2 Parametri fisiologici	24
3.1.2.1 Tasso di filtrazione	25
3.1.2.2 Tasso di respirazione	26
3.1.2.3 Tasso di escrezione	26
3.1.2.4 Misura del peso secco	26
3.1.2.5 Tasso di sopravvivenza in aria	27
3.1.3 Parametri biochimici	27
3.1.3.1 Prelievo dei tessuti	27
3.1.3.2 Attività della superossido dismutasi (SOD)	27
3.1.3.3 Attività della glutation-S-transferasi (GST)	28
3.1.3.4 Perossidazione lipidica (TBARS)	29
3.1.3.5 HSP70	30
3.1.4 Parametri immunologici	31
3.1.4.1 THC	31
3.1.4.2 Saggio di pinocitosi: <i>Neutral Red Uptake</i> (NRU)	31
3.1.4.3 Attività lisozima-like	32
3.2 SPERIMENTAZIONE A LUNGO TERMINE SUI GIOVANILI	33
3.2.1 Allestimento dell'impianto e sperimentazione	33

3.2.2 Parametri fisiologici	35
3.2.2.1 Tasso di filtrazione	35
3.2.2.2 Tasso di respirazione e tasso di escrezione	35
3.2.2.3 Misura del peso secco	37
3.2.2.4 Produzione del bisso in <i>M. galloprovincialis</i>	37
3.2.3 Parametri biochimici	37
3.2.4 Prima sperimentazione - Crescita e danno sulla conchiglia	38
3.2.4.1 Misure mensili	38
3.2.4.2 Misure trimestrali	38
3.2.5 Seconda sperimentazione - Crescita e danno sulla conchiglia	41
3.2.5.1 Parametri chimici dell'acqua di mare	41
3.3 ANALISI STATISTICA	42
3.4 LE SPECIE	43
3.4.1 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	43
3.4.2 <i>Chamelea gallina</i>	43
3.4.3 <i>Mimachlamys varia</i>	44
3.4.4 <i>Callista chione</i>	45
4. RISULTATI	46
4.1 SPERIMENTAZIONE A BREVE TERMINE SU BIVALVI ADULTI	46
4.1.1 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	46
4.1.1.1 Parametri fisiologici	46
4.1.1.2 Parametri biochimici	50
4.1.1.3 Parametri immunologici	56
4.1.2 <i>Chamelea gallina</i>	59
4.1.2.1 Parametri fisiologici	59
4.1.2.2 Parametri biochimici	63
4.1.2.3 Parametri immunologici	69
4.1.3 <i>Mimachlamys varia</i>	73
4.1.3.1 Parametri fisiologici	72
4.1.3.2 Parametri biochimici	74
4.1.3.3 Parametri immunologici	76
4.1.4 <i>Callista chione</i>	78
4.1.4.1 Parametri fisiologici	78
4.1.4.2 Parametri biochimici	80
4.1.4.3 Parametri immunologici	82

4.2 PRIMA SPERIMENTAZIONE A LUNGO TERMINE SUI GIOVANILI	84
4.2.1 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	85
4.2.1.1 Parametri fisiologici e biochimici	85
4.2.1.2 Mortalità	87
4.2.1.3 Lunghezza e peso	88
4.2.1.4 Spessore della conchiglia	89
4.2.1.5 Danno sulla conchiglia	90
4.2.2 <i>Chamelea gallina</i>	93
4.2.2.1 Parametri fisiologici e biochimici	93
4.2.2.2 Mortalità	95
4.2.2.3 Lunghezza e peso	96
4.2.2.4 Spessore della conchiglia	97
4.2.2.5 Danno sulla conchiglia	98
4.3 SECONDA SPERIMENTAZIONE GIOVANILI DI <i>M. galloprovincialis</i>	101
4.3.1 Analisi chimiche dell'acqua	102
4.3.2 Parametri fisiologici e biochimici	103
4.3.3 Mortalità	104
4.3.4 Lunghezza e peso	105
4.3.5 Danno sulla conchiglia	106
5. DISCUSSIONE	109
5.1 Risposte fisiologiche	110
5.2 Risposte biochimiche	113
5.3 Risposte immunologiche	117
5.4 Crescita, mortalità e danno alla conchiglia nei giovanili	121
6. CONCLUSIONI	125
7. LETTERATURA CITATA	127

1. INTRODUZIONE

1.1 Cambiamenti climatici globali

L'evidenza dei cambiamenti climatici è attestata da numerosi studi (Petit *et al.*, 1999; Houghton *et al.*, 2001; Augustin *et al.*, 2004; Feely *et al.*, 2004; Sabine *et al.*, 2004; Siegenthaler *et al.*, 2005; The Royal Society, 2005; IPCC, 2007) ed è ormai ampiamente riconosciuto il ruolo dell'aumento dei gas serra, come la CO₂, in questo fenomeno. Le prime conseguenze, già da tempo ipotizzate e modellizzate, sono state realmente osservate, tra esse l'aumento della temperatura degli oceani (Roemmich, 1992), il cambiamento della circolazione termoalina (Bryden *et al.*, 2005; Roether *et al.*, 1996), lo scioglimento dei ghiacciai (Curran *et al.*, 2003), l'acidificazione degli oceani e la variazione della salinità dei mari (IPCC, 2007).

Per comprendere meglio l'origine di questo complesso insieme di fenomeni, ma soprattutto la sua pericolosa evoluzione è necessario considerare le variazioni dei livelli di CO₂ atmosferica dall'epoca pre-industriale fino ai giorni nostri. Infatti la rivoluzione industriale può essere considerata il punto di partenza in un processo di cambiamento che ha visto i livelli di CO₂ atmosferica passare da un valore di circa 280 ppm (pre-rivoluzione industriale), con un range di variazione tra 180 e 300 ppm (Petit *et al.*, 1999; Augustin *et al.*, 2004; Siegenthaler *et al.*, 2005), ai valori odierni di oltre 380 ppm (Feely *et al.*, 2004).

La causa principale di questo incremento è il grande impiego di combustibili fossili, legato allo sviluppo dell'industrializzazione e delle attività agricole (Kleypas *et al.*, 2006). La concentrazione della CO₂ atmosferica è 100 volte più elevata di quanto è stato valutato negli ultimi 650.000 anni (Siegenthaler *et al.*, 2005). E' stato inoltre ipotizzato un incremento dello 0.5% annuo fino alla fine del ventunesimo secolo (Petit *et al.*, 1999; Houghton *et al.*, 2001; Augustin *et al.*, 2004; Siegenthaler *et al.*, 2005). I livelli di CO₂ raggiunti in atmosfera sono molto preoccupanti e le stime temporali per la loro riduzione prevedono un lungo periodo di tempo, difficilmente quantificabile (The Royal Society, 2005).

Studi recenti hanno stimato che solo metà della CO₂ prodotta dalle attività umane rimane in atmosfera, mentre l'altra metà viene assorbita dalla biosfera terrestre (circa 20%) e dagli oceani (circa 30%) (Feely *et al.*, 2004; Sabine *et al.*, 2004).

La diversità degli ambienti terrestri in relazione alla loro posizione geografica può comportare un diverso grado di impatto causato dai cambiamenti climatici.

Un'attenzione particolare deve essere rivolta agli ambienti costieri come baie, estuari, lagune, dove l'effetto dei cambiamenti climatici potrebbe essere più marcato a causa della loro conformazione caratterizzata da minor profondità (Gattuso *et al.*, 1998; Ver *et al.*, 1999; Chen, 2003; Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). Questi ambienti costituiscono il 7% della superficie dei mari e sostengono tra il 10 e il 30% della produzione primaria, nonché immagazzinano l'85% del

carbonio organico e il 45% di quello inorganico (Gattuso *et al.*, 1998; Wollast, 1998; Chen *et al.*, 2003). La fragilità di questi ambienti è anche dovuta al fatto che il 40% della popolazione terrestre vive ad una distanza inferiore a 100 km dalle coste; tale vicinanza influenza negativamente gli ecosistemi costieri e rappresenta un fonte continua di rischio per la loro integrità (Mackenzie, 2003).

1.2 Variazioni termiche e aline

L'aumento dei gas serra nell'atmosfera comporta un progressivo aumento dei valori termici sulla superficie terrestre e nelle acque oceaniche. Il riscaldamento terrestre è stato evidenziato non solo grazie all'analisi di serie storiche di misure della temperatura in molte regioni del pianeta, ma anche attraverso lo studio di effetti secondari legati all'innalzamento termico, come il ritiro dei ghiacciai e la diminuzione dello spessore del ghiaccio in fiumi e laghi.

E' stato dimostrato infatti che la temperatura media globale ha subito un incremento di circa 0.7°C nell'ultimo secolo e che tale aumento continuerà, fino a raggiungere valori compresi tra 1.8 e 4°C alla fine del ventunesimo secolo (IPCC, 2007; Mann *et al.*, 2008). A livello globale non si assisterà ad un aumento omogeneo su tutto il pianeta, ma il fenomeno avverrà più velocemente sulle terre emerse rispetto agli oceani, a causa della maggiore inerzia termica dell'acqua. L'aumento sarà maggiormente percepito alle alte latitudini rispetto alle basse, con un rialzo termico più marcato in inverno rispetto all'estate (IPCC, 2007).

La salinità degli oceani ed in particolar modo delle aree costiere e degli estuari potrebbe essere soggetta a forti alterazioni causate dal cambiamento climatico globale (Booij, 2005; Kay *et al.*, 2006). Sarà influenzata anche la circolazione termoalina sia degli oceani (Bryden *et al.*, 2005), sia di mari chiusi come il Mediterraneo (Roether *et al.*, 1996). Questo processo è strettamente collegato alle variazioni di temperatura e quindi ai fenomeni di evaporazione che potrebbero cambiare il ciclo idrologico su larga scala. Si potrebbe assistere ad un incremento delle precipitazioni alle alte latitudini e vicino ai tropici, mentre nelle regioni subtropicali e alle medie latitudini le precipitazioni potrebbero diminuire. Uno scenario simile riguarderebbe anche l'Italia e il bacino del Mediterraneo (Palmer & Räisänen, 2002; Fenoglio *et al.*, 2010). A seconda della latitudine, le conseguenze per la salinità potrebbero essere alquanto diverse. Nelle regioni dove le precipitazioni saranno più abbondanti la salinità diminuirà, mentre dove prevarrà l'evaporazione la salinità tenderà ad aumentare (Bussell *et al.*, 2008).

1.3 Acidificazione

Quando la CO_2 viene assorbita negli oceani si assiste ad una serie di reazioni chimiche (Fig. 1). Si forma acido carbonico, che si dissocia immediatamente in ione bicarbonato e carbonato, secondo gli equilibri:

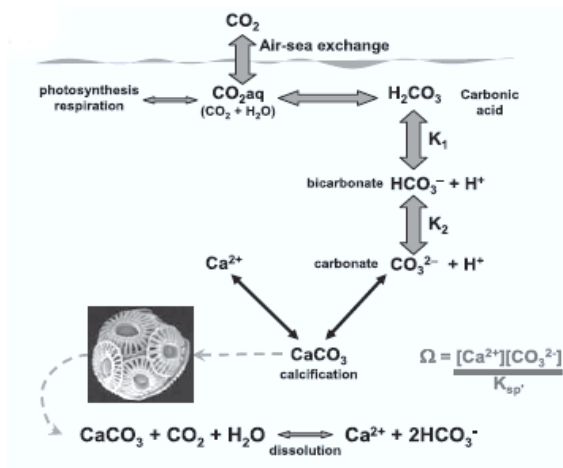
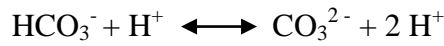
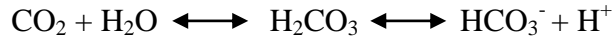


Figura 1 - Sistema dei carbonati in mare.
Da Kleypas, (2006).

funzione, ovvero quella di mantenere il valore del pH marino entro un valore stabile, compreso tra 7.5 e 8.4 (Nybakken, 2004). grazie al cosiddetto “effetto tampone dei carbonati”. La CO_2 atmosferica diffondendo dall’atmosfera all’acqua

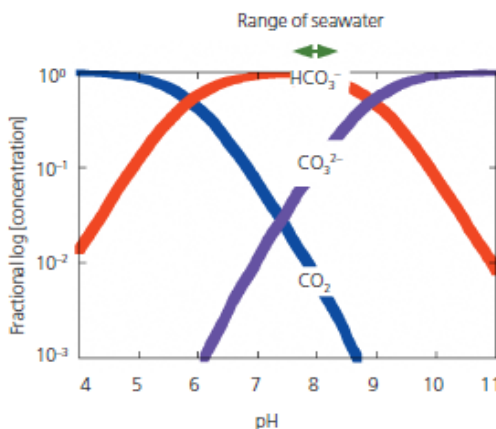


Figura 2 - Proporzioni delle tre forme di CO_2 inorganiche disciolte in acqua. La freccia verde indica il range di pH attuale e quello previsto per il futuro.
Da The Royal Society, (2005).

del mare ne determina un aumento dell’acidità attraverso l’aumento degli ioni H^+ . Quest’ultimi reagiscono con il carbonato (CO_3^{2-}) convertendolo in HCO_3^- . La sottrazione degli H^+ riduce l’acidità e con essa anche la variazione del valore del pH, garantendo all’acqua di mare un valore di pH stabile.

Queste forme rivestono un ruolo fondamentale nella chimica di molti processi biologici degli organismi marini, come la fotosintesi e la calcificazione. Il DIC (Carbonio Inorganico Disciolto) (Fig. 2) : CO_2 (circa l’1% del totale), HCO_3^- (circa il 91%) e CO_3^{2-} (circa l’8%) (The Royal Society, 2005). Tuttavia, il sistema tampone dei carbonati sta rapidamente perdendo la sua efficacia a causa dell’eccessivo apporto di CO_2 antropogenica (Skirrow & Whitfield, 1975; Broecker & Takahashi, 1977; Broecker *et al.*,

1979; Feely & Chen, 1982; Caldeira & Wickett, 2003; Feely *et al.*, 2004; Orr *et al.*, 2005). L'effetto che ne sta derivando è noto come acidificazione degli oceani, ovvero una diminuzione del valore di pH dell'acqua di mare, della concentrazione degli ioni carbonato e del relativo tasso di saturazione del carbonato di calcio (Orr *et al.*, 2005).

L'enorme importanza che gli oceani hanno nel regolare la concentrazione di CO₂ atmosferica è stata riconosciuta soltanto negli ultimi anni. La presenza di due processi fa sì che enormi quantità di CO₂ vengano continuamente immagazzinate negli oceani: il primo, definito come "pompa fisica", determina il trasporto in profondità del carbonio presente nelle acque superficiali durante la formazione delle acque profonde, il secondo, indicato come "pompa biologica", determina la diffusione ed il rilascio, negli strati profondi, della sostanza organica e del carbonato di calcio, formati in superficie (Mann & Lazier, 1996). L'oceano può essere rappresentato come un sistema a due strati: lo strato superficiale, in cui la pressione parziale di CO₂ è più o meno in equilibrio con quella atmosferica, e le acque profonde, che invece presentano livelli di anidride carbonica 50-60 volte superiori a quelli atmosferici. Ne segue che ogni meccanismo fisico, come la presenza di un "upwelling", che aumenta il trasporto di CO₂ dagli strati profondi a quelli superficiali, può determinare un incremento della concentrazione di questo gas serra nell'atmosfera. Lo stesso effetto si potrebbe verificare a causa di una diminuzione dell'attività biologica e quindi del trasporto di CO₂ verso il fondo (pompa biologica) (Mann & Lazier, 1996).

A causa dell'eccessivo apporto di CO₂ negli oceani, negli ultimi 250 anni si è assistito ad una progressiva diminuzione del valore di pH dell'acqua superficiale che è passato da 8.16 a 8.05. Tale variazione rappresenta un aumento del 30%, della concentrazione degli ioni idrogeno (H⁺) rispetto a quella presente prima della rivoluzione industriale. Analogamente a quanto riportato per i livelli di CO₂ atmosferica, una tale variazione di pH non è mai stata registrata negli ultimi 20 milioni di anni della storia terrestre (Feely *et al.*, 2004). E' inoltre prevista una progressiva diminuzione tra 0.3 a 0.5 unità di pH entro la fine del ventunesimo secolo (Caldeira & Wickett, 2005; Raven *et al.*, 2005; IPCC, 2007, Caldeira *et al.*, 2007; Feely *et al.*, 2008). Se tale processo dovesse continuare causerebbe una riduzione di 0.7 unità di pH entro il 2300 (Caldeira & Wickett, 2003).

Per gli organismi marini le ripercussioni potrebbero essere molto gravi, e rischi ancora maggiori si temono per quegli organismi calcificatori che potrebbero non essere in grado di adattarsi abbastanza velocemente a tali cambiamenti (Guinotte & Fabry, 2008), con una conseguente riduzione della biodiversità marina (Feely *et al.*, 2004). Questa situazione potrebbe portare a cambiamenti della distribuzione e dell'abbondanza delle diverse specie e avere effetti sull'intera rete trofica (Guinotte & Fabry, 2008).

1.4 Effetti della temperatura e della salinità sugli organismi marini

La temperatura e la salinità sono tra i più importanti fattori fisici che possono condizionare la vita degli organismi marini (Kinne, 1971). Un aspetto che deve essere considerato è la complessa interazione che si instaura tra questi due fattori. La temperatura può infatti modificare l'effetto della salinità alterando negli organismi il livello di tolleranza per quest'ultimo fattore, ma anche la salinità può agire allo stesso modo nei confronti della temperatura (Kinne, 1971; Williams & Geddes, 1991).

L'aumento medio delle temperatura degli oceani previsto nel prossimo futuro potrà avere una ricaduta negativa a tutti i livelli trofici marini, dai produttori primari come alghe e fanerogame marine, fino ai vertebrati (Scavia *et al.*, 2002).

E' noto che nei confronti di ciascuno dei diversi fattori ambientali, siano essi biotici che abiotici, ogni specie presenta, un intervallo di tolleranza entro il quale può svolgere le proprie funzioni biologiche. Superati questi limiti di tolleranza, però, le specie non sono in grado di resistere o sopravvivere in quell'ambiente e quindi saranno destinate a morire o migrare verso ambienti con condizioni ambientali più favorevoli. La temperatura rientra tra i fattori abiotici che potrà in futuro influenzare negativamente gli organismi marini (Hofmann & Todgham, 2010), innanzitutto attraverso un aumento dei costi metabolici (Portner, 2001; O'Connor *et al.*, 2009; Hofmann & Todgham, 2010). Di seguito sono riportati alcuni esempi che mostrano effetti biologici negativi dovuti all'aumento della temperatura del mare. In Mediterraneo è stato valutato un aumento del tasso di mortalità della gorgonia *Paramuricea clavata* (Coma *et al.*, 2009). Nell'Oceano Pacifico è stato osservato un aumento del tasso di mortalità nei coralli (Randall & Szmant, 2009), condizione peraltro associata al fenomeno del "coral bleaching" (Timothy *et al.*, 2007) ugualmente dovuto all'innalzamento della temperatura del mare. Nei gasteropodi e negli echinodermi è stato riscontrato un aumento delle patologie infettive come nel caso di *Haliotis tuberculata* (Travers *et al.*, 2009) e di *Strongylocentrotus purpuratus* (Lester *et al.*, 2007). Nel teleosteo *Zoarces viviparus*, condizioni di ipossia causate dall'aumento della temperatura comportano un effetto negativo sul tasso di respirazione e di sopravvivenza (Pörtner & Knust, 2007).

Nei molluschi bivalvi, in quanto organismi pecilotermi, la temperatura corporea cambia al variare di quella ambientale. Un suo incremento determina generalmente un incremento delle attività metaboliche, purché all'interno delle variazioni termiche tollerate dall'organismo. Tra i fattori che possono modificare l'intensità della risposta metabolica dovuta ad una variazione della temperatura vi sono comunque la taglia corporea dell'organismo, il livello metabolico e le condizioni riproduttive (Bayne *et al.*, 1976; Worrall & Widdows, 1984). Tuttavia, in prossimità dei limiti di tolleranza termica, Widdows (1985) ha osservato che *Mytilus edulis* mostra una riduzione dei tassi metabolici riducendo la propria attività cellulare, il tasso di sopravvivenza, legato quest'ultimo alla depressione

della risposta immunitaria. A livello immunitario infatti, alcuni studi hanno messo in luce l'influenza negativa dall'aumento della temperatura: ad esempio *Chamelea gallina* ha mostrato alterazioni della funzionalità degli emociti, con una riduzione del tasso di fagocitosi e una depressione dell'attività della superossido dismutasi (Monari *et al.*, 2007). Anche il pettinide *Chlamys farreri*, esposto ad alte temperature ha mostrato una riduzione del tasso di fagocitosi associata tuttavia ad un aumento del numero degli emociti (Chen *et al.*, 2007).

Durante il ciclo biologico dei bivalvi le fasi iniziali, dall'emissione dei gameti fino allo sviluppo larvale, sono in genere caratterizzate da intervalli di tolleranza termici più ristretti di quelli tipici dello stadio adulto, tant'è che i gameti vengono emessi solo all'interno di ben definiti intervalli di temperatura (Thorson, 1950; Eversole, 2001; Barber & Blake, 2006). Nel nord Atlantico, in *Crassostrea virginica* e *Mercenaria mercenaria*, è stato dimostrato che è sufficiente un piccolo aumento termico rispetto ai valori medi di temperatura durante il periodo della riproduzione, per ridurre i tassi di crescita e di sopravvivenza delle larve (Loosanoff, 1965; Fritz, 2001; Cragg, 2006). Inoltre, l'aumento delle temperature può rendere più vulnerabili le larve se associato ad altre condizioni di stress come per esempio la riduzione del pH dell'acqua di mare (Cherkasov *et al.*, 2010) e le variazioni di salinità (Kinne, 1971).

Oltre alla temperatura, anche la salinità riveste un ruolo fondamentale a livello ecologico (Kinne, 1964,1971), soprattutto per gli organismi marini che vivono in prossimità della costa o in vicinanza delle foci dei fiumi, poiché la salinità in queste aree presenta variazioni tidali, giornaliere e stagionali causate da diverse condizioni di evaporazione e di apporto di acque dolci continentali. Dal punto di vista ecologico, gli organismi che vivono in questi ambienti sono prevalentemente eurialini, in grado cioè di tollerare condizioni di forti variazioni di salinità, mentre una componente meno numerosa è costituita da organismi stenoalini, con un più ristretto intervallo di tolleranza alina. Per questa ragione, gli organismi stenoalini sono in genere animali in grado di allontanarsi dall'area quando la concentrazione salina supera i limiti di tolleranza della specie e di ritornarci quando i valori di salinità lo permettono.

Ambienti più stabili dal punto di vista della concentrazione salina sono il mare aperto o habitat marini di profondità, non condizionati da apporti di acqua dolce o da evaporazione. Gli organismi che vivono in questi ambienti, essendo esclusivamente stenoalini, sono particolarmente vulnerabili se esposti anche a piccole variazioni di salinità.

Gli effetti della salinità sono stati indagati in molte specie: in diversi crostacei è stata evidenziata una riduzione del tasso di crescita in condizioni di bassa salinità, come nel decapode *Rhithropanopeus harrisi* (Cristiansen & Costlow, 1975), nell'anfipode *Gammarus lawrencianus* (Steele & Steele, 1991) nell'isopode *Coxicerberus ramosae* (Figueiredo *et al.*, 2009) ed anche nei policheti come *Perinereis rullier* studiato proprio nella laguna di Venezia (Prevedelli & Vandini,

1991). Tra i pesci, *Brevoortia tyrannus* la diminuzione della concentrazione salina riduce la crescita ed aumenta il tasso di mortalità (Hettler, 1976).

Anche nei bivalvi, l'effetto della salinità è stato molto studiato. Tra le varie strategie adottate da questi organismi vi è la capacità di chiudere le valve fino a quando le condizioni ambientali favorevoli non sono ripristinate. Alcune specie di bivalvi hanno la capacità di tollerare ampie variazioni aline grazie a fenomeni di adattamento, come è stato dimostrato in diverse popolazioni di mitili lungo le coste dell'Alaska, soggette all'apporto delle acque dolci di fusione dei ghiacci polari (Stickle & Sabourin, 1979). Le variazioni di salinità possono però determinare degli effetti negativi sui bivalvi, come nel caso delle basse salinità del Mar Baltico, ritenute la causa della riduzione di taglia osservata in alcune popolazioni locali (Feng, 1971). A livello fisiologico per esempio è stato osservato in *M. edulis* che salinità inferiori a 20 psu comportano una riduzione dei tassi di filtrazione e di respirazione (Widdows, 1985). Sempre nei bivalvi, la salinità è inoltre responsabile di fenomeni di stress a livello di specifici tessuti, in particolare quello branchiale, dove sono stati osservati una riduzione del battito ciliare e un aumento del consumo di ossigeno in condizioni di ipersaline in *C. virginica*, *Modiolus demissus* e *M. edulis*, (Feng, 1971). Anche le risposte immunologiche sono state indagate in diverse condizioni aline: in *C. gallina*, ad esempio l'attività della superossido dismutasi negli emociti risulta inibita all'aumentare della salinità (Matozzo *et al.*, 2007). Sempre in *C. gallina* si è osservata una riduzione del numero degli emociti in condizioni di bassa salinità, e una riduzione del tasso di fagocitosi e della sopravvivenza in aria, sia in condizioni di alta che di bassa salinità (Matozzo *et al.*, 2006). Risultati ottenuti da studi condotti sia in campo che in laboratorio hanno dimostrato che spesso vi è una correlazione tra una situazione di ipersalinità e aumento della probabilità che insorgano alcune patologie, come è stato osservato in *C. virginica* per la parassitosi da *Perkinsus marinus* (Crosby & Roberts 1990; Gauthier *et al.*, 1990; Paynter & Burreson, 1991; Chu *et al.*, 1993) e per l'aumento del rischio di infezione da parte di *Haplosporidium nelsoni* (MSX) (Ford, 1988). Variazioni di salinità possono essere responsabili anche di alterazioni a livello di strutture scheletriche o di protezione dei tessuti molli. In *Mya arenaria* le variazioni di salinità, associate a variazioni termiche, sono risultate in grado di influenzare la composizione in minerali della conchiglia dei giovanili (Strasser *et al.*, 2008).

1.5 Effetti dell'acidificazione sugli organismi marini

Lo studio degli effetti biologici causati dall'acidificazione degli oceani sugli organismi ha avuto solo di recente un particolare impulso. Infatti i primi studi che hanno correlato l'aumento delle concentrazioni atmosferiche di CO₂ alla riduzione dei livelli di saturazione del carbonato di calcio in mare risalgono a circa 10 anni fa e hanno messo in luce effetti negativi su coralli e coccolitofori (Gattuso *et al.*, 1998; Kleypas 1999; Langdon *et al.*, 2000, 2003; Riebesell *et al.*, 2000). Tra gli

organismi più colpiti dai cambiamenti in atto nel sistema dei carbonati dell'acqua di mare ci sono infatti i costruttori di strutture carbonatiche, quali scheletri, conchiglie o gusci. Esperimenti condotti in laboratorio o in mesocosmi su coralli ermatipici, che formano strutture a base aragonitica, hanno mostrato che il tasso di calcificazione di questi organismi costruttori di reef tropicali diminuisce del 20-60% ad una concentrazione sperimentale di CO₂ pari a 560 ppm, valore che verrà probabilmente raggiunto entro la fine del secolo corrente, se le emissioni di CO₂ non diminuiranno (Guinotte & Fabry, 2008). Esperimenti condotti in mesocosmi con concentrazioni di CO₂ doppie rispetto a quelle attuali su alghe calcificanti hanno mostrato una diminuzione del 40% del tasso di crescita, del 78% del reclutamento e del 92% della superficie di copertura (Guinotte & Fabry, 2008).

Studi effettuati su Cocolitoforidee, tra le quali *Emiliana huxleyi*, specie ad ampia distribuzione geografica, sia in esperimenti condotti in laboratorio che in mesocosmo, hanno mostrato una diminuzione dal 25 al 66% del tasso di calcificazione dopo esposizione a incrementi della pCO₂ da 560 a 840 ppm (Guinotte & Fabry, 2008). Altri organismi diffusi a tutte le latitudini come gli Pteropodi hanno presentato dissoluzione della conchiglia a valori di sottosaturazione dell'argonite in esperimenti di laboratorio durati 48 ore (Guinotte & Fabry, 2008).

Per quanto riguarda i bivalvi, Gazeau *et al.* (2007) hanno ipotizzato che il tasso di calcificazione potrebbe diminuire del 25% in *M. edulis* e del 10% in *Crassostrea gigas* entro la fine del secolo. Questa diversa percentuale di diminuzione del tasso di calcificazione può essere spiegata dalla diversa composizione in carbonati della conchiglia delle due specie: la conchiglia di *M. edulis* è composta per più dell'80% da aragonite, mentre quella di *C. gigas* è prevalentemente formata da calcite (Gazeau *et al.*, 2007).

L'acidificazione degli oceani comporta possibili alterazioni non solo nella deposizione del carbonato di calcio, ma anche in molteplici risposte fisiologiche e biochimiche, espressione delle principali funzioni vitali (Doney *et al.*, 2009). Elevate concentrazioni ambientali di CO₂ alterano l'equilibrio acido-base dei fluidi extracellulari ed il grado di stress che ne deriva per l'organismo è commisurato alla sua capacità di rispondere a questa variazione. E' noto che alti valori di pCO₂ extracellulare (1000-4000 µatm) nei metazoi acquatici ectotermici garantiscono il mantenimento di un gradiente tra organismo e ambiente che permette l'escrezione della CO₂ metabolica. In condizioni di ipercapnia quindi un aumento della pCO₂ extracellulare consente all'organismo di mantenere il flusso metabolico di CO₂ (Melzner *et al.*, 2009). Gli organismi acquatici sono in grado di modificare i valori di pH dei fluidi extracellulari al variare del pH del mezzo, ma tale regolazione può avvenire solo all'interno di un range relativamente limitato e specie-specifico. Quando la capacità di regolazione interna non riesce più a far fronte alle variazioni esterne, lo stato di benessere dell'organismo risulterà

compromesso, con conseguenze negative sulla crescita, sul successo riproduttivo e sulla sopravvivenza.

Alcuni esempi possono far luce sulle diverse attitudini degli organismi nella regolazione del pH fisiologico. Michaelidis *et al.* (2005) hanno riportato che in *Mytilus galloprovincialis* un'esposizione a lungo termine a pH 7.3 produce un abbassamento permanente del pH dei fluidi extracellulari, mentre risulta completamente compensata l'acidosi a livello intracellulare. Condizioni più severe di ipercapnia non consentono tale compensazione in *M. edulis* (Lindinger *et al.*, 1984). In entrambi gli studi si riscontra un aumento della concentrazione di ioni bicarbonato e calcio nell'emolinfa che suggerisce una limitazione del grado di acidosi attraverso una parziale dissoluzione della conchiglia. Viceversa, Thomsen *et al.* (2010) in presenza di aumentati livelli di pCO_2 (1400-4000 μatm ; pH 7.56 e pH 7.08, rispettivamente) confermano per *M. edulis* una significativa riduzione del pH dell'emolinfa, ma non trovano nessun aumento delle concentrazioni di ioni bicarbonato, calcio e magnesio e riportano invece una riduzione significativa del carbonato. In presenza di una riduzione del pH ambientale, i mitili, come altri organismi caratterizzati da tassi metabolici relativamente bassi, non riescono ad attuare una compensazione del pH extracellulare e l'equilibrio del sistema $CO_2/HCO_3^-/CO_3^{2-}$ dell'emolinfa si sposta, riducendo la concentrazione dei carbonati. Contrariamente, in molti animali con un metabolismo più elevato il processo di accumulo di HCO_3^- extracellulare è un meccanismo efficiente per stabilizzare il pH extracellulare in caso di sue repentine diminuzioni. Questa capacità tampone per esempio mantiene funzionali i pigmenti respiratori in condizioni di ipercapnia (Melzner *et al.*, 2009). Tra i vari taxa, l'entità dell'accumulo di HCO_3^- è variabile, anche se recenti studi hanno dimostrato che la capacità di compensazione maggiore è presente nei pesci (Larsen *et al.*, 1997; Michaelidis *et al.*, 2007), nei crostacei (Pane & Barry, 2007; Spicer *et al.*, 2007) e nei molluschi cefalopodi (Gutowska *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda i bivalvi, in particolare, recenti studi hanno indagato gli effetti della variazione di pCO_2 su risposte diverse degli animali, misurate a livello biochimico, cellulare e di organismo. Lo studio degli emociti, che giocano un ruolo importante nella difesa immunitaria, ma sono altresì coinvolti in altri processi come trasporto e assimilazione dei nutrienti, escrezione, crescita e riparazione della conchiglia, ha permesso di evidenziare effetti negativi dell'acidificazione sulla capacità di fagocitosi e in generale di risposta immunitaria contro i patogeni (Malagoli & Ottaviani, 2005; Bibby *et al.*, 2008) In condizioni di elevata pCO_2 Thomsen & Melzner (2010) hanno osservato in *M. edulis* un aumento dei tassi di respirazione e di escrezione, e in particolare del catabolismo proteico, con, una diminuzione del rapporto O:N. Anche l'alimentazione è risultata negativamente influenzata (Bamber, 1987; Michaelidis *et al.*, 2005), con ripercussioni sulla crescita (Michaelidis *et al.*, 2005; Berge *et al.*, 2006; Gazeau *et al.*, 2010; Thomsen *et al.*, 2010) e sullo stato di salute

(Beesley *et al.*, 2008). Le modalità di crescita e di deposizione della conchiglia nonché della sua alterazione (Bamber, 1987; Green *et al.*, 2004, 2009; Kurihara *et al.*, 2007) sono state valutate in momenti diversi del ciclo vitale, dai giovanili agli adulti. Effetti sui primi stadi di sviluppo embrionale e larvale sono stati indagati da Kurihara *et al.* (2007) e Gazeau *et al.* (2010). In particolare, Kurihara *et al.* (2007) hanno rilevato in *M. galloprovincialis* e *C. gigas* una significativa riduzione dei tassi di fecondazione, di schiusa e di crescita della conchiglia (6 giorni dopo la fecondazione) ad un pH di 7.4.

Molte specie potrebbero venire negativamente colpite da una progressiva acidificazione delle acque marine e le condizioni di rischio risultano accresciute dalla velocità con cui il cambiamento può avvenire rispetto a potenziali capacità di adattamento degli organismi. Conseguenze negative a livello ecosistemico potrebbero derivare da una riduzione della biodiversità, in seguito alla diminuita fitness di alcune specie o all'incremento di quella di altre (Hall-Spencer *et al.*, 2008).

1.6 La formazione della conchiglia nei bivalvi

La biomineralizzazione è un processo attraverso il quale gli organismi riescono a formare strutture minerali, come ad esempio scheletri e conchiglie, con funzioni strutturali, di protezione o integrate in specifiche funzioni fisiologiche. Questo processo può avvenire con due modalità, essendo “biologicamente indotto” o “mediato da una matrice organica” (Lowenstam, 1981).

Nel primo caso la precipitazione dei minerali è dovuta all’interazione tra l’attività

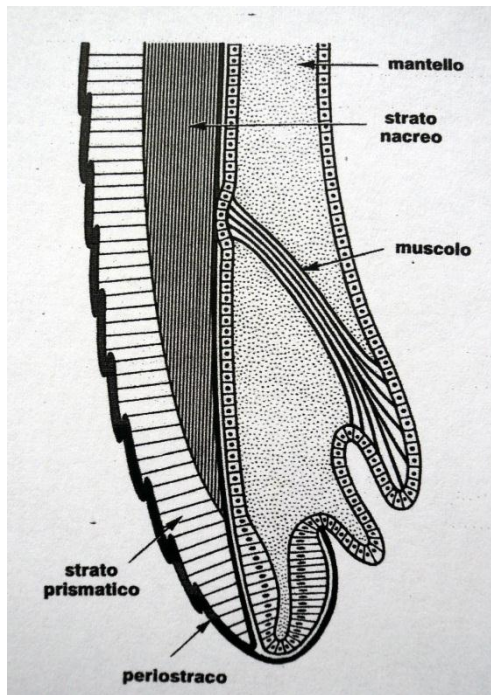


Figura 3 - Sezione trasversale schematica del margine di una valva di bivalve e del margine del mantello.

biologica dell’animale e l’ambiente nel quale vive. Mentre nel secondo, la biomineralizzazione è totalmente condizionata dall’attività cellulare dell’organismo. La maggior parte dei molluschi ha sviluppato un esoscheletro calcificato, la conchiglia, in grado di proteggerli da condizioni ambientali non favorevoli e dalla predazione (Fig. 3). La conchiglia è una struttura organo-minerale nella quale la componente minerale rappresenta più del 95% del peso, mentre la frazione organica meno del 5% (Lowenstam & Weiner, 1989). Nonostante la componente organica sia molto scarsa, essa ha una peculiare proprietà, ovvero quella di essere in grado di organizzare la frazione minerale in tre strati. Questi strati sono: il periostraco, ovvero lo strato più esterno costituito da

un insieme di proteine che prendono il nome di conchiolina. Questo strato protegge il CaCO_3 sottostante; l’ostraco, ovvero lo strato calcareo più esterno, detto anche strato prismatico poiché è formato da prismi esagonali impilati in colonna; l’ipostraco, ovvero lo strato calcareo più interno. In questo strato i cristalli di aragonite sono disposti in lamine parallele al mantello. In alcuni bivalvi questo strato è composto da spessi strati di cristalli tabulari e viene definito nacreo o madreperlaceo (Fig. 3).

Esse sono caratterizzate dall’aver diverse capacità di resistenza agli stress meccanici (Lowenstam & Weiner, 1989). La costruzione della conchiglia inizia sin dai primi stadi larvali dei molluschi, con una crescita che continua fino alla morte dell’animale. Il tasso di crescita è maggiore nella fase giovanile e diminuisce progressivamente nel tempo. Nella fase larvale di trocofora, la formazione della conchiglia inizia con la secrezione di una lamella organica la quale ha la funzione di sostenere il primo processo di mineralizzazione (Saleuddin *et al.*, 1983) costituito soprattutto da deposizione di carbonato di calcio amorfo

(Checa, 2000). Nella fase successiva, durante il normale sviluppo ontogenetico, la lamella organica produce il periostraco ovvero la componente più esterna della conchiglia. Normalmente la crescita della conchiglia inizia dal bordo della stessa, e più precisamente in un piccolo spazio (spazio extrapalleale) che si forma tra il periostraco ed il mantello. In questo spazio, le cellule epiteliali del mantello, responsabili del processo di calcificazione, rilasciano tutti i precursori della componente minerale (ioni calcio e carbonato, che sono attivamente escreti dal

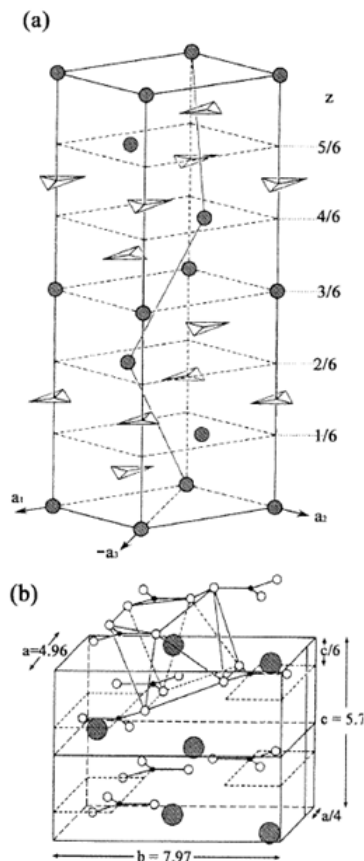


Figura 4 - Struttura della calcite (a) e della aragonite (b).
Da Meldrum (2003).

citoplasma attraverso pompe ioniche) e la componente organica della conchiglia escreta per esocitosi dalle stesse cellule. In questo fluido extrapalleale supersaturato, tutte queste componenti riescono ad auto-assemblarsi e interagire con gli ioni metallici. Mount *et al.*, (2004) hanno inoltre evidenziato in *C. virginica*, il contributo dei granulociti, ovvero di una componente degli emociti dell'emolinfa dei molluschi bivalvi, nella rigenerazione della conchiglia. I granulociti infatti sono in grado di rilasciare e modellare i cristalli di CaCO_3^{2-} .

Il prodotto finale di questa complessa interazione tra componente organica e inorganica, ovvero la conchiglia, è una struttura di strati sovrapposti, costituiti principalmente da calcite e/o aragonite (Carter, 1980).

La calcite e l'aragonite sono i due polimorfi più comuni di carbonato di calcio nei campioni geologici e biologici (Fig. 4) (Meldrum, 2003). Le due forme differiscono nella struttura, romboedrica nella calcite e ortorombica nell'aragonite, ma hanno una simile stabilità termodinamica in condizioni standard (20°C e 1 atm). La struttura

della calcite è tradizionalmente considerata analoga a quella dell' NaCl , dove gli ioni Na^+ e Cl^- sono rimpiazzati dai gruppi Ca^{2+} e CO_3^{2-} . La calcite può essere descritta in diversi modi, ma per convenienza si usa rappresentarla tramite unità esagonali contenenti 6 molecole di CaCO_3 aventi la stessa altezza della struttura romboedrica. Gli ioni Ca^{2+} e CO_3^{2-} sono localizzati in strati alternati. Gli ioni CO_3^{2-} presentano lo stesso orientamento nel medesimo strato, ma orientamento opposto a quello degli strati adiacenti (Meldrum, 2003).

L'aragonite è descritta come un insieme di unità ortorombiche nelle quali gli ioni metallici sono arrangiati nello spazio a formare una struttura pseudoesagonale. Come nella calcite, i gruppi Ca^{2+} e CO_3^{2-} sono organizzati in strati alternati (Meldrum, 2003).

La formazione e la stabilità dei polimorfi del CaCO_3 sono molto sensibili a vari parametri, quali temperatura e supersaturazione del medium nel quale si formano. È noto che la calcite precipita a temperatura ambiente, mentre l'aragonite a temperature prossime ai 100°C (Meldrum, 2003).

L'aragonite e la calcite all'interno degli strati della conchiglia possono essere disposte in vari modi. L'aragonite si può presentare soprattutto come prismi o lamine (spessore $0.5\text{-}1\mu\text{m}$) disposte parallelamente alla superficie della conchiglia e solitamente negli strati più interni; la calcite si trova principalmente come prismi (diametro $20\text{-}100\mu\text{m}$) disposti perpendicolarmente alla superficie della conchiglia e nello strato più esterno (Kobayashi & Samata, 2006).

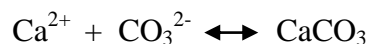
1.7 Il problema della calcificazione

I carbonati di calcio (CaCO_3) compongono la maggior parte dei minerali biogenici prodotti dagli organismi calcificatori e sono ampiamente diffusi in molti taxa (Lowenstam & Weiner 1989). Tre degli otto polimorfi del CaCO_3 sono costituiti da puro CaCO_3 e sono la calcite, l'aragonite e la vaterite (Addadi *et al.*, 2003). Dei tre, calcite e aragonite rivestono un ruolo fondamentale nella formazione delle strutture calcaree presenti in molti organismi marini e della conchiglia dei bivalvi in particolare. L'alterazione degli equilibri chimici che regolano la presenza dei carbonati nell'acqua di mare rappresenta dunque un serio problema per tutti questi organismi andando ad interferire con la formazione e la crescita delle loro strutture calcaree.

Negli oceani, infatti, la diminuzione del pH non solo agisce sull'equilibrio del sistema dei carbonati portando ad una diminuzione della $[\text{CO}_3^{2-}]$, ma va ad influire sullo stato di saturazione (Ω) del CaCO_3 che viene espresso come:

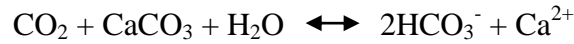
$$\Omega = \frac{[\text{Ca}^{2+}] * [\text{CO}_3^{2-}]}{K_{ps}^*}$$

dove K_{sp}^* è il prodotto di solubilità e $[\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]$ sono le concentrazioni dei due ioni nel campione di acqua esaminato (Guinotte & Fabry, 2008). Se Ω è maggiore di 1 ($\Omega > 1$), quindi quando le acque sono supersaturate, la deposizione del CaCO_3 da parte degli organismi secondo la reazione:



è favorita perché l'equilibrio è spostato verso destra. Per coralli, molluschi, foraminiferi ed altri organismi calcificanti, nel caso in cui le acque siano sottosaturate, quindi con un $\Omega < 1$, la deposizione di CaCO_3 diventa più difficoltosa e inizia a verificarsi invece la dissoluzione del CaCO_3 deposto in precedenza (Orr *et al.*, 2005; Fabry *et al.*, 2008). L'incremento della

concentrazione della CO_2 nell'acqua sta influenzando sull'equilibrio del carbonato in acqua spostandolo verso destra e provocando la diminuzione del pH, grazie all'aumento del rilascio di ioni H^+ , e la diminuzione della disponibilità degli ioni CO_3^{2-} necessari per la deposizione del CaCO_3 (Feely *et al.*, 2004).



Il CaCO_3 , una volta formatosi, può dissolversi nell'acqua, se vi è una bassa concentrazione di CO_3^{2-} , e diventare più solubile a basse temperature e con alte pressioni, condizioni che si ritrovano nelle profondità oceaniche. Esiste quindi una profondità sopra la quale il CaCO_3 si può facilmente depositare, permettendo agli organismi calcificatori la deposizione delle proprie strutture calcaree, e sotto la quale invece prevalgono fenomeni opposti di dissoluzione. Questa profondità è detta orizzonte di saturazione.

La stabilità del CaCO_3 è influenzata anche dalla concentrazione di CO_2 presente nell'acqua. La concentrazione di questo gas aumenta con la diminuzione della temperatura: acque fredde riescono ad assorbire maggiori quantità di CO_2 . La risalita di acque profonde, fredde e ricche di CO_2 , porta alla formazione di strati

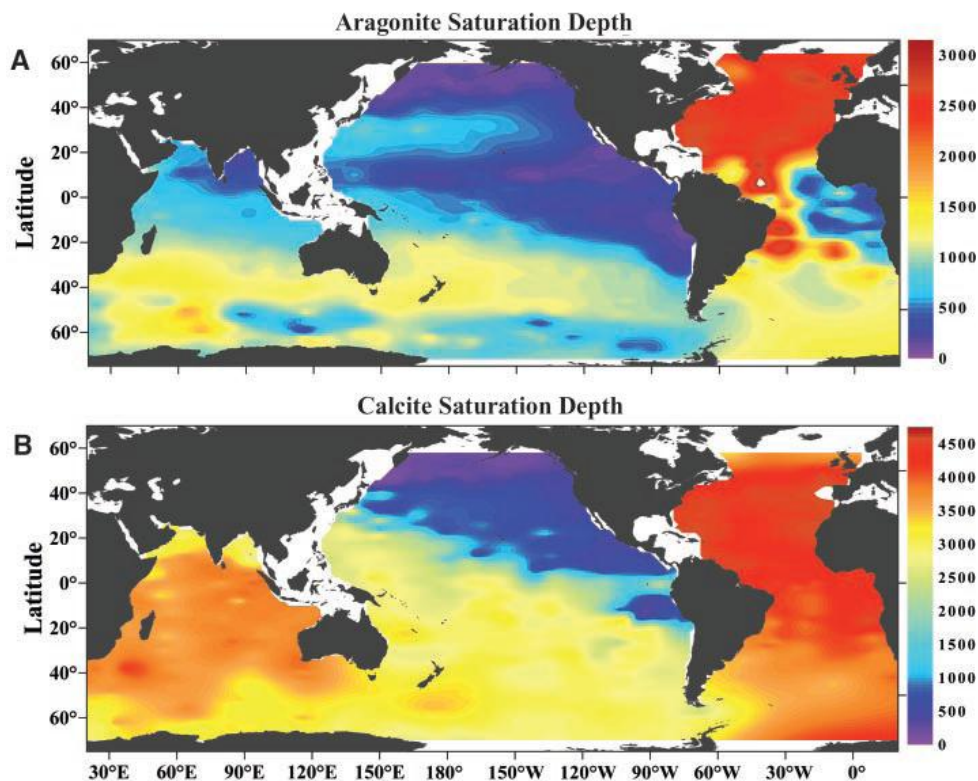


Figura 5 - Orizzonti di saturazione per calcite (A) e aragonite (B). Da Feely *et al.*, (2004).

superficiali a basso pH. Infatti, i più bassi valori di pH dell'acqua superficiale si sono riscontrati nelle zone di upwelling. L'aumento della concentrazione di CO_2 che causa la diminuzione del pH, comporta anche una diminuzione di Ω del CaCO_3 , con un conseguente spostamento dell'orizzonte di saturazione verso la

superficie. Tra le due più comuni forme del carbonato di calcio, l'aragonite ha la caratteristica di essere più solubile rispetto alla calcite e quindi l'orizzonte di saturazione dell'aragonite è sempre più vicino alla superficie rispetto a quello della calcite (Fig. 5).

Di conseguenza, gli organismi che depongono calcite sembrano essere meno vulnerabili alle suddette condizioni di acidificazione rispetto a quelli che depongono aragonite (The Royal Society, 2005). Tra i bivalvi, specie come i mitilidi *M. galloprovincialis*, *M. edulis* e i veneridi *M. mercenaria*, *M. arenaria*, avendo una conchiglia composta prevalentemente di aragonite (Green *et al.*, 2004; Checa *et al.*, 2007) potrebbero essere più sensibili alle future condizioni di acidificazione rispetto a specie con una composizione prevalentemente di calcite come *Ostrea edulis*, *Anomia ephippium*, e i pectinidi *Mimachlamys varia* e *Aequipecten opercularis* (Checa *et al.*, 2007).

1.8 Biomarkers nei bivalvi

Tutti gli organismi nel loro ambiente possono essere esposti a varie condizioni stressogene, siano esse di natura abiotica, come variazioni di temperatura, ossigeno, pH e salinità, esposizione a raggi UV e a contaminanti chimici, o biotica, come la presenza di parassiti o di predatori, la riproduzione e la disponibilità di cibo. L'abilità di un organismo di rispondere a stimoli di diversa natura dipende generalmente dalla sua capacità adattativa che comporta spesso un cambiamento del suo stato fisiologico ottimale.

Uno stress può essere definito come un'alterazione delle condizioni fisiologiche, indotta da un cambiamento ambientale, che rende l'individuo più vulnerabile a future variazioni ambientali (Bayne *et al.*, 1985).

Quando un organismo è in uno stato di stress, le alterazioni di alcune risposte fisiologiche possono essere quantificate e utilizzate nella definizione di indici di stress (biomarkers). I biomarkers possono quindi descrivere modificazioni misurabili nei sistemi biologici a differenti livelli di organizzazione: molecolare, cellulare, di individuo, di popolazione e di comunità (Bayne, 1986).

Negli ultimi decenni i biomarkers sono stati ampiamente utilizzati soprattutto in indagini ecotossicologiche poiché forniscono in maniera rapida e precisa informazioni sugli effetti prodotti dall'esposizione a composti inquinanti su organismi, popolazioni e/o comunità. A partire dagli anni '70, quando si realizzano i primi studi di ecotossicologia marina (Bayne *et al.*, 1976; Payne, 1977), i biomarkers hanno trovato applicazione in moltissime branche della medicina e dell'ecologia, come evidenziato dal crescente numero di pubblicazioni scientifiche sull'argomento (McCarthy & Shugart, 1990; Depledge & Fossi, 1994; Au, 2004; Fränze, 2006; Porte *et al.*, 2006).

E' stata proposta una suddivisione dei biomarkers in diverse categorie (Bayne, 1986). Vengono distinti due gruppi principali, ovvero biomarkers specifici, costituiti da risposte a livello molecolare o biochimico in presenza di specifici

inquinanti, e biomarkers generici, costituiti da tutte quelle risposte a livello molecolare, cellulare o fisiologico che possono mettere in evidenza una generale condizione di sofferenza riconducibile a diversi fattori ambientali (Viarengo & Canesi, 1991).

Tra i biomarkers specifici valutati a livello molecolare, rivestono particolare importanza quelli che consentono di indagare la capacità delle cellule di mantenere la funzionalità delle proprie proteine. Tra questi biomarkers, le HSP (Heat Shock proteins) rivestono un ruolo importante. Le HSP sono così chiamate perché la loro sintesi viene indotta in colture cellulari o organismi esposti ad elevate temperature. Le HSP sono classificate in base al loro peso molecolare (kDa), e la maggior componente è costituita dalle HSP90, 70 e 60 kDa. Tra le HSP più studiate ci sono le HSP70 (Morimoto *et al.*, 1990) le quali compaiono in due forme: la forma costitutiva (HSC70 Heat Shock Cognates), che è sempre presente nella cellula, e la forma inducibile (HSP70), che viene espressa solo in risposta a stress (Clark & Peck, 2009).

Nonostante la temperatura sia il principale fattore attivante, altri agenti stressogeni promuovono la sintesi di HSP con funzioni di protezione o riparazione di danni cellulari (Harndahl *et al.*, 1999; Hamilton & Heckathorn, 2001; Iba, 2002). In particolare, è stata osservata una loro sovraespressione in condizioni di stress chimico o fisiologico come quello indotto da anossia in *Salmonella typhimurium* (Spector *et al.*, 1986), da variazioni di salinità e temperatura in *M. galloprovincialis* (Chapple, 1998; Minier *et al.*, 2000; Bodin *et al.*, 2004), da esposizione a xenobiotici in *M. galloprovincialis* e *Ruditapes philippinarum* (Snyder *et al.*, 2001; Chora, 2009), da esposizione a metalli in anfipodi (Werner & Negel, 1997) ed in generale in risposta a stress ossidativi (Kalmar & Greensmith, 2009).

Sempre a livello biochimico possono essere valutate come biomarkers attività enzimatiche o quantificate specifiche molecole che intervengono in risposta ad uno stress ossidativo prodotto dai ROS, ovvero le specie reattive dell'ossigeno. I ROS possono essere prodotti dall'organismo in risposta ad agenti contaminanti o ad alterazioni fisiologiche legate a cambiamenti della temperatura, della salinità, dell'ossigeno disciolto, dello stato nutrizionale e nel ciclo riproduttivo degli animali (Power & Scheehan, 1996, Scheehan & Power, 1999; Livingstone, 2001). I ROS causano danni cellulari, alterando la struttura dei lipidi di membrana attraverso fenomeni di perossidazione (LPO) (Hannam *et al.*, 2010). A contrastare l'attività dei ROS intervengono specifici enzimi che agiscono come antiossidanti, tra questi la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi (CAT). La misura della loro attività viene considerata un buon indicatore per valutare il potenziale danno a carico delle componenti cellulari causato dall'esposizione di molluschi bivalvi a condizioni di stress ossidativo (Pipe *et al.*, 1993). Altre molecole sono implicate nella risposta antiossidativa come il glutatione (GSH), il cui ruolo è stato recentemente oggetto di studio in diverse specie di invertebrati marini (Cima *et*

al., 2008; Hannam *et al.*, 2010). Una diminuzione del contenuto totale di glutazione e di glutazione ridotto è correlata o ad un aumento della quantità di ROS oppure all'azione tossica di un contaminante.

Tra i biomarkers generici, alcuni fanno riferimento alla valutazione delle caratteristiche morfologiche e funzionali di cellule che rivestono un ruolo di primaria importanza per l'organismo come quelle coinvolte nella risposta immunitaria. Negli invertebrati, la risposta immunitaria può subire variazioni indotte o da parametri ambientali, quali la temperatura, la salinità, il pH, l'ossigeno, o da modificazioni fisiologiche intrinseche dell'individuo in diversi momenti del ciclo vitale (Matozzo *et al.*, 2005; Matozzo *et al.*, 2007; Monari *et al.*, 2007; Vijayavel *et al.*, 2009). Il sistema immunitario degli invertebrati è meno complesso di quello dei vertebrati e si basa esclusivamente su una risposta innata, mentre manca di quella adattativa basata su anticorpi e organi linfoidi (Galloway & Handy, 2003). Nei bivalvi, in particolare, la risposta immunitaria può essere di tipo cellulare e umorale. La prima è mediata dagli emociti in grado di fagocitare e/o incapsulare gli agenti patogeni esterni, la seconda è costituita dalla produzione di sostanze con proprietà battericide (Carballal *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 1997; Galloway & Handy, 2003). Quindi condizioni di stress possono essere rivelate in modo relativamente veloce negli emociti attraverso un set di biomarkers denominati immunomarkers. Nello specifico, per lo studio degli emociti dei bivalvi gli immunomarkers più frequentemente considerati sono il numero totale di cellule presenti nell'emolinfa (THC, total haemocyte count,) e la loro attività fagocitica (Matozzo & Marin, 2010; Matozzo *et al.*, 2003; Oweson & Hernroth, 2009). Il numero di emociti circolanti può aumentare in presenza di una reazione infiammatoria sistemica che ne determina la proliferazione e/o la migrazione dai tessuti periferici all'emolinfa, mentre può diminuire in seguito ad un richiamo prevalente dall'emolinfa verso altri tessuti o per fenomeni di lisi cellulare (Pipe & Coles, 1995). Recenti studi condotti su *C. gallina* hanno messo in evidenza come la temperatura, la salinità e condizioni di anossia possono ridurre significativamente il numero degli emociti e la loro capacità di fagocitosi (Matozzo *et al.*, 2005; Matozzo *et al.*, 2007; Monari *et al.*, 2007). Anche la valutazione delle attività enzimatica degli emociti può fornire indicazioni molto utili a definire le condizioni di benessere degli organismi. Gli enzimi contenuti nei lisosomi degli emociti possono variare da specie a specie, anche se la componente principale è costituita dal lisozima. Il lisozima ha una grande proprietà batteriolitica e può venire rilasciato anche all'esterno dell'ambiente cellulare, direttamente nell'emolinfa conferendole caratteristiche antimicrobiche (Pipe, 1992). La capacità di difesa immunitaria nei bivalvi è quindi fortemente dipendente dal ruolo svolto da questi enzimi, che possono essere diversamente condizionati da variazioni di temperatura, salinità, da anossia, dalla presenza di contaminanti e da tutti quei fattori che possono alterare l'omeostasi dell'organismo, come ampiamente dimostrato in *R. philippinarum* e in altri

bivalvi appartenenti alle famiglie Pectinidae, Cardidae e Ostreidae (Prieur *et al.*, 1990; Matozzo *et al.*, 2003; Matozzo & Marin, 2005). Tra i biomarkers generici più impiegati per valutare lo stato di benessere di un organismo ci sono le risposte fisiologiche (Viarengo & Canesi, 1991). Una risposta fisiologica rappresenta infatti l'insieme di molti processi cellulari o biochimici strettamente interconnessi tra loro, la cui variazione può essere rilevata e riferita ad una condizione di deterioramento ambientale (Bayne *et al.*, 1985).

Tra i biomarkers valutati a livello fisiologico nei bivalvi vi è il tasso di respirazione, misurato attraverso il consumo di ossigeno. Iglesias & Navarro (1991) hanno messo in evidenza che il consumo di ossigeno dei mitili è correlabile al loro ciclo riproduttivo, ed aumenta durante la gametogenesi. Inoltre Bayne & Newell (1983) e Widdows *et al.* (1995) hanno osservato che nei bivalvi fattori sia biotici che abiotici, come per esempio la temperatura e la presenza di contaminanti, possono aumentare l'attività respiratoria degli organismi. Tuttavia tale parametro è generalmente difficile da interpretare poiché può risultare condizionato da molteplici fattori, fisiologici e comportamentali, e quindi la sua analisi andrebbe messa in relazione con quella di altri indici fisiologici, come il tasso di escrezione e il tasso di filtrazione.

L'escrezione rappresenta una parte dell'energia persa attraverso la formazione dei prodotti azotati che derivano dal catabolismo delle proteine e degli acidi nucleici. Questo tasso può variare stagionalmente o sotto condizioni di stress ambientale (Widdows, 1985; Grants & Thorpe, 1991; Vedpathak *et al.*, 2008), motivo per cui la sua valutazione può evidenziare fenomeni di stress metabolico negli animali. All'escrezione può essere utile associare il consumo d'ossigeno tramite il rapporto O:N. Tale rapporto rappresenta un indice di utilizzo delle proteine nel metabolismo energetico, ed è in grado di valutare il contributo delle proteine nel catabolismo totale (Bayne, 1976; Bayne & Widdows, 1978). Se bassi valori di questo rapporto indicano un'intensa attività catabolica a sfavore delle proteine, rappresentando una condizione di stress metabolico, alti valori di questo indice mostrano un metabolismo ottimale che utilizza come normali substrati da ossidare i carboidrati ed i lipidi (Bayne, 1976).

In animali filtratori come i bivalvi, la misura del tasso di filtrazione fornisce una stima della quantità di energia in entrata e quindi disponibile per l'organismo. La capacità di alimentarsi è molto influenzata da condizioni di stress indotte dall'esposizione a contaminanti (Widdows & Johnson, 1988) e dalle condizioni fisiologiche dell'animale stesso (Griffith & King, 1979). Una sua riduzione può non garantire l'apporto energetico necessario per sostenere tutti i processi biologici, dalla crescita alla riproduzione (Beesley *et al.*, 2008; Thomsen & Melzner, 2010).

Un altro biomarker che può essere valutato nei bivalvi è la capacità di sopravvivenza in condizioni di esposizione all'aria. Questo indice è ben applicabile a quelle specie di bivalvi che sono costrette a far fronte a variazioni di

ossigeno disciolto all'interfaccia acqua-sedimento, a condizioni di ipossia o di anossia, o per le specie intertidali, a periodi di emersione (Eertman *et al.*, 1993). E' un indice rapido che permette di valutare lo stato di stress di un organismo che ha in precedenza sperimentato condizioni ambientali sfavorevoli (De Zwann & Wijsman, 1976) e/o è stato esposto a contaminanti (Eertman *et al.*, 1993). In condizioni di esposizione all'aria gli animali consumano velocemente le loro riserve energetiche (glicogeno e carboidrati), pertanto il tempo di sopravvivenza si riduce in animali stressati che dispongono di minori riserve (De Zwann & Wijsman, 1976).

Nei mitili è possibile valutare come indice di stress la produzione di filamenti di bisso. I filamenti di bisso, secreti da un'apposita ghiandola, permettono ai mitili di ancorarsi al substrato, assicurando ai bivalvi stabilità in condizioni di forte idrodinamismo e resistenza al tentativo dei predatori di strapparli dal substrato (Price, 1983; Waite, 1992). Alterazioni di tipo meccanico, come l'eccessiva tensione dei filamenti durante condizioni di forte idrodinamismo (Price, 1983) o stress metabolici che riducono le riserve energetiche disponibili per la produzione del bisso (Clarke, 1999) a favore di altri processi biologici come la gametogenesi (Carrington, 2002), ne possono ridurre il numero. Un'altra condizione stressogena per i mitili è l'esposizione prolungata ad alte temperature. Rajagopal *et al.* (1995) hanno infatti valutato una diminuzione dei filamenti di bisso in mitili del genere *Perna* esposti ad alte temperature.

2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questa tesi di dottorato è stato quello di definire un quadro il più ampio possibile di risposte a livello biochimico, cellulare e di individuo in molluschi bivalvi sottoposti a condizioni potenzialmente stressogene causate dalle variazioni dei principali parametri ambientali, previste in uno scenario di cambiamenti climatici.

Se i modelli previsionali sono stati formulati ed applicati a livello globale per gli oceani, è particolarmente importante considerare quali ricadute possano avere tali fenomeni in ambienti marini più circoscritti e caratterizzati da variazioni ambientali maggiori.

Il bacino dell'Alto Adriatico si presta bene a rappresentare questo tipo di ambienti. La limitata estensione, la forma chiusa, i bassi fondali, l'apporto d'acqua dolce di numerosi corsi d'acqua che caratterizzano questo bacino, potrebbero predisporlo maggiormente ad un aumento della temperatura, a variazioni della salinità e alla diminuzione del pH marino causato dall'aumento della CO₂ antropogenica. In particolare, gli habitat sensibili a questo fenomeno potrebbero essere sia quelli costieri, vista la loro ridotta profondità e la vicinanza alle foci dei fiumi, ma anche quelli più lontani dalle coste nei quali anche piccole variazioni ambientali possono causare gravi ripercussioni sugli organismi.

Tra le popolazioni che caratterizzano questi habitat, quelle bentoniche composte da organismi sessili potrebbero essere particolarmente colpite, vista la loro ridotta mobilità e l'elevato grado di adattamento alle specifiche condizioni ambientali del loro habitat. Tra questi organismi, i molluschi bivalvi rappresentano una componente molto importante in termini di abbondanza, con un ruolo rilevante non solo dal punto di vista ecologico, ma anche da quello economico, essendo oggetto di pesca e di allevamento. Quindi il loro studio potrebbe rappresentare un buon strumento predittivo per valutare l'impatto dei cambiamenti climatici sulle popolazioni e sulle comunità bentoniche alto-adriatiche. Proprio in quest'ottica si è voluto scegliere specie di bivalvi in grado di riflettere condizioni tipiche di habitat diversi, dalla colonna d'acqua ai sedimenti, seguendo un criterio che considerasse anche un gradiente costa-largo coincidente con un gradiente di profondità. Quest'ultimo aspetto mirava a comprendere organismi più o meno adattati a subire variazioni ambientali, maggiori lungo le costa, minori al largo. Sulla base di questi prerequisiti sono state dunque scelte quattro specie: *Mytilus galloprovincialis*, che vive in sospensione ancorato tramite il bisso a substrati duri, con una preferenza per le basse profondità, in ambienti soggetti anche a forti variazioni aline, come lagune ed estuari; *Chamelea gallina*, che invece vive infossata nel sedimento, anch'essa in acque relativamente basse e sottoposta, anche se in minor grado rispetto al mitilo, a variazioni aline e di temperatura; *Mimachamys varia*, che vive adesa a substrati duri tramite il bisso, in un ambiente

con una profondità maggiore e condizioni ambientali più stabili rispetto alla specie precedenti; *Callista chione*, una specie fossoria, che vive in un ambiente marino stabile con variazioni ambientali esclusivamente stagionali.

La scelta di effettuare la sperimentazione sullo stadio sia adulto che giovanile per il mitilo e la vongola ha avuto lo scopo di valutare la risposta alle variazioni ambientali e in particolare all'acidificazione nei due diversi momenti del ciclo vitale.

Negli adulti si è cercato in particolar modo di confrontare le risposte di tipo fisiologico, immunologico e biochimico, sottoponendoli a condizioni sperimentali a breve termine (7 giorni), testando simultaneamente tre fattori ambientali quali il pH, la temperatura e la salinità.

Nei giovanili, invece, si è voluto focalizzare lo studio sull'effetto dell'acidificazione durante sperimentazioni a lungo termine (fino a 6 mesi), valutando aspetti particolarmente sensibili durante la crescita, ovvero le possibili modificazioni della conchiglia e l'alterazione delle risposte fisiologiche e biochimiche.

3. MATERIALI E METODI

3.1 SPERIMENTAZIONE A BREVE TERMINE SU BIVALVI ADULTI

3.1.1 Allestimento dell'impianto e sperimentazione

Tutte le sperimentazioni sono state condotte presso la Stazione Idrobiologica di Chioggia. Per gli adulti è stato progettato un impianto a flusso continuo che consentisse di sottoporre i bivalvi alla variazione di tre fattori sperimentali, quali il pH, la temperatura e la salinità.

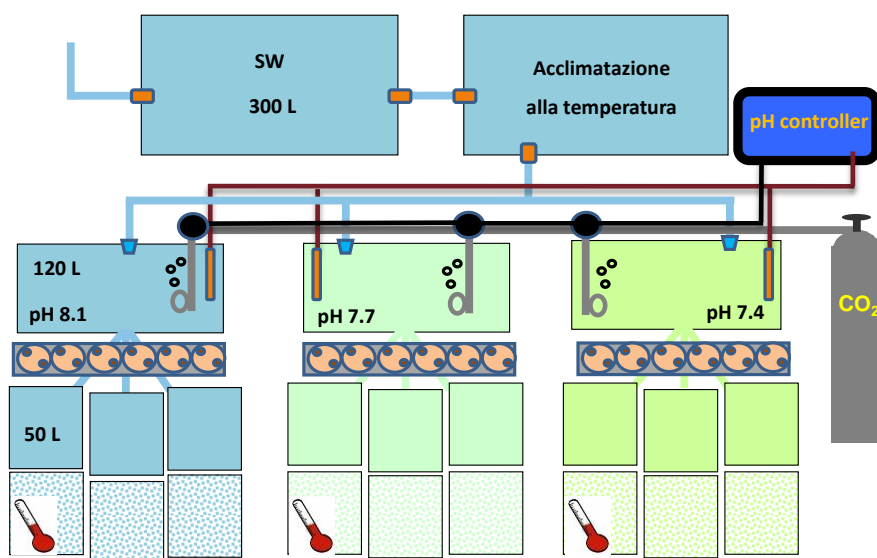


Figura 6 - Schema dell'impianto per sperimentazioni a breve termine.

L'impianto (Fig. 6), costruito all'interno di una camera termostata, consisteva di 23 vasche; 2 di queste sono state utilizzate per pre-regolare la temperatura dell'acqua proveniente da un serbatoio esterno, 3 per la correzione del pH ed infine 18 per l'esposizione dei bivalvi alle diverse condizioni sperimentali. Più in dettaglio, l'impianto è stato alimentato con acqua di mare naturale, prelevata giornalmente in fase di alta marea e raccolta in un serbatoio, della capacità di circa 1000 litri, esterno alla camera termostata. L'acqua proveniente dal serbatoio di raccolta veniva convogliata in due vasche più piccole (300 litri di capacità) unite in serie, situate nella camera termostatica, allo scopo di regolare la temperatura dell'acqua in ingresso. Inoltre, per mantenere l'acqua ben ossigenata sono stati collocati degli aeratori in entrambe le vasche. Tramite un sistema di regolazione idraulica, l'acqua veniva successivamente convogliata in vasche di miscelazione (capacità 120 litri), dove si procedeva alla regolazione del pH. I valori di pH

sperimentali sono stati ottenuti mediante un controller elettronico che, in base al pH rilevato nelle apposite vasche da un pHmetro) gestiva l'erogazione, tramite elettrovalvole, della CO₂ proveniente da una bombola. Per diffondere la CO₂ nelle vasche sono stati impiegati specifici diffusori in vetro (atomizzatori). Questi ultimi hanno lo scopo di rilasciare all'interno della vasca microbolle di CO₂ al posto di un'unica grande bolla, mettendo così a contatto una maggiore superficie di gas con l'acqua e permettendo una maggiore diffusione della CO₂. Oltre a ciò, l'atomizzatore consente anche di risparmiare sull'erogazione di CO₂.

Successivamente l'acqua a pH controllato veniva distribuita alle vasche sperimentali tramite pompe peristaltiche Acqua medic reefdoser ad un flusso pari a 25 ml/minuto. Termostati ed aeratori sono stati posizionati nelle vasche dei bivalvi per mantenere la temperatura sperimentale e una buona ossigenazione.

Da luglio 2009 a dicembre 2010 sono state condotte 8 sperimentazioni. Per *M. galloprovincialis* e *C. gallina* è stato saggiato l'effetto della combinazione di salinità, pH e temperatura conducendo tre sperimentazioni successive, ognuna ad una diversa salinità. Le tre salinità sperimentali (28, 34, 40 psu) sono state ottenute mediante l'aggiunta di acqua deionizzata o sale marino per acquari (*Red Sea Salt*, Red Sea Fish Pharm, Israel) all'acqua di mare naturale nel serbatoio di raccolta. Per *C. chione* e *M. varia*, invece, è stato testato l'effetto combinato di pH e temperatura solo a 34 psu. Per tutte le specie sono stati utilizzati tre diversi valori di pH (pH 8.1, valore medio misurato nell'Alto Adriatico, impiegato come controllo; pH 7.7, pari a -0.4 unità di pH; 7.4, pari a -0.7 unità di pH) e due diverse temperature (22 e 28°C per *M. galloprovincialis* e *C. gallina*, 16° e 22°C per *C. chione*, 18° e 26° C per *M. varia*). In un'ottica di riscaldamento globale, le temperature sono state scelte in un intervallo di valori che possono essere registrati nell'ambiente di provenienza di ciascuna specie durante la stagione più calda, collocando la temperatura sperimentale più alta a 6-8 °C di differenza dalla più bassa. In ogni esperimento venivano quindi valutati gli effetti di 6 diverse combinazioni di pH e temperatura ad un'unica salinità sperimentale. Per ogni combinazione di temperatura e pH sono state predisposte 3 repliche, ovvero 3 vasche sperimentali della capacità di 60 litri.

Compatibilmente con il periodo di riproduzione delle specie si è cercato di effettuare tutte le sperimentazione in periodi non lontani dalla fase di emissione dei gameti per non subire l'influenza dello stress riproduttivo durante le sperimentazioni.

Per la sperimentazione su *M. galloprovincialis* sono stati impiegati esemplari di 4 cm di lunghezza (asse maggiore della conchiglia) prelevati da un impianto di mitilicoltura situato davanti al litorale del Cavallino (Venezia). I mitili prima di essere utilizzati sono stati puliti da ogni epibionte ed è stato reciso il bisso.

C. gallina e *C. chione* (rispettivamente 2.5 cm e 6.5 cm di lunghezza dell'asse maggiore della conchiglia) sono stati pescati tramite turbosoffiante davanti al litorale di Chioggia. Infine, per *M. varia* sono stati impiegati esemplari di 5 cm di

lunghezza (asse maggiore della conchiglia) pescati tramite la tecnica del rampone a largo del litorale di Chioggia. Anche in questo caso gli animali sono stati ripuliti da ogni epibionte e è stato reciso il bisso prima della stabulazione in impianto.

Ogni replica era costituita da 80 esemplari per *M. galloprovincialis*, 90 per *C. gallina*, 50 per *M. varia* e per *C. chione*.

Un apposito protocollo di acclimatazione alle condizioni sperimentali è stato studiato per ridurre lo stress dei bivalvi all'inizio della stabulazione in laboratorio. La fase di acclimatazione alle diverse condizioni sperimentali è stata gestita tramite il controllo della temperatura della stanza, l'utilizzo dei termoriscaldatori, la regolazione della concentrazione di CO₂ e della salinità. Nella fase iniziale dell'acclimatazione i bivalvi sono stati mantenuti per 2 giorni alle stesse condizioni di salinità, temperatura e pH dell'ambiente di provenienza. In seguito, nell'arco di 6 giorni, salinità e temperatura sono state fatte variare gradualmente e contemporaneamente (quando necessario) di circa 2 unità/giorno, il pH di 0,2 unità/giorno.

Durante la sperimentazione venivano controllati quotidianamente temperatura e pH, mentre la salinità e la concentrazione di ossigeno disciolto è stata misurata con una cadenza di tre giorni. Per garantire un adeguato apporto alimentare durante ciascun esperimento sono state allestite colture della microalga *Isochrysis galbana*. L'alimentazione somministrata ai bivalvi era costituita da 250 ml di coltura algale (13-15 x 10⁶ cellule/ml) per tre volte al giorno. Durante la sperimentazione è stato effettuato giornalmente il controllo della mortalità.

Al termine di ciascuna sperimentazione sono state effettuate misure fisiologiche, (tasso di filtrazione, di respirazione e di escrezione) e solo in *M. galloprovincialis* e *C. gallina* è stata valutata anche la capacità di sopravvivere in condizioni di esposizione all'aria. Su campioni di emolinfa sono stati inoltre valutati parametri immunologici, quali numero di emociti circolanti (THC, Total Hemocyte Count), e loro assunzione del rosso neutro (NRU, Neutral Red Uptake), nonché l'attività del lisozima. Infine sono state condotte analisi biochimiche, quali la determinazione dell'attività della superossido dismutasi (SOD), della catalasi (CAT), della glutation-S-transferasi (GST); sono stati quantificati i livelli di perossidazione lipidica (TBARS) e delle *Heat Shock protein* (HSP70).

3.1.2 Parametri fisiologici

Le analisi fisiologiche sono state condotte sugli adulti seguendo le metodiche proposte da Widdows (1985). Le misurazioni dei tassi di filtrazione, respirazione ed escrezione sono state effettuate sullo stesso individuo o su pool se risultava problematico dal punto di vista analitico rilevare la risposta su singoli animali. Per *M. galloprovincialis* e per *C. gallina*, i tassi misurati sono stati riferiti al peso secco di un animale standard, 1 gr e 0.2 gr rispettivamente, mediante applicazione

dell'equazione allometrica $Y=aX^b$, dove Y rappresenta il parametro fisiologico, X il peso secco in grammi delle parti molli, a e b l'intercetta e la pendenza della retta di regressione. I valori dei coefficienti b utilizzati sono quelli forniti da Widdows & Johnson (1988) per i mitilo e da Moschino & Marin (2006) per la vongola. In mancanza di valori noti in letteratura per i coefficienti b in *M. varia* e *C. chione*, i tassi fisiologici di queste due specie sono stati semplicemente riferiti al peso secco di 1gr.

La capacità di sopravvivere in condizioni di esposizione all'aria è stato valutata solamente in *M. galloprovincialis* e in *C. gallina*.

3.1.2.1 Tasso di filtrazione

Per la misura del tasso di filtrazione è stato adottato un approccio statico. Per ogni specie, sono state condotte prove preliminari per valutare il volume d'acqua e la concentrazione algale più adatti per tale rilevare il parametro. In tutti gli esperimenti l'acqua impiegata veniva precedentemente filtrata con filtri Whatman GFF e opportunamente condizionata agli stessi valori di temperatura, salinità e pH delle vasche sperimentali in cui gli animali erano stati mantenuti.

Il tasso di filtrazione (o clearance rate) è stato espresso come il volume di acqua da cui, grazie all'attività di filtrazione dell'animale, sono rimosse, nell'unità di tempo, tutte le particelle in sospensione. L'alga impiegata è stata *Isochrysis galbana* con le seguenti concentrazioni:

M. galloprovincialis: 30000 cell/ml

C. gallina: 15000 cell/ml

C. varia: 20000 cell/ml

C. chione: 50000 cell/ml

La misurazione è stata effettuata individualmente su 15 individui per specie, mantenuti in beakers, con l'unica eccezione per *C. chione*, per la quale è stato necessario effettuare la misurazione su pool di 15 bivalvi in opportune vasche. Tale variazione è stata determinata dalla scarsa attività di filtrazione degli animali rilevata nelle prove preliminari. Per *M. galloprovincialis* e *M. varia* la filtrazione è stata misurata su un volume di 2 l per una durata di 1.5 ore. Per *C. gallina* sono stati utilizzati un volume di 1 l e una durata di 2 ore. Per *C. chione* è stata impiegata una vasca da 20 l e l'esperimento ha avuto una durata di 8 ore. Per il conteggio della concentrazione algale, un'aliquota di 20 ml è stata prelevata ad intervalli regolari: ogni 30 minuti da ciascun beaker, ogni 2 ore dalle vasche



Figura 7 - Coulter Counter Mod. Z2

di *C. chione*. In ogni esperimento sono stati utilizzati come bianco un beaker o una vasca senza animali. La concentrazione algale è stata determinata mediante un Coulter Counter Mod. Z2 (Fig. 7).

Il tasso di filtrazione in condizioni statiche è stato calcolato mediante la seguente formula (Coughlan, 1969):

$$\text{Tasso di filtrazione (l/h)} = (\ln C_0 - \ln C_1) \times V/t$$

Dove C_0 e C_1 sono le concentrazioni algali all'inizio e alla fine di ciascun periodo t pari a 0.5 o 2 ore (per *C. chione*), V è il volume d'acqua in ogni beaker (o vasca). Quindi è stato calcolato per ciascun individuo il tasso massimo basato sul periodo di un'ora, durante il quale la diminuzione della concentrazione algale era stata maggiore (Widdows, 1993).

3.1.2.2 Tasso di respirazione

Il tasso di respirazione è stato misurato utilizzando respirometri in plexiglas (volume pari a 700 ml; 550 ml solo per *C. gallina*) ciascuno dei quali era munito di un elettrodo a membrana (Strathkelvin 1302) collegato ad una interfaccia multicanale (Strathkelvin 928). La misurazione è stata effettuata su singoli animali in acqua di mare filtrata a 0.45μ ; un respirometro senza animale è stato utilizzato come bianco. La concentrazione di ossigeno disciolto è stata misurata nell'arco di tempo di un'ora. Il tasso di respirazione è stato calcolato mediante la formula (Widdows, 1985):

$$\text{Tasso di respirazione } (\mu\text{moli/h}) = [(C_0 - C_1) \times V],$$

dove C_0 e C_1 sono le concentrazioni iniziale e finale di ossigeno, V è il volume d'acqua espresso in litri in ciascun respirometro.

3.1.2.3 Tasso di escrezione

Il tasso di escrezione è stato calcolato misurando la concentrazione di N-NH_4 presente nell'acqua contenuta nei respirometri. In particolare, al termine del periodo dedicato alla misura del tasso di respirazione è stata prelevata un'aliquota di 50 ml da ogni contenitore e analizzata con saggio spettrofotometrico secondo il metodo Solorzano (1969). Il tasso di escrezione è stato calcolato mediante la seguente formula (Widdows, 1985):

$$\text{Tasso di escrezione } (\mu\text{atm/h}) = (C_t - C_b) \times [(14/(1000/V))] \times 1/t$$

Dove C_t indica la concentrazione di N-NH_3 nel respirometro contenente il bivalve, C_b quella del bianco, V il volume (litri), t il tempo di incubazione in ore.

3.1.2.4 Misura del peso secco

Al termine delle misure, ogni singolo animale è stato privato della conchiglia e le parti molli sono state essiccate a 60°C per 48 h per determinare il peso secco.

3.1.2.5 Tasso di sopravvivenza in aria

Il tasso di sopravvivenza in aria è stato misurato su pool di 30 bivalvi prelevati da ogni replica alla fine del periodo sperimentale. La sopravvivenza in aria è stata misurata solo per *M. galloprovincialis* e *C. gallina* poiché sono gli unici bivalvi, tra quelli testati, che in natura possono rimanere esposti durante le basse maree a brevi periodi di emersione.

I bivalvi dopo essere stati prelevati dalle vasche sono stati esposti all'aria all'interno di contenitori ermetici in un'atmosfera satura di umidità, alla temperatura di 18°C (Eertman *et al.*, 1993). La sopravvivenza è stata seguita giornalmente fino a raggiungere il 100% di mortalità. Inoltre è stato calcolato il valore di LT₅₀, ovvero il tempo nel quale il 50% dei bivalvi sottoposti al test moriva. Gli animali sono stati considerati morti solo quando le loro valve rimanevano aperte e non rispondevano ad uno stimolo meccanico chiudendosi.

3.1.3 Parametri biochimici

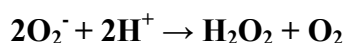
3.1.3.1 Prelievo dei tessuti

Al termine di ogni esperimento, da 3 pool di animali (totale 15 bivalvi) per condizione sperimentale sono stati raccolti campioni di emolinfa, prelevata dal muscolo adduttore mediante una siringa da insulina, per la valutazione di biomarker immunologici, quali THC, NRU e attività del lisozima. L'emolinfa è stata diluita al 50% con una soluzione di anticoagulante (0.38% sodio citrato in acqua di mare). Un'aliquota (2 ml) è stata subito processata per la determinazione di THC e NRU, una seconda aliquota di equivalente volume è stata congelata in azoto liquido e conservata a -80 °C fino al momento delle analisi.

Inoltre sono stati prelevati dagli stessi animali campioni di ghiandola digestiva e di branchia per la determinazione delle attività enzimatiche (SOD, CAT, GST) e dei livelli di TBARS e di HSP70 ed uniti in pool costituiti da 5 animali per *M. galloprovincialis*, *C. chione*, *M. varia* e pool da 9 per *C. gallina*. Analogamente a l'emolinfa sono stati congelati e conservati a -80 °C fino al momento delle analisi.

3.1.3.2 Attività della superossido dismutasi (SOD)

La SOD catalizza la dismutazione dell'anione superossido (O₂⁻) a perossido d'idrogeno (H₂O₂) e ossigeno:



L'attività della SOD è stata misurata sia nelle branchie sia nella ghiandola digestiva. I due tessuti, congelati e conservati al termine di ogni esperimento, sono stati posti in ghiaccio e ad ognuno è stato aggiunto 1 ml di tampone di estrazione (TRIS-HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 0,15 M, saccarosio 0,5 M). I tessuti sono stati poi

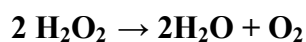
omogeneizzati in ghiaccio per 1 minuto mediante un omogeneizzatore Ultra-Turrax T8, sonicati per 10 secondi a 4 °C e quindi centrifugati per 30 minuti a 9300 g a 4 °C. Il supernatante (SN) è stato recuperato per il saggio. In questo caso è stato usato un metodo indiretto che si basa sulla capacità della SOD di inibire la riduzione del citocromo *c*, causata dalla presenza dell'anione superossido (O₂⁻), la cui formazione è a sua volta garantita dal complesso ipoxantina-xantina ossidasi (McCord & Fridovich, 1969). Le soluzioni per la miscela di reazione sono state preparate al momento del saggio:

- ipoxantina, 13 mM in NaOH 1 M;
- xantina ossidasi, 20 U/ml;
- citocromo *c*, 1,6 mM

In ogni cuvetta sono stati aggiunti: 930 µl di tampone fosfato 50 mM (K₂HPO₄-KH₂PO₄, EDTA 0,1 mM, NaN₃ 1 mM, pH 8,6), 20 µl di ipoxantina, 10 µl di citocromo *c*, 30 µl di SN, 10 µl di xantina ossidasi (per il bianco è stato usato tampone fosfato al posto del SN). L'assorbanza è stata letta a 550 nm per 30 secondi. I risultati sono stati espressi come U SOD/mg di proteine.

Attività della catalasi (CAT)

La CAT catalizza la conversione del perossido di idrogeno (H₂O₂) ad acqua e ossigeno secondo la seguente reazione:



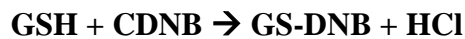
L'attività della CAT è stata misurata in ghiandola digestiva e branchia. Al momento dell'analisi, i tessuti sono stati posti in ghiaccio e ad ognuno è stato aggiunto 1 ml di tampone di estrazione (TRIS-HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 0,15 M, saccarosio 0,5 M). I tessuti sono stati poi omogeneizzati in ghiaccio per 1 minuto mediante un omogeneizzatore Ultra-Turrax T8, sonicati per 10 secondi a 4 °C e quindi centrifugati per 30 minuti a 9300 g a 4 °C. SN è stato recuperato per il saggio. È stato usato il saggio spettrofotometrico proposto da Aebi, (1984), basato sulla valutazione del grado di decomposizione del perossido di idrogeno. Il substrato era composto da una soluzione di tampone fosfato 50 mM (KH₂PO₄/Na₂HPO₄) (100 ml) e H₂O₂ (220 µl). In ogni cuvetta sono stati aggiunti: 970 µl di tampone fosfato, 20 µl di substrato e 10 µl di SN (per il bianco, al posto del campione, è stata usata acqua distillata). La lettura dell'assorbanza è stata effettuata in cuvette di quarzo a 240 nm per 30 secondi. I risultati sono stati espressi come U CAT/mg di proteine.

3.1.3.3 Attività della glutation-S-transferasi (GST)

Le glutatione transferasi (GST) sono una famiglia di isoenzimi detossificanti di fase II che utilizzano il glutatione come cofattore, e contribuiscono alla biotrasformazione di numerosi composti di natura esogena ed endogena, come

agenti cancerogeni, farmaci e prodotti dello stress ossidativo, facilitandone l'escrezione.

Il GST catalizza una reazione di coniugazione tra il glutatione ridotto (GSH) e 1-cloro-2,4-dinitro-benzene (CDNB), fornito come substrato. Il prodotto della reazione è 1- glutatione- 2,4-dinitrobenzene (GS-DNB). La velocità della reazione è proporzionale alla quantità di substrato utilizzata.



L'attività del GST è stata misurata, usando il saggio spettrofotometrico proposto da Habig *et al.* (1974), su campioni di branchia e ghiandola digestiva di mitili e vongole, omogeneizzati in 1 ml di tampone di omogeneizzazione (TRIS-HCl 50 mM, KCl 0.15 M, saccarosio 0.5 M, inibitori di proteasi, pH 7.4). Ogni campione è stato poi sonicato per 1 min. a 4°C, centrifugato a 9.300 g per 30 min. a 4°C e SN è stato infine raccolto per il saggio spettrofotometrico.

Prima di eseguire il saggio sono state preparate 3 soluzioni:

- tampone fosfato (KH₂PO₄ e K₂HPO₄, 0.1 M , pH 6.5)
- 1-cloro-2,4-dinitro-benzene (CDNB, 20 mM)
- GSH (L-glutatione ridotto, Sigma-Aldrich, 0.1 M)

Queste tre soluzioni sono state incubate a 37°C fino al momento del loro utilizzo. Per il saggio allo spettrofotometro sono stati utilizzati 10 µl di SN ai quali sono stati aggiunti 50 µl di CDNB, 840 µl di tampone fosfato e 100 µl di GSH. La lettura dell'assorbanza è stata effettuata in cuvette di quarzo ad una lunghezza d'onda di 340 nm per 30 secondi. I risultati sono stati espressi in µmol/min/mg di proteine. Il contenuto proteico totale dei campioni è stato determinato secondo Bradford (1976).

3.1.3.4 Perossidazione lipidica (TBARS)

La perossidazione dei lipidi di membrana, di cui sono responsabili i radicali liberi, avviene attraverso l'attacco degli acidi grassi insaturi presenti nei fosfolipidi della membrana citoplasmatica. La perossidazione lipidica porta alla formazione di sostanze reattive all'acido tio-barbiturico (TBARS): sono prodotti della degradazione degli acidi grassi, alcheni, alcani, chetoni e aldeidi, come la malondialdeide (MDA), cui si fa riferimento nel saggio.

Per la misura della produzione di TBARS nei tessuti è stato usato il metodo proposto da Halliwell & Gutteridge (1985). Al momento delle analisi, i campioni di ghiandola digestiva e di branchia di *M. galloprovincialis* e di *C. gallina* sono stati omogeneizzati in ghiaccio per 1-2 min. aggiungendo 1 ml di tampone di omogeneizzazione (TRIS-HCl 50 mM, pH 7.4, KCl 0.15 M, saccarosio 0.5 M e inibitori di proteasi). In seguito all'omogeneizzazione, si è proceduto con una

centrifugazione a 9300 g per 30 min a 4°C e il SN è stato recuperato per il saggio. Il campione era costituito da 200 µl di supernante, ai quali sono stati aggiunti 150 µl di tampone fosfato (0.1 M, pH7.4) e 250 µl di una soluzione di acido tricloroacetico (TCA) e butil-idrossi-toluene (BHT) (BHT 0.01% in TCA 20%). Il tutto è stato agitato per alcuni secondi mediante un agitatore vortex e nuovamente centrifugato a 11160 g per 10 min a temperatura ambiente. Sono stati recuperati 400 µl di supernante ai quali sono stati aggiunti 80 µl di HCl (0.6 M) e 320 µl di tampone TRIS-TBA (TBA 120mM in TRIS 25mM, pH 7.9). Le soluzioni così preparate sono state poste in bagnomaria ad una temperatura di 80°C per circa 15 min. Il saggio spettrofotometrico è stato effettuato recuperando 600 µl di soluzione e leggendo l'assorbanza a 532 nm.

I risultati sono stati espressi in nmol TBARS/mg proteine. Il contenuto proteico totale dei campioni è stato determinato secondo Bradford (1976).

3.1.3.5 HSP70

Per la determinazione dei livelli di HSP70 sono stati utilizzati campioni di ghiandola digestiva (3 pool da 10 animali per ogni condizione sperimentale). Per ogni campione, l'omogenato è stato preparato da circa 600 mg di tessuto in 6 volumi di tampone TRIS 20 mM (pH 7.6) (saccarosio 0.5 M, KCl 0.15 M). All'omogenato è stata aggiunta inoltre una quantità di inibitore di proteasi (Sigma) pari a 1µL per 0.01gr di campione.

I tessuti omogenati sono stati centrifugati a 11000 g per 35 minuti a 4°C. Il SN contenente il citosol è stato aliquotato ed impiegato per le successive analisi delle HSP70.

L'elettroforesi in SDS su gel di poliacrilamide (PAGE) è stata eseguita mediante una Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, USA). I minigel (Bis-Tris gel) utilizzati per la determinazione delle HSP70 erano al 10% in e il tampone di corsa era costituito da MES [2-(N-morpholino) etano-sulfonico acido] a pH 7.3, in condizioni riducenti.

Il tampone LDS (Litio Dodecil Sulfato) e l'agente riducente (ditiotreitolo, 0.5 M) sono stati aggiunti ai campioni poi riscaldati a 95°C per 5 minuti. I pesi apparenti delle bande immunopositive sono stati determinati mediante il confronto con un marcatore di pesi molecolari (Invitrogen, USA).

Come standard è stato caricato nei gel il lisato HeLa Cell per discriminare le isoforme di HSP70. I campioni sono stati caricati sul gel in volumi corrispondenti al contenuto in proteine di 25 µg/corsa. Al termine della corsa elettroforetica le proteine separate sul gel sono state trasferite con un opportuno tampone di trasferimento a pH 7.2 (bicina, bis-Tris, EDTA, clorobutanolo) su membrane PVDF (polivinilidene difluoride) e trasferite utilizzando un modulo Xcell SureLock Blot, inserito nella Xcell SureLock Mini-cell (Invitrogen, USA).

Al termine del blotting, la membrana su cui si erano trasferite le proteine è stata lavata con acqua per rimuovere tracce di gel o tampone. Il bloccaggio è stato

eseguito per 1 ora in agitazione con una soluzione specifica (contenente caseina in un tampone salino); la membrana è stata poi posta in incubazione con il corrispondente anticorpo monoclonale mouse anti-chicken HSP70/HSC70 (Assay Desing, UK), diluito 1:830, per tutta la notte, al buio e a temperatura ambiente.

La membrana è stata quindi lavata con una soluzione di lavaggio (tampone salino con detergente) e messa in incubazione con l'anticorpo secondario anti-mouse per 1 ora. Infine, una volta lavata, la membrana è stata sviluppata con una soluzione cromogena specifica contenente 5-bromo-4cloro-3-indolil-1-fosfato (BCIP)/nitro blu tetrazolio (NBT). Le proteine erano visibili con una banda immunoreattiva rosa-violacea identificata come tale dalla presenza di uno standard specifico; il peso molecolare è stato calcolato in funzione della posizione del marcatore di pesi molecolari.

L'espressione proteica è stata valutata dal punto di vista qualitativo dopo scansione, mentre dal punto di vista quantitativo è stata effettuata l'analisi con Quantity One Software (Bio-Rad, USA) ed i risultati sono stati espressi in unità arbitrarie (Monari *et al.*, 2011). La concentrazione totale delle proteine solubili nei campioni estratti è stata misurata usando Qubit Quantitation System con un Kit Quant-iT™ Protein Assay incluso in Qubit™ fluorometer (Invitrogen, USA). I valori sono stati riportati in mg di proteina per mL e sono stati usati per normalizzare l'espressione delle proteine.

3.1.4 Parametri immunologici

3.1.4.1 THC

I valori di THC, è stato determinato per mezzo di un Coulter Counter (modello Z2) (Fig.). In questo caso, una sospensione di 125 µl di emolinfa (addizionata a 125 µl di anticoagulante) è stata aggiunta a 19.75 ml di acqua di mare filtrata a 0.45 µm (FSW). Il valore di THC è stato espresso come n° di emociti ($\times 10^6$)/ml emolinfa.

3.1.4.2 Saggio di pinocitosi: *Neutral Red Uptake* (NRU)

Per questo saggio, è stato usato il metodo proposto da Cajaraville *et al.* (1996). SN, ottenuto in seguito alla centrifugazione a 4650 g per 10 minuti dei campioni di emolinfa (1 ml), è stato eliminato e gli emociti sono stati risospesi in 1 ml di una soluzione (8 mg/L in FSW) di Rosso Neutro (NR) e incubati per 30 minuti a temperatura ambiente. In seguito ad un'ulteriore centrifugazione, come prima indicato, SN è stato nuovamente eliminato e gli emociti risospesi in 1 ml di acqua distillata e centrifugati per 1 minuto a 11160 g. Il lisato cellulare così ottenuto è stato recuperato per la lettura allo spettrofotometro a 550 nm. I risultati sono stati espressi come densità ottica (DO)/ml emolinfa.

3.1.4.3 Attività lisozima-like

In accordo con la metodica proposta da Santarem *et al.* (1994), 50 μ l di emolinfa sono stati aggiunti a 950 μ l di una sospensione di *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) allo 0.15% in tampone fosfato 66 mM, pH 5.8. Il decremento in assorbanza ($\Delta A/\text{min}$) è stato quindi letto allo spettrofotometro a 450 nm per 5 minuti a temperatura ambiente. La quantità di enzima presente nei campioni è stata calcolata mediante una curva standard di lisozima puro (1, 2.5, 5 e 10 μ g lisozima/ml di tampone fosfato) e i risultati sono stati espressi come μ g lisozima/mg proteine. Il contenuto proteico totale dei campioni di emolinfa è stato determinato secondo Bradford (1976).

3.2 SPERIMENTAZIONE A LUNGO TERMINE SUI GIOVANILI

3.2.1 Allestimento dell'impianto e sperimentazione

La sperimentazione a lungo termine su individui giovanili è stata condotta in due anni successivi, da ottobre 2009 a maggio 2010 su *M. galloprovincialis* e *C. gallina*, da ottobre 2010 a gennaio 2011 solo su *M. galloprovincialis*.

In un vascone di cemento riempito di acqua di mare, situato all'esterno della Stazione Idrobiologica di Chioggia, sono state sospese 6 vasche da 60 litri (Fig. 8).

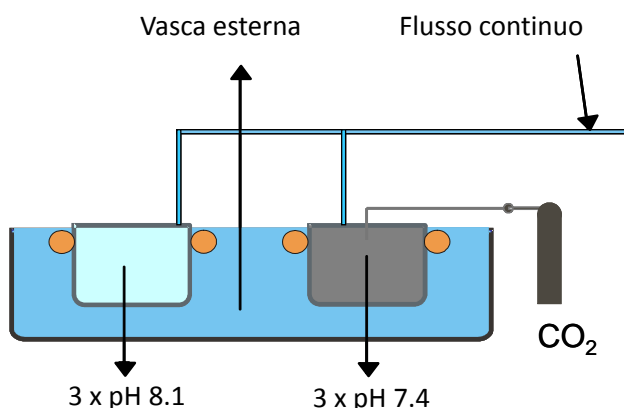


Figura 8 - Schema dell'impianto per sperimentazioni lungo termine.

Sia il vascone che le vasche sperimentali sono stati alimentati in continuo con acqua di mare, pescata durante l'alta marea davanti alla Stazione Idrobiologica e raccolta in una cisterna. Ogni vasca sperimentale è stata alimentata con un flusso continuo di 80 ml/min. In questo modo, le vasche sperimentali hanno subito variazioni analoghe a quelle dell'acqua della laguna, almeno per quello che riguarda temperatura, salinità e luce.

In 3 vasche il pH è stato mantenuto a valori naturali, nelle altre 3 il pH è stato portato artificialmente a 7.4, insufflando CO₂ erogata da una bombola e diffusa tramite opportuni atomizzatori. Il pH in ogni vasca di trattamento è stato mantenuto costante tramite l'utilizzo di un pHmetro collegato ad un computer che, rilevando in continuo il pH nella singola vasca, apriva o chiudeva una valvola che permetteva l'arrivo di CO₂ all'atomizzatore.

Ogni giorno si è proceduto a misurare il flusso dell'acqua di mare ed il pH in tutte le vasche, apportando eventuali aggiustamenti. Con la stessa cadenza, è stata misurata anche la temperatura, mentre la salinità è stata misurata una volta alla settimana. La pulizia delle vasche è stata effettuata mensilmente nel periodo ottobre-febbraio e ogni due settimane nel periodo marzo-maggio.

I bivalvi sono stati alimentati due volte al giorno, mattina e sera, con una dose di 250 ml di coltura della microalga *I. galbana*, che corrispondeva ad una concentrazione di circa 54×10^3 cellule/ml in ogni singola vasca.

Per la prima sperimentazione sono stati impiegati 400 mitili per vasca (1.15 cm media asse maggiore), raccolti dalle corde di sospensione delle reste nello stesso impianto di provenienza degli adulti usati per gli esperimenti a breve termine, e 600 vongole per vasca (0.76 media asse maggiore), pescate con apposito sacco campionatore, in grado di trattenere gli individui di piccola taglia, inserito all'interno della draga impiegata dalla turbosoffiante per la pesca delle vongole. La pesca di *C. gallina* è stata effettuata nella stessa area davanti al litorale di Chioggia dove erano stati prelevati gli adulti di vongola per gli esperimenti a breve termine.

C. gallina e *M. galloprovincialis* sono stati posti nelle stesse vasche sperimentali, ma debitamente separati. In particolare, le vongole sono state sospese sopra supporti di rete, nonostante *C. gallina* sia un bivalve che vive infossato nel sedimento. Non è stato infatti possibile utilizzare il substrato naturale della vongola, sia per motivi legati alla pulizia delle vasche, sia per permettere una più semplice individuazione dei morti. Durante questa sperimentazione sono state effettuate delle misurazioni a cadenza mensile e trimestrale. In particolare, a cadenza mensile è stata misurata la crescita (lunghezza e peso) e controllata la mortalità. A cadenza trimestrale sono stati prelevati campioni delle due specie per valutare il danno sulla conchiglia, mentre al termine della sperimentazione sono state effettuate, oltre a tutte le misure sopra citate, anche indagini fisiologiche, quali la determinazione dei tassi di respirazione, di filtrazione e di escrezione e, limitatamente al mitilo, la valutazione del numero di filamenti di bisso prodotti. Sono state inoltre eseguite indagini biochimiche relative alla quantificazione dell'attività della superossido dismutasi (SOD), della catalasi (CAT), della glutation-S-transferasi (GST), nonché della perossidazione lipidica (TBARS).

Nella seconda sperimentazione sono stati impiegati 500 mitili per vasca (1.81 cm media asse maggiore). Poiché lo scopo di tale sperimentazione era focalizzato soprattutto sullo studio delle variazioni della chimica dell'acqua al diminuire del pH, per entrambe le condizioni saggiate sono state allestite tre vasche, due con mitili ed una senza, per testare il possibile effetto dei bivalvi sulla chimica dei carbonati. Si è proceduto alla misurazione della temperatura e della salinità con le stesse modalità della precedente sperimentazione, inoltre, settimanalmente, sono stati raccolti campioni d'acqua sui quali sono state effettuate specifiche analisi chimiche per determinare: alcalinità totale (TA) espressa come $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, carbonio inorganico disciolto (DIC) espresso come $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, $p\text{CO}_2$ espressa come μatm ed infine il livello di saturazione (Ω) della calcite e dell'aragonite. Le analisi chimiche sono state condotte nel laboratorio del prof. Paolo Pastore presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova.

Analogamente alla prima sperimentazione, ma con cadenza diversa, ovvero al termine del primo mese e alla fine della sperimentazione, sono stati prelevati un campione di bivalvi per valutare il danno alla conchiglia. La crescita (lunghezza e peso) e la mortalità sono state rilevate alla fine della sperimentazione insieme alla misura di parametri fisiologici, quali tasso di respirazione, di filtrazione, di escrezione e della produzione di filamenti di bisso.

3.2.2 Parametri fisiologici

Le analisi fisiologiche sono state condotte sui giovanili seguendo le metodiche proposte da Widdows (1985). Le misurazioni dei tassi di filtrazione, respirazione ed escrezione sono state effettuate su 5 pool di animali per vasca.

3.2.2.1 Tasso di filtrazione

Negli esperimenti con i giovanili è stato utilizzato un approccio a flusso continuo. Anche per questo esperimento sono state condotte delle prove preliminari per valutare il volume e la concentrazione algale più adatti a rilevare il tasso fisiologico. L'alga impiegata è stata la stessa usata per gli adulti e l'acqua è stata filtrata e trattata come nelle misure di filtrazione sugli adulti. La concentrazione algale per entrambe le specie è stata di 15000 cell/ml.

Per le misure sui giovanili sono stati adottati piccoli recipienti (100 ml) e si è impiegato un flusso continuo d'acqua di 50 ml/min. Il tasso di filtrazione nei giovanili di mitilo è stato valutato su pools di 5 individui, mentre in *C. gallina* su pool di 15. È stato utilizzato un contenitore senza animali come bianco. Per la determinazione della concentrazione algale mediante Coulter Counter Mod.Z2, un'aliquota di 20 ml è stata prelevata in uscita da ciascun contenitore ad intervalli regolari di 30 minuti per un periodo totale di 1.5 ore

Il tasso di filtrazione in flusso continuo è stato calcolato mediante la formula (Hildreth & Crisp, 1976):

$$\text{Tasso di filtrazione (l/h)} = [(C1-C0)/C1] \times F,$$

dove C1 è la concentrazione algale in uscita dal bianco, C0 è la concentrazione in uscita dal contenitore con i bivalvi, F è il flusso in litri/ora.

3.2.2.2 Tasso di respirazione e tasso di escrezione

Per valutare il tasso di respirazione nei giovanili sono stati usati respirometri di dimensioni ridotte (volume pari a 85 ml). Le misurazioni sono state effettuate sugli stessi pool di animali utilizzati per la misura del tasso di filtrazione. Tutte le altre condizioni sperimentali e le procedure adottate per rilevare il parametro fisiologico in esame sono le stesse indicate per la sperimentazione sugli adulti.

Analogamente a quanto descritto per gli adulti, alla fine del periodo dedicato alla misura del tasso di respirazione, è stata prelevata da ogni respirometro un'aliquota

di acqua di mare per la misura della concentrazione di N-NH_3 e il calcolo del tasso di escrezione.

3.2.2.3 Misura del peso secco

Il peso secco è stato misurato su pool di animali con la stessa procedura impiegata per gli adulti.

3.2.2.4 Produzione del bisso in *M. galloprovincialis*

Nei giovanili di mitilo è stato valutato individualmente il numero di filamenti di bisso che venivano prodotti in 24 ore secondo la metodica di Lezin, (2008). Per ogni replica sono stati prelevati 10 mitili, tutti della stessa grandezza, che sono stati posizionati singolarmente in una capsula Petri all'interno della quale è stata versata un po' di acqua di mare. Dopo aver aspettato che i mitili avessero prodotto i primi filamenti, ancorandosi al substrato, le capsule sono state immerse nelle rispettive vasche sperimentali per 24 ore. Al termine dell'esperimento, ogni capsula è stata osservata allo stereoscopio per contare tutte le placche di adesione dei filamenti di bisso.

3.2.3 Parametri biochimici

Le analisi biochimiche sui giovanili sono state effettuate su n°3 pool di n° 10 animali per condizione sperimentale. Date le ridotte dimensioni degli animali e la conseguente difficoltà nell'utilizzare separatamente i diversi tessuti come avvenuto per gli adulti, i giovanili sono stati analizzati in toto. Sono state impiegate le stesse metodiche analitiche sopracitate per gli adulti

3.2.4 Prima sperimentazione - Crescita e danno sulla conchiglia

3.2.4.1 Misure mensili

Ogni mese per ogni vasca si è registrato il numero degli individui morti e, utilizzando un calibro con precisione di 0.1 mm, sono state rilevate la lunghezza di tutti i bivalvi e l'altezza dei primi 60 individui scelti casualmente. Gli assi di simmetria sono definiti diversamente in veneridi e mitilidi. Nei veneridi la lunghezza è la massima distanza lungo l'asse antero-posteriore; l'altezza è la massima distanza lungo l'asse dorso-ventrale (detto anche umbo-ventrale) e la larghezza è la massima distanza lungo l'asse perlaterale, tra le valve della conchiglia chiusa (Fig. 9) (Gaspar *et al.*, 2002). Nei pediveliger dei mitilidi l'originale porzione anteriore della conchiglia rallenta la propria crescita e diventa la superficie ventrale nell'adulto. Nei mitilidi, quindi, la lunghezza è definita come la massima distanza tra l'umbone ed il margine opposto della conchiglia; l'altezza, a sua volta, è l'asse perpendicolare al precedente, assimilabile all'asse dorso-ventrale. Mensilmente è stato registrato anche il peso degli animali. Per poter pesare correttamente bivalvi vivi è necessario asciugarli il più possibile, riducendo però al massimo il tempo di emersione e lo stress associato. Per accelerare i tempi della pesata ed aumentarne la precisione, gli animali sono stati perciò pesati in pool da 40 individui, tramite una bilancia (RADWAG PS 4500/C/1) con una risoluzione di 0.01 gr, dopo essere stati accuratamente asciugati con carta assorbente.

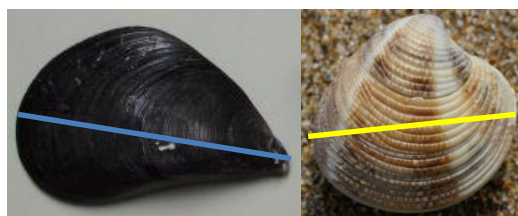


Figura 9 - Asse di misurazione della lunghezza in *M. galloprovincialis* e *C. gallina*.

3.2.4.2 Misure trimestrali

Al terzo mese e al sesto mese dall'inizio della sperimentazione sono state eseguite ulteriori misure. Per ogni vasca, sono state misurate lunghezza, altezza, peso fresco totale, peso secco della conchiglia di 30 bivalvi. Dopo averli aperti col calore, si è proceduto a separare i tessuti molli dalla conchiglia, e si è determinato il peso secco della conchiglia. Dopo le pesate le due valve di ogni bivalve sono state conservate per le successive analisi del danno conchigliare.

Per entrambe le specie, il danno conchigliare è stato valutato sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo tramite l'analisi visiva dell'alterazione della conchiglia, attribuendo un indice di danno in funzione del livello di dissoluzione

presente sulla superficie esterna della valva analizzata, calcolando l'area percentuale danneggiata e misurando lo spessore della conchiglia su sezioni della stessa.

Per attribuire l'indice di danno sono state scelte le valve destre di ogni bivalve, Utilizzando uno stereomicroscopio Leica S8AP0 provvisto di videocamera Leica DFC295 collegato ad un PC provvisto di software per l'analisi d'immagine (Leica Suite Application), di ogni valva è stata acquisita l'immagine, ad un ingrandimento di 6.3x per i mitili e di 10x per le vongole. Sulla base delle immagini è stata possibile l'attribuzione di un indice di valore crescente in funzione del livello di danno osservato.

Per ciascuna specie è stato necessario formulare uno specifico indice di danno in funzione della diversa tipologia di dissoluzione riscontrata.

Per il mitilo l'indice di danno è stato valutato nel seguente modo: 0 = nessun segno di dissoluzione; 1 = scolorimento del periostraco; 2 = rottura e sollevamento del periostraco e ostraco visibile; 3 = dissoluzione dell'ostraco e ipostraco visibile.

L'indice di danno per *C. gallina* è stato espresso come la somma dell'indice di danno dell'area umbonale e dell'indice di danno sulla parte rimanente della superficie conchigliare. Il danno all'area umbonale è stato valutato nel seguente modo: 0 = nessun danno; 1 = parziale dissoluzione dell'ostraco, ovvero ostraco conservato in parte con residue tracce di costole radiali; 2 = ostraco completamente dissolto, ovvero ipostraco visibile e costole radiali assenti. Il danno sulla parte rimanente della superficie conchigliare è stato valutato nel seguente modo: 1 = danno parziale del periostraco, ovvero perdita di lucentezza, mantenimento di aree scolorite su parte delle creste radiali, scolorimento; 2 =

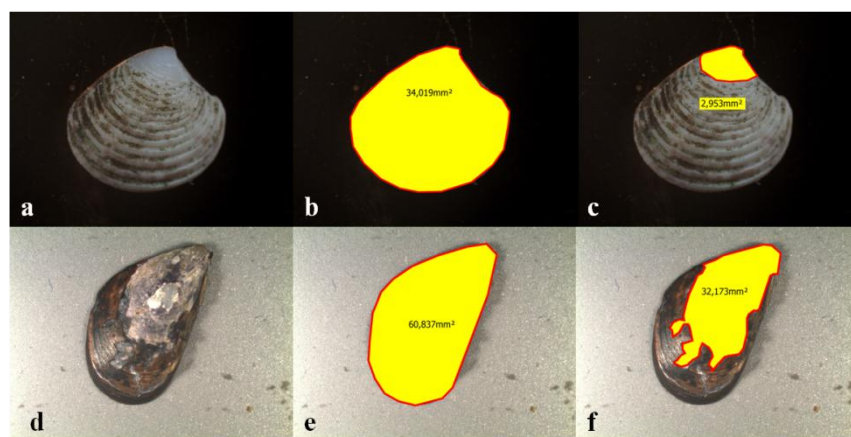


Figura 10 - *C. gallina* con danno 3 (a) e *M. galloprovincialis* con danno 3 (d), area totale della valva (b, e) e area della parte danneggiata (c,f).

dissoluzione totale del periostraco, ovvero colorazione assente, molte creste radiali appiattite. Per valutare l'area percentuale danneggiata si è partiti dall'immagine acquisita in luce trasmessa (Fig. 10 a, d), e attraverso l'utilizzo

dell'analisi d'immagine si sono misurate l'area totale della valva (Fig. 10 b, e) e l'area della zona danneggiata (Fig. 10 c, f).

Successivamente, le valve destre precedentemente fotografate sono state lavate in ipoclorito diluito per rimuovere eventuali residui di materia organica, seccate in stufa per 1 ora a 60°C e poi inglobate singolarmente in resina epossidica bicomponente trasparente. Tale resina (Araldite 2020) consta di due componenti (Araldite 2020A e Araldite 2020B) che vanno miscelate tra loro in rapporto 100:35. Le valve destre così inglobate in Araldite 2020 sono state messe in stufa a 60°C per 5 ore per permettere alla resina di solidificare. Una volta indurita la

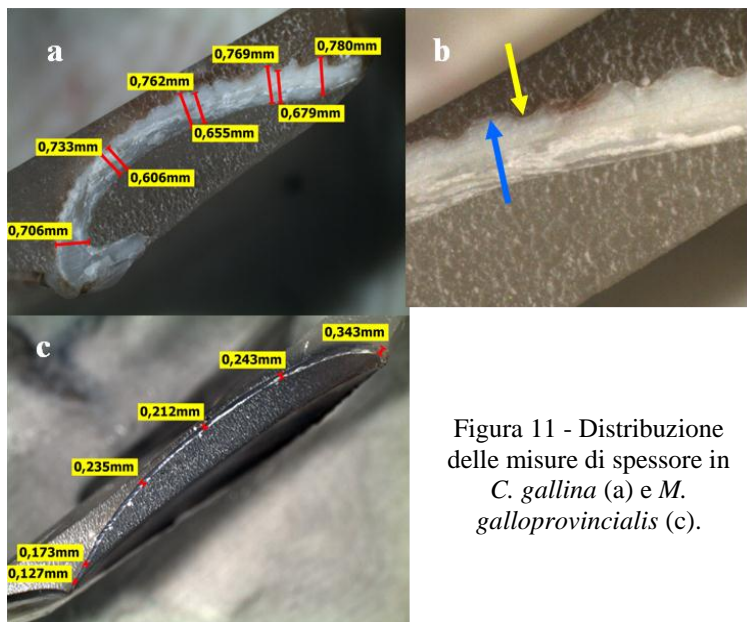


Figura 11 - Distribuzione delle misure di spessore in *C. gallina* (a) e *M. galloprovincialis* (c).

resina, si è proceduto a tagliare ogni valva lungo l'asse di maggiore accrescimento (Fig. 11) con una sega con lama diamantata. Le sezioni così ottenute sono state levigate con polveri abrasive a grana 1200, per eliminare eventuali graffi provocati dalla lama della sega.

Al termine della levigatura sono state acquisite le immagini delle sezioni ad ingrandimenti compresi tra 1.25x e 2x utilizzando lo stereomicroscopio. Successivamente è stato misurato lo spessore della conchiglia, tramite il sistema di analisi d'immagine precedentemente citato.

Per i mitili è stato misurato lo spessore della conchiglia a livello marginale, a livello umbonale, e a tre livelli diversi lungo l'asse della conchiglia, distribuiti a circa $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ della lunghezza (Fig. 11 c). Nella zona più vicina al margine della valva, corrispondente alla parte deposta più di recente, si è operata un'ulteriore misurazione.

Per le vongole è stato misurato lo spessore a livello del margine della conchiglia, dell'umbone e in altri tre punti lungo l'asse della sezione (Fig. 11a). In questi tre punti è stato misurato lo spessore sia all'apice della costola radiale (Fig. 11 b) che nella depressione successiva (Fig. 11 b).

3.2.5 Seconda sperimentazione - Crescita e danno sulla conchiglia

In ogni vasca, 50 mitili sono stati mantenuti separati dal resto degli altri bivalvi, tramite una rete, per valutarne la crescita, attraverso la misurazione della lunghezza e del peso. La lunghezza è stata misurata individualmente, mentre il peso è stato misurato sull'intero pool di bivalvi. Tutte le misure sono state effettuate all'inizio, dopo un mese e alla fine di questa sperimentazione con le stesse modalità della precedente.

Inoltre, dopo il primo mese, in corrispondenza dell'inizio del danno visibile sulle conchiglie, sono stati prelevati 20 animali per condizione sperimentale (10 per vasca), e su questi è stato valutato il danno conchigliare, attribuendo un indice di danno e l'area percentuale di danno con le stesse modalità della prima sperimentazione. Al termine della sperimentazione, il danno conchigliare è stato misurato su 30 mitili per vasca.

3.2.5.1 Parametri chimici dell'acqua di mare

L'alcalinità totale (AT) è stata determinata per titolazione potenziometrica con acido cloridrico NORMEX come titolante. La durezza dell'acqua è stata determinata con due modalità indipendenti: 1) titolazione del calcio e del magnesio con EDTA in presenza di indicatore colorimetrico (nero eriocromo T) (APHA 2340 C. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th Ed.); 2) cromatografia a scambio ionico con soppressione chimica dell'eluente. Le costanti termodinamiche impiegate sono state calcolate in accordo con Millero *et al.* (2006). Il carbonio disciolto totale (DIC) e la pressione parziale della CO₂ (pCO₂) sono state ricavate matematicamente dalla misurazione della temperatura e della AT. Lo stato di saturazione della calcite (Ω_c) e della aragonite (Ω_A) sono stati calcolati usando i prodotti di solubilità descritti da Millero *et al.* (2006). La concentrazione totale dei carbonati è stata ricavata dalla AT.

3.3 ANALISI STATISTICA

Per analizzare i risultati delle sperimentazioni sugli adulti è stata impiegata l'analisi statistica Permutazionale della Varianza (PERMANOVA) (Anderson *et al.*, 2008). I confronti tra le condizioni considerate di riferimento (controllo: pH=8.1; temperatura più bassa) e le altre sono stati eseguiti mediante ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis, seguita da test post-hoc corretti con la correzione di Bonferroni per 5 confronti. Per i set di risultati che non hanno consentito l'applicazione della PERMANOVA a causa del basso numero di permutazioni generate è stata effettuata l'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis. Per confrontare i dati biochimici ed i valori delle LT_{50} tra le tre sperimentazioni in *M. galloprovincialis* e *C. gallina* è stato effettuato il confronto dei *p-value* ottenuti dall'ANOVA di Kruskal-Wallis in ogni sperimentazione tramite il test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti.

Nelle sperimentazioni sui giovanili i dati delle analisi fisiologiche e biochimiche sono stati analizzati con il test non parametrico U di Mann-Whitney. Sempre per i giovanili sono stati inoltre applicati il test t di Student per l'analisi della crescita e il mixed model test per l'analisi del danno sulla conchiglia. Le analisi statistiche sono state realizzate utilizzando i programmi STATISTICA 9 (StatSoft, Tulsa, OK) e PERMANOVA + (PRIMER-E Ltd, Luton, UK).

3.4 LE SPECIE

3.4.1 *Mytilus galloprovincialis*

Phylum: *Mollusca*

Classe: *Bivalvia*

Ordine: *Mytiloidea*

Famiglia: *Mytilidae*

Genere: *Mytilus*

Specie: *Mytilus galloprovincialis*



Classificazione Lamarck, 1819

M. galloprovincialis è un bivalve della famiglia Mytilidae, con conchiglia equivalve, ristretta e appuntita verso la parte anteriore. E' una specie molto comune, ampiamente distribuita lungo le zone costiere che presentino substrati duri dove si ancora tramite i filamenti di bisso. Questi ultimi sono composti da cheratina che solidifica a contatto con l'acqua (Barnes & Rupert, 2004) e prodotti dalla ghiandola del bisso, alla base del piede. La distribuzione verticale della specie si estende dalla la zona intertidale fino a 40 m di profondità (Seed, 1968, 1992). La specie è capace di sopportare l'alternanza di fasi di emersione ed immersione e variazioni di temperatura e salinità. Le dimensioni sono fortemente influenzate dall'habitat: gli individui dell'alto intertidale rimangono piccoli (al massimo 60 mm di lunghezza), mentre quelli di acque più profonde possono facilmente arrivare fino a 90 mm (Seed, 1968, 1992). E' una specie gonocorica a fecondazione esterna e presenta un periodo riproduttivo esteso in Alto Adriatico da settembre a giugno, con due picchi di emissione dei gameti, uno autunnale e uno primaverile (HRS-Brenko, 1980).

3.4.2 *Chamelea gallina*

Phylum: *Mollusca*

Classe: *Bivalvia*

Ordine: *Veneroidea*

Famiglia: *Veneridae*

Genere: *Chamelea*

Specie: *Chamelea gallina*



Classificazione Linneo, 1758

C. gallina è un mollusco bivalve appartenente alla famiglia Veneridae. Vive in ambienti marini costieri a bassa profondità, compresa tra 0 e 15 m. Predilige

substrati sabbiosi e caratterizza la biocenosi delle Sabbie Fini e Ben Calibrate (SFBC) (Peres & Picard, 1964), in cui elementi di granulometria compresa tra 0.063 e 0.2 mm sono presenti in percentuali superiori al 90%. In questi sedimenti *C. gallina* vive infossata, nutrendosi per filtrazione di fitoplancton e di detrito organico in sospensione. La specie è diffusa in ambienti caratterizzati da fluttuazioni relativamente contenute dei parametri ambientali, quali temperatura e salinità, e da un buon idrodinamismo che favorisce l'ossigenazione dell'acqua e l'ossidazione della materia organica (Barillari *et al.*, 1978). *C. gallina* è un bivalve gonocorico, in cui la maturità sessuale viene raggiunta dopo il primo anno di vita alle dimensioni di 15-18 mm. Durante il ciclo riproduttivo di *C. gallina* in Alto Adriatico l'emissione dei gameti inizia a maggio, anche se nel Golfo di Trieste individui maturi sono stati rinvenuti già a gennaio (Valli *et al.*, 1989), e si protrae fino a luglio. E' una specie a crescita lenta che raggiunge la taglia commerciale di 25 mm in due anni e quella massima di 40-60 mm in 5-6 anni. E' noto un rallentamento della crescita durante i mesi invernali, con un arresto totale della crescita quando la temperatura scende sotto i 10°C (Frogliola, 1975).

3.4.3 *Mimachlamys varia*

Phylum: *Mollusca*

Classe: *Bivalvia*

Ordine: *Pterioida*

Famiglia: *Pectinidae*

Genere: *Mimachlamys*

Specie: *Mimachlamys varia*



Classificazione Linneo, 1758

M. varia è un mollusco bivalve appartenente alla famiglia dei Pectinidae. Presenta due valve diversamente convesse, con un numero variabile di coste radiali compreso tra 26 e 32. E' un bivalve comune lungo le coste atlantiche dalla Gran Bretagna e Francia fino al Sud Africa e la sua presenza si estende nell'intero bacino del Mediterraneo (Shumway & Parsons, 2006). L'habitat è costituito da substrati duri di varia natura, ai quali aderisce grazie al bisso (Rodhouse & Burnell, 1979). L'età massima registrata in Atlantico è di circa 10 anni e la taglia massima raggiunta è di circa 60 mm. Nonostante sia una specie in grado di vivere a elevate profondità, circa 80 m secondo Tebble (1966), è molto abbondante a profondità minori, attorno ai 10 m (Rodhouse & Burnell, 1979). E' una specie ermafrodita proterandrica (Lucas, 1965); la maturità gonadica e l'emissione dei gameti in Alto Adriatico si riscontrano tra luglio e settembre secondo quanto evidenziato da un recente studio dalla dott. Bressan (dati non pubblicati).

3.4.4 *Callista chione*

Phylum: *Mollusca*

Classe: *Bivalvia*

Ordine: *Veneroida*

Famiglia: *Veneridae*

Genere: *Callista*

Specie: *Callista chione*



Classificazione *Linneo, 1758*

C. chione è un mollusco bivalve appartenente alla famiglia Veneridae. La conchiglia, che può raggiungere i 90 mm di lunghezza, è equivalve e molto robusta, a forma leggermente allungata, lucida con fasce concentriche sottili. L'areale di distribuzione della specie comprende le acque temperate dell'Atlantico e del Mediterraneo, su fondali sedimentari a profondità tra i 10 e 130 m (Poppe & Goto, 1993). Nell'Adriatico nord-occidentale i banchi naturali sono localizzati a circa 8-10 miglia nautiche dalla costa a profondità di 18-20 m. *C. chione* è un filtratore che si nutre di una grande varietà di fitoplancton, di detrito organico e batteri in sospensione (Jørgensen, 1990, 1996; Hawkins & Bayne, 1992). Anche se in Atlantico può arrivare a 40 anni di vita (Forster, 1981), in Adriatico Hall *et al.* (1974) hanno stimato che l'età massima di questa specie è di circa 18 anni, con un tasso di crescita di 13 mm nei primi due anni di vita, che si riduce a 2.2 mm dal quinto anno in poi. *C. chione* è una specie gonocorica. Moura *et al.* 2008 hanno stimato che la maturità sessuale viene raggiunta a 50 mm. In Alto Adriatico, nel Golfo di Trieste, il periodo riproduttivo comincia a febbraio e si protrae fino a settembre con un picco massimo tra maggio e agosto; il ciclo gametogenico tuttavia non si interrompe mai durante tutto l'anno (Valli *et al.*, 1983–84).

4. RISULTATI

4.1 SPERIMENTAZIONE A BREVE TERMINE SU BIVALVI ADULTI

4.1.1 *Mytilus galloprovincialis*

4.1.1.1 Parametri fisiologici

Le analisi PERMANOVA (Tab. 1) multivariata e univariata sono state eseguite sui dati dei tassi di filtrazione, respirazione ed escrezione. L'approccio multivariato ha mostrato che la filtrazione e la respirazione, a differenza dell'escrezione, sono significativamente influenzate dalla salinità. Il test univariato condotto sulle singole salinità ha evidenziato i seguenti risultati.

Tasso di filtrazione

La filtrazione è stata influenzata in modo significativo dalla temperatura solo a 28 psu, dal pH invece a tutte le salinità (Tab. 1). Confrontando ad ogni salinità la risposta ottenuta alle diverse condizioni saggiate, si è osservato che a 28 psu (Fig. 12) il tasso di filtrazione è variato in funzione del pH e della temperatura. In particolare, l'aumento del tasso di filtrazione rispetto al controllo (1.19 l/h) è stato significativo a pH 7.4 in entrambe le temperature (2.3 l/h 22°C; 1.89 l/h 28°C). A 34 psu (Fig. 12) il tasso di filtrazione è aumentato significativamente con la diminuzione del pH, sia a 22 che a 28°C (valore massimo a pH 7.7 22°C). A 40 psu (Fig. 12), invece, si è assistito ad una significativa depressione del tasso di filtrazione rispetto al controllo, con valori medi molto simili a tutte le altre condizioni saggiate.

Tasso di respirazione

La respirazione è stata significativamente influenzata dalla temperatura, dal pH e dalla loro interazione solo a 34 psu (Tab. 1). Nessun effetto statisticamente significativo è stato riscontrato alle altre salinità (Tab. 1). A 34 psu (Fig. 12), il tasso di respirazione è rimasto pressoché costante a 22°C per tutti i pH saggiati, mentre si è assistito ad un incremento della respirazione a 28°C in presenza di acidificazione, con un picco statisticamente significativo a pH 7.7. A 28 psu (Fig. 12) si è assistito ad un progressivo aumento del tasso di respirazione al diminuire del pH e all'aumentare della temperatura. A 40 psu (Fig.12) si è osservata una diminuzione della respirazione a pH 7.7, seguita da un incremento a pH 7.4.

Tasso di Escrezione

L'escrezione è risultata influenzata in modo statisticamente significativo dalla temperatura a 28 psu (Tab. 1). A questa salinità (Fig. 12), il tasso di escrezione è stato maggiore a 28°C a tutti i pH testati, con un massimo raggiunto a pH 7.7 (5.67 µgat N-NH₃/l), unico valore statisticamente più alto rispetto al controllo (3.22 µgat N-NH₃/l). Anche se la PERMANOVA non evidenzia effetti significativi dei fattori sperimentali, il pattern di variazione dell'escrezione a 34 psu (Fig. 12) è stato lo stesso di quello 28 psu. Analogamente, a 40 psu (Fig. 12), l'analisi statistica non ha indicato effetti significativi per temperatura, pH e loro interazione. I risultati mostrano tuttavia che il tasso di escrezione è variato in funzione della temperatura, con valori sempre maggiori a 28 °C rispetto a 22°C.

Test di sopravvivenza in aria - LT₅₀

Il risultato del test, espresso dal valore di LT₅₀ che corrisponde al tempo di sopravvivenza del 50% degli animali esposti all'aria, non ha potuto essere elaborato statisticamente attraverso l'analisi PERMANOVA, poiché la presenza di 3 valori replicati per condizione sperimentale generava un numero troppo basso di permutazioni. Quindi è stato effettuato il confronto dei *p-value* dell'ANOVA di Kruskal-Wallis tramite il test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti al fine di valutare anche per questo indice l'effetto della salinità (Tab. 2). La salinità ha influenzato significativamente la LT₅₀. 40 psu è risultata la condizione con la sopravvivenza maggiore (18 giorni) rispetto a 28 e 34 psu (entrambe 16 giorni). Per ogni salinità l'ANOVA non parametrica di K-W non è mai risultata statisticamente significativa (Tab. 2).

Tabella 1 - Risultati dell'analisi PERMANOVA per il tasso di filtrazione, di respirazione ed escrezione, condotta sull'insieme dei dati delle tre sperimentazioni "Spe" e sui dati di ogni singola sperimentazione (28, 34, 40 psu) in *M. galloprovincialis*. Per ciascun parametro vengono riportati gli effetti delle variabili "S" salinità (28, 34, 40 psu), "T" temperatura (22°, 28°C) e "pH" (8.1, 7.7, 7.4), "T X pH" interazione temperatura e pH. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); p non significativo "ns".

		Spe	28 psu	34 psu	40 psu
		p	p	p	p
Filtrazione	S **	T	*	ns	ns
		pH	**	**	**
		TxpH	ns	**	ns
Respirazione	S **	T	ns	**	ns
		pH	ns	**	ns
		TxpH	ns	*	ns
Escrezione	S ns	T	**	ns	ns
		pH	ns	ns	ns
		TxpH	ns	ns	ns

Tabella 2 - Risultati dell'analisi statistica per il valore di LT_{50} in *M. galloprovincialis*. A) Risultati del test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti effettuato tra le tre sperimentazioni "Spe". B) Risultati dell'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis a 28, 34, 40 psu. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.01$ (**); p non significativo "ns".

A		B		
Spe		28 psu	34 psu	40 psu
p		p	p	p
LT_{50}	**	ns	ns	ns

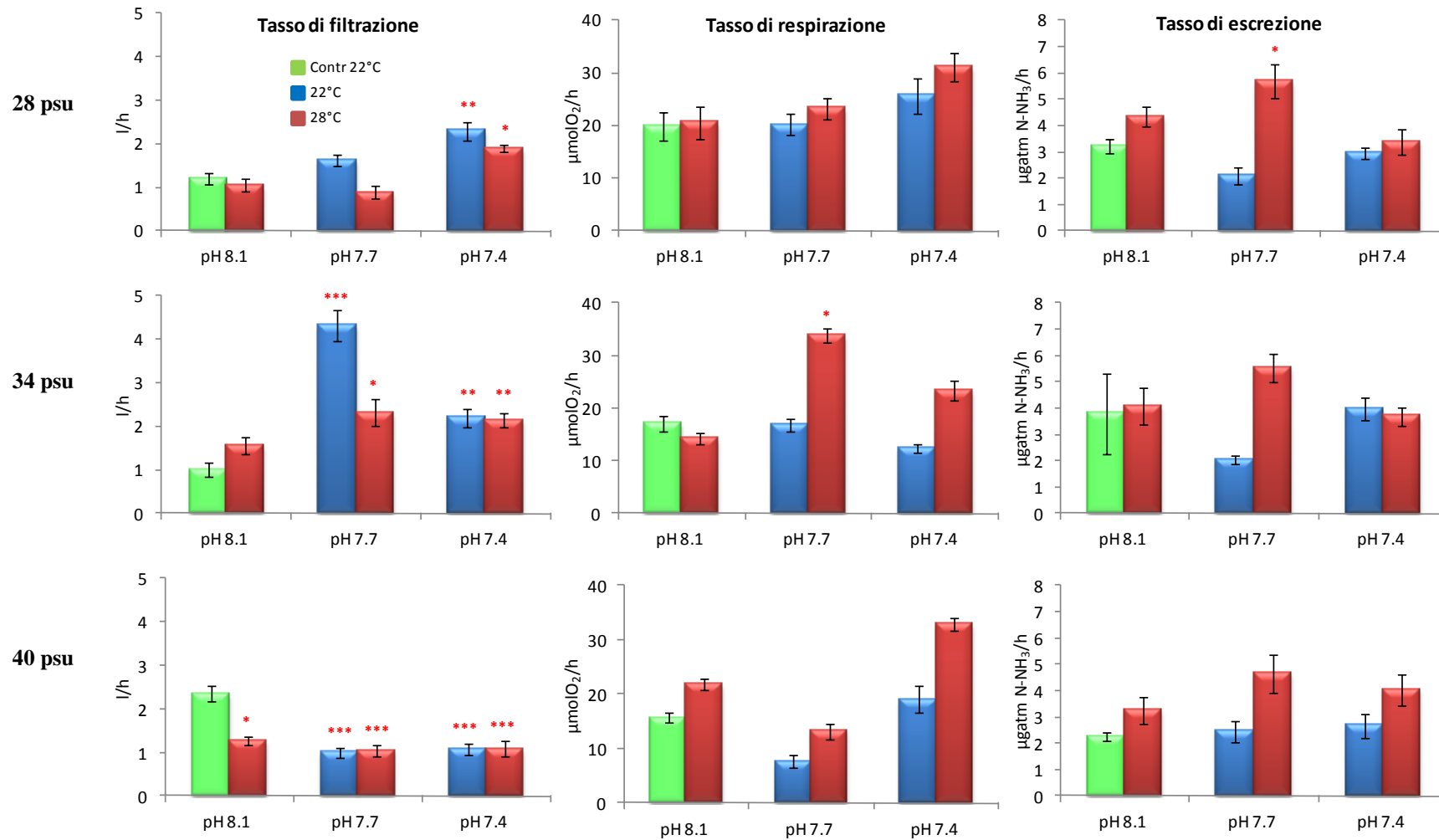


Figura 12 – Tasso di filtrazione, tasso di respirazione e tasso di escrezione in *M. galloprovincialis*, (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 22°C): $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

4.1.1.2 Parametri biochimici

Le attività enzimatiche di SOD, CAT, GST e i livelli di TBARS sono stati valutati in due tessuti, branchia e ghiandola digestiva (Tab. 3; Figg. 13, 14). Anche in questo caso, la numerosità delle repliche per condizione sperimentale non ha permesso di ottenere un numero di permutazioni adeguato per un'applicazione della PERMANOVA. E' stato effettuato quindi il confronto dei *p-value* dell'ANOVA di Kruskal-Wallis tramite il test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti. A livello branchiale (Tab. 3), la salinità ha avuto un effetto significativo sulla CAT e sul GST, mentre per la ghiandola digestiva, solo sulla CAT. In particolare, a 28 psu (Fig. 13), solo l'attività del GST nelle branchie è risultata significativamente influenzata dalle condizioni sperimentali, subendo una depressione alla temperatura più alta e alla diminuzione del pH. Nonostante l'ANOVA non parametrica non sia risultata significativa per le altre risposte biochimiche, è stato possibile apprezzare una diminuzione progressiva rispetto al controllo per l'attività della CAT e della SOD in funzione del pH e della temperatura. Il TBARS ha mostrato invece un tendenziale aumento alla temperatura più alta a tutti e tre i valori di pH. Nella ghiandola digestiva (Fig. 14) è stato interessante sottolineare l'aumento significativo dell'attività della CAT in funzione della temperatura e del pH con un massimo a pH 7.4 28°C. Per l'attività della SOD, del GST e per il TBARS non sono stati apprezzati specifici pattern di variazione; solo per il TBARS, analogamente a quanto riscontrato nella branchia, si è osservano valori sempre più alti a 28°C che a 22°C (Fig. 14).

A 34 psu (Tab. 3) l'analisi statistica non ha evidenziato effetti significativi per nessuna risposta biochimica. Ciononostante, è stato interessante notare che l'attività della CAT, della SOD e del GST nelle branchie (Fig. 13) hanno mostrato un pattern simile di variazione, con un aumento di attività al diminuire del pH (soprattutto SOD e GST) e all'aumentare della temperatura (CAT). Il TBARS invece, non ha subito particolari variazioni, ma ha mostrato il valore più alto nel controllo e a 28°C è risultato sempre inferiore rispetto a 22°. Nella ghiandola digestiva a 34 psu (Fig. 14) sono stati riscontrati, come nella branchia, pattern di variazione poco accentuati, con un aumento di attività al diminuire del pH (SOD, CAT, GST) e all'aumentare della temperatura (GST). Anche nella ghiandola digestiva il TBARS ha mostrato i livelli maggiori nel controllo.

A 40 psu l'attività della CAT nelle branchie è stata influenzata significativamente dalle condizioni sperimentali saggiate (Fig. 13). La risposta della CAT in questo tessuto ha fatto registrare un aumento in funzione del diminuire del pH, soprattutto a 22°C. L'unica condizione significativamente diversa dal controllo è stata quella a pH 7.4 22°C. Sebbene l'attività della SOD e del GST e il TBARS non sono stati statisticamente diversi nelle combinazioni sperimentali saggiate, è stato possibile rilevare alcuni pattern di variazione specifici. Infatti, l'attività della SOD è aumentata in funzione della temperatura, soprattutto a pH 7.4; il GST

invece ha subito un incremento alla temperatura più alta, tanto maggiore quanto maggiore era il valore di pH. Ancora una volta il TBARS ha mostrato i valori più alti a pH 8.1 e 22°C e diminuendo in condizioni di acidificazione ad entrambe le temperature. Nelle ghiandola digestiva (Fig. 14), solo per la SOD si è rilevata una differenza significativa tra le diverse combinazioni sperimentali, con la temperatura più alta che ha promosso un' induzione dell'attività enzimatica a pH 8.1 e una sua depressione in condizioni di acidificazione. Tuttavia, nessun confronto con il controllo è risultato statisticamente significativo. L'attività della CAT è aumentata in funzione della temperatura solo a pH 8.1 e 7.7, quella del GST è risultata molto simile nelle diverse condizioni sperimentali, con i valori più alto e più basso a pH 8.1, rispettivamente a 22 e a 28°C. Il TBARS ha mostrato i valori più alti a pH 7.7 per poi diminuire a pH 7.4 facendo registrare valori inferiori al controllo (Fig. 14).

Espressione HSP70 nell'epatopancreas

Per valutare l'effetto della salinità per tale indice è stato effettuato il confronto dei *p-value* dell'ANOVA di Kruskal-Wallis tramite il test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti. La salinità è risultata influenzare significativamente l'espressione delle HSP70 (Tab. 4). A 28 psu l'espressione delle HSP è risultata influenzata dalle condizioni sperimentali saggiate (Tab. 4). In particolare i livelli di HSP70 (Fig. 15) sono cresciuti progressivamente al diminuire del pH e all'aumentare della temperatura, con differenze significative rispetto al controllo a 28°C pH 8.1 e pH 7.7; in quest'ultima condizione, le HSP70 hanno raggiunto il livello maggiore dell'intera sperimentazione (156).

A 34 psu (Fig. 15) i livelli delle HSP70 hanno mantenuto lo stesso trend di variazione in funzione di temperatura e pH già osservato a 28 psu, con valori significativamente maggiori di quelli misurati nel controllo a pH 7.7 e 7.4. A 40 psu (Fig. 15) i livelli delle HSP70 a 22°C non sono variati rispetto al controllo (161) con il diminuire del pH. A 28°C (Fig. 15) i livelli delle HSP70 sono aumentati in tutte le condizioni di pH rispetto a 22° C anche se in modo significativo solo a pH 7.7.

Tabella 3 - Risultati dell'analisi statistica per i saggi biochimici di *M. galloprovincialis* in "BR" branchia, "GH" ghiandola digestiva per l'attività della SOD, attività della CAT, del GST, e perossidazione lipidica (TBARS). A) Risultati del test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti effettuato tra le tre sperimentazioni "Spe"; B) Risultati dell'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis a 28, 34, 40 psu. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); p non significativo "ns".

		A	B		
		Spe	28 psu	34 psu	40 psu
		p	p	p	p
BR	SOD	ns	ns	ns	ns
	CAT	*	ns	ns	*
	GST	*	**	ns	ns
	TBARS	ns	ns	ns	ns
GH	SOD	ns	ns	ns	*
	CAT	**	ns	ns	ns
	GST	ns	ns	ns	ns
	TBARS	ns	ns	ns	ns

Tabella 4 - Risultati dell'analisi statistica per l'espressione delle HSP70 nella ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis*. A) Risultati del test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti effettuato tra le tre sperimentazioni "Spe"; B) Risultati dell'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis a 28, 34, 40 psu. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

		A	B		
		Spe	28 psu	34 psu	40 psu
		p	p	p	p
HSP70		*	**	**	*

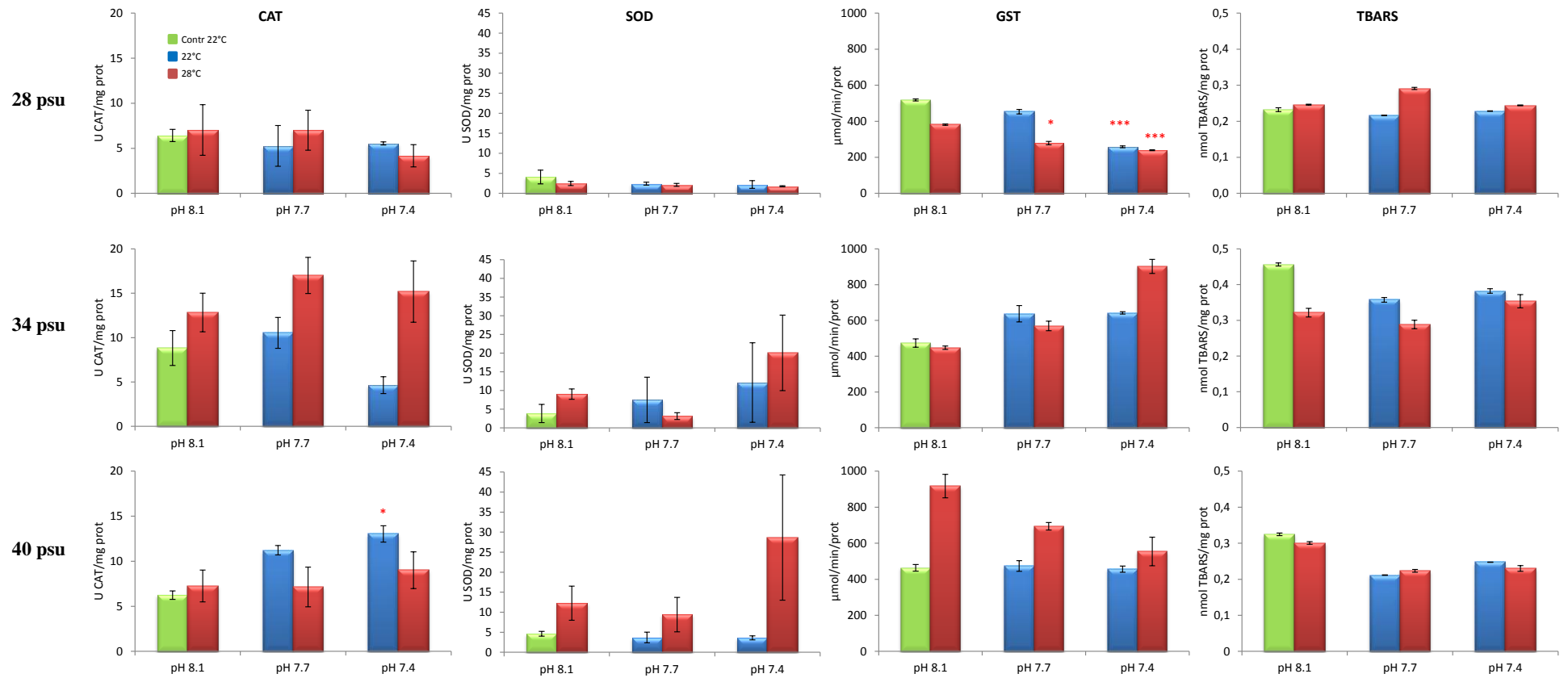


Figura 13 - Attività della catalasi (CAT), attività della superossido dismutasi (SOD), attività della glutatione solfo-transferasi “GST” e perossidazione lipidica (TBARS) nelle branchie di *M. galloprovincialis* (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 22°C): $p < 0.05$ (*); $p < 0.001$ (***)

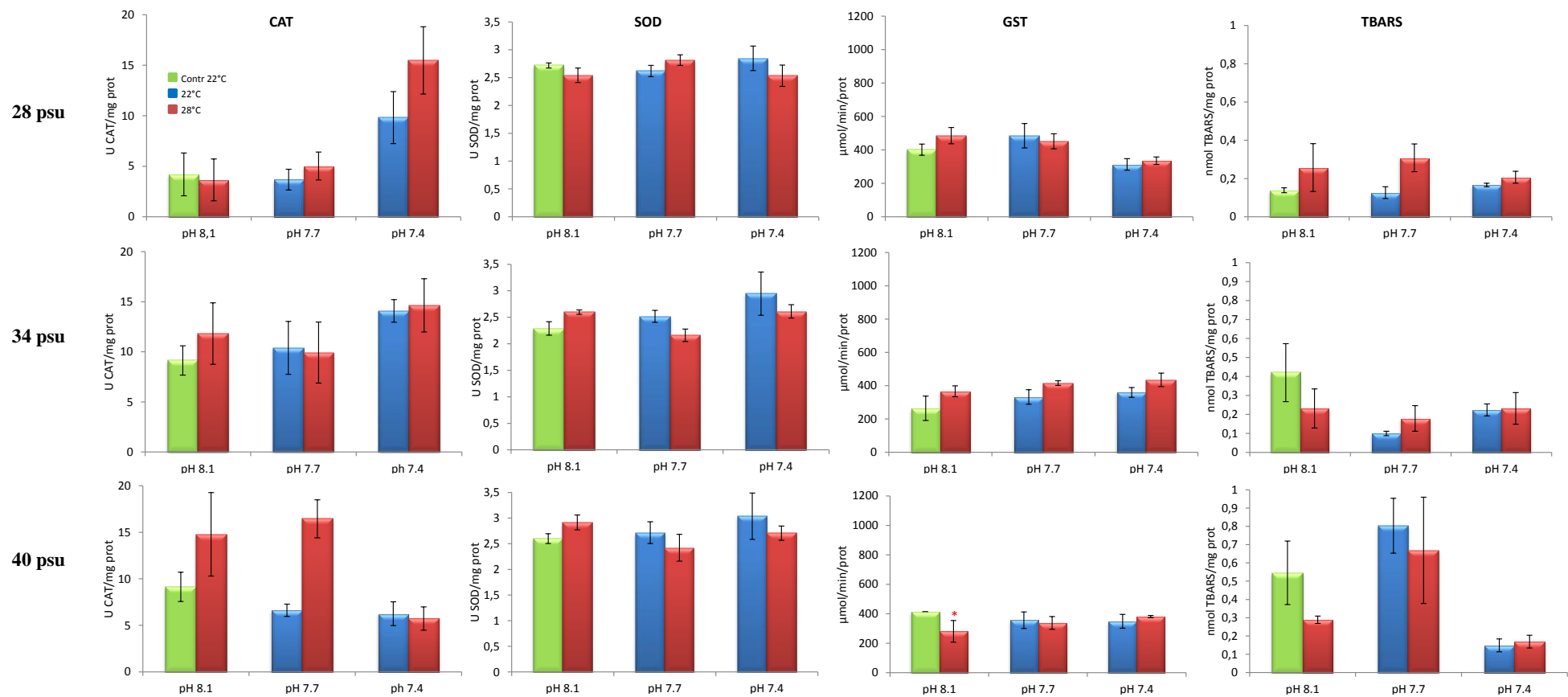


Figura 14 – Attività della catalasi (CAT), attività della superossido dismutasi (SOD), attività della glutazione solfo-transferasi “GST” e perossidazione lipidica (TBARS) nella ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4).

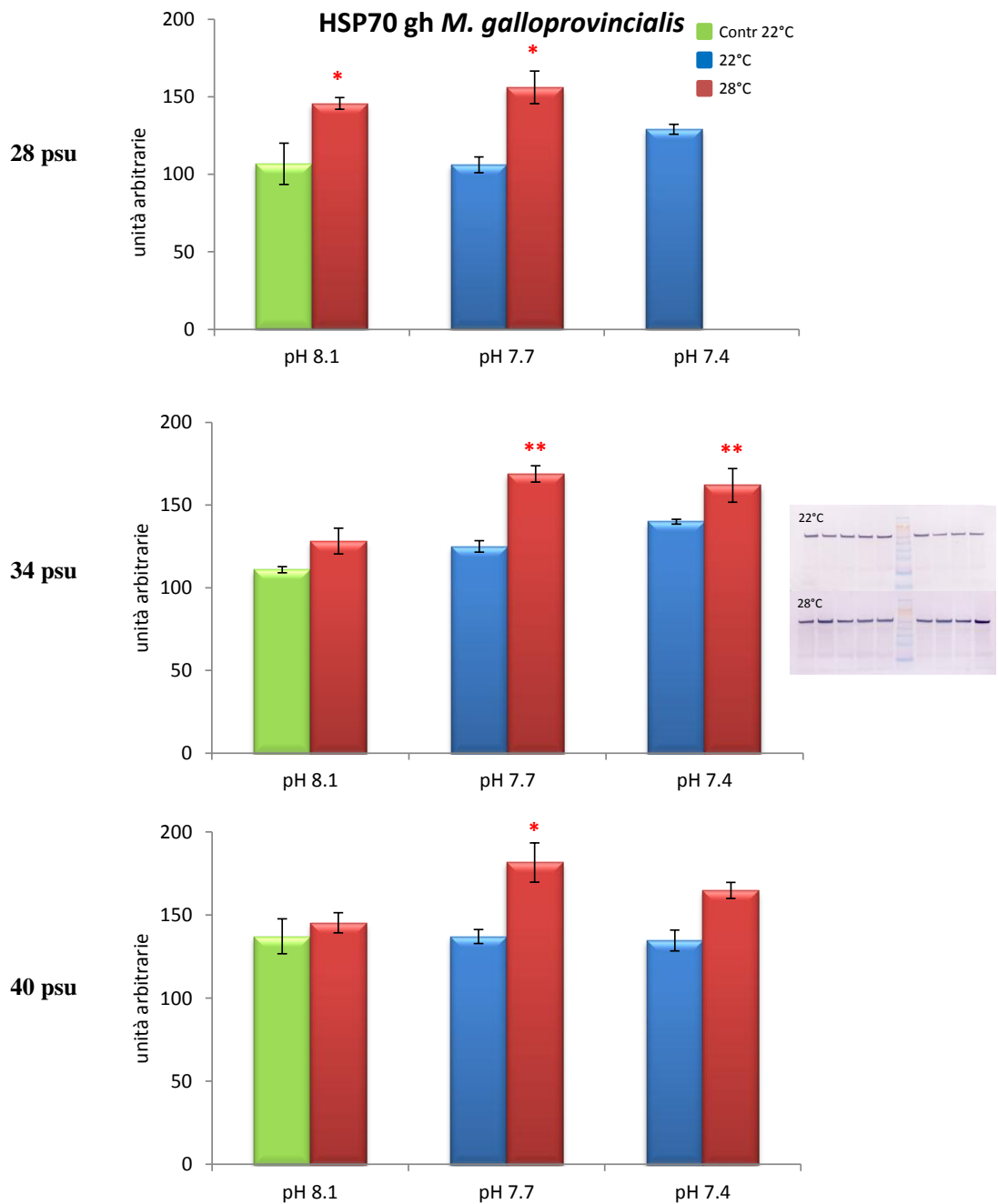


Figura 15 - Espressione delle HSP70 (media \pm e.s.) nella ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis*, dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). L'analisi densitometrica è stata espressa in unità arbitrarie. A 34 psu viene riportato un esempio di blot di campioni a 22° e 28°C. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 22°C): $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

4.1.1.3 Parametri immunologici

L'analisi PERMANOVA multivariata eseguita sui dati relativi a THC, NRU, e attività del lisozima ha mostrato che la salinità influenza significativamente i parametri immunologici, tranne che l'attività del lisozima (Tab. 5).

THC

L'analisi PERMANOVA univariata (Tab. 5) condotta sui risultati ottenuti alle singole salinità ha evidenziato che il THC è stato influenzato in modo significativo dalla temperatura sia alla salinità più bassa che a quella più alta, mentre l'effetto del pH risulta significativo sia a 28 psu, sia a 34 psu. A quest'ultima salinità, così come a 40 psu, è risultata significativa anche l'interazione tra pH e temperatura. A 28 psu (Fig. 16), nonostante a tutti i pH saggiati sia stato possibile rilevare un incremento dei valori misurati a 28°C rispetto a quelli a 22°C, tuttavia nessuna condizione è risultata statisticamente diversa dal controllo (pH 8.1 22°C). A 34 psu (Fig. 16) è stata evidenziata una riduzione significativa e molto marcata del THC in tutte le combinazioni sperimentali rispetto a quella di controllo che mostra il valore più alto (9.63×10^6 cell/ml). Il controllo è risultato statisticamente diverso dalle altre combinazioni sperimentali. A 40 psu (Fig. 16) il numero degli emociti è stato maggiore a pH 8.1 per poi diminuire progressivamente nelle condizioni di acidificazione. Rispetto al controllo, pH 8.1 22°C, il THC è risultato significativamente più basso a pH 7.4 22°C e in tutte le condizioni di acidificazione a 28°C.

NRU

L' NRU è stato influenzato significativamente dal pH, (Tab. 5) tranne che a 28 psu, e dall'interazione temperatura – pH a tutte le salinità. In particolare, a 28 psu (Fig. 16) si sono osservati valori molto simili a pH 8.1 e 7.7, mentre a pH 7.4 - 22°C è stata registrata una diminuzione significativa della risposta indagata rispetto al controllo. A 34 psu (Fig. 16) il pattern di variazione ha mostrato una diminuzione dell' NRU al diminuire del pH e all'aumentare della temperatura. Il valore di NRU trovato nel controllo (0.32 DO/ml emolinfa) è differito in modo statisticamente significativo da tutte le altre condizioni, eccetto pH 7.7 a 22°C. A 40 psu (Fig. 16), l' NRU è aumentato a pH 7.7 per poi ridursi a pH 7.4, anche se significativamente solo a 22°C, dove si è registrato il valore più basso (0.13 DO/ml emolinfa vs 0.20 DO/ml emolinfa a pH 8.1 22°C).

Lisozima

A 34 psu l'attività del lisozima non è stata statisticamente influenzata dalla temperatura e dal pH, né dalla loro interazione, mentre la temperatura e il pH hanno mostrato un effetto significativo a 28 psu (Tab. 5). A 40 psu (Tab. 5) invece è stato osservato un effetto significativo del pH e dalla sua interazione con la

temperatura. A 28 psu (Fig. 16) l'attività del lisozima è aumentata a 28°C ad eccezione di quanto osservato a pH 7.7, dove i valori sono simili. La differenza tra le temperature è maggiore a pH 7.4. Nessuna condizione è stata però statisticamente diversa dal controllo (pH 8.1 22°C). A 34 psu (Fig. 16), sebbene l'analisi PERMANOVA non ha evidenziato un effetto statisticamente significativo per nessuno dei fattori testati, è stato comunque possibile osservare un trend di aumento dell'attività del lisozima al diminuire del pH e all'aumentare della temperatura. A 40 psu (Fig. 16) l'attività del lisozima è stata massima a pH 8.1 28°C (2.20 mg lisozima/mg prot) per poi diminuire progressivamente nelle condizioni di acidificazione ad entrambe le temperature. Rispetto al controllo, tutte le condizioni sono state significativamente diverse ad eccezione delle due a pH 7.4.

Tabella 5 - Risultati dell'analisi PERMANOVA per il numero degli emociti circolanti (THC), saggio di assunzione del rosso neutro (NRU) e attività del lisozima, condotta sull'insieme dei dati delle tre sperimentazioni "Spe" e sui dati di ogni singola sperimentazione (28, 34, 40 psu) in *M. galloprovincialis*. Per ciascun parametro vengono riportati gli effetti delle variabili "S" salinità (28, 34, 40 psu), "T" temperatura (22°, 28°C) e "pH" (8.1, 7.7, 7.4), "T X pH" interazione temperatura e pH. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; p non significativo "ns".

		Spe	28 psu	34 psu	40 psu
		p	p	p	p
THC	S ***	T	*	ns	***
		pH	**	**	ns
		TxpH	ns	***	*
NRU	S ***	T	ns	ns	ns
		pH	ns	**	**
		TxpH	*	*	**
Lisozima	S ns	T	*	ns	ns
		pH	*	ns	*
		TxpH	ns	ns	**

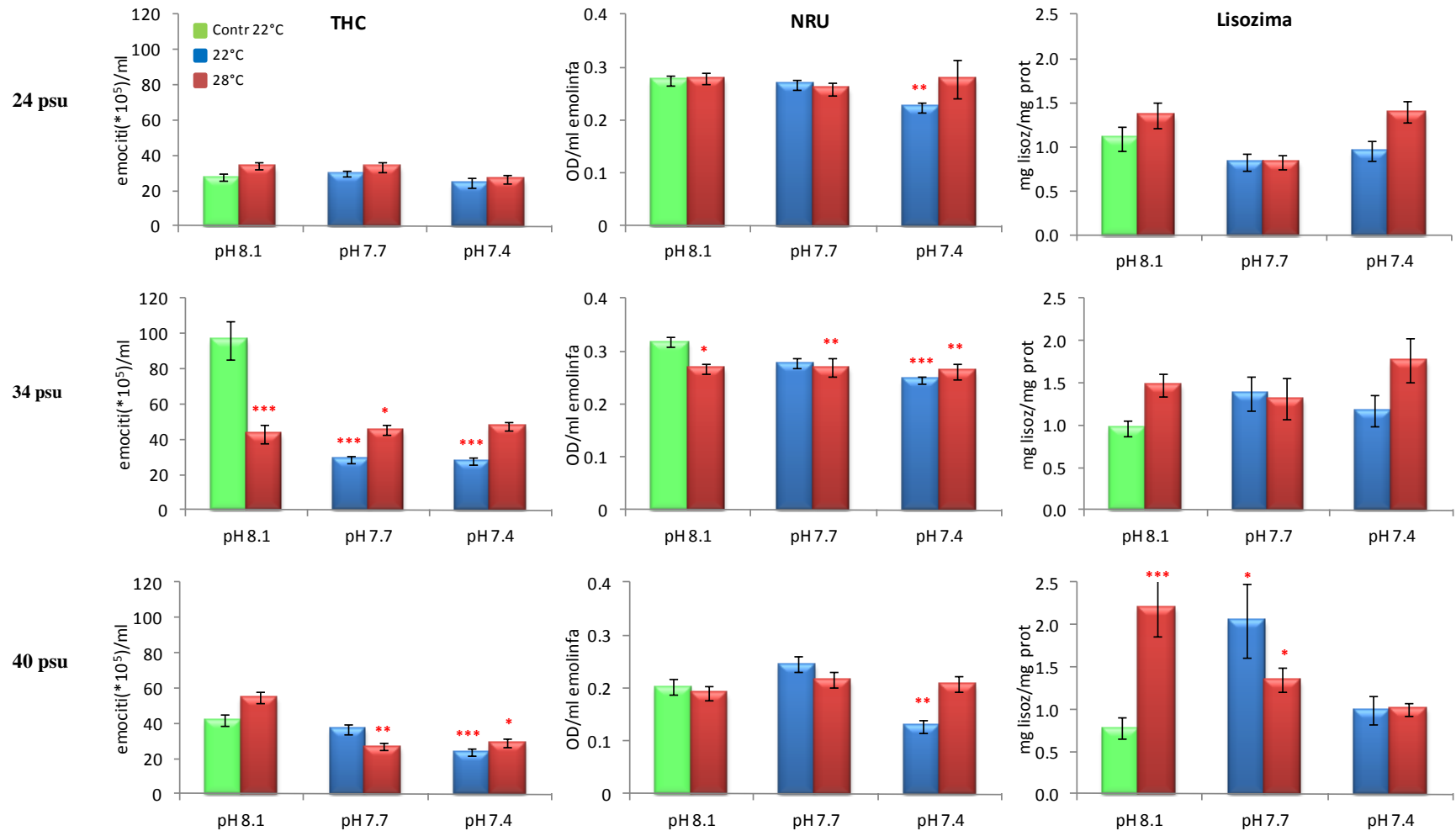


Figura 16 – Numero di emociti circolanti (THC), assunzione del Rosso Neutro (NRU), e attività del lisozima in *M. galloprovincialis* (media ± e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 22°C): $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

4.1.2 *Chamelea gallina*

4.1.2.1 Parametri fisiologici

L'analisi multivariata PERMANOVA ha evidenziato che in *C. gallina* tutti i parametri fisiologici (tasso di filtrazione, tasso di respirazione e tasso di escrezione) sono sempre stati significativamente influenzati dalla salinità (Tab. 6). Gli effetti di temperatura e pH e della loro interazione, indagati mediante PERMANOVA univariata alle tre diverse salinità, vengono riportati in seguito per ogni singolo tasso fisiologico.

Tasso di filtrazione

La filtrazione è risultata significativamente influenzata dal pH a 34 e a 40 psu, e dalla temperatura a 34 psu (Tab. 6). L'analisi del pattern di variazione del parametro ed i confronti a coppie effettuati con il test di Kruskal-Wallis ha evidenziato a 34 psu (Fig. 17) una diminuzione del tasso di filtrazione con la riduzione del pH, ma anche con l'aumento della temperatura, infatti per ogni condizione i valori a 28°C sono stati sempre più bassi rispetto a quelli a 22°C (Fig. 17). Rispetto al controllo pH 8.1 22°C (2.76 l/h), tutte le condizioni a pH più acido sono state statisticamente diverse e con valori più bassi (minimo a pH 7.4 28°C: 0.76 l/h). A 40 psu (Fig. 17) il tasso di filtrazione, come nella sperimentazione a 34 psu, è diminuito con la riduzione del pH. Rispetto al controllo pH 8.1 22°C (0.78 l/h), solamente i valori misurati a pH 7.4 sono stati statisticamente diversi e più bassi (22°C: 0.34 l/h; 28°C: 0.28 l/h). A 28 psu (Fig. 17) il pattern di variazione del tasso di filtrazione è stato simile a quello riscontrato alle altre due salinità, anche se la diminuzione rispetto al controllo è stata meno marcata.

Tasso di respirazione

Il tasso di respirazione è risultato significativamente influenzato dalla temperatura e dal pH solo a 34 psu (Tab. 6). In particolare, a 34 psu (Fig. 17) il tasso di respirazione è aumentato in funzione della temperatura, mentre ha mostrato una diminuzione, anche se non significativa a 22°C pH 7.4. Rispetto al controllo, tutte le condizioni a 28°C sono state statisticamente diverse. L'aumento maggiore si è registrato a pH 7.7 (12.89 $\mu\text{molO}_2/\text{h}$). A 28 e 40 psu (Fig. 17) i tassi di respirazione hanno mostrato lo stesso pattern di risposta, ovvero si è assistito ad un aumento in funzione della temperatura (28°C); valori più alti di quelli dei controlli sono stati registrati anche a 22°C a pH 7.4.

Tasso di escrezione

40 psu è stata l'unica salinità alla quale è stato possibile rilevare un effetto significativo sul tasso di escrezione, causato esclusivamente dal pH (Tab. 6). Dal

pattern di variazione del parametro e dai confronti a coppie con il test di K-W è risultato che a 40 psu (Fig. 17) il tasso di escrezione è aumentato a 28°C a tutti i pH saggiati, un analogo progressivo aumento si è osservato a 22°C con l'aumentare del pH. Rispetto al controllo (0.05 µgat N-NH₃/l/gr) i valori ottenuti ad entrambe le temperature a pH 7.4 sono stati statisticamente diversi e sono stati i più alti registrati nella sperimentazione (22°C: 0.13 µgat N-NH₃/l/gr; 28°C: 0.14 µgat N-NH₃/l/gr). Invece, sia a 28 che a 34 psu il pattern di variazione dell'escrezione ha mostrato un andamento decrescente in funzione del pH e della temperatura (Fig. 17).

Test di sopravvivenza in aria - LT₅₀

Come per *M. galloprovincialis*, anche per *C. gallina* è stato effettuato il confronto dei *p-value* dell'ANOVA di Kruskal-Wallis tramite il test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti. La salinità è risultata influenzare significativamente il valore di LT₅₀ (Tab. 7). 34 psu e 28 psu sono risultate le condizioni con una sopravvivenza maggiore (LT₅₀ di 6 giorni) rispetto a 40 psu (LT₅₀ di 4 giorni). Confrontando la risposta ottenuta alle diverse combinazioni di temperatura e pH ad ogni salinità, rispetto al controllo, nessun confronto è risultato significativamente diverso (Tab. 7).

Tabella 6 - Risultati dell'analisi PERMANOVA per il tasso di filtrazione, di respirazione ed escrezione, condotta sull'insieme dei dati delle tre sperimentazioni "Spe" e sui dati di ogni singola sperimentazione (28, 34, 40 psu) in *C. gallina*. Per ciascun parametro vengono riportati gli effetti delle variabili "S" salinità (28, 34, 40 psu), "T" temperatura (22°, 28°C) e "pH" (8.1, 7.7, 7.4), "T X pH" interazione temperatura e pH. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); p non significativo "ns".

		Spe	28 psu	34 psu	40 psu
		p	p	p	p
Filtrazione	S **	T	ns	*	ns
		pH	ns	**	**
		TxpH	ns	ns	ns
Respirazione	S *	T	ns	**	ns
		pH	ns	**	ns
		TxpH	ns	ns	ns
Escrezione	S **	T	ns	ns	ns
		pH	ns	ns	**
		TxpH	ns	ns	ns

Tabella 7 - Risultati dell'analisi statistica per il valore di LT_{50} in *C. gallina*. A) Risultati del test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti effettuato tra le tre sperimentazioni (Spe). B) Risultati dell'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis a 28, 34, 40 psu. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); p non significativo "ns".

		A	B		
		Spe	28 psu	34 psu	40 psu
		p	p	p	p
LT_{50}	*		ns	ns	ns

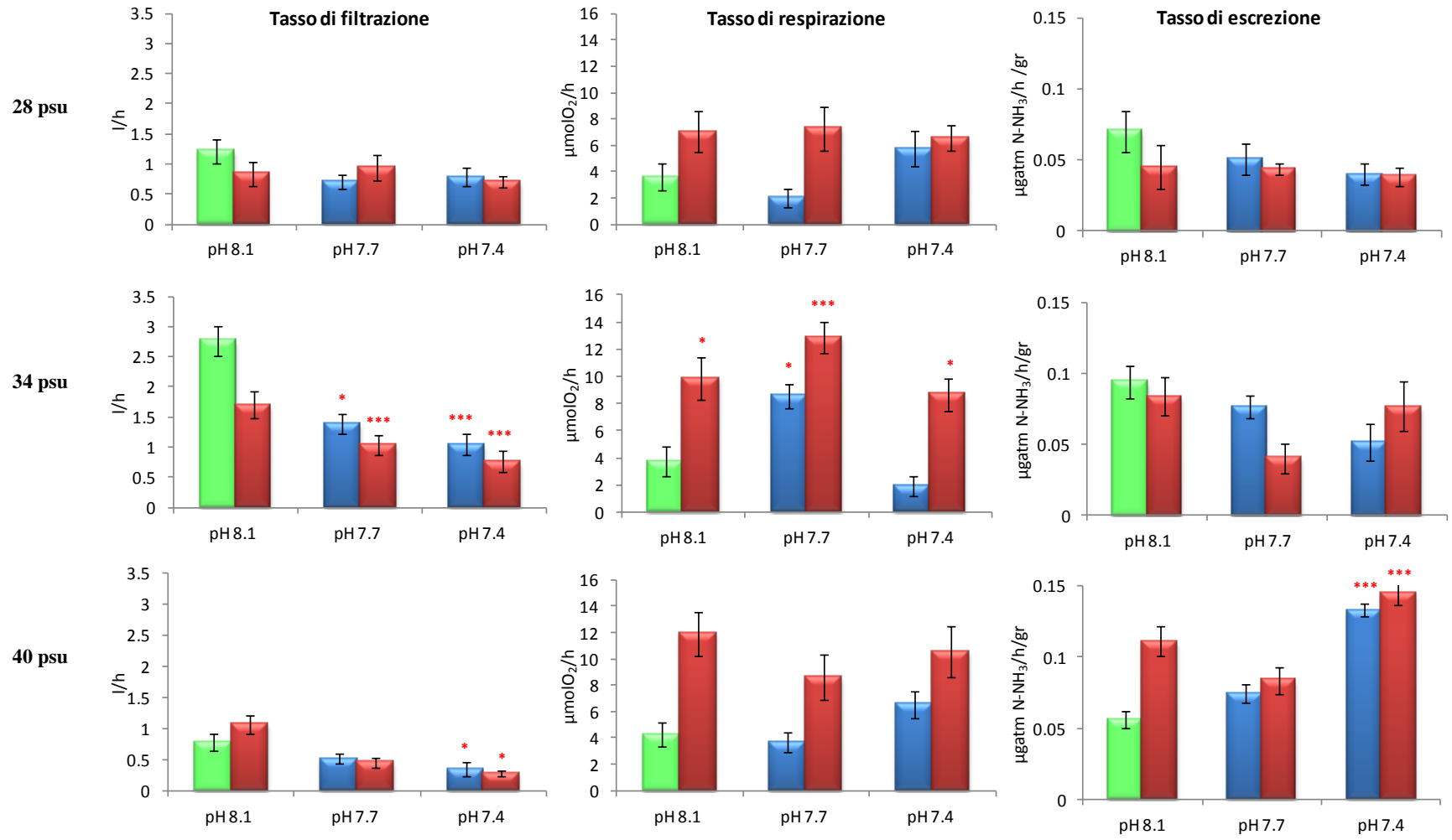


Figura 17 – Tasso di filtrazione, tasso di respirazione e tasso di escrezione in *C. gallina*, (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 22°C): $p < 0.05$ (*); $p < 0.001$ (***)

4.1.2.2 Parametri biochimici

Le risposte biochimiche, SOD, CAT, GST, TBARS sono state valutate come nel mitilo. La numerosità dei campioni per condizione sperimentale infatti non ha permesso di ottenere un numero di permutazioni adeguato per un'applicazione della PERMANOVA. E' stato effettuato quindi il confronto dei *p-value* dell'ANOVA di Kruskal-Wallis tramite il test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti.

La salinità ha avuto un effetto significativo a livello branchiale sulla CAT ed il TBARS, mentre al livello della ghiandola digestiva solo sul TBARS (Tab. 8).

A 28 psu nelle branchie (Tab. 8), solo per l'attività della SOD, l'ANOVA di Kruskal-Wallis è risultata statisticamente significativa, mostrando un unico picco di induzione a pH 7,7 22°C (Fig. 18), quest'ultimo statisticamente diverso dal controllo. L'attività di CAT e GST sebbene non siano state statisticamente diverse tra le condizioni saggiate hanno mostrato un comune pattern di induzione legato alla temperatura. Il TBARS invece è diminuito in tutte le condizioni di pH a 28°C. Nella ghiandola digestiva per nessun parametro l'ANOVA di Kruskal-Wallis è risultata statisticamente significativa (Tab. 8). E' stato comunque possibile individuare alcuni pattern di risposta specifici. Se la CAT non ha mostrato nessuna variazione, la SOD ed il GST hanno subito un incremento in funzione del pH e della temperatura, mentre il TBARS ha presentato lo stesso andamento riscontrato nella branchia (Fig. 19).

A 34 psu nelle branchie solo il GST ed il TBARS sono risultati statisticamente influenzati dal pH e dalla temperatura (Tab. 8).

Il GST seppur non mostrando nessun confronto statisticamente significativo rispetto al controllo, ha evidenziato un picco a pH 7.7 22°C (Fig. 18). Il TBARS invece ha mostrato un pattern di variazione più specifico, con una riduzione significativa rispetto al controllo a 28°C per tutti i pH. L'attività della CAT, anche se con variazioni modeste, ha mostrato un'induzione rispetto all'acidificazione ma solo a 22°C, al contrario la SOD è stata indotta alla temperatura più alta.

A 34 psu nella ghiandola digestiva, solo la SOD è risultata statisticamente influenzata dai parametri testati, anche se non è stato trovato nessun confronto statisticamente significativo rispetto al controllo (Fig. 19). Il valore più alto di attività è stato registrato alla condizione più estrema (pH 7.4 28°C). La CAT è stata indotta a 28°C, ma solo a pH 8.1 e 7.7; a 22°C l'attività ha avuto un andamento crescente al diminuire del pH. Per il GST non sono stati evidenziati particolari pattern di induzione o depressione legati alle condizioni di acidificazione e di temperatura. Per il TBARS invece si è osservato a 28°C un progressivo aumento dei valori al diminuire del pH (Fig. 19).

A 40 psu, nelle branchie (Tab. 8) solo per il TBARS, l'ANOVA di Kruskal-Wallis è risultata statisticamente significativa, mostrando un'influenza del pH e della temperatura. Per la CAT e la SOD si è osservato un tendenziale aumento di

attività a 28°C, mentre un trend opposto è stato rilevato per il GST (Fig. 18). A 40 psu, nella ghiandola digestiva (Fig. 19) i livelli di TBARS sono risultati significativamente diversi alle condizioni sperimentali saggiate. Il TBARS ha mostrato una riduzione in tutte le condizioni a 28°C rispetto a 22°C, e il confronto rispetto al controllo è risultato statisticamente significativo a pH 8.1 28°C. La CAT, significativamente influenzata dai fattori testati, ha mostrato un progressivo aumento della propria attività con l'aumento dell'acidificazione e della temperatura. Come nella banchia, l'attività della SOD è aumentata alla temperatura più alta, mentre quella del GST è diminuita. Rispetto al controllo, tutte le altre combinazioni hanno mostrato valori di GST più bassi (Fig. 19).

Espressione HSP70 nell'epatopancreas

Come per *M. galloprovincialis*, per valutare l'effetto della salinità sull'espressione delle HSP70 è stato effettuato il confronto dei *p-value* dell'ANOVA di Kruskal-Wallis tramite il test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti. La salinità ha influenzato significativamente l'espressione delle HSP70 (Tab. 9).

A 28 psu (Tab. 9) le HSP70 hanno subito una variazione significativa rispetto ai parametri testati. In particolare, l'aumento della temperatura ha comportato una riduzione dei livelli delle HSP70 a tutti i pH saggiati ed in modo significativo a pH 8.1 e 7.7 (Fig. 20).

A 34 e 40 psu le variazioni dei livelli delle HSP70 non sono state significative (Tab. 9). Nonostante questo è stato possibile valutare a 34 psu a 22°C una progressiva diminuzione in funzione del pH. Al contrario a 28°C, l'espressione delle HSP70 sono aumentate in funzione della diminuzione del pH (Fig. 20). A 40 psu i livelli delle HSP70 nella ghiandola digestiva sono risultati simili a tutte le condizioni sperimentali saggiate, senza differire in modo significativo dalla condizione di controllo (Fig. 20).

Tabella 8 - Risultati dell'analisi statistica per i saggi biochimici di *C. gallina* in "BR" branchia, "GH" ghiandola digestiva per l'attività della SOD, attività della CAT del GST, e perossidazione lipidica (TBARS). A) Risultati del test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti effettuato tra le tre sperimentazioni "Spe"; B) Risultati dell'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis a 28, 34, 40 psu. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); p non significativo "ns".

		A	B		
		Spe	28 psu	34 psu	40 psu
		p	p	p	p
BR	SOD	ns	*	ns	ns
	CAT	*	ns	ns	ns
	GST	ns	ns	*	ns
	TBARS	*	ns	*	*
GH	SOD	ns	ns	*	ns
	CAT	ns	*	ns	*
	GST	ns	ns	ns	ns
	TBARS	**	ns	ns	*

Tabella 9 - Risultati dell'analisi statistica per l'espressione delle HSP70 nella ghiandola digestiva di *C. gallina*. A) Risultati del test delle combinazioni di Fisher per test indipendenti effettuato tra le tre sperimentazioni "Spe"; B) Risultati dell'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis a 28, 34, 40 psu. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); p non significativo "ns".

		A	B		
		Spe	28 psu	34 psu	40 psu
		p	p	p	p
HSP70		*	**	ns	ns

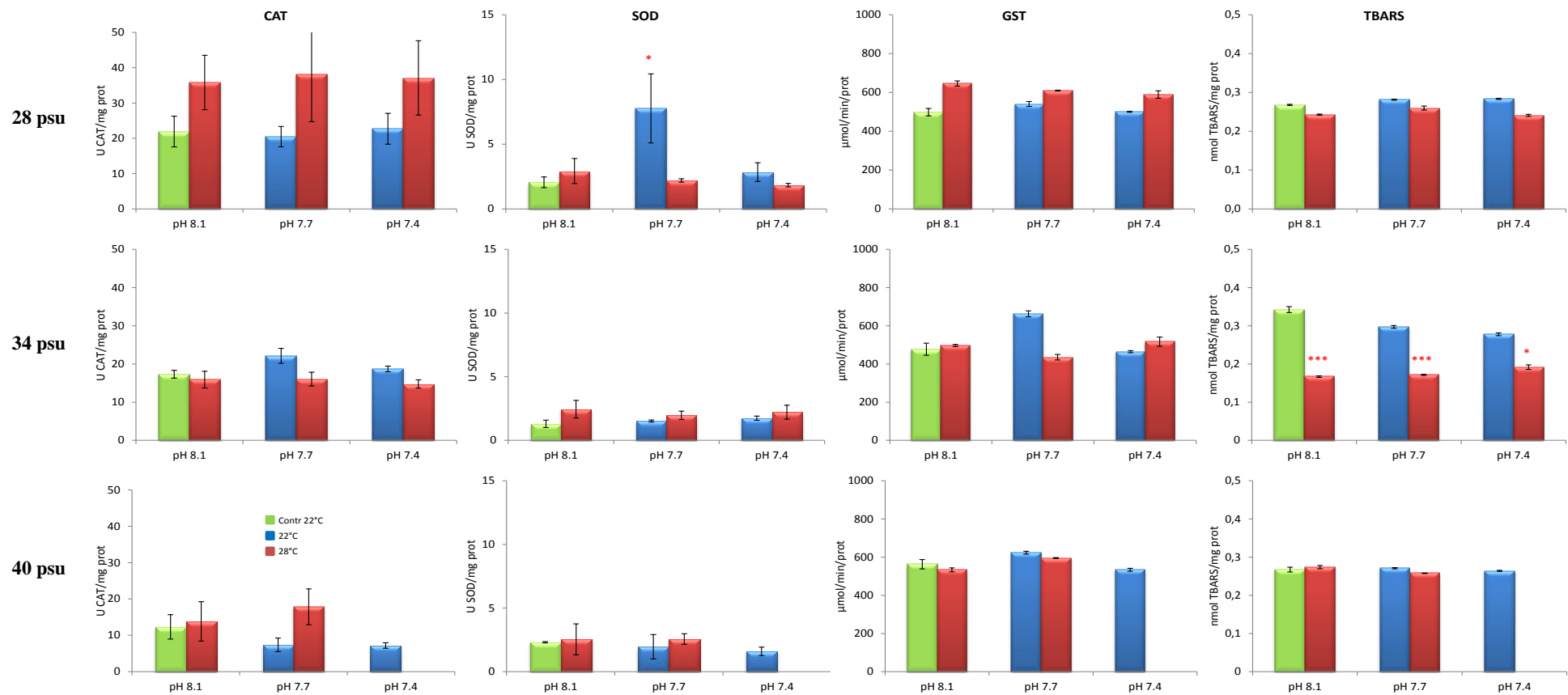


Figura 18 – Attività della catalasi (CAT), attività della superossido dismutasi (SOD), attività della glutazione solfo-transferasi “GST” e perossidazione lipidica (TBARS) nelle branchie di *C. gallina* (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 22°C): $p < 0.05$ (*); $p < 0.001$ (***)

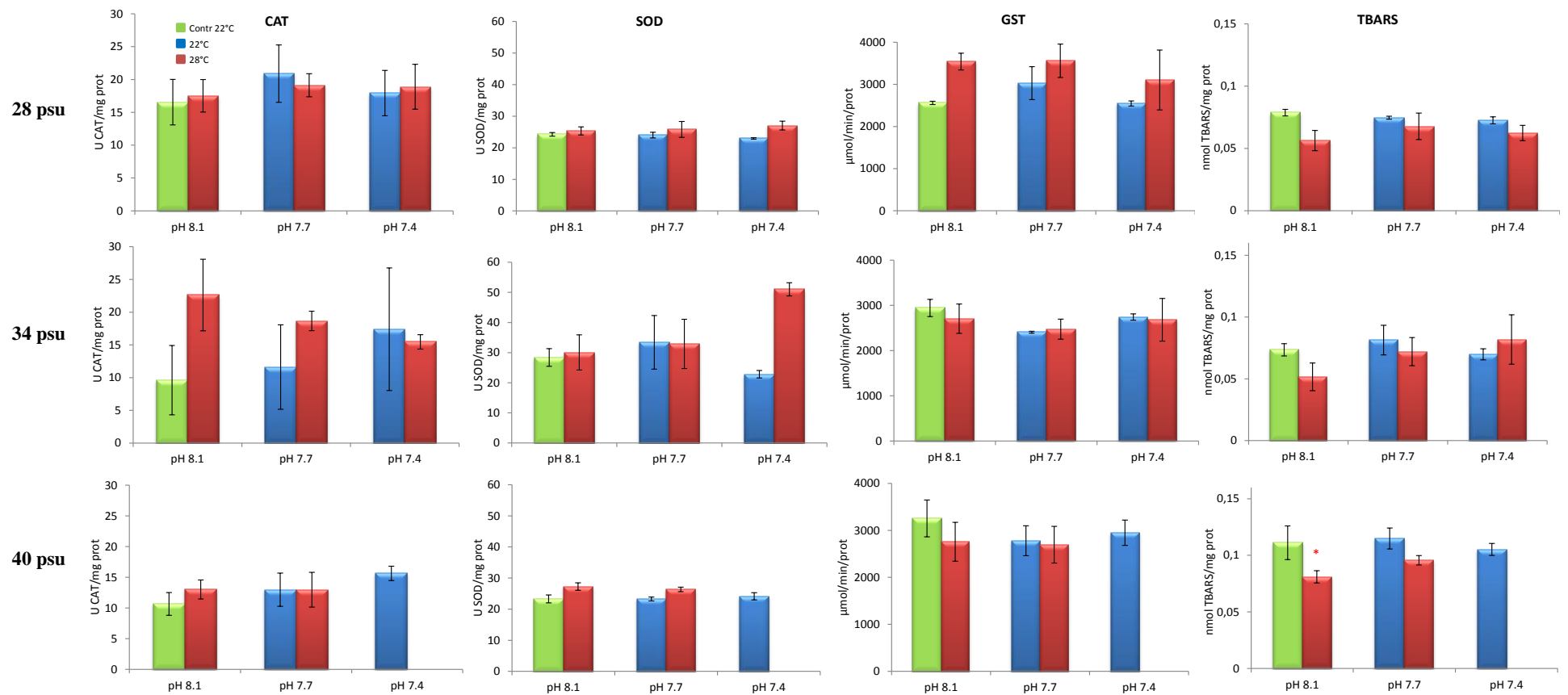


Figura 19 – Attività della catalasi (CAT), attività della superossido dismutasi (SOD), attività della glutazione solfo-transferasi “GST” e perossidazione lipidica (TBARS) nella ghiandola digestiva di *C. gallina* (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 22°C): $p < 0.05$ (*).

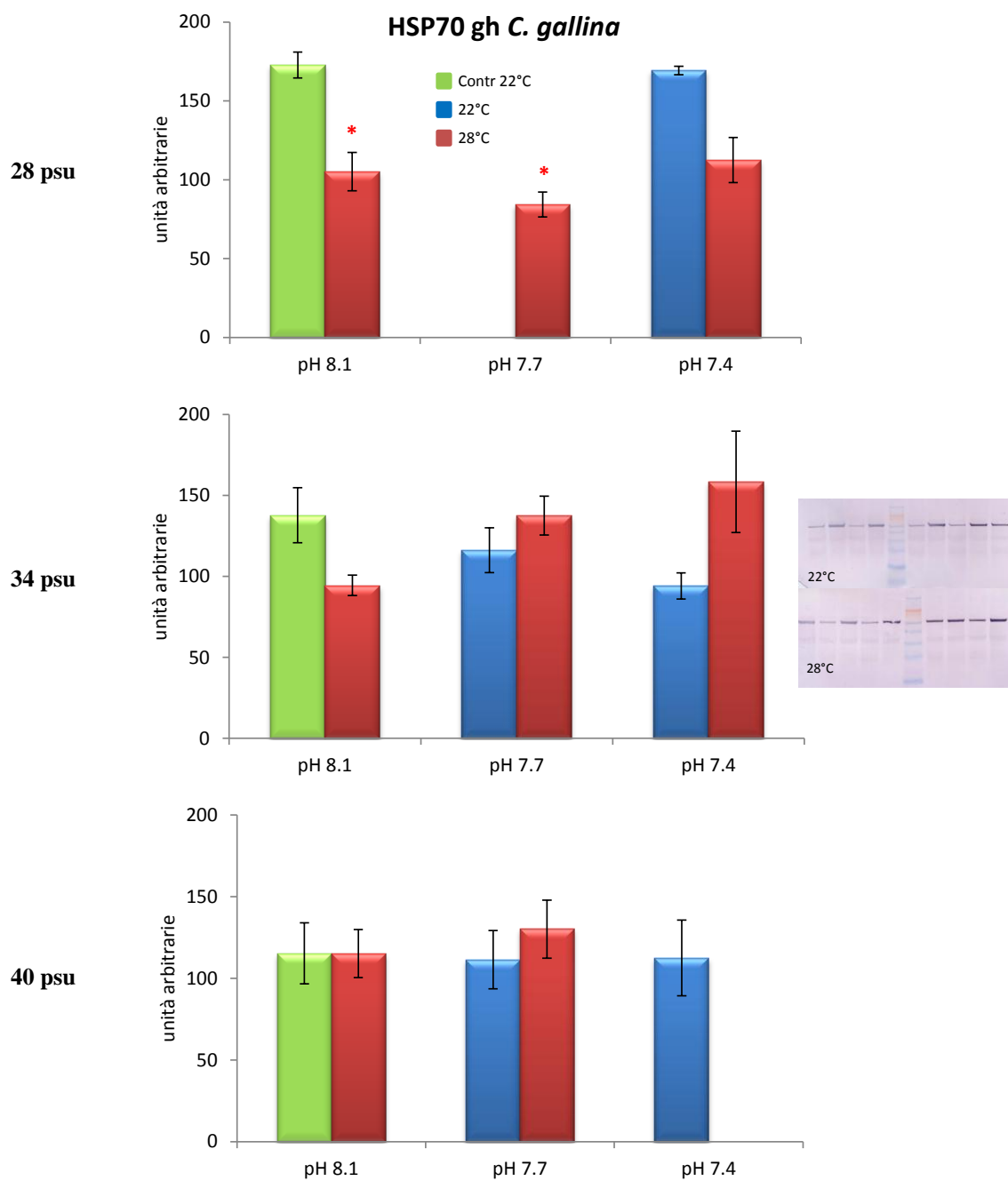


Figura 20 - Espressione delle HSP70 (media \pm e.s.) nella ghiandola digestiva di *C. gallina*, dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). L'analisi densitometrica è stata espressa in unità arbitrarie. A 34 psu viene riportato un esempio di blot di campioni a 22° e 28°C. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 22°C): $p < 0.05$ (*).

4.1.2.3 Parametri immunologici

L'analisi PERMANOVA multivariata (Tab. 10), condotta sull'intero set di risultati relativi ai parametri immunologici di *C. gallina*, ha evidenziato che la salinità influenza significativamente la risposta di NRU e l'attività di lisozima, ma non il THC. L'influenza di temperatura e pH, indagata per ogni salinità mediante PERMANOVA univariata, viene riportata in seguito, per i tre immunomaker valutati.

THC

Il THC è stato influenzato significativamente dalla temperatura in tutte e tre le salinità, mentre l'effetto significativo del pH e quello dell'interazione tra i due fattori sono stati rilevati rispettivamente a 28 e 40 psu e a 28 e 34 psu (Tab. 10). Il pattern di variazione dei parametri ed i confronti a coppie effettuati con il test di K-W evidenziano che a 28 psu (Fig. 21) il numero di emociti ha subito una variazione in funzione del pH e della temperatura. A 22°C si è osservata una progressiva diminuzione del THC fino al valore significativamente più basso registrato a pH 7.4 (11.43×10^6 cell/ml). A 28°C i valori del THC sono stati tutti più bassi rispetto a quelli misurati a 22°C allo stesso pH e sempre significativamente diversi dal controllo. A 34 psu il THC (Fig. 21) ha presentato trend di variazione meno costanti al variare di temperatura e pH. A 22°C è stato osservato un significativo aumento del numero degli emociti in condizioni di massima acidificazione (19.75×10^6 cell/ml). A 28°C i valori sono aumentati in modo significativo a pH 8.1 e 7.7, per poi diminuire a pH 7.4, unica condizione di questa temperatura che non è stata significativamente diversa dal controllo. A 40 psu (Fig. 21), il THC a 22°C è stato sempre maggiore di quello a 28°C. Rispetto al controllo, le uniche condizioni statisticamente diverse sono state quelle a pH 8.1 28°C (7.3×10^6 cell/ml) dove si è registrato un significativo calo, e a pH 7.7 22°C (27.05×10^6 cell/ml), dove si è osservato un significativo incremento.

NRU

Per l'NRU, la PERMANOVA univariata ha riportato il maggior numero di effetti significativi tra tutti i parametri immunologici testati (Tab. 10). L'unica assenza di significatività è stata quella relativa all'interazione temperatura-pH a 40psu. A 28 psu (Fig. 21) tutte le condizioni sperimentali hanno fatto registrare una risposta significativamente maggiore rispetto al controllo. In particolare, a 22°C NRU ha subito un forte incremento al diminuire del pH, mentre a 28°C si è assistito ad un calo al diminuire del pH. A 34 psu (Fig. 21) l'NRU ha avuto un incremento in funzione dell'aumento della temperatura e della diminuzione del pH. Rispetto al controllo (pH 8.1 22°C 0.02 DO/ml emolinfa) la risposta è stata significativamente più alta a pH 7.7 28°C, e a pH 7.4 in entrambe le temperature, con un massimo a 28°C (0.08 DO/ml emolinfa). A 40 psu (Fig. 21), diversamente

dalle altre salinità, l'NRU è diminuito progressivamente sia in funzione della temperatura e sia del pH, con un valore massimo raggiunto nella condizione di controllo (0.07 DO/ml emolinfa) ed un minimo a pH 7.4 22°C (0.02 DO/ml emolinfa).

Lisozima

L'attività del lisozima non è stata influenzata dalla temperatura in tutte la salinità, mentre è risultato significativo l'effetto del pH a 28 psu e dell'interazione temperatura - pH a 28 e a 34 psu (Tab. 10). In particolare, a 28 psu (Fig. 21) l'attività del lisozima è aumentata significativamente rispetto al controllo (1.64 mg lisozima/mg prot) a pH 8.1 28°C (valore massimo 2.46 mg lisozima/mg prot), mentre è diminuita significativamente a pH 7.7 28°C. A 34 psu (Fig. 21), l'attività enzimatica ha mostrato esattamente lo stesso pattern di variazione osservato a 28 psu, con valori significativamente maggiori del controllo a pH 8.1 28°C e a pH 7.7 22°C. A 40 psu (Fig. 21) l'attività del lisozima non è variata tra pH 8.1 e pH 7.7 a 22°C, mentre ha subito una diminuzione a pH 7.7 28°C e a pH 7.4 22°C.

Tabella 10 - Risultati dell'analisi PERMANOVA per il numero degli emociti circolanti (THC), saggio di assunzione del rosso neutro (NRU) e attività del lisozima, condotta sull'insieme dei dati delle tre sperimentazioni "Spe" e sui dati di ogni singola sperimentazione (28, 34, 40 psu) in *C. gallina*. Per ciascun parametro vengono riportati gli effetti delle variabili "S" salinità (28, 34, 40 psu), "T" temperatura (22°, 28°C) e "pH" (8.1, 7.7, 7.4), "T X pH" interazione temperatura e pH. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; p non significativo "ns"

			Spe	28 psu	34 psu	40 psu
			p	p	p	p
THC	S	ns	T	***	*	**
			pH	**	ns	*
			TxpH	*	***	ns
NRU	S	*	T	**	*	***
			pH	***	***	**
			TxpH	***	**	ns
Lisozima	S	***	T	ns	ns	ns
			pH	***	ns	ns
			TxpH	***	**	ns

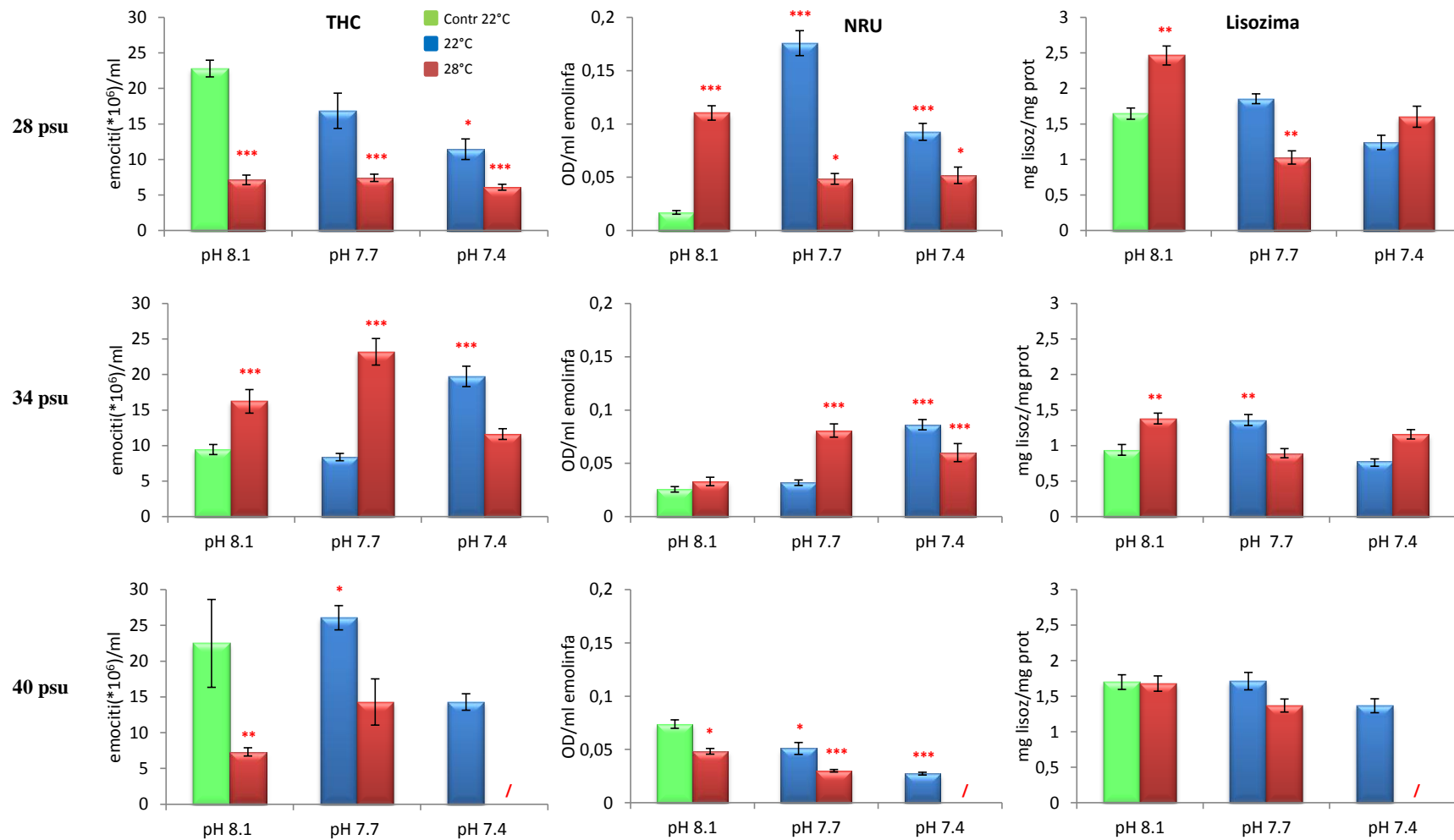


Figura 21 – Numero di emociti circolanti (THC), assunzione del Rosso Neutro (NRU), e attività del lisozima in *C. gallina* (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a differenti valori di salinità (28, 34, 40 psu), temperatura (22°, 28°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 22°C colonna verde): $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***).

4.1.3 *Mimachlamys varia*

4.1.3.1 Parametri fisiologici

L'analisi PERMANOVA eseguita sui dati dei tassi di filtrazione, respirazione ed escrezione ha evidenziato che in questa specie la filtrazione e l'escrezione sono state significativamente influenzate sia dalla temperatura che dal pH, la respirazione dal pH soltanto (Tab. 11). Di seguito si riportano in dettaglio i risultati per i singoli parametri sulla base del loro pattern di variazione e dei confronti a coppie effettuati con il test di Kruskal-Wallis tra la condizione di controllo (pH 8.1-18°C) e le altre combinazioni di temperatura e pH.

Il tasso di filtrazione (Fig. 22) è stato maggiore nella condizione di controllo a pH 8.1 18°C (1.5 l/h/gr) e ha mostrato alla stessa temperatura una progressiva diminuzione all'aumentare dell'acidificazione. A tutti i valori di pH saggiati la temperatura elevata ha comportato una fortissima depressione del tasso. Tutti i confronti sono risultati statisticamente diversi dal controllo ad eccezione della condizione a pH 7.7 18°C.

Il tasso di respirazione è rimasto pressoché costante a 18°C anche in condizione di acidificazione (Fig. 22). A 26°C si è assistito ad un incremento della respirazione, con un massimo a pH 8.1 (38.02 $\mu\text{molO}_2/\text{h/gr}$) statisticamente diverso dal controllo (8.56 $\mu\text{molO}_2/\text{h/gr}$) e una progressiva diminuzione all'aumentare dell'acidificazione, fino al valore più basso registrato a pH 7.4 26°C (10.62 $\mu\text{molO}_2/\text{h/gr}$) anch'esso statisticamente diverso dal controllo.

A tutti i pH saggiati, il tasso di escrezione a 18°C è stato più basso rispetto a quello misurato a 26°C (Fig. 22). I confronti statistici rispetto al controllo (pH 8.1 18°C) hanno indicato che vi è stato un incremento significativo solo a pH 8.1 26°C (13.33 $\mu\text{gat N-NH}_3/\text{l/gr}$) ed a pH 7.4 26°C (11.79 $\mu\text{gat N-NH}_3/\text{l/gr}$) ().

Tabella 11 - Risultati dell'analisi PERMANOVA in *M. varia* per il tasso di filtrazione, di respirazione ed escrezione. Per ciascun parametro vengono riportati gli effetti "T" temperatura (18°, 26°C), "pH" (8.1, 7.7, 7.4), "T X pH" interazione temperatura e pH. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); p non significativo "ns".

	Filtrazione	Respirazione	Escrezione
	p	p	p
T	**	ns	**
pH	*	**	**
TxpH	ns	ns	ns

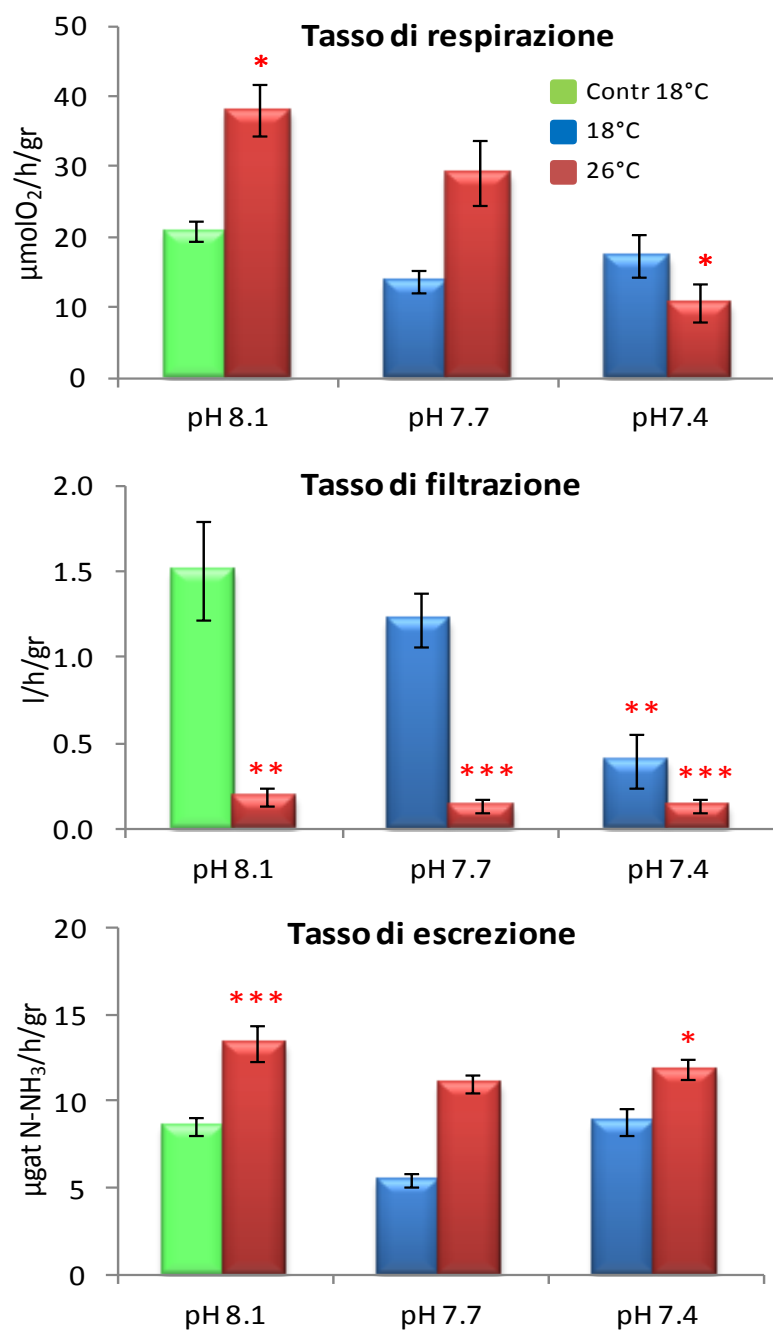


Figura 22 – Tasso di filtrazione, tasso di respirazione e tasso di escrezione in *M. varia*, (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a 34 psu a differenti valori di temperatura (18°, 26°C), pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 18°C): $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

4.1.3.2 Parametri biochimici

L'ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti solo per l'attività della SOD nel tessuto branchiale (Tab. 12), che è aumentata al diminuire del pH e all'aumentare della temperatura (Fig. 23). Il valore registrato a pH 7.4 26°C (3.80 U SOD/mg prot) è statisticamente diverso da quello del controllo, pH 8.1 18°C (3.19 U SOD/mg prot). Nella ghiandola digestiva si è potuto osservare un andamento analogo dell'attività al variare delle condizioni sperimentali (Fig. 23).

Nelle branchie, tranne che a pH 7.7, l'attività della CAT è risultata più bassa a 26 che a 18°C; lo stesso pattern di variazione si è confermato a tutti e tre i pH saggiati nella ghiandola digestiva. In questo tessuto i valori più bassi di attività della CAT vengono misurati a pH 7.4 (Fig. 23).

Tabella 12 - Risultati dell'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis per l'attività della SOD, attività della CAT di *M. varia* in "br" branchia, "gh" ghiandola digestiva. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); p non significativo "ns".

SOD br	SOD gh	CAT br	CAT gh
<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
*	ns	ns	ns

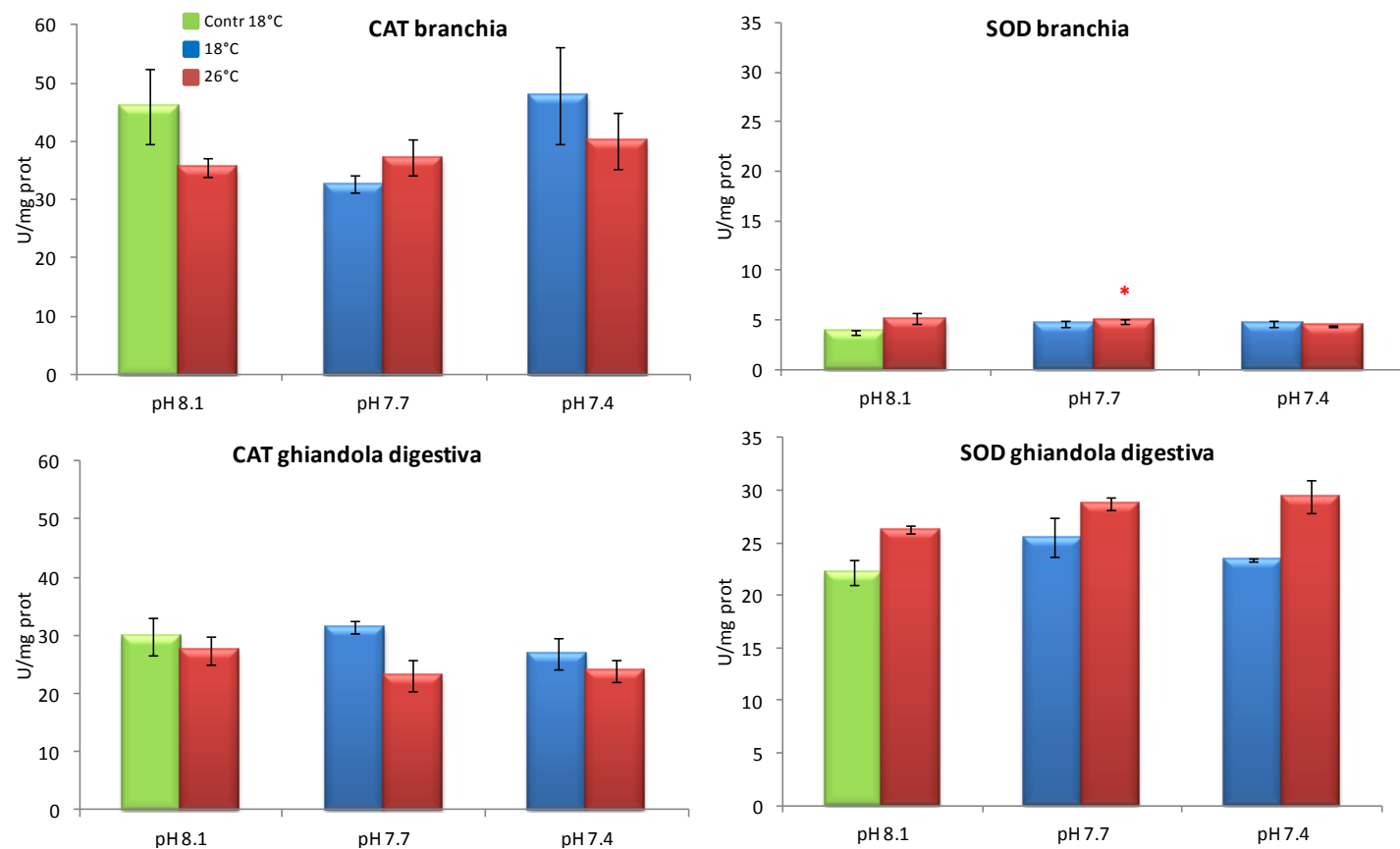


Figura 23 – Attività della catalasi (CAT), attività della superossido dismutasi (SOD) nelle branchie di *M. varia* (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a 34 psu a differenti valori di pH (8.1, 7.7, 7.4), temperatura (18°, 26°C). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 18°C): $p < 0.05$ (*).

4.1.3.3 Parametri immunologici

Nella sperimentazione su *M. varia* sono stati valutati solo gli effetti della temperatura e del pH. La PERMANOVA è stata eseguita sui dati di THC, NRU e attività del lisozima. Solo la temperatura ha mostrato un effetto significativo sugli indici immunologici, tranne che nel caso dell'NRU (Tab. 13).

L'analisi del pattern di variazione ed i confronti a coppie effettuati con il test di Kruskal-Wallis hanno evidenziato che i valori di THC sono stati maggiori nella condizione di controllo pH 8.1 18°C (3.8×10^6 cell/ml) e nel trattamento a pH 7.7 18°C (4×10^6 cell/ml). Eccetto che a pH 7.4, dove i valori sono simili alle due temperature, il THC è diminuito all'aumentare della temperatura, in maniera statisticamente significativa a pH 8.1 26°C (Fig. 24).

Per l'NRU (Fig. 24) è possibile rilevare a 18°C un pattern di diminuzione all'aumentare dell'acidificazione. L'aumento di temperatura ha comportato una riduzione del valore dell'NRU, tranne che a pH 7.4, dove si è osservato invece un incremento.

L'attività del lisozima (Fig. 24) ha mostrato un chiaro pattern di risposta in funzione della temperatura ed è sempre stata significativamente più elevata a 26°C rispetto a 18°C con un massimo a pH 8.1 (9.06 mg lisozima/mg prot).

Tabella 13 - Risultati dell'analisi PERMANOVA in *M. varia* per il numero degli emociti circolanti (THC), saggio di assunzione del rosso neutro (NRU) e attività del lisozima. Per ciascun parametro vengono riportati gli effetti "T" temperatura (18°, 26°C), "pH" (8.1, 7.7, 7.4), "T X pH" interazione temperatura e pH. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

	THC	NRU	Lisozima
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
T	*	ns	**
pH	ns	ns	ns
TxpH	ns	ns	ns

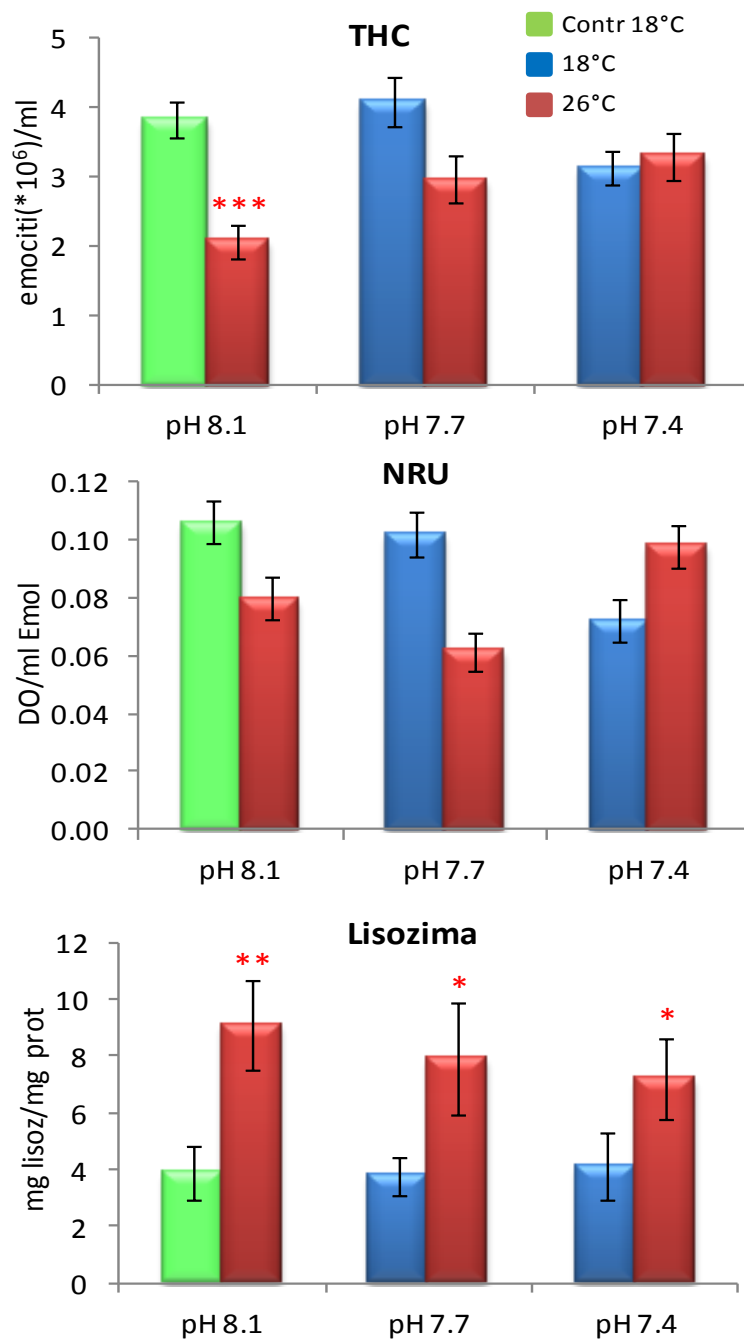


Figura 24 – Numero di emociti circolanti (THC), assunzione del Rosso Neutro (NRU), e attività del lisozima in *M. varia* (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a 34 psu a differenti valori di temperatura (18°, 26°C), pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 18°C colonna verde): $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

4.1.4 *Callista chione*

4.1.4.1 Parametri fisiologici

A causa della ridotta numerosità delle repliche per condizione sperimentale, per i parametri fisiologici non è stato possibile effettuare l'analisi PERMANOVA e si è quindi proceduto ad una ANOVA non parametrica con il test di Kruskal-Wallis.

Tutti e tre i tassi fisiologici sono risultati significativamente diversi nelle diverse combinazioni sperimentali saggiate (Tab. 14); i risultati dei confronti a coppie (post-hoc di Kruskal-Wallis) tra la condizione di controllo (pH 8.1, 16°C) e le altre condizioni sono riportati di seguito per ogni singolo parametro.

Il tasso di filtrazione (Fig. 25) è stato sempre maggiore a 22°C rispetto a 16°C. Ad entrambe le temperature il valore massimo è raggiunto a pH 7.4, con una differenza significativa rispetto al controllo (0.38 l/h/gr) a 22°C (0.9 l/h/gr).

Il tasso di respirazione (Fig. 25) è rimasto pressoché uniforme a 16°C, indipendentemente dalle condizioni di acidificazione. A 22°C invece, il consumo di ossigeno è stato sempre maggiore rispetto a quello misurato a 16°C e si è assistito ad un progressivo incremento del tasso al diminuire del pH, con i due valori più alti registrati a pH 7.7 (18.4 $\mu\text{molO}_2/\text{h/gr}$) e pH 7.4 (20.14 $\mu\text{molO}_2/\text{h/gr}$), statisticamente diversi dal controllo (8.6 $\mu\text{molO}_2/\text{h/gr}$).

Il tasso di escrezione è sempre stato più alto a 22°C rispetto a 16°C (Fig. 25). Ad entrambe le temperature l'escrezione è diminuita con la riduzione del pH. Rispetto al controllo (2.29 $\mu\text{gat N-NH}_3/\text{l/gr}$), le condizioni statisticamente diverse sono state quelle a 22°C pH 8.1 (5.18 $\mu\text{gat N-NH}_3/\text{l}$) e pH 7.7 (5.44 $\mu\text{gat N-NH}_3/\text{l}$) che hanno i valori più alti registrati nella sperimentazione.

Tabella 14 - Risultati dell'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis per il tasso di filtrazione, di respirazione ed escrezione di *C. chione*. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.001$ (***).

Filtrazione	Respirazione	Escrezione
<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
*	***	***

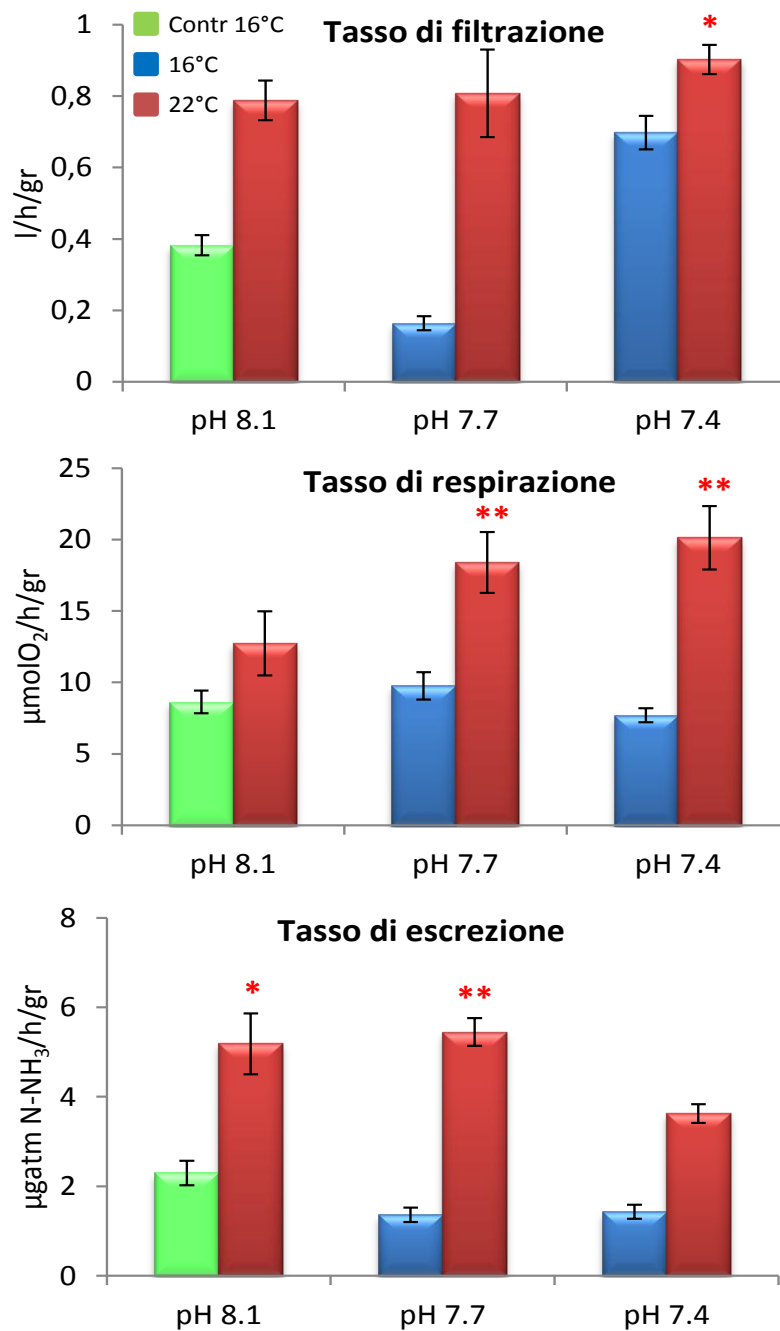


Figura 25 – Tasso di filtrazione, tasso di respirazione e tasso di escrezione in *C. chione*, (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a 34 psu a differenti valori di temperatura (16°, 22°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 16°C): $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

4.1.4.2 Parametri biochimici

Per la SOD e la CAT, l'ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis non ha evidenziato differenze significative tra le diverse condizioni sperimentali, sia nelle branchie, sia nella ghiandola digestiva (Tab. 15). Tuttavia, la SOD in entrambi i tessuti e la CAT nelle branchie hanno mostrato un andamento crescente al diminuire del pH e all'aumentare della temperatura (Fig. 26). Viceversa, la CAT nella ghiandola digestiva ha avuto un andamento decrescente, con valori sempre minori a 22°C rispetto a quelli registrati a 16°C e un minimo di attività a pH 7.4 22°C (Fig. 26).

Tabella 15 - Risultati dell'analisi ANOVA non parametrica di Kruskal-Wallis per l'attività della SOD, attività della CAT di *C. chione* in "br" branchia, "gh" ghiandola digestiva; *p* non significativo "ns".

SOD br	SOD gh	CAT br	CAT gh
<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
ns	ns	ns	ns

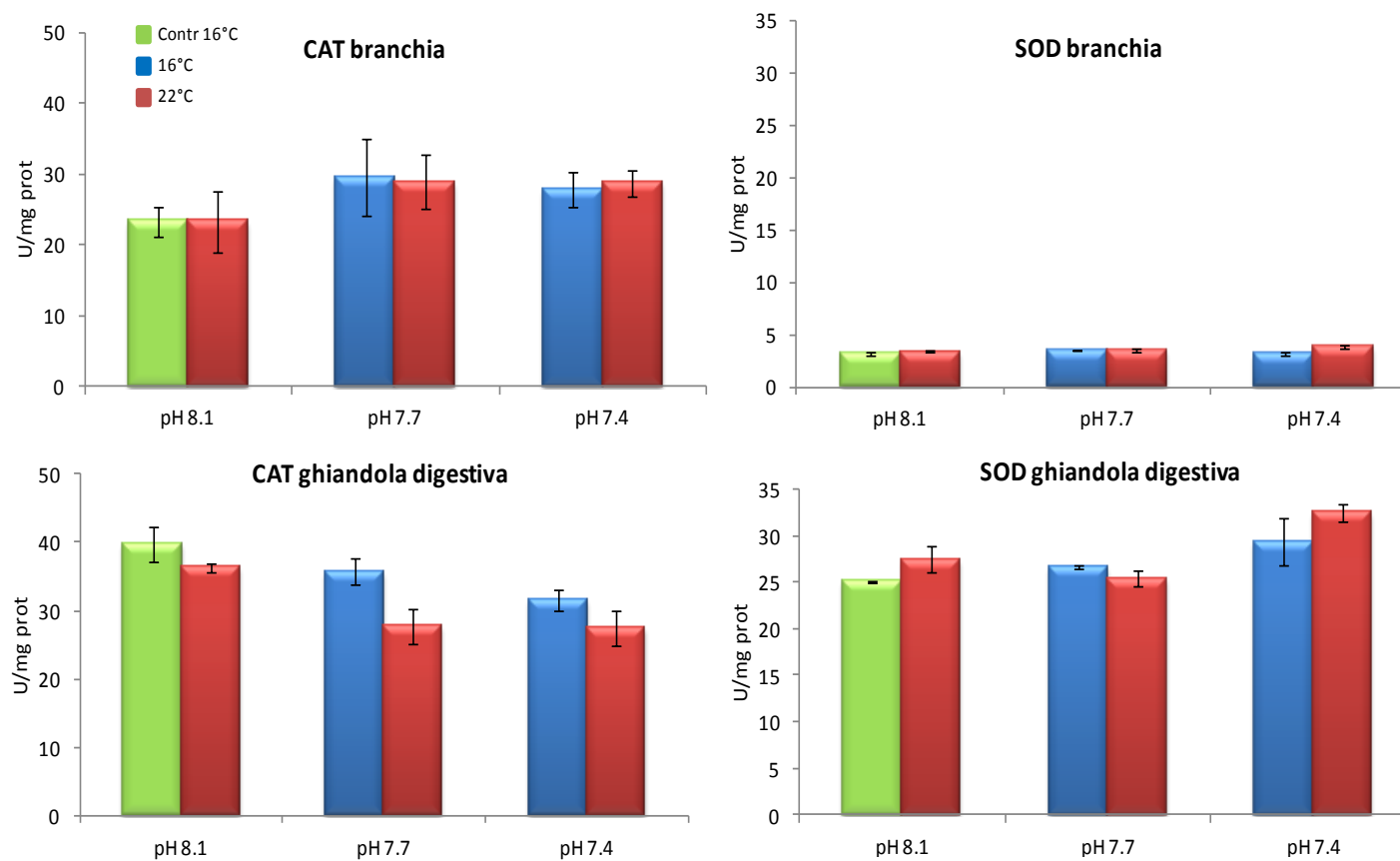


Figura 26 – Attività della catalasi (CAT), attività della superossido dismutasi (SOD) nella ghiandola digestiva di *C. chione* (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a 34 psu a differenti valori di temperatura (16°, 22°C) e pH (8.1, 7.7, 7.4).

4.1.4.3 Parametri immunologici

Anche per questa specie, la PERMANOVA è stata eseguita sui dati di THC, NRU, e attività del lisozima. Il THC è stato l'unico parametro che risulta significativamente influenzato dalla temperatura, dal pH e dalla loro interazione (Tab. 16). Solo a 22°C è stato possibile evidenziare un chiaro trend di crescita del numero degli emociti in funzione della diminuzione del pH (Fig. 27). Infatti a pH 7.4 22°C si è registrato il valore maggiore (1.2×10^6) assunto dal parametro in tutte le combinazioni saggiate. A 16°C il THC non è variato in maniera lineare in funzione del pH; un calo statisticamente significativo rispetto al controllo è stato osservato pH 7.7 16°C. L'NRU (Fig. 27) ha mostrato una diminuzione progressiva in funzione del pH e della temperatura, mentre l'attività del lisozima è diminuita leggermente alla temperatura più alta, tranne che a pH 8.1 (Fig. 27).

Tabella 16 - Risultati dell'analisi PERMANOVA in *C. chione* per il numero degli emociti circolanti (THC), saggio di assunzione del rosso neutro (NRU) e attività del lisozima. Per ciascun parametro vengono riportati gli effetti "T" temperatura (22°, 28°C), "pH" (8.1, 7.7, 7.4), "T X pH" interazione temperatura e pH. Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); p non significativo "ns".

	THC	NRU	Lisozima
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
T	*	ns	ns
pH	*	ns	ns
TxpH	**	ns	ns

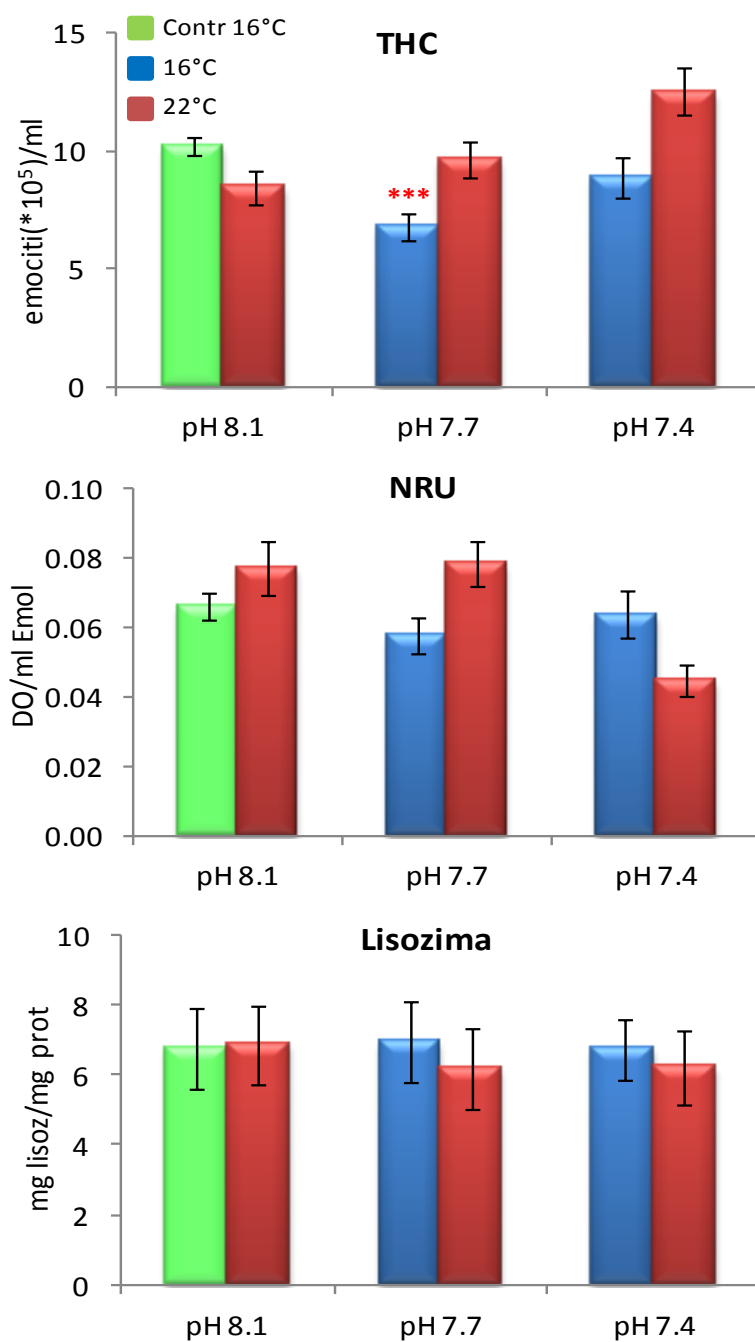


Figura 27 – Numero di emociti circolanti (THC), assunzione del Rosso Neutro (NRU), e attività del lisozima in *C. chione* (media \pm e.s.) dopo 7 giorni di esposizione a 34 psu a differenti valori di temperatura (16°, 22°C), pH (8.1, 7.7, 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test post hoc di Kruskal-Wallis con correzione di Bonferroni per 5 confronti) rispetto al controllo (pH 8.1, 16°C): $p < 0.001$ (***)

4.2 PRIMA SPERIMENTAZIONE A LUNGO TERMINE SUI GIOVANILI

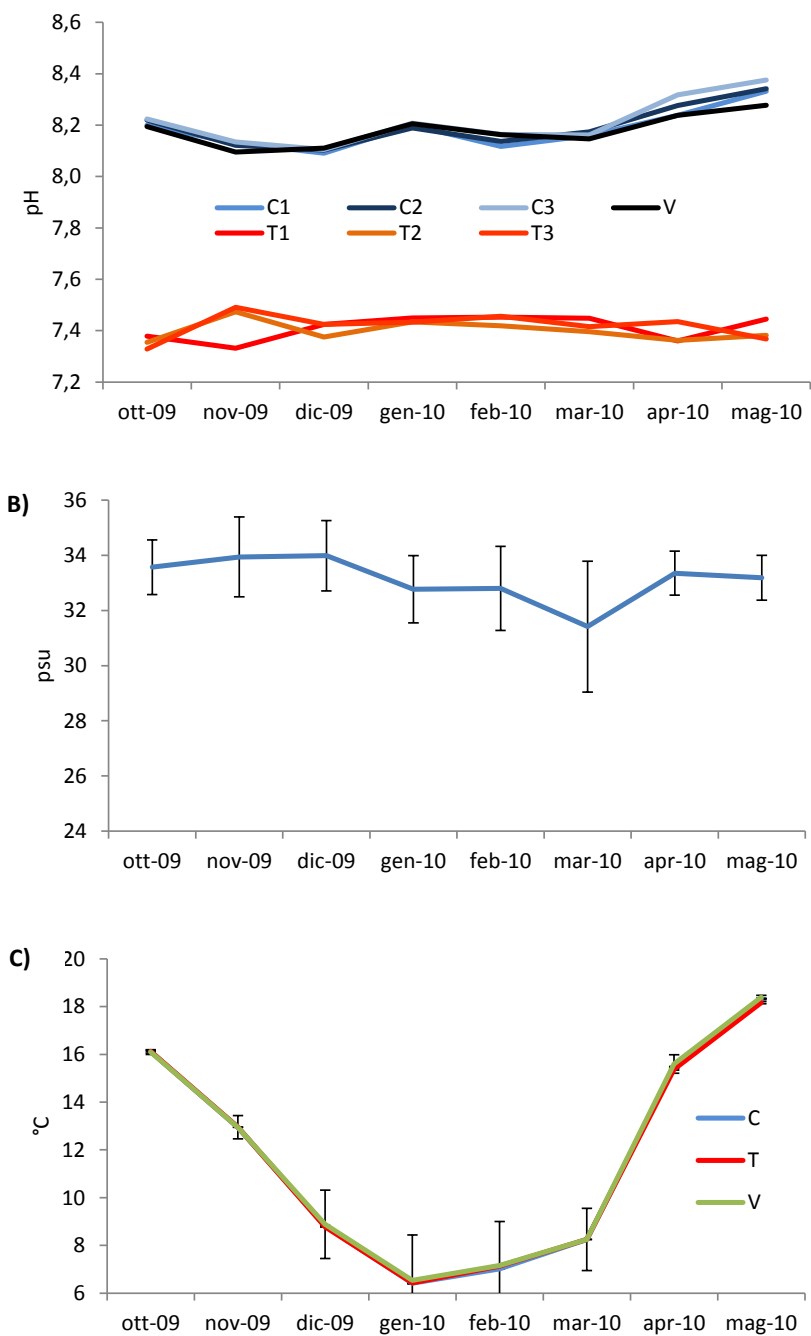


Figura 28 - Variazione del pH (a), della salinità (b), della temperatura (c). C= controllo; T= trattato; 1,2,3 = numero della replica; V= vascone.

Il pH (Fig. 28 a) delle vasche di controllo durante i sei mesi di sperimentazione è oscillato tra 8 e 8.40, con minime differenze rispetto a quello misurato nell'acqua della laguna che alimentava l'impianto. Nelle vasche a pH ridotto, il parametro ha avuto in media un'oscillazione di ± 0.1 rispetto al valore impostato di 7.4. La

salinità ha oscillato tra un minimo di 31.4 psu, registrato a marzo, ed un massimo di 33.9 psu, a novembre-dicembre (Fig 28 b). Dalla figura appare chiaro che la salinità è stata più variabile nel mese di marzo, quando le precipitazioni sono state particolarmente abbondanti. La temperatura nel vascone (Fig 28 c) è scesa dai 16°C iniziali di ottobre fino ai minimi di circa 6°C di gennaio, per poi rialzarsi e giungere ad un massimo di circa 18° a fine sperimentazione. Le vasche sperimentali hanno mostrato la stessa variazione stagionale (Fig. 28 c), con una differenza molto bassa (max. 0.2°C) rispetto al vascone.

4.2.1 *Mytilus galloprovincialis*

4.2.1.1 Parametri fisiologici e biochimici

Il tasso di filtrazione e quello di respirazione, misurati nei giovanili a sei mesi dall'inizio della sperimentazione, sono risultati più elevati nei controlli rispetto ai trattati, anche se la differenza osservata risulta significativa solo per la filtrazione (test U di Mann-Whitney) (Fig. 29). Invece, seppure non significativamente, il tasso di escrezione (Fig. 29) è stato maggiore nei trattati che nei controlli. Per il rapporto O:N, che può rappresentare un indice per valutare il catabolismo degli animali, il confronto è significativo con un evidente calo nei trattati. Il numero di filamenti di bisso prodotti in 24 ore è stato significativamente maggiore nei controlli rispetto ai trattati (Fig. 29).

Per quanto riguarda i parametri biochimici (Fig. 30), l'attività della CAT e quella della SOD sono aumentate nei trattati rispetto ai controlli, ma solo la CAT in modo statisticamente significativo. Il GST ed il TBARS sono diminuiti significativamente nei trattati rispetto ai controlli (Fig. 30).

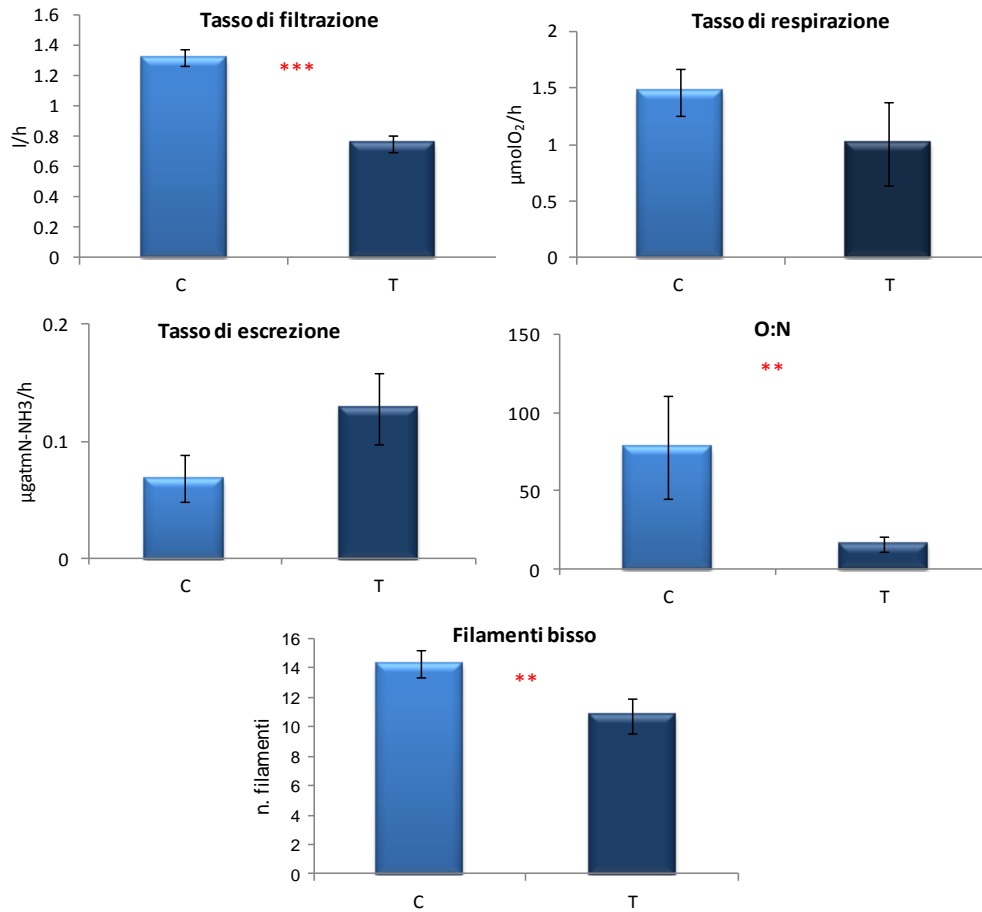


Figura 29 – Tasso di filtrazione, tasso di respirazione, tasso di escrezione, rapporto ossigeno azoto (O:N) e numero dei filamenti di bisso in *M. galloprovincialis*, (media \pm e.s.) dopo sei mesi di esposizione a pH 7.4. “C” controllo (pH naturale), “T” trattato (pH 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test U di Mann-Whitney): $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

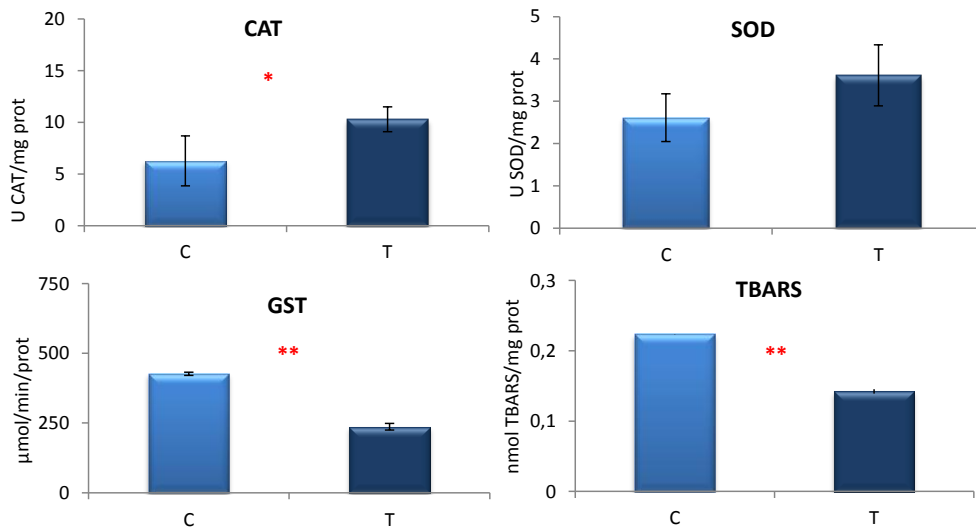


Figura 30 – Attività della catalasi (CAT), attività della superossido dismutasi (SOD), attività della glutatone solfo-transferasi “GST” e perossidazione lipidica (TBARS) nell’intero organismo di *M. galloprovincialis*, (media \pm e.s.) dopo sei mesi di esposizione a pH 7.4. “C” controllo (pH naturale), “T” trattato (pH 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test U di Mann-Whitney): $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

4.2.1.2 Mortalità

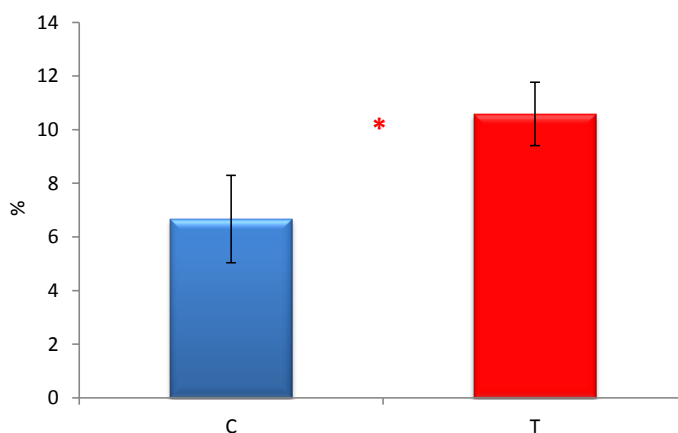


Figura 31– Percentuale della mortalità al termine della sperimentazione espressa come media \pm deviazione standard delle vasche dei controlli “C” e dei trattati “T”. Gli asterischi indicano il livello di significatività riportato in Tab. 17: $p < 0.05$ (*).

Tabella 17 - Mortalità: risultati del test t di Student tra trattati “T” e controlli “C”: p livello del valore di significatività. I confronti significativi sono indicati in rosso.

T vs C	t_4	p
morti totali	-3.374	0.028
mort al 6°	-3.394	0.027
mort al 5°	-0.234	0.826

La mortalità è stata piuttosto bassa nel corso dell’intera sperimentazione, con una media mensile di 4.5 ± 2.3 individui nei primi 5 mesi nei controlli e di 4.4 ± 3.3 individui nei trattati. Al sesto mese, invece, si è registrata una media di 26.6 ± 6.5 individui morti, pari al 7%, nelle vasche dei controlli, e di 42.3 ± 4.7 individui morti, pari al 11%, nelle vasche dei trattati (Fig. 31). Tale differenza tra controlli e trattati a $pH 7.4$ è risultata statisticamente significativa (Tab. 17).

4.2.1.3 Lunghezza e peso

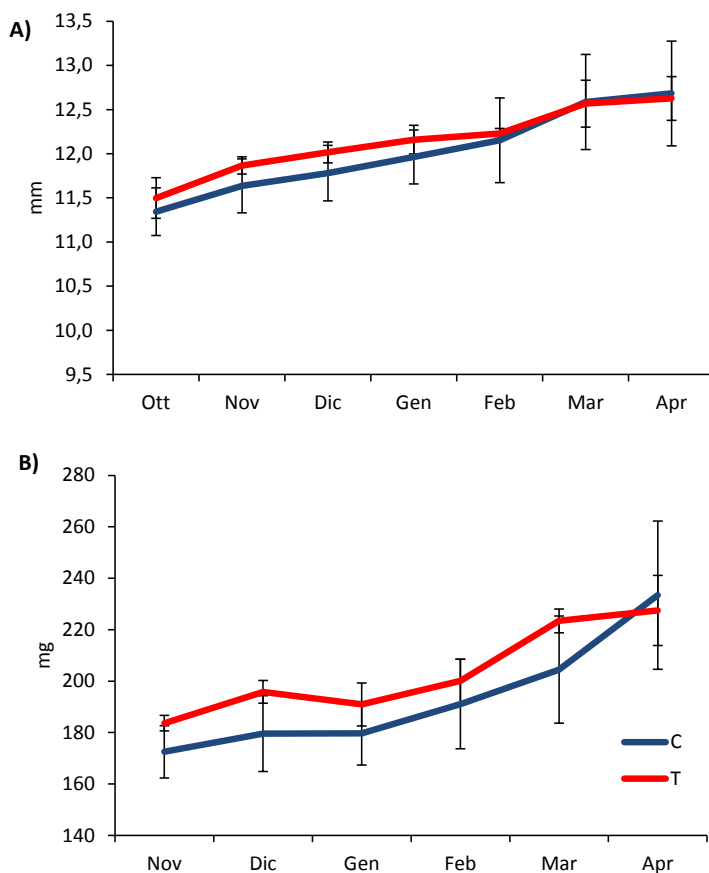


Figura 32 - A) Lunghezza: medie mensili (mm) \pm deviazione standard: “C” controlli, “T” trattati. B) Peso: medie mensili (mg) \pm deviazione standard: “C” controlli, “T” trattati.

Tabella 18 - A) Lunghezza: confronto tra trattati “T” e controlli “C” a fine sperimentazione. B) Peso: confronto tra trattati “T” e controlli “C” a fine sperimentazione (6° mese). F: risultati del mixed model ANOVA con sottoscritti i gradi di libertà; *p*: valore del livello di significatività.

A	T vs C	$F_{1,4}$	<i>p</i>
	Lunghezza finale	0.028	0.874
B	T vs C	$F_{1,4}$	<i>p</i>
	Peso 6°	0.142	0.724

La lunghezza e il peso medi durante i 6 mesi di sperimentazione sono aumentati sia nei controlli che nei trattati con un andamento molto simile (Fig 32 a, b). I confronti statistici tra le misure dei trattati e dei controlli non sono mai risultati statisticamente significativi, nè durante, nè alla fine la sperimentazione (Tab. 18).

4.2.1.4 Spessore della conchiglia

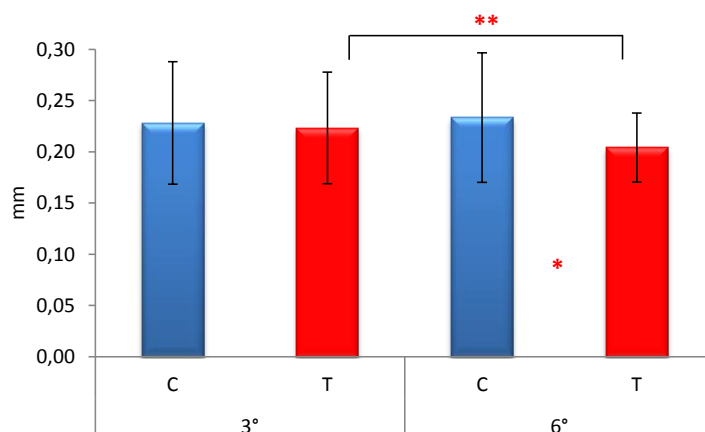


Figura 33 - Spessore della conchiglia: media (mm) \pm deviazione standard nei controlli “C” e trattati “T” al 3° e al 6° mese di sperimentazione. Gli asterischi indicano il livello della significatività riportato in Tab. 19: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

Tabella 19 - Spessore della conchiglia: confronto tra trattati “T” e controlli “C” al 3° e 6° mese e tra trattati al 3° e 6° mese. F: risultati del mixed model ANOVA con sottoscritti i gradi di libertà; p : valore del livello di significatività. I confronti significativi sono indicati in rosso.

T vs C	$F_{1,4}$	p
3° mese	0.160	0.709
6° mese	18.679	0.012
T	$F_{1,56}$	p
3° vs 6°	7.521	0.000

Al terzo mese lo spessore della conchiglia è risultato quasi identico negli individui di controllo e in quelli mantenuti a pH 7.4 (Fig. 33), ed infatti il confronto eseguito tramite il mixed model non è risultato significativo (Tab. 19). Al sesto mese, invece, i controlli avevano conchiglie significativamente più spesse dei trattati (Fig. 33; Tab. 19). Inoltre, lo spessore nei trattati al sesto mese è risultato significativamente minore rispetto a quello del terzo mese (Tab. 19).

4.2.1.5 Danno sulla conchiglia

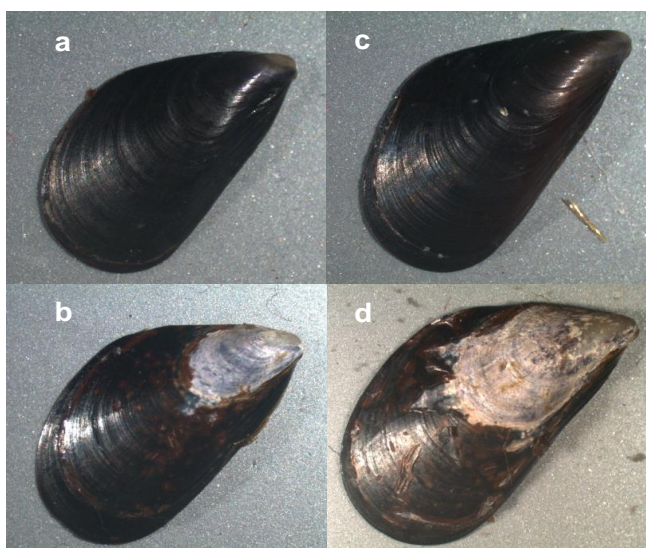


Figura 34 - a: controllo 3° mese; b: trattato 3° mese; c: controllo 6° mese; d: trattato 6° mese.

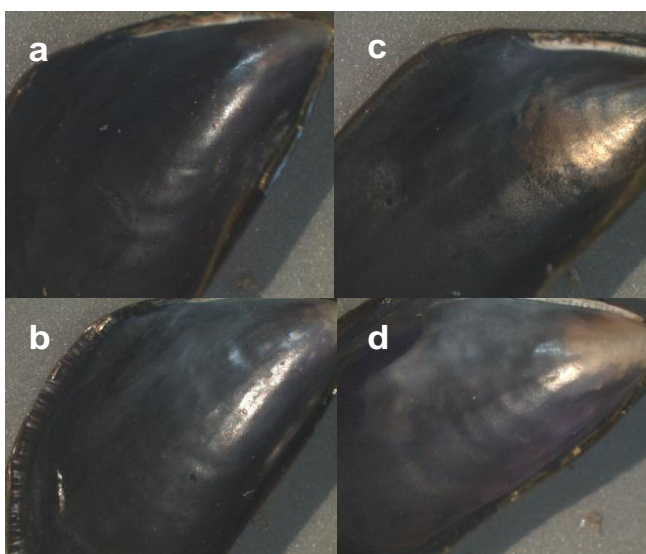


Figura 35 – Superficie interna: a, b controllo 6° mese; c, d trattato 6° mese.

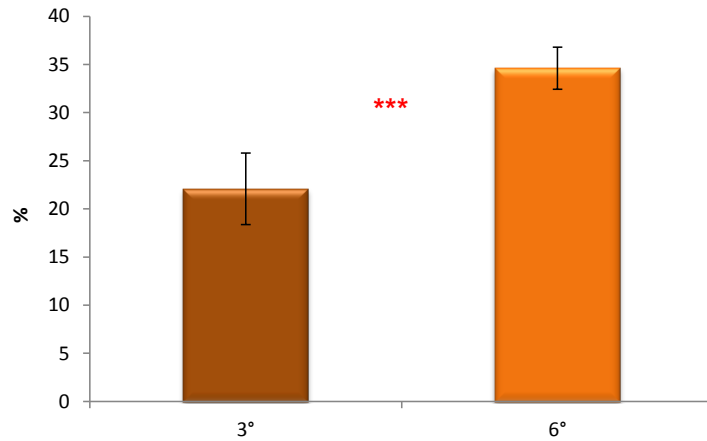


Figura 36 - Area danneggiata percentuale: media \pm deviazione standard nei controlli “C” e nei trattati “T” al 3° e 6° mese. Gli asterischi indicano il livello della significatività riportato in Tab, 20 : $p < 0.001$ (***)

Tabella 20 - Area danneggiata percentuale “% D”: confronto tra trattati “T” al 3° e 6° mese. F: risultati del mixed model ANOVA con sottoscritti i gradi di libertà; p : valore del livello di significatività.

% D	$F_{1,172}$	p
3° vs 6°	46.119	0.000



Figura 37 - Variabilità del danno sulla superficie della conchiglia al 6° mese

Le conchiglie nei mitili di controllo non hanno mai mostrato alcun tipo di danno (Fig. 34), né sulla superficie esterna, né su quella interna (Fig. 35). Nei mitili trattati invece è stato osservato sulla superficie esterna delle conchiglie un danno che si è manifestato a partire dalla zona umbonale, per poi estendersi progressivamente lungo l’asse maggiore. Nella fase iniziale di comparsa del danno, il periostraco ha cominciato a scolorirsi (ID = 1) per poi separarsi dagli strati sottostanti esponendo l’ostraco (ID = 2). L’ostraco esposto a valori bassi di pH si è stato ulteriormente corroso fino alla completa scomparsa, rendendo visibile l’ipostraco (ID = 3).

Già al terzo mese, tutti i mitili trattati presentavano il valore massimo di 3 dell’indice di danno con un’evidente dissoluzione dell’ostraco e con l’ipostraco sottostante visibile. L’analisi di immagine ha evidenziato invece un’estensione molto variabile del danno sulla superficie della conchiglia (Fig. 37). Al terzo mese

l'area danneggiata ricopriva in media il 22% della superficie totale della conchiglia, mentre al sesto aumentava significativamente, arrivando al 35% (Fig. 36; Tab. 20), anche se tali valori presentavano una certa variabilità all'interno di ogni campione.

4.2.2 *Chamelea gallina*

4.2.2.1 Parametri fisiologici e biochimici

Nei giovanili di vongola sia la filtrazione che l'escrezione sono risultate significativamente diverse tra controlli e trattati (test U di Mann-Whitney) (Tab. 21). In particolare, il tasso di filtrazione è stato maggiore nei controlli, mentre il tasso di escrezione è stato maggiore nei trattati. Il tasso di respirazione (Fig. 37) non è risultato significativamente diverso nei controlli e nei trattati, mentre il rapporto O:N ha mostrato un calo significativo nei secondi. Le attività di CAT, SOD e GST non hanno differito in modo significativo tra trattati e controlli (Fig. 38). L'unica differenza significativa è stata riscontrata per il TBARS che nei trattati ha fatto rilevare valori maggiori.

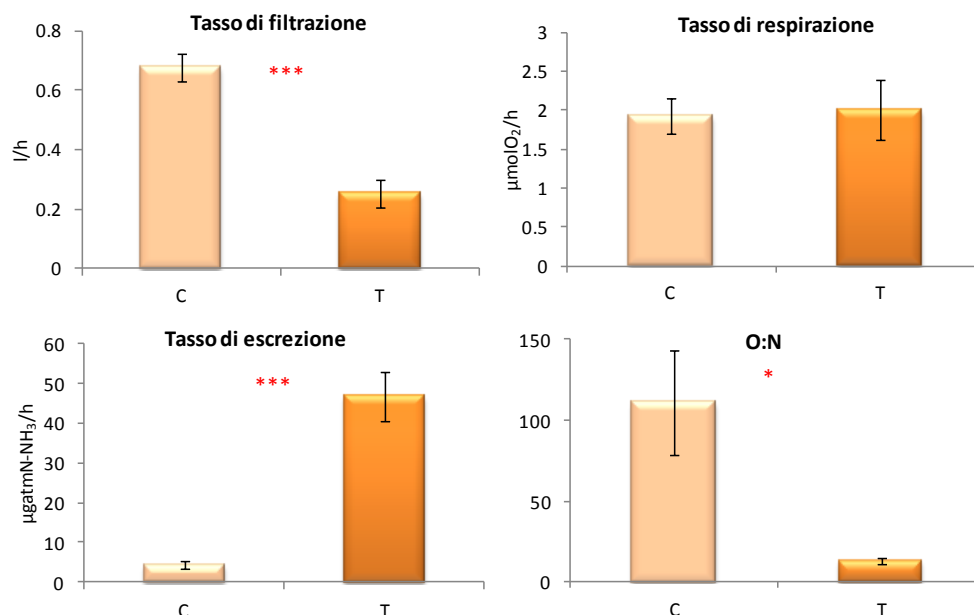


Figura 37 – Tasso di filtrazione, tasso di respirazione, tasso di escrezione e rapporto ossigeno azoto (O:N) in *C. gallina*, (media \pm e.s.) dopo sei mesi di esposizione a pH 7.4. “C” controllo (pH naturale), “T” trattato (pH 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test U di Mann-Whitney): $p < 0.05$ (*); $p < 0.001$ (***).

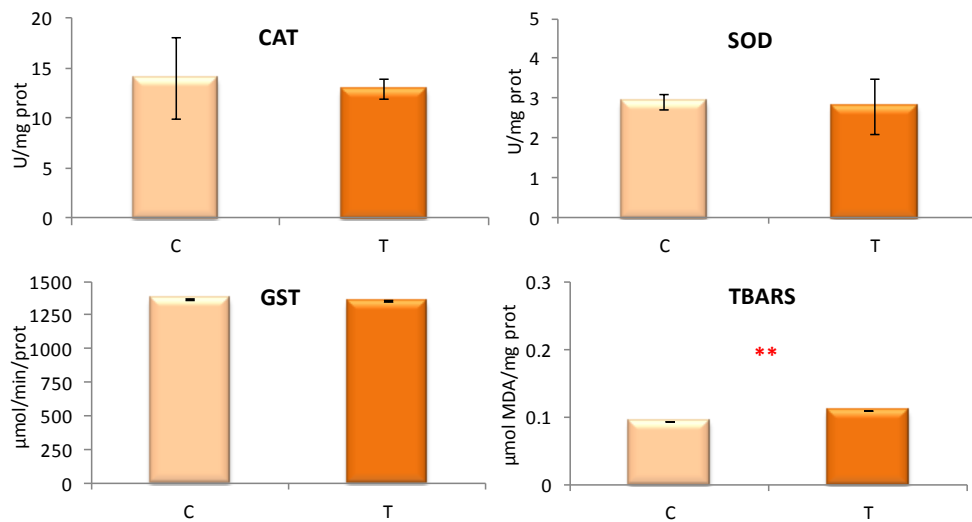


Figura 38 – Attività della catalasi (CAT), attività della superossido dismutasi (SOD), attività della glutazione solfo-transferasi “GST” e perossidazione lipidica (TBARS) nell’intero organismo di *C. gallina*, (media \pm e.s.) dopo sei mesi di esposizione a pH 7.4. “C” controllo (pH naturale), “T” trattato (pH 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test U di Mann-Whitney): $p < 0.01$ (**).

4.2.2.2 Mortalità

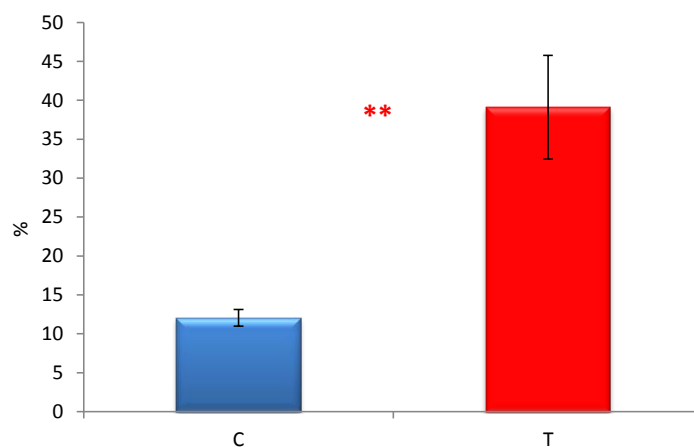


Figura 39 - Percentuale della mortalità al termine della sperimentazione espressa come media \pm deviazione standard delle vasche dei controlli “C” e dei trattati “T”. Gli asterischi indicano il livello di significatività riportato in Tab. 22: $p < 0.01$ (**).

Tabella 22 - Mortalità: risultati del test t di Student tra trattati “T” e controlli “C” in *C. gallina*: p livello del valore di significatività. I confronti significativi sono indicati in rosso.

T vs C	t_4	p
mort totali	-6.945	0.002
mort al 6°	-8.145	0.001
mort al 4°	-0.454	0.673

Nei primi 4 mesi la mortalità delle vongole è stata molto bassa, con una media mensile di 1.6 ± 1.9 individui nei controlli e 2.5 ± 2.3 individui nei trattati. A fine sperimentazione però è aumentata significativamente nelle vasche di trattamento rispetto a quelle di controllo (Tab. 22). Nelle vasche dei controlli sono stati osservati in media 72.3 ± 6.5 individui morti, pari al 12%, e nelle vasche dei trattati 234.7 ± 39.4 individui morti, pari al 39% (Fig. 39). La differenza tra trattati e controlli è risultata significativa solo al sesto mese (Tab. 22).

4.2.2.3 Lunghezza e peso

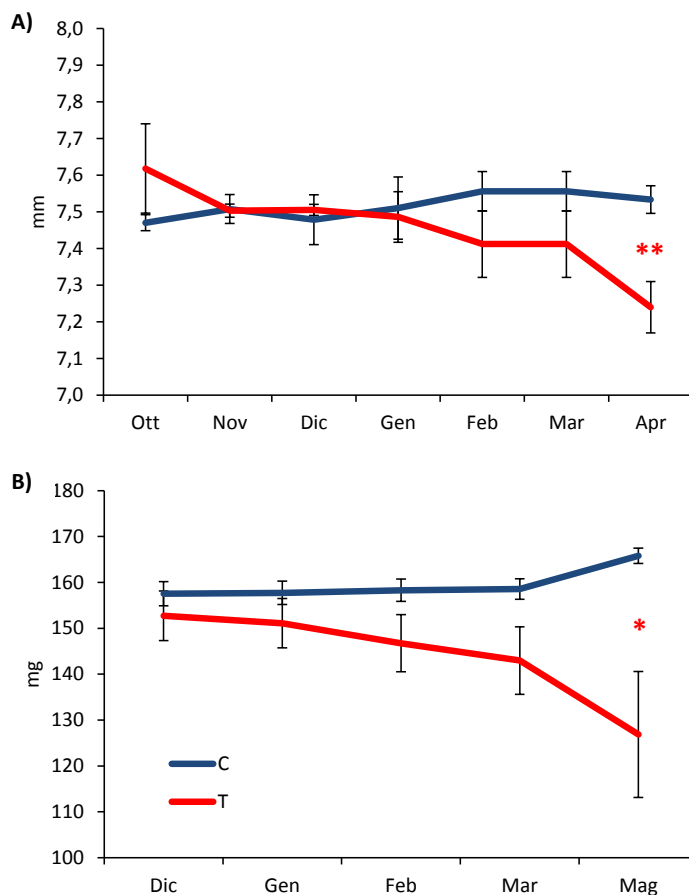


Figura 40 - A) Lunghezza: medie mensili (mm) \pm deviazione standard: “C” controlli, “T” trattati. B) Peso: medie mensili (mg) \pm deviazione standard: “C” controlli, “T” trattati. Gli asterischi indicano il livello di significatività riportato in Tab. 23 : $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

Tabella 23 - A) Lunghezza: confronto tra trattati “T” e controlli “C” a fine sperimentazione. B) Peso: confronto tra trattati “T” e controlli “C” durante la sperimentazione dal primo mese con differenza significativa tra T vs C. F: risultati del mixed model ANOVA con sottoscritti i gradi di libertà; p : valore del livello di significatività.

A	T vs C	$F_{1,4}$	p
	Lunghezza finale	43.255	0.002
B	T vs C	$F_{1,4}$	p
	Peso 6°	29.235	0.005
	Peso 4°	12.293	0.025
	Peso 3°	8.906	0.041

Durante la sperimentazione si possono riscontrare due trend opposti negli andamenti della lunghezza e del peso tra le vongole di controllo e quelle trattate (Fig. 40 a, b). I controlli presentano un trend positivo, con un incremento della lunghezza da 7.47 mm a 7.53 mm, pari all' 1.5%; analogamente, il peso aumenta in media del 5.2%. I trattati, invece, mostrano un trend negativo, passando da 7.61 a 7.24 mm di lunghezza, pari ad un decremento del 4%; si osserva altresì una diminuzione del peso medio del 17%. La lunghezza e il peso dei controlli sono risultati significativamente diversi da quelli dei trattati (Tab. 23). In particolare, per il peso si è osservata una differenza significativa già a partire dal terzo mese (Tab. 23).

4.2.2.4 Spessore della conchiglia

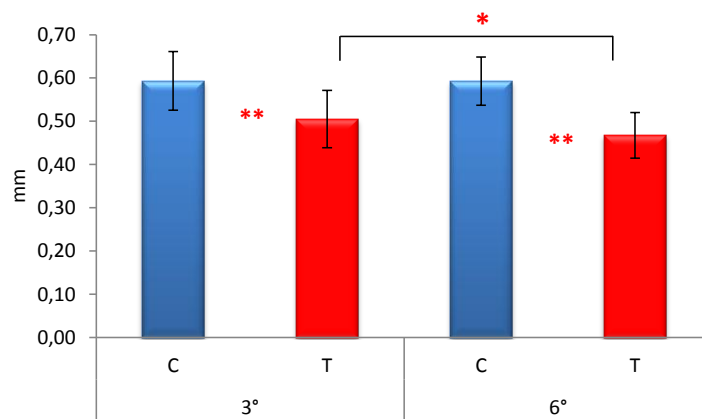


Figura 41 - Spessore della conchiglia: media (mm) \pm deviazione standard nei controlli "C" e trattati "T" al 3° e al 6° mese di sperimentazione. Gli asterischi indicano il livello della significatività riportato in Tab. 24 : $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

Tabella 24 - Spessore della conchiglia: confronto tra trattati "T" e controlli "C" al 3° e 6° mese e tra trattati al 3° e 6° mese. F: risultati del mixed model ANOVA con sottoscritti i gradi di libertà; p : valore del livello di significatività.

T vs C	$F_{1,4}$	p
3°	26.504	0.007
6°	33.905	0.004
<hr/>		
T	$F_{1,56}$	p
3° vs 6°	5.441	0.023

Lo spessore delle conchiglie delle vongole a pH 7.4 è risultato significativamente inferiore a quello delle vongole a pH naturale, già al terzo mese ed ulteriormente ridotto al sesto (Fig. 41; Tab. 24). Anche in questo caso, come per i mitili, lo spessore della conchiglia nei trattati al sesto mese è risultato significativamente ridotto rispetto a quello delle vongole al terzo mese (Tab. 24).

4.2.2.5 Danno sulla conchiglia

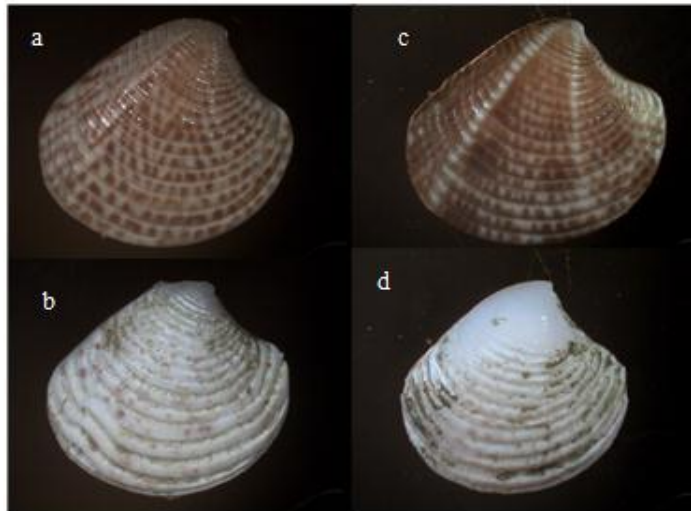


Figura 42 - a: controllo 3° mese; b: trattato 3° mese; c: controllo 6° mese; d: trattato 6° mese.

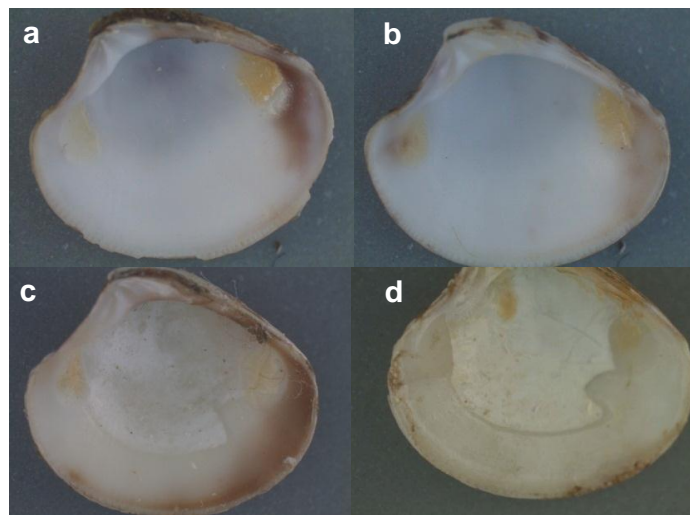


Figura 43 – Superficie intena: a, b controllo 6° mese; c, d trattato 6° mese.

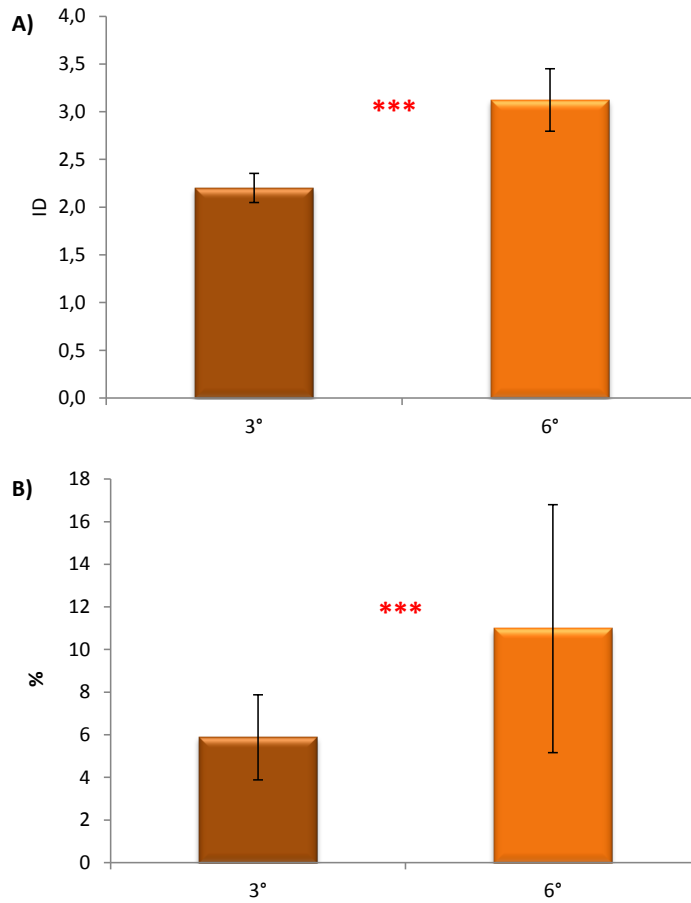


Figura 44 - A) Indice di danno “ID”: media ± deviazione standard nei controlli “C” e nei trattati “T” al 3° e 6° mese. B) % area danneggiata: media ± deviazione standard nei controlli “C” e nei trattati “T” del 3° e 6° mese. Gli asterischi indicano il livello della significatività riportato in Tab 25 : $p < 0.001$ (***)

Tabella 25 - A) Indice di danno “ID”: confronto tra i trattati “T” al 3° e 6° mese di *C. gallina*. B) % area danneggiata “%D”: confronto tra i trattati “T” al 3° e 6° mese di *C. gallina*. F: risultati del mixed model ANOVA con sottoscritti i gradi di libertà; p : valore del livello di significatività

A	ID	$F_{1,176}$	p
	3° vs 6°	157.340	0.000
B	%D	$F_{1,176}$	p
	3° vs 6°	58,585	0.000



Figura 45 - Variabilità del danno sulla superficie della conchiglia al 6°mese

Anche per la vongola il danno della conchiglia è stato riscontrato solo nei trattati e sulla superficie esterna (Fig. 42), ma si deve segnalare, sempre nei trattati al sesto mese una perdita di lucentezza dell'ipotraco nel lato interno della conchiglia (Fig. 43).

Nelle vongole l'attribuzione di un indice di danno è stata complessa poiché durante la sperimentazione è stato osservato un diverso grado di danno tra l'area umbonale ed il resto della superficie conchigliare esterna. La progressione del danno è stata comunque la stessa per entrambe le aree, anche se il danno più grave è stato riscontrato nell'area umbonale. Nella fase iniziale è stata evidenziata una perdita di lucentezza del periostraco con un suo successivo scolorimento e scomparsa (ID = 1). In seguito, l'ostraco è andato incontro a corrosione e si è ridotta l'altezza delle creste radiali (ID = 2). Nell'area umbonale, l'acidificazione ha ulteriormente corrosivo l'ostraco, facendo scomparire completamente le creste radiali ed esponendo lo strato sottostante, ovvero l'ipotraco (ID = 2).

Un danno significativo sulla conchiglia dei trattati è stato riscontrato già al terzo mese (Tab. 25). Tra il terzo e sesto mese l'indice di danno è aumentato in modo significativo, passando da 2.25 a 3.12 (Fig. 44).

L'analisi d'immagine ha evidenziato un'estensione variabile dell'area danneggiata sulla superficie della conchiglia (Fig. 45). L'area danneggiata delle conchiglie è passata dal 6% del terzo mese all'11% del sesto, e questo incremento è risultato altresì significativo (Tab. 25).

4.3 SECONDA SPERIMENTAZIONE GIOVANILI DI *M. galloprovincialis*

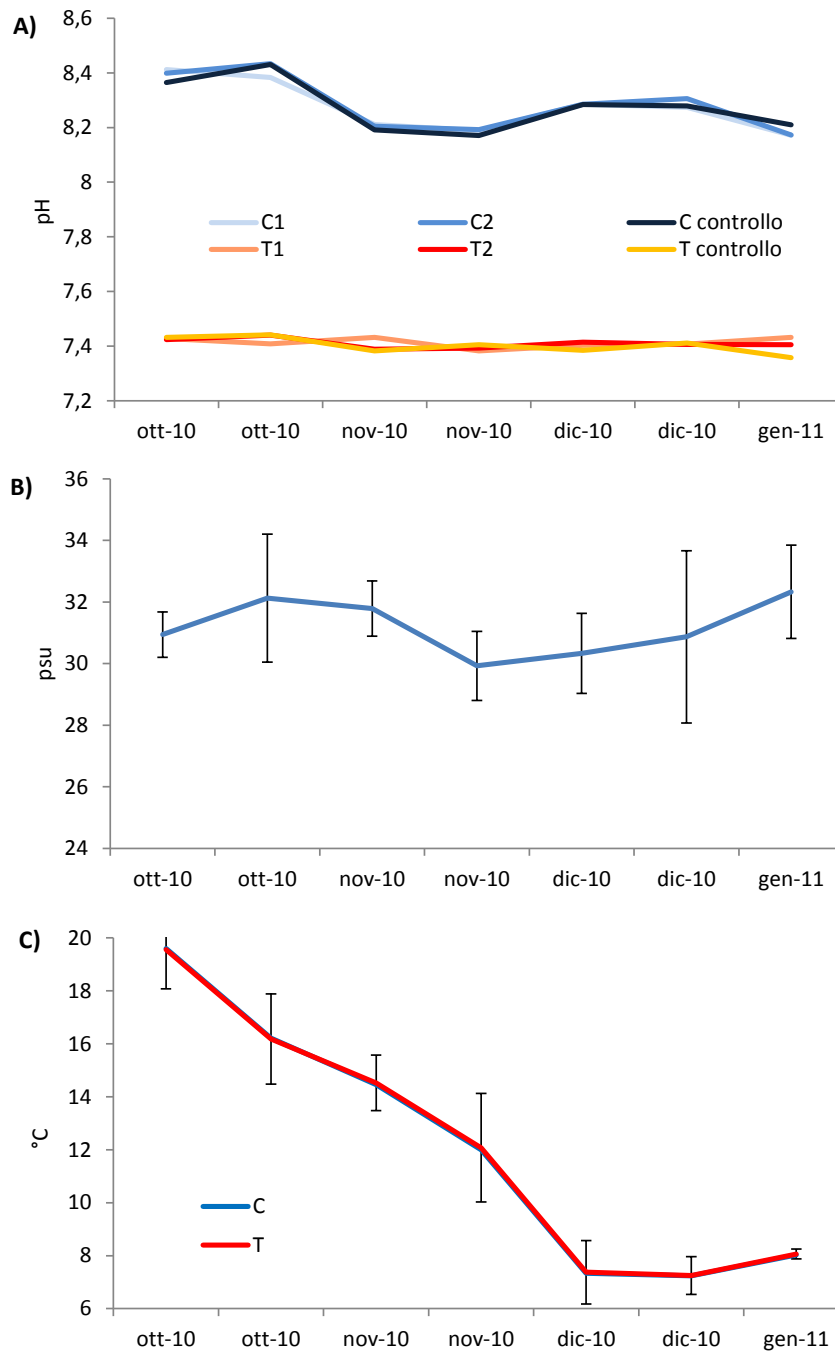


Figura 46 - Variazione media del pH (a), della salinità (b), della temperatura (c) C= controllo; T= trattato.

Il pH (Fig. 46 a) delle vasche dei controlli ha avuto una media di 8.3 con una oscillazione di ± 0.1 . Nelle vasche dei trattati il pH ha fatto registrare un valore medio di $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$. La salinità media (Fig. 46 b) è stata di 31 ± 2 psu, variando tra un minimo di 27 psu a dicembre e un massimo di 34 psu a gennaio. La

temperatura (Fig. 46 c) è scesa dai 17°C iniziali di ottobre fino ai minimi di circa 8°C di gennaio, al termine della sperimentazione.

4.3.1 Analisi chimiche dell'acqua

Tabella 26 - Media \pm deviazione standard dei parametri chimico fisici misurati durante la sperimentazione (n=9): T=temperatura; S=salinità; pH=pH; AT= alcalinità totale; DIC=carbonio disciolto totale; pCO_2 = pressione parziale della CO_2 ; Ω_a = stato di saturazione dell'aragonite; Ω_c = stato di saturazione della calcite; (no biv) = vasca senza bivalvi).

Vasca	T C°	S psu	pH	AT ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	DIC ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	pCO_2 (μatm)	Ω_a	Ω_c
pH 7.4 (no biv)	10.82 \pm 3.61	30.93 \pm 1.93	7.37 \pm 0.07	2933 \pm 17	3008 \pm 19	2718 \pm 46	0.72 \pm 0.18	1.15 \pm 0.28
pH 7.4	10.82 \pm 3.54		7.38 \pm 0.12	2891 \pm 14	2957 \pm 16	2615 \pm 63	0.76 \pm 0.33	1.21 \pm 0.51
pH naturale (no biv)	10.70 \pm 3.58	30.93 \pm 1.93	8.21 \pm 0.12	2921 \pm 16	2687 \pm 14	349 \pm 11	4.01 \pm 0.66	6.35 \pm 1.09
pH naturale	10.77 \pm 3.56		8.22 \pm 0.13	2889 \pm 18	2651 \pm 15	338 \pm 11	4.11 \pm 0.79	6.51 \pm 1.30

Le analisi chimiche (Tab. 26) dei campioni d'acqua raccolti settimanalmente hanno permesso di valutare i livelli di alcalinità totale, di carbonio inorganico disciolto (DIC), di pressione parziale della CO_2 e di saturazione della calcite (Ω_c) e dell'aragonite (Ω_a) presenti in condizioni di controllo e di trattamento a pH ridotto (Tab. 26). Non sono state rilevate differenze tra le vasche con e senza animali ad entrambe le condizioni di pH, mentre sono risultate differenti le vasche di controllo e quelle a pH 7.4. In particolare a pH 7.4, è stato registrato un incremento della pCO_2 e del DIC, accompagnato da una riduzione di Ω_c e Ω_a . A pH 7.4, Ω_a è scesa sotto il livello di saturazione (<1), creando un ambiente sottosaturato.

4.3.2 Parametri fisiologici e biochimici

Le misure fisiologiche valutate alla fine della seconda sperimentazione sui giovanili di mitilo hanno fatto rilevare che già dopo tre mesi di esposizione a condizioni di acidificazione gli animali hanno presentato una riduzione significativa del tasso di filtrazione e un calo di quello di respirazione (Fig. 47). Il tasso di escrezione è risultato invece significativamente maggiore nei trattati a pH 7.4 (Fig. 47). Il rapporto O:N non è significativamente diverso tra trattati e controlli, così come la produzione di filamenti di bisso (Fig. 47)

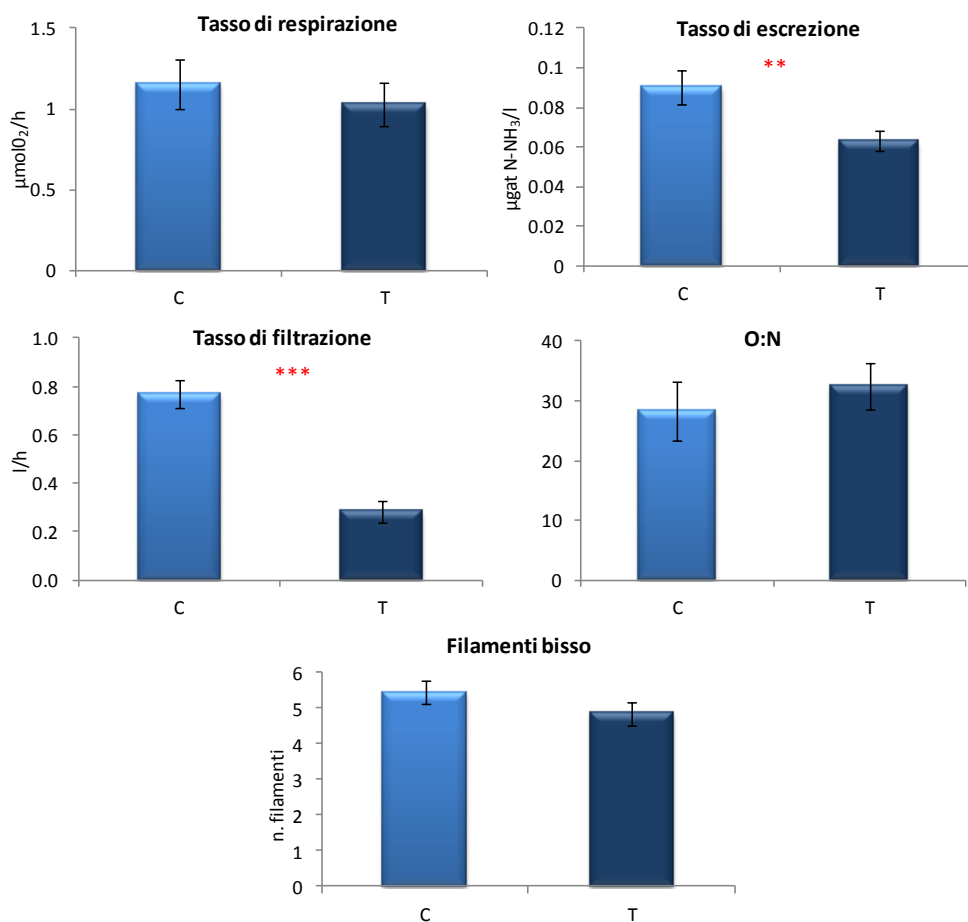


Figura 47 – Tasso di filtrazione, tasso di respirazione, tasso di escrezione, rapporto ossigeno azoto (O:N) e numero dei filamenti di bisso in *M. galloprovincialis*, (media \pm e.s.) dopo 3 mesi di esposizione a pH 7.4. “C” controllo (pH naturale), “T” trattato (pH 7.4). Gli asterischi indicano i confronti statisticamente significativi (test U di Mann-Whitney): $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

4.3.3 Mortalità

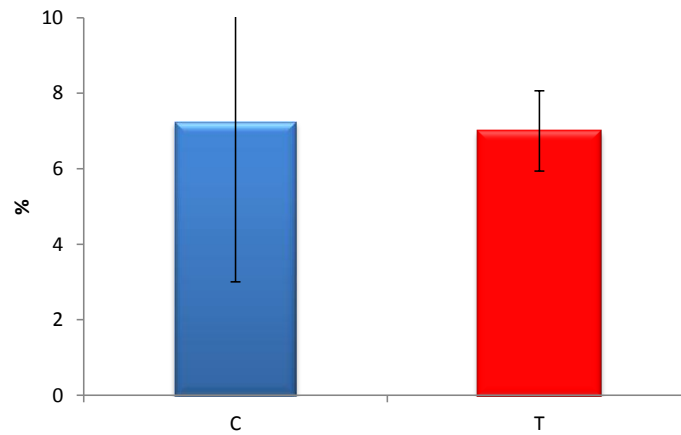


Figura 48 - Percentuale della mortalità al termine della sperimentazione espressa come media \pm deviazione standard delle vasche dei controlli “C” e dei trattati “T”.

Tabella 27 - Mortalità: risultati del test t di Student tra trattati “T” e controlli “C” al termine della sperimentazione: p livello del valore di significatività.

T vs C	t_2	p
morti totali	-0.080	0.942

La mortalità al termine della sperimentazione è stata piuttosto bassa con una media di 28 ± 4.2 individui, pari al 7%, nei trattati e 29 ± 16.9 individui, pari al 7,25%, nei controlli (Fig. 48). La differenza tra trattati e controlli non è risultata statisticamente significativa (Tab. 27).

4.3.4 Lunghezza e peso

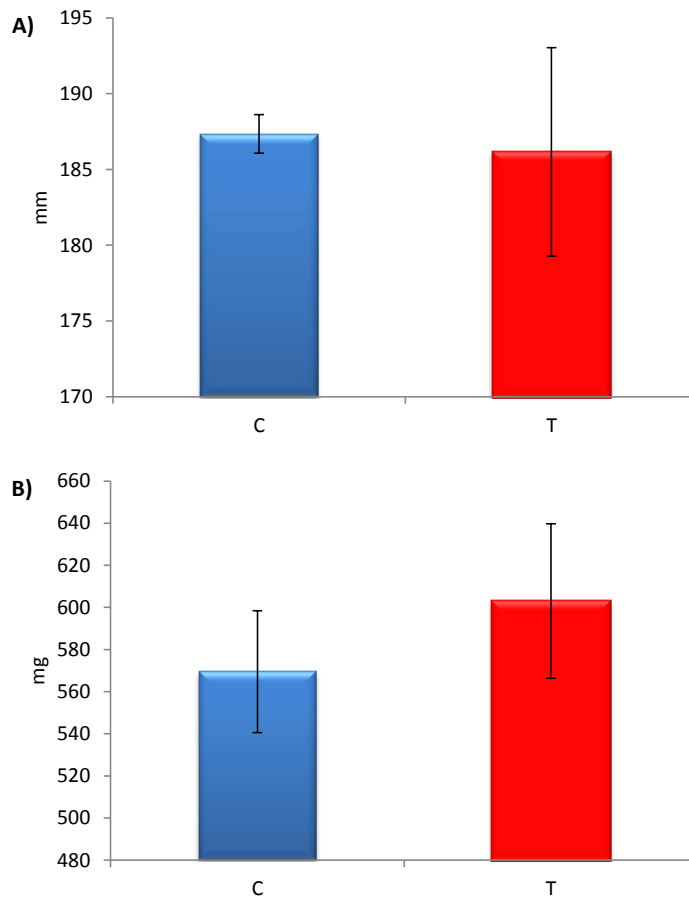


Figura 49 - A) Lunghezza: media a fine sperimentazione (mm) \pm deviazione standard. B) Peso: medie a fine sperimentazione (mg) \pm deviazione standard: "C" controlli, "T" trattati.

Tabella 28 - Lunghezza: A) confronto nei trattati "T" e nei controlli "C" tra il 1° e 3° mese. B) – confronto tra trattati e controlli al primo e terzo mese. F: risultati del mixed model ANOVA con sottoscritti i gradi di libertà; *p*: valore del livello di significatività. I confronti significativi sono indicati in rosso.

			F _{1,2}	<i>p</i>
A	1° vs 3°	C	10.575	0.001
		T	9.058	0.003
			F _{1,1}	<i>p</i>
B	C vs T	1° mese	1.039	0.415
		3° mese	0.064	0.824

Tabella 29 - Peso: risultati del test t di Student tra trattati "T" e controlli "C" a fine sperimentazione: p livello del valore di significatività.

T vs C	t_2	p
Peso totale	-0.849	0.485

La lunghezza media è aumentata in modo significativo sia nei controlli (+8.11%), che nei trattati (+10.39%) (Fig. 49; Tab. 28); la differenza tra le due condizioni al terzo mese non è risultata significativa. Analogamente, il peso non è risultato significativamente diverso tra trattati e controlli alla fine della sperimentazione (Tab. 29).

4.3.5 Danno sulla conchiglia

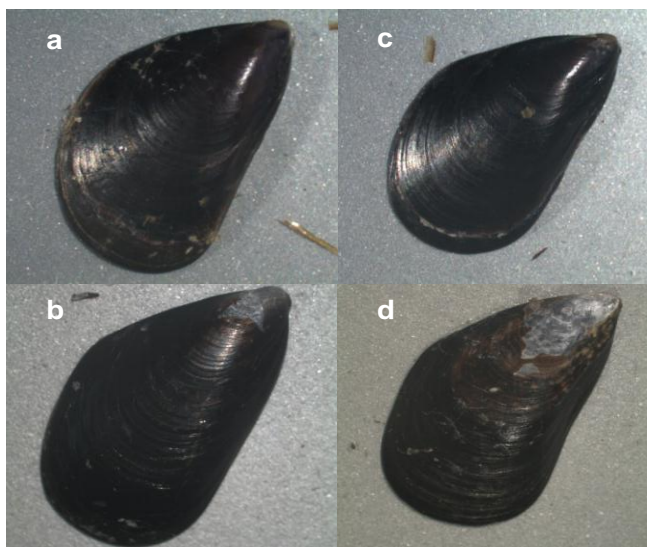


Figura 50 - a: controllo 1° mese; b: trattato 1° mese; c: controllo 3° mese; d: trattato 3° mese.

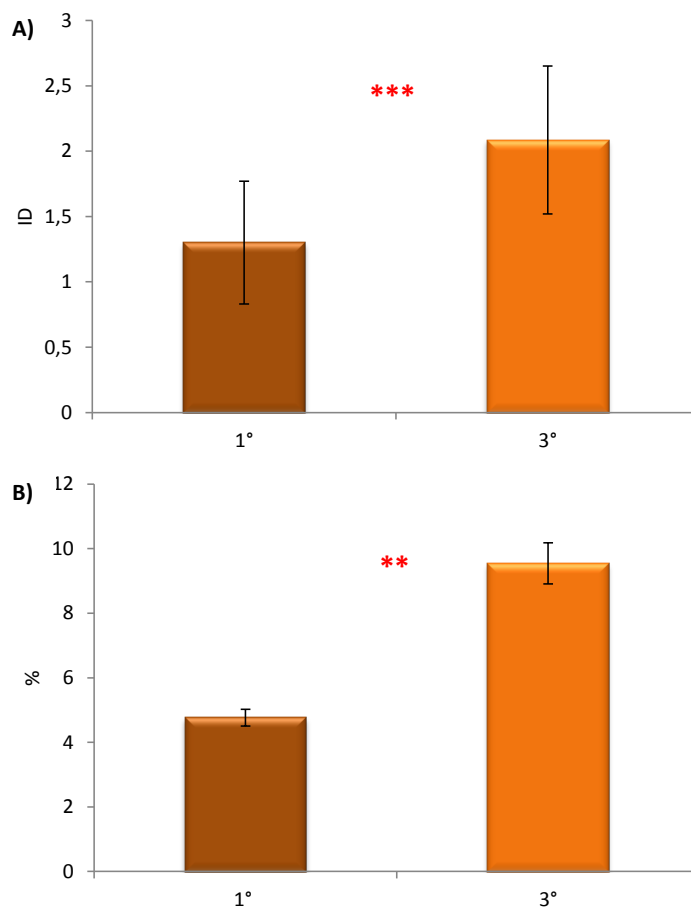


Figura 51 - A) Indice di danno “ID”: media \pm deviazione standard nei controlli “C” e nei trattati “T” al 3° e 6° mese. B) area danneggiata percentuale “%D”: media \pm deviazione standard nei controlli “C” e nei trattati “T” al 3° e 6° mese. Gli asterischi indicano il livello della significatività riportato in Tab. 30: $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

Tabella 30 - A) Indice di danno “ID”: confronto tra i trattati “T” del 1° e 3° mese. B) area danneggiata percentuale “%D”: confronto tra i trattati “T” del 1° e 3° mese. F: risultati del mixed model ANOVA con sottoscritti i gradi di libertà; p : valore del livello di significatività.

A	ID	$F_{1,75}$	p
	1° vs 3°	30.883	0.000
B	%D	$F_{1,35}$	p
	1° vs 3°	9.803	0.002

Il danno sulle conchiglie è stato osservato solo nei trattati (Fig. 50) ed è stato misurato all’inizio della sua comparsa (dopo circa un mese) e alla fine della sperimentazione. Il valore dell’indice di danno è stato 1.3 alla fine del primo mese e 2 alla fine del terzo con un’evidente rottura e sollevamento del periostraco (Fig. 51). Tale aumento dell’indice di danno è risultato statisticamente significativo (Tab. 30). Anche nella seconda sperimentazione il danno è comparso nell’area

umbonale, a partire dalla quale è progressivamente aumentata la sua estensione lungo l'asse maggiore (Fig. 50). Il confronto tra l'estensione dell'area di danno misurata al primo mese (4%) e al terzo (10%) è risultato significativo (Tab. 30).

5. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni molte ricerche sono state focalizzate allo studio dei cambiamenti climatici. Il crescente interesse verso tale problematica è legato alla necessità di valutare gli effetti di questo fenomeno sugli organismi e sul loro ambiente e comprendere quindi quali conseguenze avranno a livello ecologico.

Il Mare Adriatico, ed in particolar modo il suo bacino settentrionale, rappresentano un esempio di ambiente che potrebbe subire in un prossimo futuro e in maniera più marcata gli effetti negativi dei cambiamenti climatici, vista la ridotta profondità, le limitate dimensioni ed il forte grado di antropizzazione. Infatti, tali caratteristiche predispongono l'Alto Adriatico ad un maggior rischio di possibili variazioni a livello termico, con un progressivo aumento della temperatura, e a variazioni della salinità legate al fenomeno difficilmente prevedibile di un incremento dell'evaporazione o della piovosità. A tali condizioni si aggiunge il possibile insorgere del fenomeno dell'acidificazione del mare causato da eccessivo apporto di CO₂ di origine antropica.

In questo contesto, la presente ricerca fornisce un quadro di conoscenze utili alla valutazione degli effetti che i cambiamenti climatici, caratterizzati da fenomeni di acidificazione, di aumento termico e dalla variazione di salinità, potrebbero avere in quattro specie di molluschi bivalvi diffuse in Alto Adriatico e distribuite secondo un gradiente costa-largo. Si è infatti voluto indagare il grado di tolleranza agli effetti dei cambiamenti climatici, e dell'acidificazione in particolare, in animali provenienti da habitat diversi. Sono state oggetto di studio sia specie tipiche di un ambiente costiero, adattate a tollerare variazioni ambientali maggiori, sia specie di un habitat tipicamente marino, adattate a vivere in condizioni di limitata variabilità ambientale. Sono state inoltre considerate sia specie che come habitat hanno la colonna d'acqua, sia specie fossorie che vivono nei sedimenti, poiché anche tali condizioni potrebbero rendere gli animali diversamente suscettibili ai cambiamenti climatici e alle loro dirette conseguenze. Sono stati considerati infine organismi in diversi momenti del ciclo vitale, adulti e giovanili, così come diversi tempi di esposizione alla variazione dei parametri ambientali.

Per apprezzare il diverso grado di risposta di queste specie alle future condizioni ambientali sono stati valutati specifici biomarkers a livello biochimico, cellulare e fisiologico, ma anche processi come la crescita e la comparsa di alterazioni della conchiglia legate ai cambiamenti nella chimica dei carbonati che si associano al fenomeno dell'acidificazione dell'acqua di mare.

5.1 Risposte fisiologiche

L'applicazione di biomarkers fisiologici costituisce, in questo studio, un approccio nella valutazione degli effetti dei parametri chimico-fisici negli esperimenti a breve e lungo termine.

I risultati relativi alle misure fisiologiche hanno mostrato pattern di risposta molto variabili tra le specie, le quali hanno messo in luce diverse capacità di modulazione delle risposte indagate in funzione della variazione dei fattori saggiati.

In generale, la plasticità delle risposte fisiologiche degli organismi può rappresentare una strategia per far fronte ad accresciute condizioni di stress ambientale. In particolare, l'aumento del metabolismo, attraverso l'aumento dei tassi fisiologici, costituisce una risposta alla richiesta di energia necessaria a far fronte ad uno stress e mantenere l'omeostasi. Al contrario, una depressione, può rappresentare una misura conservativa che permette agli organismi di sopravvivere fino al ritorno delle condizioni ottimali (Lannig *et al.*, 2010) o un danno che impedisce lo svolgimento delle normali attività fisiologiche (Widdows, 1985).

Tra le diverse misure fisiologiche, il tasso di filtrazione riflette maggiormente situazioni di stress, poiché quando l'animale viene a trovarsi in uno stato di sofferenza si riduce anche la sua capacità di alimentarsi (Widdows & Johnson, 1988). I bivalvi possono altresì aumentare il loro tasso di filtrazione per soddisfare una maggiore richiesta di energia (Deslous-Paoli *et al.*, 1987; Dupuy *et al.*, 2000), garantendo i principali processi vitali, tra cui la riproduzione (Beesley *et al.*, 2008). Le risposte relative a tale parametro sono state molto variabili a tal punto da evidenziare pattern di variazione anche molto diversi nella stessa specie al variare delle condizioni sperimentali. A 34 psu è stato osservato un aumento del tasso di filtrazione in *M. galloprovincialis* e *C. chione*, mentre una depressione è stata rilevata in *C. gallina* e *M. varia* in condizioni di acidificazione e aumento termico. Probabilmente, in queste condizioni ambientali, *M. galloprovincialis* e *C. chione* adottano una strategia che mira ad aumentare l'apporto energetico mediante un incremento della filtrazione. Al contrario, *C. gallina* e *M. varia* che hanno mostrato una generale riduzione della filtrazione potrebbero manifestare in un futuro scenario di cambiamenti climatici conseguenze particolarmente negative. Una riduzione della filtrazione è stata in generale riscontrata in *C. gallina*, in condizioni sia ipo- che iperaline, a conferma della limitata tolleranza della specie a variazioni di salinità (Matozzo *et al.*, 2007). Il mitilo invece sembra risentire meno l'effetto di condizioni ipoaline, rispetto a quelle iperaline dove manifesta una forte riduzione della capacità di alimentarsi. Un effetto dell'acidificazione sulla filtrazione è stato riportato in un recente studio condotto da Fernández-Reiriz *et al.* (2011) su *R. decussatus*, dove si è riscontrata una

riduzione della filtrazione nei bivalvi esposti a bassi valori di pH (-0,4; -0,7 rispetto al valore naturale pH 8.16), in una sperimentazione della durata di 87 giorni. Anche giovanili di *Saccostrea glomerata* e *C. gigas* esposti ad una riduzione di pH (7.8) ed a un aumento della temperatura (25°C) hanno manifestato una riduzione del tasso di filtrazione (Parker *et al.*, 2010).

La diversa risposta alla salinità in mitilo e vongola fa probabilmente ritenere che a basse salinità il mitilo sia in grado di rispondere più efficacemente della vongola a condizioni di stress associate ad abbassamenti di pH e di innalzamento termico. Al contrario, per entrambe le specie, condizioni iperaline, di basso pH e di alta temperatura, potrebbero rappresentare una condizione di rischio. Le sperimentazioni a lungo termine hanno messo in evidenza che l'acidificazione potrebbe essere un fattore di stress cronico, sia per i giovanili di mitilo sia per quelli di vongola. In entrambe le specie infatti la capacità di alimentarsi è risultata significativamente ridotta. Tale riduzione è estremamente negativa soprattutto per i giovanili poiché può ridurre l'apporto energetico necessario a sostenere la crescita (Thomsen & Melzner, 2010). Non si può quindi escludere che una delle cause dell'alto tasso di mortalità riscontrato tra i giovanili esposti all'acidificazione, sia almeno in parte conseguenza della ridotta capacità di alimentarsi. I bivalvi sono animali eterotermi e l'aumento del loro metabolismo in primavera, in corrispondenza dell'ultimo periodo della sperimentazione, quando si è verificato un aumento della temperatura, potrebbe non essere stato sostenuto da un adeguato apporto alimentare.

Il tasso di respirazione sembra non aver presentato un chiaro andamento e l'interpretazione dei risultati è stata problematica. Al contrario di quanto è stato osservato in altre sperimentazioni in *M. edulis*, *C. virginica*, *C. gigas* e *R. decussatus*, nelle quali il tasso di respirazione è diminuito in condizioni di acidificazione (Wilson & Burnett, 2000; Michaelidis *et al.*, 2005; Lannig *et al.*, 2010; Fernández-Reiriz *et al.*, 2011), tutte le specie indagate nel presente studio hanno mostrato un aumento del consumo di ossigeno a pH ridotto. Tale aumento è stato in genere enfatizzato dall'alta temperatura. Va comunque segnalata l'unica eccezione di riduzione significativa del tasso per *M. varia* a pH 7.4 e ad alta temperatura. È importante considerare che nei bivalvi la respirazione è il meccanismo fisiologico che determina il consumo maggiore di energia, come dimostrato da studi in *Meretrix meretrix*, *C. farreri* e in altre specie (Bayne & Newell 1983; Wang *et al.*, 2004; Zhuang & Liu, 2006). Quindi l'aumento del tasso di respirazione dopo una breve esposizione alle diverse condizioni di temperatura e pH potrebbe essere indice di uno stress ancora in atto fase di compensazione. Al contrario, nelle sperimentazioni a lungo termine non si sono evidenziate differenze significative del tasso di respirazione tra controlli e trattati a basso pH. Tale risposta fisiologica potrebbe essere attribuita ad una forma di adattamento avvenuta durante il lungo periodo di esposizione.

Per avere a disposizione un ulteriore elemento di valutazione dello stato di salute dei bivalvi, in un quadro così complesso di variabili, è stato analizzato il tasso di escrezione. Molti Autori hanno messo in evidenza che lo ione ammonio è la componente azotata escreta in maggior quantità dai bivalvi e può subire variazioni in funzione delle condizioni ambientali e stagionali (Grants & Thorpe, 1991; Vedpathak *et al.*, 2008), in funzione di una riduzione della salinità come visto in *C. farreri* (Yang *et al.*, 1999), in funzione del livello metabolico (Bacon & McDonald, 1991), o in presenza di contaminanti (Bayne & Widdows, 1978; Widdows, 1978). In tutte le specie oggetto di questo studio, il tasso di escrezione è risultato condizionato prevalentemente dall'aumento della temperatura, anche se in *C. gallina* è stato evidenziato un aumento significativo dell'escrezione in funzione della diminuzione del pH a 40 psu. Un significativo aumento del tasso di escrezione è stato osservato anche nei giovanili di *C. gallina* in presenza di acidificazione, confermando quanto riscontrato in analoghe condizioni sperimentali sui giovanili di un altro Veneridae, *R. decussatus* (Fernández-Reiriz *et al.*, 2011).

Nelle sperimentazioni a lungo termine è stato inoltre calcolato il rapporto O:N. Tale rapporto rappresenta un indice di utilizzo delle proteine nel metabolismo energetico (Bayne, 1976; Bayne & Widdows, 1978). Elevati valori del rapporto O:N danno evidenza di una prevalente attività catabolica a carico di carboidrati e lipidi, espressione dei normali processi metabolici. Al contrario, bassi valori indicano un elevato catabolismo proteico (Bayne, 1976). Alla luce di questo, le sperimentazioni hanno messo in evidenza una condizione di stress al sesto mese per entrambe le specie nei bivalvi esposti a pH 7.4, poiché hanno fatto registrare un rapporto O:N significativamente più basso di quello dei controlli. Un'analogha risposta è stata riscontrata da Fernández-Reiriz *et al.* 2011 per *R. decussatus* esposta a bassi valori di pH. Questa alterazione metabolica potrebbe manifestare un'incapacità di adattamento a prolungate condizioni di acidificazione per i bivalvi durante la fase di crescita e il ricorso a riserve energetiche che normalmente non vengono utilizzate, comportando una complessiva riduzione dello stato energetico dell'organismo e conseguentemente delle sue capacità di far fronte ad eventuali ulteriori condizioni di stress.

Il test della sopravvivenza in aria è stato utilizzato in molti studi per valutare condizioni di stress pregresso cui gli animali erano stati sottoposti in natura o in laboratorio (Moschino & Marin, 2006; Matozzo *et al.*, 2007; Monari *et al.*, 2007). In particolare, in *C. gallina* mantenuta a diverse condizioni di temperatura, Monari *et al.* (2007) segnalano una riduzione significativa della LT₅₀ a 30°, rispetto a 20 e 25°C; in diverse condizioni aline invece, Matozzo *et al.* (2007) riportano un calo significativo a 28 e a 40 psu, rispetto a 34 psu. Nella sperimentazione a breve termine, sia per i mitili che per le vongole, i risultati

ottenuti mostrano un'influenza della salinità sulla risposta di sopravvivenza in aria e confermano una riduzione della LT_{50} a 40 psu per vongole, mentre nei mitili la stessa salinità comporta un aumento del tempo di sopravvivenza in aria. Tuttavia, il test non è riuscito a discriminare nettamente per nessuna delle due specie le diverse combinazioni di temperatura e pH saggiate.

Nei giovanili di mitilo è stata valutata anche la produzione di filamenti di bisso, un processo biochimico associato alla disponibilità di energia per le normali attività vitali dell'organismo (Clarke & McMahon, 1996). Un'alterazione metabolica indotta da uno stress, che riduce la disponibilità di energia, può comportare la riduzione della produzione di filamenti di bisso, come è stato osservato da Clarke (1999) in *Dreissena polymorpha* mantenuta per 21 giorni in una condizione di ridotto apporto alimentare. Quindi la significativa riduzione dei filamenti di bisso riscontrata nei mitili giovanili in condizioni di acidificazione, potrebbe indicare una condizione di stress fisiologico. Anche se non esiste ancora nessun lavoro in letteratura in merito all'effetto dell'acidificazione su questo aspetto, è noto che altri fattori ambientali come, ad esempio, le alte temperature, possono debilitare i mitili e ridurre la produzione dei filamenti di bisso. Rajagopal *et al.* (1995) hanno infatti osservato nel mitilo *Perna indica* una riduzione del numero di filamenti di bisso sottoponendo in laboratorio gli animali ad una temperatura di 30°C.

5.2 Risposte biochimiche

Gli enzimi antiossidanti giocano un ruolo fondamentale nel fronteggiare lo stress ossidativo a cui sono sottoposti gli animali in presenza di molteplici fattori stressogeni. Fanno parte di questa categoria la SOD, la CAT, e la glutatione transferasi, le cui prerogative sono quelle di limitare la tossicità delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) agendo come antiossidanti. La misura della loro attività nei molluschi bivalvi viene considerata un buon indicatore per valutare il potenziale danno a carico delle componenti cellulari causato dall'esposizione ai contaminanti ambientali. Va inoltre considerato che l'induzione di questi enzimi può variare in risposta a variazioni stagionali della temperatura, della salinità, dell'ossigeno disciolto, dello stato nutrizionale e del ciclo riproduttivo degli animali (Power & Scheehan, 1996; Scheehan & Power, 1999; Livingstone, 2001). I risultati ottenuti hanno evidenziato pattern di variazione delle attività enzimatiche molto variabili tra le specie ed in molti casi la differenza tra le condizioni saggiate non è stata significativa.

La SOD è un enzima citosolico che catalizza la dismutazione dell'anione superossido (O_2^-) a perossido d'idrogeno (H_2O_2) e ossigeno (O_2) e generalmente

un aumento della SOD indica una capacità di far fronte a crescenti condizioni di stress ossidativo.

In questo studio, l'attività della SOD valutata nelle branchie e nella ghiandola digestiva degli adulti di *M. galloprovincialis* e *C. gallina* non ha evidenziato un'influenza significativa della salinità. Monari *et al.* (2007), valutando l'attività della SOD nell'emolinfa di *C. gallina*, hanno invece riscontrato che condizioni iperaline (40 psu) riducevano significativamente l'attività di questo enzima.

Al contrario dei mitili e delle vongole, *C. chione* e *M. varia* hanno mostrato una differente attività della SOD in branchie e ghiandola digestiva. In quest'ultima infatti si è osservata un'attività enzimatica maggiore rispetto alla branchia, con un più sensibile incremento in condizioni di acidificazione e di alta temperatura. Tale differenza sembra riflettere la maggiore capacità antiossidante della ghiandola digestiva rispetto alle branchie (Irato *et al.*, 2007). Negli esperimenti a lungo termine l'attività della SOD quantificata sulle parti molli ha mostrato un ordine di grandezza pari a quello rilevato nelle branchie degli adulti e nessuna variazione significativa è stata riscontrata in condizioni di pH ridotto.

La CAT è in grado di catalizzare la trasformazione del perossido d'idrogeno (H_2O_2) in acqua e ossigeno. Tra i parametri biochimici indagati, l'attività di questo enzima risulta la più influenzata dalla salinità, soprattutto quando misurata nella branchia. Infatti la branchia meglio riflette le variazioni delle condizioni ambientali presenti nell'acqua, al contrario della ghiandola digestiva che può essere maggiormente influenzata da fattori endogeni quali lo stato di nutrizione e la riproduzione (Soldatov *et al.*, 2007). Nelle sperimentazioni a breve termine sia per *M. galloprovincialis* che per *C. gallina* è stato possibile rilevare alcuni pattern di risposta specie-specifici in funzione della salinità. Nella branchia di mitilo la temperatura più alta risulta indurre la CAT soprattutto a 34 psu, mentre il pH ridotto causa un'induzione soprattutto a 40 psu. Nella branchia di *C. gallina* un incremento di attività si osserva invece alle alte temperature associate alle salinità estreme.

Proprio in *M. galloprovincialis* è stata valutata l'attività di tale enzima in risposta alla combinazione di fattori ambientali quali la temperatura e la salinità, e ad un inquinante (lindano) ed è stata osservata un'induzione ad alte temperature (25°C) e ad alte salinità (41-42 psu) (Kheissiba, 2005). Un incremento della CAT, legato a fenomeni di inquinamento, è stato osservato nel tessuto branchiale di *M. edulis* (Power & Sheehan, 1996) e nel cardide *Fulvia fragilis* (Mahmoud *et al.*, 2010). Nei giovanili della nostra sperimentazione a lungo termine è stata rilevata una maggiore capacità di rispondere allo stress ossidativo in *M. galloprovincialis* rispetto a *C. gallina*. Solo per la prima specie infatti i valori di attività enzimatica misurati negli animali trattati a pH 7.4 sono risultati significativamente superiori a quelli dei controlli.

Il GST rappresenta una famiglia di isoenzimi che catalizzano molteplici reazioni neutralizzando i perossidi ed intervenendo nei processi di biotrasformazione e detossificazione di numerosi composti di natura esogena ed endogena, facilitandone l'escrezione. Anche in questo caso nella sperimentazione a breve termine l'attività enzimatica si è mostrata significativamente influenzata dalla salinità, in particolare nella branchia di mitilo. *Soldatov et al.* 2007 riportando valutazioni dell'attività enzimatica nei principali tessuti di *M. galloprovincialis*, affermano che le branchie sono in grado di rispondere più efficacemente in termini di induzione della GST, rispetto alla ghiandola digestiva. La salinità ha discriminato in modo significativo la risposta di questo enzima, evidenziandone un incremento a 34 psu e un decremento a 28 psu, per entrambi i tessuti, all'aumentare della temperatura e al diminuire del pH. In *C. gallina* solo a 28 psu è stato possibile evidenziare per entrambi i tessuti un aumento del GST in funzione della temperatura. Inoltre, nel mitilo e nella branchia, si può ipotizzare una certa vicinanza tra GST e CAT, con un aumento dell'una in presenza di un calo dell'altra (come a 40 psu) e viceversa (28 e 34 psu), anche se in maniera diversificata a seconda dei valori di temperatura o di pH. Analogamente, nei giovanili di mitilo il calo del GST si associa ad un aumento della CAT. Probabilmente, la maggiore plasticità adattativa di *M. galloprovincialis* rispetto a *C. gallina* ha permesso di attivare e mantenere efficiente questo meccanismo di protezione.

La perossidazione dei lipidi di membrana, della quale sono responsabili i radicali liberi, avviene attraverso l'attacco degli acidi grassi insaturi presenti nei fosfolipidi della membrana citoplasmatica. Gli studi condotti sulla perossidazione lipidica descrivono un aumento del TBARS in presenza di condizioni di stress. Verlecar *et al.* (2008) hanno osservato che la perossidazione lipidica in *Perna viridis* era maggiore negli organismi esposti a Hg, al termine di un'esposizione di 14 giorni, rispetto ai controlli. Anche Kucuksezgin *et al.* (2008) hanno osservato che *M. galloprovincialis* provenienti da aree con un forte inquinamento da metalli (Hg, Cd, Pb, Cr, Cu, Zn, Mn, Fe) presentavano livelli di TBARS maggiori rispetto a quelli di mitili provenienti da un'area non inquinata. Nell'esposizione a breve termine degli adulti la perossidazione lipidica non ha mostrato chiari pattern di variazione al variare dei parametri saggiati, anche se in *C. gallina* si è evidenziata un'influenza significativa della salinità sulla risposta misurata sia nella branchia che nella ghiandola. In particolare, la mancanza di aumento dei livelli di TBARS nelle condizioni potenzialmente più stressogene (elevata temperatura e pH ridotto) suggerisce che queste ultime non causino uno stress ossidativo tale da non poter essere contrastato dai meccanismi di difesa a disposizione degli organismi. Solo in parte un aumento delle difese antiossidanti è stato rilevato dalle altre risposte enzimatiche misurate (CAT, SOD, GST) e non si può escludere la possibilità che

altre molecole enzimatiche e non, come ad esempio il glutatione, rivestano un maggiore ruolo protettivo.

E' interessante notare come nell'esposizione a lungo termine a pH ridotto, mitili e vongole presentino invece risultati opposti in relazione alla quantificazione del TBARS. Nelle vongole un valore di TBARS maggiore negli animali trattati rispetto ai controlli si accompagna però all'assenza di variazioni a carico delle altre attività enzimatiche, mentre nei mitili il calo dei livelli di TBARS negli animali esposti a pH ridotto si associa ad un aumento significativo della CAT e della SOD. Questo risultato suggerisce che *C. gallina* sia particolarmente esposta al rischio di danno ossidativo quando sottoposta per lungo tempo a condizioni di acidificazione.

Tra i vari meccanismi di protezione cellulare, le HSP (Heat Shock Protein) rivestono un ruolo importante. Nonostante la temperatura sia il principale fattore che induce l'espressione delle HSP70, anche altri fattori promuovono la loro sintesi con funzione di protezione (Harndahl *et al.*, 1999; Hamilton & Heckathorn, 2001; Iba, 2002). E' stata osservata, infatti, una loro sovraespressione in condizioni di stress chimico e fisiologico, come l'anossia in *S. typhimurium* (Spector *et al.*, 1986) o variazioni di salinità e di temperatura nei bivalvi (Werner, 2004; Monari *et al.*, 2011).

Sono invece assenti in letteratura studi relativi all'espressione delle HSP70 sui bivalvi sottoposti a diverse condizioni di pH. Questo lavoro vuole quindi rappresentare un primo tentativo, seppur modesto, di analisi di tale fenomeno. In particolare, sia in *M. galloprovincialis* e che in *C. gallina*, l'espressione delle HSP70 è stata valutata nella ghiandola digestiva, sede principale di fenomeni di detossificazione (Livingstone & Farrar, 1984) e di attività antiossidante (Irato *et al.*, 2007).

I risultati ottenuti hanno evidenziato per entrambe le specie una modulazione della risposta in funzione della salinità, ma *M. galloprovincialis* ha mostrato una capacità maggiore rispetto a *C. gallina* di rispondere alle variazioni di temperatura e pH, promuovendo rapidamente un incremento di espressione delle HSP70. Questa induzione è stata ben evidenziata soprattutto alla salinità naturale (34 psu) ed a quella bassa (28 psu), dove i livelli di HSP70 di mitilo aumentano sia con l'aumento della temperatura, sia con la diminuzione del pH. Invece in *C. gallina*, a 28 psu, si osserva una diminuzione di espressione con l'aumento della temperatura, senza variazioni apprezzabili dipendenti dal pH, mentre solo a 34 psu e alla temperatura più alta si rileva un trend crescente di espressione al diminuire del pH.

La capacità di *M. galloprovincialis* di promuovere l'espressione delle HSP70, riscontrata in questo lavoro, conferma quanto già descritto per questa specie e per *Mytilus trossulus* da Lockwood & Somero (2011) i quali hanno evidenziato una forte induzione delle HSP70 in mitili esposti ad un range di temperatura crescente,

ovvero 24°, 28°, 32°C. A tal proposito, Fields *et al.* (2006) affermano che *M. galloprovincialis* sia proprio una “warm-adapted species” in grado cioè di rispondere efficacemente ed in breve tempo a stress termici. Sempre Lockwood & Somero (2011) associano questa elevata plasticità di *M. galloprovincialis* al suo successo invasivo, come specie alloctona introdotta lungo la costa Est degli Stati Uniti d’America. Alcuni studi hanno inoltre identificato il ruolo della salinità nella regolazione di un gruppo di HSP e tra queste in modo particolare proprio le HSP70 (Lyons *et al.*, 2003), la cui induzione può essere associata alla risposta ad uno shock osmotico. Un recente studio condotto su *C. gallina* ha evidenziato un aumento delle HSP70 nelle vongole esposte a basse e alte salinità, rispettivamente nelle branchie (40 psu) e nella ghiandola digestiva (28 psu) (Monari *et al.*, 2011). Studi sui salmonidi hanno messo in evidenza l’induzione delle HSP70 in risposta a stress sia ipo- che iperosmotici (Smith *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 2008). Condizioni più lontane dall’ottimalità per quanto riguarda la tolleranza alina in *C. gallina*, in particolare la bassa salinità, appaiono inibire una sovraespressione delle HSP70, all’aumentare della temperatura e/o al diminuire del pH. Poiché le HSP sono proteine ATP dipendenti (Feige & Van Eden, 1996; Roberts *et al.*, 1997) è probabile che l’energia richiesta per l’osmoregolazione in condizioni ipoaline non sia stata sufficiente per sostenere una sovraespressione delle HSP70. Un’analoga situazione è stata infatti osservata nel bivalve *Potamocorbula amurensis* (Werner, 2004) in condizione di stress ipoosmotico. Complessivamente i biomarkers biochimici misurati in numero mitilo e nella vongola, hanno evidenziato una risposta più marcata in *M. galloprovincialis* rispetto a *C. gallina* alle variazioni di temperatura e pH. Il mitilo ha mostrato una maggiore capacità di adattamento grazie alla possibilità di modulare la risposta antiossidante e l’espressione delle HSP70 in funzione del livello di stress al quale è stato sottoposto.

5.3 Risposte immunologiche

Nei molluschi bivalvi gli emociti sono coinvolti in importanti funzioni, quali la difesa immunitaria (Cheng, 1981; Hine, 1999; Cima *et al.*, 2000; Donaghy *et al.*, 2009) e la deposizione della conchiglia (Mount *et al.*, 2004). A livello immunitario, la risposta indotta da agenti patogeni consiste nell’emocitosi (aumento degli emociti circolanti), nella fagocitosi o pinocitosi (in funzione della taglia della particella da inglobare), ma anche nella produzione di enzimi litici lisosomiali, in particolare il lizozima. Numerosi studi hanno dimostrato che fattori, sia abiotici che biotici, possono alterare la funzionalità degli emociti nei bivalvi, causando in questo modo una riduzione dell’immunosorveglianza.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che le condizioni sperimentali hanno alterato significativamente questi parametri cellulari e che ogni specie ha mostrato un pattern specifico di risposta.

Nei molluschi bivalvi un incremento del THC può essere il risultato di una proliferazione degli emociti o di un loro movimento dai tessuti all'emolinfa, mentre un decremento può essere dovuto a fenomeni di lisi cellulare o ad un aumento del movimento degli emociti dall'emolinfa ai tessuti (Pipe & Coles, 1995). In tutte le sperimentazioni sono stati osservati diversi pattern di variazione, sia rispetto al fattore salinità (nel caso di mitilo e vongola), sia rispetto alla temperatura e al pH nelle quattro le specie. Alla salinità naturale di 34psu, in condizione di acidificazione e di alta temperatura, l'andamento del THC ha mostrato un incremento in *C. gallina* e *C. chione* ed un decremento in *M. galloprovincialis* e *M. varia*. La risposta del THC viene maggiormente influenzata dal variare della salinità nel mitilo rispetto alla vongola.

E' tuttavia interessante notare che alte temperature e bassi pH causano un decremento nei valori di THC soprattutto a 28 psu in *C. gallina*, nel mitilo una diminuzione si osserva alle stesse condizioni a 40 psu. Questi risultati evidenziano come la risposta dell'immunomarker rifletta le diverse caratteristiche delle due specie, con il mitilo organismo diffuso in ambienti estuarini, dove ridotti valori di salinità sono frequenti, e la vongola più tipicamente marina e stenoalina. Per quanto riguarda gli effetti dell'acidificazione, il decremento generalmente osservato nel mitilo è in accordo con quanto riportato da Hernroth *et al.*, 2011 nell'echinoderma *Asterias rubens* che, dopo una settimana di esposizione a pH 7.7, mostra una riduzione significativa del numero degli emociti circolanti rispetto al controllo (pH 8.1). Al contrario, Bibby *et al.* (2008) hanno evidenziato che in *M. edulis* il THC non varia in modo significativo dopo 32 giorni di esposizione a valori di pH bassi (fino a 6.5) e rispetto ad animali mantenuti a pH 7.9 come controllo. E' tuttavia da rilevare come, rispetto al presente studio, quello di Bibby *et al.* (2008) sia caratterizzato da diverse condizioni sperimentali, come la durata più lunga dell'esposizione a pH ridotto e l'assenza di combinazione con altri fattori sperimentali come salinità e temperatura.

Sulla base dei risultati ottenuti per il THC, l'aumento dell'acidificazione e della temperatura si configurano come condizioni stressogene, poiché hanno promosso meccanismi di modulazione del numero degli emociti circolanti in tutte le specie.

Numerosi studi hanno mostrato che l'attività endocitotica dei molluschi bivalvi, in particolare la fagocitosi, può venire negativamente influenzata sia dall'esposizione a xenobiotici, sia dalle variazioni delle condizioni ambientali (Oliver & Fisher, 1999). In questo lavoro è stata valutata la capacità di assunzione del Rosso Neutro da parte degli emociti (NRU), attraverso un saggio rapido, sensibile ed efficace, in grado di stimare la potenziale efficienza degli emociti nella fagocitosi (Munari *et*

al., 2011) e di indagare al contempo la stabilità della loro membrana. Il Rosso Neutro è un colorante vitale, molto usato nei saggi *in vitro* sui bivalvi per valutare gli effetti di agenti stressogeni, in relazione non solo al suo accumulo all'interno degli emociti, ma anche ai tempi di ritenzione all'interno dei lisosomi (Hauton *et al.*, 1998; Matozzo *et al.*, 2001; Canesi *et al.*, 2007; Binelli *et al.*, 2009). L'assunzione di questo colorante cationico negli emociti può essere legata sia a meccanismi di pinocitosi, sia a diffusione passiva, mentre cellule non vitali non sono in grado di assumerlo e trattenerlo (Coles *et al.*, 1995). Si ritiene, dunque, che differenti gradi di ritenzione del colorante potrebbero riflettere un possibile danno alle membrane e/o l'alterazione della capacità pinocitotica degli emociti stessi. *C. gallina* ha mostrato un differente pattern di variazione dell'NRU in condizioni di acidificazione e di alta temperatura nelle sperimentazioni a 28 e 40 psu, con un aumento dei valori di NRU a 28 e una diminuzione a 40 psu. Questi risultati suggeriscono una stimolazione dell'attività pinocitotica a 28 psu: è possibile che a questa salinità lo stress dovuto all'aumento di temperatura e alla diminuzione del pH induca gli emociti ad una maggiore attività, compensando così almeno in parte la riduzione del loro numero, ovvero del THC. Precedenti studi hanno dimostrato che *C. gallina* esposta per 7 giorni a condizioni di iposalinità (28 psu) e ipersalinità (40 psu) (Matozzo *et al.*, 2007), così come ad alte temperature (30°C) (Monari *et al.*, 2007), mostra una significativa riduzione dell'attività fagocitica. Questi risultati e quelli ottenuti nel presente studio suggeriscono che la variazione di un singolo fattore ambientale può indurre una risposta cellulare diversa rispetto a quella che si può osservare quando vengono saggiate combinazioni di più fattori. E' stato inoltre interessante osservare come nelle vongole mantenute a 34 psu il pattern di variazione dell'NRU sia stato simile a quello degli animali trattati a 28 psu. Relativamente agli aspetti della funzionalità cellulare considerati nel saggio dell'NRU, le combinazioni di basso pH e di alta temperatura sembrano creare condizioni di maggiore stress a salinità più elevate rispetto a quelle basse e/o naturali.

Anche in *M. galloprovincialis* i pattern di variazione dell'NRU sono stati differenti nelle tre sperimentazioni. Infatti i valori sono diminuiti nei mitili mantenuti a pH acido e ad alta temperatura, a 28 e 34 psu, mentre non è stata evidenziata una variazione lineare a 40 psu.

Come in *M. gallorovincialis* a 34 psu, anche *C. chione* e *M. varia* hanno mostrato una diminuzione della capacità di assumere il Rosso Neutro in condizione di acidificazione e di alta temperatura. Una diminuzione analoga e significativa è stata riscontrata nel processo di fagocitosi in *M. edulis* dopo esposizione per 16 e 32 giorni a pH acido (pH 7.7, 7.5, 6.7) a 34 psu (Bibby *et al.*, 2008). Analogamente, in *A. rubens* esposta per 7 giorni a pH 7.7 è stata evidenziata una riduzione dell'attività fagocitica dei celomociti rispetto al controllo mantenuto a pH 8.1 (Hernroth *et al.*, 2011).

Negli emociti dei bivalvi, il rilascio di enzimi idrolitici è una componente importante nella difesa immunitaria dai microorganismi (Canesi *et al.*, 2002). In particolare il lisozima è uno dei più importanti agenti batteriolitici contro i batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi; viene sintetizzato negli emociti dei bivalvi e successivamente secreto nell'emolinfa durante la fagocitosi (Cheng *et al.*, 1975). In questo studio, è stata quantificata l'attività del lisozima rilasciato nell'emolinfa dalle cellule in essa circolanti per valutare un possibile effetto negativo dovuto alle condizioni sperimentali saggiate. I risultati ottenuti sono di difficile interpretazione, soprattutto per due ragioni, ovvero l'assenza di lavori sui bivalvi in merito all'attività del lisozima in condizione di acidificazione dell'acqua di mare e le risposte non lineari ottenute per l'attività di questo enzima nelle diverse sperimentazioni. In ogni caso, *C. gallina* esposta a bassi pH ha mostrato una significativa riduzione dell'attività enzimatica a 28 psu, mentre l'interazione pH/temperatura ha influenzato l'attività sia a 28 che a 34 psu. Non solo, è stato interessante notare, inoltre, come il pattern di variazione del lisozima sia lo stesso a 28 ed a 34 psu. La salinità più alta (40 psu) invece sembra abbia mitigato l'effetto di pH e temperatura, facendo così registrare solo limitate differenze tra le diverse combinazioni saggiate. In *M. galloprovincialis* a 28 psu il pH ridotto e l'alta temperatura hanno influenzato in modo opposto l'attività del lisozima, tanto che, all'aumento dell'acidificazione è corrisposta una diminuzione dell'attività enzimatica, mentre all'aumento della temperatura ne è stato rilevato un aumento. Sempre nei mitili, a 40 psu il pH e l'interazione pH/temperatura hanno influenzato l'attività del lisozima, che risulta significativamente maggiore nei mitili esposti alle condizioni di bassa acidificazione (pH 7.7) e alta temperatura, rispetto ai controlli. L'attività del lisozima in *C. chione* non ha mostrato nessuna risposta in funzione della temperatura o del pH. Rispetto alle altre tre specie, *M. varia* ha invece dato evidenza di una forte induzione enzimatica in funzione esclusivamente della temperatura. Risulta quindi evidente come la risposta del lisozima sia molto diversa a seconda della specie, anche se in presenza delle stesse condizioni ambientali. Ciò potrebbe essere in parte dovuto a diverse condizioni di ottimalità necessarie per l'espressione dell'attività del lisozima nei bivalvi. E' probabile comunque che il rilascio di lisozima dagli emociti nell'emolinfa sia la conseguenza di una ridotta stabilità delle membrane, anche se non può essere escluso il tentativo da parte dei bivalvi di incrementare il livello di immunosorveglianza a livello periferico. Al contrario, invece, una riduzione della secrezione del lisozima potrebbe essere associata al tentativo di ridurre il costo energetico del metabolismo cellulare degli emociti in condizioni di stress. Anche in questo caso, la variabilità dei pattern di risposta potrebbe indicare la diversa capacità delle specie di rispondere alle variazioni dei parametri ambientali saggiati.

5.4 Crescita, mortalità e danno alla conchiglia nei giovanili

Le sperimentazioni sui giovanili hanno permesso di valutare l'effetto dell'acidificazione sulla crescita del mitilo e della vongola, inoltre in entrambe le specie è stato possibile valutare e quantificare la comparsa e la progressione di un danno a carico della superficie esterna della conchiglia.

L'accrescimento in lunghezza e quello in peso riscontrati nei giovanili di mitilo mantenuti a pH 7.4 in entrambe le sperimentazioni, non sembrano aver risentito dell'effetto dell'acidificazione, non avendo mostrato differenze significative rispetto ai controlli. Un pattern positivo di crescita in condizioni di acidificazione senza differenze significative rispetto al controllo è stato registrato anche da Thomsen *et al.* (2010), i quali hanno riscontrato che la lunghezza di giovanili (13-22 mm) di *M. edulis* esposti ad pH 7.72 era aumentata in modo simile a quella dei controlli mantenuti a pH 8.1. Da sottolineare comunque che il valore di pH usato per l'esperimento (7.72) era notevolmente superiore a quello (7.4) di questa sperimentazione. Ancora, giovanili di *M. edulis*, esposti per 44 giorni a valori di pH compresi tra 8.1 e 6.7, hanno fatto riscontrare un accrescimento significativamente ridotto solo a pH <7.1, ma non a pH 7.4 (Berge *et al.*, 2006).

Gli esemplari giovanili di *C. gallina*, utilizzati solo nella sperimentazione durata sei mesi, sembrano aver risentito del trattamento molto più dei mitili. Nel considerare i risultati ottenuti va ricordato che gli animali sono stati mantenuti nelle vasche sperimentali in assenza di sedimento. Questa scelta, determinata da motivi tecnici legati alla gestione dei bivalvi, può aver causato condizioni di allevamento troppo lontane da quelle ottimali per questa specie, e aver reso particolarmente difficile la crescita anche per i controlli. Le vongole esposte al pH naturale hanno mostrato comunque una crescita, seppur modesta, al termine della sperimentazione, mentre quelle trattate hanno mostrato un risultato apparentemente sorprendente, ovvero un decremento significativo dei due parametri di crescita considerati (lunghezza e peso).

Mettendo in relazione la crescita al tasso di filtrazione per valutare un possibile effetto negativo della ridotta capacità di alimentarsi e quindi di sostenere i normali processi biologici, appare evidente una diversa risposta da parte delle due specie. I mitili trattati, nonostante abbiano manifestato una riduzione significativa del tasso di filtrazione, sono riusciti ad alimentarsi a sufficienza, permettendo un incremento di lunghezza e peso pari a quello dei controlli, mentre questo non è accaduto nelle vongole. Bisogna sottolineare che il tasso di filtrazione è stato misurato solo alla fine della sperimentazione e quindi non si può escludere che la sua riduzione sia comparsa in tempi diversi nelle due specie. Forse, una riduzione precoce e più marcata del tasso di filtrazione in *C. gallina* rispetto al mitilo, potrebbe non aver sostenuto a sufficienza la richiesta energetica durante questa fase di crescita.

Per entrambe le specie è stata registrata un'elevata e significativa mortalità al termine della sperimentazione semestrale. Questa condizione si è manifestata soprattutto in corrispondenza dell'aumento primaverile della temperatura dell'acqua. I bivalvi in quanto animali eterotermi aumentano il loro metabolismo all'aumentare della temperatura. La mortalità potrebbe quindi essere il risultato di una generale alterazione fisiologica verificatasi durante la sperimentazione nei bivalvi esposti a pH 7.4, i quali hanno presentato, oltre ad una riduzione del tasso di filtrazione, anche un elevato tasso di escrezione ed un basso rapporto O:N. Questa condizione fisiologica causata da una prolungata esposizione all'acidificazione ha probabilmente compromesso la capacità degli organismi di rispondere ad un aumento termico, con un aumento dei tassi metabolici. Un'alterazione fisiologica è stata trovata anche da Michaelidis *et al.* (2005) sia in adulti che in giovanili (5-25 mm di lunghezza) di *M. galloprovincialis*, che, esposti a pH 7.3 per tre mesi, hanno manifestato una riduzione del tasso di respirazione, un incremento del tasso di escrezione ed una riduzione della crescita in lunghezza ed in peso.

Nonostante i giovanili di entrambe le specie esposti a pH 7.4 abbiano presentato un'alterazione della conchiglia, tale danno si è manifestato con differenti modalità, non solo per quanto riguarda la sua progressione durante la sperimentazione, ma anche perché nelle vongole si è riscontrato un danno, seppure limitato, anche sulla superficie interna. Per comprendere il fenomeno dell'erosione della conchiglia è stata effettuata l'analisi chimica dell'acqua di mare durante la seconda sperimentazione, valutando con particolare attenzione lo stato di saturazione dell'aragonite e della calcite. Il dato certamente più evidente è stato il raggiungimento di un livello di sottosaturazione dell'aragonite durante tutto l'esperimento, mentre la calcite, sebbene in media non sia scesa sotto il livello di saturazione (> 1), ha comunque presentato occasionalmente valori di sottosaturazione (< 1). Analoghe condizioni di sottosaturazione sono state rilevate da Thomsen *et al.* (2010), durante una sperimentazione su *M. edulis* esposto a condizioni di acidificazione. Il danno sulla superficie delle conchiglie riscontrato da Thomsen *et al.* (2010) presenta la stessa tipologia, anche se con estensione minore, rispetto al danno riscontrato durante le sperimentazioni su *M. galloprovincialis*. E' quindi possibile ritenere che lo stato di sottosaturazione delle due forme di carbonato di calcio sia la principale causa della corrosione delle conchiglie sia del mitilo che della vongola.

Il danno al periostraco esibito sia dal mitilo che dalla vongola può rendere l'animale più vulnerabile all'attacco da parte di predatori e patogeni macro- e microscopici. Infatti il periostraco, come notato da Wahl *et al.* (1998) prima, e successivamente da Scardino *et al.* (2003), svolge una funzione antifouling, impedendo l'insediamento di organismi incrostanti sulla superficie della conchiglia. Anche se alcuni studi hanno dimostrato che l'erosione del periostraco

può essere un fenomeno naturale che avviene a causa dell'invecchiamento della conchiglia o della turbolenza dell'acqua (Roper & Hickey, 1994), in questo caso l'erosione del periostraco è imputabile all'azione del pH, in quanto i mitili e le vongole nelle nostre vasche di controllo non hanno presentato alcun danno alla conchiglia.

Ai lavori appena citati per specie del genere *Mytilus* si aggiungono altre pubblicazioni (Kurihara *et al.*, 2007; Beesley *et al.*, 2008; Sokolowski *et al.*, 2008; Gazeau *et al.*, 2010) che mostrano quanto più comune sia la ricerca sugli effetti dell'acidificazione sui mitilidi rispetto ai veneridi (Bamber, 1987; Green *et al.*, 2004, 2009), ed in particolare rispetto a *C. gallina*, per la quale non esiste alcun dato pubblicato. Le differenze tra i diversi esperimenti sopracitati sono state soprattutto relative a diversi momenti del ciclo ontologico (es. gameti, zigoti, larve, giovanili, adulti) e alla durata della sperimentazione. Alcuni studi hanno riguardato gli effetti sulla sopravvivenza o sulla crescita, altri sulle risposte immunitarie o sulle condizioni di benessere dei bivalvi. Da segnalare inoltre che almeno in alcuni degli studi sui veneridi è stato manipolato il pH dei sedimenti in cui questi animali vivono infossati, e quindi i dati disponibili sono solo parzialmente confrontabili con i nostri.

Olkurihara *et al.* (2007) hanno verificato che il tasso di fecondazione in *M. galloprovincialis* e *C. gigas* non viene modificato da variazioni del pH, almeno fino a 7.4. Con il procedere dello sviluppo, a partire soprattutto dall'inizio della deposizione della conchiglia larvale, cominciano ad evidenziarsi alcuni problemi. Ma mentre nell'ostrica il 70% delle larve è privo di conchiglia, nel mitilo tutte le larve presentano conchiglia calcificata, anche se di dimensioni ridotte (-20%) e con una forma alterata rispetto al controllo.

Lavorando su stadi larvali di *M. edulis*, Gazeau *et al.* (2010) hanno rilevato una riduzione della crescita della conchiglia dei trattati del 4.5% a pH 7.8 e del 12.7% a pH 7.6. Sebbene questi risultati evidenzino la capacità di formare una conchiglia da parte delle larve anche in acqua a pH ridotto e sottosaturata rispetto all'aragonite ($\Omega_a = 0,81$), secondo gli Autori i ridotti tassi di schiusa e la ridotta crescita larvale potrebbero risolversi comunque in una forte riduzione dell'insediamento e del successivo reclutamento.

Tali dati evidenziano un'estrema sensibilità dei mitili all'abbassamento del pH e all'ipercapnia nei primi stadi di sviluppo. È necessario segnalare che la prodossoconca I e II, che costituiscono la parte della conchiglia deposta durante lo sviluppo larvale, sono principalmente composte di aragonite e quindi particolarmente a rischio di mancata deposizione in condizioni di acidificazione.

Alcuni Autori segnalano che i bivalvi possono usare il meccanismo di dissoluzione della conchiglia già deposta in precedenza per tamponare l'acidosi extracellulare, che si viene a determinare in conseguenza di aumenti anche modesti dell'ipercapnia, soprattutto se protratta per lunghi periodi di tempo (mesi)

(Michaelidis *et al.*, 2005). In condizioni di anaerobiosi, è anche nota per alcuni bivalvi, la capacità di dissoluzione della conchiglia a partire dalla superficie interna per tamponare la riduzione del pH extracellulare, dissoluzione che determina una riduzione del peso (Sokolowski *et al.*, 2008). Tale condizione non si è presentata in mitilo, mentre non si può escludere che la perdita di lucentezza osservata sulla superficie interna della conchiglia della vongola dopo sei mesi di esposizione a pH 7.4 sia una conseguenza dell'instaurarsi di condizioni di acidosi nel liquido intervalvare, che hanno portato ad un'iniziale corrosione dello strato più superficiale dell'ipostraco.

Anche per alcuni veneridi sono stati compiuti studi sugli effetti dell'acidificazione. In giovanili di *M. mercenaria* (lunghezze < 2mm), pH 7.1 ha determinato la dissoluzione della conchiglia dopo 21 giorni di esposizione (Green *et al.*, 2004, 2009). Bamber (1987) ha rilevato in *R. decussatus* che l'alterazione della conchiglia è avvenuta a pH < 7.55, entro 30 giorni. La vera e propria corrosione diventava però evidente solo per pH < 6.1. A pH < 7.0 l'alimentazione è risultata inibita e sia il peso delle parti molli che la crescita sono stati significativamente ridotti. A pH < 6 si è inoltre visto che le vongole rimanevano chiuse per molto tempo, probabilmente come risposta difensiva alle avverse condizioni. Tale comportamento può ridurre l'effetto dannoso dell'acidificazione, almeno per un certo tempo, ma determina sicuramente una perdita di peso e una riduzione dell'accrescimento, nonché un accumulo di sostanze tossiche nello spazio intervalvare (Bamber, 1987).

6. CONCLUSIONI

Negli adulti la valutazione delle diverse risposte fisiologiche, immunologiche e biochimiche ha permesso di evidenziare diverse modalità di risposta al fenomeno dell'acidificazione e dell'aumento della temperatura per tutte e quattro le specie studiate ed anche in funzione della salinità per *M. galloprovincialis* e *C. gallina*. Per il mitilo e la vongola è interessante sottolineare come i parametri immunologici mostrino un effetto più marcato sia della temperatura che del pH alle salinità estreme. *C. gallina* ha inoltre una maggiore sensibilità nei confronti del pH e della temperatura alla salinità più bassa. Nei mitili l'analisi dei parametri fisiologici suggerisce che 34 e 40 psu agiscano in modo diverso nel discriminare gli effetti delle diverse condizioni sperimentali: 40 psu ha un effetto marcato soprattutto sulla filtrazione, mentre 34 e 40 psu sulla respirazione. Nelle vongole invece gli effetti dovuti alle variazioni di temperatura e di pH risultano più evidenti a 34 psu, sia per la filtrazione che per la respirazione. Nei parametri immunologici di *C. chione* e di *M. varia* la risposta maggiore appare indotta dalla temperatura che tuttavia ha influenzato non sempre nella stessa maniera le risposte delle due specie, suggerendo diversi pattern di immunomodulazione. Correlando le risposte fisiologiche a quelle immunologiche sembra che *C. chione* tenda a rispondere alla temperatura e all'acidificazione aumentando i propri tassi metabolici, mentre al contrario *M. varia* li riduce. La plasticità nelle risposte fisiologiche degli organismi può rappresentare una strategia per far fronte ad accresciute condizioni di stress ambientale. In particolare, l'aumento del metabolismo attraverso l'aumento dei tassi fisiologici può essere una risposta alla richiesta di energia necessaria per affrontare uno stress e mantenere l'omeostasi, al contrario, una sua depressione, può rappresentare una misura conservativa che permette agli organismi di sopravvivere fino al ritorno delle condizioni ottimali (Lanning *et al.*, 2010). Anche se le risposte biochimiche per tutte le specie non hanno permesso di valutare pattern di risposta specifici, l'andamento delle attività enzimatiche sembra rispondere tendenzialmente mostrando un'induzione preferibilmente legata ad un aumento termico. Probabilmente le analisi delle attività enzimatiche andrebbero monitorate durante l'intero arco delle sperimentazioni per valutare al meglio i fenomeni di induzione o depressione rilevati al termine di esse.

Nei giovanili, tutte le analisi sembrano indicare un possibile effetto dell'acidificazione per entrambe le specie, seppur con modalità differenziate. Il pH sperimentale ha rallentato la crescita in *C. gallina*, ma non in mitilo, come già segnalato da Berge *et al.* (2006). La vongola sembra meno tollerante rispetto al mitilo e mostra inoltre una dissoluzione della conchiglia più marcata in tempi più brevi. Nonostante nei mitili il danno alla conchiglia fosse evidente, essi hanno continuato ad alimentarsi nello stesso modo sia nel controllo che a pH ridotto. Nelle vongole invece le condizioni sperimentali hanno portato addirittura ad una

riduzione delle dimensioni iniziali, indicando chiaramente una situazione di stress molto elevato. A confermare le indicazioni tratte dai dati morfologici anche i parametri fisiologici mostrano nel complesso uno stress maggiore per gli animali trattati a pH ridotto, seppure con effetti più marcati nelle vongole. L'alterazione dei tassi metabolici può quindi rivelarsi un indice di incremento del costo sia per la calcificazione, sia per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, in accordo con quanto riscontrato da Thomsen & Melzner (2010) in *M. edulis*. L'analisi chimica dell'acqua ha confermato che il fenomeno della dissoluzione della conchiglia è legato principalmente alla condizione di sottosaturazione dell'aragonite e al raggiungimento di un valore limite per la sottosaturazione della calcite. Questo è in accordo con quanto rilevato da recenti studi sul danno alla conchiglia prodotto da condizioni di acidificazione in *M. edulis* (Thomsen *et al.*, 2010).

In un confronto tra specie, la diversa modulazione dei parametri fisiologici, biochimici ed immunologici nei bivalvi ha permesso di apprezzare un diverso grado di tolleranza rispetto a probabili future variazioni ambientali che caratterizzeranno il loro habitat. L'acidificazione associata ad un'alta temperatura può comportare condizioni stressogene per tutte le specie, tanto più se in presenza di variazioni di salinità. La risposta differenziata tra il mitilo e la vongola può essere attribuita alla loro diversa tolleranza alle variazioni ambientali. *C. gallina* conferma la maggiore sensibilità rispetto a *M. galloprovincialis* in un ambito di habitat costiero. La vongola è infatti una specie notoriamente poco tollerante alle variazioni sia termiche che aline (Matozzo *et al.*, 2007; Monari *et al.*, 2007), mentre il mitilo risulta ampiamente tollerante alle variazioni di molti parametri ambientali (Gosling, 1992). In un ambito marino lontano dalla costa, caratterizzato da variazioni ambientali minime, *C. chione* e *M. varia* risultano entrambe molto sensibili ad un aumento di temperatura e quindi particolarmente suscettibili alle variazioni previste in un futuro scenario di cambiamento climatico.

In conclusione, possiamo affermare che anche se a livello di specie esiste un gradiente di tolleranza, maggiore per le specie costiere e minore per quelle più tipicamente marine, le comunità di bivalvi nel Nord Adriatico potrebbero risentire dei cambiamenti climatici con conseguenze anche molto gravi. Tali conseguenze potrebbero essere amplificate in momenti critici del ciclo vitale, come ad esempio la riproduzione e i primi stadi di sviluppo. Ne potrebbero derivare diminuzioni del tasso di fecondazione o alterazioni nella formazione della conchiglia, con un possibile aumento della mortalità prima dell'insediamento e/o del reclutamento, esponendo così le popolazioni a rischio di estinzione. Negli stadi adulti, un assottigliamento della conchiglia, potrà comportare comunque un aumento del rischio di predazione e di attacco di parassiti e patogeni.

7. LETTERATURA CITATA

- Addadi L., Raz S., Weiner S., 2003 - Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its role in biomineralization. *Adv Mater*, 15: 959-970.
- Aebi H., 1984 - Catalase in vitro. *Enzymology*, 105:121-126.
- Anderson M.J., Gorley R.N., Clarke K.R., 2008 – PERMANOVA+ for PRIMER: guide to software and statistical methods. PRIMER-E, Plymouth, UK.
- Au D.W.T., 2004 - The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar Pollut Bull*, 48: 817-834.
- Augustin L., Barbante C., Barnes P.R.F., Barnola J.M., et al, 2004 - Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature*, 429: 623-628.
- Bacon C.S., Mc Donald B. A., 1991- Food quality, feeding activity and energy balance in the sea scallop, *Placopecten megalanicus*. *J Shell Fish Res*, 10: 1-3.
- Bamber R.N., 1987 - The effects of acidic sea water on young carpet shell clams *Venerupis decussate* (L.) (Bivalvia: Veneracea). *J Exp Mar Biol Ecol*, 108: 241-260.
- Barber B.J., Blake N. J., 2006 - Reproductive physiology. In: Shumway SE, Parsons GJ, eds. *Scallops: Biology, Ecology, and Aquaculture*: Elsevier. Pp 357-416.
- Barillari A., Boldrin A., Mozzi C., Rabitti S., 1978 - Alcune reazioni tra natura dei sedimenti e presenza della vongola *Chamelea (Venus) gallina* (L.) nell'Alto Adriatico, presso Venezia. *Atti Ist Veneto Sci Lett Arti* 137: 19-34.
- Barnes R.D., Rupert E.E., Fox R.S., 2004 - Zoologia degli Invertebrati, Piccin (ed), pp 410-412.
- Bayne B.L., 1976 - Marine mussels, their ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bayne B.L., 1986 - Measuring the effects of pollution at the cellular and organism level. In: G. Kulleberg (Ed.), *The role of the Oceans as a waste disposal options*. Riedel, New York, NY: 617-634.
- Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici A., Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Stebbing A.R.D., Widdows J., 1985 - The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger Publishers, NY: pp 384.
- Bayne B.L., Livingstone D.R., Moore M.N., Widdows J., 1976 - A cytochemical and a biochemical index of stress in *Mytilus edulis* L. *Mar Pollut Bull*, 7: 221-224.

- Bayne B.L., Newell R.C., 1983 - Physiological energetics of marine molluscs, In: Salevddin, A. S. M. & K. M. Wilbur (eds.) *The mollusca. Physiology Parte 1*. 4^o vol, Academic Press. New York, pp. 407-515.
- Bayne B.L., Widdows J., 1978 - The physiological ecology of two populations of *Mytilus edulis* L. *Oecologia*, 37: 137-162.
- Beesley A., Lowe D.M., Pascoe C.K., Widdicombe S., 2008 - Effect of CO₂-induced seawater acidification on the health of *Mytilus edulis*. *Dim Res*, 37:215-225.
- Berge J.A., Bjerkgeng B., Pettersen O., Schaanning M.T., Øxnevad S., 2006 - Effects of increased sea water concentration of CO₂ on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L. *Chemosphere*, 62: 681-687.
- Bibby R., Widdicombe S., Parry H., Spicer J.I., Pipe R., 2008 - Impact of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Biol*, 2: 67-74.
- Binelli A., Cogni D., Parolini M., Riva C., Provini A., 2009 - Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposures to triclosan and trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 150: 50-56.
- Bodin N., Burgeot T., Stanisiere J.Y., Bocquene G., Menard D., Minier C., 2004 - Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp. Biochem Physiol*, 138C: 411-27.
- Booij M.J., 2005 - Impact of climate change on river flooding assessed with different spatial model resolution. *J Hydrol*, 303: 176-198.
- Bradford M.M., 1976 - Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Broecker W.S., Takahashi T., 1977 - Neutralization of fossil fuel CO₂ by marine calcium carbonate. In: *The Fate of Fossil Fuel in the Oceans*. Andersen N R, Malahoff A (eds). Plenum Press. New York.
- Broecker W.S., Takahashi T., Simpson H.J., Peng T.H., 1979 - Fate of fossil fuel carbon dioxide and the global carbon budget. *Science*, 206: 409-418.
- Brooks S.P.J., de Zwaan A., van den Thillart G., Cattani O., Cortesi P., Storey K.B., 1991 - Differential survival of *Venus gallina* and *Scapharca inaequalvis* during anoxic stress: covalent modifications of phosphofructokinase and glycogen phosphorylase during anoxia. *J Comp Physiol*, 161(B): 207-212.
- Bryden H.L., Longworth H.R., Cunningham S.A., 2005 - Slowing of the Atlantic meridional overturning circulation at 25°N. *Nature*, 438: 655-657.
- Bussell J.A., Gidman E.A., Causton D.R., Gwynn-Jones D., Malham S.K., Jones M.L.M., 2008 - Changes in the immune response and metabolic fingerprint

- of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. *J Exp Mar Biol Ecol* 358: 78-85.
- Cajaraville M.P., Olabarrieta I., Marigómez I., 1996 - *Ecotox Environ Safety*, 35: 253–260.
- Caldeira K., Archer D., James P., Barry., Richard G., Bellerby J., *et al.*, 2007 - Comment on “Modernage buildup of CO₂ and its effects on seawater acidity and salinity” by Hugo A. Loaiciga. *Geophysical Research Letters* 34: L18608. doi: 10.1029/2006GL027288.
- Caldeira K., Wickett M.E., 2003 - Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425: 365.
- Caldeira K., Wickett M.E., 2005 - Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res*, 110: np.
- Canesi L., Ciacci C., Lorusso L.C., Betti M., Gallo G., Pojana G., 2007 - Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non target organisms. *Comp Biochem Physiol*, 145(C): 464-472.
- Canesi L., Gavioli M., Pruzzo C., Gallo G., 2002 - Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Techniq*, 57: 469-476.
- Carballal M.J., Lopez C., Azevedo C., Villalba A., 1997 - *In vitro* study of phagocytic Ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 7: 403-416.
- Carrington E., 2002 - The ecomechanism of mussel attachment: from molecules to ecosystem. *Integr Comp Biol*, 42: 846-852.
- Carter J.G., 1980 - Environmental and biological controls of Bivalve shell mineralogy and microstructure. In: Rhoads D C, Lutz R A, 1980. *Skeletal Growth of Aquatic Organisms: Biological Records of Environmental Change*. Plenum Press, New York (eds), pp. 69-113.
- Chapple J.P., Smerdona G.R., Berryb R.J., Hawkinsa A.J.S, 1998 - Seasonal changes in stress-70 protein levels reflects thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis* L. *J Exo Mar Biol Ecol*, 229: 53-68.
- Checa A.G., 2000 - Tissue Cell, Carter JW (ed), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes, and Evolutionary trends*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1990.
- Checa A.G., Lopez C.J., Navarro A.R., Machad J.P., 2007 - Precipitation of aragonite by calcitic bivalves in Mg-enriched marine waters. *Mar Biol*, 150: 820-827.
- Chen C.T.A., 2003 - New vs export production on the continental shelf. *Deep-Sea Res*, II 50: 1327-1333.

- Chen C.T.A, Liu K.K., Macdonald R., 2003 - Continental margin exchanges, p 53–97. In: M J R Fasham (ed), *Ocean Biogeochemistry: a JGOFS Synthesis*, Springer-Verlag.
- Chen C.T.A., Andreev A., Kim K.R., Yamamoto M., 2004 - Roles of continental shelves and marginal seas in the biogeochemical cycles of the North Pacific Ocean. *J Oceanogr*, 60: 17-44.
- Chen M., Yang H., Delaporte M., Zhao S., 2007 - Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture*, 271: 479-487.
- Cheng T.C., 1981 - Bivalves. In: Ratcliffe NA, Rowley AF (eds) *Invertebrate blood cells: general aspects, animals without true circulatory systems to cephalopods*. Academic Press, London: 233-300.
- Cheng T.C., Rodrick G. E., Foley D.A., Koehler S.A., 1975 - Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J Invertebr Pathol*, 25: 261–266.
- Cherkasov A.S., Taylor C., Sokolova I.M., 2010 - Seasonal variation in mitochondrial responses to cadmium and temperature in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) from different latitudes. *Aquat Toxicol*, 97: 68-78.
- Chora S., 2009 – Study of contaminant effects in a sentinel species, the clam *Ruditapes decussatus*, through protein expression analysis: Monitoring in marine environment. PhD thesis, University of Algarve, Faro, Portugal.
- Chu F.L.E., La Peyre J.F., 1993 - *Perkinsus marinus* susceptibility and defence related activities in eastern oyster *Crassostrea virginica*: temperature effects. *Dis Aquat Org*, 16: 223-234.
- Cima F., Bragadin M., Ballarin L., 2008 - Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes I. Sea-Nine 211TM and chlorothalonil. *Aquat Toxicol*, 86: 299-312.
- Cima F., Matozzo V., Marin M.G., Ballarin L., 2000 - Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunol*, 10: 677-693.
- Clarke M., 1999. The effect of food availability on byssogenesis by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). *J Molluscan Stud*, 65: 327-333.
- Clark M.S., Peck L.S., 2009 - Triggers of the HSP70 stress response: environmental responses and laboratory manipulation in an Antarctic marine invertebrate (*Nacella concinna*). *Cell Stress Chaperon*, 14(6): 649-660.
- Clarke M., McMahon R.F., 1996 - Effects of hypoxia and low-frequency agitation on byssogenesis in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Biol Bull*, 191: 413–420.

- Coles J.A., Farley S.R., Pipe R.K., 1995 - Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis Aquat Organ*, 22: 59-65.
- Coma R., Ribes M., Serrano E., Jimenez E., Salat J., Pascual J., 2009 - Global warming-enhanced stratification and mass mortality events in the Mediterranean. *PNAS*, 16: 6176-6181.
- Coughlan J., 1969 - The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar Biol*, 2:356-358.
- Cragg S.M., 2006 - Development, Physiology, Behavior, and Ecology of Scallop Larvae. In: Shumway SE, Parsons GJ, eds. *Scallops: Biology, Ecology, and Aquaculture*: Elsevier. pp 45-122.
- Cristiansen M.E., Costlow J.D., 1975 - The effect of salinity and cyclic temperature on larval development of the mud-crab *Rhithropanopeus harrisi* (Brachyura: Xanthidae) reared in the laboratory. *Mar Biol*, 32: 215-221.
- Crosby M.P., Roberts C.F., 1990 - Seasonal infection intensity cycle of the parasite *Perkinsus marinus* (and absence of *Haplosporidium* spp.) in oysters from a South Carolina salt marsh. *Dis aquat Org*, 9: 149-156.
- Curran M.A.J., Mark A.J., Van Ommen T.D., Morgan V.I., Phillips K.L., Palmer A.S., 2003 - Ice Core Evidence for Antarctic Sea Ice Decline Since the 1950s. *Science*, 302: 1203-1206.
- De Zwann A., Wijssman T.C.M., 1976 - Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca) I. Characteristics of anaerobic metabolism. *Comp biochem Physiol*, 54: 313-324.
- Depledge M.H., Fossi M.C., 1994 - The role of biomarker in environmental assessment: invertebrates. *Ecotoxicology*, 3: 173-179.
- Deslous-Paoli J.M., Héral M., Boromthananat W., Razet D., Garnier J., Prou J., Barillé L., 1987 - Evolution saisonnière de la filtration de bivalves intertidaux dans des conditions naturelles. *Océanis*, 13:575-579.
- Donaghy L., Lambert C., Choi K.S., Soudant P., 2009 - Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, 297: 10-24.
- Doney S.C., Fabry V. J.R., Feely R.A., Kleypas J.A., 2009 - Ocean Acidification: The other CO₂ problem. *Annu Rev Mar Sci*, 1: 169-92.
- Dupuy C., Vaquer A., Lam-Höai T., Rougier C., 2000 - Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a neutral planktonic community of the Mediterranean Thau lagoon. *Mar Ecol Prog Ser*, 205: 171-184.
- Eertman R.H.M., Wagenvoort A.J., Hummel H., Smaal A.C., 1993 - "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. *J Exp Mar Biol Ecol*, 179: 179-195.

- Eversole A.G., 2001 - Reproduction in *Mercenaria mercenaria*. In: Kraeuter JN, Castagna M, (eds). *Biology of the Hard Clam*: Elsevier. pp 221–260.
- Fabry V.J., Seibel B.A., Feely R.A., Orr J.C., 2008 - Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J Mar Sci*, 65: 414-432.
- Feely R.A., Chen C.T.A., 1982 - The effect of excess CO₂ on the calculated calcite and aragonite saturation horizons in the Northeast Pacific. *Geophys Res Lett*, 9: 1294-1297.
- Feely R.A., Orr J., Fabry V.J., Kleypas J.A., Sabine C.L., Langdon C., 2008 - Present and future changes in seawater chemistry due to ocean acidification. *Geophys Monogr Ser*, 183: 175-188.
- Feely R.A., Sabine C.L., Lee K., Berelson W., Kleypas J., Fabry V.J., 2004 - Impact of antropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the ocean. *Science*, 305: 362-366.
- Feige U., Van Eden W., 1996 - Infection, autoimmunity and autoimmune disease. *Experientia*, 77: 359-370.
- Feng S.Y., 1971 - Responses of some estuarine bivalves to temperature and salinity changes. *Proceedings of the Conference on Shellfish Culture*, Williams C (ed), Suffolk, LI, NY: 49-57.
- Fenoglio S., Bo T., Cucco M., Mercalli L., Malacarne G., 2010 - Effects of global climate change on freshwater biota: a review with special emphasis on the Italian situation. *Ital J Zool*, 77: 374-383.
- Fernández-Reiriz M.J., Range P., Álvarez-Salgado X.A., Labarta U., 2011 - Physiological energetics of juvenile clams *Ruditapes decussatus* in a high CO₂ coastal ocean. *Mar Ecol Prog Ser*, 433: 97-105.
- Fields P.A., Rudomin E.L., Somero G.N., 2006 - Temperature sensitivities of cytosolic malate dehydrogenases from native and invasive species of marine mussels (genus *Mytilus*): sequence-function linkages and correlations with biogeographic distribution. *J Exp Biol* 209: 656-667.
- Figueiredo E., Meurer B., Camara Genofre Netto G., 2009 - Effects of Temperature and Salinity on the Survival Rates of *Coxicerberus ramosae* (Albuquerque, 1978), an Interstitial Isopod of a Sandy Beach on the Coast of Brazil Vol 52, n 5: pp. 1179-1187. ISSN 1516-8913 Printed in Brazil.
- Ford S.E., 1988 - Host-parasite interaction in eastern oyster selected for resistance to *Haplosporidium nelsoni* (MSX) disease: survival mechanisms against a natural pathogen. *Am Fish Soc Sp Publ*, 18: 206-224.
- Forster G.R., 1981 - The age and growth of *Callista chione*. *J Mar Biol Ass*, 61: 881-883.
- Fränzle O., 2006 - Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecol Indic*, 6: 114-136.
- Fritz L.W., 2001 - Shell Structure and Age Determination. In: Kraeuter J N, Castagna M, (eds). *Biology of the Hard Clam*: Elsevier Science. pp 53–76.

- Froggia C., 1975 - Aspetti biologici, tecnologici e statici della pesca delle vongole (*Venus gallina*). *Quad Lab Tecnol Pesca*, 9: 7-22.
- Galloway T.S., Handy R., 2003 - Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*, 12: 345-363.
- Gaspar M.B., Leitão F., Santos M.N., Sobral M., Chícharo L., Chícharo A., Monteiro C.C., 2002 - Influence of mesh size and tooth spacing on the proportion of damaged organisms in the catches of the Portuguese clam dredge fishery. *ICES J Mar Sci*, 59:1228-1236.
- Gattuso J.P., Frankignoulle M., Wollast R., 1998 - Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Ann Rev Ecol Syst*, 29: 405-434.
- Gauthier J.D., Soniat T.M., Rogers J.S., 1990 - A parasitological survey of oysters along salinity gradients in coastal Louisiana. *J World Aquacult Soc*, 21: 105-115.
- Gazeau F., Gattuso J.P., Dawber C., Pronker A.E., Peene F., Peene J., Heip C.H.R., Middelburg J.J., 2010 - Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Biogeosciences Discuss*, 7: 2927–2947.
- Gazeau F., Quiblier C., Jansen J.M., Gattuso J.P., Middelburg J.J., Heip C.H.R., 2007 - Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophys Res Lett*, 34: L07603.
- Grants J., Thorpe B., 1991 - Effects of suspended sediment on growth, respiration, and excretion of the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *Can J Fish Aquat Sci*, 48: 1285-1292.
- Green M.A., Jones M.E., Boudreau C.L., Moore R.L., Westman B.A., 2004 - Dissolution mortality of juvenile bivalves in coastal marine deposits. *Limnol Oceanogr*, 49(3): 727-734.
- Green M.A., Waldbusser G.G., Reilly S.L., Emerson K., O'Donnell S., 2009 - Death of dissolution: sediment saturation state as a mortality factor for juvenile bivalves. *Limnol Oceanogr*, 54(4): 1037-1047.
- Griffiths C., King J.A., 1979 - Some relationships size, food availability and energy balance in the ribbed mussel *Aulacomya ater*. *Mar Biol*, 51: 141-149.
- Guinotte M.J., Fabry V.J., 2008 - Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *NYAS*, 1134: 320-342.
- Gutowska M.A., Melzner F., Langenbuch M., Bock C., Claireaux G., Pörtner H.O., 2010 - Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *J Comp Physiol, B* 180: 323-335.
- Habig W.H., Pabst M. J., Jakoby W.B., 1974 - Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249, 7130–7139.

- Hall Jr C.A., Dollase W.A., Corbato C.E., 1974 - Shell growth in *Tivela stultorum* (Mawe, 1823) and *Callista chione* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia): annual periodicity, latitudinal differences, and diminution with age. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeocol*, 15: 33-61.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1985 - Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press.
- Hall-Spencer J., Rodolfo-Metalpa R., Martin S., Ransome E., Fine M., Suzanne T. M., Rowley S. J., Tedesco D., Buia M.C., 2008 - Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature*, 454: 96-99.
- Hamilton W.E., Heckathorn S.A., 2001 - Mitochondrial adaptations to NaCl complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betanine. *Plant Physiol*, 126: 1266-1274.
- Hannam M.L., Bamber S.D., Galloway T.S., Moody A.J., Jones M.B., 2010 - Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere*, 78: 779-784.
- Harndahl U., Hall R.B., Osteryoung K.W., Vierling E., Bornman J.F., Sundby C., 1999 - The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress Chaperon*, 4: 129-138.
- Hauton C., Hawkins L.E., Hutchinson S., 1998 - The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B. Biochemistry and Molecular Biology*, 119: 619-623.
- Hawkins A.J.S., Bayne B.L., 1992 - Physiological interrelations and the regulation of production. In: Gosling, E. (Ed.), *The Mussel Mytilus, Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Amsterdam, Elsevier, pp. 171-212.
- Hernroth B., Baden S., Thorndyke M., Dupont S., 2011 - Immune suppression of the echinoderm *Asterias rubens* (L.) following long-term ocean acidification. *Aquat Toxicol*, 103: 222-224.
- Hettler W.F., 1976 - Influence of temperature and salinity on routine metabolic rate and growth of young Atlantic menhaden. *J Fish Biol*, 8(1): 55-65.
- Hildreth D.I., Crisp D.J., 1976 - A corrected formula for calculation of filtration rate of bivalve molluscs in an experimental flowing system. *J Mar Biol Assoc UK*, 56:111-120.
- Hine P.M., 1999 - The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 9: 367-385.

- Hofmann G.E., Todgham A.E., 2010 - Living in the now: Physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu Rev Physiol*, 72: 127-145.
- Houghton J.T., Ding Y., *et al.*, 2001 - IPCC Third Assessment Report - Climate Change 2001: The Scientific Basis. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- HRS-Brenko M., 1980 - The settlement of mussel and oyster in the northern Adriatic sea. *Nova Thalassa* 4 (suppl.): 67-85.
- Iba K., 2002 - Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Ann Rev Plant Biol*, 53: 225-245.
- Iglesias J.I.P., Navarro E., 1991 - Energetics of growth and reproduction in cockles (*Cerastoderma edule*): seasonal and age-dependent variations. *Mar Biol*, 111: 359-368.
- IPCC, 2007 - Summary for policymakers. In: Solomon et al. (eds), *Climate Changes 2007: The physical science basis*. Contributing of Working Group I to the fourth assessment report of the intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, UK.
- Irato P., Piccini E., Cassini A., Santovito G., 2007 - Antioxidant responses to variations in dissolved oxygen of *Scapharca inaequivalvis* and *Tapes philippinarum*, two bivalve species from the lagoon of Venice. *Marine Pollut Bull*, 54: 1020-1030.
- Jørgensen C.B., 1990 - Bivalve filter feeding, hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology. Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark.
- Jørgensen C.B., 1996. Bivalve filter feeding revisited. *Mar Ecol Prog Ser* 142: 287-302.
- Kalmar B., Greensmith L., 2009 - Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliver Rev*, 61: 310-318.
- Kay A.L., Jones R.G., Reynard N.S., 2006 - RCM rainfall for UK flood frequency estimation. II. Climate change results. *J Hydrol*, 318: 163-172.
- Khessiba A., Romeo M., Aissa P., 2005 - Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environ Pollut*, 133: 275-281.
- Kinne O., 1964 - The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II-Salinity and temperature salinity combinations. *Oceanog Mar Biol Ann Rev*, 2: 281-339.
- Kinne O., 1971 - Salinity. Animals Invertebrates, In: Kinne O. (ed) *Marine Ecology*, 2, Wiley - Interscience, New York, pp. 821-995.
- Kleypas J.A., Buddemeier R.W., Archer D., Gattuso J.P., Langdon C., Opdyke B.N., 1999 -Geochemical consequences of increased atmospheric CO₂ on coral reefs. *Science*, 284: 118-120.

- Kleypas J.A., Feely R.A., Fabry V.J., Langdon C., Sabine C.L., Robbins L.L., 2006 - Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research, report of a workshop held 18–20 April 2005, St. Petersburg, FL, sponsored by NSF, NOAA, and the U.S. Geological Survey, pp 88.
- Kobayashi I., Samata T., 2006 - Bivalve shell structure and organic matrix. *Mater Sci Eng, C* 26: 692-698.
- Kucuksezgin F., Kyatekin M., Uluturhan E., Uysal N., Acikgoz O., Gonenc S., 2008 - Preliminary investigation of sensitive biomarkers of trace metal pollution in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Izmir Bay (Turkey). *Environ Monit Assess*, 141: 339–345.
- Kurihara H., Kato S., Ishimatsu A., 2007 - Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Biol*, 1: 91-98.
- Langdon C., Broecker W.S., Hammond D.E., Glenn E., Fitzsimmons K., Nelson S.G., Peng T.H., Hajdas I., Bonani G., 2003 - Effect of elevated CO₂ on the community metabolism of an experimental coral reef. *Global Biogeochem Cycles*, 17(1): 1011.
- Langdon C., Takahashi T., Sweeney C., Chipman D., Goddard J., Marubini F., Aceves H., Barnett H., Atkinson M.J., 2000 - Effect of calcium carbonate saturation state on the calcification rate of an experimental coral reef. *Global Biogeochem Cy*, 14: 639-654.
- Lannig G., Eilers S., Hans O., Sokolova P., Bock C., 2010 - Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas* - Changes in metabolic pathways and thermal response. *Mar Drugs*, 8: 2318-2339.
- Larsen B., Pörtner H., Jensen F., 1997 – Extra - and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. *Mar Biol*, 128(2): 337-346.
- Larsen P.F., Nielsen E.E., Koed A., Thomsen D.S., Olsvik P.A., Loeschcke V., 2008 - Interpopulation differences in expression of candidate genes for salinity tolerance in winter migrating anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.). *Genetics*, 9: 1-9.
- Lester S.E., Tobin E.D., Behrens M.D., 2007 - Disease dynamics and the potential role of thermal stress in the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Can J Fish Aquat Sci*, 64: 314-323.
- Lezin P. A., Khalaman V., 2008 - Byssus production rate of the white sea blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) in the presence of metabolites of some hydrobionts. *Russ J Mar Biol* +,33 (1): 58-60.
- Lindinger M.I., Lauren D.J., McDonald D.G., 1984 - Acid-base balance in the sea mussel, *Mytilus edulis* III. Effects of environmental hypercapnia on intra- and extracellular acid–base balance. *Mar Biol Lett*, 5: 371-381.

- Livingstone D.R., 2001 - Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull*, 42: 656-666.
- Livingstone D.R., Farrar S.V., 1984 - Tissue and subcellular distribution of mixed function oxidase and benzo[a]pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. *Sci Total Environ*, 39: 209-235.
- Lockwood B.L., Somero G.N., 2011 - Transcriptomic responses to salinity stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*). *Mol Ecol*, 20(3): 517-529.
- Loosanoff V.L., 1965 - The American or Eastern oyster. United States Dept of the Interior Circular 205: 1-36.
- Lopez C., Carballal M.J., Azevedo C., Villalba A., 1997 - Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Dis Aquat Org*, 30: 209-215.
- Lowenstam H.A., 1981 - Minerals formed by organisms. *Science*, 211: 1126-1131.
- Lowenstam H.A., Weiner S., 1989 - On Biomineralization. Oxford University Press, New York, 7-24.
- Lucas A., 1965 - Recherches sur la sexualité des Mollusques Bivalves. *Bull Biol Fr Belg*, 99: 115-247.
- Lyons C., Dowling V., Tedengren M., Gardeström J., Hartl M.G., O'Brien N., Van Pelt F.N., O'Halloran J., Sheehan D., 2003 - Variability of heat shock proteins and glutathione S transferase in gill and digestive gland of bluemussel, *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res*, 56(5): 585-597.
- Mackenzie F.T., 2003 - Our Changing Planet, 3rd ed. Pearson Education, Inc.
- Mann K. H., Lazier J. R.N., 1996. The oceans and global climate change: physical and biological aspects. In Mann K.H., Lazier J. R.N. (eds), Dynamics of marine ecosystems. Biological physical interactions in the oceans: 317-347, Blackwell Science Inch, Cambridge.
- Mahmoud N., Dellali M., El Bour M., Aissa P., Mahmoudi E., 2010 - The use of a *Fulvia fragilis* (Mollusca: Cardiidae) in the biomonitoring of Bizerta Lagoon: A multimarkers approach. *Ecological Indicators* 10: 696-702.
- Malagoli D., Ottaviani E., 2005 - Cytotoxicity as a marker of mussel health status. *J Mar Biol Ass U K*, 85: 359-362.
- Mann K.H., Lazier J.R.N., 2006 - Dynamics of marine ecosystems. Biological-physical interactions in the oceans. Blackwell, Oxford.
- Mann M.E., Zhang Z., Hughes M.K., Bradley R.S., Miller S.K., Rutherford S., 2008 - Proxy-based reconstructions of hemispheric and global variation over the past two millennia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 13252-13257.
- Matozzo V., Marin M.G., 2005 - 4-Nonylphenol induces immunomodulation and apoptotic events in the clam *Tapes philippinarum*. *Mar Ecol Prog Ser*, 285: 97-106.

- Matozzo V., Ballarin L., Pampanin D.M., Marin M.G., 2001 - Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 163-170.
- Matozzo V., Da Ros L., Meneghetti F., Marin M.G., 2003 - Functional responses of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice: fishing impact and seasonal variations. *Can J Fish Aquat Sci*, 60: 949-958.
- Matozzo V., Marin M.G., 2010 - The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune response: a first survey. *Fish Shellfish Immunol*, 28: 534-541.
- Matozzo V., Monari M., Foschi J., Papi T., Cattani O., Marin M.G., 2005 - Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina* I. Effects on immune responses. *J Exp Mar Biol Ecol*, 325: 163-174.
- Matozzo V., Monari M., Foschi J., Serrazanetti G. P., Cattani O., Marin M. G., 2007 - Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses. *Mar Biol*, 151: 1051-1058.
- Matozzo V., Monari M., Foschi J., Serrazanetti G.P., Cattani O., Marin M.G., 2007 - Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina* haemocytes. Part I: alterations in immune responses. *Mar Biol*, 151: 1051-1058.
- Matozzo V., Tomei A., Marin M.G., 2006 - Effects of 4-nonylphenol (xenoestrogen) and chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) on acetylcholinesterase activity in the clam *Tapes philippinarum*. *Fres Environ Bulletin*, 15(8a): 710-714.
- McCarthy F., Shugart L.R., 1990 - Biomarker of environmental contamination. Lewis Publisher, Chelsea, MI, USA, pp. 457.
- McCord J.M., Fridovich I., 1969 - Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocyanin). *J Biol Chem*, 244(22): 6049-6055.
- Meehl G.A., Covey C., Delworth T., Latif M., *et al.*, 2007 - Global Climate Projections. In *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Solomon S., Qin D., Manning M., *et al.*, (eds): Cambridge University Press. Cambridge, UK, and New York, NY.
- Meldrum F.C., 2003 - Calcium carbonate in biomineralisation and biomimetic chemistry. *Int Mater Rev*, 48(3): 187-224.
- Melzner F., Gutowska M.A., Langenbuch M., Dupont S., Lucassen M., Thorndyke M.C., Bleich M, Pörtner H.O., 2009 - Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences*, 6: 2313-2331. doi:10.5194/bg-6-2313-2009.

- Melzner F., Stange P., Trübenbach K., Thomsen J., Casties I., Panknin U., Gorb S.N., Gutowska M.A., 2011 - Food Supply and Seawater pCO₂ Impact Calcification and Internal Shell Dissolution in the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* 6(9):e24223.
- Michaelidis B., Ouzounis C., Palaras A., Pörtner H.O., 2005 - Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser*, 293 109-118.
- Michaelidis B., Spring A., Pörtner H.O., 2007 - Effects of long-term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid-base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*. *Mar Biol*, 150: 1417-1429.
- Millero F.J., Graham B.T., Huang F., Serrano H.B., Pierrot D., 2006 - Dissociation constants of carbonic acid in seawater as a function of salinity and temperature. *Mar Chem*, 100: 80-94.
- Minier C., Borghi V., Moore M.N., Porte C., 2000 - Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*, 50:167–176.
- Monari M., Matozzo V., Foschi J., Cattani O., Serrazanetti G.P., Marin M.G., 2007 - Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish Shellfish Immunol*, 22: 98-114.
- Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C., 1990 - Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- Moschino V., Marin M.G., 2006 - Seasonal changes in physiological responses and evaluation of “well-being” in the Venus clam *Chamelea gallina* from the Northern Adriatic Sea. *Comp Biochem Physiol* 145 (A): 433-440.
- Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P., Snider D., 2004 - Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern oyster. *Science*, 304: 297-300.
- Moura P., Gaspar M.B., Monteiro C.C., 2008 - Gametogenic cycle of the smooth clam *Callista chione* on the south-western coast of Portugal. *J Mar Biol Assoc UK*, 88:161–167.
- Munari M., Matozzo V., Marin M.G., 2011 - Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol*, 30: 1024-1030.
- Nybakken J.W., Bertness M.D., 2004 - Marine Biology an ecological approach, 6th ed. Pearson Benjamin Cumming, p 7.
- O'Connor M.I., Piehler M.F., Leech D.M., Anton A., Bruno J.F., 2009 - Warming and resource availability shift food web structure and metabolism. *Plos Biol*, 7: 1-5.
- Oliver L.M., Fisher W.S., 1999 - Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. *Biomarkers*, 4: 510-530.

- Orr J.C., Fabry V.J., Amount O., Bopp L., Doney S.C., Feely R.A., Gnanadesikan A., Gruber N., Ishida A., Joos F., Key R.M., Lindsay K., Maier-Reimer E., Matear R., Monfray P., Mouchet A., Najjar R.G., Plattner G.K., Rodgers K.B., Sabine C.L., Sarmiento J.L., Schlitzer R., Slater R.D., Totterdell I.J., Weirig M.F., Yamanaka Y., Yool A., 2005 - Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437: 681-686.
- Oweson C., Hernroth B., 2009 - A comparative study on the influence of manganese on the bactericidal response of marine invertebrates. *Fish Shellfish Immunol*, 27: 500-507.
- Palmer T.N., Räisänen J., 2002 - Quantifying the risk of extreme seasonal precipitation events in a changing climate. *Nature*, 415: 512-514.
- Pane E.F., Barry J.P., 2007 - Extracellular acid–base regulation during short-term hypercapnia is effective in a shallow-water crab but ineffective in a deep-sea crab. *Mar Ecol Prog Ser*, 334: 1-9.
- Parker L.M., Ross P.M., O'Connor W.A., 2010 - Comparing the effect of elevated pCO₂ and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters. *Mar Biol*, 157: 2435–2452.
- Payne J.F., 1977 - Mixed function oxidases in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. *Mar Pollut Bull*, 8: 112-116.
- Paynter K.T., Bureson E.M., 1991 - Effects of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Disease development and impact on the growth rate at different salinities. *J Shellfish Res*, 10: 425-431.
- Peres J.M., Picard J., 1964 – Nouveau Manuel de Bionomie Benthique de la Mer Méditerranée. Rec Trav Stat Mar d'Endoume, 33-Bull, 31: 5-139.
- Petit J.R., Jouzel J., Raynaud D., Barkov N.I., Barnola J.M., Basile I., Benders M., Chappellaz J., Davis M., Delayque G., Delmotte M., Kotlyakov V.M., Legrand M., Lipenkov V.Y., Lorius C., Pépin L., Ritz C., Saltzman E., Stievenard M., 1999 - Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399: 429-436.
- Pipe R.K., 1992 - Generation of reactive oxygen metabolites by haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Com Immunol*, 16: 111-122.
- Pipe R.K., Coles J.A., 1995 - Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol*, 5: 581–595.
- Pipe R.K., Porte C., Livingstone D.R., 1993 - Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol*, 3: 221-233.
- Poppe G.T., Goto Y., 1993 – In: European seashells, Vol. 2 (Scaphopoda, Bivalvia, Cephalopoda). Wiesbaden: Verlag Christa Hemmen. pp 1-221.

- Porte C., Janer G., Lorusso L.C., Ortiz-Zarragoitia M., Cajaraville M.P., Fossi M.C., Canesi L., 2006 - Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comp Biochem Physiol C*, 143: 303-315.
- Pörtner H.O., 2001 - Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88: 137-46.
- Pörtner H.O., 2010 - Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate related stressor effects in marine ecosystems. *J Exp Biol*, 213: 881-893.
- Pörtner H.O., Knust R., 2007 - Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315: 95-97.
- Power A., Sheehan D., 1996 - Seasonal variation in the antioxidant defence system of gill and digestive gland of the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol*, 114C: 99-103.
- Prevedelli D., Vandini R., 1991 - Ciclo biologico di *Perinereis rullieri* Pilato (Polichaeta: Nereididae) nella Laguna di Venezia. *Oebalia*, 17: 309-313.
- Price H.A., 1983 - Structure and formation of byssus complex in *Mytilus* (Mollusca, Bivalva). *J Mollusca Stud*, 49: 9-17.
- Prieur G., Mevel G., Nicolas J.L., Plusquellec A., Vigneulle M., 1990 - Interactions between bivalve mollusco and bacteria in the marine environment. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev*, 29: 277-352.
- Rajagopal S., Nair K.V. K., Azariah A., 1995 - Response of brown mussel, *Perna indica*, to elevated temperatures in relation to power plant biofouling control. *J therm Biol*, 20(6): 461-467.
- Randall C. J., Szmant A. M., 2009 - Elevated temperature reduces survivorship and settlement of the larvae of the Caribbean scleractinian coral, *Favia fragum* (Esper). *Coral Reefs* 28: 537-545.
- Raven J., Caldeira K., Elderfield H., Hoegh-Guldberg O., Liss P., Riebesell U., 2005 - Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. Policy Document. The Royal Society, London.
- Riebesell U., Zondervan I., Rost B., Tortell P.D., Zeebe R.E., Morel F.M.M., 2000 - Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature*, 407: 364-367.
- Roberts D.A., Hofmann G.E., Somero G.N., 1997 - Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: acclimation (seasonal and tidal-height comparisons) and acclimation effects. *Biol Bull*, 192: 309-320.
- Rodhouse M.S., Burnell G.M., 1979 - *In situ* studies on the scallop *Chlamys varia*. In: Gamble J. C., George J. D. (eds). Progress in Underwater Science. Pentech Press, Plymouth pp 87-98.
- Roemmich D., 1992 - Ocean Warming and Sea Level Rise Along the Southwest U.S. Coast. *Science*, 257: 73-75.

- Roether W., Manca B.B., Klein B., Bregant D., Georgopoulos D., Beitzel V., Kovacevic D.V., Luchetta A., 1996 - Recent changes in eastern Mediterranean Deep Waters. *Science*, 271: 333-335.
- Roper D.S., Hickey C.W., 1994 - Population structure, shell morphology, age and condition of the freshwater mussel *Hyridella menziesi* (Unionacea: Hyriidae) from seven lake and river site in the Waikato River system. *Hydrobiologia*, 284: 205-217.
- Sabine C.L., Feely R.A., Gruber N., Key R.M., Lee K., Bullister J.L., Wanninkhof R., Wong C. S., Wallace D.W., Tilbrook B., Millero F.J., Peng T.H., Kozyr A., Ono T., Rios A.F., 2004 - The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science*, 305: 367-371.
- Saleuddin A.S.M., Petit H.P., 1983 - In: Saleuddin A.S.M., Wilbur K.M. (eds.), *The Mollusca, Physiology*, vol. 4, Academic Press, New York, p. 199.
- Santarem M.M., Robledo J.A.F., Figueras A., 1994 - Seasonal changes in hemocytes and serum defence factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis Aquat Org*, 18: 217-222.
- Scardino A., De Nys R., Ison O., O'Connor W., Steinberg P., 2003 - Microtopography and antifouling properties of shell surface of the Bivalve Molluscs *Mytilus galloprovincialis* e *Pinctada imbricata*. *Biofouling*, 19: 221-230.
- Scavia D., Field J.C., Boesch D.F., Buddemeier R.W., Burkett V., 2002 - Climate change impacts on US coastal and marine ecosystems. *Estuaries*, 25: 149-164.
- Scheehan D., Power A., 1999 - Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanism of bivalve mollusks. *Comp Biochem Physiol*, 123C: 193-199.
- Seed R., 1968 - Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*. *J Mar Biol Assoc UK*, 48: 561-584.
- Seed R., 1992 - Systematics evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus*: an overview. *Am Malacol Bull*, 9: 123-137.
- Shumway S., Parsons G.J., 2006 - Preface from First Edition. In: Shumway S. Parson G. J. (eds), *Scallops: biology, ecology and aquaculture*, Elsevier B V. Amsterdam: 9-10.
- Siegenthaler U., Stocker T.F., Monnin E., Lüthi D., Schwander J., Stauffer B., Raynaud D., Barnola J.M., Fischer H., Masson-Delmotte V., Jouzel J., 2005 - Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. *Science*, 310: 1313-1317.
- Skirrow G., Whitfield M., 1975 - The effect of increases in the atmospheric carbon dioxide content on the carbonate ion concentration of surface water at 25°C. *Limnol Oceanogr*, 20: 103-108.

- Smith T.R., Tremblay G.C., Bradley T.M., 1999 - Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *J Exp Zool*, 284: 286-298.
- Snyder M.J., Girvetz E., Mulde E.P., 2001 - Induction of Marine Mollusc Stress Proteins by Chemical or Physical Stress. *Arch Environ Contam Toxicol*, 41: 22-29.
- Sokolowski A., Pawlikowski K., Wolowicz M., Garcia P., Namieśnik J., 2008 - Shell deformation in the Baltic Clam *Macoma balthica* from Southern Baltic Sea (the Gulf of Gdansk): hypotheses on environmental effects. *Ambio*, 37: 93-100.
- Soldatov A.A., Gostyukhina O.L., Golovina I.V., 2007 - Antioxidant Enzyme Complex of Tissues of the Bivalve *Mytilus galloprovincialis* am. under Normal and Oxidative-Stress Conditions: A Review. *Appl Biochem Micro*, 43(5): 556-562.
- Solorzano L., 1969 - Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol Oceanogr*, 14: 799-801.
- Spector M., Aliabadi Z., Gonzalez T., Foster J.W., 1986 - Global control in *Salmonella typhimurium*: Two dimensional electrophoretic analysis of starvation, anaerobiosis, and heat shock-inducible protein. *J Bacteriol*, 168: 420-424.
- Spicer J.I., Raffo A., Widdicombe S., 2007 - Influence of CO₂-related seawater acidification on extracellular acid-base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. *Mar Biol*, 151: 1117-1125.
- Steele D.H., Steele V.J., 1991 - Effects of salinity on the survival, growth rate, and reproductive output of (Crustacea, Amphipoda). *Mar Ecol prog Ser*, 78: 49-56.
- Stickle W.B., Sabourin T.D., 1979 - Effect of salinity on the respiration and heart rate of the common mussel, *Mytilus edulis* L., and the black chiton, *Katherina tunicata* (Wood). *J Exp Mar Biol Ecol*, 41: 257-268.
- Strasser C.A., Lauren S.M., Thorrold S.R., 2008 - Temperature and salinity effects on elemental uptake in the shells of larval and juvenile softshell clams *Mya arenaria*. *Mar Ecol Prog Ser*, 370: 155-169.
- Tebble N., 1966 - British Bivalve Seashells. British Museum, London. p 212.
- The Royal Society, June 2005 - Ocean acidification due increasing atmospheric carbon dioxide. Policy document 12/05.
- Thomsen J., Gutowska M.A., Saphörster J., Heinemann A., Trübenbach K., Fietzke J., Hiebenthal C., Eisenhauer A., Körtzinger A., Wahl M., Melzner F., 2010 - Calcifying invertebrates succeed in a naturally CO₂ enriched coastal habitat but are threatened by high levels of future acidification. *Biogeosciences*, 7: 3879-3891.

- Thomsen J., Melzner F., 2010 - Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 157(12): 2667-2676.
- Thorson G., 1950 - Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol Rev Camb Philos*, 25: 1-45.
- Timothy R., Mc Clanahan M.A., Christopher A., Muhando J.M., 2007 - Effects of climate and sea water temperature on coral bleaching and mortality variation. *Ecol Monogr*, 77(4): 503-525.
- Travers M.A., Basuyaux O., Le Goic H., Huchette S., Nicolass J.L., Koken M., Paillard C., 2009 - Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glo Change Biol*, 15: 1365–1376.
- Valli G., Bidoli E., Marussi C., 1983–84 - Preliminary observations on reproduction and biometry in *Callista chione* (L) (Mollusca, Bivalvia) of the Gulf of Trieste. *Nova Thalassia* 6: 97–103.
- Valli G., Stangher B., Nodari P., 1989 – Analisi degli aminoacidi e biomentria in *Chamelea gallina* (L.) del Golfo di Trieste durante il ciclo riproduttivo. *Nova Thalassa*, 10: 23-44.
- Vedpathak A.N., Dhakane K.R., Pandit S.V., 2008 - Size dependent variations in the rate of oxygen consumption, rate of ammonia excretion and O:N ratio of freshwater bivalve, *Lamellidens marginalis* from river Godavari, during summer. *Uttar Pradesh J Zool*, 28(2): 231-236.
- Ver L.M.B., Mackenzie F.T., Lerman A., 1999 - Carbon cycle in the coastal zone: Effects of global perturbations and change in the past three centuries. *Chem Geol*, 159: 283–304.
- Verlecar X.N., Jena K.B., Chainy G.B.N., 2008 - Seasonal variation of oxidative biomarkers in gill and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuar Coast Shelf Sci*, 76: 745-752.
- Viarengo A., Canesi L., 1991 - Mussels as biological indicator of pollution. *Aquaculture*, 94: 225-243.
- Vijayavel K., Gopalakrishnan S., Thiagarajan R., Thilgam H., 2009 - Immunotoxic effects of nickel in the mud crab *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunol*, 26: 133-139.
- Wahl M., Kroger K., Lenz M., 1998 - Non-toxic protection against epibiosis. *Biofouling*, 12: 205-226.
- Waite J.H., 1992 - The formation of mussel byssus: anatomy of a natural manufacturing process. In: Case ST (ed) Results and problems in cell differentiation, vol 19, Biopolymers. Springer, Berlin pp 27-54.
- Wang J., Jiang Z.H., Tang Q.S., 2004 – Study on physiological energetics of Farrei’s scallop *Chlamys farreri*. *Chinese Mar Fish Res*, 25: 46-54.

- Werner I., 2004 - The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia). *Mar Environ Res*, 58: 803–807.
- Werner I., Nagel R., 1997 - Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthene. *Environ Toxicol Chem*, 11: 2393-2403.
- Widdows J., 1993 - Marine and estuarine invertebrate toxicity test. In: Handbook of ecotoxicology. Calow, P. (ed), Blackwell Scientific, Oxford, 1: 146-166.
- Widdows J., 1978 - Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *J Mar Biol Assoc UK*, 58: 109-124.
- Widdows J., 1985 - Physiological measurements. In: The effects of stress and pollution on marine animals. Bayne B L *et al.* (Ed), Praeger Press, New York: 3-45.
- Widdows J., Donkin P., Brinsley M.D., Evans S.V., 1995 - Scope for growth and contaminant levels in North Sea mussels *Mytilus edulis*. *Mar Ecol Prog Ser*, 127: 131-148.
- Widdows J., Johnson D., 1988 - Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for Growth. *Mar Ecol Prog Ser*, 46: 113-121.
- Williams W.D., Geddes M.C., 1991 - Anostracans of Australian Salt Lakes, with particular reference to a comparison of *Parartemia* and *Artemia*. In: R.A. Browne, P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman (eds) *Artemia biology*. CRC Press, Florida, USA.
- Wilson L.L., Burnett L.E., 2000 - Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Effects of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 246: 223–240.
- Wollast R., 1998 - Evaluation and comparison of the global carbon cycle in the coastal zone and in the open ocean: 213–252. In K.H. Brink, and A.R. Robinson (eds), *The Sea: The Global Coastal Ocean Processes and Methods*, John Wiley.
- Worrall C.M., Widdows J., 1984 - Investigation of factors influencing mortality in *Mytilus edulis* L. *Mar Biol Lett*, 5:85-97.
- Yang H., Wang P., Zhang T., Wang J., He Y., Zhang F., 1999 – Effects of reduced salinity on oxygen consumption and ammonian excretion of *Chlamys farreri*. *Chin J Oceanol Limnol*, 17(3): 207-211.
- Zhuang S., Liu X., 2006 - The influence of fresh weight and water temperature on metabolic rates and the energy budget of *Meretrix meretrix* Linnaeus. *Mar Biol*, 150: 245-252.