



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOECOLOGIA MARINA
Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente
Direttore: Prof. Angelo Cau

**Studio dell'attività comportamentale delle
valve di *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck,
1819) tramite l'utilizzo di sensori Hall**

Relatori:

Dott. *Piero Addis*

Tesi di Laurea

Valeria Andreotti

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

INTRODUZIONE	4
BIOLOGIA DI <i>Mytilus galloprovincialis</i>	9
<i>Distribuzione e habitat</i>	10
<i>Anatomia</i>	10
<i>Il ruolo della temperatura nel comportamento dei Mitili</i>	21
MATERIALI E METODI	23
COLTURE ALGALI	23
<i>Cenni sulla biologia delle microalghe utilizzate</i>	23
<i>Il ciclo algale</i>	26
<i>Allevamento e mantenimento delle colture algali</i>	27
<i>Procedura per effettuare gli inoculi in sterilità</i>	29
UTILIZZO DEI SENSORI HALL PER LO STUDIO DEL COMPORTAMENTO DI MYTILUS GALLOPROVINCIALIS	31
<i>Descrizione sensori</i>	32
<i>Risposte comportamentali alla variazione di fitoplancton</i>	34
<i>Risposte comportamentali alla variazione di temperatura</i>	37
ANALISI DEI DATI	38
<i>Risposte comportamentali alla variazione di fitoplancton</i>	38
<i>Risposte comportamentali alla variazione di temperatura</i>	39
<i>Analisi della mortalità</i>	40
RISULTATI	41
RISPOSTE COMPORTAMENTALI ALLA VARIAZIONE DI FITOPLANCTON	43
<i>Esperimento 1 - Nannochloropsis oculata</i>	43
<i>Esperimento 2 - Isochrysis galbana</i>	48
<i>Analisi risposte comportamentali tra i due esperimenti</i>	52
<i>Analisi risposte comportamentali tra le vasche controllo</i>	53

<i>RISPOSTE COMPORTAMENTALI ALLA VARIAZIONE DI TEMPERATURA</i>	54
<i>Analisi della mortalità</i>	56
<i>DISCUSSIONI</i>	57
<i>CONCLUSIONI</i>	63
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	67

INTRODUZIONE

Mytilus galloprovincialis è un mollusco bivalve comune nelle zone intertidali e subtidali (Seed, 1976). Riveste un importante ruolo ecologico in quanto forma barriere di grandi dimensioni che possono incrementare la diversità delle comunità locali fornendo attraverso il loro filtraggio un collegamento fondamentale tra i sistemi bentonici e pelagici (Seed, 1976; Dame *et al.*, 1991; Beadman *et al.*, 2004). Questa specie è ritenuta autoctona delle coste del Mar Mediterraneo e del Mar Nero, anche se oggi ha una vasta distribuzione nelle zone temperate di tutto il mondo (Brownes *et al.*, 2006), soprattutto in prossimità dei grandi porti (Branch e Stephanni 2004).

Questa diffusione, dovuta in gran parte al trasporto di acque di zavorra negli scafi delle imbarcazioni, ha permesso al *M. galloprovincialis* di insediarsi e colonizzare nuove zone, causando così delle difficoltà alle comunità di mitili autoctone, come suggerito da una serie di studi (Carlton, 1992; Robinson e Griffiths 2002; Geller, 1999).

Questo mitile, volgarmente chiamato “cozza” riveste però anche una grande importanza dal punto di vista economico, in quanto è allevata ormai in tutto il bacino del Mediterraneo per scopi alimentari. Va ricordato che la molluschicoltura rappresenta la principale voce produttiva per quanto riguarda l’acquacoltura nazionale (pari a 81,25 milioni di €) e che insieme alla vongola verace filippina (*Tapes philippinarum*) costituiscono circa il 99% della produzione nazionale di molluschi (Enea, 2005). La produzione nazionale di mitili nel 2005 è stimata in 125.000 tonnellate (ISMEA, 2005) di cui circa 74.714 da mitilicoltura, mentre la restante quota deriva dallo sfruttamento di banchi naturali. La produzione di vongola verace filippina è stimata in ca. 40.000 t. . Gli impianti di mitilicoltura sono presenti in 11 regioni italiane ma la maggior parte della produzione si concentra in poche regioni. In ordine decrescente, Puglia, Veneto, Emilia

Romagna, Friuli Venezia Giulia e Sardegna coprono l'80 % della produzione nazionale (Ispesl, 2002). Nel 2005 sono state stimate 263 imprese dedite alla mitilicoltura con circa 1.400 addetti. I centri di depurazione molluschi (CDM) autorizzati sono 125 (2007) mentre quelli di spedizione (CSM) 320. A questi dati di produzione l'ISTAT (2006) evidenzia un'importazione pari a 25.700 tonnellate (68% dalla Spagna).

Sotto il profilo ecologico *M. galloprovincialis* è utilizzato anche come organismo bioindicatore per la valutazione dello stato di qualità degli ambienti acquatici. Per quanto riguarda la presenza di sostanze contaminanti, la valutazione delle condizioni ambientali si può effettuare mediante svariate procedure, tra cui l'utilizzo di organismi che fungano da bioindicatori e sui quali nel tempo vengano valutati parametri biologici e biochimici (biomonitoraggio) (Focardi e Leonzio, 2000).

Si definiscono bioindicatori “.. tutti quegli organismi che mediante reazioni identificabili (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, ecc.) forniscono informazioni sulla qualità dell'ambiente (o di una parte di esso)” (Bargagli *et al.*, 1998). La bioindicazione si basa su diverse scale di intervento, da quella ecologica alla molecolare: dalle variazioni di parametri biochimici, fisiologici e comportamentali, al bioaccumulo di contaminanti, fino alla presenza/assenza di specie. L'approccio più comunemente utilizzato dalla bioindicazione si basa sulla valutazione dei livelli di contaminanti nell'organismo bioindicatore. La scelta dell'organismo bioindicatore deve tenere conto di una serie di caratteristiche relative alla sua fisiologia, al tipo d'alimentazione, all'habitat ed al generale stile di vita. (Bargagli *et al.*, 1998).

M. galloprovincialis viene ampiamente utilizzato come bioindicatore per la sua capacità di accumulare metalli e contaminanti organici, per la sua immobilità e per la sua limitata capacità di metabolizzare i contaminanti accumulati tutti questi fattori lo

rendono un buon indicatore dello stato di salute dell'ambiente circostante (Phillips, 1977; O'Connor, 2002). Il vasto impiego dei mitili in campagne di biomonitoraggio è dovuto inoltre alla loro resistenza, alla facilità di recupero e di impiego (Nasci *et al.*, 2002) e alla loro larga diffusione nella maggior parte delle zone costiere del mondo (Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville, 2006). Negli USA fin dagli anni 80 tramite il Mussel Watch Project (Farrington *et al.*, 1983; O'Connor, 1996) sono stati sviluppati piani di monitoraggio usando mitili per valutare gli andamenti nello spazio e nel tempo delle concentrazioni dei contaminanti nelle regioni di costa ed estuario.

I Bivalvi adulti non essendo in grado di scegliere il luogo dove alimentarsi devono adattare i movimenti delle loro valve alle attività vitali, come respirazione, alimentazione ed escrezione le quali sono utilizzate nella valutazione degli indicatori di vitalità e di ritmi circadiani (Rao, 1954; Langton, 1977; Fujii e Toda, 1991; Ameyaw-Akumfi e Naylor, 1987).

I Molluschi Bivalvi aprono e chiudono le loro valve in reazione di difesa a stimoli esterni, come quelli meccanici (urti), un'ombra o un approccio improvviso con un predatore, in risposta a deterioramento ambientale dovuto a maree rosse tossiche, deficit di ossigeno o basse concentrazione di sale (Dharmaraj, 1983; Gainey e Shumway, 1988; Baldwin e Kramer, 1994; Rajagopal *et al.*, 1997).

Le cozze sopravvivono facilmente all'interno di acquari e, come tale, si prestano a studi comportamentali in laboratorio (Maire *et al.*, 2007). Tuttavia, nonostante questo vantaggio apparente, le cozze in laboratorio possono comportarsi in modo diverso dai conspecifici selvatici se le condizioni sono inappropriate e così potrebbe rivelarsi un invertebrato meno utile di quanto sembra (Robson, 2008).

La ricerca sul comportamento dei Bivalvi ha fornito opinioni su come gli organismi affrontano ambienti altamente fluttuanti. Sono stati effettuati diversi studi che riguardano il comportamento dei Molluschi Bivalvi: l'analisi sull'apertura delle valve, i movimenti dei sifoni, la filtrazione e il comportamento di pompaggio in relazione ai parametri ambientali (profondità, luce, temperatura, particelle disperse, cibo e interazioni con i predatori) (e.g. Ropert-Coudert e Wilson, 2004).

Ci sono molte controversie riguardo ai molti aspetti del comportamento dei bivalvi come ad esempio l'alimentazione, ciò risulta in parte dalle difficoltà nel registrare accuratamente le misurazioni ad alta frequenza dell'attività di filtrazione (Maire *et al.*, 2007). Maire *et al.* (2007) evidenziano l'importanza di registrare cambiamenti a breve termine nell'apertura delle valve e nell'area del sifone esalante. Wilson *et al.* (2005) dimostrano come la tecnologia dei sensori Hall, originariamente sviluppata per studi su endotermi marini, possa essere utilizzata per chiarire e quantificare il comportamento dei bivalvi sia in laboratorio che in natura. Con questa nuova tecnica Robson *et al.* (2007) hanno quantificato come *Mytilus edulis* reagisce al rischio di predazione nel suo ambiente quantificando l'apertura delle valve. Nagai *et al.* (2006) hanno sviluppato un rapido sistema di rilevazione di fioriture nocive di dinoflagellati utilizzando la risposta dell'ostrica *Pinctada fucata* a queste cellule, misurandola tramite il sistema di sensori Hall.

In questa tesi abbiamo studiato il comportamento di *M. galloprovincialis* usando il sistema di sensori Hall per registrare l'apertura delle valve in risposta a stimoli ambientali provocati sperimentalmente.

In particolare, conoscendo le caratteristiche fisiologiche di questo mollusco, abbiamo sperimentato in che modo reagisca alle variazioni di temperatura e a diverse concentrazioni di fitoplancton del quale si nutrono.

BIOLOGIA DI Mytilus galloprovincialis



Figura 1: Esempjari di *M. galloprovincialis*

Classificazione scientifica

Regno: Animalia

Phylum: Mollusca

Classe: Bivalvia

Ordine: Mytiloida

Famiglia: Mytilidae

Genere: Mytilus

Specie: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

Distribuzione e habitat

Il *M. galloprovincialis* è presente nel Mar Mediterraneo, Mar Nero, Oceano Atlantico, dalla Manica fino alle coste del Marocco. Si trova generalmente nella zona infralitorale, dal limite superiore della zona intertidale fino a profondità di qualche metro, attaccato a materiali duri (rocce o pali) o a substrati relativamente mobili in sospensione (corde) ai quali aderisce per mezzo del bisso (Bandiera, 2006). Vive in comunità molto numerose, su rocce o substrati duri. La salinità di crescita è intorno al 28/34‰ (ottimale: 27/30‰) e l'optimum della temperatura è tra gli 8°C e i 25°C.

Anatomia

- CONCHIGLIA

I Bivalvi sono caratterizzati dalla costante presenza di una conchiglia composta da due valve, da cui il nome; la conchiglia contiene il corpo compresso lateralmente, privo di capo e ricoperto ai lati dai due lembi del mantello che scendono dal dorso (Baccetti, 1994). La conchiglia è nera - bluastro, bombata e di forma quasi triangolare e formata da carbonato di calcio che il mollusco estrae dall'acqua.



Figura 2: Valve di *Mytilus galloprovincialis*

Le valve sono separate dai relativi lobi del mantello e destinate a proteggere i visceri. La parte anteriore è quella appuntita, quella posteriore è quella arrotondata. Sulla parte esterna delle valve si osservano delle linee concentriche di forma ovale: sono le strisce di accrescimento. La parte interna si presenta di colore madreperlaceo e mostra le impronte delle inserzioni dei muscoli adduttori.

Le valve unite da un legamento e da una cerniera sono costituite da una matrice organica formata da proteine, mucopolisaccaridi e cristalli di carbonato di calcio, generalmente sotto forma di calcite o aragonite. Sono collegate dai muscoli adduttori che, attraversando il corpo da un parte all'altra si inseriscono sulle parti anteriore e posteriore della loro porzione medio-dorsale. Essi agiscono in antagonismo con il legamento elastico e contraendosi, determinano lo schiacciamento o lo stiramento del legamento e la chiusura delle valve. Tale posizione è normalmente mantenuta se l'animale è esposto temporaneamente all'aria, come avviene periodicamente nelle specie intertidali, o si trova in presenza di condizioni ambientali avverse da cui si difende isolandosi temporaneamente.

Mentre la chiusura delle valve è attiva, dovuta alla contrazione dei muscoli adduttori, l'apertura della conchiglia è determinata passivamente dal legamento elastico, per cui dopo la morte gli animali rimangono con le valve aperte (Bandiera, 2006). La presenza e lo sviluppo dei muscoli adduttori, valutabili anche dall'impronta sulla faccia interna della conchiglia, assume valore sistematico, come la disposizione ed il numero dei dentelli della cerniera (Cesari e Pellizzato, 1990).

- **MANTELLO**

Il mantello è una duplicatura cutanea, più o meno estesa tra il sacco dei visceri ed il piede, che delimita la cavità palleale e produce all'esterno la conchiglia. Il mantello racchiude completamente l'animale all'interno della conchiglia (Fantuzzi, 2004).

Le ciglia, localizzate sulla superficie interna del mantello svolgono un ruolo importante nel convogliare le particelle sulle branchie.

Periodicamente il materiale di scarto è espulso attraverso una chiusura forzata ed improvvisa delle valve, che garantisce una completa espulsione del materiale dalla cavità del mantello. Nei mitili il mantello contiene la maggior parte delle gonadi. I gameti si formano all'interno del mantello e sono trasportati lungo canali ciliati ai gonodotti che terminano nella cavità del mantello. Dopo il rilascio dei gameti, il mantello diventa sottile e trasparente.

Il mantello svolge un importante ruolo nel bioaccumulo di metalli e contaminanti organici anche se le branchie, il rene e la ghiandola digestiva sono considerati organi di accumulo più importanti (Fantuzzi, 2004).

- SIFONI

I bordi del mantello si prolungano formando dei sifoni o condotti per l'entrata e l'uscita dell'acqua: in tal modo distinguiamo un sifone inalante superiore, che nelle femmine permette anche l'ingresso dello sperma, e un sifone esalante inferiore con funzione escretori (Fantuzzi, 2004).

In condizioni normali un mitilo di media dimensione, filtra all'incirca da 4 a 5 litri di acqua all'ora, ed è in grado di trattenere il 90% delle particelle contenute in essa, che rientrano nella gamma delle dimensioni filtrabili (2-5 micron) (Mengoli, 1998).

- PIEDE

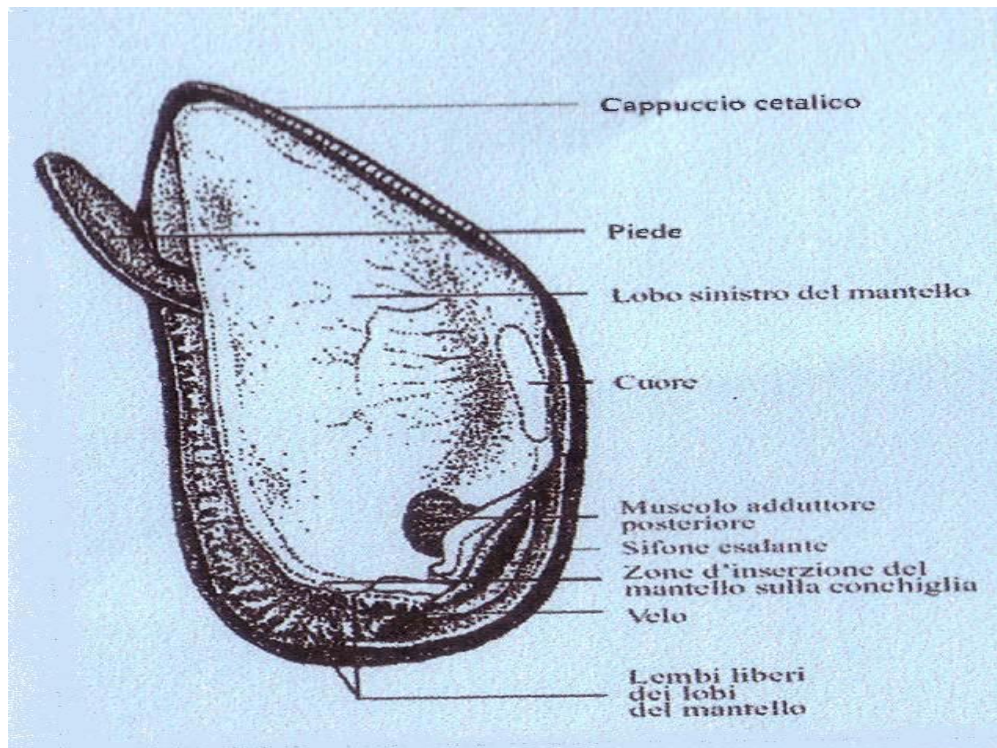


Figura 3: Mitilo previa asportazione della valva sinistra

Il piede si trova tra i lobi del mantello e appare come una formazione impari disposta lateralmente in mezzo alle branchie. Ha la forma di una piccola lingua, molto

estensibile e la sua superficie ventrale è ricoperta di ciglia (Fantuzzi, 2004). È costituito da strati muscolari circolari e longitudinali.

Sulla linea medio-ventrale del piede si apre la ghiandola bissogena, la quale produce dei filamenti o bisso. Questi filamenti sono costituiti prevalentemente da aminoacidi e la loro abbondanza e resistenza dipende dallo stato fisiologico del mollusco. Il bisso rappresenta un ottimo adattamento ad un habitat con forti correnti che, di conseguenza, garantisce all'animale un' elevata capacità di filtrazione e rifornimento di ossigeno (Gaion, 2006).



Figura 4: Mitilo con bisso

Il piede ha anche una piccola capacità locomotoria. Infatti quando l'animale vuole spostarsi si avvicina il più possibile al ciuffo del bisso, poi lancia dei nuovi

filamenti nella direzione desiderata, passa il piede nei vecchi filamenti e man mano li rompe. Nei mitili adulti i filamenti raggiungono una lunghezza di 2-4 cm, hanno un diametro di 0,2-0,3 mm e sono attaccati con placche del diametro di 2-3 mm.

- **APPARATO MUSCOLARE**

L'apparato muscolare è costituito da due muscoli adduttori anteriori, un muscolo adduttore posteriore e dai muscoli retrattori del piede (Fantuzzi, 2004). I muscoli adduttori sono composti, nella maggior parte dei bivalvi, da fibre muscolari lisce di aspetto madreperlaceo e da fibre muscolari striate d'aspetto vitreo. La muscolatura liscia, fornisce contrazioni lente e a basso consumo energetico, mentre invece quella striata dà luogo a contrazioni rapide ad alto consumo energetico. Sono queste ultime che presiedono alla chiusura rapida delle valve mentre le prime provvedono alla chiusura protratta per lunghi periodi di tempo. I muscoli adduttori presentano un'attività ritmica costituita da un periodo di rilassamento, che si effettua con lentezza e lascia una fessura tra le due valve, seguito da una contrazione rapida che provoca la chiusura delle valve stesse. Entrambi i tipi di muscoli partecipano al realizzarsi di questo ritmo. Questi muscoli rivestono un ruolo importante nella sopravvivenza dei molluschi, infatti dalla chiusura delle valve dipende:

- la possibilità di potersi difendere dai predatori ;
- la loro sopravvivenza dopo la depurazione, grazie alla possibilità di captare l'ossigeno atmosferico a condizione che le loro branchie restino umide.

Da ciò deriva l'importanza di poter mantenere le valve più o meno chiuse per trattenere il liquido intervalvare mantenendo così umide le branchie il più a lungo possibile (Fantuzzi, 2004).

- APPARATO RESPIRATORIO

La respirazione viene effettuata attraverso le branchie, che sono responsabili dell'interscambio gassoso, oltre a essere il luogo in cui si realizza la captazione delle particelle alimentari che penetrano nella cavità palleale.

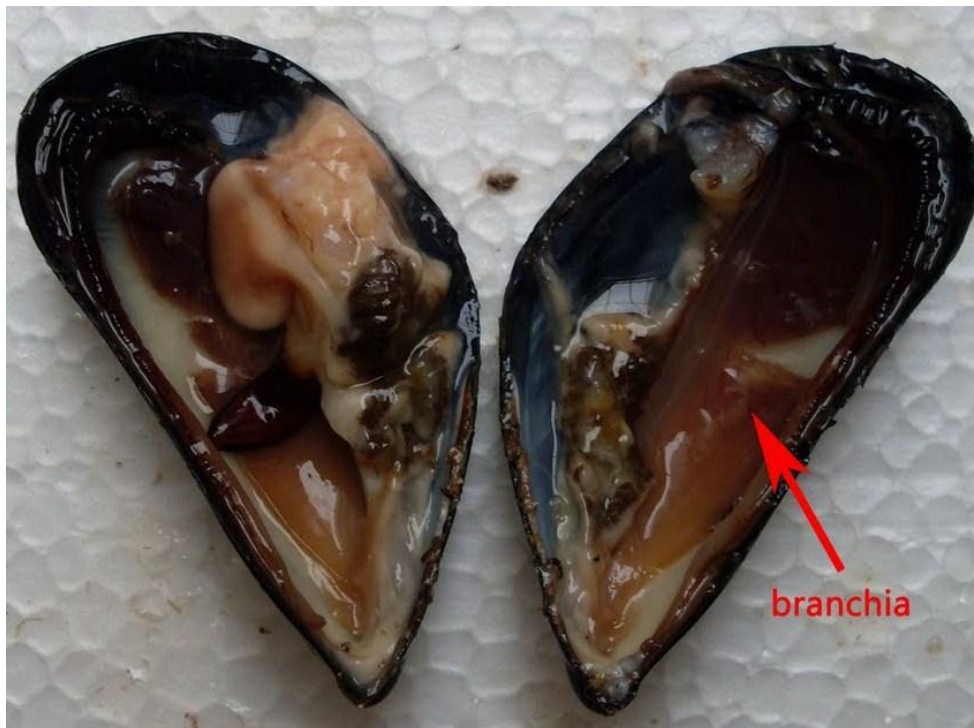


Figura 5: *M. galloprovincialis* con branchie in evidenza

Esse sono situate a sinistra ed a destra del corpo, e tra la massa viscerale ed il mantello; normalmente ve ne sono due su ciascun lato (Mengoli, 1998). Nei mitili

hanno una struttura estremamente semplice di tipo filamentoso e vengono chiamate filibranchie.

Le branchie sono formate da filamenti più o meno lunghi che si diramano da un asse longitudinale. L'insieme di filamenti di una medesima linea forma una lamina branchiale. I filamenti branchiali sono rivestiti da un epitelio abbondantemente cigliato sulla superficie esterna che serve per una corretta circolazione dell'acqua attraverso la branchia (Gaion, 2006). Attraverso le branchie i molluschi bivalvi sono in grado di captare, oltre all'ossigeno disciolto nell'acqua, anche altre sostanze disciolte quali macromolecole e ioni, in quanto essi agiscono come un filtro nel quale vengono trattenute le particelle alimentari attaccate al muco che la superficie delle branchie possiede. Per questa ragione, la superficie branchiale supera di molto le necessità respiratorie: a esempio, un mitilo di 6-7cm di lunghezza possiede una superficie branchiale di 100-110 centimetri quadrati sebbene per la respirazione basterebbe il 5-10% di tale superficie (Gaion, 2006).

- APPARATO DIGERENTE.

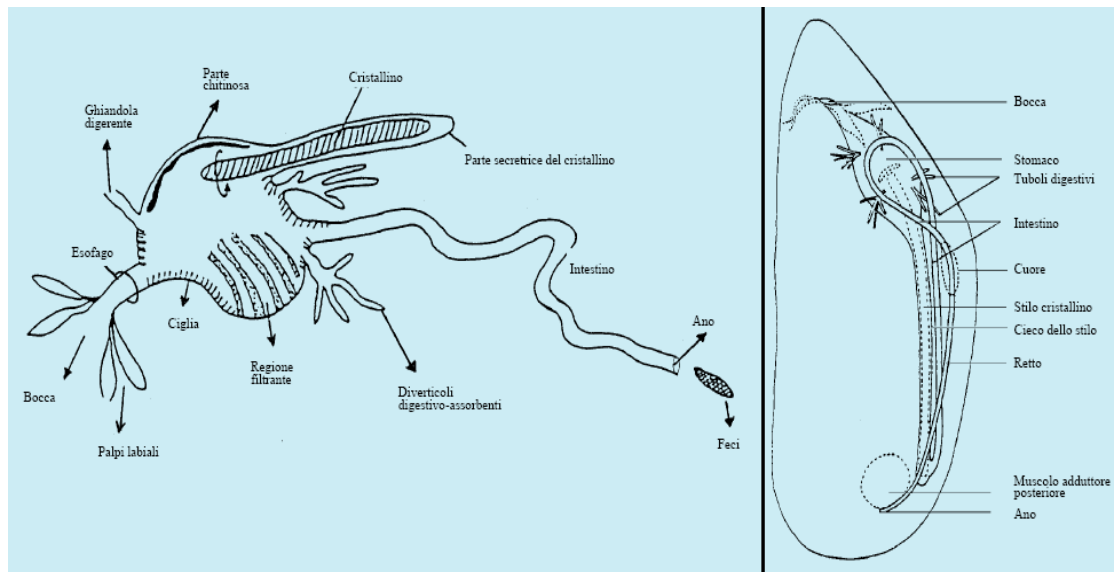


Figura 6: Apparato digerente di mitile

L'alimentazione dei molluschi bivalvi è microfaga, ossia a base plancton e di particelle organiche mantenute in sospensione nell'acqua (Mengoli, 1998).

La misurazione più comunemente usata per l'attività di filtrazione è "il tasso di filtrazione", che è definito come quel volume di acqua completamente eliminato in unità di tempo. Il tasso di filtrazione è frequentemente confuso con il tasso di ventilazione (tasso di pompaggio), che è il volume dell'acqua che passa attraverso le branchie in un unità di tempo (Bayne, 1976).

Sono le ciglia laterali delle branchie che con il loro battito creano la corrente alimentare inalante. Il ritmo del battito, in un mitilo a esempio, è di 2-5 pulsazioni al secondo, che possono arrivare fino a 20 pulsazioni in acque calde e povere di O_2 . Questa corrente formata dalle ciglia laterali è più che sufficiente ad assicurare la respirazione dell'individuo (Gaion, 2006).

Con le valve leggermente socchiuse, si produce una lieve corrente inalante che fornisce nuova acqua alla zona ventrale della cavità palleale. Questa corrente penetra nell'emibranchia passando tra i filamenti adiacenti; le ciglia fanno da setaccio trattenendo le particelle trasportate da detta corrente.

Le dimensioni delle particelle trattenute dalle ciglia latero-frontali, in generale, sono comprese tra un massimo di circa 400-500 micron, e un diametro minimo di 1-5 micron. Al di sopra della dimensione massima, la penetrazione delle particelle nella cavità palleale è impedita dai bordi del mantello. Questa gamma di misure comprende un gran numero di batteri liberi (le cui dimensioni medie sono comprese tra 0,5-1 micron e 1-5 micron), particelle di argilla, organismi planctonici, larve e uova di un gran numero di specie, resti di organismi vegetali e animali. Le particelle trattenute dalle ciglia vengono mescolate nel muco secreto dalle cellule glandolari e a trasportarle verso i solchi alimentari. La raccolta delle particelle in sospensione nell'acqua avviene quindi tramite i filamenti branchiali: una volta captate le particelle vengono dirette verso i solchi marginali o dorsali e convogliate verso i palpi labiali e la bocca. Le particelle alimentari agglutinate all'interno di un cordone mucoso, penetrano nella bocca e vengono convogliate attraverso un breve esofago cigliato che sbocca nello stomaco. Questo organo è circondato da una grande massa ghiandolare a funzioni digerenti: la ghiandola digerente o epatopancreas.

Lo stomaco ha due regioni chiaramente differenziate: quella dorsale, nella quale sboccano l'esofago ed i condotti della ghiandola digerente; e la regione ventrale a forma di sacca, nella quale si trova lo stilo cristallino, anch'essa ghiandolare, secernente una serie di enzimi, quali amilasi, cellulasi e lipasi. Questi enzimi vengono assorbiti dalla matrice proteica mano a mano che questa si forma sul fondo della sacca. L'intestino,

anch'esso cigliato, è relativamente lungo e forma varie anse nella zona stomacale della ghiandola, prolungandosi posteriormente verso il retto, il quale attraversa il pericardio e il ventricolo per sboccare nell'ano, situato all'altezza del muscolo adduttore posteriore, nella cavità soprabranchiata, da dove le feci vengono espulse all'esterno. Le feci, che contengono sia i residui della digestione intracellulare sia le particelle parzialmente digerite che vengono poi respinte nello stomaco, sono relativamente compatte e dense, per cui si sedimentano rapidamente in acqua (Gaion, 2006).

- **APPARATO RIPRODUTTORE**

I mitili sono animali a sessi separati nei quali la fecondazione è esterna. Le femmine producono nelle ovaie una sostanza che, spargendosi nell'acqua di mare, provoca l'ejaculazione nei maschi vicini e, a sua volta, lo sperma ejaculato nell'acqua scatena nelle femmine la deposizione delle uova. Non vi è quindi copulazione e la fecondazione è esterna, oppure avviene nella cavità del mantello della madre (Gaion, 2006).

Il ruolo della temperatura nel comportamento dei Mitili

La temperatura è riconosciuta come una dei maggiori determinanti ambientali nell'attività e nel tasso di metabolismo degli organismi pecilotermi. I mitili come molti altri invertebrati presenti nel litorale, sebbene apparentemente incapaci di regolare il loro tasso di accumulo o di perdita di calore dall'ambiente, sono abili a variare i loro tassi di respirazione e alimentazione in modo tale da mantenersi relativamente indipendenti dalle temperature ambientali (Bayne, 1976).

Le risposte a istantanee variazioni di temperatura nel *M. edulis* sono state descritte da Widdows e Bayne (1971) e Widdows (1973a, b), infatti tra 5 e 20°C la risposta ad una immediata riduzione di temperatura, corrisponde un decremento nel tasso di filtrazione, mentre a un incremento della temperatura corrisponde un aumento del tasso di filtrazione (dati per cozze acclimatate a 15°C). Tuttavia al di sopra dei 20°C un animale acclimatato a 15°C risponde a elevate temperature riducendo il tasso di filtrazione.

Fry (1947) ha descritto i fattori letali come quelli che agiscono per distruggere l'integrazione dell'organismo. Ulteriori studi mostrano che il limite letale può dipendere da sesso, età, (Ushakov, 1965), condizioni di nutrizione e stagione (Newell e Pye, 1970a). La procedura sperimentale utilizzata per determinare la temperatura letale prevedeva riscaldare, o raffreddare, l'organismo a velocità costante fino alla morte, però Fry (1947) evidenzia, che ciò non consente alle due variabili, tempo e temperatura, di essere distinte. Tuttavia, la maggior parte dei limiti letali registrati in letteratura sono stati determinati in questo modo. Usando questa procedura, Henderson (1929) ha registrato la temperatura letale di 36,3°C per *Modiolus modiolus* e 40°C per *M. edulis*. Read e Cumming (1967) determinarono una temperatura letale più elevata di 27° per *M.*

edulis aumentando la temperatura di un grado ogni 3,5 giorni. Wells e Gray (1960) fornirono una stima ecologicamente significativa dichiarando che il limite meridionale di distribuzione per il *M. edulis* si verifica quando la temperatura media dell'acqua in estate è 26,7°C.

MATERIALI E METODI

COLTURE ALGALI

Il fitoplancton viene comunemente usato come alimento vivo da parte di organismi filtratori come i Molluschi Bivalvi. Molte specie di Bivalvi presentano una limitata capacità di sintetizzare trigliceridi, steroli liberi, digliceridi e altri lipidi di membrana. Appare dunque necessario fornire questi acidi grassi ai mitili attraverso una dieta che favorisca migliori tassi di accrescimento. Le microalghe maggiormente coltivate come fonte alimentare per gli organismi acquatici sono *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*, e per tale motivo si è ritenuto opportuno utilizzarle anche nelle sperimentazioni in oggetto.

Cenni sulla biologia delle microalghe utilizzate

Nannochloropsis oculata

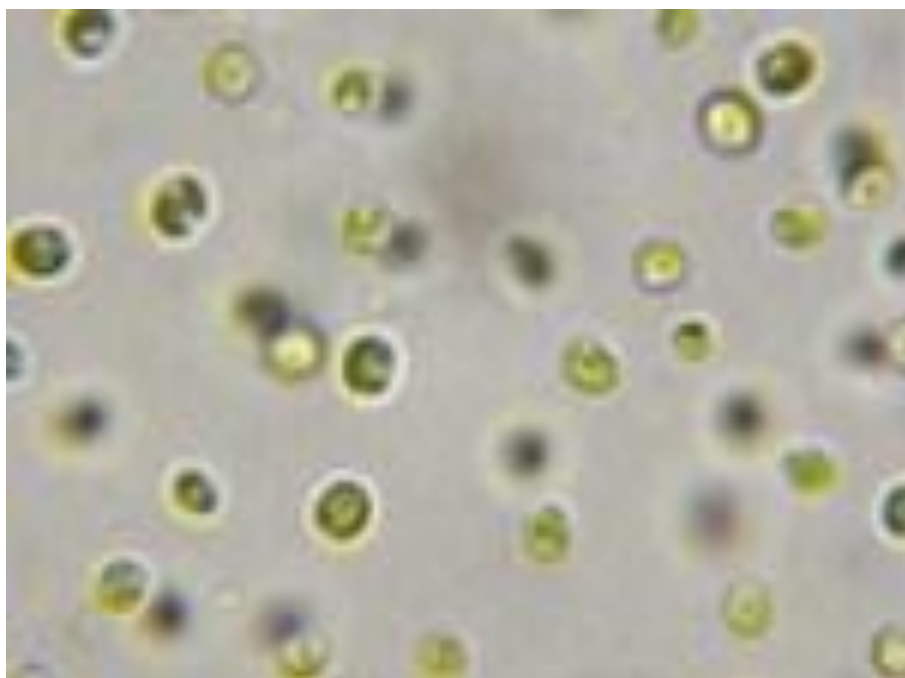


Figura 7: *Nannochloropsis oculata*

Regno Protista, divisione *Heterokontophyta*, classe *Chrysophyceae*. Si tratta di un'alga verde scuro (2–6 μm), contenente vari pigmenti come clorofilla e carotenoidi. Ha inoltre una parete cellulare spessa e solida, caratterizzata da una rapida crescita, che talvolta ne limita la digestione da parte degli animali. Contiene un livello di acidi grassi EPA (altamente insaturi) molto elevato e un alto contenuto sia di vitamina B12 che di proteine (Carlino, 2008).

Isochrysis galbana



Figura 8: *Isochrysis galbana*

Regno Protista, divisione *Haptophyta*, classe *Prymnesiophyceae*. Risulta un piccolo flagellato mobile unicellulare di lunghezza 6 μm e larghezza 4,7 μm (diametro di 3-6 micron) e presenta una superficie cellulare ricoperta da scaglie di natura cellulosa. Possiede cromatofori di colore giallo-brunastro contenenti clorofilla a e c, carotene e xantofille; le riserve sono costituite da olii e da crisolaminarina. Ha un alto

contenuto di acidi grassi polinsaturi ed in particolare un alto livello di DHA, oltre ad un elevato contenuto proteico. Viene utilizzata per l'alimentazione degli stadi larvali di molluschi bivalvi per le sue buone qualità nutrizionali e le piccole dimensioni (Carlino, 2008).

Il ciclo algale

Si possono descrivere diversi stadi di crescita suddivisi nel modo seguente (Carlino, 2008):

1. Fase di latenza: dura circa 24 ore, non si presenta crescita, ma si ha un periodo di adattamento del ceppo algale inoculato;
2. Fase di crescita (esponenziale): la fase di maggior produzione attiva, caratterizzata da crescita esponenziale delle cellule algali. La durata di questa fase può variare da 3–4 giorni fino a più di 20 giorni a seconda della specie;
3. Fase di transizione dalla crescita esponenziale allo stato stazionario: la riproduzione delle cellule algali comincia a rallentare, fino a cessare quasi totalmente (stato stazionario). Ciò è dovuto alla riduzione dei nutrienti disponibili, alla produzione di sostanze di rifiuto e all'impenetrabilità della luce nella coltura;
4. Stadio stazionario: il numero delle cellule non presenta sostanziali variazioni, poiché le cellule interrompono quasi del tutto la loro riproduzione, a causa della modificazione chimica del substrato che influenza negativamente la crescita;
5. Fase letale: arresto totale della crescita e successiva morte cellulare.

Il momento più adatto per prelevare un'aliquota di coltura algale per l'inoculo di altri volumi è la fase esponenziale. I microrganismi così ottenuti vengono sia impiegati per il lancio di nuove colture, sia per l'alimentazione come nel caso dei bivalvi.

Allevamento e mantenimento delle colture algali

La coltura di microalghe in ambiente controllato è preceduta dalle seguenti operazioni:

- ✓ Preparazione del mezzo di coltura;
- ✓ Allestimento del laboratorio e sterilizzazione attrezzatura/vetreteria;
- ✓ Trattamento di sterilizzazione dell'acqua di mare, finalizzato all'uccisione della maggior parte dei microrganismi che potrebbero arrecare danni alle microalghe in coltura;
- ✓ Regolazione della salinità ed inoculo di terreni di coltura e vitamine;
- ✓ Isolamento e conservazione dei ceppi algali.

Dopo aver eseguito le operazioni preliminari si può procedere avviando il ciclo di produzione algale, passando dalla coltura in piccoli volumi (con beute da 250 ml) fino a volumi maggiori, arrivando alla coltura vera e propria nelle beute da 2 litri.

Per creare le condizioni migliori per la crescita del fitoplancton è necessario predisporre una serie di parametri:

- Filtrazione/sterilizzazione acqua;
- Terreno di coltura;
- Luce;
- Temperatura;
- Salinità;
- Aereazione;
- pH.

Filtrazione. Per ottenere fioriture monospecifiche è stato necessario filtrare l'acqua di mare, precedentemente prelevata in siti non inquinati, mediante filtri millipore con pori dal diametro di 0,45 μm , che hanno garantito l'allontanamento di tutte le specie algali endogene dal campione d'acqua stesso. La stessa è stata sottoposta a bollitura per circa 20 minuti.

Terreno di coltura. I terreni hanno lo scopo di arricchire l'acqua di mare (sterilizzata) con nutrienti, sali minerali e vitamine. In questo specifico caso è stato utilizzato il terreno di coltura proposto da Walne (1974). Le vitamine sono state aggiunte solo successivamente la sterilizzazione in autoclave in quanto, per la loro struttura chimica, risultano essere altamente sensibili alla temperatura (Helm, 1990). Si è poi proceduto con l'aggiunta dell'inoculo algale che ha permesso di ottenere una coltura monospecifica.

Luce. Trattandosi di organismi vegetali l'illuminazione è fondamentale per la fotosintesi. Sono state utilizzate lampade al neon da 65 – 80 W poste a 15 – 20 cm di distanza dalle colture, con un fotoperiodo di 16 – 18 ore di luce.

Temperatura. La temperatura ideale dipende dalla specie algale che si intende allevare, nel nostro caso è stata mantenuta intorno ai 20 – 22 °C.

Salinità. Il fitoplancton marino si adatta bene ai diversi gradi di salinità, ma sembra riscontrare una crescita superiore a salinità inferiori a quelle ambientali. Per le nostre due specie di microalghe si è proceduto con una salinità del 25 psu.

Areazione. È necessario fornire un'areazione moderata per mantenere in sospensione le microalghe, evitando così che precipitino sul fondo.

PH. Compreso tra 8,2–8,7.

Procedura per effettuare gli inoculi in sterilità

Le colture devono essere maneggiate seguendo determinate procedure al fine di evitare la contaminazione delle colture stesse. La procedura eseguita per gli inoculi è la seguente:

- rimozione del tappo in cotone idrofilo dalla beuta contenente la coltura riproduttiva;
- sterilizzazione del collo della beuta tramite esposizione alla fiamma di un becco *Bunsen*;
- travaso di un inoculo del volume desiderato in una beuta sterile, contenente il terreno di coltura;
- flambato il collo della seconda beuta, realizzazione e inserimento del tappo, costituito da un batuffolo di cotone idrofilo sterile, avvolto da una porzione di parafilm e da un pezzo di carta argentata, flambata nella parte interna;
- marcatura della beuta con il nome della specie e la data.

Queste operazioni sono state effettuate manualmente indossando guanti in lattice. I prelievi sono stati effettuati con delle pipette monouso. L'inoculo delle colture starter dei due ceppi algali è stato effettuato in due beute da 500 ml, con 250 ml di fitoplancton e 250 ml di terreno di coltura.

Le colture nelle beute sono state poi esposte alla luce di quattro lampade al neon da 65 – 80 W, e areate ininterrottamente inserendo al loro interno la pipetta collegata alla valvola dell'areazione. Dalle colture starter sono state ricavate delle colture intermedie, in beute da 250 ml con 20 ml di alghe e 80 ml di terreno, portato poi a volume con acqua di mare sterilizzata. Anche le colture intermedie, come le precedenti,

sono state posizionate davanti a lampade al neon e aerate costantemente. Queste colture intermedie in pochi giorni hanno raggiunto la fase esponenziale ed è stato effettuato l'inoculo in beute da 2 litri, con 250 ml di fitoplancton, 5 ml di terreno di Walne e acqua di mare sterilizzata. Le colture algali presenti nelle beute da 2 litri, una volta raggiunta la fase esponenziale, sono state utilizzate come alimentazione per i mitili.

Le due specie di fitoplancton utilizzate sono rimaste separate per tutto l'esperimento.



Figura 9: Beute con le colture algali

UTILIZZO DEI SENSORI HALL PER LO STUDIO DEL COMPORTAMENTO DI MYTILUS GALLOPROVINCIALIS

Nel procedere in questo lavoro si è agito adoperando i sensori Hall originariamente impiegati da Wilson et al. (2002) per lo studio in laboratorio del comportamento del *M. galloprovincialis* in risposta a variazioni di tipo ambientale, in particolare alla variazione di concentrazione di fitoplancton e alla variazione della temperatura dell'acqua.

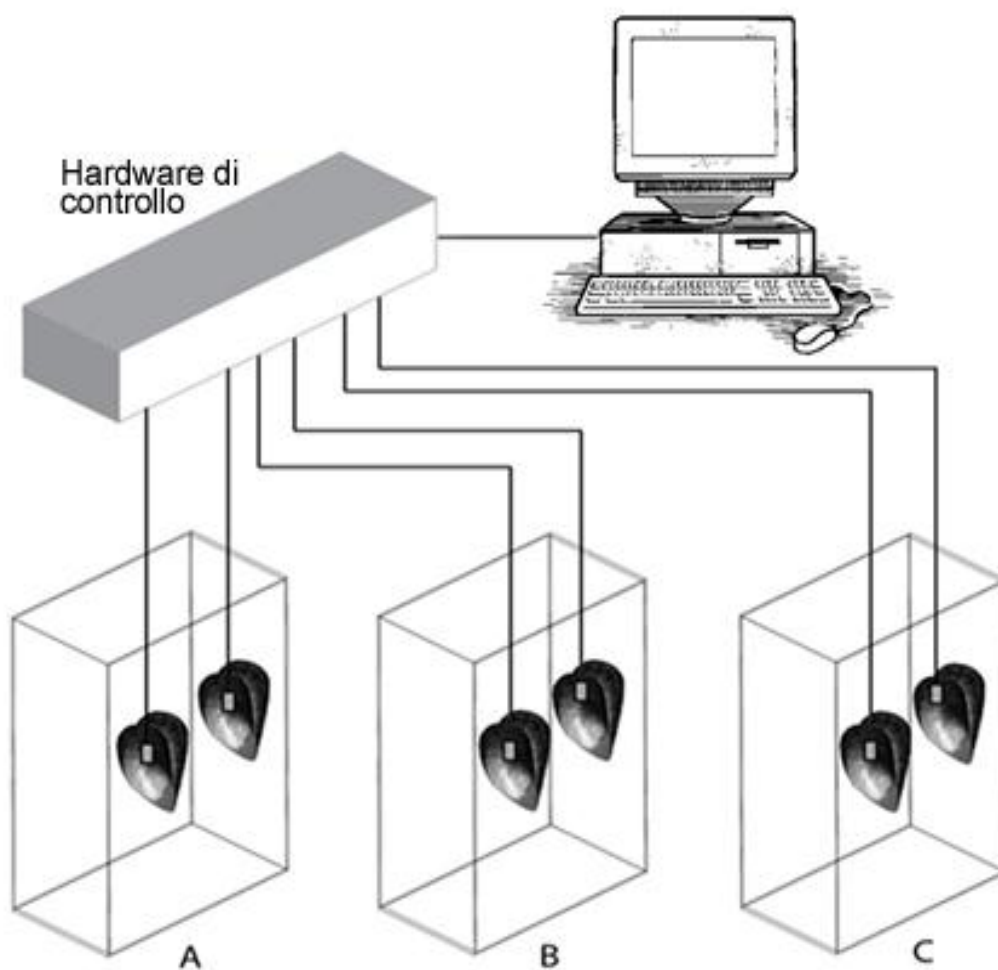


Figura 10: Schema dell'esperimento

Descrizione sensori

Lo strumento utilizzato si presenta composto da due elementi: un magnete, applicato ad una valva del mitile, genera un campo magnetico; un sensore, posto nell'altra valva, misura tale campo magnetico. L'apertura e/o chiusura delle valve produce una variazione della misura della forza del campo magnetico percepita dal sensore (Wilson *et al.*, 2002), rendendo così possibile la sua tracciabilità nel tempo. Questo sistema è poi collegato ad un computer munito di software appositamente sviluppato per la registrazione dei dati.



Figura 11: Hardware di controllo . I led indicano l'apertura (verde) o la chiusura delle valve (rosso). Entrambi i led spenti indicano lo zero, dal quale far partire la registrazione.

Nel software di registrazione dei parametri è stato utilizzato un algoritmo per convertire le misure fornite dai sensori in una misura di distanza lineare (in millimetri), in quanto l'intensità del campo magnetico non è proporzionale alla distanza ma varia in

modo esponenziale. Il sensore veniva calibrato mediante una vite filettata contenente il magnete, ciò permetteva a valve chiuse di impostare in maniera precisa per ogni esemplare la distanza 0 mm.

Il sistema è stato programmato in modo da consentire il rilevamento dei dati per 24 ore al giorno, ad intervalli di 2 secondi, ma ai fini dell'esperimento sono state prese in considerazione le registrazioni effettuate nelle ore notturne, dalle 21:00 alle 6:00, in quanto durante le ore diurne il comportamento dei mitili avrebbe potuto subire alterazioni da fattori accidentali dovuti alle quotidiane attività di laboratorio.



Figura 12: Esempio di andamento osservato al PC durante gli esperimenti. Nella parte alta dello schermo sono visualizzati i valori di apertura di ogni canale associato ad un colore, l'ultimo canale indica la temperatura. Il grafico mostra i valori dei canali aggiornati ogni due secondi.

Risposte comportamentali alla variazione di fitoplancton

I Bivalvi sono stati raccolti nel porto di Cagliari in località “su Siccu”, tagliando loro il bisso. Gli esemplari sono stati successivamente misurati in quanto ai fini dell’esperimento i mitili dovevano avere mediamente la stessa lunghezza.

In laboratorio le valve dei mitili sono state pulite e asciugate e con una apposita resina bicomponente (pattex bicomponente) resistente all’acqua sono stati applicati sulle valve il sensore e il magnete. Le cozze sono state posizionate nelle vasche dopo due ore dalla raccolta.



Figura 13: Mitili con attacco per i sensori. Nel dado posizionato in alto veniva sistemato un bullone contenente in magnete, mentre l’altro posizionato al centro è stato utilizzato per il sensore che veniva poi bloccato in posizione da una vite inox.

Sono state adoperate tre vasche di vetro (A,B,C) contenenti ciascuna un volume di 25,6 litri di acqua di mare filtrata, con filtri da 0,45 μm .

I mitili sono stati fatti acclimatare con il sensore per 2 giorni prima del

trattamento. Nelle tre vasche a disposizione , sono stati aggiunti due differenti volumi di acqua di mare filtrata contenente il fitoplancton. La specie utilizzata per il primo esperimento, iniziato a dicembre 2010, è stata *Nannochloropsis oculata*, mentre per il secondo esperimento, iniziato a gennaio 2011, è stata utilizzata *Isochrysis galbana*.

Nella vasca A sono stati aggiunti 500 ml di coltura algale, nella vasca B 1000 ml e nella vasca C non è stato aggiunto alcun alimento per i mitili, ed è stata utilizzata come "controllo". In entrambi gli esperimenti gli esemplari sono stati monitorati per 10 giorni, in vasche costantemente areate e effettuando periodicamente controlli sullo stato dei sensori e dei mitili.

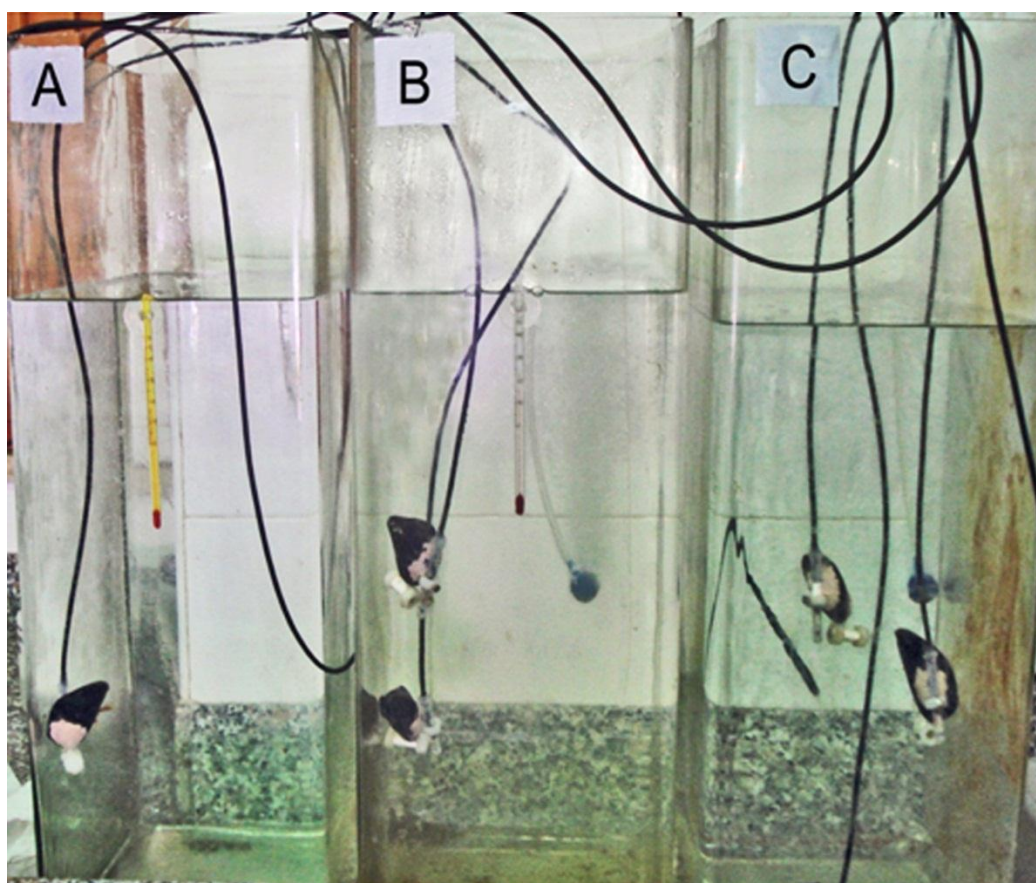


Figura 14: Le tre vasche con i mitili muniti di sensori

Ai fini dell'esperimento sono stati presi in considerazione per le analisi statistiche i dati relativi alle registrazioni nelle tre vasche considerando i seguenti periodi:

- (T0): registrazioni effettuate due giorni antecedenti la fase di alimentazione;
- (T1): registrazioni effettuate nei due giorni iniziali della fase di alimentazione;
- (T2): registrazioni effettuate il nono e decimo giorno della fase di alimentazione.

Tra i due esperimenti i mitili sono stati sostituiti, le vasche sono state sterilizzate ed è stata aggiunta nuova acqua filtrata.

Risposte comportamentali alla variazione di temperatura

Lo studio del comportamento del *M. galloprovincialis*, in risposta alla temperatura dell'acqua all'interno degli acquari ha avuto inizio a maggio 2010.

Il sistema di sensori Hall è stato posizionato sulle valve di sei mitili, successivamente inseriti nelle tre vasche riempite con acqua di mare filtrata. L'acqua all'interno delle vasche è stata portata a tre diverse temperature: la vasca 1 conteneva acqua con una temperatura pari a 20°C, mantenuta costante tramite un sistema di refrigerazione, la vasca 2 conteneva acqua a temperatura ambiente di 25°C e la vasca 3 acqua a 30°C mantenuta costante per mezzo di un termostato. In tutte e tre le vasche erano presenti due mitili. Complessivamente l'esperimento è durato 20 giorni, ma per le analisi statistiche sono state prese in considerazione 9 ore notturne per sei giorni consecutivi.

Giornalmente gli acquari venivano monitorati verificando che la temperatura dell'acqua rimanesse costante nelle tre vasche. Durante tutta la sperimentazione, è stata controllata la sopravvivenza degli animali sia nelle vasche controllo che in quelle relative ai trattamenti sperimentali. Sono stati considerati morti, oltre agli individui che presentavano le valve aperte, anche quelli che sottoposti ad una leggera percussione non reagivano con la chiusura delle valve.

ANALISI DEI DATI

I dati di apertura ottenuti durante gli esperimenti non sono stati direttamente sottoposti ad analisi statistiche. Come variabile per l'analisi dell'apertura di ogni mitile sotto l'effetto dei diversi trattamenti, è stato considerato il tempo di apertura delle valve (in secondi). L'apertura delle valve veniva considerata significativa quando questa superava l'80% del valore massimo di apertura delle valve di ogni singolo esemplare, questa percentuale è stata definita a priori per evitare possibili errori di lettura da parte dello strumento.

Risposte comportamentali alla variazione di fitoplancton

È stata effettuata inizialmente per i due esperimenti un'analisi esplorativa dei tempi di apertura dei mitili all'interno di ogni vasca. I dati sono stati analizzati con test di Student ($P < 0,05$) per individuare eventuali differenze nei tempi di apertura nei vari trattamenti. Questo test è stato utilizzato per dimostrare la validità dell'ipotesi nulla H_0 o dell'ipotesi alternativa H_1 .

H_0 o ipotesi nulla: il tempo di apertura della valve non è influenzato dalle diverse concentrazioni di fitoplancton;

H_1 o ipotesi alternativa: il tempo di apertura delle valve è influenzato dalle diverse concentrazioni di fitoplancton.

All'interno di ogni periodo (T_0 , T_1 , T_2), con questo test, sono stati messi a confronto i tempi di apertura dei mitili tra le tre vasche: A vs B, B vs C, A vs C. Successivamente è stata effettuata l'ANOVA per la valutazione di differenze tra i tempi di apertura calcolati per i due periodi (T_1 - T_2) all'interno delle tre vasche A-B-C. Il test C di Cochran è stato utilizzato per verificare l'ipotesi di omogeneità delle varianze, è

stato quindi possibile comparare i tempi di apertura dei mitili delle tre vasche A-B-C nei due periodi T_1 e T_2 .

È stato effettuato poi un t-Student e un'analisi ANOVA tra i T_1 e T_2 dell' l'esperimento 1 e l'esperimento 2, per verificare se ci fossero differenze significative tra i trattamenti con le 2 diverse alghe. Nel caso l'ANOVA indichi differenze significative è stata utilizzata la procedura LSD di Fisher o Differenza Minima Significativa che ha permesso di condurre tutti i possibili confronti.

Inoltre è stata svolta un'analisi tra i tempi di apertura dei mitili posti all'interno delle vasche controllo, per verificare che non fosse presente un "effetto vasca".

Risposte comportamentali alla variazione di temperatura

Per l'analisi del comportamento dei mitili a tre diverse temperature è stato studiato l'andamento dei tempi di apertura dei mitili nei sei giorni di trattamento. È stato effettuato preliminarmente un test di Student per dimostrare la validità dell'ipotesi:

H_0 : non esistono differenze significative nei tempi di apertura dei mitili sottoposti alle tre temperature.

È stata svolta un'ANOVA, per verificare se il comportamento dei mitili fosse costante o meno durante i 6 giorni a parità di trattamento. Successivamente l'analisi ANOVA è stata utilizzata per confrontare la risposta dei mitili alle diverse temperature.

L'omogeneità della varianza è stata testata mediante il test di Cochran, nel caso la varianza non fosse omogenea si è provveduto alla trasformazione dei dati.

Nel caso l'ANOVA indichi differenze significative è stata utilizzata la procedura LSD di Fisher o Differenza Minima Significativa che ha permesso di condurre tutti i possibili confronti.

Analisi della mortalità

È stata svolta successivamente un'analisi della mortalità degli esemplari posti in acqua a temperature elevate (28°-30°C) per la durata totale dell'esperimento, ossia 20 giorni. È stato calcolato il tempo (in ore) di sopravvivenza di ciascun esemplare, è stata poi effettuata un'analisi descrittiva dei dati calcolando i tempi medi di sopravvivenza dei nove mitili, sottoposti a queste temperature. Con il test di Student è stato effettuato un ulteriore confronto tra le ore di sopravvivenza dei mitili in acqua calda.

RISULTATI

I mitili utilizzati per tutte le sperimentazioni avevano una lunghezza media (\pm DS) di $65\pm 2,95$ mm.

I grafici (Fig.15-16) rappresentano un esempio dell'attività di due mitili nelle 9 ore di esperimento. Nelle ordinate sono riportati i mm che indicano l'apertura e chiusura delle valve, mentre nelle ascisse è indicato il tempo dalle 21:00:00 alle 06:00:00 ogni 2 secondi. È possibile notare in questo caso tempi di apertura e chiusura relativamente costanti, con aperture che arrivano fino ai 10 mm e una chiusura che tocca raramente lo zero.

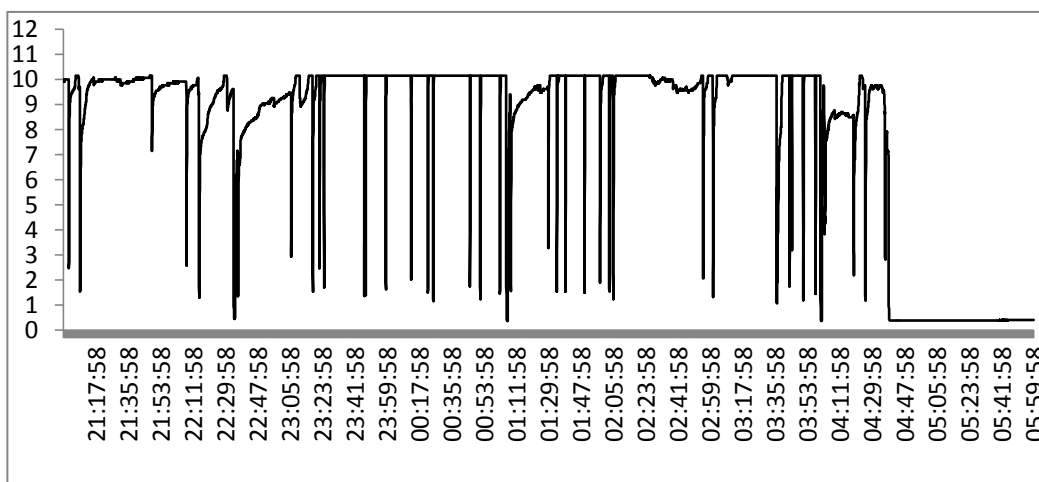


Figura 15: Esempio dell'attività di un mitile al T₁

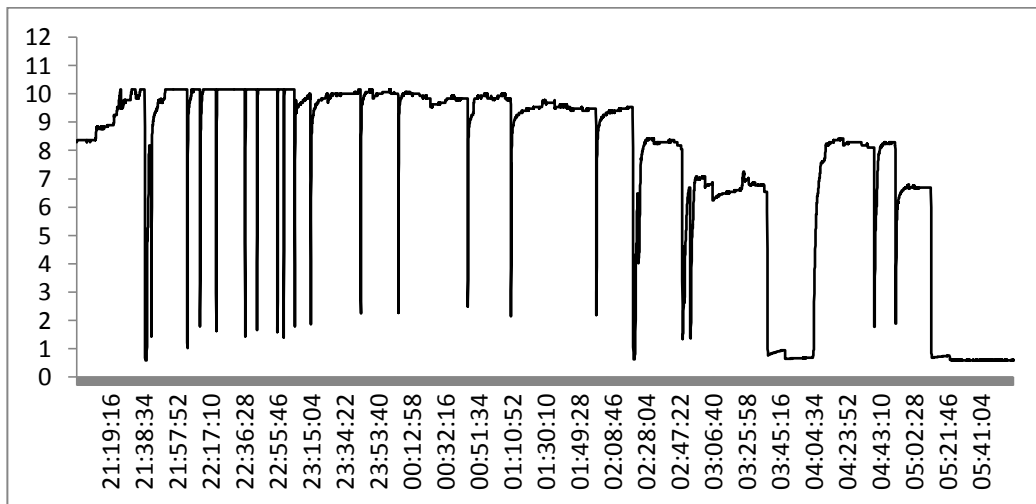


Figura 16: Esempio dell'attività di un mitile al T_2

RISPOSTE COMPORTAMENTALI ALLA VARIAZIONE DI FITOPLANCTON

Esperimento 1 - Nannochloropsis oculata

Il grafico (Fig.17) mostra il tempo di apertura e chiusura dei mitili nei 3 periodi, T₀-T₁-T₂.

Si nota che al T₀ il tempo di apertura delle valve nelle 3 vasche è maggiore rispetto al T₁ e T₂, dove diminuiscono notevolmente nelle vasche controllo (C).

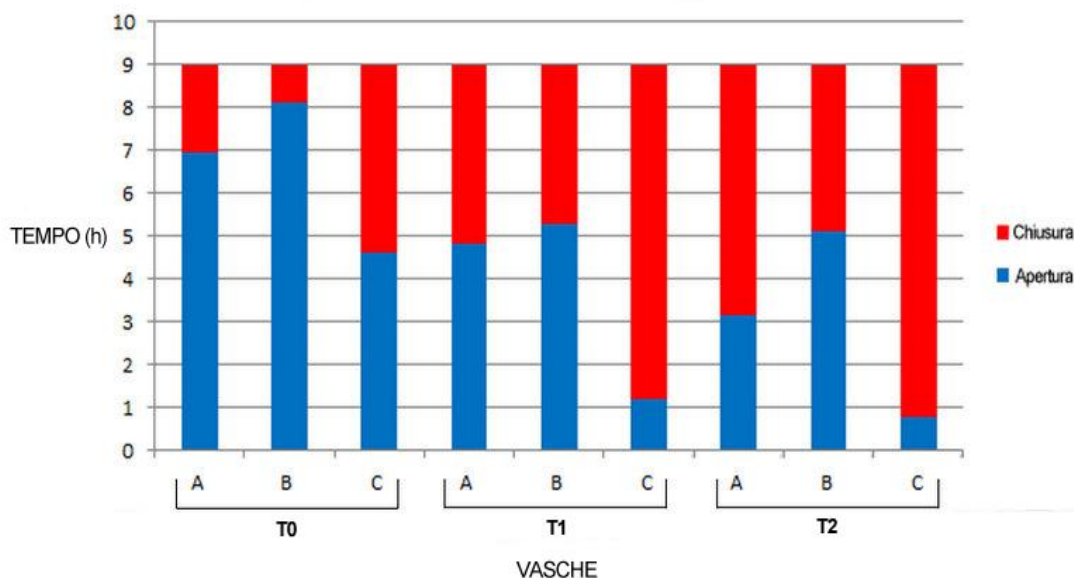


Figura 17: Grafico dei tempi di apertura e chiusura delle valve

I tempi di apertura dei mitili sotto diverse concentrazione dell'alga *N. oculata* sono stati inizialmente sottoposti ad un'analisi esplorativa i cui risultati sono riportati nella tabella sottostante (Tabella 1).

Tabella 1 - Statistica descrittiva dei dati relativi ai tempi di apertura (in sec) dell'esperimento 1 con *N. oculata*. DS=Deviazione Standard, ES=Errore Standard.

PERIODI	VASCHE	MEDIA	MEDIANA	DS	VARIANZA	ES	MAX	MIN
T0	A	24941	26905	6930	4,80E+07	3465	30936	15020
	B	29222	29389	2741	7,51E+06	1370	32402	25710
	C	16531	17426	11002	1,21E+08	4492	29354	3900
T1	A	17292	16374	11879	1,41E+08	5939	29578	6840
	B	18947	19437	9489	9,00E+07	4745	28804	8108
	C	4235	2758	4369	1,91E+07	2185	10638	784
T2	A	11359	10797	10019	1,00E+08	5010	21912	1928
	B	18367	18995	5021	2,52E+07	2511	22684	12792
	C	2734	2934	826	6,83E+05	413	3420	1646

Per quanto riguarda l'esperimento 1, all'inizio del trattamento con *N. oculata* (T₁), sono state osservate differenze significative nei tempi di apertura dei mitili nelle vasche A-C e B-C (P<0,05), cioè tra i due trattamenti (concentrazioni 500 ml-1000 ml) e il controllo. Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i tempi di apertura dei mitili sottoposti ai due trattamenti con *N. oculata* nelle vasche A-B (P>0.05).

Al 9° e 10 ° giorno di esperimento (T₂), sono state evidenziate differenze significative (P<0,05) tra i tempi di apertura dei mitili nella vasca a concentrazione di 1000 ml di fitoplancton e il controllo (B-C). Non sono state riscontrate differenze significative nel confronto tra i mitili nelle vasche A-C e A-B.

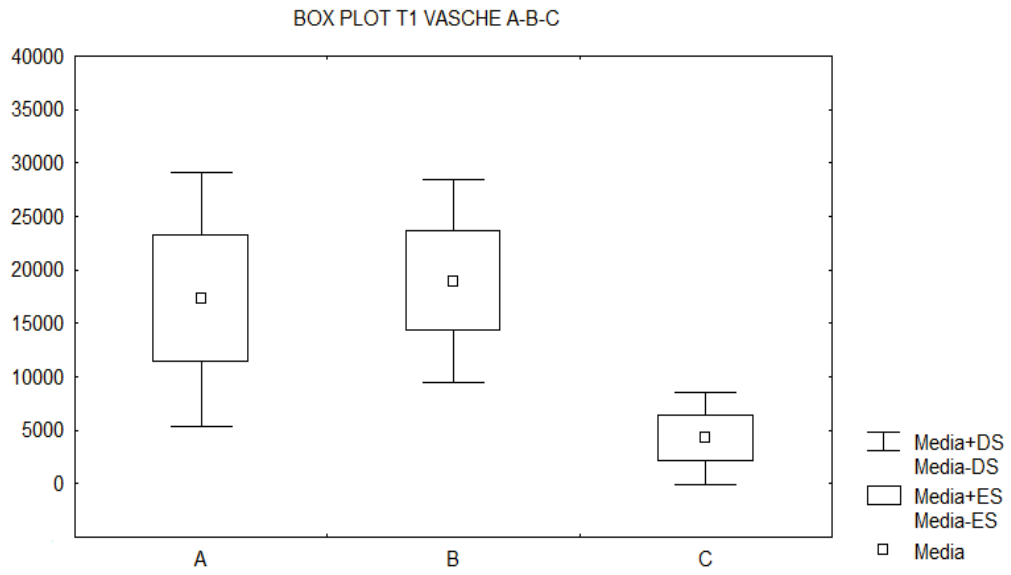


Figura 18: Box plot dei tempi di apertura dei mitili nelle 3 vasche al periodo T1

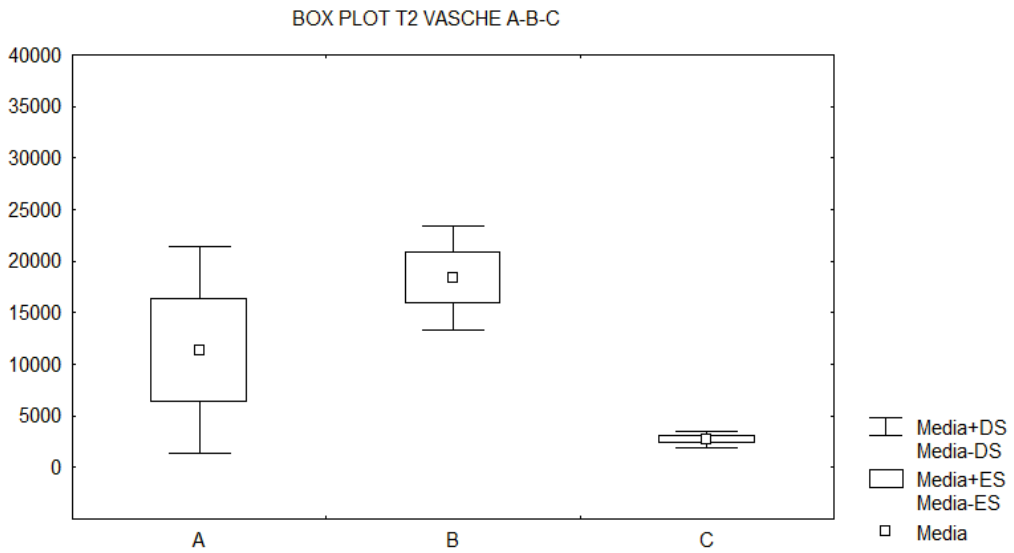


Figura 19: Box plot dei tempi di apertura dei mitili nelle 3 vasche al periodo T2

È stato applicato un test ANOVA per l'analisi della varianza dei tempi di apertura dei mitili nelle tre vasche durante i due periodi (T_1 - T_2). L'ANOVA ha confermato le analisi precedentemente svolte, infatti vi è una differenza significativa tra le medie dei tempi di apertura nelle tre vasche (ANOVA; $P < 0,05$) (Tabella 2).

Tabella 2: Risultati ANOVA dei tempi di apertura dei mitili nelle vasche A-B-C al T_1 e T_2

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,0529E9	5	2,10579E8	3,36	0,0257
Within groups	1,12958E9	18	6,27542E7		
Total (Corr.)	2,18247E9	23			

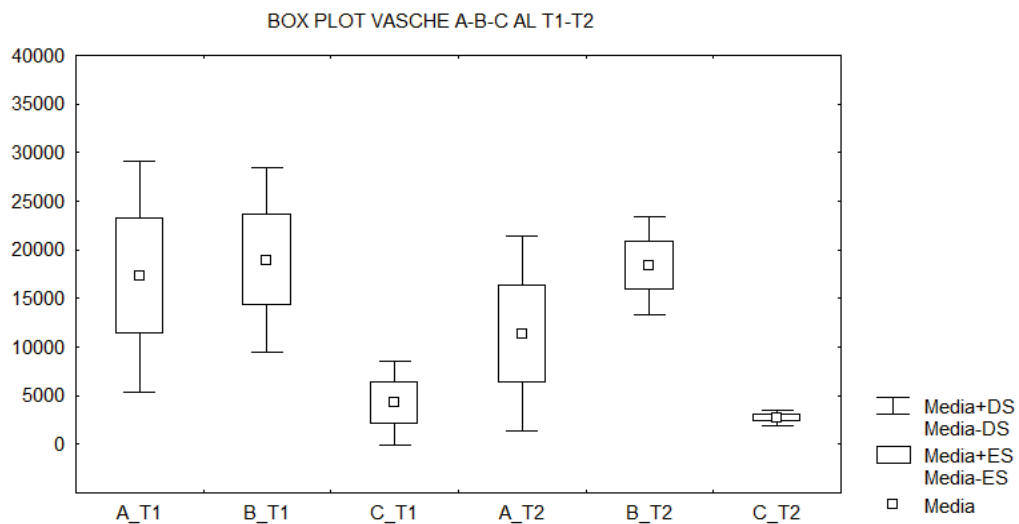


Figura 20: Box plot del confronto delle vasche A-B-C al T_1 T_2

Viste le differenze significative evidenziate dall'ANOVA, è stato possibile effettuare un test LSD di Fisher che mostra delle differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i comportamenti dei mitili nelle vasche con 500 ml e 1000 ml del T_1 e i controlli (al T_1 e al T_2), e tra le vasche 1000 ml del T_2 e i controlli (al T_1 e T_2). Non sono presenti invece differenze tra i mitili nella vasca da 500 ml nel T_2 e i controlli.

Con il test di Cochran sono stati analizzati i tempi di apertura delle cozze nella vasca A-B-C in T₁-T₂. In tal caso non è stata osservata una differenza significativa tra le deviazioni standard e il livello di confidenza (P=0,38 Cochran's C test=0,37).

Esperimento 2 - *Isochrysis galbana*

Come per l'esperimento 1 anche in questo caso è stato costruito un grafico che rappresenta i tempi (in ore) di apertura e chiusura dei mitili nei 3 periodi (T₀-T₁-T₂).

Dal grafico si può osservare che non è presente una differenza significativa tra le ore di apertura e chiusura dei mitili al T₀ e T₁, mentre al T₂ in particolare nelle vasche A-B i tempi di chiusura sono maggiori.

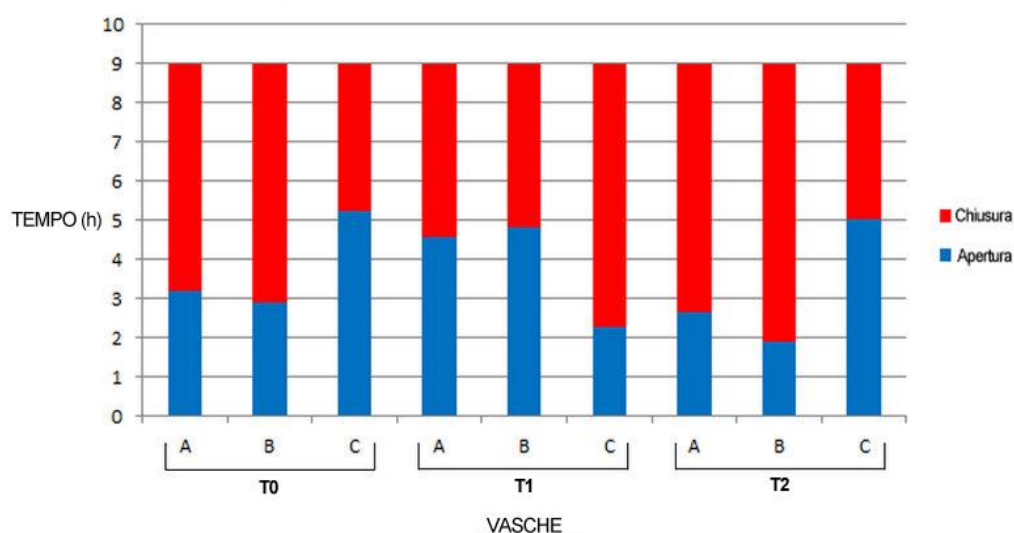


Figura 21: Grafico dei tempi di apertura e chiusura delle valve

I tempi di apertura degli esemplari sottoposti al trattamento con *I. galbana* sono stati inizialmente analizzati mediante un'analisi esplorativa dei dati. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella sottostante (Tabella 3).

Tabella 3: Statistica descrittiva dei dati relativi all'esperimento 2 con *I. galbana*

PERIODI	VASCHE	MEDIA	MEDIANA	DS	VARIANZA	ES	MAX	MIN
T ₀	A	11478	5280	13922	1,94E+08	6961	32246	3106
	B	10488	3874	14584	2,13E+08	7292	32292	1912
	C	18850	21356	13479	1,82E+08	5503	32402	612
T ₁	A	16411	16522	17922	3,21E+08	8961	32282	318
	B	17310	17863	17355	3,01E+08	8677	32362	1150
	C	8130	8538	2478	6,14E+06	1239	10690	4752
T ₂	A	9512	6276	10182	1,04E+08	5091	24204	1290
	B	6898	3778	7940	6,30E+07	3970	18682	1352
	C	18178	15962	13256	1,76E+08	7653	32402	6170

Nell'esperimento 2 nel quale è stata utilizzata l'alga *I. galbana*, il test t-Student applicato ai tempi di apertura dei mitili all'interno delle tre vasche al T₀-T₁ e T₂ non ha evidenziato differenze significative ($P > 0,05$).

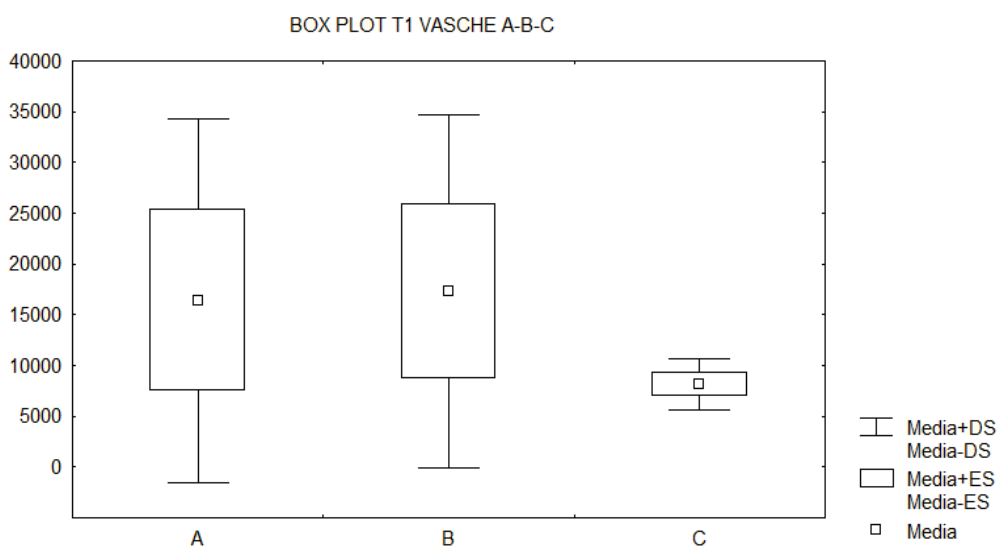


Figura 22: Box plot dei tempi di apertura dei mitili nelle 3 vasche al periodo T1

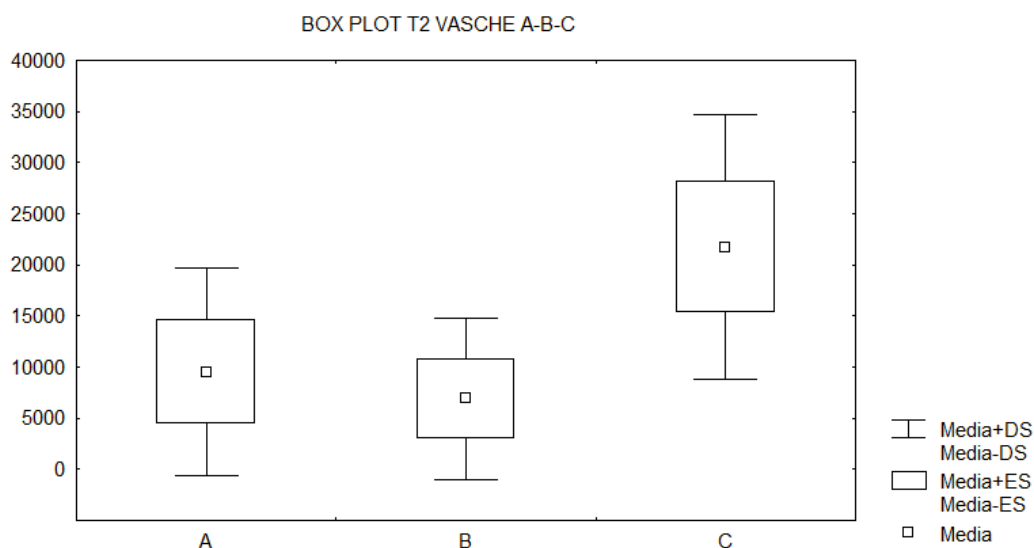


Figura 23: Box plot dei tempi di apertura dei mitili nelle 3 vasche al periodo T2

È stato svolto anche in questo caso un test ANOVA per analizzare le differenze tra i tempi di apertura dei mitili nella vasche A–B–C durante i due periodi (T_1 - T_2). Anche in questo caso il test non ha evidenziato differenze significative ($P > 0,05$) tra le medie dei tempi di apertura nei due periodi.

Tabella 4: Risultati ANOVA tra i tempi di apertura dei mitili nelle vasche A-B-C nei due periodi.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	7,15837E8	5	1,43167E8	0,89	0,5070
Within groups	2,88881E9	18	1,60489E8		
Total (Corr.)	3,60465E9	23			

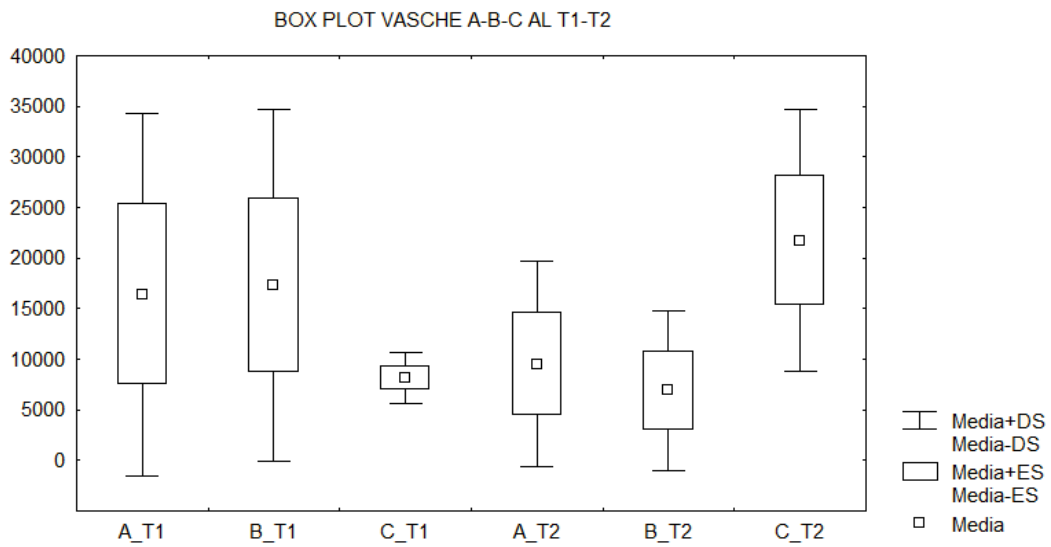


Figura 24: Box plot del confronto delle vasche A-B-C al T₁ T₂

L'analisi mediante test di Cochran tra i tempi di apertura dei mitili nella vasca A-B-C in T₁-T₂, ha evidenziato che non sono presenti differenze significative tra le deviazioni standard e il livello di confidenza (P=0,59; Cochran's C test=0,33).

Analisi risposte comportamentali tra i due esperimenti

È stato svolto un t-Student tra l'esperimento 1 con *N. oculata* e l'esperimento 2 con *I. galbana*. Questo test non ha evidenziato differenze significative tra i tempi di apertura dei mitili sottoposti ai 2 trattamenti con le diverse alghe. Una successiva analisi della varianza tra i tempi di apertura dei mitili nei periodi T₁-T₂ ha confermato che non sono presenti differenze significative nel comportamento degli esemplari tra i due esperimenti (P>0,05).

Tabella 5: Analisi della varianza tra l'esperimento 1 e l'esperimento 2

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,78536E9	11	1,62305E8	1,45	0,1921
Within groups	4,01838E9	36	1,11622E8		
Total (Corr.)	5,80374E9	47			

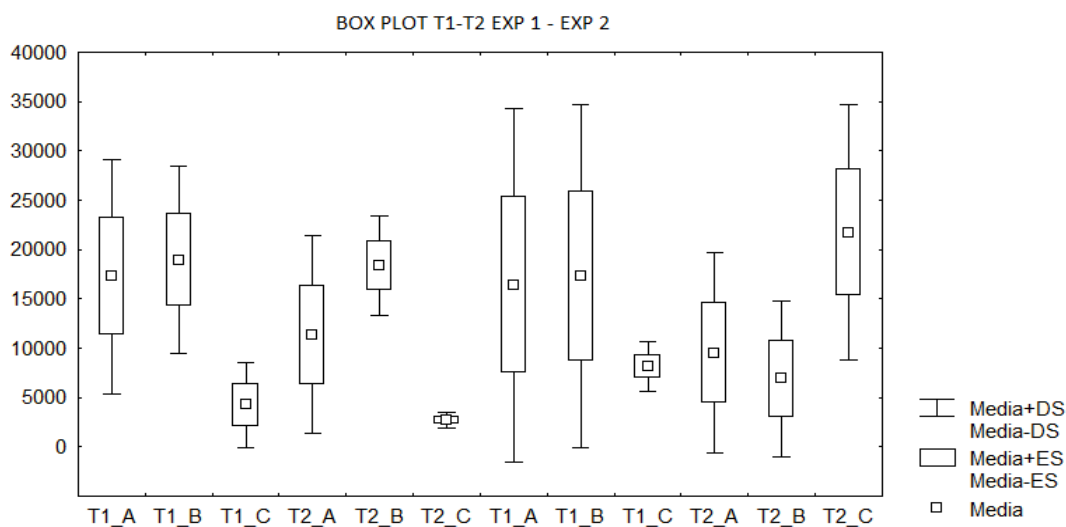


Figura 25: Box Plot tra tempi di apertura al T₁-T₂ nei due esperimenti

Analisi risposte comportamentali tra le vasche controllo

È stato effettuato un t-Student per un confronto tra il comportamento dei mitili nelle vasche controllo (T_0), cioè prima dei diversi trattamenti. In questo caso non è stata osservata nessuna differenza significativa tra i tempi di apertura degli esemplari posti in vasche diverse ($P > 0,05$). È stato inoltre utilizzato il test C di Cochran che ha confermato che non vi è una differenza significativa tra le deviazioni standard e il livello di confidenza ($P = 0,91$; Cochran's C test = 0,27).

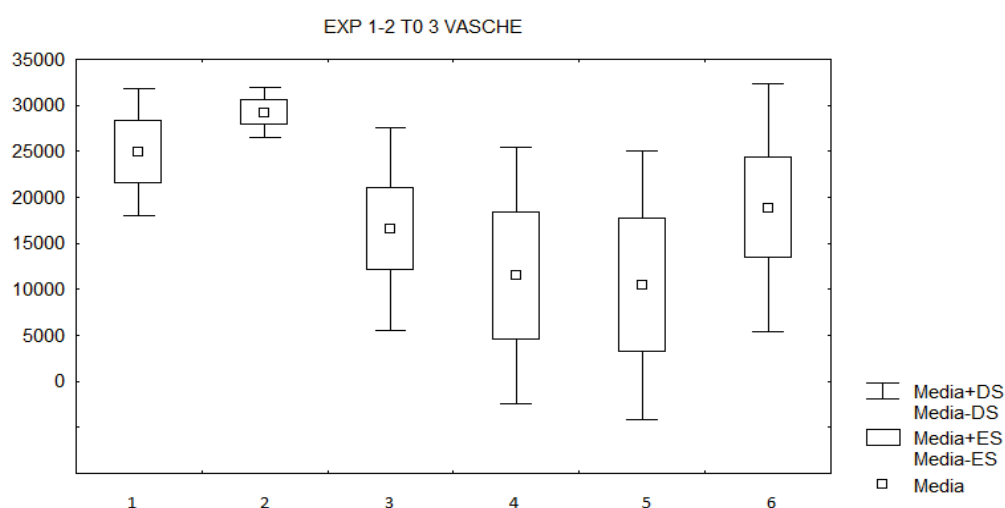


Figura 26: Box plot delle 6 vasche controllo

Il Box-Plot mostra i tempi di apertura degli esemplari nelle sei vasche prive di fitoplancton nei due esperimenti: le vasche 1-2-3 corrispondono alle vasche A-B-C nel periodo T_0 nell'esperimento 1, mentre le vasche 4-5-6 corrispondono alle vasche A-B-C nel periodo T_0 nell'esperimento 2.

RISPOSTE COMPORTAMENTALI ALLA VARIAZIONE DI TEMPERATURA

In questo caso è stato costruito inizialmente un grafico che mostra l'andamento dei tempi di apertura dei mitili sottoposti alle tre temperature nei sei giorni (Fig. 27).

Dal grafico si può notare che il 5° e 6° giorno le cozze in acqua calda (30°C) hanno aumentato gradualmente il loro tempo di apertura, al contrario i mitili in acqua fredda (20°C) e a temperatura ambiente (25°C) hanno mostrato un comportamento relativamente costante durante i sei giorni di esperimento.

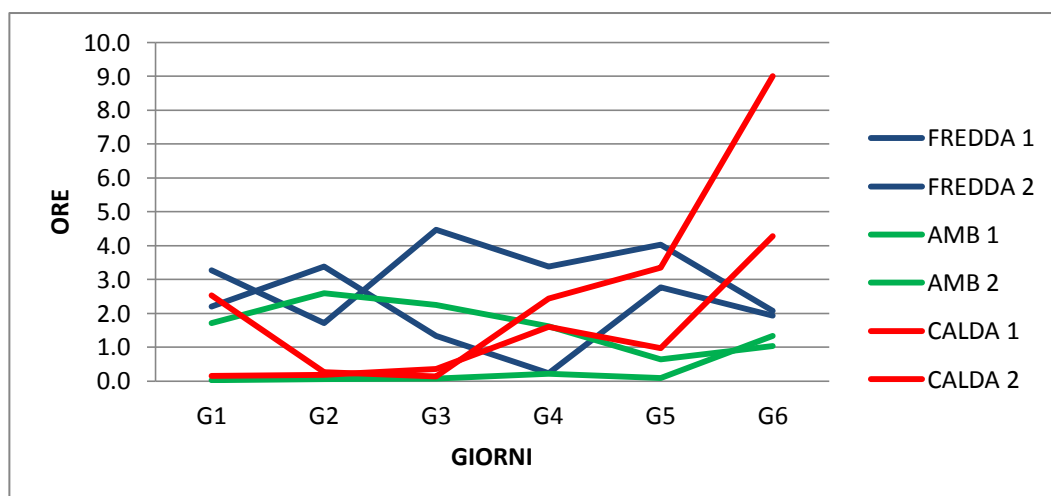


Figura 27: Il grafico mostra i tempi di apertura dei mitili in sei giorni

Il confronto delle coppie di mitili trattati a 20°C, 25°C e 30°C durante i 6 giorni non ha mostrato differenze significative, rispettivamente $P=0,87$, $P=0,96$ $P=0,06$.

È stato effettuato poi un t - Student per confrontare i tempi di apertura dei mitili sottoposti alle tre temperature. È stata rilevata una differenza significativa soltanto tra i tempi di apertura in acqua a 20°C e a 25°C, ($P<0,05$), mentre tra i mitili in acqua a 20° e 30° C e tra 25° e 30°C non è stata riscontrata una differenza significativa ($P>0,05$).

Il test C di Cochran ha evidenziato che i dati relativi ai mitili non presentavano varianze omogenee e si è provveduto a trasformarli mediante logaritmo. L'analisi dei dati trasformati ha evidenziato che non sono presenti differenze significative tra le deviazioni standard e i livelli di confidenza ($P=0,30$; Cochran's C test=0,48).

Il test ANOVA eseguito tra i tempi di apertura trasformati in logaritmi ha evidenziato differenze significative tra i mitili posti nelle 3 diverse vasche in sei giorni di esperimento ($P<0,05$).

Tabella 6: Risultati del test ANOVA tra i tempi di apertura dei mitili sottoposti alle tre temperature

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2,88758	2	1,44379	4,33	0,0215
Within groups	11,0153	33	0,333797		
Total (Corr.)	13,9029	35			

Viste le differenze significative evidenziate dall'ANOVA, è stato possibile effettuare un test LSD di Fisher che mostra delle differenze statisticamente significative ($P<0,05$) tra i tempi di apertura dei mitili in acqua a 20°C e 25°C.

Analisi della mortalità

Durante il totale dei 20 giorni di esperimento sulla temperatura sono morti 9 esemplari. Questi si trovavano nelle vasche in cui era presente acqua calda (30°C). Il tempo medio (\pm DS) di sopravvivenza è stato stimato in $115\pm 99,9$ ore.

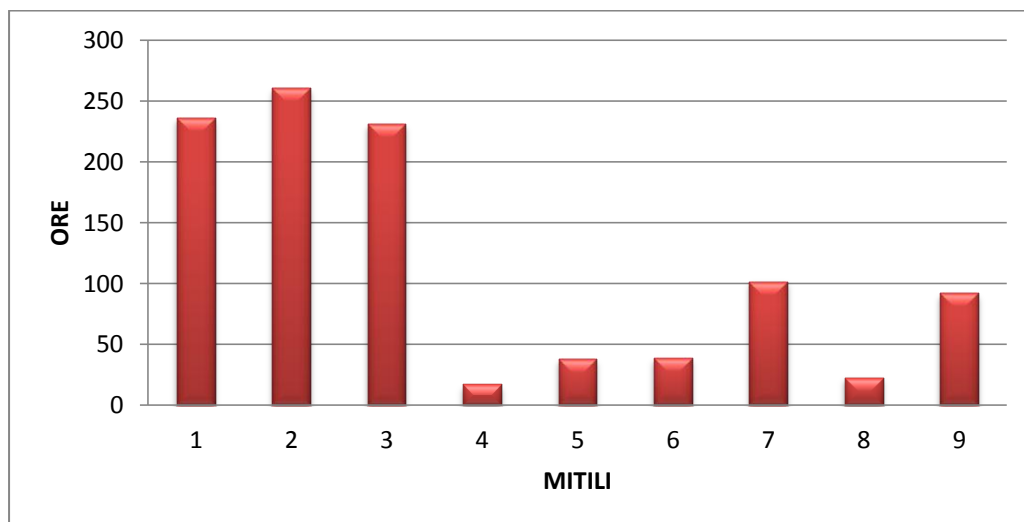


Figura 28: Analisi del tempo di sopravvivenza dei mitili in acqua a 30°C

Il grafico (Fig. 28) mette in evidenza le ore di sopravvivenza dei nove mitili nelle vasche in acqua a 30°C. È possibile notare che sono presenti due gruppi ben distinti, infatti i mitili 1-2-3 hanno un tempo medio di 242 ore, mentre le cozze 4-5-6-7-8-9 hanno un tempo di sopravvivenza medio di 51 ore.

Il t-Student ($P < 0,05$) ha confermato che esistono differenze significative tra i due gruppi di ore di sopravvivenza dei mitili posti in acqua calda.

DISCUSSIONI

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare il comportamento del *M. galloprovincialis* utilizzando il sistema di sensori Hall per registrare l'apertura e chiusura delle valve in risposta a diversi stimoli ambientali. Nello specifico sono state analizzate le reazioni alle variazioni di temperatura e alle concentrazioni di due specie di fitoplancton: *N. oculata* e *I. galbana*.

Per questo lavoro è stata impiegata una nuova tecnica, originariamente sviluppata da Wilson et al., (2002) per studi su l'alimentazione, movimenti degli arti (Wilson and Liebsch, 2003), respirazione (Wilson et al., 2003) e defecazione di animali marini endotermi (Wilson et al., 2004). Questo nuovo approccio metodologico solo di recente è stato utilizzato su molluschi bivalvi, in particolare sul *M. edulis* (Wilson et al., 2005), (Robson et al., 2007), ma nessun lavoro lo ha mai applicato a *M. galloprovincialis*.

Viste le principali caratteristiche di questa specie che apre le valve per filtrare il cibo, assorbire l'ossigeno, eliminare gli scarti (Robson, 2007) e date le abitudini sessili e la sua elevata capacità di sopravvivenza all'interno di acquari, il *M. galloprovincialis* si presta molto bene all'utilizzo di tale tecnica.

I risultati ottenuti da questo studio sono stati analizzati mediante dei test statistici che ci hanno permesso di evidenziare le caratteristiche comportamentali di questa specie. Inizialmente è stata svolta un analisi del comportamento dei mitili prima di applicare i diversi trattamenti, e questa ha evidenziato che non sono presenti sostanziali differenze tra il comportamento dei mitili tra le vasche, e questo ci permette di escludere un potenziale "effetto vasca" durante gli esperimenti.

Nei due trattamenti con *N. oculata* e *I. galbana* le risposte comportamentali dei mitili alle diverse concentrazioni di fitoplancton hanno mostrato delle differenze. Infatti, gli esemplari alimentati con *N. oculata* nel T₁ hanno mostrato tempi di apertura significativamente maggiori rispetto a quelli del controllo mentre non sono state evidenziate differenze significative tra i mitili sottoposti alle due concentrazioni di fitoplancton (500 e 1000 ml). Il fatto che siano state trovate differenze tra i mitili sottoposti a *N. oculata* ed il controllo è un risultato abbastanza scontato visto che tale specie rappresenta l'alimento abituale per *M. galloprovincialis* (Okumus, 2002). Più interessante è il fatto che non risultino differenze nel comportamento tra i mitili sottoposti alle due diverse concentrazioni. È infatti noto che, la concentrazione di fitoplancton ha un effetto positivo sul consumo di alimento e uno negativo sui tassi di filtrazione del *M. galloprovincialis* (Navarro *et al.*, 1991; Widdows, 1991). Questi autori affermano che il consumo totale di alimento aumenta significativamente con l'incremento della concentrazione di fitoplancton, mentre il tasso di filtrazione diminuisce. Il tasso di filtrazione inoltre, è influenzato anche da qualità, e dimensione delle cellule di fitoplancton o di altre particelle di cibo, ma anche dalla dimensione dell'esemplare e dai fattori ambientali (Navarro *et al.*, 1991; Widdows, 1991).

Al termine del trattamento (T₂), sono state evidenziate differenze tra i tempi di apertura dei mitili nella vasca con 1000 ml di fitoplancton e il controllo, mentre non sono stati rilevati comportamenti differenti tra i mitili sottoposti a 500 ml di fitoplancton e il controllo e tra i mitili nelle vasche con le due diverse concentrazioni. Questo potrebbe dipendere dal fatto che dopo 10 giorni nella vasca con 1000 ml di fitoplancton sia ancora presente una certa quantità di alimento che invece non è più presente nella vasca con 500 ml di *N. oculata*. In letteratura esistono pareri discordanti sull'effetto

positivo tra alimentazione e concentrazione di alimento, infatti studi effettuati sul *M. edulis* affermano che questa specie non filtra in sospensioni molto diluite, ma la filtrazione inizia con una concentrazione critica di particelle, che presumibilmente corrisponde alla soglia del recettore interessato (Theede, 1963; Thompson e Bayne, 1972). Schlieper e Kowalski (1958) invece hanno suggerito che indipendentemente dalla concentrazione di particelle le ciglia frontali sulle branchie di *M. edulis* battono alla massima velocità solo se stimolati dalle particelle di cibo o dal composto organico disciolto nell'acqua. Quindi, poiché non è stato possibile determinare la concentrazione finale di fitoplancton al termine dell'esperimento le spiegazioni possibili di questo risultato sono che: 1) non è presente alimento al termine dell'esperimento a causa del consumo; 2) la concentrazione di fitoplancton era al disotto della concentrazione critica di attivazione.

Nell'esperimento 2 nel quale è stata utilizzata l'alga *I. galbana*, non sono state osservate differenze significative tra i ai tempi di apertura anche se il valore di P dell'ANOVA è molto vicino al valore di significatività ($P=0,0507$) dei mitili all'interno delle tre vasche nei tre periodi, quindi anche in questo caso le concentrazioni differenti (500 e 1000 ml) non hanno influenzato significativamente l'apertura dei mitili. Anche un'analisi tra i mitili nei due periodi (T_1-T_2) non ha evidenziato delle differenze significative. Questo potrebbe dipendere dal fatto che *I. galbana* non costituisce un alimento tale da causare una intensa attività nel *M. galloprovincialis* allo stadio adulto; mentre quest'alga avendo delle piccole dimensioni, un alto contenuto di acidi grassi polinsaturi e di proteine viene utilizzata principalmente come alimento negli stadi larvali di molluschi bivalvi.

Da un confronto tra i mitili sottoposti alle due specie di fitoplancton non si evidenziano differenze nei loro tempi di apertura, ma mostrano un comportamento simile di apertura e chiusura delle valve, con un valore di P dell'ANOVA alquanto lontano dal valore di significatività ($P=0,192$).

Nel considerare gli effetti della concentrazione delle particelle sul tasso di ingestione, è importante identificare anche il tasso di produzione di pseudo feci (Bayne, 1976). Infatti i frequenti eventi di chiusura dei mitili potrebbero essere causati da una eliminazione di feci dal sifone esalante (Gosling, 2003). È noto che i mitili dopo la somministrazione del fitoplancton iniziano ad alimentarsi tra i 2 e 8 minuti, mentre la prima produzione di feci appare tra i 3 e 10 minuti dall'inizio dell'esperimento (Okumus, 2002). Tuttavia si può anche supporre che i mitili possano chiudere le valve per creare una corrente d'acqua che rimuova l'accumulo di feci intorno a loro che può limitare il flusso d'acqua nel sifone inalante (Robson, 2007). Inoltre bisogna tenere in considerazione che in natura i mitili mostrano dei marcati ritmi giorno-notte, sia per quanto riguarda la massima apertura sia la frequenza di apertura delle valve, questi due parametri sono significativamente maggiori durante la notte (Wilson, 2005). Il nostro esperimento prendeva in esame i dati raccolti nelle ore notturne durante le quali l'impatto sul fitoplancton dovrebbe essere maggiore.

Le risposte comportamentali dei mitili alle tre temperature sono state differenti, infatti durante i sei giorni di esperimento sono stati registrati tempi di apertura diversi tra i mitili posti nelle tre vasche. Le differenze significative emerse riguardavano i mitili posti in acqua fredda (20°C) e in acqua a temperatura ambiente (25°C). Inoltre durante i sei giorni i mitili sottoposti alle tre temperature hanno mostrato un comportamento costante.

Studi effettuati da Schulte (1975) dimostrano che l'influenza della temperatura sull'attività di filtrazione è più alta tra 5-15°C e 25 -30°C. A un incremento della temperatura da 15 a 25°C corrisponde solo un lieve incremento nel tasso di filtrazione, mentre a 5 e 30 gradi la filtrazione si è spostata su valori molto bassi (Schulte, 1975).

Dai nostri risultati è emerso che *M. galloprovincialis* acclimatati a 25°C hanno lunghi periodi di chiusura delle valve. Ciò concorda con gli studi effettuati da Anestis et al. (2007) che spiega questi cambiamenti comportamentali come una riduzione dello stato di attività dell'enzima glicolitico piruvato chinasi (PK) indicando un basso tasso di glicolisi e, quindi, riduzioni periodiche di turnover di energia. Questi dati sono in linea anche con ricerche precedenti che indicano che la depressione metabolica accompagna la chiusura delle valve nei bivalvi (De Zwaan *et al.*, 1980) (Ortmann e Grieshaber, 2003).

L'analisi della mortalità dei mitili posti in acqua a 30°C ha evidenziato che gli esemplari morivano con un tempo medio di 115 ore (~5 giorni). Questo risultato è stato confermato anche da studi precedentemente svolti, infatti Anestis et al. (2007) hanno dimostrato che la mortalità delle cozze aumenta drasticamente durante il riscaldamento a 30°C, e il 45% di mitili muoiono entro i primi 5 giorni di esperimento. È stato dimostrato infatti che quando la temperatura supera i 25°C, la filtrazione diminuisce significativamente (Anestis *et al.*, 2007). Questa situazione è frequente durante l'estate, soprattutto tra la fine di luglio e la metà di agosto, quando le temperature superficiali dell'acqua di mare, oscillano tra i 26°C e 28°C (Damianidis e Chintiroglou, 2000). Tuttavia, la notte la temperatura può scendere di 0,5-1,5°C. Secondo studi pubblicati, il 30-55% di cozze muore quando la temperatura del giorno delle acque superficiali del mare sale fino a 28°C, indicando che le cozze vivono al limite superiore della loro

capacità di acclimatazione. Simile a *M. galloprovincialis*, *M. edulis* mostra una temperatura letale superiore tra i 26°C e 28°C (Read e Cumming, 1967).

CONCLUSIONI

Da questo lavoro di tesi è emerso che il comportamento di apertura delle valve del *M. galloprovincialis* è influenzato sia dalla presenza di alimento che dalla temperatura. Infatti, è stato possibile evidenziare che l'alga *N. oculata* condiziona in maniera significativa l'apertura delle valve, soprattutto per quanto riguarda le concentrazioni elevate, mentre il comportamento rimane invariato quando le concentrazioni di alimento diminuiscono. Per quanto riguarda *I. galbana* invece sembra non incidere in maniera evidente sul comportamento di apertura dei mitili, quest'alga infatti anche ad elevate concentrazioni non provoca un incremento nell'attività nel *M. galloprovincialis*.

Dall'analisi del comportamento dei mitili in risposta alla temperatura, è emerso che a temperatura ambiente (25°C) il tempo di chiusura delle valve aumenta dovuto ad una probabile riduzione del metabolismo. Le alte temperature (30°C) hanno causato un aumento della mortalità, con una sopravvivenza in media di ~5 giorni.

Questa tipologia di studio, relativa all'ecologia dei molluschi bivalvi, può dare un contributo importante alla gestione di questa specie per quanto riguarda il suo utilizzo in acquacultura, permettendo ad esempio la comprensione dei fattori limitanti per la crescita. La sostenibilità della mitilicoltura dipende principalmente dalle capacità di carico dell'ecosistema e la scelta del sito è chiaramente molto importante, soprattutto in relazione all'inquinamento ambientale, la temperatura e la produzione primaria. A tal proposito i sensori Hall potrebbero essere un ottimo strumento per l'individuazione di siti idonei per gli allevamenti di mitilicoltura, in quanto il loro posizionamento su un campione di mitili potrebbe garantire la sopravvivenza dell'intero stock di molluschi.

L'utilizzo dei sensori Hall in laboratorio ci ha permesso di individuare numerosi vantaggi quali ad esempio un'elevata facilità nel montaggio, stabilità e un carico minimo sulle valve del mollusco. Sono emersi però anche una serie di svantaggi che riguardano in maniera particolare l'utilizzo di questo sistema sul *M. galloprovincialis* che con il bisso tendeva a staccare il sensore, per cui necessitava di controlli giornalieri. Occorrerebbe inoltre trovare delle resine più resistenti all'acqua che anche dopo alcuni giorni mantengano caratteristiche iniziali.

Il protocollo descritto nella presente tesi potrebbe essere applicato anche ad altri bivalvi di mare o d'acqua dolce, e le caratteristiche precedentemente evidenziate rendono questo strumento adatto anche ad un utilizzo in natura.

La metodologia impiegata permette una valutazione adeguata del comportamento dei mitili, con un approccio non invasivo che potrebbe quindi contribuire a migliorare l'allevamento di questa specie. Per quanto riguarda invece l'utilizzo di questo mitile come bioindicatore delle condizioni ambientali, questa tecnica potrebbe migliorarne l'efficacia soprattutto in siti particolarmente a rischio che richiedono un maggior controllo.

BIBLIOGRAFIA

Ameyaw-Akumfi C., Naylor E., (1987) - Temporal patterns of shellgape in *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 95: 237–242.

Anestis A., Lazou A., Pörtner H. O., Michaelidis B., (2007) - Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature.

Baccetti B., Bedini C., Capanna E., Cobolli M., Ghirardelli E., Giusti F., Minelli A., Ricci N., Ruffo S., Sarà M., Zullini A., (1994) - Lineamenti di zoologia sistematica. Zanichelli. Bologna 200-212.

Baldwin I.G., Kramer K.J.M., (1994) - Biological early warning systems (BEWS). In: Kramer, K.J.M. (Ed.), Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. CRC, Florida, pp. 1–23.

Bandiera P., (2006) - Organismi acquatici e ambiente: meccanismi biochimici di interazione, risposta e adattamento. Univ. di Bologna.

Bargagli R., Sanchez-Hernandez J.C., Martella L., Monaci F., (1998) - Mercury, cadmium and lead accumulation in Antarctic mosses growing along nutrient and moisture gradients. Polar Biology. 19: 316-22.

Bayne B.L., (1976) - Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press: New York.

- Beadman H.A., Kaiser M. J., Galanidi M., Shucksmith R., Willows R.I., (2004)** - Changes in species richness with stocking density of marine bivalves. *J. Appl. Ecol.* 41: 464–475.
- Branch G.M. and Steffani C.N., (2004)** - Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *J. of Experimental Marine Biology and Ecology.* 300: 189-215.
- Brownes S.J., McQuaid C.D., (2006)** - Will the invasive mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck replace the indigenous *Perna perna* L. on the south coast of South Africa? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 338:140-151.
- Carlino P.A.,(2008)** – Ottimizzazione di colture fitoplanctoniche intensive per applicazioni produttive ecosostenibili ed ecocompatibili.
- Carlton J.T., (1992)** - Introduced Marine and Estuarine Mollusks of North America: An End-of-the-20th-century Perspective, *J. of Shellfish Res.* 11(2): 489-505.
- Cesari P. and Pellizzato M., (1990)** - *Tapes philippinarum* biologia e sperimentazione. ESAV 23-39.
- Dame R., Dankers N., Prins T., Jongsma H., Smaal A., (1991)** - The influence of mussel beds on nutrients in the Western Wadden Sea and Eastern Scheldt estuaries. *Estuaries* 14: 130-138.
- Damianidis P., Chintiroglou C.C., (2000)** - *Structure and functions of polychaetofauna living in Mytilus galloprovincialis assemblages in Thermaikos Gulf (north Aegean sea).* *Oceanologica Acta* 23: 323–337.

- De Zwaan A., Thompson R.J., Livingstone D.R., (1980)** - *Physiological and biochemical aspects of valve snap and valve closure in the giant scallop *Plactopecten magellanicus*. 2 Biochemistry. J. Comp. Physiol. 137: 105–115.*
- Dharmaraj S., (1983)** - Oxygen consumption in pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould) and *Pinctada sugillata* (Reeve). *Proc. Symp. Coast. Aquac. 2: 627–632.*
- Fantuzzi N., (2004)** - Importanza della diagnosi istopatologica nei molluschi bivalvi marini. Univ. di Bologna.
- Farrington J.W., Goldberg E.D., Risegrough R.W., Martin J.H., Bowen V.T., (1983)** - An overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon, and artificial radionuclide data. *Environ. Sci. and Technology. 17: 490-496.*
- Focardi S. and Leonzio C., (2000)** - I biomarcatori nel monitoraggio costiero. *Biol. Mar. Medit. 8 (2): 136-145.*
- Fry F. E. J., (1947)** – Effects of the environment on animal activity. Univ. of Toronto Studies, Biological Series, No. 55. Publications of the Ontario Fish. Res. Lab., The Univ. of Toronto Press.
- Fujii T., Toda S., (1991)** - Open and close shell-movement of the mussel, *Mytilus edulis* L. under natural conditions. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 20: 33–40.*
- Gainey L.F., Shumway S.E., (1988)** - A compendium of the responses of bivalve mollusks to toxic dinoflagellates. *J. Shellfish Res. 7: 623–628.*

- Gaion A., (2006)** - Valutazione degli effetti biologici della movimentazione di sabbie marine mediante l'utilizzo di biomarker cellulari in *Mytilus galloprovincialis*. Univ. di Pisa.
- Geller J.B., (1999)** - Decline of a native mussel masked by sibling species invasion. *Cons. Biol.* 13 (3): 661-664.
- Gosling E. (ed), (2003)** - Bivalve molluscs: biology, ecology, and culture. Blackwell Publishing, Oxford.
- Helm M.M., (1990)** - Culture of microalgae. In: *Tapes philippinarum*. Biol. E sperimentazione. E.S.A.V. 91-105.
- Henderson J. T., (1929)** – Lethal temperature of Lamellibranchiata. *Contributions to Canadian Biol. and Fish.* 4: 397-412.
- Jørgensen C.B., (1975)** - On gill function in the mussel *Mytilus edulis*. *L. Ophelia* 13:187–232.
- Jørgensen C.B., (1990)** - Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology. Olsen & Olsen, Fredensborg.
- Langton R.W., (1977)** - Digestive rhythms in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 41: 53–58.
- Maire O, Amouroux J.M., Duchêne J.C., Grémare A., (2007)** - Relationship between filtration activity and food availability in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Biol* 152: 1293–1307.

- Mengoli A., (1998)** - Aspetti morfo-funzionali dei mitili. Asl Ferrara.
- Nagai K., Honjo T., Go J., Yamashita H., Seok Jin Oh S., (2006)** - Detecting the shellfish killer *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) by measuring bivalve valve activity with a Hall element sensor. *Aquaculture* 255: 395–401.
- Nasci C., Nesto N., Monteduro R.A., Da Ros L. (2002)** - Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring in the Lagoon of Venice (NE Italy). *Mar. Environ. Res.* 54: 811 – 816.
- Navarro E., Iglesias J. I.P., Perez Camaccho A., Labarta, U., and Beiras, R., (1991)** - The physiological energetics of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) from different cultivation rafts in the Ria de Arosa (Galicia, N.W. Spain). *Aquaculture*. 94: 197-212.
- Newell R. C. and Pye V. I. (1970a)** – Seasonal changes in the effect of temperature on the oxygen consumption of the winkle *Littorina littorea* L. and mussel *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 34: 367-83.
- O'Connor T.P., (2002)** - National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Mar. Environ. Res.* 53: 117–143.
- O'Connor, T.P., (1996)** - Trends in chemical concentrations in mussels and oysters collected along the U.S. coast from 1986 to 1993. *Mar. Environ. Res.* 41: 183–200.

- OKUMUP U., BAPINAR N., ZKAN M. (2002)** - The Effects of Phytoplankton Concentration, Size of Mussel and Water Temperature on Feed Consumption and Filtration Rate of the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). KTU Faculty of Mar. Sci., Department of Fish. 26: 167-172.
- Ortiz-Zarragoitia M. and Cajaraville M.P., (2006)** - Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disruptors Arch. Environ. Contam. Toxicol. 50: 361–369.
- Ortmann C., Grieshaber M.K., (2003)** - *Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam Corbicula fluminea.* J. Exp. Biol. 206: 4167–4178.
- Perez-Tris J., Diaz J.A., Telleria J.L. (2004)** - Loss of body mass under predation risk: cost of antipredatory behaviour or adaptive Wt-for-escape? Anim. Behav. 67:511–521.
- Phillips D.J.H., (1977)** - The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments – a review. Environ. Poll. 13: 281–317.
- Rajagopal S., Velde G.V.D., Jenner H.A., (1997)** - Shell valve movement response of dark false mussel, *Mytilopsis leucophaeta*, to chlorination. Water Res. 31: 3187–3190.
- Rao K.P., (1954)** - Tidal rhythmicity of rate of water propulsion in *Mytilus californianus* and its modifiability by transplantation. Biol. Bull. 43: 283–293.

- Read K.R.H., Cumming K.B., (1967)** - *Thermal tolerance of the bivalve molluscs Modiolus modiolus (L), Mytilus edulis L. and Brachidontes demissus. Dillwyn. Comp. Biochem. Physiol. 22: 149–155.*
- Riisgård H.U., Kittner C., Seerup D.F., (2003)** - Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule, Mytilus edulis, Mya arenaria*) in response to low algal concentration. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 284:105–127.
- Riisgård H.U., Randløv A., (1981)** - Energy budgets, growth and filtration in *Mytilus edulis* at different algal concentrations. *Mar Biol* 67:227–234.
- Robinson T.B. and Griffiths C.L. (2002)** - Invasion of Langebaan Lagoon, South Africa, by *Mytilus galloprovincialis*: Effects on natural communities, *African Zoology* 37(2): 151-158.
- Robson A. A., (2008)** – Gaping at Environmental Variability: How do Bivalves React to Changing Circumstance? Swansea University, UK:248 pp.
- Robson A., Wilson R., Garcia de Leaniz C., (2007)** - Mussels flexing their muscles: a new method for quantifying bivalve behavior. *Mar. Biol.* 151:1195-1204.
- Ropert-Coudert Y., Wilson R., (2004)** - Subjectivity in bio-logging science: Do logged data mislead? *Mem. Natl. Inst. Polar Res.* 58(Spec Issue):23–33.
- Schlieper C. and Kowalski R., (1958)** – Ein zellularer Regulations mechanismus für erhöhte Kiemenventilation nach Anoxybiose bei *Mytilus edulis L.* *Kieler Meeresforschungen.* 14: 42-7.

- Schulte H. E., (1975)** - Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 30: 331–341.
- Seed R., (1976)** - Ecology of marine mussels. In Bayne, B. L. (ed.), Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge: 13–65.
- Theede H., (1963)** - Experimentelle Untersuchungen fiber die Filtrierleistung der Miesmuschel, *Mytilus edulis* L. Kieler. Meeresforsch. 19: 20-41.
- Thompson R. J. and Bayne B. L., (1972)** - Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis* L. J. exp. Mar. Biol. Ecol. 9: 111-124.
- Ushakov B. P. (1965)** – Cellular resistance adaptation to temperature and thermostability of somatic cells with special reference to marine animals. Mar. Biol. 1: 153-60.
- Walne P.R. (1974)** - Culture of Bivalve Molluscs. 50 Years's Experience at Conway. Fish. News (Books), West Byfleet. 173.
- Wells H. W. and Gray I. E., (1960)** – The seasonal occurrence of *Mytilus edulis* on the Carolina coast as a result of transport around Cape Hatteras. Biol. Bulletin. Mar. Biol. Lab. Woods Hole, Mass. 119: 550-9.
- Widdows J. and Bayne B. L., (1971)** – Temperature acclimation of *Mytilus edulis* with reference to its energy budget. J. of the Mar. Biological Association of the UK. 51: 827-43.
- Widdows J., (1973 b)** – The effect of temperature on the metabolism and activity of *Mytilus edulis* L., Netherlands J. of Sea Res. 7: 387-98.

- Widdows J., (1973a)** – Effect of temperature and food on the heart beat, ventilation rate and oxygen uptake of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 20: 269-76.
- Widdows, J., (1991)** - Physiological ecology of mussel larvae. *Aquaculture*. 94: 147-163.
- Wilson R., Liebsch N., (2003)** - Up-beat motion in swinging limbs: new insights into assessing movement in free-living aquatic vertebrates. *Mar. Biol.* 142:537–547.
- Wilson R., Reuter P., Wahl M., (2005)** - Muscling in on mussels: new insights into bivalve behavior using vertebrate remote-sensing technology. *Mar. Biol.* 147: 1165-1172.
- Wilson R., Reuter P., Wahl M., (2005)** - Muscling in on mussels: new insights into bivalve behaviour using vertebrate remote-sensing technology. *Mar. Biol.* 147:1165–1172.
- Wilson R., Scolaro A., Quintana F., Siebert U., Thor Straten M., Mills K., Zimmer I., Liebsch N., Steinfurth A., Spindler G., Muler G., (2004)** - To the bottom of the heart: cloacal movement as an index of cardiac frequency, respiration and digestive evacuation in penguins. *Mar. Biol.* 144:813–827.
- Wilson R., Simeone A., Luna-Jorquera G., Steinfurth A., Jackson S., Fahlman A., (2003)** - Patterns of respiration in diving penguins: is the last gasp based on an inspired tactic? *J. Exp. Biol.* 206:1751–1763.
- Wilson R., Steinfurth A., Ropert-Coudert Y., Kato A., Kurita M., (2002)** - Lip-reading in remote subjects: an attempt to quantify and separate ingestion,

breathing and vocalisation in free-living animals using penguins as a model.

Mar. Biol. 140:17–27.

Riferimenti web

www.enea.it/molluschicoltura

http://www.ispesl.it/profili_di_rischio/Acquacoltura/Acquacoltura_index.asp

www.ISMEA.IT