

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede amministrativa dell'Università di Trieste

XXI CICLO DEL

Dottorato di Ricerca in
Metodologie di Biomonitoraggio della Alterazione Ambientale

**EFFETTI DEGLI STRESS AMBIENTALI
SU TRE SPECIE
DI CROSTACEI DECAPODI COSTIERI**

(Settore scientifico disciplinare BIO 05)

DOTTORANDA
Marzia Martinis

**COORDINATORE DEL COLLEGIO
DEI DOCENTI**
Chiar.mo Prof. Mauro Tretiach
Università degli Studi di Trieste

RELATORE
Chiar.mo Prof. Enrico A. Ferrero
Università degli Studi di Trieste

CORRELATORE
Dott.ssa Simonetta Lorenzon
Istituto Nazionale di Oceanografia e di
Geofisica Sperimentale

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

Il gambero e' un frutto del mare, te lo puoi fare sia arrosto, bollito, grigliato al forno, saltato, c'e lo spiedino di gamberi, gamberi con cipolle, zuppa di gamberi, gamberi fritti in padella, con la pastella, a bagnomaria, gamberi con le patate, gamberi al limone, gamberi strapazzati, gamberi al pepe, minestra di gamberi, stufato di gamberi, gamberi all'insalata, gamberi e patatine, polpette di gamberi, tramezzini coi gamberi, e questo e' tutto, mi pare (Forrest Gump).

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
1.1 <i>Importanza ecologica delle zone costiere</i>	1
1.2 <i>I Crostacei nelle reti trofiche</i>	1
1.3 <i>Effetti della salinità sui Crostacei</i>	3
1.3.1 Risposte fisiologiche: ruoli metabolici	5
1.3.2 Risposte fisiologiche: regolazione ionica	7
1.3.2.1 Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi	9
1.3.2.2 Anidrasi carbonica (CA)	10
1.3.2.3 Altri scambi ionici	10
1.4 <i>Effetti della temperatura sui Crostacei</i>	11
1.4.1 Risposte fisiologiche	12
1.4.2 Risposte fisiologiche: effetti sulla respirazione	13
1.4.3 Altre variazioni metaboliche	14
1.5 <i>Risposte metaboliche in seguito ad ipossia</i>	16
1.6 <i>Importanza delle proteine nell'emolinfa</i>	19
1.7 <i>Scopi della tesi</i>	22
2 MATERIALI E METODI	24
2.1 <i>Descrizione delle specie</i>	24
2.1.1 <i>Carcinus aestuarii</i>	24
2.1.2 <i>Palaemon elegans</i>	25
2.1.3 <i>Upogebia pusilla</i>	25
2.2 <i>C. aestuarii, P. elegans: disegno sperimentale</i>	26
2.2.1 Trasporto, stabulazione e mantenimento durante gli esperimenti	26
2.2.2 Prelievo di emolinfa	28
2.2.3 Step: esposizione diretta a salinità o temperature modificate ed esposizione all'aria	28
2.2.4 Adattamenti	29
2.2.4.1 <i>C. aestuarii</i>	29
2.2.4.2 <i>P. elegans</i>	30
2.3 <i>U. pusilla: prove di mantenimento e manipolazione, prove sperimentali</i>	31
2.4 <i>Determinazione dei parametri fisiologici nell'emolinfa</i>	32
2.4.1 Glicemia	32
2.4.2 Acido lattico	32
2.4.3 Densità	33
2.4.4 Proteine totali	33

2.4.5 pH	33
2.4.6 Ammoniemia	33
2.4.7 Elettroliti	33
2.5 Valutazione qualitativa delle proteine emolinfatiche	34
2.6 Analisi statistiche ed elaborazioni grafiche	34
3 RISULTATI	35
3.1 <i>Carcinus aestuarii</i>	35
3.1.1 Mortalità	35
3.1.2 Esposizione diretta: salinità	35
3.1.2.1 Glicemia	35
3.1.2.2 Acido lattico	36
3.1.2.3 Densità	37
3.1.2.4 Proteine	37
3.1.2.5 pH	38
3.1.2.6 Ammoniaca	39
3.1.2.7 Cloruri	40
3.1.2.8 Calcio	41
3.1.3 Esposizione graduale e adattamento: salinità	42
3.1.3.1 Glicemia	42
3.1.3.2 Acido lattico	43
3.1.3.3 Densità	44
3.1.3.4 Proteine	45
3.1.3.5 pH	46
3.1.3.6 Ammoniaca	47
3.1.3.7 Cloruri	47
3.1.3.8 Calcio	48
3.1.4 Esposizione diretta: temperatura	50
3.1.4.1 Glicemia	50
3.1.4.2 Acido lattico	51
3.1.4.3 Densità	51
3.1.4.4 Proteine	52
3.1.4.5 pH	53
3.1.4.6 Ammoniaca	54
3.1.5 Esposizione graduale e adattamento: temperatura	54
3.1.5.1 Glicemia	55
3.1.5.2 Acido lattico	56
3.1.5.3 Densità	56
3.1.5.4 Proteine	57
3.1.5.5 pH	58

3.1.6 Esposizione diretta: ambiente subaereo	59
3.1.6.1 Glicemia	60
3.1.6.2 Acido lattico	60
3.1.6.3 Densità	61
3.1.6.4 Proteine	62
3.1.6.5 pH	62
3.1.6.6 Cloruri	63
3.1.6.7 Calcio	63
3.2 <i>Palaemon elegans</i>	64
3.2.1 Mortalità	64
3.2.2 Esposizione diretta: salinità	65
3.2.2.1 Glicemia	65
3.2.2.2 Acido lattico	66
3.2.2.3 Densità	66
3.2.2.4 Proteine	67
3.2.2.5 pH	67
3.2.2.6 Cloruri	68
3.2.2.7 Calcio	68
3.2.3 Esposizione graduale e adattamento: salinità	69
3.2.3.1 Glicemia	69
3.2.3.2 Acido lattico	69
3.2.3.3 Densità	70
3.2.3.4 Proteine	70
3.2.3.5 pH	71
3.2.3.6 Cloruri	72
3.2.3.7 Calcio	72
3.2.4. Esposizione diretta: temperatura	73
3.2.4.1 Glicemia	73
3.2.4.2 Acido lattico	74
3.2.4.3 Densità	74
3.2.4.4 Proteine	75
3.2.4.5 pH	75
3.2.5 Esposizione graduale e adattamento: temperatura	76
3.2.5.1 Glicemia	76
3.2.5.2 Acido lattico	76
3.2.5.3 Densità	77
3.2.5.4 Proteine	77
3.2.5.5 pH	78
3.3 <i>Upogebia pusilla</i>	78
3.3.1 Prove di mantenimento e manipolazione	78

3.4 <i>Correlazione densità e proteine</i>	79
3.5 <i>Gel</i>	80
3.6 <i>Altre osservazioni in fase sperimentale</i>	80
4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	81
4.1 <i>Carcinus aestuarii e Palaemon elegans: valutazione della mortalità</i>	81
4.2 <i>C. aestuarii e P. elegans: risposte fisiologiche in seguito a modificazioni dei parametri ambientali</i>	83
4.2.1 <i>Modificazioni della salinità e stress osmotico</i>	84
4.2.2 <i>Modificazioni della temperatura e stress termico</i>	91
4.2.3 <i>Emersione</i>	95
4.3 <i>Casi individuali</i>	98
4.4 <i>Altre osservazioni effettuate in fase sperimentale</i>	99
4.5 <i>Upogebia pusilla</i>	101
4.6 <i>Correlazioni densità – proteine totali e corse elettroforetiche</i>	101
4.7 <i>Domande aperte</i>	103
5 BIBLIOGRAFIA	104
6. APPENDICE	130

1 INTRODUZIONE

1.1 Importanza ecologica delle zone costiere

Le coste rappresentano il confine tra le terre emerse ed il mare; esse sono estremamente diversificate, caratterizzate da diversi habitat popolati da specifici gruppi animali e vegetali. La tutela di questi ambienti è una delle priorità sia del competente Ministero italiano, che dell'Unione Europea; gli enti preposti si occupano sia di provvedere a dei continui monitoraggi al fine di ridurre inquinamento e degrado costiero, che al mantenimento della biodiversità nelle zone di transizione.

Il Friuli Venezia Giulia è una delle Regioni italiane che si affacciano sul mare; la costa, si presenta diversificata: a est sul Golfo di Trieste è alta e rocciosa e le spiagge sono ridotte; nella zona centro – occidentale, tra le foci di Isonzo e Tagliamento, si estende il complesso lagunare di Grado e Marano. Quest'ultimo sistema, suddiviso in due differenti unità, la Laguna di Grado e la Laguna di Marano caratterizzate da parametri ecologici differenti, è il più sensibile alle alterazioni ambientali naturali ed indotte dall'uomo. La perdita della naturalità delle zone umide costiere è un pericolo da non sottovalutare data la loro importanza ecologica: oltre alla peculiarità paesaggistica, è qui infatti che trovano riparo numerose specie ittiche e di uccelli migratori che in questi ambienti svernano e si riproducono.

1.2 I Crostacei nelle reti trofiche

In ambiente lagunare tra le specie che costituiscono le varie comunità ecologiche si instaurano stretti rapporti alimentari. In questo contesto, i Crostacei sono organismi fondamentali nel trasferimento di materia ed energia all'interno delle reti trofiche. Spesso rivestono il ruolo di keystone e quindi il loro indebolimento o scomparsa si ripercuote su tutto l'ecosistema.

Esistono diversi studi che dimostrano da un lato quali siano le preferenze alimentari dei Crostacei, dall'altro le interazioni comportamentali tra i Crostacei e i loro predatori (Backwell *et al.*, 1998; Viscido e Wetthey, 2002).

Sebbene tra i Decapodi, l'Ordine più ricco tra i Crostacei, esistano alcune specie detritivore che scavano fosse in substrati mobili, la strategia alimentare prevalente è la predazione.

Nella predazione i Crostacei dimostrano delle preferenze alimentari, risultando a volte utili nel mantenimento degli equilibri all'interno degli ecosistemi. Mistri (2004) ha infatti dimostrato che, nelle valli della foce del Po in cui vivono due specie di bivalvi alloctoni, *Ruditapes philippinarum* introdotta dall'uomo a scopi commerciali e *Musculista senhousia* introdotta accidentalmente, il granchio autoctono *Carcinus aestuarii* preferisce predare la seconda specie controllandone quindi la crescita.

I pesci sono sia prede (Fairchild e Howell, 2000) che predatori (De Pirro *et al.* 1999) di Crostacei, mentre gli uccelli acquatici che popolano le coste, ed in particolare le lagune, sono fondamentali come indicatori, oltre che degli stock di pesci, anche delle popolazioni di invertebrati come ad esempio Policheti e Crostacei. (Barret *et al.*, 2007).

Diversi gruppi di ricerca hanno sviluppato numerose tecniche per lo studio delle relazioni che intercorrono tra gli uccelli acquatici e le loro prede (Barret *et al.*, 2007). Applicando una di queste tecniche Moreira (1997) è riuscito a valutare l'impatto che ha la predazione degli uccelli costieri sulle comunità bentoniche, valutando da un lato la quantità di energia necessaria agli uccelli, dall'altro la biomassa prodotta dalle loro prede. Le prede maggiormente consumate da tutti gli uccelli presenti nell'area di studio (la foce del Tago in Portogallo) sono risultate essere *Carcinus maenas*, i bivalvi appartenenti al genere *Scorbicularia* e alcune specie di alghe. In particolare i granchi vengono maggiormente predati dalla specie di gabbiano *Larus fuscus*.

I Crostacei, pur essendo delle prede apprezzate dagli uccelli acquatici, possono essere considerati anche dei bioturbatori (Botto e Iribarne, 2000). Alcune specie di Decapodi fossori, tra cui i gamberetti *Callinassa spp.*, *Upogebia spp.* e il granchio *Chasmagnathus granulatus*, scavando le loro tane alterano il substrato rendendolo meno usufruibile da alcune specie di uccelli limicoli. È infatti stato osservato che in aree in cui la densità di questi Crostacei è elevata, l'avifauna è scarsa (Iribarne *at al.* 2005). Inoltre è stato dimostrato che in queste stesse zone sono alterati i rapporti preda – predatore tra limicoli e Policheti; questi ultimi, che solitamente scavano tane verticali, sono avvantaggiati dalla presenza di tane a due uscite, precedentemente scavate dai Crostacei, rendendoli meno sensibili alla predazione tattile (Palomo *et al.*, 2003).

L'importanza dei Crostacei è dimostrata dal fatto che l'alterazione di alcuni parametri ambientali, ripercuotendosi sulla loro fisiologia e sulla loro vitalità, incide sugli equilibri esistenti all'interno delle reti trofiche. Taylor e Eggleston (2000) hanno dimostrato che le condizioni di ipossia che si verificano molto spesso nelle zone umide, alterano le dinamiche preda – predatore tra il granchio *Callinectes sapidus* ed il bivalve *Mya arenaria*: in queste condizioni ambientali i molluschi diminuiscono la profondità delle loro tane divenendo più disponibili come prede per i granchi. Anche la temperatura può influire sulla capacità di predazione dei Crostacei; ad esempio la richiesta metabolica del granchio *Carcinus maenas* diminuisce sotto i 9° C, mentre sotto i 6° C questa specie smette di predare (Cohen *et al.*, 1995).

1.3 Effetti della salinità sui Crostacei

La salinità è un parametro fondamentale nell'equilibrio delle lagune e dei bacini che caratterizzano le coste del Friuli Venezia Giulia. Negli ambienti paralici in cui si osservano ampie oscillazioni stagionali della salinità, i Crostacei hanno evoluto apparati osmoregolatori efficaci per il mantenimento dell'omeostasi, che prevedono l'utilizzo di macromolecole, il trasferimento di acqua e ioni attraverso le superfici corporee, cambiamenti nel livello di attività e nella spesa energetica (Péqueux 1995; Rowe 2002).

Di seguito vengono riportati e descritti i vari siti di scambio ionico e i tessuti implicati nell'osmoregolazione che si sono evoluti nei Crostacei osmoregolatori.

- Cuticola: rappresenta la prima barriera di protezione verso l'ambiente esterno (Péqueux 1995); qui si innescano movimenti ionici e soprattutto di acqua, per il mantenimento dell'osmolalità dell'emolinfa al variare delle condizioni della salinità esterna. Diversi studi hanno infatti dimostrato che al variare della salinità, varia la permeabilità corporea (Campbell e Jones 1990; Rasmussen e Bjerregaard 1995; Rainbow e Black 2001).
- Intestino e organi escretori: la continua ingestione di acqua da parte dei Crostacei rende necessario il coinvolgimento nell'osmoregolazione del tratto gastro-intestinale. Nonostante non siano ancora noti i meccanismi di assorbimento ionico a livello dell'intestino, è chiaro che alcune sue cellule siano identiche agli ionociti tipici delle branchie, principali tessuti osmoregolatori (Péqueux 1995). Anche le ghiandole antennali, gli organi escretori dei Crostacei, sono fondamentali soprattutto nella regolazione del

volume corporeo e degli ioni bivalenti, tra cui il Mg^{2+} . Sembra che al variare della salinità ambientale, in numerosi Crostacei vari la quantità di urina prodotta, oppure vari la sua concentrazione (Péqueux 1995; Rasmussen e Bjerregaard 1995; Lin *et al.* 2000; Zanotto e Wheatly 2006).

- **Branchie:** sono queste i principali siti di ione- ed osmoregolazione, in particolare sembra che siano maggiormente implicate le branchie posteriori, ricoperte da spessi epiteli costituiti da ionociti, cellule specializzate per il trasporto ionico (Péqueux 1995; Dunel-Erb *et al.* 1997; Barradas *et al.* 1999a; Barradas *et al.* 1999b; Cieluch *et al.* 2005), le cui membrane presentano alcuni enzimi fondamentali. Un esempio è la pompa sodio-potassio che regola l'assorbimento del sodio dall'ambiente esterno (Barradas *et al.* 1999b). Numerosi studi hanno dimostrato come varia l'attività di questo enzima in seguito all'alterazione della salinità esterna (Lucu e Devescovi 1999; Lucu e Towle 2003; Hongyu *et al.* 2006; Tsai e Lin 2007). Altrettanto importante è la presenza dell'anidrasi carbonica, necessaria per la regolazione di Cl/HCO_3^- e Na^+/H^+ (Péqueux 1995; Skaggs e Henry 2002; Pavicic - Hamer *et al.* 2003; Serrano *et al.* 2007).

I tessuti osmoregolatori appena descritti, rispondono alle alterazioni della salinità con modificazioni morfologiche e fisiologiche. Queste risposte sono controllate a diversi livelli. E' noto ad esempio che la regolazione osmotica è sottoposta alla modulazione da parte di neuroormoni e bioamine (dopamina, norepinefrina, etc) prodotti e regolati dal sistema nervoso e dal peduncolo oculare (Zatta 1987; Eckhardt *et al.* 1995; Santos 1996; Spanings- Pierrot 2000). Serrano *et al.* (2003) hanno valutato la variazione della concentrazione di sodio nell'emolinfa del gambero d'acqua dolce *Astacus leptodactylus* in seguito all'ablazione bilaterale del peduncolo oculare: la concentrazione di questo elettrolita, dopo brusche diminuzioni, può essere ripristinata in seguito all'iniezione di estratto di peduncolo. Questo dimostra il coinvolgimento dei fattori neuroendocrini presenti nella ghiandola del seno nei processi di osmoregolazione. Nel granchio *Callinectes sapidus* è stato inoltre ipotizzato che l'induzione dell'anidrasi carbonica, presente sulle membrane delle branchie posteriori, avvenga sotto controllo neuroendocrino tramite il complesso ghiandola del seno/organo-X (SG-XO) del peduncolo oculare e che l'espressione genica, alla base dell'induzione, sia controllata da un ormone appartenente alla famiglia del cHH (crustacean Hyperglycemic Hormone) sempre prodotto dal sistema SG-XO. (Henry

2005; Henry e Borst 2006). Anche l'attività di alcune bioamine, come ad esempio la dopamina, sembra essere coinvolta nel mantenimento delle funzioni di ione- ed osmoregolazione delle branchie posteriori: nei granchi *Eriocheir sinensis* e *Chasmagnathus granulatus* questo neurotrasmettitore agisce indirettamente su enzimi come l' Na^+/K^+ -ATPasi attraverso la stimolazione di secondi messaggeri intracellulari (cAMP) (Ling Mo *et al.* 2003; Genovese *et al.* 2006).

1.3.1 Risposte fisiologiche: ruoli metabolici

L'importanza della salinità nell'ambiente di vita dei Crostacei è dimostrata dal fatto che le sue alterazioni vengono percepite, già in fase embrionale (Susanto e Charmantier 2001; Taylor e Seneviratna 2005), grazie alla presenza di osmorecettori posizionati prevalentemente in corrispondenza delle aperture delle camere branchiali, oppure sulle zampe, sulle antenne e sulle antennule (Dufort *et al.* 2001).

Le variazioni di salinità attivano nei Crostacei osmoregolatori i meccanismi per il mantenimento dell'omeostasi, e quindi l'adattamento alle nuove condizioni. Questi meccanismi implicano un continuo sostegno energetico, garantito dalla mobilitazione di zuccheri dai siti di riserva.

Che il metabolismo dei carboidrati fosse implicato nei processi di osmoregolazione è noto già da molti anni; Lacerda e Sawaya (1986) hanno dimostrato che nel granchio *Callinectes danae*, in seguito all'alterazione della salinità, la concentrazione di glucosio presente nell'emolinfa varia, diminuendo alle condizioni osmotiche estreme. Durante la sua esposizione a diverse salinità Spaargaren e Haefner (1987) hanno ottenuto che in *Crangon crangon* il picco glicemico massimo è stato raggiunto alla salinità di 12 PSU, mentre a salinità inferiori la concentrazione di glucosio rimane più bassa. Il rapido consumo di zuccheri, è stato dimostrato anche in *Neomysis integer*, un Misidaceo eurialino che è isotonico con l'ambiente esterno a 18 PSU: partendo da 3 PSU, l'acclimatazione alle salinità 5 PSU e 25 PSU determina la mobilitazione delle riserve energetiche (Verslycke e Janssen 2002). Analoghi risultati sono stati ottenuti in *Neosarmatium spp.* esposti a 16, 48 e 65 PSU partendo da 32 PSU (Gillikin *et al.* 2004), mentre nei gamberetti *Palaemonetes pugio* e *P. vulgaris* esposti a salinità comprese tra 0,5 – 35 PSU è stato osservato che il consumo di energia è massimo a 0,5 PSU ed è minimo alla salinità 10 PSU (Rowe 2002).

La gluconeogenesi, processo metabolico che permette la formazione di glucosio, avviene nell'epatopancreas nei momenti di carenza energetica, a partire da precursori non saccaridici. Tra questi si hanno prevalentemente gli amminoacidi epatopancreatici da cui viene eliminato il gruppo amminico, e il lattato prodotto durante il metabolismo anaerobio, che vengono convertiti in piruvato. Quest'ultimo viene riconvertito in glucosio seguendo a ritroso le tappe della glicolisi. Una via alternativa per il rifornimento di glucosio è rappresentato dalla glicogenolisi.

La neosintesi dello zucchero è fondamentale sia perché questo metabolita, che può essere utilizzato come biomarker dell'alterazione ambientale (Lignot 1999; Lorenzon *et al.* 2004, 2005, 2007), fornisce rapidamente energia in forma di ATP, attraverso le vie metaboliche della glicolisi e della fosforilazione ossidativa, sia perché il glucosio introdotto con l'alimentazione spesso non è sufficiente per il sostenimento del metabolismo. Soprattutto durante gli stress osmotici, quando questo metabolita viene utilizzato per il mantenimento dell'omeostasi, una fonte energetica alternativa è rappresentata dagli amminoacidi non utilizzati per la sintesi delle proteine e dalle proteine stesse.

L'importanza delle proteine è stata dimostrata anche in studi condotti sulle larve di specie di Crostacei Decapodi; sembra infatti che durante l'esposizione a diverse salinità degli stadi giovanili, la loro crescita avvenga solo se viene fornita una quantità di amminoacidi sufficiente sia per la regolazione osmotica che per l'accrescimento (Anger *et al.* 1998; Rosas *et al.* 1999; Lemos *et al.* 2001; Rosas *et al.* 2001; Rosas *et al.* 2002; Torres *et al.* 2002; Fockedey *et al.* 2005).

Sembra inoltre che durante gli stress osmotici la presenza degli amminoacidi liberi (FAA) sia fondamentale per il mantenimento dell'osmolalità dei fluidi intracellulari (Tan e Choong 1981). Il fatto che gli amminoacidi liberi abbiano un duplice ruolo durante l'acclimatazione a salinità alterate è stato messo in evidenza da Oliveira e da Silva (2000): nel granchio *Chasmagnathus granulata* mantenuto a condizioni iposmotiche e nutrito con una dieta ricca di proteine, da un lato viene mantenuta l'osmolalità dei fluidi corporei, dall'altro aumenta la concentrazione di glicogeno nell'epatopancreas.

In *C. maenas* e *Marsupenaeus japonicus* l'esposizione a basse salinità causa un decremento della concentrazione di FAA e in *Penaeus keraturus* si è dimostrato in particolare un decremento di glicina, alanina e prolina (Lee e Chen 2003).

Il catabolismo degli amminoacidi e proteine determina la formazione di composti azotati, rappresentati per il 60 – 70 % da ammoniaca, eliminata attraverso le branchie, e per la rimanente percentuale da urea ed acido urico, eliminati attraverso le ghiandole antennali (Lee e Chen 2003; Weihrauch *et al.* 2004). La funzione escretoria è fondamentale durante i processi di osmoregolazione, contribuendo sia a mantenere il volume corporeo e a prevenire la disidratazione nel caso di esposizione ad ambienti ipersalini, che a mantenere l'equilibrio ionico nei fluidi corporei. È stato dimostrato che l'esposizione dei Crostacei a salinità modificate determina variazioni nella secrezione sia di urina che di ammoniaca. Lin *et al.* 2000 hanno dimostrato che l'esposizione del gamberetto *Penaeus monodon* a diverse salinità causa una diminuzione nella quantità di urina prodotta all'aumentare della salinità.

Analizzando le percentuali dei composti azotati che si formano durante l'esposizione a differenti salinità del gamberetto *Marsupenaeus japonicus*, Lee e Chen (2003) hanno trovato che a 18 PSU vengono prodotti il 90,9 % di ammoniaca, il 3,1 % di urea e il 4,2 % di altri composti organici, mentre a 42 PSU le percentuali variano rispettivamente a 38,5 %, 10,9 % e 50,4 %. La diminuzione della percentuale di ammoniaca e l'aumento dell'urea eliminate durante stress iperosmotici, indicano sia la minor capacità di scambio ionico attraverso le branchie, come di seguito riportato, che la necessità di produrre composti meno tossici attraverso un incremento dei processi di ureogenesi.

1.3.2 Risposte fisiologiche: regolazione ionica

L'emolinfa è un tessuto in cui sono presenti numerose specie ioniche (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^-) (Robertson 1961; Burton 1995; Onken 1999; Zanotto 2002) che tendono a muoversi attraverso le superfici corporee per il mantenimento della tonicità corporea.

Nei Crostacei osmoconformi, per lo più stenoalini, i movimenti ionici attraverso gli epiteli e le membrane sono passivi, e tendono a mantenere i fluidi corporei isotonici con l'ambiente esterno. In genere esiste per ogni specie un intervallo di salinità fisiologico, entro il quale la specie mantiene la conformità; oltre i limiti di questo intervallo si innescano dei movimenti attivi in corrispondenza dei tessuti osmoregolatori. In questo caso i Crostacei, che sono eurialini, vengono definiti osmoregolatori ed in particolare ipo- iper- osmoregolatori se mantengono sempre la tonicità dell'emolinfa indipendentemente dai cambiamenti dell'ambiente esterno, e

iper-osmoregolatori quando mantengono l'emolinfa iperosmotica in ambienti in cui è diminuita la salinità, ma sono isotonici in ambienti in cui la salinità è aumentata (Péqueux 1995).

Le lagune e gli estuari sono ecosistemi in cui tipicamente si adattano Crostacei osmo-iono-regolatori, che oltre a dover affrontare variazioni stagionali di salinità, trascorrono varie fasi del loro ciclo di vita in ambienti molto diversi come il mare aperto e ambienti costieri paralici.

Come precedentemente descritto i movimenti ionici avvengono in corrispondenza dei tessuti osmoregolatori, in particolare le branchie, costituite da ionociti sulle cui membrane sono presenti i canali e le pompe ioniche. I meccanismi della ionoregolazione, soprattutto del reclutamento di ioni sodio e cloro, non sono del tutto chiari, ma possono essere riassunti nella seguente maniera:

- ingresso di sodio attraverso la membrana apicale degli epitelii che avviene grazie alla presenza di canali ionici, proteine di scambio Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$,
- passaggio di sodio attraverso la membrana basale degli epitelii verso l'emolinfa grazie alla presenza dell'enzima Na^+/K^+ -ATPasi che trasporta Na^+ dalla branchia all'emolinfa scambiandolo con K^+ e/o NH_4^+ ,
- ingresso di cloro attraverso la membrana apicale degli ionociti che avviene grazie alla presenza di proteine di scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$; l'anidrasi carbonica è un enzima fondamentale in quanto procede alla catalisi dell'anidride carbonica in acido carbonico derivata dalla respirazione,
- passaggio di cloro nell'emolinfa grazie alla presenza di canali ionici secondo un gradiente di concentrazione (Piller *et al.* 1995; Onken e Riestenpatt 1998; Henry 2001; Ling Mo *et al.* 2003; Henry *et al.* 2003).

I numerosi studi fatti per approfondire come avvenga la ionoregolazione nei Crostacei e la loro conseguente capacità di adattamento ad ambienti in cui varia la salinità sono anche molto importanti per il ruolo che sostanze inquinanti quali i metalli pesanti possono avere. Queste sostanze infatti possono sostituirsi ai sali durante i passaggi attraverso le pareti e le membrane, andando a danneggiare i tessuti utilizzati nella ionoregolazione, e ad accumularsi nel corpo dei Crostacei (Lignot *et al.* 2000; Roast *et al.* 2002; Skaggs e Henry 2002; Erk *et al.* 2008).

Lignot *et al.* (2000) hanno sottolineato che la capacità di osmoregolazione (OC), definita come la differenza della pressione osmotica tra ambiente interno ed esterno,

è un'importante biomarker per il monitoraggio delle alterazioni fisiologiche in seguito ad alterazioni ambientali o esposizione a sostanze inquinanti. Nel loro lavoro di revisione hanno riportato sia come variano i flussi di acqua, Na^+ e Cl^- attraverso i tessuti osmoregolatori che l'attività degli enzimi coinvolti nella ionoregolazione, durante l'esposizione a vari stressogeni. Ad esempio per il granchio *C. maenas* esposto a concentrazioni sub letali di DDT e di piombo, l'attività dell' Na^+/K^+ -ATPasi diminuisce rispettivamente del 43,5 % e del 50 %, mentre in seguito ad esposizione a cadmio e zinco è compromessa la capacità di regolare i flussi d'acqua.

1.3.2.1 Na^+/K^+ -ATPasi

Onken (1999) ha dimostrato che nel granchio *Eriocheir sinensis* i flussi di Na^+ e Cl^- che si innescano attraverso gli epitelii sono indipendenti l'uno dall'altro e variano in base alla salinità. Analoghi risultati sono stati ottenuti utilizzando l'astice *Homarus spp.* In particolare è stato osservato che dopo il trasferimento a basse salinità di *Homarus gammarus*, si verifica nelle prime 12 ore una drastica diminuzione delle concentrazioni di sodio e cloro e un loro recupero nell'arco dei 15 giorni successivi, probabilmente per un aumento dell'attività di sintesi di nuovi enzimi nelle branchie (Lucu e Devescovi 1999; Charmantier *et al.* 2001).

Due aspetti sono fondamentali per la comprensione dei meccanismi di ionoregolazione a salinità alterate: la loro cinetica e la neo sintesi di enzimi.

Per quanto riguarda i tempi di reazione dei tessuti osmoregolatori Ling Mo e Greenaway (2001) hanno osservato che, durante il trasferimento del gambero dulciacquicolo *Cherax destructor* in acqua salata, la concentrazione del cAMP, necessario per la stimolazione dell'enzima Na^+/K^+ -ATPasi, aumenta. Un primo aumento si verifica dopo 10 minuti e si protrae per 2 ore in risposta alla rilevazione del cambiamento della concentrazione esterna degli ioni. Dopo 6 ore di esposizione un secondo picco indica l'avvenuta percezione dell'alterazione della concentrazione interna degli ioni.

Per quanto riguarda la produzione ex novo di Na^+/K^+ -ATPasi, è ancora poco chiaro se la capacità di osmoregolazione nei Crostacei dipenda da un effettivo aumento della sua attività, oppure da un aumento della sua concentrazione a livello delle membrane basolaterali degli ionociti. Sembra tuttavia che le alterazioni della salinità abbiano un'influenza sulla capacità di espressione delle sequenze di amminoacidi specifiche per la sintesi di nuove molecole di Na^+/K^+ -ATPasi (Towle *et al.* 2001; Lucu e Towle 2003; Chung 2006).

1.3.2.2 Anidraasi carbonica (CA)

L'anidraasi carbonica agisce successivamente alla diluizione del mezzo esterno. Questo è stato dimostrato in alcune specie di Crostacei, tra cui i granchi eurialini *Callinectes sapidus* e *Carcinus maenas*. Nella prima specie è stato osservato che il passaggio ad ambienti diluiti, induce una risposta della CA inversamente proporzionale alla salinità esterna. In *C. maenas* invece è stato dimostrato il ruolo dell'anidraasi carbonica, attraverso la sua inibizione con acetazolamide: in seguito al trasferimento di questa specie in ambienti fortemente diluiti vengono infatti a mancare gli equilibri tra gli ioni negativi presenti nell'emolinfa. Più recentemente è stata individuata per queste specie la salinità critica, quella al di sotto della quale viene stimolata l'attività dell'anidraasi carbonica cioè 26 PSU (Henry 2001; Henry *et al.* 2003; Henry 2005).

Come per gli enzimi Na^+/K^+ -ATPasi e H^+ -ATPasi, anche per la CA l'espressione genica è influenzata dalla salinità e in particolare si è visto che di questa proteina esistono due isoforme, l'una posizionata sulla membrana degli ionociti, attiva nell'intervallo di salinità in cui una specie si mantiene conforme con l'ambiente esterno, l'altra libera nel citoplasma e attivata in seguito a diminuzione della salinità del mezzo. È quest'ultima molecola ad essere maggiormente implicata nella ionoregolazione (Henry *et al.* 2003; Serrano *et al.* 2007).

1.3.2.3 Altri scambi ionici

Nonostante la pompa sodio potassio e l'anidraasi carbonica siano gli enzimi principali nei processi di ionoregolazione, recentemente è stata messa in luce l'importanza di un'altra proteina che catalizza il passaggio di ioni H^+ attraverso le membrane cellulari: H^+ -ATPasi. Questo enzima che viene attivato in seguito alle alterazioni della salinità, è presente sulle membrane apicali nei Crostacei d'acqua dolce e terrestri e libera nel citoplasma dei Crostacei marini (Genovese *et al.* 2005; Beyenbach *et al.* 2006; Tsai e Lin 2007).

Nei Crostacei l'accumulo di ammoniaca e ione ammonio, tossici per la maggior parte degli animali, provoca alterazioni nella capacità di osmoregolazione (Weihrauch *et al.* 2004). Come riportato precedentemente (paragrafo 1.3.1) l'ammoniaca e lo ione ammonio sono derivati dal catabolismo delle proteine e vengono eliminati attraverso scambi ionici in corrispondenza dei tessuti osmoregolatori. A livello delle branchie questo è possibile per due ragioni: innanzi tutto lo ione ammonio e il potassio hanno lo stesso raggio ionico e la stessa carica, inoltre esistono sulle membrane apicali delle

pompe di scambio $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ e H^+/NH_4^+ (Weihrauch *et al.* 2002). Oltre a queste in *C. sapidus*, sembra essere coinvolta anche la pompa sodio potassio; Masui *et al.* (2002) hanno trovato che questo enzima possiede due siti per l'idrolisi dell'ATP, uno stimolato dal potassio ed uno dagli ioni ammonio.

1.4 Effetti della temperatura sui Crostacei

Un altro parametro molto importante per la caratterizzazione degli ecosistemi acquatici è la temperatura che è soggetta a variazioni sia giornaliere che stagionali, soprattutto in zone costiere. A queste oscillazioni si aggiungono modificazioni dovute alle attività umane che aggravano fenomeni naturali, come il riscaldamento del pianeta, attraverso significativi aumenti della concentrazione di anidride carbonica in atmosfera. Marbà e Duarte (1997) hanno evidenziato che l'aumento della piovosità, l'innalzamento del livello marino e la conseguente erosione delle coste, correlati al riscaldamento globale, hanno effetti diretti sull'accrescimento delle praterie di *Posidonia oceanica*, una delle maggiori specie vegetali che caratterizzano gli ambienti marini mediterranei. Il danno provocato sulla vegetazione ha conseguenze dirette sulle specie animali che popolano le zone costiere. Diversi studi hanno messo in evidenza l'importanza delle praterie per molte specie di Crostacei Decapodi: la tipica distribuzione a macchie della vegetazione fornisce protezione ai diversi stadi giovanili di queste specie animali, che scelgono l'habitat a loro più favorevole per accrescersi senza essere disturbati dai predatori (Sanchez 1997; Eggleston *et al.* 1998).

Dal punto di vista ecologico i Crostacei hanno adottato diverse strategie di adattamento sia in ambienti in cui la temperatura è più stabile che in quelli in cui la temperatura subisce delle oscillazioni. In quest'ultimo caso si ha una grande influenza su diversi momenti dei cicli vitali dei Crostacei, condizionandone la distribuzione.

Diversi studi hanno evidenziato la capacità dei Crostacei di sopravvivere alle alterazioni di temperatura, determinando per ciascuna specie quale sia il valore meglio tollerato (CTMax, temperatura critica massima) (Korhonen e Lagerspetz 1995; Fernando *et al.* 2002; Manush *et al.* 2004; Re *et al.* 2005). Questa tecnica, che prevede l'identificazione dei primi segnali di stress termico individuabili tramite la valutazione della diminuzione della capacità di locomozione, ha permesso di stabilire, ad esempio, che la temperatura massima sopportata da *Carcinus maenas*,

granchio eurialino che vive nella zona intertidale, pescato in autunno ed acclimatato a 22° C, è di 35,8° C (Cuculescu *et al.* 1998).

1.4.1 Risposte fisiologiche

Sebbene dal punto di vista ecologico i Crostacei abbiano adottato diverse strategie di adattamento, ciascuna specie ha evoluto meccanismi fisiologici propri per la sopravvivenza in ambienti in cui si verificano oscillazioni della temperatura.

Come già evidenziato nei paragrafi precedenti relativi allo stress osmotico anche in seguito a modificazioni della temperatura si ha mobilitazione di glucosio per garantire l'apporto energetico (Bergmann *et al.* 2001; Lorenzon *et al.* 1997, 2004). Nell'astice *Homarus americanus* è stato dimostrato che l'iperglicemia indotta da stress e il recupero delle condizioni fisiologiche normali sono influenzate dalla temperatura (Lorenzon *et al.* 2007).

Il rilascio del glucosio dai siti di riserva è coordinato dal sistema neuroendocrino, in particolare dal complesso SG-XO posizionato nel peduncolo oculare in corrispondenza dei gangli ottici (Govind 1992). Tra gli ormoni qui prodotti e rilasciati vi è il cHH responsabile della regolazione della concentrazione di glucosio nell'emolinfa (Fingerman 1987; Webster 1996; Chang *et al.* 1998; Lorenzon *et al.* 2004, 2005). È stato ampiamente dimostrato in numerose specie di Crostacei Decapodi che la concentrazione di glucosio nell'emolinfa in seguito a stress termico dipende prevalentemente da variazioni nel rilascio di cHH (Santos e Keller 1993, Chang *et al.* 1998, Lorenzon 2005, 2007; Zou *et al.* 2003). Kuo e Yang (1999) hanno dimostrato che nel gamberetto *Macrobrachium rosenbergii* la risposta glicemica mediata dal cHH è modulata dal rilascio di bioammine tra cui epinefrina, norepinefrina, dopamina, serotonina e ottopamina. Più di recente in un lavoro condotto sulla stessa specie Hsieh *et al.* (2006) hanno osservato che in quattro gruppi sperimentali, due costituiti da animali interni e due da animali che hanno subito l'ablazione bilaterale del peduncolo oculare, la concentrazione di glucosio nell'emolinfa aumenta sempre dopo il loro trasferimento dalla temperatura di 28° C a 15 e 10° C. Questi risultati potrebbero dimostrare che durante lo stress termico altri meccanismi, che coinvolgono alcune bioammine ma non il cHH, sono implicati nelle risposte glicemiche (Hsieh *et al.* 2006).

La temperatura influisce sulla solubilità dell'ossigeno, in particolare per elevate temperature la quantità di ossigeno disponibile diminuisce. Le risposte atte a

compensare da un lato lo stress termico, dall'altro le variazioni nella concentrazione di ossigeno disponibile sono diverse; una di queste è il passaggio dal metabolismo aerobio a quello anaerobio, con conseguente iperlatticemia (Hagerman *et al.* 1990, Zou *et al.* 1996, Frederich e Portner 2000, Sanchez *et al.* 2001; Ocampo *et al.* 2003).

Lorenzon *et al.* (2007) durante uno studio condotto sulle condizioni di trasporto dell'astice *Homarus americanus* hanno dimostrato che la temperatura influisce sulla latticemia: la concentrazione di acido lattico dopo il periodo di trasporto è infatti risultata significativamente più elevata in animali a 15° C rispetto a quelli a 6° C.

Selvakumar e Geraldine (2003) hanno dimostrato che nel gamberetto *Macrobrachium malconsonii* la concentrazione dell'acido lattico nell'emolinfa varia in relazione alla temperatura, essendo più bassa rispetto ai gruppi di controllo nei gamberetti esposti a 15° C e più alta in quelli esposti a 35° C. In questo caso è stato dimostrato che l'anaerobiosi dipende dalla relazione tra l'attività dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) e la temperatura. Sembra inoltre che i meccanismi che contribuiscano al passaggio al metabolismo anaerobio in Crostacei esposti ad elevate temperature siano molti quali ad esempio l'aumento delle attività cardiache e respiratorie (Truchot 1980) e la diminuzione dell'affinità tra ossigeno ed emocianine ad elevate temperature (Mauro e Mangum 1982).

1.4.2 Risposte fisiologiche: effetti sulla respirazione

A differenza di ciò che accade per gli stress osmotici, non è ancora chiaro come avvenga la percezione della variazione della temperatura nei Crostacei. Crossin *et al.* (1998) e Juri e Watson III (2000) hanno messo in evidenza che, prediligendo la temperatura di 16° C, l'astice *Homarus americanus* abbia dei meccanismi di termorecezione, probabilmente neuroni termosensibili, localizzati in corrispondenza dei gangli toracici.

Sebbene non siano del tutto conosciuti questi meccanismi, è noto che le alterazioni della temperatura, e le correlate variazioni della solubilità dell'ossigeno, determinano in numerose specie di Decapodi l'aumento dell'attività metabolica, e di conseguenza la richiesta ed il consumo di ossigeno (Eshky *et al.* 1996; Mercaldo-Allen e Thurberg F. 1987). Queste alterazioni possono essere utilizzate come indicatori di stress termico.

Morris e Taylor (1985) hanno dimostrato che in *Palaemon elegans* l'acclimatazione ad una determinata temperatura incide sul metabolismo respiratorio risultato

dimostrato anche nelle larve del gamberetto *Macrobrachium acanthurus* (Ismael e Moreira 1997).

L'aumento della richiesta metabolica e la crescente necessità di ossigenare i tessuti durante lo stress termico, si ripercuotono sul battito cardiaco (Mercaldo-Allen e Thurberg F. 1987), ulteriore indicatore dell'avvenuta detezione della modificazione dell'ambiente esterno (Juri e Watson III 2000).

L'astice *Homarus americanus* è stato sottoposto a modificazioni della temperatura al fine di misurarne la frequenza cardiaca ed è stato evidenziato che le alterazioni della temperatura, anche di pochi gradi, inducono un'iniziale e breve bradicardia seguita da un prolungata tachicardia (Juri e Watson III 2000). Questi risultati sono stati confermati più recentemente sia esponendo la stessa specie a un più ampio intervallo di temperature (Worden *et al.* 2005) che utilizzando altre specie di Crostacei (Nakamura *et al.* 1994).

È noto dalla bibliografia che il battito cardiaco è influenzato dalla concentrazione di Mg^{2+} (Watt *et al.* 1999), che agisce, soprattutto a basse temperature, diminuendo il battito cardiaco (Frederich *et al.* 2000a). La diminuzione della temperatura da 12 a 0° C, induce una parallela diminuzione della concentrazione di Mg^{2+} nell'emolinfa del granchio *Maja squinado*, con conseguente bradicardia (Frederich *et al.* 2000b). Viceversa Sartoris e Portner (1997) hanno trovato che nel gamberetto *Crangon crangon* esposto a basse temperature la concentrazione di Mg^{2+} aumenta, contribuendo al mantenimento del pH e della concentrazione di ATP intracellulari, fondamentali per il corretto funzionamento cellulare sia in momenti durante i quali gli animali si preparano ad un prolungato periodo di inattività, che in quelli in cui devono fronteggiare eventuali stress termici.

Il magnesio è uno ione scambiato durante i processi di osmoregolazione. Le variazioni di salinità con conseguente alterazione dei movimenti ionici possono dunque influenzare la capacità di termoregolazione dei Crostacei.

1.4.3 Altre variazioni metaboliche

È stato dimostrato che i processi di osmoregolazione e la capacità di tollerare gli abbassamenti della temperatura sono collegati e determinano le migrazioni stagionali tipiche del gamberetto *Palaemon elegans*: pare infatti che il trasferimento di questi animali in mare aperto durante i mesi invernali possa dipendere dalla diminuzione della capacità di osmoregolazione a basse temperature (Janas e Spicer 2008).

Anche l'aumento della temperatura può avere conseguenze sulla capacità osmotica dei Crostacei, alterando la barriera di permeabilità delle membrane con conseguente perdita o ingresso di acqua e ioni. In queste circostanze alcuni metaboliti come il colesterolo e le proteine possono essere utilizzate per ricostruire le membrane (Pascual *et al.* 2003).

L'effetto sinergico di stress termico e stress osmotico è stato dimostrato anche nel granchio *Callinectes sapidus*. Conducendo uno studio sulla mortalità invernale di questa specie, Rome *et al.* (2005), hanno dimostrato che la sua capacità di sopravvivere a basse temperature (1 e 3° C) dipende dalla salinità a cui viene esposta (8, 12 o 16 PSU).

È ben documentato che l'alterazione di alcuni parametri ambientali, tra cui la temperatura, incidono sul sistema immunitario dei Crostacei, indebolendoli e rendendoli passibili di infezioni da parte di batteri naturalmente presenti negli ambienti acquatici (Cheng e Chen 2000; Pascual *et al.* 2003; Lorenzon 2007, 2008). Le difese immunitarie dei Crostacei sono rappresentate prevalentemente dagli emociti, componente cellulare dell'emolinfa, suddivisi in tre tipi: cellule ialine, implicate nella fagocitosi, emociti granulari e semigranulari, in cui sono presenti in differente quantità dei granuli che vengono liberati nel momento in cui la cellula riconosce corpi estranei. I granuli contengono elementi del sistema della profenolossidasi, una cascata enzimatica responsabile della produzione di melanina, coinvolta nei meccanismi di difesa (Söderhäll e Smith 1986; Smith e Söderhäll 1991; Lorenzon *et al.* 2002; Giulianini *et al.*, 2006).

In *Macrobrachium rosenbergii*, un gamberetto che vive in ecosistemi in cui la temperatura varia tra 14 e 35° C, il numero totale degli emociti circolanti aumenta e il sistema enzimatico della profenolossidasi viene attivato se esposto a elevate temperature (Sung *et al.* 1998, Cheng e Chen 2000).

Nel gambero *Litopenaeus setiferus* l'adattamento a 27 o 31° C e l'esposizione a 33° C inducono da un lato la diminuzione del numero di emociti totali circolanti, dall'altro l'attivazione del sistema della profenolossidasi con conseguente produzione di melanina (Sanchez *et al.* 2001; Pascual *et al.* 2003).

Anche la capacità di riprodursi dei Crostacei dipende dalla temperatura; è stato dimostrato che in varie specie di Decapodi, lo stress termico causa disfunzioni dell'apparato riproduttore e alterazioni nella crescita delle larve (Paula *et al.* 2001; Perez-Velazquez *et al.* 2001; Sanchez *et al.*, 2003).

È noto infine dalla bibliografia che la modificazione della temperatura incide anche sulla trasmissione nervosa e sul comportamento dei Crostacei (Fraser 1990; Crossin 1998; Young *et al.* 2006).

1.5 Risposte metaboliche in seguito ad ipossia

I Crostacei che vivono in zone costiere possono essere soggetti a periodi di emersione, o possono venire momentaneamente isolati dal mare (pozze di marea o stagni costieri), con conseguente riduzione della quantità di ossigeno disponibile (Brouwer *et al.* 2004).

Tra i Decapodi vi sono differenze interspecifiche sulla capacità di ossigenazione dei tessuti che dipendono da numerosi fattori, come l'area delle branchie, la capacità di ventilazione e la capacità di trasportare ossigeno dell'emolinfa (Watt *et al.* 1999).

A queste diversità si aggiunge l'emersione che causa la riduzione degli scambi gassosi a livello delle branchie con ripercussioni sulla respirazione e sulla loro fisiologia. Le risposte fisiologiche più evidenti, come di seguito descritto, sono il passaggio dal metabolismo aerobio a quello anaerobio che causa acidosi lattica e spostamento dell'equilibrio acido base, e alterazioni della capacità di ionoregolazione con conseguente accumulo soprattutto di ammoniaca, principale prodotto del catabolismo delle proteine, nella sua frazione tossica (Morris 2002).

La risposta glicemica già descritta per lo stress osmotico e quello termico, è evidente anche nei Crostacei che vengono sottoposti ad emersione (Spicer *et al.* 1990; Speed *et al.* 2001). Taylor e Spicer (1987) hanno dimostrato che nei gamberetti *P. elegans* e *P. serratus*, la concentrazione di glucosio nell'emolinfa aumenta nell'arco di due ore quando esposti ad ambiente privo di ossigeno. Più di recente gli stessi risultati sono stati ottenuti in *Eriocheir sinensis* e in *Jasus edwardsii*; in quest'ultimo accanto all'aumento di glucosio si è osservata una significativa diminuzione del glicogeno (Zou *et al.* 1996; Morris e Oliver 1999).

I Crostacei utilizzati per scopi commerciali, dopo essere stati pescati, sono spesso sottoposti a periodi di emersione durante le varie fasi della commercializzazione. È stato dimostrato, in molti Decapodi, che la glicemia aumenta durante le diverse fasi di manipolazioni commerciali (Paterson e Spanoghe 1997; Bergman *et al.* 2001; Lorenzon *et al.* 2007, 2008).

Il glucosio, viene utilizzato per sostenere la respirazione aerobia; in condizioni di carenza o mancanza di ossigeno il passaggio al metabolismo anaerobio garantisce un adeguato apporto di ATP tramite la fermentazione lattica.

Il primo sintomo della carenza di ossigeno sono l'aumento della frequenza e dell'ampiezza del battito degli scafognatiti, strutture posizionate in corrispondenza delle entrate delle camere branchiali prossime alla bocca, che vibrando velocemente determinano la fuoriuscita di acqua, con conseguente iperventilazione (McMahon 2001). Come dimostrato da diversi autori, in molti Crostacei, all'iperventilazione segue un aumento della concentrazione di acido lattico (Taylor e Wheatley 1980; deFur *et al.* 1988; Morris e Oliver 1999; Watt *et al.* 1999).

Tra i Crostacei le specie fossorie sono quelle che più frequentemente nel loro ambiente naturale sono esposte a condizioni ipossiche o anossiche. Zebe (1981) ha dimostrato che la concentrazione di acido lattico nell'emolinfa di *Upogebia pugettensis* e *Callinassa californiensis* aumenta progressivamente nell'arco di 7,5 ore in condizioni di carenza di ossigeno; a queste condizioni estreme è stata osservata una differenza sia nella quantità di acido lattico prodotto che nella sopravvivenza delle due specie. Infatti *U. pugettensis*, in cui gli incrementi di acido lattico sono maggiori, sopravvive fino a 30 ore, mentre *C. californiensis* riesce a sopravvivere per il doppio del tempo. Queste differenze sono probabilmente alla base della grande variabilità a tollerare l'anossia che si osserva tra i Thalassinidea.

Analoghi risultati sono stati ottenuti con la specie dulciacquicola *Eriocheir sinensis* (Zou *et al.* 1996), e con le specie sopralitorali *P. elegans* e *P. serratus* (Taylor e Spicer 1987); la concentrazione di acido lattico aumenta quando la pressione dell'ossigeno diminuisce. Gli autori hanno dimostrato che il ripristino di condizioni normossiche determina una rapida ripresa del metabolismo aerobio, con conseguente riconversione del lattato in glucosio.

Il passaggio dal metabolismo aerobio a quello anaerobio osservato in *Nephrops norvegicus* esposto in ambiente aereo, sembra inoltre essere dipendente dalla temperatura; la quantità di acido lattico presente nell'emolinfa è infatti maggiore in seguito alla combinazione di emersione ed elevate temperature (Ridgway *et al.* 2006).

Incrementi di acido lattico si sono osservati anche nelle specie commerciali *H. americanus* e *C. pagurus*, durante il loro trasporto fuori dall'acqua (Lorenzon *et al.* 2007, 2008).

Il cambiamento dei flussi di acqua a livello delle branchie durante l'esposizione all'aria si riflettono sul battito cardiaco (Paterson e Thorne 1995; McMahon 2001). È stato dimostrato che nel gamberetto fossorio *Trypaea australiensis* (Paterson e Thorne 1995), nell'astice *H. americanus* e nel granchio *Cancer magister* (McMahon 2001) la carenza di ossigeno determina sia la diminuzione della frequenza del battito cardiaco, che l'aumento della sua intensità.

Durante l'emersione, oltre a diminuire la capacità di scambi gassosi a livello dei tessuti respiratori, viene anche a mancare la capacità di scambio ionico a livello delle branchie. Oltre a causare problemi legati al mantenimento di osmolalità e volume corporeo, insorgono quindi problemi legati all'escrezione.

Come già detto i Crostacei sono ammoniotelici e secernono come prodotto di scarto l'ammoniaca. Lo ione ammonio viene eliminato prevalentemente per diffusione passiva a livello dei tessuti ionoregolatori. In diversi lavori è stato dimostrato che, in numerose specie di Crostacei, in seguito ad esposizione all'aria viene alterato il metabolismo dell'azoto e di conseguenza i processi di escrezione (Schmitt *et al.* 1997; Durand *et al.* 1998; 2000; Weihrauch *et al.* 2004). Regnault (1992) ha dimostrato che nel granchio *C. pagurus* esposto per brevi periodi all'aria, la concentrazione di ammoniaca nell'emolinfa aumenta, e la quantità escreta rappresenta circa il 4 % di quella normalmente eliminata in acqua. Lo stesso autore ha ipotizzato che, essendo tossica, l'ammoniaca venga immagazzinata in qualche distretto corporeo; la formazione di glucosamina, una delle principali componenti della chitina, potrebbe indicare l'accumulo di ammoniaca nell'esoscheletro (Regnault 1996)

Un ulteriore conseguenza dell'esposizione all'aria, è l'alterazione del sistema immunitario, ed in particolare del numero totale degli emociti (THC) circolanti nell'emolinfa (Ridgway *et al.* 2006; Lorenzon *et al.* 2007, 2008). In *N. norvegicus* è stato dimostrato che la prolungata esposizione all'aria determina una diminuzione del THC. A parità di tempo di esposizione, la diminuzione del numero di emociti circolanti è aggravata dalla temperatura: essi infatti sono inferiori in animali esposti a 25° C rispetto a quelli esposti a 10° C (Ridgway *et al.* 2006). Analoghi risultati si sono ottenuti nella specie commerciale *C. pagurus*: il trasporto a secco di questa specie dai luoghi di pesca a quelli di vendita determina una diminuzione significativa nel numero di emociti circolanti sia rispetto al gruppo trasportato in acqua che al gruppo utilizzato come controllo (Lorenzon *et al.* 2008).

1.6 Importanza delle proteine nell'emolinfa

In bibliografia è ben documentato il ruolo delle proteine totali nell'emolinfa dei Crostacei durante le alterazioni ambientali. Questi metaboliti possono dunque essere utilizzati come indicatori sia dello stress termico che ipossico (Brouwer *et al.* 2004).

Molti autori concordano ormai nell'affermare che le emocianine (Hc), i pigmenti respiratori dei Crostacei, rappresentano l'80-90% delle proteine totali presenti nell'emolinfa dei Crostacei (Chen e Cheng 1995; Watt *et al.* 1999; Chausson *et al.* 2004). Sebbene sia ben documentato che gli stress fisiologici inducono la mobilitazione anche di altre proteine, tra cui le metallotioneine (MT) e le stress proteins (HSP) (Rainbow e Wong 1986; Pedersen e Lundebye 1996; Lewis *et al.* 1999; Cimino *et al.* 2002; Ravaux *et al.* 2007), le emocianine vengono largamente utilizzate per il monitoraggio delle condizioni dei Crostacei.

Le emocianine dei Crostacei sono proteine oligomeriche formate dall'aggregazione di subunità il cui peso molecolare è compreso tra 65 e 90 KDa. Come sottolineato da Dolashka e il suo gruppo di lavoro (2001), la maggior parte delle emocianine sono glicoproteine, in cui la composizione saccaridica varia da specie a specie. È noto che anche il numero delle subunità costituenti le emocianine ha variabilità interspecifica (Giomi e Beltramini 2007), e che i Crostacei meno evoluti hanno emocianine esameriche, mentre quelli più evoluti presentano più subunità (Mangum e Greaves 1996). Analizzando il pattern elettroforetico dell'emolinfa Hodgson e Spicer (2001) hanno trovato che le emocianine di diverse specie di Decapodi sono costituite da un numero di subunità compreso tra sei e dieci. In uno studio condotto sull'astice *H. americanus*, è stato osservato che esistono differenze tra i pattern elettroforetici di individui diversi; questo è stato spiegato con la possibilità dell'esistenza di criptocianine, proteine non deputate al trasporto dell'ossigeno e collegate ai processi di muta, che oltre ad essere appartenenti alla stessa famiglia delle emocianine, hanno anche il loro stesso peso molecolare (Mangum e Joy 1997).

Nonostante siano numerosi gli studi sulla composizione delle emocianine, è stato però spesso sottolineato che i risultati non possono essere comparabili sia per le differenti condizioni fisiologiche in cui si trovano gli animali nel momento delle analisi che per la tecnica utilizzata (Hodgson e Spicer 2001).

La capacità delle emocianine di legare reversibilmente l'ossigeno, dipende dalla presenza di un sito attivo costituito da un nucleo di rame (Lamy *et al.* 1985; Spinozzi *et al.* 2005).

Numerosi studi hanno dimostrato che la concentrazione di rame contenuto nel corpo dei Crostacei è correlato alla concentrazione di emocianine, e che il 93 % di questo metallo è dato da quello contenuto in queste proteine (Martin *et al.* 1977; Abdennour 1997). La quantità di rame disponibile per la sintesi delle emocianine dipende da condizioni ambientali quali salinità, ipossia e temperatura; poiché la stabilità dei pigmenti respiratori dipende dalla presenza del nucleo rameico, sembra possibile che la loro concentrazione possa variare in stagioni diverse (Abdennour 1997; Devescovi e Lucu 1995; Martin e Rainbow 1998).

Sebbene sia stato dimostrato che la concentrazione delle emocianine circolanti nell'emolinfa dipenda da fattori come il sesso, il peso corporeo, le fasi di muta e di crescita (Abdennour 1997; Spicer e Baden 2000; Giomi e Beltramini 2007), sembra che in diverse specie di Decapodi siano fondamentali anche la concentrazione di ossigeno e la temperatura dell'ambiente esterno (Mangum 1994; Mangum e McKenney 1996; Mangum e Joy 1997). L'esposizione di *L. setiferus* e di *H. americanus* a diverse temperature induce una variazione nella concentrazione delle proteine presenti nell'emolinfa (Engel *et al.* 2001; Sanchez *et al.* 2001; Lorenzon *et al.* 2007). Analoghi risultati sono stati riportati di recente da Giomi e Beltramini (2007): la concentrazione delle emocianine aumenta in seguito a stress ipossico nello scampo *N. norvegicus* e nel gamberetto *C. crangon*, ed in seguito a stress iposalino nei granchi *Eriocheir sinensis*, *C. sapidus* e *C. maenas*.

Oltre alla variazione della loro concentrazione, un altro effetto che hanno sia la temperatura che le condizioni di ossigenazione, è quello di variare l'affinità delle emocianine con l'ossigeno, che diminuisce in condizioni critiche (Morris e Bridges 1985; Whiteley e Taylor 1997; Adamczewska e Morris 1998; Taylor *et al.* 2000). McMahon (2001) ha tuttavia evidenziato che nelle specie fossorie come i gamberi *Cambarus fodiens*, *C. diogenes* e *P. clarkii*, più probabilmente soggette a momenti di ipossia le emocianine hanno una maggiore affinità con l'ossigeno.

È noto che in molti Crostacei diversi modulatori, sia organici che inorganici, contribuiscano a compensare gli effetti negativi delle alterazioni ambientali (McMahon 2001; Giomi e Beltramini 2007). Truchot (1980) ha dimostrato in *Carcinus maenas* che l'acido lattico prodotto dall'anaerobiosi aumenta l'affinità tra emocianine e ossigeno. Lo stesso effetto è stato evidenziato anche da Zeis *et al.* (1992) in numerose specie di Decapodi tra cui l'astice *Homarus vulgaris*.

L'effetto positivo che ha l'acido lattico sull'affinità delle emocianine con l'ossigeno dipende dall'aumento della concentrazione degli ioni H^+ , con conseguente spostamento dell'equilibrio di Bohr verso l'anidride carbonica, favorendo quindi gli scambi gassosi (Cameron 1989; Adamczewska e Morris 1998; Taylor *et al.* 2000). Bassi valori di pH tuttavia hanno effetto sulla struttura delle emocianine destabilizzandole. Esistono altri modulatori, come urato e neurammine, che tamponando il pH dell'emolinfa mantengono stabile la struttura delle proteine (Zeis *et al.* 1992; Bridges 2001; McMahon 2001).

1.7 Scopi della tesi

Gli ecosistemi acquatici costieri, sono caratterizzati da alcuni parametri fondamentali come salinità, temperatura e ossigenazione. Questi parametri, oltre a variare naturalmente nel corso dell'anno, subiscono mutazioni indotte dalle attività umane, che si ripercuotono sugli organismi che vivono in questi ambienti. È necessario quindi verificare l'adattabilità e la capacità di reazione delle specie costiere a queste alterazioni, per individuare quali parametri ambientali contribuiscono maggiormente al loro indebolimento e/o mortalità. Gli organismi lagunari potranno quindi essere utilizzati come bioindicatori per il monitoraggio di quanto accade negli ecosistemi costieri.

In questo lavoro si sono utilizzati i Crostacei Decapodi *Carcinus aestuarii*, *Palaemon elegans* e *Upogebia pusilla*, tutti presenti sulle coste del Friuli Venezia Giulia, in quanto organismi fondamentali per il mantenimento degli equilibri all'interno degli ecosistemi. L'approccio di questo lavoro è stato di tipo ecofisiologico, quindi in seguito alla loro esposizione a salinità o temperature modificate ed in seguito ad emersione, sono stati valutati mortalità e stress fisiologico.

Con questo lavoro, date le poche informazioni esistenti in letteratura, si è innanzi tutto voluto estendere la conoscenza sulle risposte fisiologiche dei Decapodi abitanti le acque di transizione nelle nostre coste. Si sono analizzati i seguenti aspetti:

- Capacità di adattamento alle condizioni di laboratorio. Prima del loro utilizzo nelle fasi sperimentali si è voluto verificare che le condizioni di stabulazione fossero adeguate per ciascuna specie, per eliminare ogni eventuale interferenza fisiologica.
- Sopravvivenza alle condizioni sperimentali. Attraverso l'analisi dei dati di mortalità, si è tentato di determinare quale sia la resistenza delle specie trattate per conoscere quali siano gli effetti di stress osmotico, termico e ipossico.
- Esposizione acuta di ciascuna specie a diverse condizioni di salinità, temperatura o ad ambiente subaereo. Gli esperimenti sono stati condotti con lo scopo di identificare condizioni estreme, non tollerate dalle specie, ovvero per individuare intervalli di salinità o temperature entro i quali vengano attivate risposte fisiologiche per il mantenimento dell'omeostasi. Questo tipo di esperimenti ha inoltre permesso di capire quale sia per ciascuna specie il parametro fisiologico prevalentemente coinvolto durante stress termici, osmotici ed in condizioni di ipossia.

- Trasferimento graduale di ciascuna specie dalle condizioni di stabulazione a diverse condizioni di salinità o temperature. Queste serie sperimentali sono state eseguite per verificare quali risposte fisiologiche vengono messe in atto dopo costanti variazioni della salinità o della temperatura e gli effetti verificabili dopo il raggiungimento della condizione definitiva.
- Adattamento di ciascuna specie a diverse condizioni di salinità o temperature per due settimane. Si è voluto verificare se la specie è resistente sul lungo periodo ad una nuova condizione, e se c'è differenza tra le condizioni fisiologiche di animali stabulati e animali che hanno subito uno stress cronico.

Dal momento che i Crostacei utilizzati sono regolarmente predati da altre specie lagunari, ulteriore scopo di questo lavoro è stato quello di ottenere dati che potranno essere inseriti in studi sull'andamento della disponibilità delle risorse alimentari per ittiofauna ed avifauna.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Descrizione delle specie

2.1.1 *Carcinus aestuarii*

Il granchio *Carcinus aestuarii* (Nardo) è un Crostaceo Decapode che popola il Mar Mediterraneo, e le coste delle isole Canarie e nel Mar Nero.

Questa specie si distingue dagli altri granchi per la morfologia del carapace, che è convesso, trapezoidale, liscio e presenta caratteristiche incisioni sul dorso. Il bordo anteriore del torace termina con tre sporgenze poco acuminate simili a lobi, affiancate lateralmente da cinque dentelli.

Sul capo sono presenti un paio di occhi pedunculati, un paio di antennule corte e un paio di antenne più lunghe. La specie ha cinque paia di arti: il primo paio anteriore è munito di chele, spesso diverse dal punto di vista morfometrico, con dattili appuntiti e dentati; le quattro paia di arti successivi, i pereopodi, sono utilizzati per la deambulazione. I maschi e le femmine di questa specie sono facilmente riconoscibili dalle caratteristiche morfologiche dell'addome: nei maschi ha la forma di un triangolo stretto e appuntito e possiede solamente i pleopodi anteriori, utilizzati come organi copulatori, nelle femmine è largo e arrotondato ed i pleopodi vengono utilizzati per il trasporto delle uova. Anche le dimensioni sono differenti tra i due sessi: i maschi raggiungono una larghezza massima del carapace di 6 cm mentre le femmine sono più piccole, raggiungono una larghezza di 4 cm. Il colore è tipicamente verde o tendente al grigio sul dorso, mentre l'addome è più chiaro, giallastro con venature rossastre (Cottiglia, 1983).

Carcinus aestuarii è una specie litoranea ritrovabile in acque basse, soprattutto in laguna. Nonostante sia una specie eurialina ed euriterma, difficilmente si ritrova in acque dolci, dove sopravviverebbe per brevi periodi; può invece essere piuttosto lunga la permanenza in ambiente subaereo. È onnivoro e si ciba prevalentemente di notte e con l'alta marea.

C. aestuarii si riproduce da maggio a novembre, periodo in cui le femmine mutano: infatti perché avvenga la fecondazione è necessario che la femmina sia prossima alla muta e il maschio abbia l'esoscheletro duro. Le femmine migrano poi in mare a deporre le uova. Dall'uovo si schiude una prima larva, la zoea, che dopo l'ultimo stadio larvale, la megalopoda, muta per la prima volta in giovane granchio. Da questo momento in poi si susseguono più mute nell'arco di un anno fino al raggiungimento dello stadio di

granchio adulto. Da adulti i granchi maschi mutano in primavera e in autunno (Cottiglia 1983).

2.1.2 *Palaemon elegans*

Il gamberetto Palaemon elegans (Rathke) è un Crostaceo Decapode appartenente alla famiglia dei Palaemonidi; è diffuso nel Mar Mediterraneo, nel Mar Nero e nell'Atlantico Orientale, dalla Namibia alla Norvegia.

La porzione anteriore del corpo è costituita dal cefalotorace ricoperto dal carapace, terminante anteriormente con un rostro rettilineo o lievemente ricurvo verso l'alto, caratterizzato dalla presenza di 2 – 3 dentelli sul margine inferiore, e 7 – 9 su quello superiore. Le sei paia di appendici presenti nella porzione cefalica sono nell'ordine: peduncoli oculari, antennule, antenne, mandibole e due paia di massille. Sul torace sono invece presenti 8 paia di appendici: le prime tre, i massillipedi, sono utilizzate per la manipolazione del cibo, le ultime, i pereopodi, hanno funzione ambulacrale.

Sull'addome sono presenti sei paia di appendici biramificate, i cui endopoditi sono trasformati in petasma ed appendice maschile (1° e 2° segmento nei maschi) ed in uropodi (6° segmento, o telson).

Questi gamberetti possono avere dimensioni che vanno dai 3 ai 7 cm.

P. elegans è una specie eurialina ed euriterma, che vive nelle spiagge rocciose, nei porti, nelle pozze di marea e nei luoghi dove è fitta la vegetazione. *Palaemon elegans* è una specie onnivora opportunista. Manifesta preferenze alimentari verso alcuni gruppi tassonomici, che possono variare in relazione alla disponibilità di organismi predabili all'interno degli ambienti occupati.

Il ciclo di vita di questa specie è caratterizzato da regolari migrazioni tra il mare aperto, dove vengono deposte le uova, e le lagune, raggiunte dalle larve planctoniche subito dopo la schiusa. Lo spostamento attivo verso ambienti paralici come lagune ed estuari, avviene nella fase di postlarve (Cottiglia 1983; Riedl 1991).

2.1.3 *Upogebia pusilla*

Upogebia pusilla (Petagna) è un gamberetto che appartiene alla famiglia dei Callianassidi. Vive nel Mar Mediterraneo, nel Mar Nero e nell'Atlantico Orientale dalla Norvegia a Gibilterra.

Questo gamberetto ha il carapace notevolmente sviluppato che rappresenta circa il 40% della lunghezza totale; anteriormente termina con il rostro, grande, triangolare, dotato di solchi, lateralmente ai quali si trovano delle setole.

I chelipedi sono normalmente mantenuti distesi in avanti; essi sono compressi e tra loro e non presentano notevoli differenze morfologiche. Particolare è il dattilopodite, ricurvo e sviluppato in altezza.

Sul capo sono presenti le antenne, gialle, più corte dell'intero corpo e dotate di setole, e le seconde antenne, dello stesso colore delle prime e dotate di un pettine di setole sul loro ramo superiore.

L'addome è stretto in corrispondenza del primo segmento e si allarga posteriormente. Le prime appendici addominali, mancanti nei maschi, sono uniramate e ridotte nelle femmine. Le successive sono biramate, decisamente sviluppate e ricche di setole.

U. pusilla presenta una colorazione verde-giallastra o bruno giallastra, intervallata da macchie più chiare; spiccano inoltre i bordi anteriori e laterali e quelli del rostro, che sono bianchi. Anche i pereopodi risultano più chiari del resto del corpo.

La dimensione comune varia tra 4 e 7 cm (questi ultimi ritrovabili soprattutto nelle lagune del nord Adriatico).

E' una specie fossoria che vive su substrati sabbiosi-limosi, a modeste profondità, anche sopra il limite superiore di bassa marea. Scava gallerie spesso a più uscite, con diametro compreso tra 0,5 e 1,5 cm, e profonde fino a 30 cm. La specie è rinvenibile prevalentemente di notte, quando esce per cibarsi; *Upogebia pusilla* si nutre prevalentemente dei detriti che trova fuori dall'ingresso delle tane.

La specie è abbastanza eurialina, anche se tollera gli aumenti della salinità solo per brevi momenti mentre le condizioni iposaline non vengono tollerate.

Si riproduce a fine primavera-estate; la larva dopo sei giorni di vita, passa dallo stadio planctonico a quello bentonico (Cottiglia 1983).

2.2 C. aestuarii, P. elegans: disegno sperimentale

2.2.1 Trasporto, stabulazione e mantenimento durante gli esperimenti

Gli animali utilizzati per questo lavoro sono stati forniti da pescatori che lavorano sulle coste del Friuli Venezia Giulia:

- *Carcinus aestuarii*: i granchi sono stati pescati manualmente mediante retino nella Laguna di Grado, e poi trasportati in laboratorio racchiusi in contenitori privi di acqua. Le metodologie di pesca e di trasporto utilizzate non hanno mai causato mortalità degli animali.

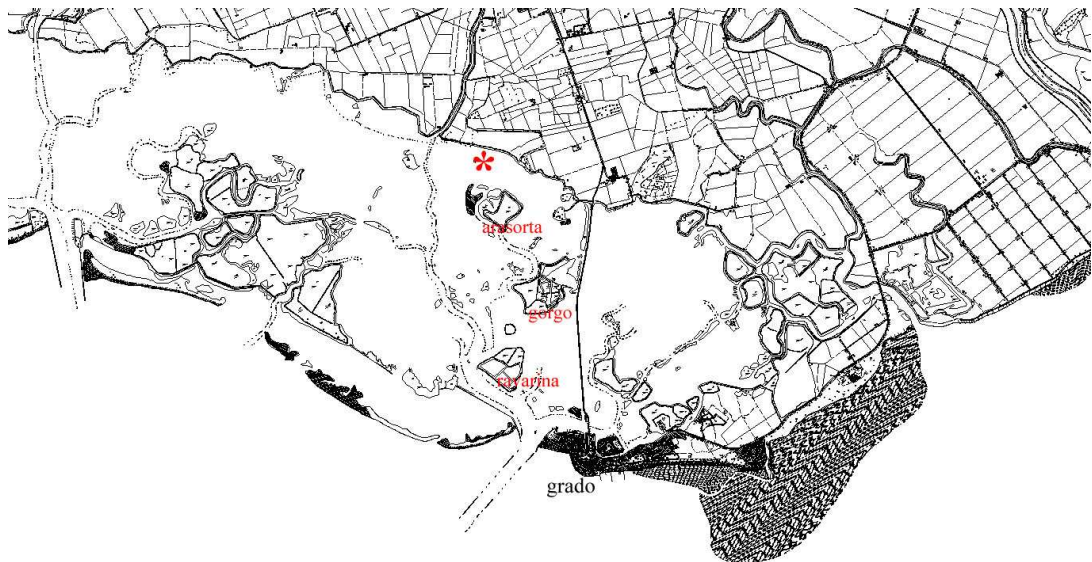


Figura . Sito di pesca (*) dei granchi presso la laguna di Grado. Il sito è posto nella zona posteriore verso Nord della valle Arastorta.

- *Palaemon elegans*: i gamberetti provengono dalla pesca commerciale nella Baia di Panzano, Golfo di Trieste; il loro mantenimento durante il trasporto presso i laboratori è stato analogo a quello descritto per i granchi, anche se non è risultato ottimale per questa specie.

In laboratorio gli animali sono stati stabulati a condizioni costanti per due settimane prima di essere utilizzati per gli esperimenti. Le vasche di mantenimento hanno dimensioni di 120 x 40 x 40 cm ed una capacità di 120 L, sono dotate di aerazione e sistema di filtraggio a circuito chiuso e riempite con acqua di mare artificiale (Prodac ®) con salinità 36 PSU. Per quanto riguarda la temperatura un gruppo di animali per ciascuna specie è stato stabulato a $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ed un altro a $18 \pm 1^\circ \text{C}$. Le condizioni di illuminazione sono state costanti e hanno previsto 12h di luce e 12h di buio. Sono stati nutriti regolarmente ogni tre giorni con pezzi di pesce, molluschi o mangimi artificiali, fino a 48h prima dell'inizio degli esperimenti.

Per ciascuna specie sono stati creati due gruppi di controllo costituiti da 10 granchi o 25 gamberetti, uno per ogni temperatura di stabulazione. Su questi gruppi si sono effettuati prelievi di emolinfa, come descritto di seguito, e si sono misurati alcuni parametri fisiologici. I dati sono stati utilizzati come confronto per quelli ottenuti durante gli esperimenti. Nel caso di *C. aestuarii* ed esclusivamente per gli adattamenti (tempo 14d), il confronto è stato effettuato con la media di tutti i dati osservati ai tempi 0h degli esperimenti di step (n=50), ovvero con i dati ottenuti dopo il periodo di stabulazione.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in vasche opportunamente allestite:

- *C. aestuarii*: tutti gli esperimenti riguardanti le alterazioni di salinità e gli aumenti di temperatura, sono stati eseguiti in vaschette di vetro dalle dimensioni 56 x 40 x 22 cm, dotate di sistema di aerazione, di filtro a circuito chiuso e riscaldatore (per il mantenimento o per la modificazione della temperatura);
- *P. elegans*: per quanto riguarda gli esperimenti a salinità alterate e a temperature elevate, gli esperimenti si sono svolti in vasche di vetro di lunghezza 58 cm, di larghezza 25 cm e di altezza 37 cm, anche queste dotate di aeratore, filtro e riscaldatore;
- per entrambe le specie gli esperimenti di diminuzione della temperatura sono stati realizzati in vasche analoghe a quelle di stabulazione, collegate ad un refrigeratore (Teco).

Per quanto riguarda l'esposizione all'aria è stato sfruttato il naturale andamento delle temperature dell'ambiente in cui sono alloggiato le vasche. Per l'esposizione all'aria fredda, gli animali sono stati posizionati in un frigo a $4 \pm 1^\circ \text{C}$, in cui è stata sistemata una lampada che veniva accesa e spenta seguendo il ritmo L/D a cui gli animali erano abituati durante la stabulazione. L'esposizione a temperature elevate è stata eseguita mettendo gli animali in vaschette di plastica vuote e coperte, a loro volta immerse in vasche riempite con acqua a 32°C . In tutti i casi è stata garantita l'umidità dell'aria.

2.2.2 Prelievo di emolinfa

Il prelievo di emolinfa è stato eseguito dalle membrane articolari degli arti di *C. aestuarii* e dal seno pericardio di *P. elegans*, utilizzando una siringa sterile da 1 mL con ago 25 g.

Per quanto riguarda i granchi a ciascun animale ad ogni prelievo sono stati prelevati 300 μL di emolinfa, mentre per i gamberetti, a causa delle loro ridotte dimensioni, ne sono stati prelevati 50 μL , cumulati in lotti il cui volume finale è stato di 200-250 μL .

In tutti i casi l'emolinfa prelevata è stata centrifugata per 1 min a 15000 g.; il supernatante è stato immediatamente surgelato a -20°C per le successive analisi.

2.2.3 Step: esposizione diretta a salinità o temperature modificate ed esposizione all'aria

La prima fase sperimentale ha previsto la creazione di gruppi di granchi o gamberetti, che sono stati esposti direttamente, senza adattamento, a condizioni di salinità e temperatura alterate o in ambiente subaereo (tab. 1).

Tabella 1 : salinità e temperature durante la stabulazione e durante gli esperimenti di step.

Condizioni iniziali	Step di temperatura	Step di salinità	Esposizione all'aria
18° C – 36 PSU	24° C		18° C
	30° C		4° C
	12° C		24° C
	6° C		
22° C – 36 PSU		6 PSU	24° C
		16 PSU	30° C
		26 PSU	
		46 PSU	

Per quanto riguarda *C. aestuarii*, 48h prima dell'inizio degli esperimenti 10 animali sono stati isolati in cestelli di plastica numerati, sia per facilitare il riconoscimento di ciascun individuo, che per eliminare alterazioni fisiologiche legate allo scontro con altri granchi. I cestelli sono rimasti nelle vasche di stabulazione fino al primo prelievo (tempo 0h) e successivamente trasferiti in vasche sperimentali (salinità o temperatura modificate), oppure in ambiente subaereo. I prelievi sono stati eseguiti dopo 3, 8, 24 e 48h di esposizione.

Per *P. elegans* i tempi di prelievo sono stati gli stessi appena descritti per i granchi; al tempo 0h è stata prelevata emolinfa da 25 gamberetti mantenuti nelle vasche di stabulazione. Per i tempi successivi 120 animali sono stati trasferiti nelle vasche sperimentali; ad ogni tempo di prelievo ne sono stati utilizzati 25 ottenendo così 5 lotti di emolinfa.

I dati ottenuti dalle misure effettuate sull'emolinfa prelevata da animali sperimentali sono stati confrontati con quelli ottenuti agli stessi tempi negli animali che hanno costituito i gruppi di controllo, ovvero con i gruppi adattati alle condizioni di stabulazione.

2.2.4 Adattamenti

Nella seconda fase di questo lavoro, si sono effettuati esperimenti di adattamento sul lungo periodo alle stesse condizioni di temperatura o salinità già valutate nel corso degli step.

2.2.4.1 *C. aestuarii*

Per gli adattamenti alle diverse salinità e temperature, sono stati creati 8 gruppi costituiti da 14 animali ciascuno, trasferiti una settimana prima dell'inizio degli esperimenti nelle vasche sperimentali in cui le condizioni di salinità e temperatura dell'acqua sono state identiche a quelle di stabulazione.

Successivamente salinità o temperatura sono state modificate, aumentando o riducendo i parametri di 2 PSU o 2° C ogni due giorni fino al raggiungimento delle condizioni stabilite.

Il primo prelievo di emolinfa (tempo 0h), effettuato a soli 10 dei granchi (marcati) costituenti i gruppi sperimentali, è coinciso con il momento immediatamente precedente all'ultimo passaggio di salinità o di temperatura: ad esempio, nei passaggi da 36 PSU a 6 PSU, il prelievo al tempo 0h è stato considerato quello effettuato dopo due giorni di mantenimento a 8 PSU (tab. 2). I prelievi successivi sono stati fatti dopo 3, 8, 24, 48h e 14d, dal passaggio alla salinità o temperatura definitiva.

Tabella 2: salinità e temperature prima e durante le esposizioni graduali e gli adattamenti.

Condizioni iniziali e finali	Condizioni al tempo 0h	Condizioni ai prelievi successivi
36 PSU – 6 PSU	8 PSU	6 PSU
36 PSU – 16 PSU	18 PSU	16 PSU
36 PSU – 26 PSU	28 PSU	26 PSU
36 PSU – 46 PSU	44 PSU	46 PSU
18° C – 24° C	22° C	24° C
18° C - 30° C	28° C	30° C
18° C – 12° C	14° C	12° C
18° C – 6° C	8° C	6° C

2.2.4.2 P. elegans

Per questa specie si sono creati 6 gruppi sperimentali (4 per ciascuna salinità già sperimentata nella fase precedente e due per l'esposizione graduale a 6 e 12° C) il cui numero iniziale di individui è stato differente, sebbene per i prelievi ne siano sempre stati utilizzati 120 (tab. 3). Dal momento che il tempo di adattamento alle varie condizioni sperimentali è differente per ciascun gruppo, un elevato numero iniziale di animali ha garantito che un numero sufficiente di gamberetti per ottenere i lotti di emolinfa per tutti i prelievi, arrivasse fino al 14° giorno di esposizione.

Tabella 3: numero iniziale di gamberetti e durata degli esperimenti di adattamento.

Adattamento	Numero iniziale di gamberetti	Durata (giorni)
6 PSU	200	30 + 14
16 PSU	180	20 + 14
26 PSU	150	10 + 14
46 PSU	150	10 + 14
6° C	150	12 + 14
12° C	150	6 + 14

I gruppi creati sono stati trasferiti nelle vasche sperimentali una settimana prima dell'inizio degli esperimenti, che sono stati condotti secondo i tempi già descritti per la specie *C. aestuarii*. In questo caso però, ad ogni prelievo sono stati utilizzati 20 gamberetti, in seguito eliminati dal gruppo, per l'ottenimento di 4 lotti di emolinfa.

2.3 *U. pusilla*: prove di mantenimento e manipolazione, prove sperimentali

I gamberetti appartenenti a questa specie sono stati pescati manualmente nella Laguna di Grado. Dopo la pesca sono stati trasportati in laboratorio a secco, distesi su fogli umidi in contenitori di polistirolo. I metodi di pesca e trasporto hanno garantito la vitalità degli animali.

In laboratorio si sono sperimentate diversi tipi di stabulazione, al fine di trovare quella ottimale per la specie. L'acqua utilizzata, preparata artificialmente (Prodac ®), ha sempre avuto salinità 36 PSU e temperatura 22° C, mentre le condizioni di illuminazione non sono state costanti: un gruppo di gamberetti è stato sottoposto a cicli naturali di illuminazione (12h luce – 12h buio), un gruppo è stato mantenuto al buio. Durante i tentativi di stabulazione si sono variate le dimensioni della vasca, la quantità di substrato presente in ciascuna vasca e il numero di gamberetti per vasca:

1. una vasca da 120 L dotata di sistema di filtraggio sul cui fondo è stato posta della sabbia per uno spessore pari a 5 cm; in un primo tentativo i gamberetti sono stati lasciati liberi nella vasca (n=80), in seguito si sono posti dei divisori in plastica per la formazione di celle in cui sono stati posizionati 4 gamberetti;
2. due vaschette 56 x 40 x 22 cm sul cui fondo è stata messa sabbia per uno spessore di 3 cm; le ridotte dimensioni delle vasche e la presenza della sabbia hanno reso impossibile l'utilizzo dei filtri e l'aerazione è stata mantenuta solo in una vaschetta. Anche in questo caso in una vaschetta i gamberetti sono stati lasciati liberi (n=20), mentre in una sono stati isolati singolarmente da divisori in plastica;
3. 6 vaschette di plastica 20 x 15 x 12 cm: un primo tentativo è stato fatto mettendo un gamberetto per ciascuna vaschetta riempita prevalentemente di sabbia (8 cm) ricoperta da poca acqua (2 cm); in seguito, con un ulteriore gruppo di animali (n=6), si è provato a mettere un gamberetto per ogni vaschetta precedentemente riempita con 5 cm di sabbia e 5 cm di acqua.

Il prelievo dell'emolinfa è stato effettuato con siringhe sterili da 1 mL con ago 25 g, tra le membrane articolari del penultimo e terzultimo metamero addominale, direttamente

nel pericardio. Su 22 gamberetti si sono effettuati prelievi di emolinfa immediatamente dopo il loro arrivo in laboratorio, prima della loro immersione nelle vasche. In seguito sono stati creati diversi gruppi (n=5) su cui si sono effettuate alcune prove:

- prelievo di 30 μL o 50 μL di emolinfa;
- tempi di prelievo diversi: a 0, 3 e 24h oppure a 0, 0,5, 1, 2 e 3h;
- mantenimento in acqua in vasche singole (5 cm di sabbia e 5 cm di acqua) utilizzando la sequenza di prelievo 0, 0,5, 1, 2 e 3h;
- mantenimento in aria di gamberetti precedentemente stabulati in vasche singole (5 cm di sabbia e 5 cm di acqua) utilizzando la sequenza di prelievo 0, 0,5, 1, 2 e 3h.

2.4 Determinazione dei parametri fisiologici nell'emolinfa

2.4.1 Glicemia

La concentrazione di glucosio nell'emolinfa è stata misurata utilizzando un riflettometro colorimetrico ONE TOUCH II e kit commerciali di strisce reattive ONE TOUCH (Lifescan). La misura è basata sulla reazione tra il glucosio e l'ossigeno, che tramite la glucosio ossidasi, determina la formazione di acido gluconico e acqua ossigenata; quest'ultima ossida i due indicatori colorimetrici (reazione mediata dalla perossidasi), che assumono una colorazione blu proporzionale alla quantità di glucosio. La concentrazione di glucosio nell'emolinfa in mg dL^{-1} (coefficiente di variazione CV: $\pm 3\%$).

2.4.2 Acido lattico

La quantità di acido lattico presente nell'emolinfa è stata determinata utilizzando lo strumento LACT (CDR-analisi e sviluppo sistemi cibernetici).

Sono state utilizzate cuvette da 1 mL già pronte all'uso (1 cm di cammino ottico), nelle quali sono stati aggiunti 10 μL di emolinfa.

L'acido lattico viene trasformato in acido piruvico (reazione catalizzata dalla lattato ossidasi), con formazione di acqua ossigenata che procede nell'ossidazione dei cromogeni; la colorazione viola, più o meno intensa, è proporzionale alla quantità di acido lattico presente, che viene espressa alla fine della lettura in mg dL^{-1} .

2.4.3 Densità

La densità (10 µL per ogni campione) è stata determinata mediante l'utilizzo di un densimetro – salinometro ottico a rifrazione, con compensazione automatica della temperatura (SCUBLA s.n.c.).

2.4.4 Proteine totali

La concentrazione delle proteine totali è stata determinata grazie all'utilizzo dello strumento SCREEN POINT, (Hospitex Diagnostics s.r.l. Firenze). Le cuvette (1 cm di cammino ottico) sono state riempite con 1 mL di reattivo pronto all'uso e contenente i seguenti reagenti: ioduro di potassio, sodio potassio tartrato, solfato di rame e idrossido di iodio (Biureto modificato). Le proteine presenti nel campione reagiscono con ioni rameici formando un complesso blu. Dopo 5 min di incubazione delle cuvette a 37 °C, lo strumento effettua la lettura alla lunghezza d'onda di 546 nm (520 – 570 nm).

2.4.5 pH

Il pH dell'emolinfina è stato misurato con pHmetro (Crison) dotato di microelettrodo per misure su piccoli volumi.

2.4.6 Ammoniemia

La concentrazione di ammoniaca nell'emolinfina dei granchi è stata misurata utilizzando il sistema AMMONIA TEST KIT II (un riflettometro colorimetrico) e AMMONIA CHECKER II/PocketChem BA, (Arkray, Inc), un kit commerciale di strisce reattive. Per le misurazioni si sono utilizzati 20 µL di emolinfina diluita (10 µL di emolinfina in 490 µL di PBS), aggiunti sull'area ricevente delle strisce; le reazioni che si sviluppano determinano la formazione di ammoniaca gassosa che colora gli indicatori. Le reazioni hanno una durata di 180 sec, dopo i quali avviene la lettura in 20 sec; sul display viene visualizzata la concentrazione di ammoniaca in µmol/L.

2.4.7 Elettroliti

Lo strumento SCREEN POINT utilizzato per la determinazione della concentrazione delle proteine totali emolinfatiche è stato utilizzato anche per la misura delle concentrazioni di cloruri e di calcio. In entrambi i casi sono stati utilizzati reagenti pronti all'uso, con i quali si sono riempite cuvette da 1 cm di cammino ottico. Per quanto riguarda i cloruri, al reagente si sono aggiunti 10 µL di emolinfina, mentre per il calcio si sono aggiunti 25 µL di emolinfina diluita in milliQ.

In entrambi i casi il metodo è colorimetrico, quindi si basa sul legame tra gli ioni interessati e i rispettivi reagenti, con sviluppo di colore la cui intensità è direttamente proporzionale alle concentrazioni cercate.

Nel caso dei cloruri, dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la lettura viene effettuata alla lunghezza d'onda di 505 nm, contro bianco reattivo. L'assorbanza del calcio viene invece letta a 578 nm dopo 5 minuti di incubazione a 37° C.

2.5 Valutazione qualitativa delle proteine emolinfatich

La valutazione qualitativa delle proteine presenti nell'emolinfa è stata fatta mediante l'esecuzione di elettroforesi su gel di acrilamide.

I campioni sottoposti alle corse elettroforetiche sono stati preparati diluendo 10 µL di emolinfa in 490 µL di PBS; 5 µL della soluzione ottenuta sono stati aggiunti a 5 µL di SAMPLE buffer. I campioni ottenuti sono stati fatti bollire per circa 10 minuti, ed in seguito caricati nei pozzetti della cella elettroforetica (7 µL per pozzetto); sono stati confrontati con i pesi molecolari utilizzati come controllo.

Per la colorazione i gel sono stati immersi in una soluzione di blu di Coomassie per un'ora; in seguito sono stati decolorati (40 minuti circa) e reidratati in acqua distillata.

2.6 Analisi statistiche ed elaborazioni grafiche

I dati raccolti sono stati inseriti in tabelle Excel e la statistica è stata eseguita mediante SPSS 12 ® per Windows; i dati in seguito riportati sono espressi come media ± errore standard.

Gli effetti delle prove sperimentali sui diversi parametri sono stati analizzati mediante test-t di Student, sia rispetto al tempo 0h che rispetto alle condizioni di controllo (soglia di significatività: $P < 0,05$).

Le medie e gli errori standard sono stati riportati su grafici, creati utilizzando il programma Origin 6.0, che mettono in relazione l'andamento dei vari parametri fisiologici rispetto al tempo. Per una migliore resa visiva, la scala temporale non è proporzionale.

L'elaborazione delle immagini, riguardanti le corse elettroforetiche è stata effettuata con i programmi Photoshop 7.0 e ImageJ.

3 RISULTATI

3.1 *Carcinus aestuarii*

3.1.1 Mortalità

Il grafico in figura 1 mostra la mortalità registrata durante tutte le fasi sperimentali per ciascun gruppo (n=10) sia esposto direttamente (1A) che gradualmente (1B) a variazioni di salinità o temperatura.

3.1.2 Esposizione diretta: salinità

3.1.2.1 Glicemia

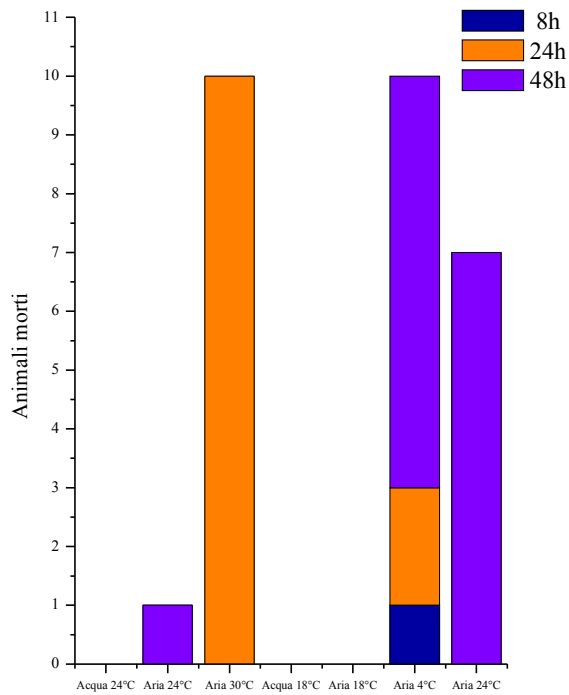
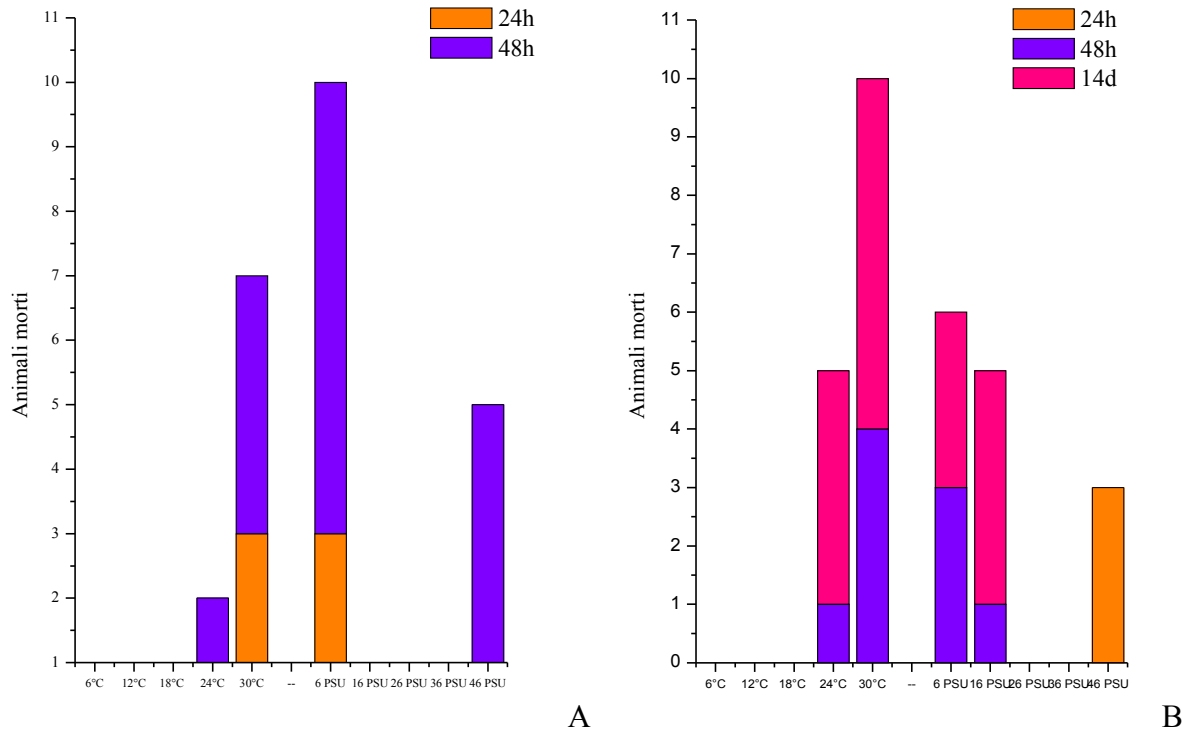
La glicemia al tempo 0h (n=10), in granchi non trattati ed in seguito utilizzati come gruppo di controllo è $5,10 \pm 0,50$ es mg dL⁻¹; ai successivi prelievi non si sono ottenute medie glicemiche significativamente diverse da questo valore (P>0,05). Il grafico in figura 2A mostra gli andamenti glicemici nel tempo alle diverse salinità.

A 6 PSU il glucosio dell'emolinfa, partendo da $3,80 \pm 0,59$ es mg dL⁻¹ (n=10), è aumentato significativamente dal tempo 3h fino a 8h ($6,10 \pm 0,98$ es mg dL⁻¹, P=0,023 e $6,20 \pm 0,76$ es mg dL⁻¹, P=0,040 rispettivamente. Sebbene a 24h la glicemia rimanga elevata non è significativamente diversa rispetto al tempo 0h (P=0,276). Il confronto tra le medie osservate in questo gruppo e quelle rilevate agli stessi tempi nel gruppo di controllo non sono mai state significativamente diverse (P>0,05).

Nel gruppo posto a 16 PSU (n=10) la concentrazione iniziale di glucosio circolante è stata $4,20 \pm 0,77$ es mg dL⁻¹ successivamente si verifica un lieve aumento della glicemia al tempo 3h ($5,50 \pm 0,86$ es mg dL⁻¹ P>0,05) seguito poi da una diminuzione fino a 24h ($4,30 \pm 0,47$ es mg dL⁻¹). Al tempo 48h la glicemia è $4,33 \pm 0,47$ es mg dL⁻¹ è significativamente diversa da quella ottenuta allo stesso tempo nel gruppo di controllo (P=0,033).

L'esposizione a 26 PSU (n=10) non ha mai determinato aumenti significativi (P>0,05) della concentrazione di glucosio rispetto al tempo 0h ($4,20 \pm 0,51$ es mg dL⁻¹); a 48h la glicemia misurata ($4,00 \pm 0,49$ es mg dL⁻¹) è stata significativamente diversa da quella rilevata allo stesso tempo nel gruppo di controllo (P=0,012).

La concentrazione di glucosio iniziale (0h) nei granchi in seguito esposti a 46 PSU (n=10) è stata $3,10 \pm 0,41$ es mg dL⁻¹; anche in questo caso ai tempi successivi non si



C

Figura 1: mortalità osservata durante gli esperimenti con *C. aestuarii*. In A sono riportati i dati osservati durante gli esperimenti di esposizione diretta a salinità o temperature modificate, in B i dati osservati durante l'esposizione graduale e in C durante l'esposizione all'aria.

sono avute differenze significative ($P>0,05$) rispetto alla media iniziale. In quest'ultimo gruppo il confronto tra le glicemia ottenute a tutti i tempi ed i valori del gruppo di controllo ha evidenziato sempre differenze significative (0h $P=0,007$; 3h $P=0,027$; 8h $P=0,003$; 24h $P=0,0001$; 48h $P=0,0001$) (Appendice, tavola 1A; figura 2A).

3.1.2.2 Acido lattico

Nel gruppo di controllo ($n=10$; figura 2B) mantenuto a 36 PSU la concentrazione di acido lattico è progressivamente diminuito; le medie ottenute a 3, 8, 24, 48h non sono mai state significativamente diverse ($P>0,05$) da quelle del tempo 0h ($3,10 \pm 0,27$ es mg dL⁻¹).

Il valore iniziale (0h) di lattico emolinfatico dei granchi ($n=10$) in seguito posti alla salinità 6 PSU è $3,16 \pm 0,26$ es mg dL⁻¹; ai tempi successivi si sono registrati dei progressivi aumenti fino a raggiungere a 24h, un valore di $3,57 \pm 0,32$ es mg dL⁻¹ ($P=0,018$ vs 0h). In questo gruppo i valori non sono mai stati significativamente diversi da quelli ottenuti per il gruppo di controllo ($P>0,05$).

Prima del passaggio a 16 PSU (tempo 0h) la media di acido lattico emolinfatico è $3,34 \pm 0,25$ es mg dL⁻¹ ($n=10$). Nelle 3h successive si è misurato un lieve ma non statisticamente significativo ($P>0,05$) aumento della concentrazione ($3,59 \pm 0,35$ es mg dL⁻¹); in seguito fino a 24h si assiste invece ad un leggero decremento fino a $3,26 \pm 0,24$ es mg dL⁻¹ ($P>0,05$). L'ulteriore diminuzione di acido lattico registrata a 48h ($2,81 \pm 0,25$ es mg dL⁻¹) è invece risultata significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,014$). Anche per questo gruppo le medie di acido lattico ai diversi tempi non sono state significativamente diverse da quelle del gruppo di controllo ($P>0,05$).

Durante l'esposizione diretta alla salinità di 26 PSU ($n=10$) la concentrazione di acido lattico è progressivamente aumentata da $3,45 \pm 0,46$ es mg dL⁻¹ (tempo 0h) a $3,86 \pm 0,39$ es mg dL⁻¹ ($P=0,032$ vs tempo 0h) nell'arco di 24h; a 48h l'acido lattico torna a $3,54 \pm 0,36$ es mg dL⁻¹ valore non significativamente diverso rispetto al tempo 0h ($P>0,05$). Le medie ottenute non sono mai state significativamente diverse da quelle del gruppo di controllo ($P>0,05$).

A 46 PSU dalla concentrazione iniziale di acido lattico di $3,28 \pm 0,23$ es mg dL⁻¹ ($n=10$) si passa, con un graduale aumento fino alle 8h, a un valore di $4,28 \pm 0,42$ es mg dL⁻¹ significativamente diverso sia dal tempo 0h ($P=0,014$) che dal controllo ($P=0,006$). In seguito l'acido lattico torna a diminuire e i valori ottenuti non sono mai

stati significativamente diversi ($P > 0,05$) né dal tempo 0h né dal gruppo di controllo (Appendice, tavola 1B; figura 2B).

3.1.2.3 Densità

Nel gruppo di controllo ($n=10$) mantenuto a 36 PSU la densità al tempo 0h è stata $1045,90 \pm 4,06$ es g L⁻¹; nei prelievi successivi si è poi registrata una diminuzione e in particolare, i valori ottenuti ai tempi 24 e 48h, rispettivamente $1039,50 \pm 2,95$ es g L⁻¹ e $1037,00 \pm 2,16$ es g L⁻¹, sono risultati significativamente inferiori al tempo 0h ($P=0,043$, $P=0,032$).

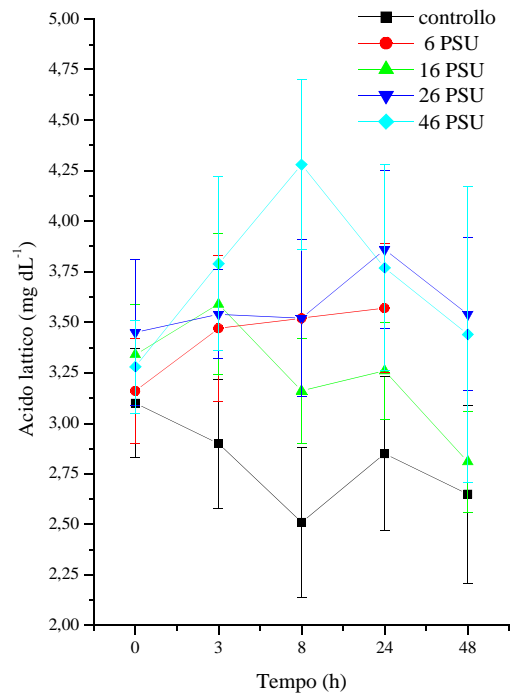
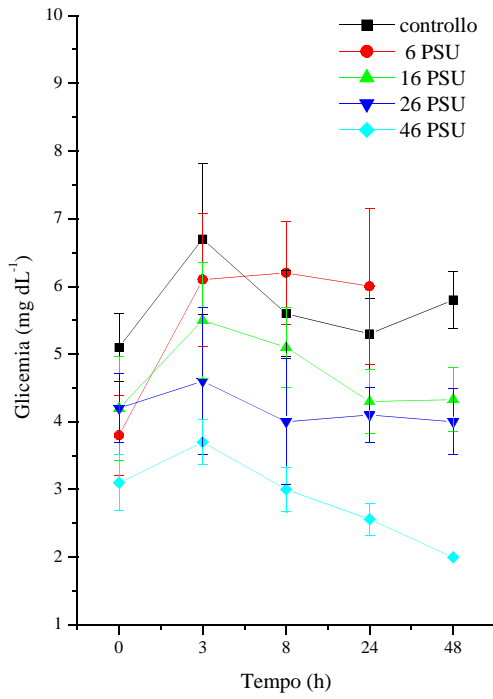
A 6 PSU la densità emolinfatica iniziale media del gruppo sperimentale ($n=10$) è $1048,60 \pm 4,21$ es g L⁻¹. Già dopo 3h di esposizione ad ambiente iposalino si è osservata una diminuzione significativa della densità ($1041,60 \pm 4,14$ es g L⁻¹, $P=0,0001$); successivamente si verifica una diminuzione fino a $1030,29 \pm 3,04$ es g L⁻¹ (24h) dato significativamente diverso sia dal tempo 0h ($P=0,0001$) che da quello del gruppo di controllo ($P=0,047$).

A 16 PSU il valore di densità al tempo 0h è $1052,40 \pm 4,77$ es g L⁻¹ ($n=10$) e come nel caso precedente nell'arco delle 48h si verifica una progressiva diminuzione. A ciascun tempo di prelievo le medie delle densità sono risultate significativamente diverse dal tempo 0h ($P < 0,05$) ma non dai valori agli stessi tempi del controllo ($P > 0,05$; appendice, tavola 1C).

Come si vede nel grafico in figura 2C durante l'esposizione a 26 PSU la densità media dell'emolinfata cala progressivamente da $1046,00 \pm 3,98$ es g L⁻¹ (tempo 0h; $n=10$) a $1038,00 \pm 4,06$ es g L⁻¹ (48h); a tutti i prelievi i valori sono risultati significativamente diversi rispetto al tempo 0h (rispettivamente $P=0,043$, $P=0,018$, $P=0,027$, $P=0,0001$) ma non rispetto al gruppo di controllo ($P > 0,05$). Il valore iniziale della densità emolinfatica nei granchi in seguito esposti alla salinità di 46 PSU è $1048,60 \pm 2,21$ es g L⁻¹ ($n=10$). Durante l'esperimento, non si sono osservate variazioni significative ($P > 0,05$). Dal confronto dei dati ottenuti in questo gruppo sperimentale e quelli ottenuti dal gruppo di controllo, sono risultate significativamente diverse le medie ai tempi 8 e 24h (rispettivamente $P=0,028$, $P=0,024$) (Appendice, tavola 1C; figura 2C).

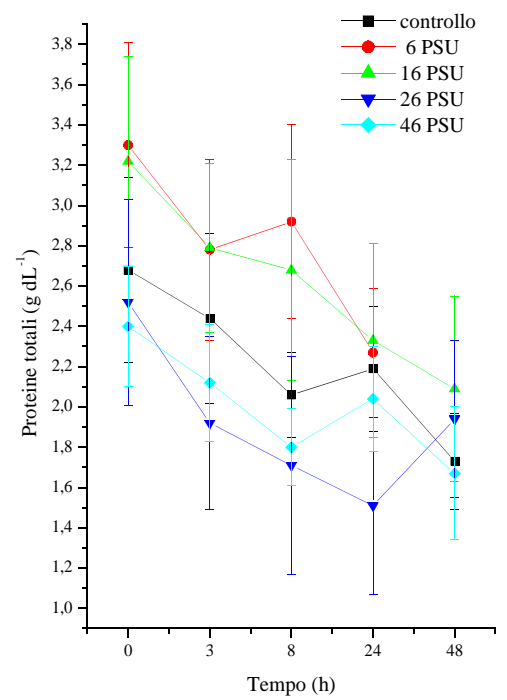
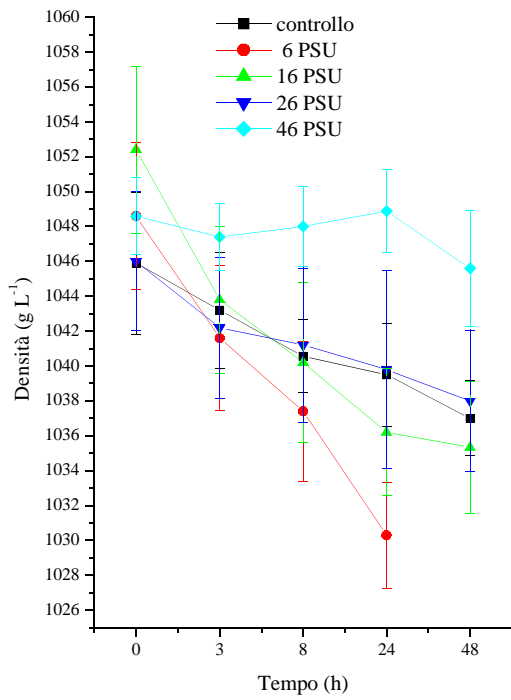
3.1.2.4 Proteine

Nel gruppo di controllo (salinità 36 PSU; $n=10$) il valore al tempo 0h è $2,68 \pm 0,46$ es g dL⁻¹ che cala progressivamente nelle 48h (fig. 2D) fino a $1,73 \pm 0,24$ es g dL⁻¹ ($P=0,052$ vs 0h).



A

B



C

D

Figura 2: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *C. aestuarii* esposto direttamente alle diverse salinità.

La media ottenuta al tempo 0h nei granchi posti a 6 PSU (n=10) è stata $3,30 \pm 0,51$ es g dL^{-1} . Già dopo 3h le proteine circolanti nell'emolinfa diminuiscono significativamente ($P < 0,05$), raggiungendo a 24h la concentrazione di $2,27 \pm 0,32$ es g dL^{-1} ($P = 0,013$). In questo gruppo la concentrazione delle proteine totali non è mai risultata, ai singoli tempi, significativamente diversa dal controllo ($P > 0,05$).

A 16 PSU (n=10), le proteine partendo dalla concentrazione di $3,22 \pm 0,52$ es g dL^{-1} , subiscono un'iniziale diminuzione ($P > 0,05$) a 3h, seguita ai tempi successivi da ulteriori decrementi significativamente diversi dal tempo 0h ($P < 0,05$) (Appendice, tavola 1D; figura 2D). I dati di questo gruppo, confrontati con quelli del gruppo di controllo non sono mai significativamente diversi ($P > 0,05$).

Come le precedenti, anche la salinità 26 PSU (n=10; fig. 2D) causa una costante diminuzione delle proteine che passano da $2,52 \pm 0,51$ es g dL^{-1} al tempo 0h a $1,51 \pm 0,44$ es g dL^{-1} al tempo 24h ($P = 0,006$). A differenza di ciò che accade negli altri gruppi esposti ad ambiente iposalino, dopo 48h le proteine totali aumentano e non risultano significativamente diverse dal tempo 0h ($1,94 \pm 0,39$ es g dL^{-1} , $P = 0,054$). Anche a questa salinità non si evidenziano, ai rispettivi prelievi, dati significativamente diversi da quello di controllo ($P > 0,05$).

La salinità 46 PSU determina una diminuzione progressiva delle proteine totali da $2,40 \pm 0,30$ es g dL^{-1} (n=10) fino a $1,80 \pm 0,19$ es mg dL^{-1} nell'arco di 8h. Sebbene alle 24h le proteine subiscano un incremento ($P = 0,0001$ vs 0h), a 48h si è ottenuta un'ulteriore loro significativa diminuzione ($1,67 \pm 0,33$ es g dL^{-1} , $P = 0,003$). Anche in questo caso la concentrazione delle proteine totali nell'emolinfa dei granchi non è mai stata significativamente diversa da quella degli animali utilizzati come controllo ($P > 0,05$) (Appendice, tavola 1D; figura 2D).

3.1.2.5 pH

Il pH a 0h nel gruppo di controllo (n=10) è risultato $7,83 \pm 0,06$ es, poi diminuito progressivamente fino a 8h ($7,72 \pm 0,07$ es, $P = 0,158$). Nelle ore seguenti il pH torna ad aumentare fino a raggiungere valori prossimi a quello rilevato al tempo 0h.

Alla salinità 6 PSU si verifica un brusco aumento del valore di pH, che passa dal valore iniziale di $7,68 \pm 0,05$ es a $8,29 \pm 0,04$ es a 24h. A tutti i tempi gli aumenti sono stati significativamente diversi rispetto al tempo 0h ($P < 0,05$); inoltre i valori registrati dopo 24 e 48h di esposizione sono anche significativamente diversi da quelli ottenuti ai medesimi tempi nel gruppo di controllo ($P = 0,0001$).

A 16 PSU si è osservato un andamento analogo a quello appena descritto: al tempo 0h infatti il pH dell'emolinfa è $7,82 \pm 0,04$ es ($n=10$), ed aumenta progressivamente nei prelievi successivi e fino a 24h (rispettivamente $7,91 \pm 0,04$ es, $P=0,002$; $8,06 \pm 0,03$ es, $P=0,0001$; $8,08 \pm 0,02$ es, $P=0,0001$). I dati sono risultati significativamente diversi da quelli ottenuti nel gruppo di controllo ($P<0,05$). Dopo 48h di esposizione il pH rimane elevato ($7,99 \pm 0,02$ es) e significativamente diverso sia dal tempo 0h che dal gruppo di controllo ($P<0,05$).

Prima dell'esposizione di *C. aestuarii* ($n=10$) alla salinità 26 PSU, la media del pH dell'emolinfa è stata $7,84 \pm 0,02$ es. Dopo 3h di esposizione il pH è aumentato significativamente rispetto al tempo 0h, ma non rispetto al gruppo di controllo ($7,89 \pm 0,03$ es, $P=0,022$, $P=0,054$). L'ulteriore aumento osservato a 24h ($7,95 \pm 0,03$ es) è invece risultato significativo sia rispetto al tempo 0h ($P=0,007$) che allo stesso tempo nel gruppo di controllo ($P=0,013$).

A differenza di quanto osservato alle altre salinità, l'esposizione a 46 PSU ha causato una lieve e graduale diminuzione del pH. Al tempo 0h il pH è $7,90 \pm 0,02$ es ($n=10$) e diminuisce fino al valore $7,87 \pm 0,02$ es registrato dopo 48h. Il confronto tra i dati ottenuti a tutti i tempi di prelievo e la condizione iniziale non è mai significativo ($P>0,05$). I valori sono invece significativamente diversi rispetto al controllo ai tempi 3, 8 e 48h (rispettivamente $P=0,042$, $P=0,048$, $P=0,005$) (Appendice, tavola 1E; figura 2E).

3.1.2.6 Ammoniaca

Nel gruppo di controllo ($n=5$) la concentrazione iniziale è stata di $0,19 \pm 0,04$ es mmol L^{-1} ed è aumentata in maniera non significativa ($P>0,05$) nell'arco delle 3h successive fino a $0,25 \pm 0,08$ es mmol L^{-1} . A 24h la concentrazione di questo metabolita è scesa fino a $0,12 \pm 0,01$ es mmol L^{-1} ($P>0,05$).

L'andamento ottenuto per il gruppo di controllo si è ripetuto nel caso di tutti i gruppi esposti a basse salinità. A 6 PSU ($n=5$) l'ammoniaca aumenta da $0,17 \pm 0,02$ es mmol L^{-1} a $0,34 \pm 0,05$ es mmol L^{-1} dopo 3h ($P=0,004$), il dato però non è significativamente diverso rispetto al gruppo di controllo ($P>0,05$). A 24h la media ottenuta ($0,21 \pm 0,01$ es mmol L^{-1}) è superiore sia rispetto alla condizione iniziale ($P=0,013$) che allo stesso tempo per il gruppo di controllo ($P=0,001$).

L'esposizione a 16 PSU ($n=5$; fig. 2F) ha indotto lievi ma non significativi aumenti ($P>0,05$) della concentrazione di ammoniaca; inoltre i dati ottenuti per questo gruppo

sperimentale non sono significativamente diversi rispetto al gruppo di controllo ($P>0,05$).

La concentrazione di ammoniaca iniziale nei granchi poi esposti a 26 PSU è stata $0,16 \pm 0,01$ es mmol L^{-1} . Nell'arco delle ore successive l'ammoniaca aumenta, ma non è mai significativa ($P>0,05$) rispetto al tempo 0h. Il valore a 24h ($0,25 \pm 0,04$ es mmol L^{-1}) è significativamente diverso ($P=0,025$) da quella ottenuta al medesimo tempo nel controllo.

L'andamento della concentrazione dell'ammoniaca dei granchi esposti a 46 PSU ($n=5$) è stato contrario a quello descritto per le altre salinità. Dopo 3h di esposizione l'ammoniaca cala lievemente e passa da $0,19 \pm 0,02$ es mmol L^{-1} a $0,16 \pm 0,02$ es mmol L^{-1} ($P>0,05$). Dopo 24h la media di $0,18 \pm 0,02$ es mmol L^{-1} , non è significativamente diversa dal tempo 0h ($P>0,05$), mentre lo è dallo stesso tempo del gruppo di controllo ($P=0,035$) (Appendice, tavola 1F; figura 2F).

3.1.2.7 Cloruri

Nel gruppo di controllo (36 PSU; $n=10$), la concentrazione dei cloruri è stata circa costante a tutti i tempi (Appendice, tavola 1G; figura 2G), e mai significativamente diversa dal tempo 0h ($P>0,05$).

Durante l'esposizione a 6 PSU ($n=10$) si è osservata una brusca diminuzione dei cloruri, che sono passati da $9,29 \pm 0,30$ es mmol L^{-1} a $4,20 \pm 0,31$ es mmol L^{-1} a 24h ($P=0,0001$) questo dato è significativamente diverso anche dal gruppo di controllo ($P=0,0001$).

Anche la salinità 16 PSU ($n=10$) ha indotto una diminuzione significativa della concentrazione dei cloruri ($P<0,05$), passando da un valore iniziale di $9,31 \pm 0,28$ es mmol L^{-1} , a $8,27 \pm 0,26$ es mmol L^{-1} dopo 3h e a $7,41 \pm 0,37$ es mmol L^{-1} a 24h. Come nel caso precedente anche qui la media a 24h è significativamente diversa da quella ottenuta allo medesimo tempo nel controllo ($P=0,042$).

Come nei casi precedenti anche a 26 PSU ($n=10$), i cloruri sono diminuiti (Appendice, tavola 1G; fig. 2G); le medie sono risultate significativamente diverse dal tempo 0h a tutti i tempi ($P<0,05$), ma non dal gruppo di controllo ($P>0,05$).

A differenza degli altri gruppi sperimentali dopo il passaggio da 36 a 46 PSU ($n=10$) la concentrazione dei cloruri, inizialmente di $8,82 \pm 0,22$ es mmol L^{-1} , aumenta passando a $9,59 \pm 0,22$ es mmol L^{-1} e $10,16 \pm 0,22$ es mmol L^{-1} (3 e 24h rispettivamente) valori che sono significativamente diversi sia dal tempo 0h ($P=0,048$ e $P=0,004$) che dal gruppo di controllo ($P=0,0001$) (Appendice, tavola 1G; fig. 2G).

3.1.2.8 Calcio

A 36 PSU la media del calcio a 0h è di $13,11 \pm 0,66$ es mmol L^{-1} (n=10) valore che diminuisce fino alla concentrazione di $12,35 \pm 0,61$ es mmol L^{-1} al tempo 3h ($P>0,05$), si verifica poi un successivo lieve aumento fino a $14,51 \pm 0,55$ es mmol L^{-1} a 24h ($P>0,05$).

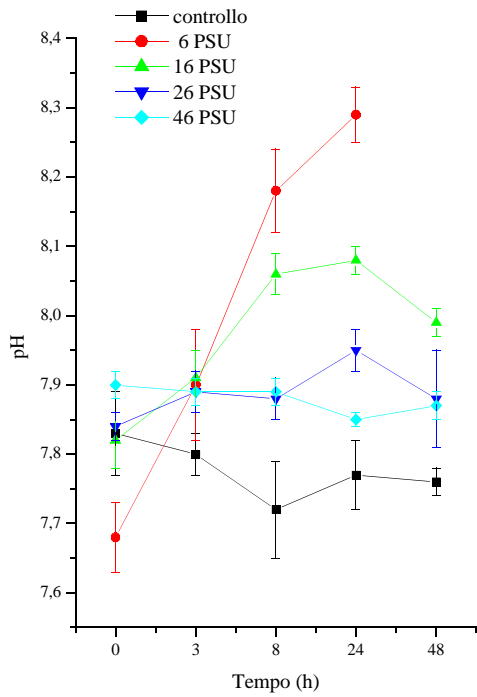
La concentrazione iniziale in granchi poi esposti a 6 PSU è $13,04 \pm 0,40$ es mmol L^{-1} . Durante l'esperimento la concentrazione diminuisce entro le prime 3h ($12,56 \pm 0,55$ es mmol L^{-1} ; $P>0,05$) e poi fino a $4,51 \pm 0,13$ es mmol L^{-1} dopo 24h di esposizione ($P=0,0001$ rispetto al tempo 0h e $P=0,0001$ rispetto al controllo).

Anche a 16 PSU la concentrazione del calcio, inizialmente di $13,03 \pm 0,95$ es mmol L^{-1} , diminuisce nell'arco delle 24h quando il valore ($9,64 \pm 0,54$ es mmol L^{-1}) è risultato significativamente diverso sia dal tempo 0h ($P=0,010$) che allo stesso tempo nel gruppo di controllo ($P=0,0001$).

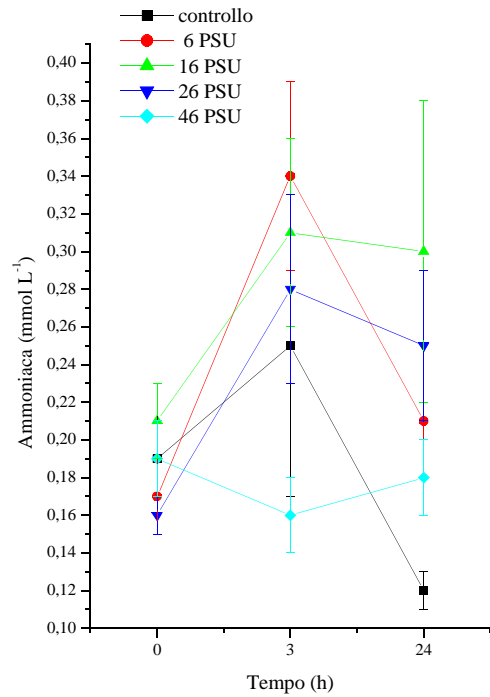
La salinità 26 PSU induce ancora (fig. 2H), una progressiva diminuzione della concentrazione del calcio (n=10). Solo il valore a 24h ($11,49 \pm 0,74$ es mmol L^{-1}) è stato significativamente diverso sia dal tempo 0h ($P=0,019$) che dal gruppo di controllo ($P=0,005$).

A 46 PSU si è osservato invece un graduale aumento nella concentrazione del calcio. Infatti dopo 3h la concentrazione è passata da $13,79 \pm 0,31$ es mmol L^{-1} a $14,80 \pm 0,28$ es mmol L^{-1} ($P=0,029$) e dopo 24h a $16,04 \pm 0,42$ es mmol L^{-1} ($P=0,001$). Ad entrambi i tempi i valori sono significativamente diversi da quelli del gruppo di controllo ($P<0,05$) (Appendice, tavola 1H; figura 2H).

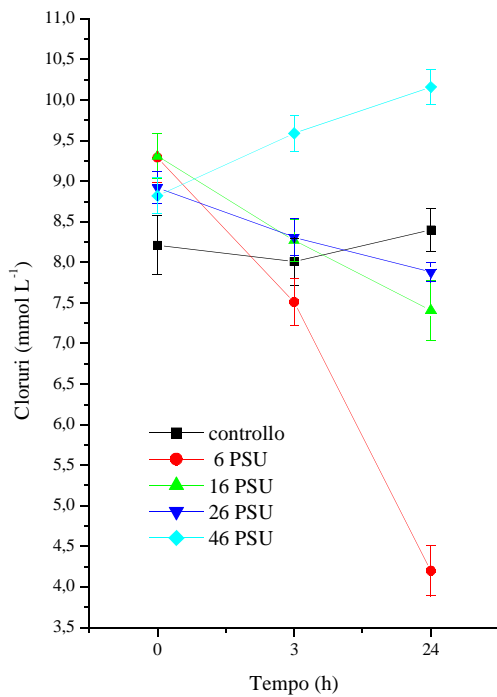
Riassumendo i dati fin qui presentati, durante lo stress osmotico acuto in *C. aestuarii* si sono osservate alterazioni delle risposte fisiologiche legate soprattutto al metabolismo degli zuccheri, alle proteine, all'ammoniaca e al pH dell'emolinfa. Negli stress iposalini, le maggiori variazioni di questi parametri si sono osservate durante l'esposizione a 6 PSU e sono diminuite di intensità a 16 e 26 PSU, ovvero man mano che ci si avvicinava alla salinità di controllo di 36 PSU. Durante lo stress ipersalino (46 PSU) gli andamenti della glicemia, della latticemia, della densità dell'emolinfa e dell'ammoniaca non sono concordi con quelli osservati per le altre salinità sperimentali: quando infatti per le altre salinità si sono osservati aumenti dei parametri, per questa si sono registrate loro diminuzioni e viceversa.



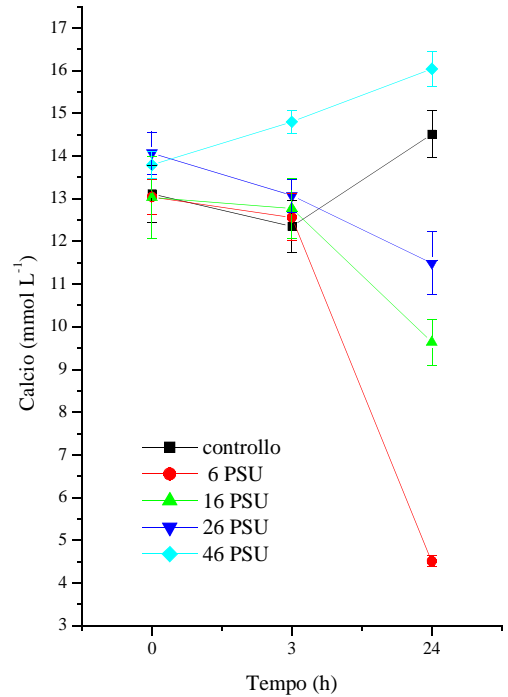
E



F



G



H

Figura 2: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *C. aestuarii* esposto direttamente alle diverse salinità.

3.1.3 Esposizione graduale e adattamento: salinità

Vengono di seguito descritti i dati ottenuti dagli esperimenti con i granchi esposti gradualmente ed adattati a diverse salinità.

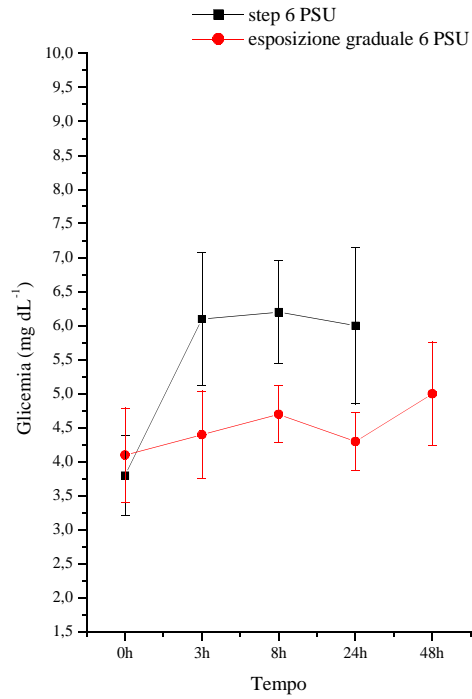
3.1.3.1 Glicemia

Quattro gruppi di granchi sono stati trasferiti a salinità 6, 16, 26 e 46 PSU, partendo da quella di controllo (36 PSU).

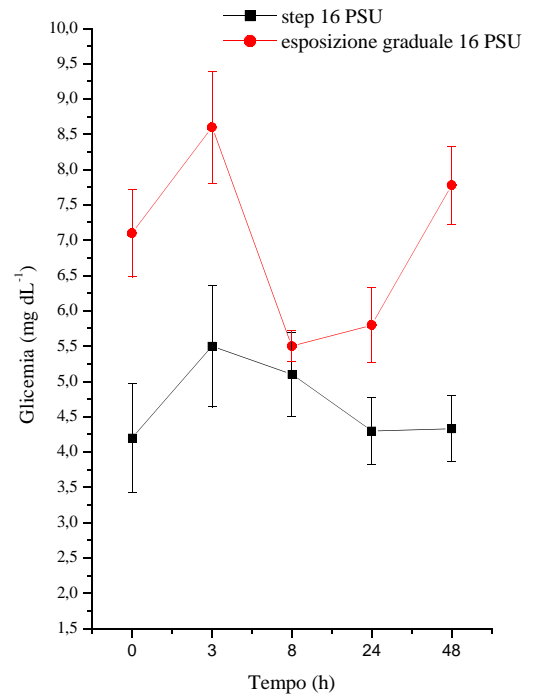
Nel gruppo (n=10) esposto gradualmente a 6 PSU la glicemia al tempo 0h è stata $4,10 \pm 0,69$ es mg dL⁻¹, non significativamente diversa rispetto a quella misurata allo stesso tempo nei granchi esposti direttamente alla medesima salinità (P>0,05). Il glucosio emolinfatico in questo gruppo cresce nell'arco delle 48h fino a $5,00 \pm 0,76$ es mg dL⁻¹; le medie ottenute ai tempi 3, 8, 24, 48h non sono mai state però significativamente diverse né rispetto al tempo 0h né rispetto a quelle ottenute agli stessi tempi nel gruppo sperimentale che ha subito uno step a 6 PSU (P>0,05) (Appendice, tavola 2A; figura 3A). Dopo 14d di esposizione alla salinità 6 PSU la glicemia nei granchi è $4,75 \pm 1,03$ es mg dL⁻¹, non significativamente diversa dal controllo, rappresentato dalla media di glucosio circolante nell'emolinfa di tutti i granchi stabulati ed in seguito utilizzati negli esperimenti di esposizione diretta (n=50) alle diverse salinità ($4,08 \pm 0,26$ es mg dL⁻¹, P>0,05) (Appendice, tavola 2A; figura 3E).

In seguito al passaggio a 16 PSU la glicemia a 0h, di $7,10 \pm 0,62$ es mg dL⁻¹ (n=10), è significativamente più elevata che nel gruppo esposto direttamente alla stessa salinità (P=0,009). A 3h il glucosio mostra un picco significativo (P<0,05) sia rispetto al tempo 0h che allo stesso tempo nel gruppo che ha subito lo step alla salinità 16 PSU, in seguito tende a diminuire fino a 24h (P>0,05). Dopo 48h di esposizione la glicemia ($7,78 \pm 0,65$ es mg dL⁻¹ P>0,05 vs 0h) è significativamente diversa dallo stesso tempo nel gruppo utilizzato durante gli step e servito come confronto (P=0,0001). Dopo due settimane di mantenimento a questa salinità la glicemia di $5,20 \pm 1,02$ es mg dL⁻¹ non è significativamente diversa né dal tempo 0h né dalla glicemia media nei granchi utilizzati ai tempi 0h durante gli esperimenti di step (Appendice, tavola 2A; figure 3B e 3E).

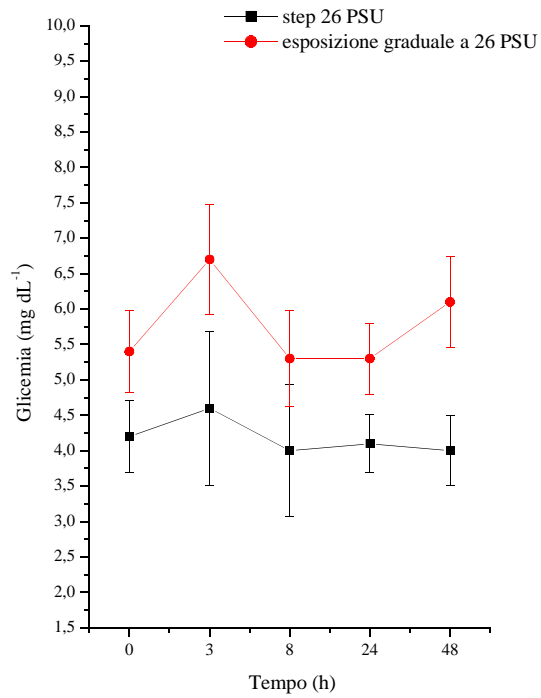
Il raggiungimento della salinità 26 PSU (n=10) non ha indotto variazioni significative nella concentrazione di glucosio né rispetto al tempo 0h né al relativo gruppo esposto direttamente alla medesima salinità (P>0,05). Solo il valore misurato a 48h ($6,10 \pm 0,64$ es mg dL⁻¹) è risultato significativamente più elevato rispetto a



A

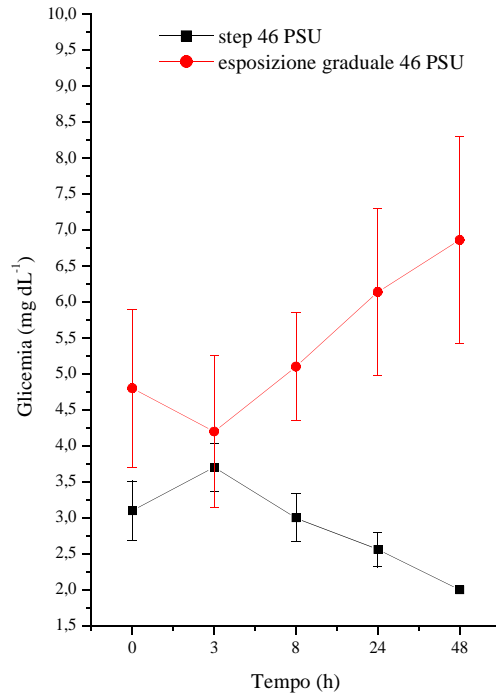


B



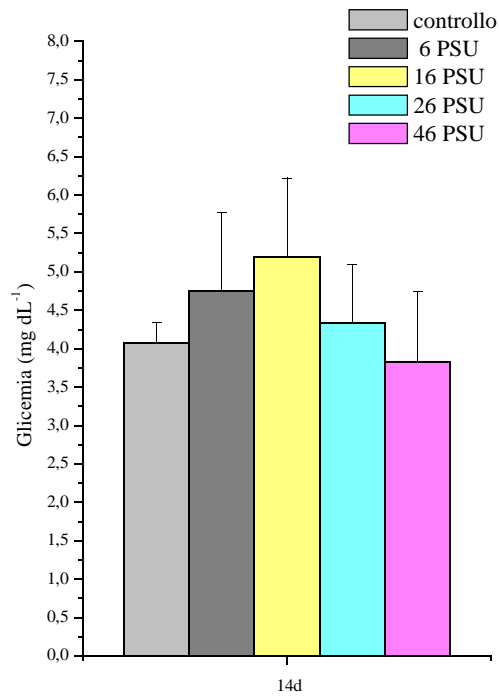
C

Figura 3: confronto dell'andamento nel tempo della glicemia in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



D

Figura 3: confronto dell'andamento nel tempo della glicemia in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



E

Figura 3: medie di glicemia in *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse salinità

quello misurato nel gruppo che ha subito esposizione diretta ($P=0,019$). A 14d la glicemia non è significativamente ($P>0,05$) dal gruppo di controllo (tempi 0h esperimenti di esposizione diretta) (Appendice, tavola 2A; figure 3C e 3E).

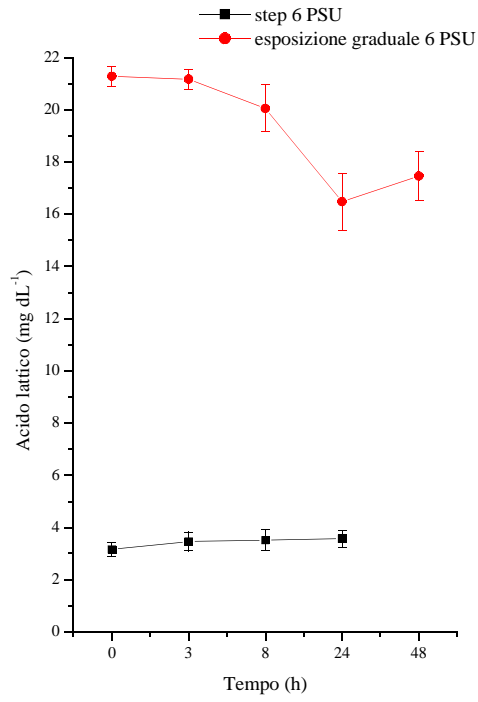
Al tempo 0h nel gruppo di granchi che ha subito un graduale aumento della salinità fino a 46 PSU ($n=10$) la concentrazione di glucosio circolante nell'emolinfa è stata $4,80 \pm 2,10$ es mg dL⁻¹. Nel corso dell'esperimento, fino al tempo 48h la glicemia è aumentata progressivamente; le medie ottenute ai diversi tempi non sono mai state significativamente diverse rispetto al tempo 0h ($P>0,05$), mentre ai tempi 8, 24 e 48h lo sono state rispetto al gruppo di granchi esposti direttamente alla stessa salinità ($P<0,05$) (Appendice, tavola 2A; figura 3D). Anche in questo caso a 14d la glicemia non mostra variazioni significative ($P>0,05$) (Appendice, tavola 2A; figura 3E).

3.1.3.2 Acido lattico

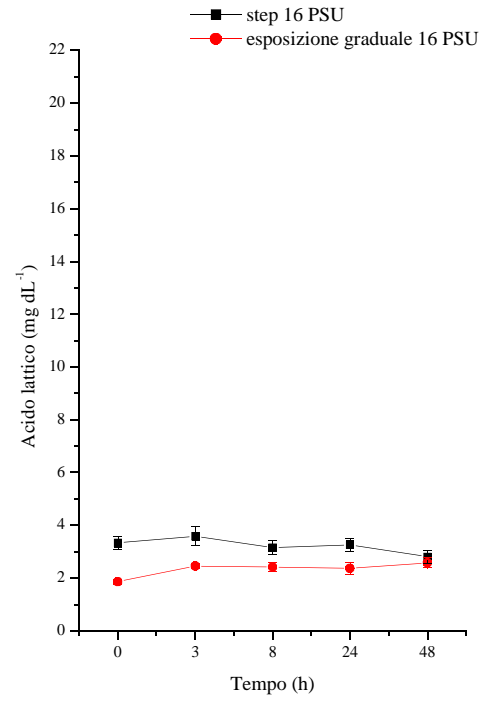
I grafici in figura 4 mostrano l'andamento nel tempo dell'acido lattico nell'emolinfa durante le esposizioni graduali alle diverse salinità.

L'esposizione graduale alla salinità 6 PSU (fig. 4A) determina un aumento di acido lattico fino a $21,28 \pm 0,37$ es mg dL⁻¹ ($n=10$), valore significativamente diverso da quello allo stesso tempo nel gruppo esposto direttamente ($P=0,0001$). Durante il corso dell'esperimento l'acido lattico, pur mantenendosi significativamente più alto rispetto al gruppo di granchi esposto direttamente a 6 PSU ($P=0,0001$ a tutti i tempi), diminuisce nell'arco delle 48h e i dati ottenuti a 24 e 48h (rispettivamente $16,48 \pm 1,09$ es mg dL⁻¹ e $17,46 \pm 0,94$ es mg dL⁻¹) sono significativamente diverse dal tempo 0h ($P>0,05$). Dopo 14d l'acido lattico è significativamente diverso da quello medio nei granchi utilizzati al tempo 0h ($n=50$) durante gli step di salinità ($3,27 \pm 0,12$ es mg dL⁻¹, $P=0,001$) (Appendice, tavola 2B; figura 4E).

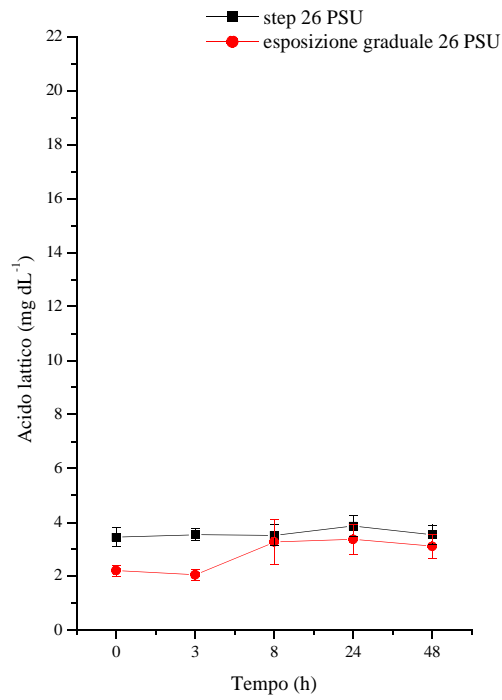
In seguito al passaggio da 36 a 16 PSU la concentrazione di acido lattico a 0h è stata di $1,86 \pm 0,11$ es mg dL⁻¹ ($n=10$) inferiore a quella misurata allo stesso tempo nel gruppo esposto direttamente alla medesima salinità ($P=0,0001$). Nell'arco delle 24h successive l'acido lattico circolante, aumenta rispetto al tempo 0h ($P<0,05$) ma rimane significativamente più basso rispetto al gruppo esposto direttamente a 16 PSU ($P<0,05$). A 48h la media ottenuta ($2,58 \pm 0,19$ es mg dL⁻¹) non risulta significativamente diversa né dal tempo 0h né rispetto allo stesso tempo nel gruppo di confronto ($P>0,05$) (Appendice, tavola 2B; figura 4B). Dopo 14d l'acido lattico, non è significativamente diverso dal tempo 0h ($P>0,05$) ma lo è rispetto alla media di



A

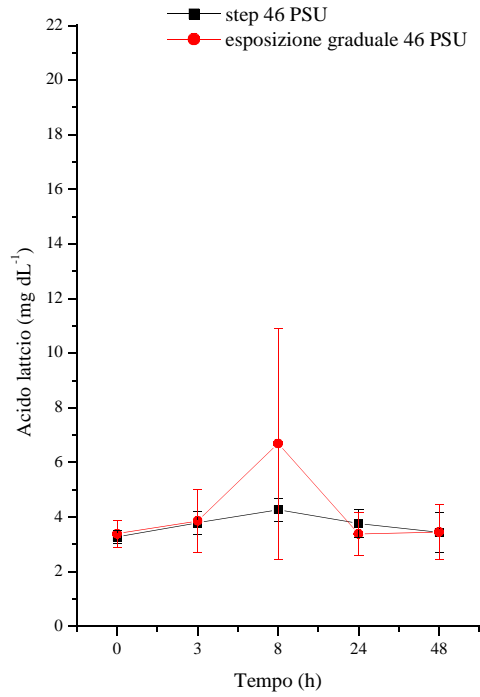


B



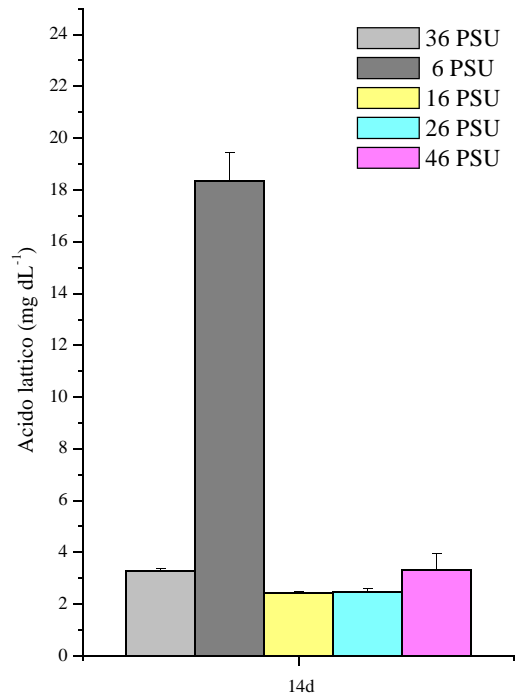
C

Figura 4: confronto dell'andamento nel tempo dell'acido lattico in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



D

Figura 4: confronto dell'andamento nel tempo dell'acido lattico in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



E

Figura 4: medie di acido lattico in *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse salinità.

controllo (n=50, $3,27 \pm 0,12$ es mg dL⁻¹, P=0,0001) (Appendice, tavola 2B; figura 4E).

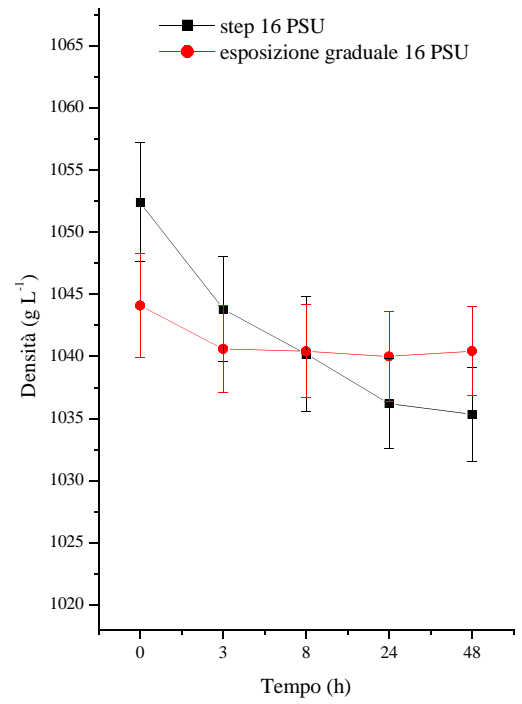
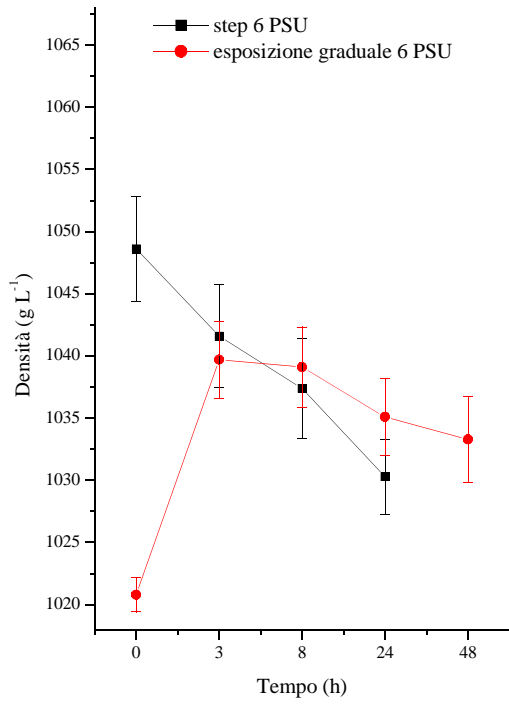
Al tempo 0h, dopo un periodo di esposizione graduale a salinità modificata fino a 26 PSU, la concentrazione di acido lattico è stata di $2,21 \pm 0,21$ es mg dL⁻¹ (P=0,010 vs 0h del gruppo esposto direttamente a 26 PSU). Come rappresentato nel grafico in figura 4C, durante l'arco di tutto l'esperimento fino al tempo 48h questo metabolita non ha subito variazioni significative rispetto al tempo 0h (P>0,05), e non è significativamente diverso dal gruppo esposto direttamente alla medesima salinità (P>0,05). Dopo 14d, l'acido lattico pari a $2,47 \pm 0,15$ es mg dL⁻¹ è significativamente più basso rispetto alla media di controllo ($3,27 \pm 0,12$ es mg dL⁻¹, P=0,001) (Appendice, tavola 2B; figura 4E).

L'esposizione graduale fino a 46 PSU e l'adattamento fino a 14d non ha determinato variazioni significative della concentrazione di acido lattico né rispetto al tempo 0h né rispetto al gruppo che ha subito esposizione diretta alla stessa salinità (P>0,05) (Appendice, tavola 2B; grafici in figure 4D e 4E).

3.1.3.3 Densità

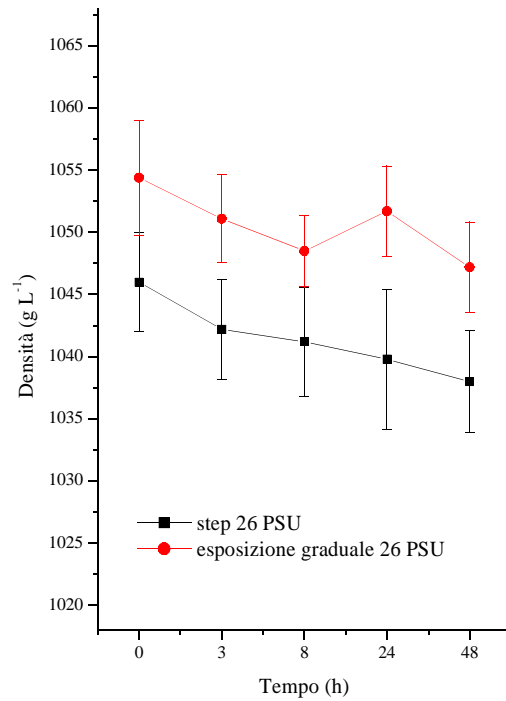
Il passaggio graduale alla salinità di 6 PSU ha indotto nei granchi (n=10) una diminuzione della densità dell'emolinfa fino a $1020,80 \pm 1,37$ es g L⁻¹ (0h), significativamente diverso rispetto a quello del gruppo esposto direttamente alla stessa salinità (P=0,0001). Il grafico in figura 5A mostra come dopo un immediato aumento a 3h ($1039,70 \pm 3,08$ es g L⁻¹, P=0,0001 vs tempo 0h), la densità dell'emolinfa è progressivamente diminuita nell'arco di tutto l'esperimento. Le medie ottenute fino a 48h sono sempre state superiori rispetto al tempo 0h (P<0,05) ma non significativamente diverse da quelle del gruppo esposto direttamente a 6 PSU (P>0,05) (Appendice, tavola 2C; figura 5A). Dopo 14d di esposizione la media di $1028,75 \pm 4,68$ es g L⁻¹ è significativamente inferiore rispetto al controllo, rappresentato dai granchi utilizzati al tempo 0h (n=50) durante gli esperimenti di esposizione diretta ($1048,30 \pm 1,72$ es g L⁻¹, P=0,018) (Appendice, tavola 2C; figura 5E).

La densità dell'emolinfa iniziale in *C. aestuarii* (n=10) dopo il passaggio graduale da 36 a 16 PSU è stata $1044,10 \pm 4,16$ es g L⁻¹ (fig. 5B). Ai tempi successivi si è avuta una progressiva diminuzione della densità mai significativamente diversa rispetto a quelle misurata, ai medesimi tempi, nei granchi esposti direttamente a questa salinità (P>0,05). Tuttavia a 24 e 48h, la densità è inferiore rispetto al tempo 0h (P<0,05).



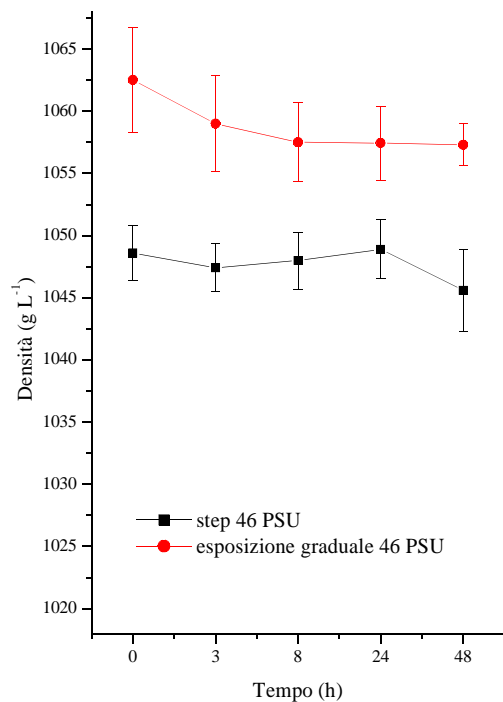
A

B



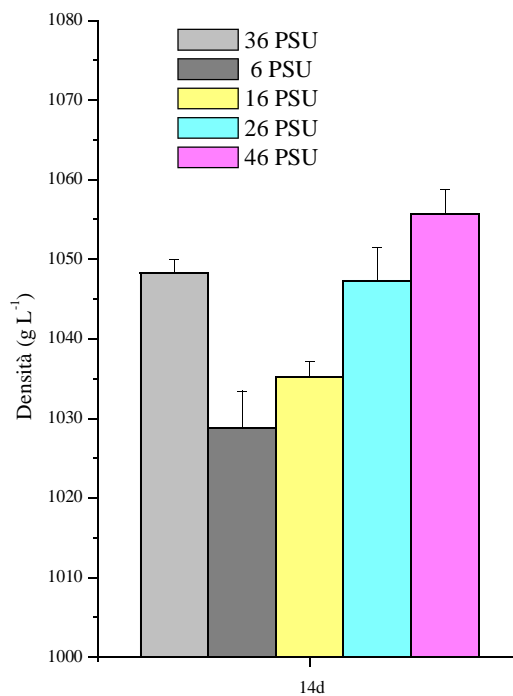
C

Figura 5: confronto dell'andamento nel tempo della densità dell'emolinfa in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



D

Figura 5: confronto dell'andamento nel tempo della densità dell'emolinfa in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



E

Figura 5: andamento della densità dell'emolinfa in *C. aestuarii* esposti gradualmente alle diverse salinità.

Dopo due settimane di permanenza a 16 PSU la densità di $1035,20 \pm 1,96$ es g L⁻¹ è significativamente diversa da quella dell'emolinfa dei granchi (n=50) mantenuti a 36 PSU e utilizzati al tempo 0h negli step (P=0,0001) (Appendice, tavola 2C; figura 5E).

A 26 PSU la densità dell'emolinfa dei granchi (n=10) al tempo 0h è stata $1054,40 \pm 4,62$ es g L⁻¹, non significativamente diversa rispetto al gruppo esposto direttamente alla stessa salinità (P>0,05). A tutti i tempi successivi la densità non è risultata significativamente diversa né dal tempo 0h né dal gruppo che ha subito esposizione diretta (P>0,05) (Appendice, tavola 2C; figure 5C e 5E).

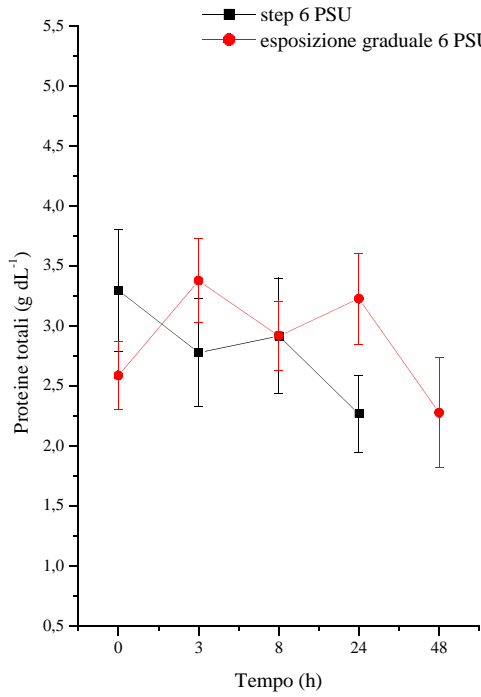
In seguito al passaggio graduale da 36 a 46 PSU la densità dell'emolinfa a 0h ($1062,50 \pm 4,23$ es g L⁻¹; n=10) è significativamente più alta rispetto a quella osservata al medesimo tempo nei granchi esposti direttamente a 46 PSU (P=0,012). Nell'arco delle ore successive la densità diminuisce e le medie ottenute ai diversi tempi sono significativamente diverse (P<0,05) sia dal tempo 0h che dal gruppo esposto direttamente a 46 PSU. (Appendice, tavola 2C; figura 5D). Dopo due settimane di mantenimento a questa salinità, la densità ($1055,67 \pm 3,07$ es g L⁻¹) non risulta essere significativamente diversa dal controllo ($1048,30 \pm 1,72$ es g L⁻¹, P=0,068) (Appendice, tavola 2C; figura 5E).

3.1.3.4 Proteine

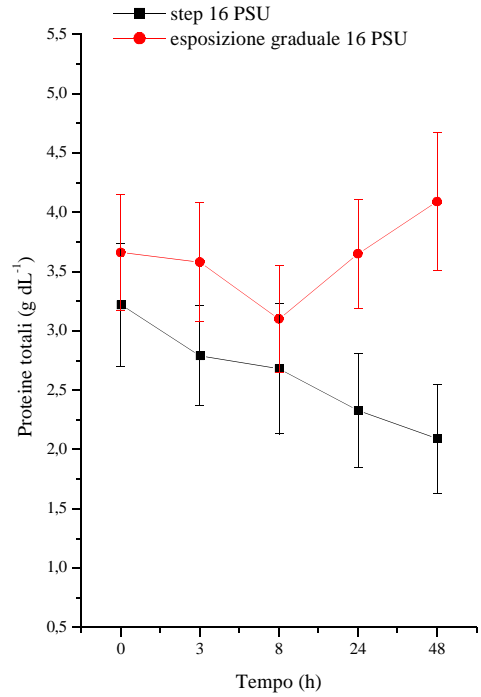
Il grafico in figura 6A mostra l'andamento delle proteine totali nell'emolinfa dei granchi trasferiti gradualmente da 36 a 6 PSU (n=10). La concentrazione iniziale è $2,59 \pm 0,28$ es g dL⁻¹ e successivamente non si evidenziano variazioni significative né rispetto al tempo 0h né al gruppo esposto direttamente a 6 PSU (P>0,05) (Appendice, tavola 2D).

A 16 PSU (fig. 6B) la concentrazione delle proteine a 0h è stata $3,66 \pm 0,49$ g dL⁻¹ (n=10) e successivamente solo al tempo 48h ($4,09 \pm 0,58$ es g dL⁻¹) sono risultate significativamente maggiori (P=0,016) rispetto al valore, allo stesso tempo, nel gruppo che ha subito il passaggio diretto alla stessa salinità. A 14d la concentrazione delle proteine totali è stata di $3,00 \pm 0,28$ es g dL⁻¹, non significativamente diversa dalla loro concentrazione media nell'emolinfa nei granchi (n=50) stabulati per lo stesso tempo a 36 PSU ($2,82 \pm 0,21$ es g dL⁻¹, P>0,05).

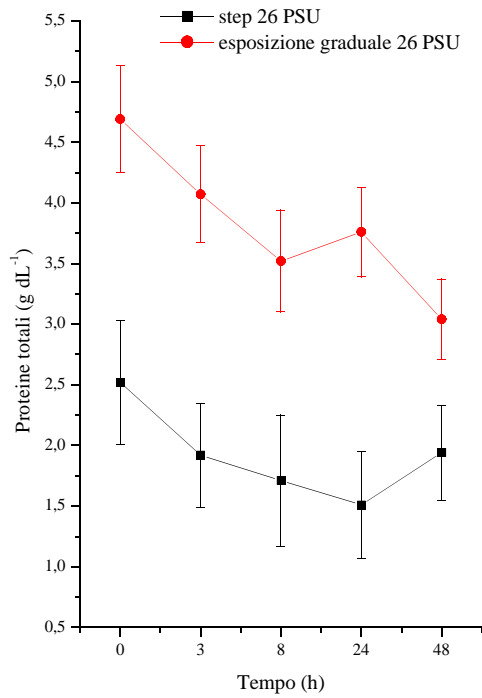
In seguito al passaggio graduale a 26 PSU le proteine totali nell'emolinfa sono diminuite progressivamente (fig. 6C); a tutti i tempi i valori medi sono risultati significativamente diversi sia dal tempo 0h, che dal gruppo trasferito senza passaggi



A

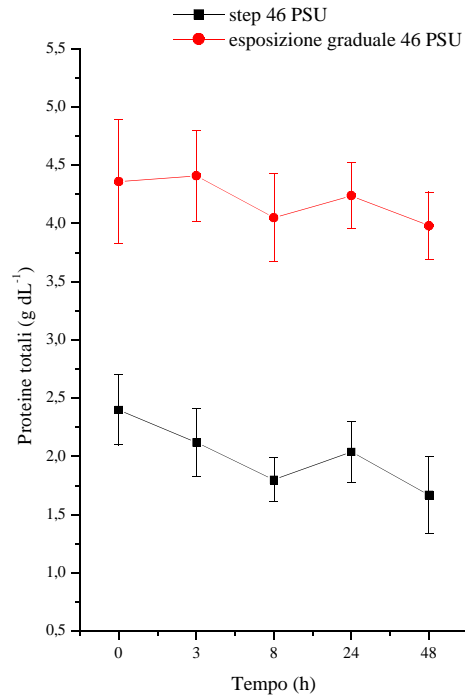


B



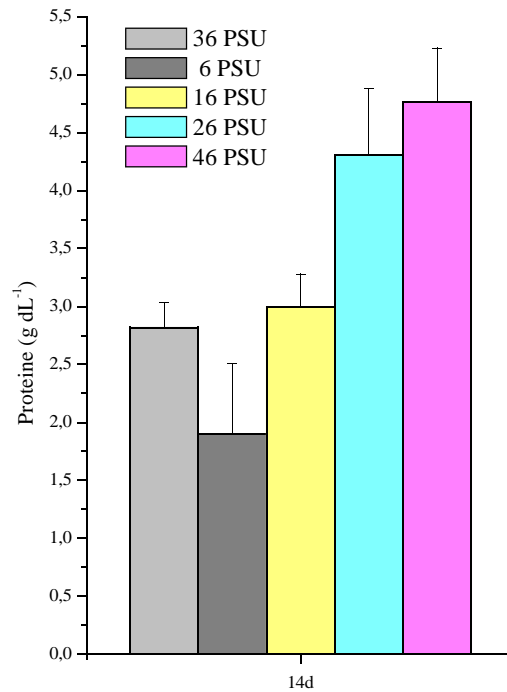
C

Figura 6: confronto dell'andamento nel tempo delle proteine totali dell'emolinfa in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



D

Figura 6: confronto dell'andamento nel tempo delle proteine totali dell'emolinfia in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



E

Figura 6: proteine totali nell'emolinfia di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse salinità.

intermedi a questa salinità ($P < 0,05$); anche durante l'adattamento di due settimane a questa salinità la media è significativamente diversa dal controllo rappresentato dai granchi ($n=50$) utilizzati al tempo 0h negli esperimenti di esposizione diretta (Appendice, tavola 2D, figura 6E).

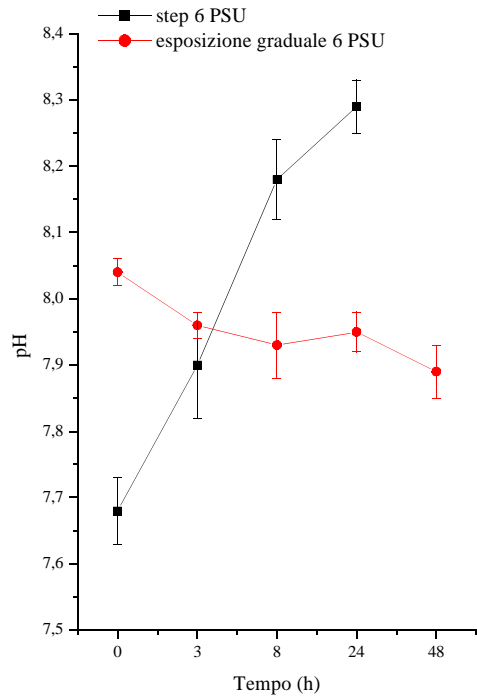
Nei granchi ($n=10$) trasferiti progressivamente a 46 PSU le proteine totali emolinfatice sono state $4,36 \pm 0,53$ es g dL^{-1} . Fino a 48h le proteine diminuiscono in maniera non significativa rispetto al tempo 0h ($P > 0,05$) ma le medie ottenute sono sempre state significativamente maggiori rispetto ai valori nel gruppo utilizzato nello step a 46 PSU ($P < 0,05$). Dopo due settimane di adattamento le proteine ($4,76 \pm 0,47$ es g dL^{-1}) sono significativamente più alte rispetto al gruppo di controllo ($n=50$, $2,82 \pm 0,21$ es g dL^{-1} , $P=0,007$) (Appendice, tavola 2D; figure 6D e 6E).

3.1.3.5 pH

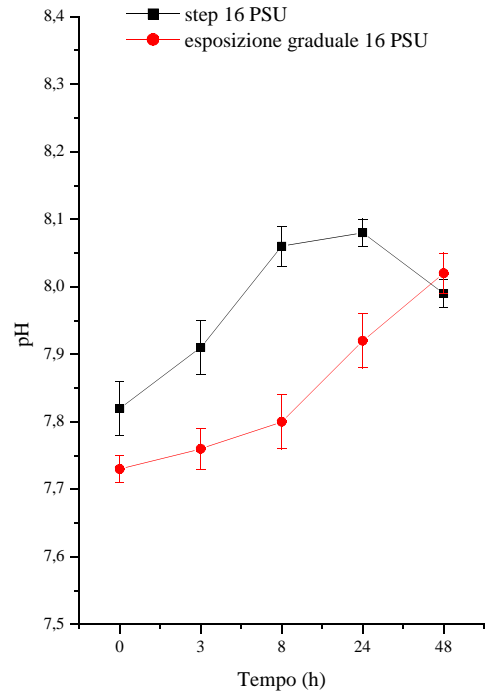
Il pH iniziale dell'emolinfa dei granchi trasferiti gradualmente da 36 a 6 PSU è stato di $8,04 \pm 0,02$ es, significativamente superiore a quello del gruppo esposto direttamente alla stessa salinità ($P=0,0001$). Le medie ottenute ai tempi successivi non sono state significativamente diverse dal tempo 0h ($P > 0,05$), e solo quelle ottenute a 8 e 24h sono significativamente diverse da quelle del gruppo utilizzato nello step a 6 PSU ($P < 0,05$). Dal grafico in figura 2E si può vedere che dopo 14d di adattamento il pH è sceso a $7,92 \pm 0,10$ es e non è significativamente diverso dalla media ottenuta nei granchi utilizzati ai tempi 0h negli esperimenti di step, e serviti da controllo ($n=50$, $7,81 \pm 0,02$ es, $P > 0,05$) (Appendice 2E; figure 7A e 7E).

Passando a 16 PSU (fig. 7B) il pH dell'emolinfa ($7,73 \pm 0,02$ es; $n=10$) non è significativamente diverso da quello dei granchi utilizzati nello step a questa salinità ($P > 0,05$). Nel corso delle 48h successive il pH aumenta gradualmente e a 24 e 48h è significativamente diverso dal tempo 0h ($P < 0,05$). Dal confronto con il gruppo esposto direttamente a 16 PSU è significativo il pH ai tempi 3, 8 e 24h ($P < 0,05$). A 14d il pH, di $7,72 \pm 0,02$ es, è significativamente diverso dal controllo ($n=50$, $7,81 \pm 0,02$ es, $P=0,002$) (Appendice, tavola 2E; figura 7E).

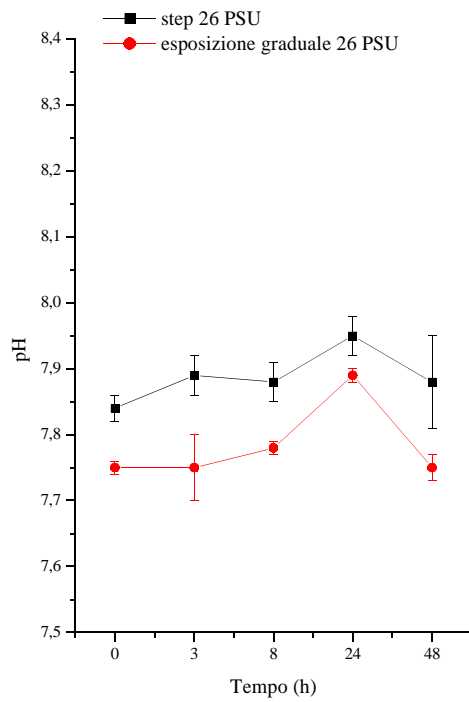
Nel passaggio graduale da 36 a 26 PSU ($n=10$), il pH dell'emolinfa al tempo 0h è $7,75 \pm 0,01$ es ($P=0,001$ vs step a 26 PSU). Nell'arco delle ore successive il pH aumenta gradualmente fino al picco massimo ottenuto a 24h significativo rispetto al tempo 0h ($P=0,0001$) (fig. 2C), ma non dal gruppo esposto direttamente alla stessa salinità ($P > 0,05$). Dopo due settimane di adattamento (fig. 7E) il pH non è significativamente diverso dal controllo ($n=50$, $7,81 \pm 0,02$ es, $P > 0,05$).



A

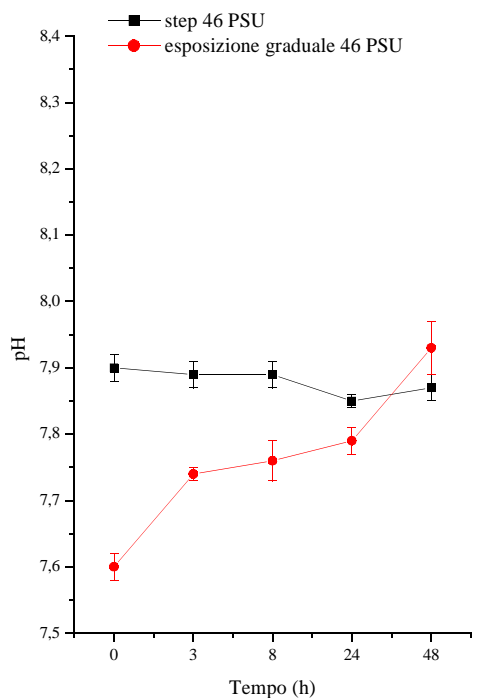


B



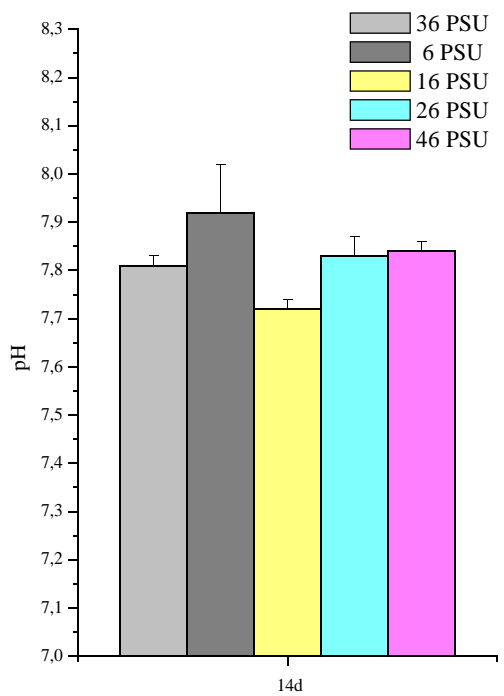
C

Figura 7: confronto dell'andamento nel tempo del pH dell'emolinfa in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



D

Figura 7: confronto dell'andamento nel tempo del pH dell'emolfinfa in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



E

Figura 7: pH dell'emolfinfa di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse salinità.

Il passaggio graduale di *C. aestuarii* (n=10) alla salinità 46 PSU induce un progressivo aumento del pH dell'emolinfa che risulta a tutti i prelievi significativamente diverso sia dal valore a 0h che dal gruppo trasferito direttamente da 36 a 46 PSU ($P < 0,05$). A 14d il pH ($7,74 \pm 0,02$ es) non è significativamente diverso dal controllo ($P > 0,05$) (Appendice 2E; figure 7D e 7E).

3.1.3.6 Ammoniaca

Per ogni gruppo sperimentale esposto gradualmente alle diverse salinità, è stata valutata l'ammoniemia in cinque granchi (fig. 8).

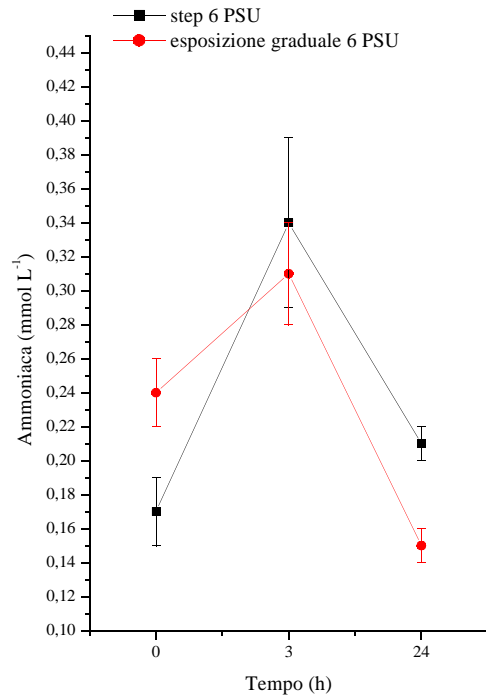
Al tempo 0h la media della concentrazione dell'ammoniaca nell'emolinfa dei granchi trasferiti gradualmente da 36 a 6 PSU è $0,24 \pm 0,02$ es mmol L^{-1} , valore superiore ($P < 0,05$) di quello allo stesso tempo del gruppo esposto direttamente alla stessa salinità. Il picco ottenuto a 3h ($0,31 \pm 0,03$ es mmol L^{-1}) è significativamente diverso dal valore a 0h ($P = 0,003$), ma non da quello del gruppo utilizzato nello step ($P > 0,05$). Al tempo successivo e dopo il periodo di adattamento, l'ammoniemia non è significativamente diversa dai dati utilizzati come confronto ($P > 0,05$) (Appendice 2F; figure 8A e 8E).

L'esposizione graduale a 16 PSU non ha determinato variazioni significative (vs 0h) della concentrazione di ammoniaca nell'arco delle 24h ($P > 0,05$); i dati inoltre non sono risultati significativamente diversi ($P > 0,05$) neanche dal gruppo che ha subito lo step da 36 a 16 PSU. Dopo 14d di adattamento alla salinità definitiva, l'ammoniaca, di $0,36 \pm 0,06$ es mmol L^{-1} , è significativamente più alta rispetto al controllo, rappresentato dai granchi stabulati (n=25) per due settimane e utilizzati come tempo 0h negli esperimenti di step ($0,19 \pm 0,01$ es mmol L^{-1} $P = 0,043$) (Appendice 2E; figure 8B e 8E).

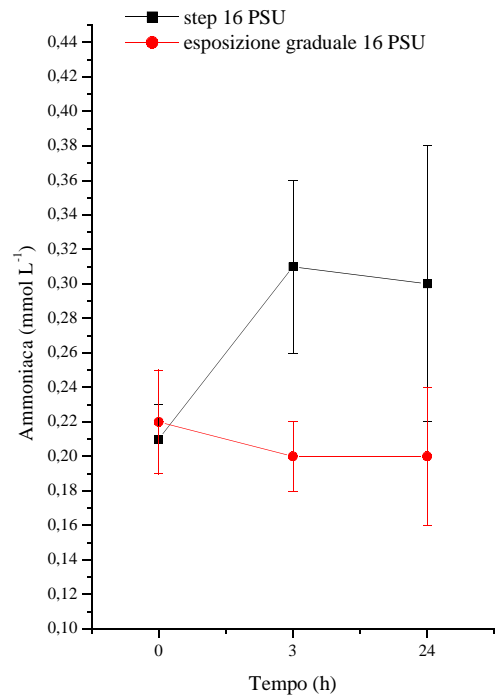
Il progressivo trasferimento di *C. aestuarii* alle salinità 26 e 46 PSU non ha determinato variazioni significative ($P > 0,05$) nell'ammoniemia né in seguito al confronto con il rispettivo tempo 0h né da quello con i gruppi trasferiti direttamente alle stesse salinità (Appendice 2E; figure 8C, 8D e 8E).

3.1.3.7 Cloruri

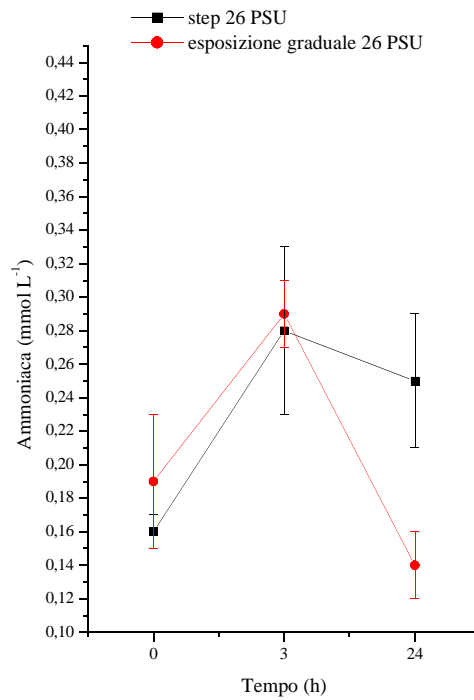
La concentrazione iniziale dei cloruri nell'emolinfa dei granchi (n=10) utilizzati nel trasferimento graduale da 36 a 6 PSU è stata $8,28 \pm 0,34$ es mmol L^{-1} valore significativamente ($P = 0,041$) più basso rispetto a quello iniziale del gruppo esposto direttamente alla stessa salinità. come rappresentato nel grafico in figura 9A, nell'arco delle 24h successive si è osservata una significativa diminuzione dei cloruri



A

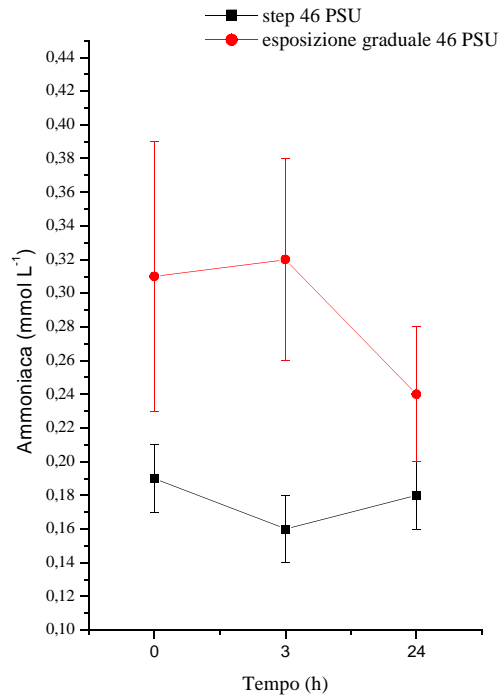


B



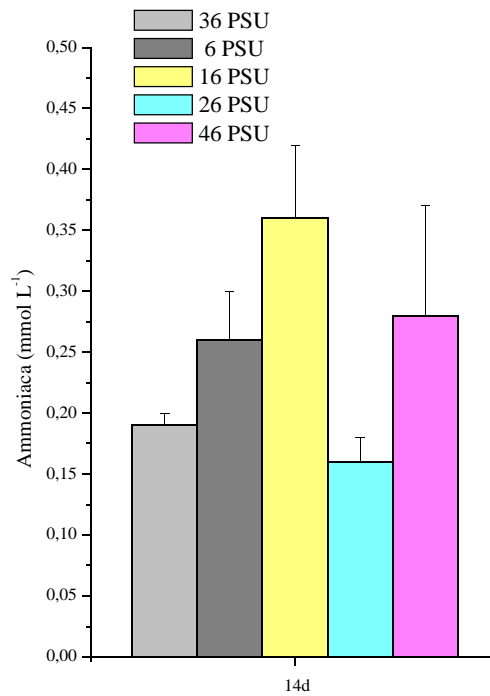
C

Figura 8: confronto dell'andamento nel tempo della concentrazione dell'ammoniaca nell'emolinfa di *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



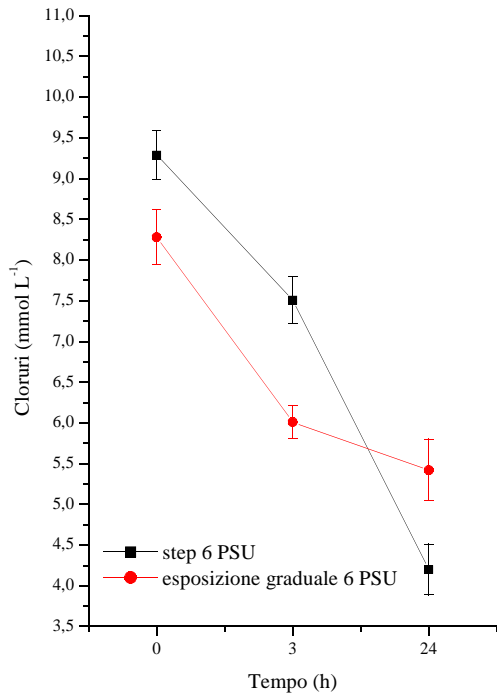
D

Figura 8: confronto dell'andamento nel tempo della concentrazione dell'ammoniaca nell'emolinfa di *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.

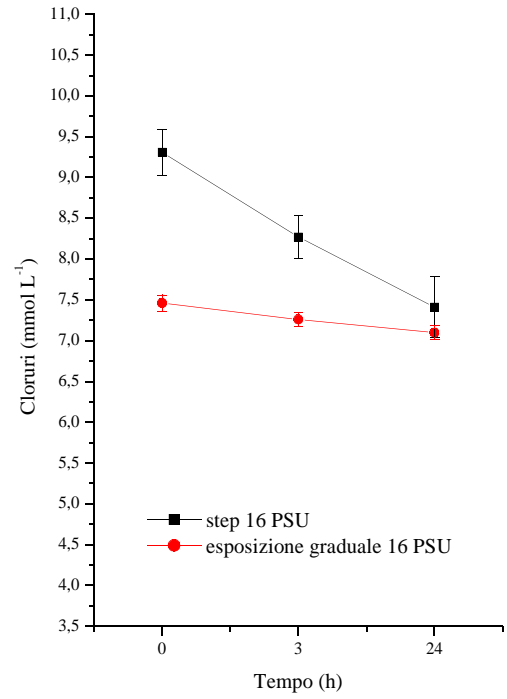


E

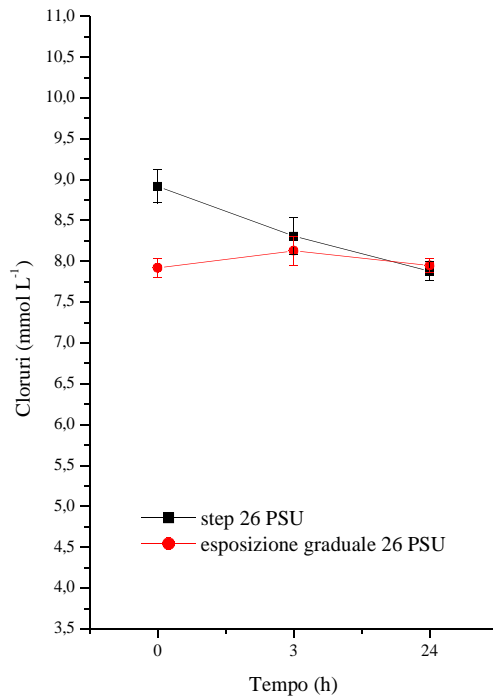
Figura 8: concentrazione di ammoniaca nell'emolinfa di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse salinità.



A

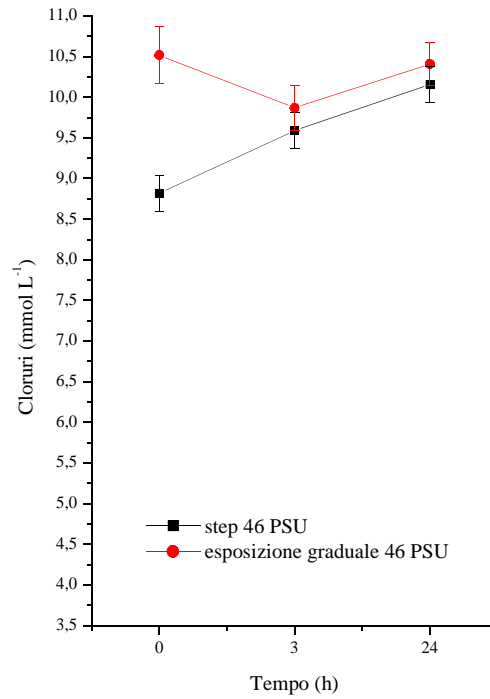


B



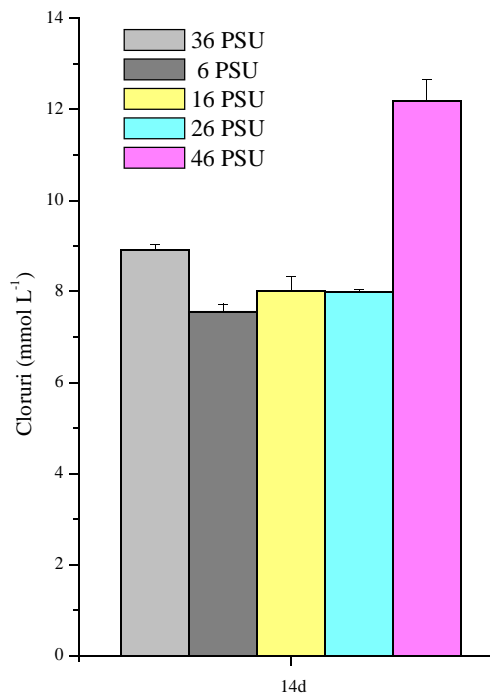
C

Figura 9: confronto dell'andamento nel tempo della concentrazione dei cloruri nell'emolinfa di *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



D

Figura 9: confronto dell'andamento nel tempo della concentrazione dei cloruri nell'emolifina di *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



E

Figura 9: concentrazione dei cloruri nell'emolifina di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse salinità.

sia rispetto al tempo 0h che al gruppo utilizzato nello step a 6 PSU ($P < 0,05$). Dopo 14d di mantenimento a questa salinità, i cloruri nell'emolinfa ($7,56 \pm 0,25$ es mmoL L^{-1}) dei granchi diminuiscono in maniera non significativa ($P > 0,05$) rispetto a quelli misurati nell'emolinfa dei granchi utilizzati ai tempi 0h ($n=50$) negli step ($8,91 \pm 0,13$ es mmoL L^{-1}) (Appendice 2G; figura 9E).

Dopo il passaggio graduale da 36 a 16 PSU la concentrazione dei cloruri nell'emolinfa a 0h è di $7,46 \pm 0,10$ es mmoL L^{-1} ($P=0,0001$ vs tempo 0h nel gruppo che ha subito step a 16 PSU); a 3h si ha una diminuzione significativa rispetto allo stesso tempo nello step a 16 PSU ($P=0,003$). In seguito al periodo di adattamento i cloruri sono significativamente inferiori rispetto a quelli nei granchi utilizzati come confronto ($n=50$, $P=0,043$) (Appendice 2G; figure 9B e 9E).

La concentrazione iniziale dei cloruri nell'emolinfa degli animali ($n=10$) trasferiti poi gradualmente da 36 a 26 PSU è di $7,92 \pm 0,12$ es mmoL L^{-1} (fig. 9C) significativamente minore a quella rilevata nei granchi utilizzati per lo step alla medesima salinità ($P=0,001$). Ai tempi successivi i cloruri si mantengono circa costanti e non significativamente diversi né dal tempo 0h né dal gruppo utilizzato per lo step ($P > 0,05$). Dopo 14d di esposizione la media è risultata significativamente più bassa dal gruppo utilizzato come controllo e ai tempi 0h negli esperimenti di esposizione diretta alle diverse salinità ($n=50$, $P=0,0001$) (Appendice 2G; figura 9E). Come già descritto per il gruppo precedente, la concentrazione iniziale dei cloruri nell'emolinfa dei granchi di $10,52 \pm 0,35$ es mmoL L^{-1} ($n=10$) trasferiti alla salinità 46 PSU è significativamente inferiore dal tempo 0h del gruppo utilizzato nell'esposizione diretta da 36 a 46 PSU ($P=0,001$). Ai tempi successivi le variazioni di questi elettroliti non sono mai significative ($P > 0,05$). A 14d i cloruri sono significativamente più alti del controllo ($P=0,001$) (Appendice 2G; figure 9D e 9E).

3.1.3.8 Calcio

Nei granchi trasferiti gradualmente da 36 a 6 PSU (fig. 10A) la concentrazione del calcio nell'emolinfa ($n=10$) è sempre stata significativamente diversa dal gruppo che è stato utilizzato nel trasferimento diretto alla stessa salinità ($P < 0,05$). Dal confronto con il valore a 0h ($8,23 \pm 0,21$ es mmoL L^{-1}), è risultato significativamente inferiore quello a 3h ($5,25 \pm 0,26$ es mmoL L^{-1} , $P=0,0001$). Al tempo 14d la concentrazione del calcio ($6,88 \pm 0,28$ es mmoL L^{-1}) risulta essere significativamente più bassa rispetto a quella nell'emolinfa dei granchi stabulati per due settimane e utilizzati

come tempo 0h negli esperimenti di step (n=50, $13,41 \pm 0,27$ es mmoL L^{-1} , $P=0,0001$) (Appendice 2H; figura 10E).

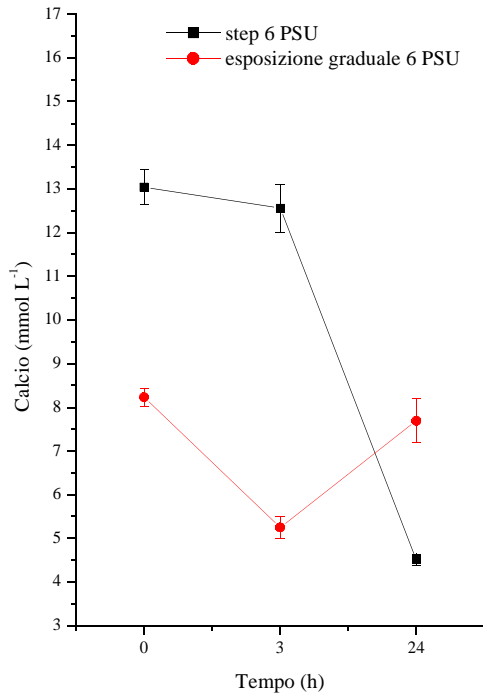
Anche nel caso dell'esposizione graduale a 16 PSU il calcio iniziale ($9,57 \pm 0,42$ es mmoL L^{-1}) nell'emolinfa di *C. aestuarii* (n=10) è inferiore da quello trovato al tempo 0h nei granchi utilizzati nello step alla stessa salinità ($P=0,004$). A tutti i tempi successivi, fino a 14d, il calcio è significativamente diverso dai dati utilizzati come confronto ($P<0,05$) (Appendice 2H; figure 10B e 10E).

Al tempo 0h (fig. 10C) il calcio negli animali esposti gradualmente da 36 a 26 PSU ($11,05 \pm 0,39$ es mmoL L^{-1} , n=10) è significativamente più basso di quello osservato allo stesso tempo nei granchi utilizzati nello step alla medesima salinità ($P=0,0001$). Ai tempi successivi non si sono verificate variazioni significative rispetto al tempo 0h ($P>0,05$), ma dopo 3h il calcio è significativamente più basso rispetto allo stesso tempo del gruppo esposto direttamente a 26 PSU ($P=0,013$). Dopo le due settimane di adattamento la media ottenuta ($9,38 \pm 0,35$ es mmoL L^{-1}) è significativamente inferiore rispetto al gruppo utilizzato come confronto (n=50, $P=0,0001$) (Appendice 2H; figura 10E).

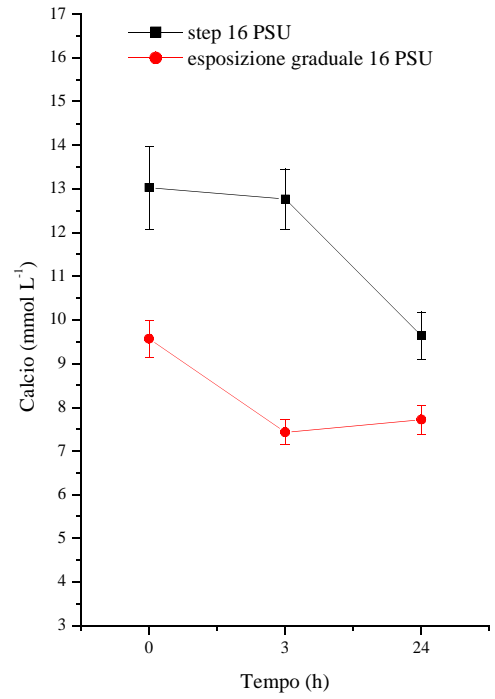
A differenza degli altri casi, l'esposizione graduale a 46 PSU (n=10) non determina modificazioni significative della concentrazione del calcio ($P>0,05$), la cui media iniziale è stata di $13,42 \pm 0,30$ es mmoL L^{-1} . I valori misurati ai tempi 3 e 24h ($P>0,05$ vs 0h), sono significativamente più bassi rispetto a quelli ottenuti nel gruppo utilizzato nello step ($P<0,05$). A 14d la media di $15,09 \pm 0,73$ es mmoL L^{-1} è significativamente più alta rispetto a quella ottenuta nei granchi utilizzati ai tempi 0h negli esperimenti di step (n=50, $P=0,0001$) (Appendice, tavola 2H; figure 10D e 10E).

Dopo il periodo di esposizione graduale alle diverse salinità (tempo 0h) si sono osservate ulteriori variazioni di alcuni parametri fisiologici. In particolare sono evidenti l'aumento dell'acido lattico a 6 PSU, la diminuzione della densità e delle proteine totali, dei cloruri e del calcio a 6 e 16 PSU. Nelle 48h durante le quali si sono effettuati i prelievi, si sono osservati aumenti della glicemia a 6 e 16 PSU, della densità a 6 PSU e del pH a 46 PSU; in generale sono stati questi gli unici andamenti che sono stati diversi rispetto ai relativi esperimenti di step.

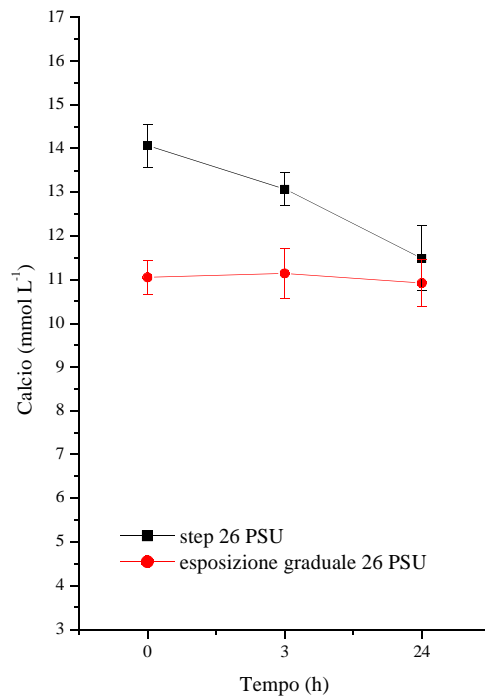
Dopo due settimane di adattamento alle diverse salinità, i risultati più significativi



A

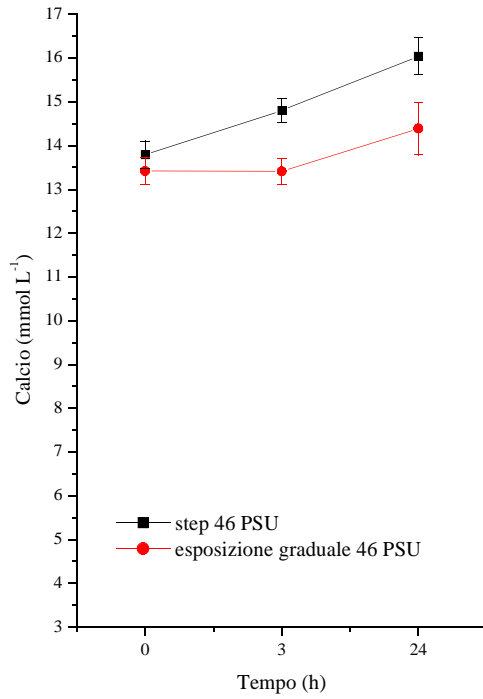


B



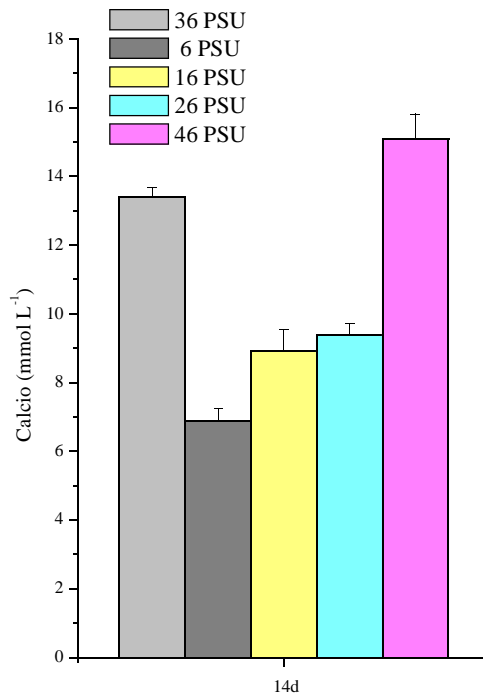
C

Figura 10: confronto dell'andamento nel tempo della concentrazione del calcio nell'emolinfia di *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



D

Figura 10: confronto dell'andamento nel tempo della concentrazione del calcio nell'emolfinfa di *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse salinità.



E

Figura 10: concentrazione del calcio nell'emolfinfa di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse salinità.

sono stati quelli riguardanti l'acido lattico a 6 PSU, la densità, le proteine e gli elettroliti a 6 e 16 PSU. La salinità 26 PSU è risultata quella a cui i granchi si adattano meglio sul lungo periodo.

3.1.4 Esposizione diretta: temperatura

3.1.4.1 Glicemia

Nel gruppo di controllo mantenuto a 18° C la glicemia misurata al tempo 0h è risultata $3,90 \pm 0,55$ es mg dL⁻¹ (n=10); nei tempi successivi è aumentata progressivamente fino al picco ottenuto a 8h ($4,40 \pm 0,50$ es mg dL⁻¹ P>0,05), per poi diminuire dalle 24h ($3,60 \pm 0,34$ es mg dL⁻¹ P>0,05 a 48h). Le medie ottenute per questo gruppo non sono mai state significativamente diverse dal tempo 0h (P>0,05).

L'esposizione a 6° C (n=10) ha determinato un rapido e significativo aumento della glicemia (figura 11 A), che è passata da $4,30 \pm 0,33$ es mg dL⁻¹ a $9,50 \pm 0,96$ es mg dL⁻¹ (P=0,001). Ai tempi successivi di 8 e 48h il glucosio rimane significativamente alto (rispettivamente P=0,003, P=0,040), ma non al tempo 24h (P>0,05). A tutti i tempi considerati la glicemia è stata significativamente diversa da quella corrispondente del gruppo di controllo (P<0,05).

Per i granchi trasferiti direttamente a 12° C il glucosio al tempo 0h è stato $2,70 \pm 0,50$ es mg dL⁻¹ (n=10). Nell'arco delle 48h la concentrazione di glucosio si è mantenuta prossima a quella iniziale (P>0,05). Dal confronto con il gruppo di controllo, solo il dato relativo al tempo 8h ($2,80 \pm 0,36$ es mg dL⁻¹) è significativamente diverso (P=0,011).

L'esposizione di *C. aestuarii* a 24° C (n=10) ha indotto un'iniziale aumento della glicemia da $2,70 \pm 0,26$ es mg dL⁻¹ a $4,90 \pm 0,55$ es mg dL⁻¹ (P=0,010); nelle ore successive il glucosio torna a diminuire e le medie ottenute non sono significativamente diverse da quelle al tempo 0h (P>0,05). Solo il valore al tempo 0h è significativamente diverso dal controllo (P=0,043).

Per il gruppo di granchi posti a 30° C (n=10) la concentrazione di glucosio a 0h è stata $2,90 \pm 0,31$ es mg dL⁻¹, aumentata fino al tempo 3h (P>0,05). A 8 e 24h si è osservata una diminuzione della glicemia seguita poi da un aumento non significativo (P>0,05) al tempo 48h ($9,33 \pm 6,33$ es mg dL⁻¹). Rispetto al controllo i dati di questo gruppo non sono mai stati significativamente diversi (P>0,05) (Appendice, tavola 3A, figura 11A).

3.1.4.2 Acido lattico

Il grafico in figura 11B mostra l'andamento dell'acido lattico nei vari gruppi sperimentali.

Nel gruppo di controllo (n=10) la concentrazione di acido lattico nell'emolinfa al tempo 0h è stata $4,71 \pm 0,57$ es mg dL^{-1} . La concentrazione di questo metabolita ai tempi successivi non ha subito variazioni significative rispetto al tempo 0h ($P>0,05$).

A 6°C l'acido lattico nell'emolinfa dei granchi (n=10) è aumentato da $3,88 \pm 0,47$ es mg dL^{-1} a $11,30 \pm 3,54$ es mg dL^{-1} nell'arco di 3h ($P=0,054$) ed è successivamente diminuito fino alle 48h ($2,75 \pm 0,40$ es mg dL^{-1}), quando la media non è risultata significativamente diversa dal tempo 0h ($P>0,05$) ma significativamente diversa dallo stesso tempo nel gruppo di controllo ($P=0,005$).

Dopo il passaggio di *C. aestuarii* a 12°C (n=10) l'acido lattico, inizialmente di $4,71 \pm 0,29$ es mg dL^{-1} , diminuisce significativamente fino a 8h ($2,49 \pm 0,65$ es mg dL^{-1} , $P=0,005$ vs tempo 0h, $P=0,019$ vs controllo). Dopo un lieve ma non significativo ($P>0,05$) recupero dopo 24h si è rilevata a 48h un'ulteriore diminuzione ($P=0,002$ vs tempo 0h, $P=0,001$ vs controllo).

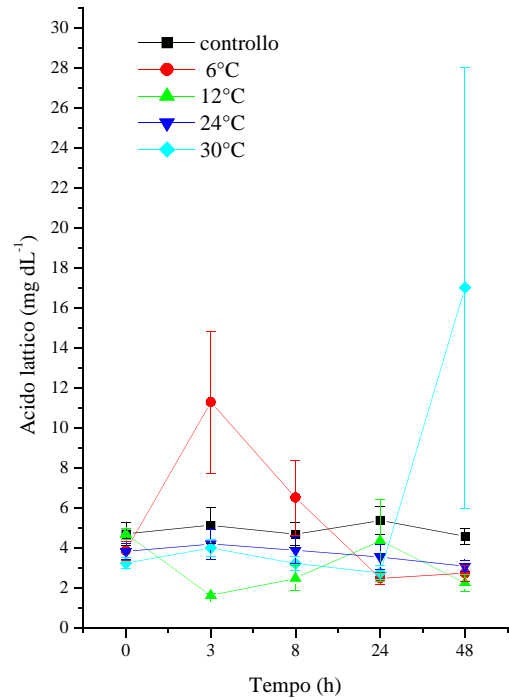
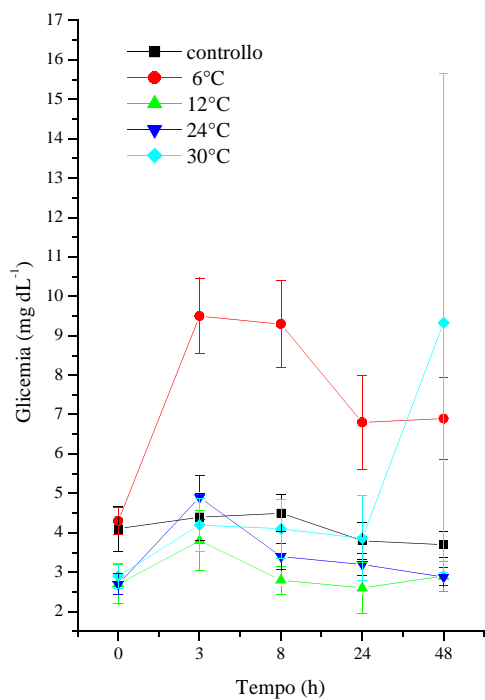
La concentrazione iniziale di acido lattico nei granchi esposti a 24°C è $3,83 \pm 0,89$ es mg dL^{-1} (n=10). Durante il corso dell'esperimento la concentrazione di questo metabolita non ha subito variazioni significative né rispetto al tempo 0h né rispetto al gruppo di controllo.

Nei granchi posti a 30°C l'acido lattico iniziale è stato $3,25 \pm 0,26$ es mg dL^{-1} salito a $4,01 \pm 0,44$ es mg dL^{-1} ($P=0,038$) dopo 3h. Successivamente a 8, 24 e 48h la concentrazione di acido lattico non è stata significativamente diversa dal tempo 0h ($P>0,05$). Rispetto al gruppo di controllo sono risultate significative le medie ottenute ai tempi 8 e 24h (rispettivamente $P=0,049$ e $P=0,005$) (Appendice, tavola 3B, figura 11B).

3.1.4.3 Densità

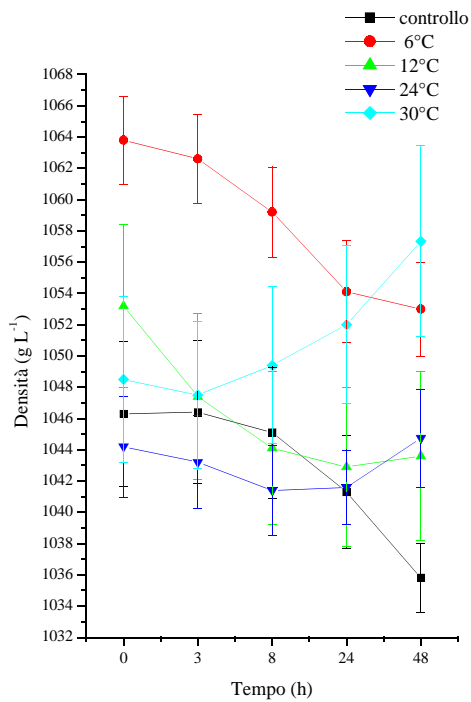
Nel gruppo utilizzato come controllo (n=10) la densità iniziale è stata $1051,20 \pm 2,12$ es g L^{-1} ; ai tempi successivi si è osservata una progressiva diminuzione fino a 48h, tempo al quale la media ($1035,80 \pm 2,21$ es g L^{-1}) è significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,018$).

Anche durante l'esposizione a 6°C (n=10) si è osservato un progressivo calo della densità dell'emolinfa (fig. 11 C). Si passa infatti da $1063,80 \pm 2,81$ es g L^{-1} (0h) a $1059,20 \pm 2,89$ es g L^{-1} (8h; $P=0,012$), a $1054,10 \pm 3,25$ es g L^{-1} (24h; $P=0,0001$)



A

B



C

Figura 11: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *C. aestuarii* esposto direttamente alle diverse temperature. In A e B le barre dell'errore al tempo 48h dell'andamento relativo all'esposizione a 30° C è dovuto alla variabilità delle risposte fisiologiche misurate negli individui sopravvissuti (n=3).

fino al minimo a 48h di $1053,00 \pm 3,01$ es g L⁻¹ (P=0,0001). Questi valori sono risultati sempre significativamente diversi dai corrispondenti del gruppo di controllo (P<0,05).

Come già visto per la temperatura precedente, la temperatura 12° C (n=10) ha indotto una diminuzione della densità dell'emolinfa nel corso dell'esperimento; la media iniziale è $1053,20 \pm 5,23$ es g L⁻¹ ed è calata significativamente a tutti i tempi (P<0,05) fino alle 48h ($1043,60 \pm 5,40$ es g L⁻¹). Questo calo però non è risultato significativamente diverso da quello di controllo per nessun tempo (P>0,05).

La media iniziale della densità nei granchi utilizzati per l'esposizione a 24° C (n=10) è stata di $1044,20 \pm 3,22$ es g L⁻¹. Nell'arco delle 24h successive si è avuta una diminuzione significativa di questo parametro ($1041,60 \pm 2,38$ es g L⁻¹, P=0,045), ma a 48h torna ad un valore prossimo a quello osservato al tempo 0h ($1044,75 \pm 3,14$ es g L⁻¹, P>0,05 vs tempo 0h). Per questo gruppo non si evidenziano differenze statisticamente significative (P>0,05 sempre) rispetto al controllo.

A differenza di ciò che accade alle altre temperature, l'esposizione dei granchi a 30° C (n=10) causa un aumento della densità dell'emolinfa a partire da 8h; le medie infatti ai diversi tempi sono state $1048,50 \pm 5,29$ es g L⁻¹ al tempo 0h, $1049,40 \pm 5,03$ es g L⁻¹ a 8h e $1057,33 \pm 6,12$ es g L⁻¹ a 48h; questi valori però non sono mai stati significativamente diversi né dal tempo 0h né dal gruppo di controllo (P>0,05) (Appendice, tavola 3C, figura 11C).

3.1.4.4 Proteine

Nel gruppo mantenuto a 18° C (n=10) e utilizzato come controllo, le proteine totali al tempo 0h sono state $2,74 \pm 0,55$ es mg L⁻¹ (fig. 11D); dopo 24 e 48h la loro concentrazione è diminuita significativamente (rispettivamente $1,69 \pm 0,26$ es g dL⁻¹ P=0,035, $1,65 \pm 0,27$ es g dL⁻¹, P=0,011).

La media iniziale nei granchi posti a 6° C (n=10) è stata $5,35 \pm 0,33$ es g dL⁻¹, significativamente diversa da quella del gruppo di controllo (P=0,001). Durante il corso dell'esperimento, le proteine totali sono diminuite e le medie ottenute a tutti i tempi (Appendice, tavola 3D; fig. 11D) sono risultate significativamente diverse sia dal tempo 0h che dal gruppo di controllo (P<0,05).

Le proteine emolinfatriche in *C. aestuarii* utilizzato per l'esposizione diretta a 12° C (n=10) è stata a 0h pari a $3,83 \pm 0,48$ es g dL⁻¹. Dopo 8h queste sono diminuite significativamente rispetto al tempo 0h (P=0,023) successivamente le medie ottenute ai tempi 24 e 48h (rispettivamente $3,52 \pm 0,44$ es g dL⁻¹ e $3,97 \pm 0,53$ es g dL⁻¹) non

sono risultate significativamente diverse dal tempo 0h ($P>0,05$), mentre lo sono state dal controllo ($P<0,05$).

Il mantenimento degli animali ($n=10$) a 24°C ha determinato una diminuzione significativa ($P<0,05$) delle proteine totali da $2,61 \pm 0,38$ es g dL^{-1} a $2,30 \pm 0,33$ es g dL^{-1} in 3h. Ai tempi successivi le proteine circolanti nell'emolinfa rimangono più basse rispetto al tempo 0h, sebbene le medie non siano significative ($P>0,05$). Questo gruppo non è risultato essere significativamente diverso dal controllo ($P>0,05$).

I 30°C inducono una diminuzione delle proteine totali nell'emolinfa dei granchi ($n=10$) fino a 8h. Il grafico in figura 11D mostra la concentrazione pari a $3,03 \pm 0,60$ es g dL^{-1} al tempo 0h, che cala a $2,49 \pm 0,56$ es mg L^{-1} dopo 8h ($P=0,001$). Ai tempi successivi si è osservato un recupero della concentrazione delle proteine totali, ma la media ottenuta a 24h è significativa rispetto al tempo 0h ($3,51 \pm 0,25$ es g dL^{-1} , $P=0,008$). A nessun tempo le medie di questo gruppo sono state significativamente diverse dagli stessi tempi del gruppo di controllo ($P>0,05$).

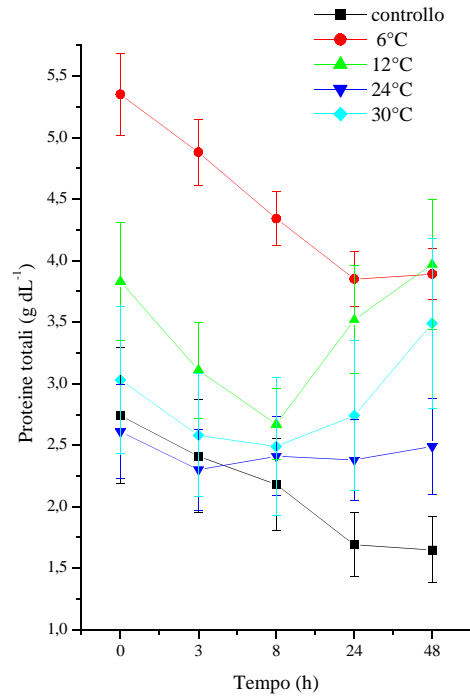
3.1.4.5 pH

Nel gruppo di controllo ($n=10$) la media al tempo 0h è stata $7,71 \pm 0,68$ es e ai tempi successivi non ci sono state variazioni significative di questo parametro ($P>0,05$; fig. 11E).

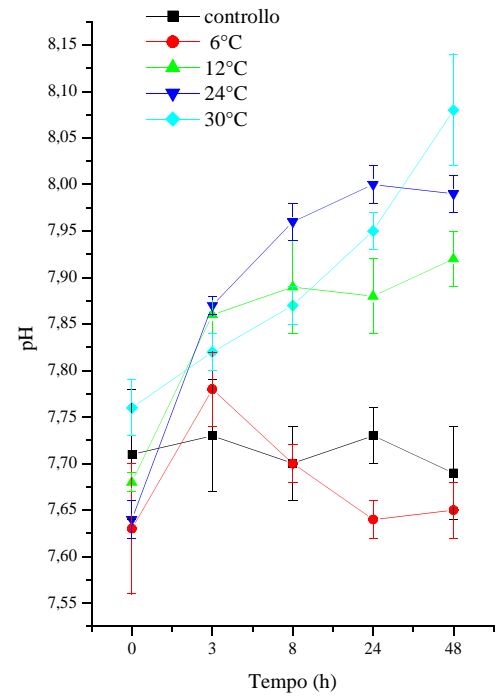
Anche l'esposizione a 6°C ($n=10$), in cui la media al tempo 0h è stata $7,63 \pm 0,07$ es il pH non è variato in maniera significativa ($P>0,05$) durante il corso dell'esperimento. Solo dopo 24h il pH risultata essere significativamente diverso da quello allo stesso tempo nel controllo ($7,64 \pm 0,02$ es, $P=0,042$).

Sia l'esposizione dei granchi a 12°C ($n=10$) che a 24°C ($n=10$) causa un aumento significativo ($P<0,05$) del pH già dopo 3h di esposizione (Appendice, tavola 3E; figura 11E). Ai tempi successivi fino al termine dell'esperimento il pH si è mantenuto significativamente più alto sia rispetto al tempo 0h che agli stessi tempi osservati nel gruppo di controllo ($P<0,05$).

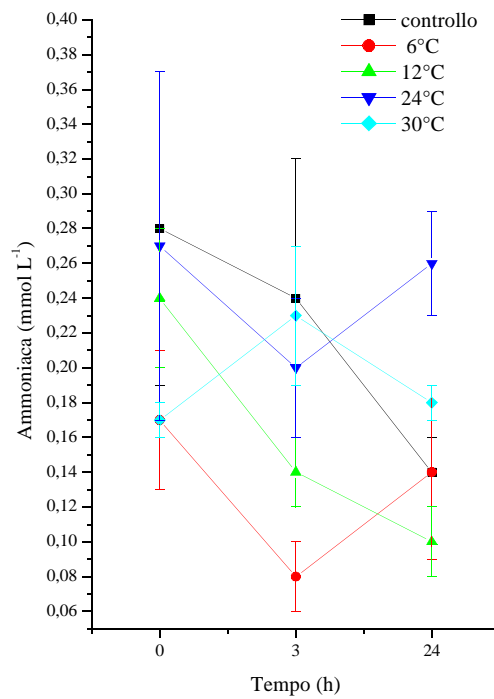
A 30°C ($n=10$) il pH aumenta progressivamente per tutto il corso dell'esperimento, passando dal valore medio di $7,76 \pm 0,03$ es a 0h a quello di $7,87 \pm 0,02$ es ($P=0,004$ vs tempo 0h, $P=0,004$ vs controllo). Il pH rimane significativamente alto sia rispetto al tempo 0h che al gruppo di controllo nei prelievi successivi ($P<0,05$) (Appendice, tavola 3E; figura 11E).



D



E



F

Figura 11: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *C. aestuarii* esposto direttamente alle diverse temperature.

3.1.4.6 Ammoniaca

La quantità di ammoniaca circolante in *C. aestuarii* (n=50) prima del suo utilizzo per l'esposizione alle diverse temperature è $0,22 \pm 0,03$ es mmoL L^{-1} .

Nel gruppo di controllo mantenuto a 18°C (n=5), la quantità di ammoniaca iniziale è stata di $0,28 \pm 0,09$ es mmoL L^{-1} , valore che diminuisce in maniera non significativa ($P>0,05$) nel tempo (fig. 11F).

In *C. aestuarii* posti a 6°C (n=5), dopo una iniziale significativa diminuzione da $0,17 \pm 0,04$ es mmoL L^{-1} a $0,08 \pm 0,02$ es mmoL L^{-1} ($P=0,021$), si assiste a un recupero non significativo dell'ammoniemia ($P>0,05$). Questo gruppo non è mai stato significativamente diverso da quello di controllo ($P>0,05$).

L'esposizione a 12°C (n=5) e a 24°C (n=5) non hanno indotto variazioni significative ($P>0,05$) nella concentrazione di ammoniaca presente nell'emolinfa dei granchi, e i gruppi non sono mai stati significativamente diversi da quello di controllo ($P>0,05$).

A 30°C (n=5) a differenza dei casi appena descritti si è osservato un lieve aumento nella concentrazione di ammoniaca circolante nell'emolinfa, passata da $0,17 \pm 0,01$ es mmoL L^{-1} a 0h a $0,23 \pm 0,04$ es mmoL L^{-1} al tempo 3h ($P>0,05$). Nonostante questa diversa tendenza però, il gruppo non è mai stato significativamente diverso da quello di controllo ($P>0,05$) (Appendice, tavola 3F, figura 11F).

Riepilogando i dati riportati in questo paragrafo, le temperature che maggiormente alterano la fisiologia di *C. aestuarii* durante lo stress acuto, sono le più estreme cioè 6 e 30°C . La temperatura di 12°C , è risultata quella fisiologicamente meglio tollerata, sebbene vi siano state variazioni significative della concentrazione di proteine totali e del pH dell'emolinfa.

L'esposizione diretta da 18 a 24°C causa alterazioni di quasi tutti i parametri fisiologici qui considerati, ma l'intensità delle risposte è stata inferiore rispetto a quella osservata nel gruppo esposto a 30°C .

3.1.5 Esposizione graduale e adattamento: temperatura

Vengono di seguito descritti gli andamenti dei parametri fisiologici misurati nell'emolinfa dei gruppi di granchi che sono stati esposti gradualmente e adattati alle diverse temperature.

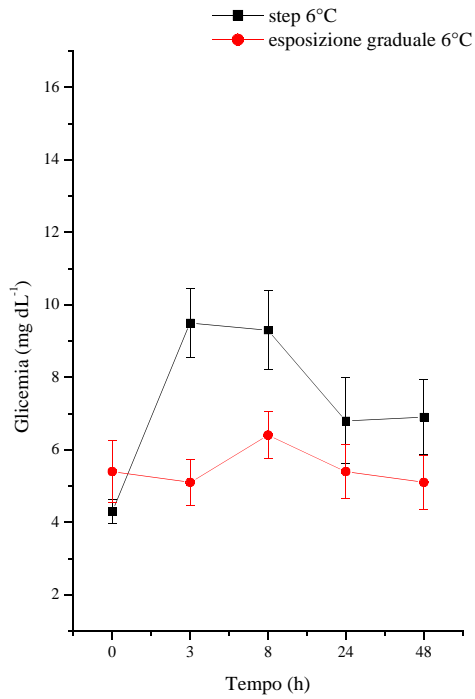
3.1.5.1 Glicemia

Al tempo 0h in seguito al trasferimento graduale di *C. aestuarii* alla temperatura di 6° C partendo da quella di stabulazione di 18 °C, (fig. 12E) la glicemia è stata di $5,40 \pm 0,85$ es mg dL⁻¹ (n=10), non significativamente diversa rispetto a quella osservata allo stesso tempo nel gruppo che ha subito esposizione diretta alla medesima temperatura (P>0,05). Nell'arco delle ore successive la concentrazione di glucosio rimane costante e non significativamente diversa dal tempo 0h (P>0,05). Ai tempi 3 e 8h, le medie però sono risultate significativamente diverse da quelle ottenute agli stessi tempi nel gruppo che ha subito lo step a 6° C. Dopo due settimane di mantenimento a questa temperatura, la glicemia di $3,40 \pm 0,81$ es mg dL⁻¹ non è significativamente diversa dal controllo (P>0,05) costituito dai 50 granchi stabulati ed in seguito utilizzati negli esperimenti di step alle diverse temperature (Appendice tavola 4A; figure 12A e 12E).

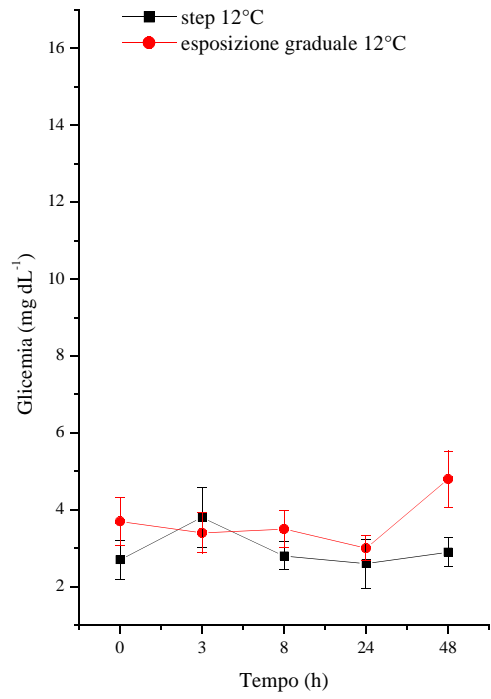
L'esposizione graduale a 12° C non ha mai indotto variazioni significative né rispetto al tempo 0h né rispetto allo step alla stessa temperatura (P>0,05) della concentrazione di glucosio nell'emolinfa dei granchi (n=10) (Appendice tavola 4A; figure 12 B e 12 E).

Il valore iniziale di glucosio in granchi portati gradualmente a 24° C (n=10) è stato $4,20 \pm 0,59$ es mg dL⁻¹, significativamente diverso dal tempo 0h del gruppo trasferito direttamente alla stessa temperatura (P=0,024). Nell'arco delle ore successive la glicemia aumenta gradualmente e le medie ottenute ai tempi 24 e 48h, rispettivamente di $5,60 \pm 0,56$ es mg dL⁻¹ e $7,00 \pm 1,09$ es mg dL⁻¹, sono significativamente diverse dal tempo 0h (P<0,05). Dal confronto con il gruppo esposto direttamente la glicemia è risultata significativamente superiore al prelievo effettuato dopo 24h (P<0,05). A 14d la glicemia non è significativamente diversa (P>0,05) da quella osservata nei granchi che sono stati utilizzati come tempi 0h durante gli esperimenti di step (n=50, $3,34 \pm 0,20$ es mg dL⁻¹) (Appendice tavola 4A; figure 12 C e 12 E).

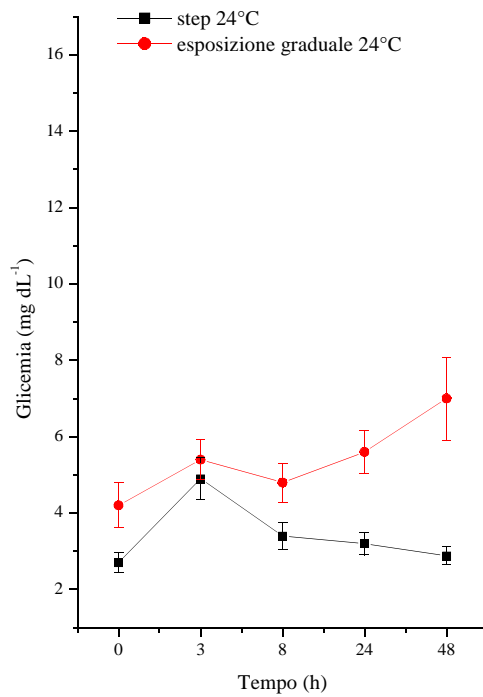
Anche nel caso dell'esposizione graduale a 30° C (fig. 12D) la glicemia iniziale nell'emolinfa dei granchi ($4,90 \pm 0,41$ es mg dL⁻¹ n=10) è significativamente diversa da quella al tempo 0h del gruppo utilizzato per lo step a 30° C (P=0,001). Nell'arco delle 48h il glucosio emolinfatico diminuisce gradualmente e significativamente rispetto al tempo 0h (rispettivamente $3,20 \pm 0,55$ es mg dL⁻¹, P=0,038 a 8h ; $3,00 \pm 0,45$ es mg dL⁻¹, P=0,004 a 48h) (Appendice tavola 4A).



A

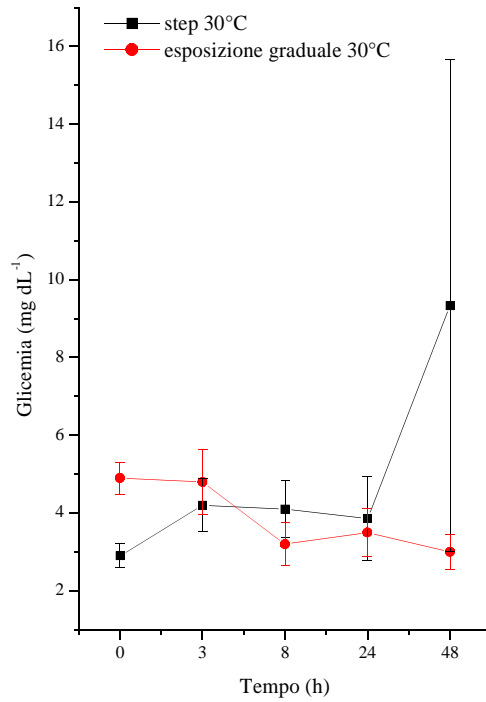


B



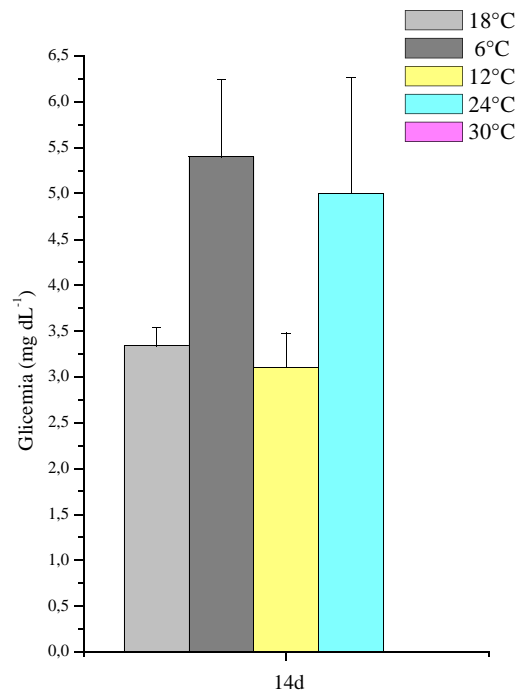
C

Figura 12: confronto dell'andamento nel tempo della glicemia in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.



D

Figura 12: confronto dell'andamento nel tempo della glicemia in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.



E

Figura 12: concentrazione di glucosio nell'emolinfia di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse temperature.

3.1.5.2 Acido lattico

Il passaggio progressivo da 18 a 6° C non causa variazioni significative della concentrazione di acido lattico nell'emolinfa ($P > 0,05$). Tuttavia dopo il periodo di adattamento di due settimane questo metabolita è significativamente più basso rispetto al controllo, composto dai granchi ($n=50$) utilizzati ai tempi 0h negli esperimenti di step ($P < 0,05$) (Appendice, tavola 4B; figure 13A e 13E).

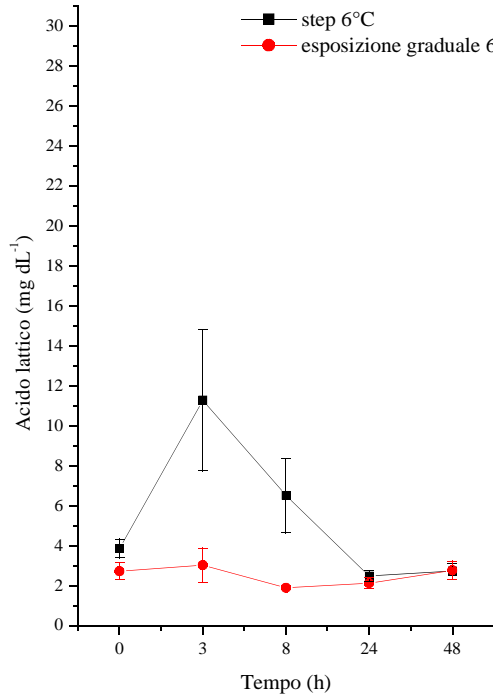
Analogamente nel passaggio a 12° C (fig. 13B) non si evidenziano modificazioni significative nell'arco delle 48h ($P > 0,05$). Le medie iniziali sono tuttavia significativamente diverse dal gruppo esposto direttamente a 12° C (rispettivamente $2,25 \pm 0,25$ es mg dL^{-1} , $P=0,0001$; $2,20 \pm 0,23$ es mg dL^{-1} , $P=0,043$). Come per l'esposizione graduale a 6° C anche in questo caso al tempo 14d l'acido lattico rimane significativamente ($P=0,0001$) più basso rispetto al controllo ($n=50$, $4,08 \pm 0,19$ es mg dL^{-1}) (Appendice, tavola 4B; figura 13E).

Anche l'esposizione graduale a 24° C, l'acido lattico, inizialmente di $2,71 \pm 0,50$ es mg dL^{-1} ($n=10$), non varia in maniera significativa nell'arco delle 48h successive ($P > 0,05$). La media al tempo 3h è però risultata significativamente da quella ottenuta allo stesso tempo nel gruppo esposto direttamente alla stessa temperatura ($P=0,018$). A differenza di ciò che è stato descritto per i gruppi precedenti, dopo il periodo di adattamento a 24° C la concentrazione di acido lattico non risulta essere significativamente diversa da quella osservata nei granchi stabulati ($n=50$) e utilizzati negli esperimenti di esposizione diretta ($P > 0,05$) (Appendice, tavola 4B; figure 13C e 13E).

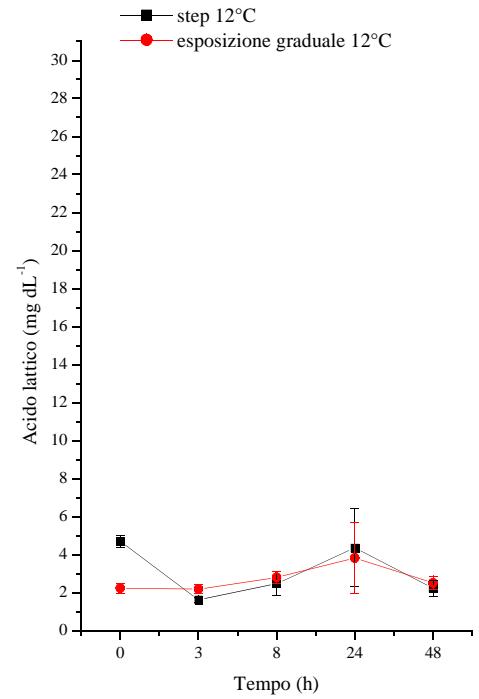
L'esposizione graduale a 30° C induce invece un aumento della concentrazione di acido lattico (fig. 13D). Il valore al tempo 0h ($18,55 \pm 1,88$ es mg dL^{-1}) aumenta fino al tempo 24h, quando la concentrazione di $25,94 \pm 0,68$ es mg dL^{-1} è significativamente diversa rispetto al tempo 0h ($P=0,002$). I valori ottenuti in questo gruppo è a tutti i tempi significativamente diverso dal gruppo esposto direttamente a 30° C ($P < 0,05$) (Appendice, tavola 4B).

3.1.5.3 Densità

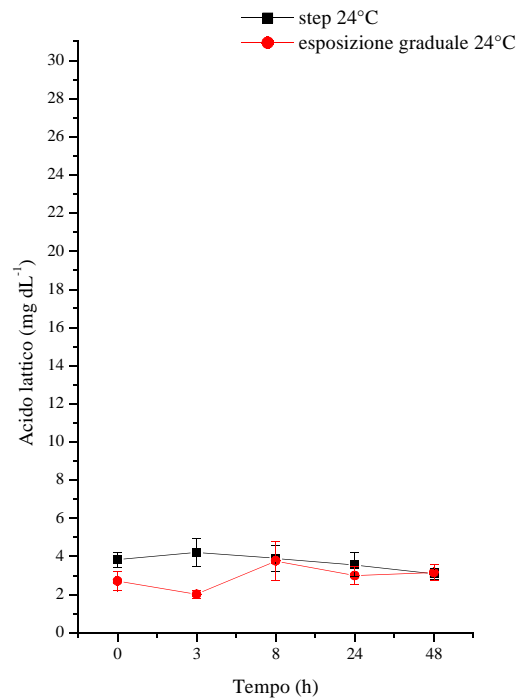
Alla temperatura di 6° C, raggiunta progressivamente, anche se la densità dell'emolinfa dei granchi ($n=10$) diminuisce nell'arco delle due settimane sperimentali i valori misurati a tutti i tempi non sono mai risultate significativamente diverse dai dati utilizzati come confronto ($P > 0,05$) (Appendice, tavola 4C; figure 14A e 14E).



A

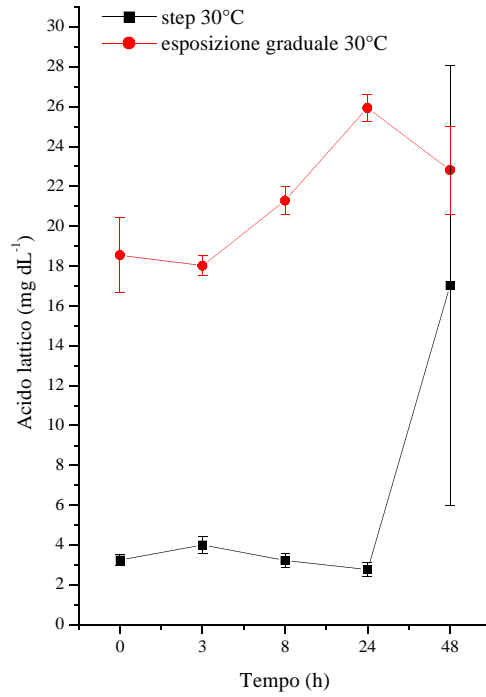


B



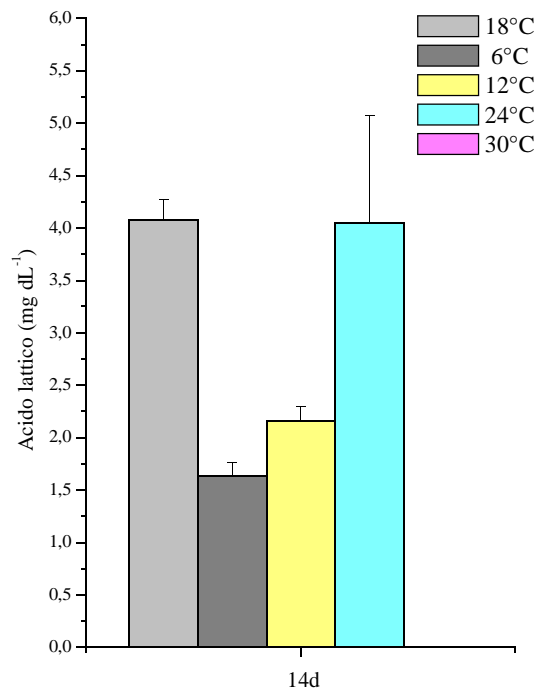
C

Figura 13: confronto dell'andamento nel tempo della latticemia in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.



D

Figura 13: confronto dell'andamento nel tempo della latticemia in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.



E

Figura 13: concentrazione di acido lattico nell'emolfinza di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse temperature.

Sebbene la densità dell'emolinfa dei granchi (n=10) esposti gradualmente a 12° C (fig. 14B) non sia mai significativamente diversa dal gruppo esposto direttamente alla stessa temperatura ($P>0,05$), nell'arco delle due settimane, passando da $1063,90 \pm 3,33$ es g L⁻¹ al tempo 0h a $1044,20 \pm 2,30$ es g L⁻¹ diminuisce significativamente a tutti i tempi rispetto al tempo 0h e ($P<0,05$) e, nel caso del tempo 14d, rispetto al controllo, costituito dai granchi stabulati per il loro successivo utilizzo negli step (n=50, $1051,20 \pm 2,12$ es g L⁻¹, $P<0,05$) (Appendice, tavola 4C; figura 14E).

Anche nel passaggio graduale a 24° C la densità subisce una progressiva diminuzione che risulta significativamente diversa a 48h ($1044,33 \pm 3,81$ es g L⁻¹, $P=0,026$ vs tempo 0h). Non si evidenziano invece variazioni statisticamente significative dei dati il rispetto al gruppo esposto direttamente a 24° C. Dopo due settimane di adattamento a questa temperatura però la densità di $1042,50 \pm 3,10$ es g L⁻¹ è significativamente più bassa ($P=0,042$) rispetto al controllo (tempi 0h esperimenti di step,) (Appendice tavola 4C; figure 14C e 14E)

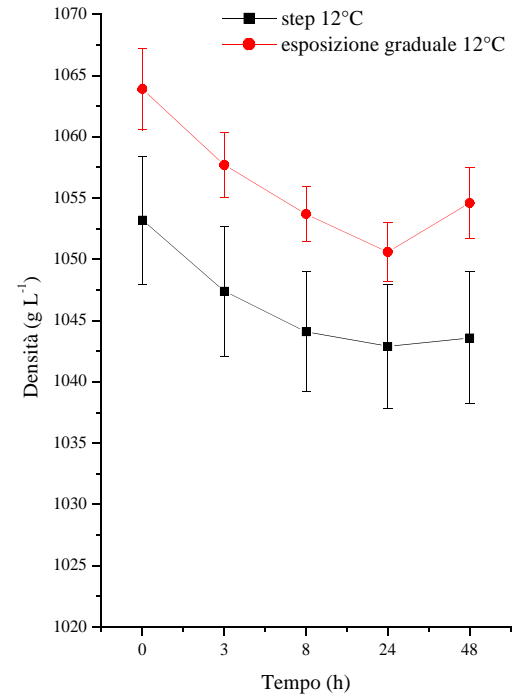
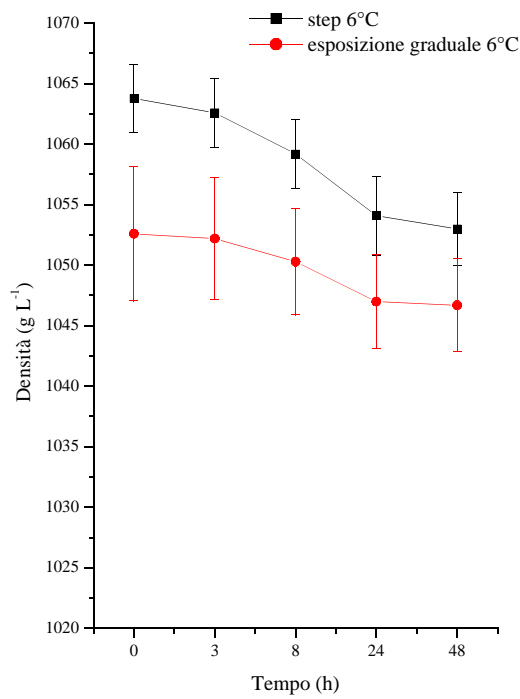
Al tempo 0h la densità dell'emolinfa dei granchi (n=10) trasferiti gradualmente da 18 a 30° C è stata $1027,80 \pm 2,13$ es g L⁻¹ e nell'arco delle 48h questa diminuisce gradualmente e le medie ottenute a 24 e 48h sono significativamente diverse dal tempo 0h (rispettivamente $P=0,032$ e $P=0,029$; Appendice, tavola 4C; figura 14D). Rispetto ai dati ottenuti negli animali esposti direttamente a 30°C fin dal tempo 0h ($P=0,004$) la densità si mantiene su valori significativamente diversi ($P<0,05$).

3.1.5.4 Proteine

I grafici in figura 15 mostrano gli andamenti delle proteine emolinfatichiche durante le esposizioni graduali alle diverse temperature.

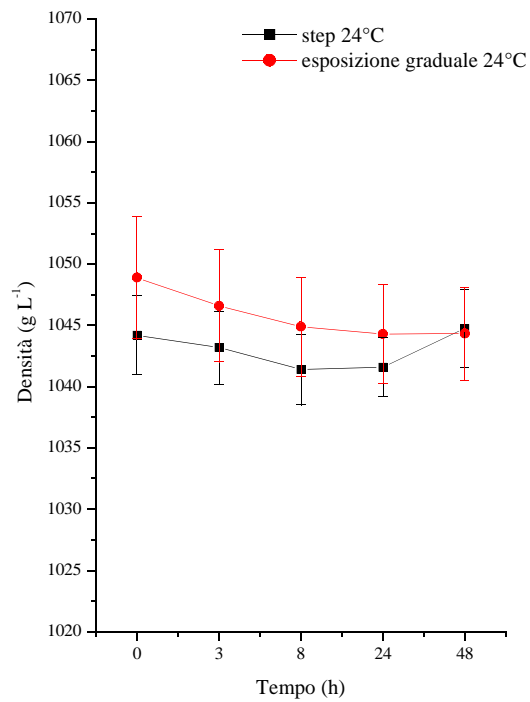
La concentrazione iniziale nei granchi portati progressivamente a 6° C (n=10) è stata $3,85 \pm 0,56$ es g dL⁻¹, significativamente più bassa di quella del gruppo esposto direttamente alla stessa temperatura ($P=0,035$). Nell'arco delle ore successive le proteine totali diminuiscono fino a 48h, quando la media ($3,07 \pm 0,37$ es g dL⁻¹) è significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,032$). Dopo due settimane di adattamento però la concentrazione delle proteine totali di $2,88 \pm 0,43$ es g dL⁻¹ non è significativamente diversa dalla loro media nell'emolinfa dei granchi prima del loro utilizzo negli esperimenti di esposizione diretta alle diverse temperature (n=50, $3,51 \pm 0,25$ es g dL⁻¹, $P>0,05$) (Appendice tavola 4D, figure 15A e 15E).

Dopo il passaggio graduale da 18 a 12° C il valore delle proteine emolinfatichiche di $4,10 \pm 0,35$ es g dL⁻¹ (n=10; $P=0,009$ vs passaggio diretto). Ai prelievi effettuati a 3,



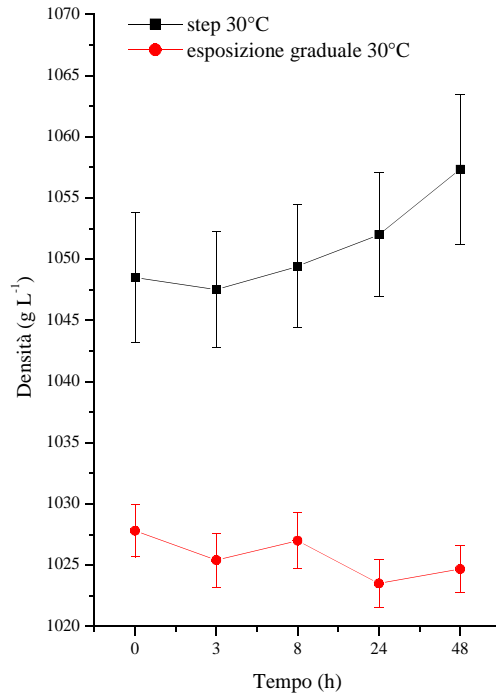
A

B



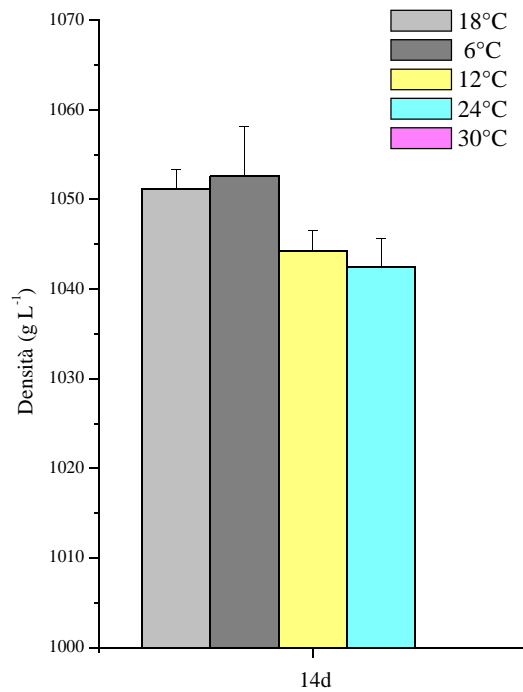
C

Figura 14: confronto dell'andamento nel tempo della densità dell'emolinfa in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.



D

Figura 14: confronto dell'andamento nel tempo della densità dell'emolinfa in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.



E

Figura 14: densità dell'emolinfa di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse temperature.

24 e 48h i valori misurati sono significativamente diversi rispetto al tempo 0h ($P < 0,05$). A tutti i tempi le proteine totali si sono mantenute significativamente più alte rispetto a quelle ai medesimi tempi nel gruppo esposto direttamente a 12° C ($P < 0,05$). Dopo 14d le proteine totali ($3,83 \pm 0,89$ es g dL⁻¹) non sono significativamente diverse da quelle circolanti nell'emolinfa dei granchi ($n=50$) utilizzati ai tempi 0h negli esperimenti di esposizione diretta ($P > 0,05$) (Appendice, tavola 4D; figure 15B e 15E).

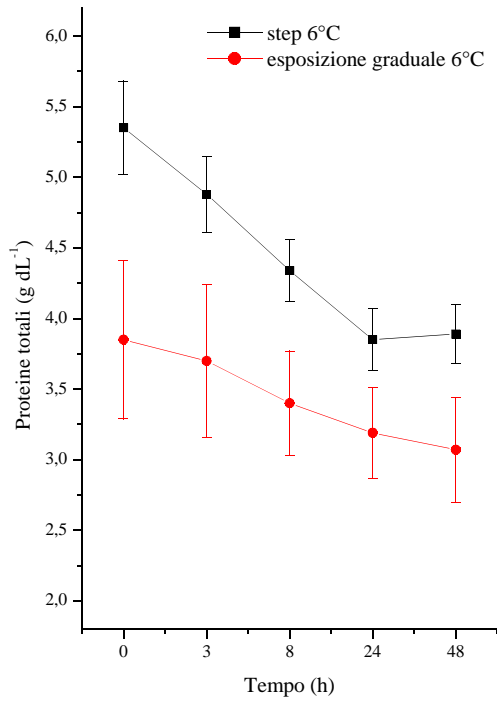
Passando da 18 a 24° C iniziatasi verifica una diminuzione significativa delle proteine totali nell'emolinfa, da $4,20 \pm 0,50$ es g dL⁻¹ al tempo 0h, fino a $2,68 \pm 0,42$ es g dL⁻¹ a 8h ($P < 0,05$). Rispetto al gruppo esposto direttamente a 24° C sono significative ($P < 0,05$) le medie ottenute a 0, 3 e 48h. Nessuna differenza significativa è stata evidenziata tra il tempo 14d e il controllo formato dai granchi stabulati e utilizzati in seguito per gli step ($P > 0,05$) (Appendice, tavola 4D; figure 15C e 15E).

La concentrazione delle proteine nei granchi ($n=10$) portati nel tempo a 30° C è stata inizialmente di $4,05 \pm 0,58$ es g dL⁻¹. Ai prelievi successivi il livello di proteine totali diminuisce gradualmente fino a 48h quando la media ($3,68 \pm 0,46$ es g dL⁻¹) è significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,022$). Il gruppo non è mai significativamente diverso da quello esposto direttamente alla stessa temperatura ($P > 0,05$) (Appendice, tavola 4D; figura 15D).

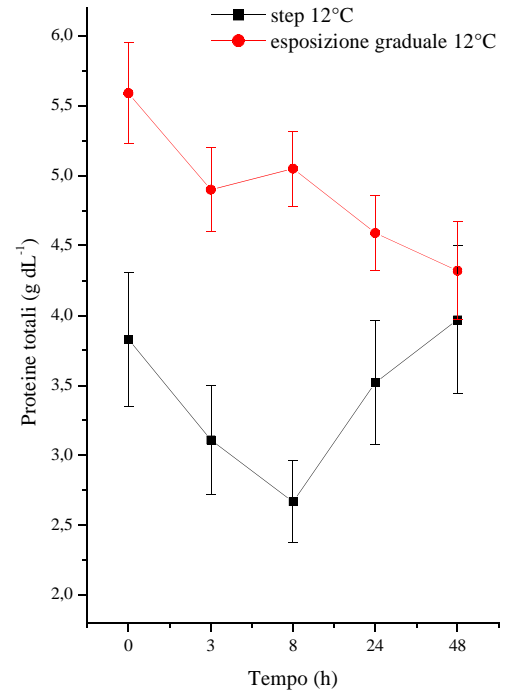
3.1.5.5 pH

Negli animali che passano gradualmente da 18 a 6 °C le variazioni del pH emolinfatico sono risultate significative rispetto al tempo 0h ($7,63 \pm 0,03$ es) e ai tempi 3 e 24h ($P < 0,05$). A nessun tempo il pH è stato significativamente diverso dal gruppo esposto direttamente a 6° C ($P > 0,05$). Dopo 14d di mantenimento a questa temperatura il pH dell'emolinfa non è significativamente diverso da quello nei granchi utilizzati ai tempi 0h negli esperimenti di step ($n=50$, $7,68 \pm 0,02$ es) ($P > 0,05$) (Appendice, tavola 4E; figure 16A e 16E).

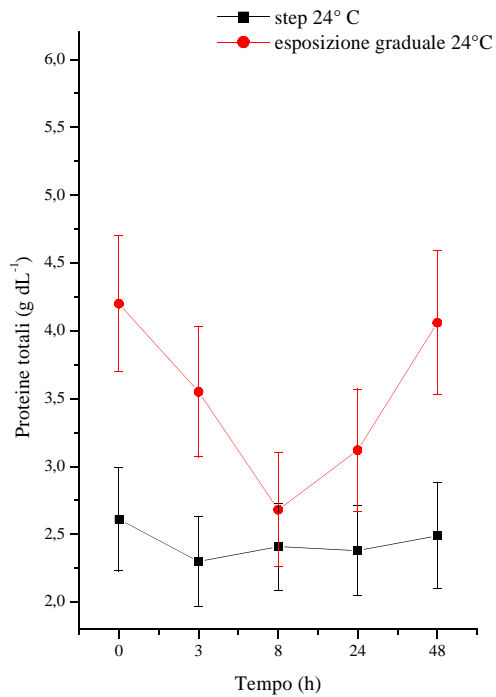
Come si osserva nel grafico in figura 16B, il passaggio progressivo di *C. aestuarii* ($n=10$) a 12° C, non ha indotto, nell'arco delle 48h, variazioni significative nel valore del pH dell'emolinfa ($P > 0,05$); ma è sempre stato significativamente diverso ($P < 0,05$) rispetto ai valori agli stessi tempi nel gruppo esposto direttamente alla medesima temperatura. Anche in questo caso, dopo due settimane di adattamento, il pH di $7,69 \pm 0,03$ es non è significativamente ($P > 0,05$) diverso dal controllo, costituito dai granchi stabulati per due settimane (Appendice tavola 4E; figura 16E).



A

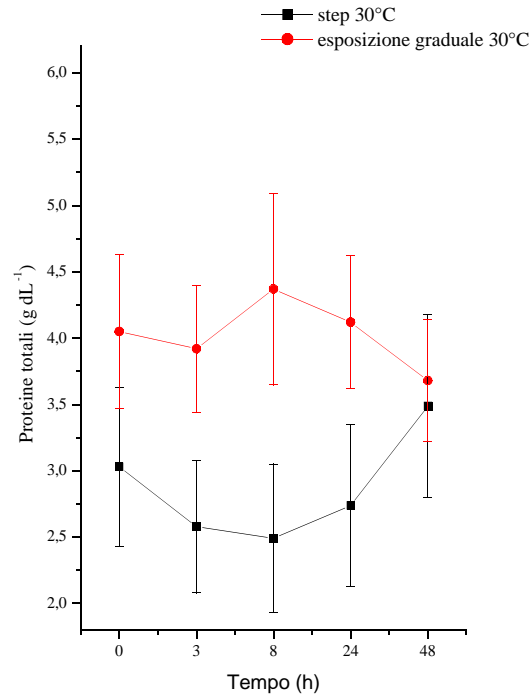


B



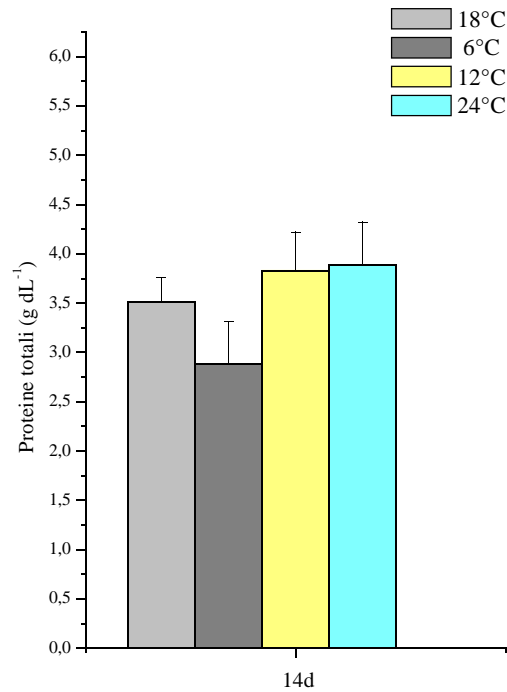
C

Figura 15: confronto dell'andamento nel tempo della concentrazione delle proteine totali nell'emolinfa di *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.



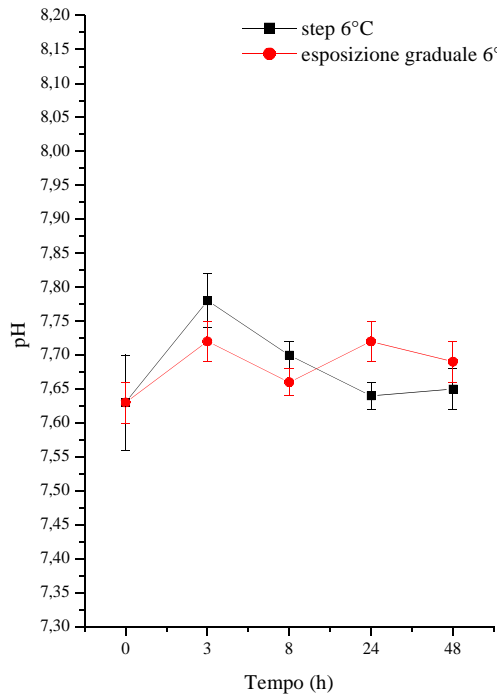
D

Figura 15: confronto dell'andamento nel tempo della concentrazione delle proteine totali nell'emolinfa di *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.

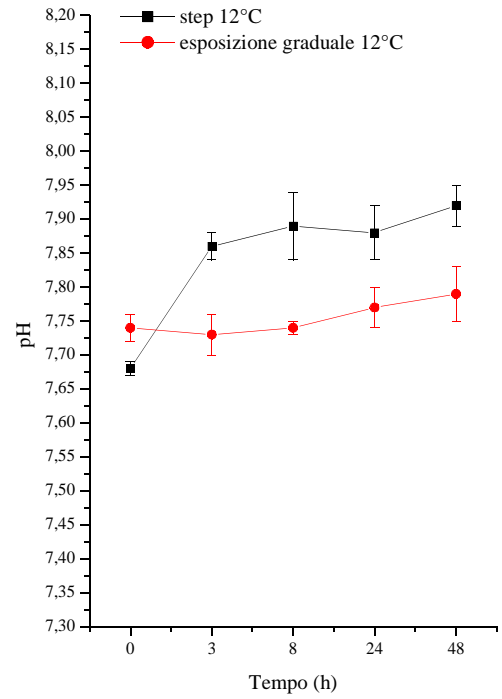


E

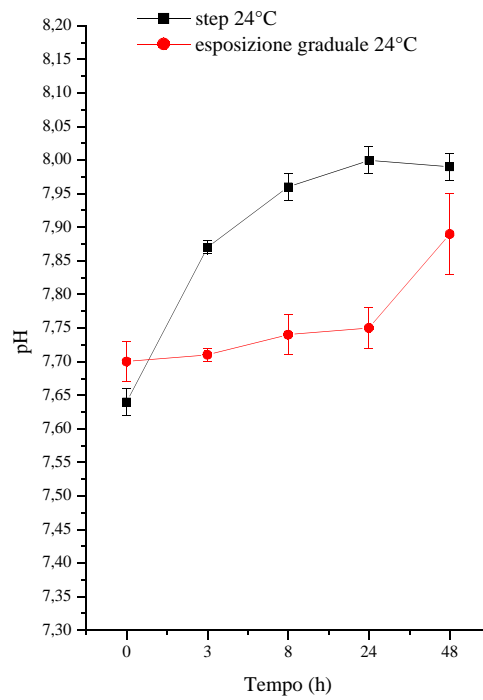
Figura 15: concentrazione delle proteine totali nell'emolinfa di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse temperature.



A

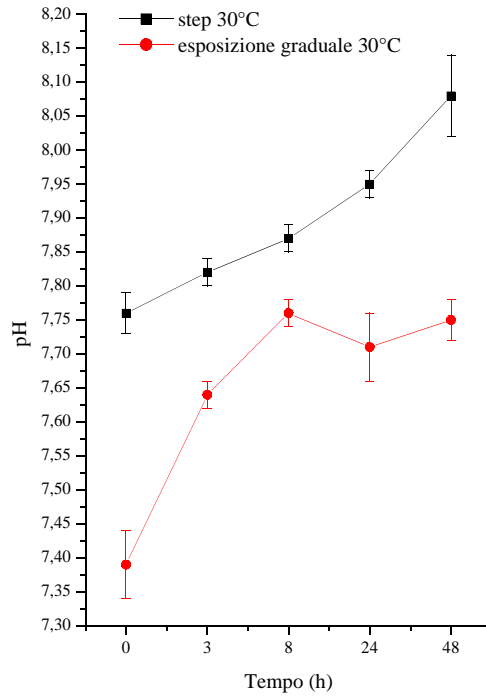


B



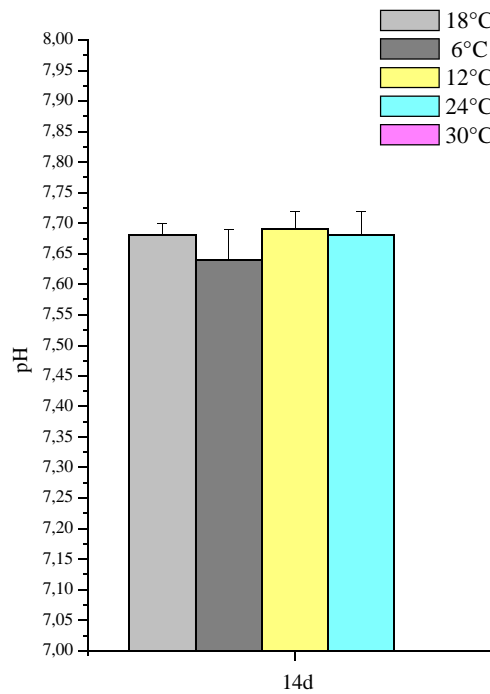
C

Figura 16: confronto dell'andamento nel tempo del pH dell'emolinfa in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.



D

Figura 16: confronto dell'andamento nel tempo del pH dell'emolinfa in *C. aestuarii* esposti direttamente vs gradualmente alle diverse temperature.



E

Figura 16: pH dell'emolinfa di *C. aestuarii* adattato per due settimane alle diverse temperature.

Il pH al tempo 0h dell'emolinfa dei granchi adattati gradualmente a 24° C (n=10) è stato $7,70 \pm 0,03$ es ($P>0,05$ vs esposizione diretta). Successivamente il pH aumenta fino alle 48h, quando la media ottenuta ($7,89 \pm 0,06$ es,) è risultata significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,007$). A 3, 8 e 24h il pH si è mantenuto significativamente più basso rispetto agli stessi tempi nel gruppo esposto direttamente a 24° C ($P<0,05$). Dopo 14d il pH dell'emolinfa non è significativamente diverso da quello misurato negli animali (n=50) ai tempi 0h negli esperimenti di step ($P>0,05$) (Appendice, tavola 4E; figure 16C e 16E).

Nei granchi trasferiti da 18 a 30° C (fig. 16D) il pH a 0h ($7,39 \pm 0,05$ es) è significativamente più basso rispetto a quello osservato allo stesso tempo nel gruppo esposto direttamente alla medesima temperatura ($P=0,0001$). A tutti i tempi successivi il pH aumenta rispetto al tempo 0h ($P<0,05$), pur mantenendosi significativamente più basso ($P<0,05$) rispetto al pH dei granchi posti direttamente a 30° C. (Appendice, tavola 4E).

Sintetizzando i dati appena descritti, durante il trasferimento graduale alle diverse temperature e durante le 48h in cui si sono effettuati i prelievi è risultato che la glicemia e l'acido lattico non subiscono variazioni significative a 6 e 12 ° C; solo dopo 14d di adattamento l'acido lattico subisce, a queste temperature, un notevole calo. Risposte esattamente contrarie a quelle appena descritte si sono ottenute a 24 e 30° C.

Per quanto riguarda la densità dell'emolinfa a 30° C, è indicativa la sua diminuzione rispetto al gruppo che ha subito step alla stessa temperatura, mentre proteine totali e pH, sebbene i loro andamenti siano paralleli a quelli osservati durante gli step, subiscono variazioni significative a tutte le temperature. L'adattamento di due settimane riporta questi parametri verso i valori fisiologici.

3.1.6 Esposizione diretta: ambiente subaereo

Alcuni gruppi di granchi mantenuti a 22° C o a 18° C sono stati poi utilizzati per esperimenti di valutazione degli effetti di esposizione all'aria a diverse temperature. L'andamento dei vari parametri considerati, nei gruppi di granchi utilizzati come controllo, è già stata descritta precedentemente ai paragrafi 3.1.2.1 e 3.1.4.1.

3.1.6.1 Glicemia

I grafici nelle figure 17A e 17B mostrano l'andamento nel tempo della glicemia nei diversi gruppi sperimentali.

L'esposizione in ambiente subaereo a 24° C (n=10), partendo dalla condizione di stabulazione di 22° C (fig. 17A), ha indotto un incremento nella glicemia; il valore iniziale di $2,50 \pm 0,22$ es mg dL⁻¹ è in seguito aumentato progressivamente (P<0,05) fino al tempo 48h ($10,44 \pm 0,41$ es mg dL⁻¹). Ai prelievi eseguiti a 24 e 48h, si è riscontrata un aumento significativo dei valori rispetto al controllo (P=0,0001).

Il passaggio da acqua a 22° C all'aria a 30° C (n=10), ha causato aumenti significativi della glicemia, passata da $3,90 \pm 0,38$ es mg dL⁻¹ (0h) a $6,40 \pm 0,93$ es mg dL⁻¹, a 8h (P=0,041). Non si evidenziano dati significativamente diversi dal gruppo mantenuto in acqua a 22° C (P>0,05).

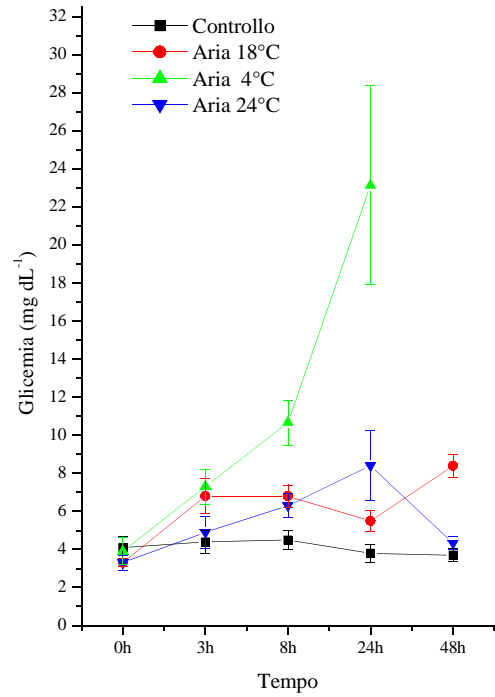
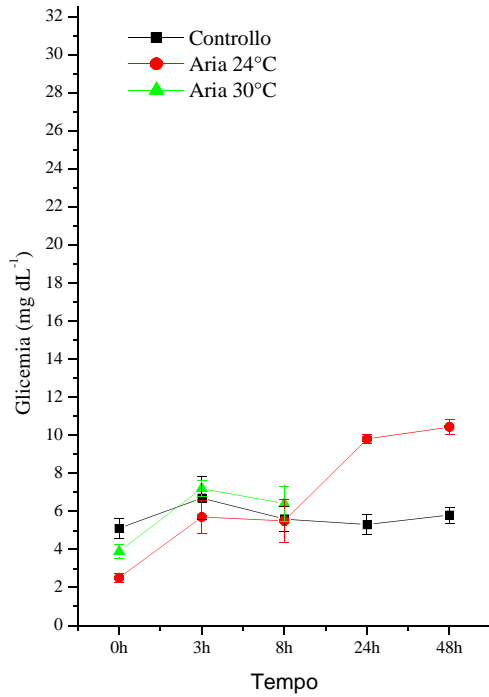
Per quanto riguarda i gruppi mantenuti in acqua a 18° C, il trasferimento in ambiente subaereo a 18° C (n=10) e a 4° C (n=10) ha determinato aumenti glicemici significativi a tutti i tempi sia rispetto al tempo 0h che al gruppo di controllo (P<0,05) (Appendice, tavola 5A; figura 17B).

Nel gruppo trasferito all'aria a 24° C partendo da acqua a 18° C (n=10) la glicemia, iniziale è stata $3,30 \pm 0,40$ es mg dL⁻¹, ed è poi aumentata progressivamente fino al tempo 24h ($8,40 \pm 1,43$ es mg dL⁻¹, P=0,013 vs tempo 0h e P=0,035 vs controllo). A 48h invece il glucosio emolinfatico cala fino ad un valore che non è risultato significativo né rispetto al tempo 0h né rispetto al gruppo di controllo (P>0,05) (Appendice, tavola 5A; figura 17B).

3.1.6.2 Acido lattico

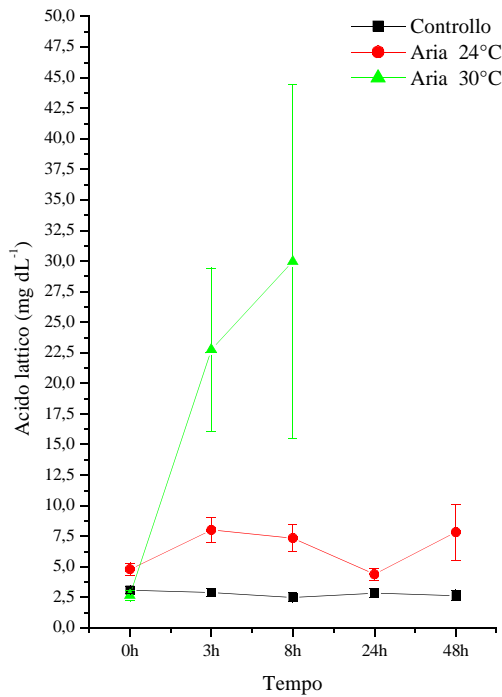
La concentrazione iniziale di acido lattico nei granchi stabulati a 22° C (n=10) e posti all'aria a 24° C è $4,81 \pm 0,50$ es mg dL⁻¹ nelle 3h successive aumentata significativamente fino a $8,01 \pm 1,03$ es mg dL⁻¹ (P=0,012). Ai tempi successivi l'acido lattico oscilla, e le medie ottenute non sono mai state significativamente diverse dal tempo 0h (P>0,05). I dati ottenuti sono sempre significativamente diversi rispetto al controllo (P<0,05).

Gli animali mantenuti all'aria a 30° C (n=10) presentano una concentrazione iniziale di acido lattico di $2,68 \pm 0,43$ es mg dL⁻¹ il valore misurato a 3h ($22,76 \pm 6,67$ es mg dL⁻¹) è significativamente più elevato sia rispetto al tempo 0h che al gruppo di controllo, (P=0,012 e P=0,016 rispettivamente). Dopo 8h, sebbene la media si

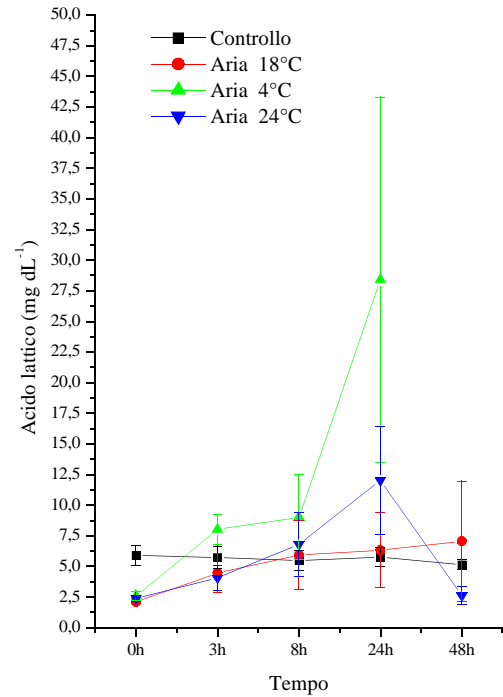


A

B



C



D

Figura 17: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *C. aestuarii* esposto in ambiente subaereo a diverse temperature; in A e C sono riportate le medie \pm es nei gruppi partiti da acqua a 24° C, in B e D quelle nei gruppi partiti da 18° C.

mantenga alta, non è significativamente diversa né dalle 0h né dal gruppo di controllo ($P>0,05$).

C. aestuarii (n=10) posto all'aria a 18° C, partendo dalla stessa temperatura, non mostra variazioni significative di acido lattico né rispetto al tempo 0h né rispetto al gruppo di controllo ($P>0,05$) (Appendice, tavola 5B; figura 17D).

Anche il passaggio a 24° C non causa variazioni significative di acido lattico né rispetto al tempo 0h né rispetto al gruppo di controllo ($P>0,05$) anche se sono presenti lievi aumenti del metabolita (Appendice, tavola 5B; figura 17D).

Il mantenimento a 4° C (n=10) ha invece determinato una crescita significativa della concentrazione di acido lattico che è passata da $2,61 \pm 0,40$ es mg dL⁻¹ a $8,03 \pm 1,21$ es mg dL⁻¹ ($P=0,002$). Ai tempi successivi l'acido lattico aumenta ancora ma non in maniera significativa ($P>0,05$) rispetto al tempo 0h. Il gruppo non è significativamente diverso da quello di controllo ($P>0,05$).

3.1.6.3 Densità

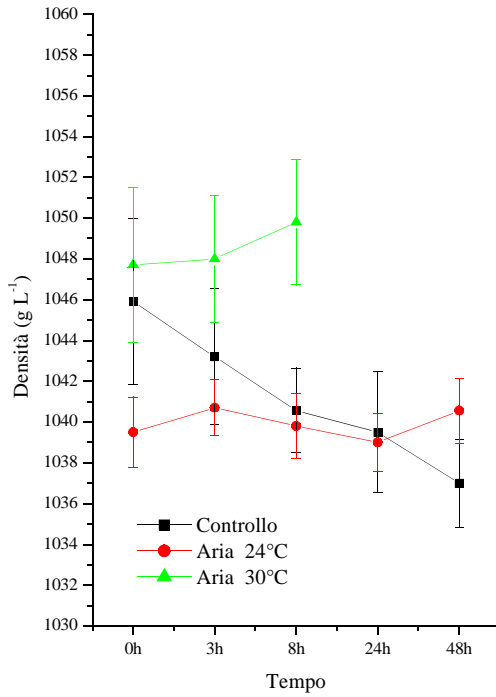
Il grafico in figura 17E mostra come la densità dell'emolinfa ($1039,50 \pm 1,71$ es g L⁻¹ 0h) dei granchi che sono stati trasferiti dalla stabulazione a 22° C ad ambiente subaereo 24° C non abbia subito, in tutto il periodo sperimentale, variazioni significative né dal valore iniziale né dal gruppo di controllo ($P>0,05$).

Il passaggio all'aria a 30° C ha causato invece un graduale aumento della densità dell'emolinfa da una media iniziale di $1047,70 \pm 3,79$ es g L⁻¹ a $1049,80 \pm 3,07$ es g L⁻¹ dopo 8h di esposizione ($P>0,05$ vs 0h, $P=0,024$ vs controllo).

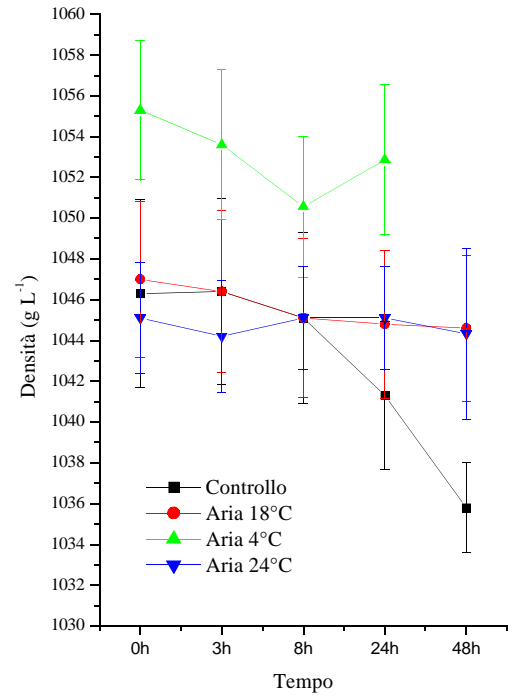
Dopo il passaggio dei granchi (n=10) all'aria a 18° C la densità dell'emolinfa cala nelle 48h; la media iniziale è infatti stata $1047,00 \pm 3,82$ es g L⁻¹, scesa poi a $1044,80 \pm 3,63$ es g L⁻¹ a 24 ($P=0,040$) e a $1044,60 \pm 3,59$ es g L⁻¹ a 48h ($P=0,011$); questo gruppo non è mai stato significativamente diverso da quello di controllo ($P>0,05$).

Il trasferimento di un gruppo di granchi a 4° C (n=10) non ha determinato variazioni significative della densità dell'emolinfa rispetto al tempo 0h; solo la media al tempo 48h ($1052,86 \pm 3,69$ es g L⁻¹) è significativamente diversa da quella ottenuta allo stesso tempo nel gruppo di controllo ($P=0,042$).

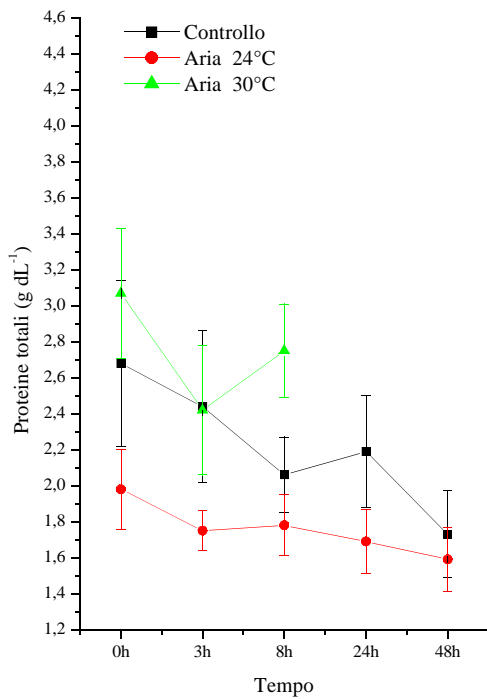
L'esposizione di granchi mantenuti a 18° C (n=10) e in posti poi in emersione a 24° C non ha determinato variazioni significative della densità dell'emolinfa ($P>0,05$). (Appendice, tavola 5C; figure 17E e 17F).



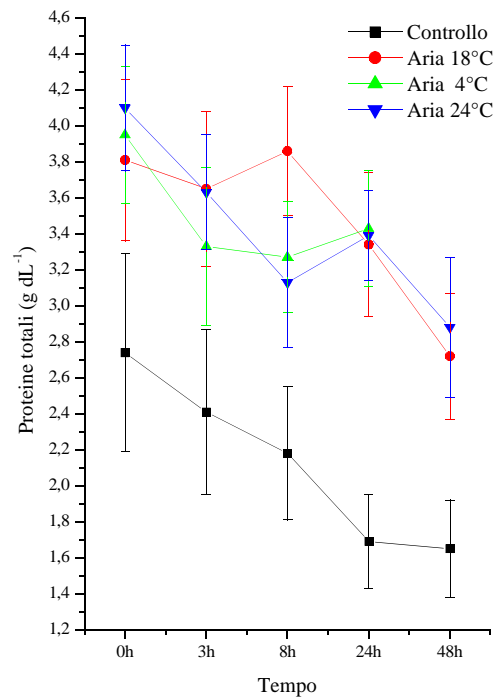
E



F



G



H

Figura 17: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *C. aestuarii* esposto in ambiente subaereo a diverse temperature; in E e G sono riportate le medie \pm es nei gruppi partiti da acqua a 24° C, in F e H quelle nei gruppi partiti da 18° C.

3.1.6.4 Proteine

Dopo il passaggio di *C. aestuarii* dalla condizione di stabulazione di 22° C ad ambiente subaereo a 24° C le proteine totali, inizialmente di $1,98 \pm 0,22$ es g dL⁻¹, diminuiscono progressivamente durante tutto l'esperimento, e le medie osservate a 24 e 48h, rispettivamente di $1,69 \pm 0,18$ es g dL⁻¹ e $1,59 \pm 0,18$ es g dL⁻¹, sono significativamente diverse rispetto al tempo 0h (P=0,023, P=0,001) ma non rispetto al controllo (P>0,05).

Nel gruppo (n=10) esposto in aria a 30° C le proteine totali iniziali sono state $3,07 \pm 0,36$ es g dL⁻¹ valore che cala significativamente dopo 3h di esposizione ($2,42 \pm 0,36$ es g dL⁻¹, P=0,006). A 8h la concentrazione di proteine totali non è diversa né dal tempo 0h, né dal gruppo di controllo (P>0,05).

Anche nel caso del passaggio da 18° C in acqua alla stessa temperatura in aria, si è osservata una diminuzione della concentrazione delle proteine totali; dalla condizione iniziale di $3,81 \pm 0,45$ es g dL⁻¹, sono infatti diminuite fino a $3,34 \pm 0,40$ es g dL⁻¹ a 24h (P=0,022 vs 0h, P=0,003 vs controllo), ed ulteriormente fino alle 48h (P=0,001 vs 0h, P=0,026 vs controllo).

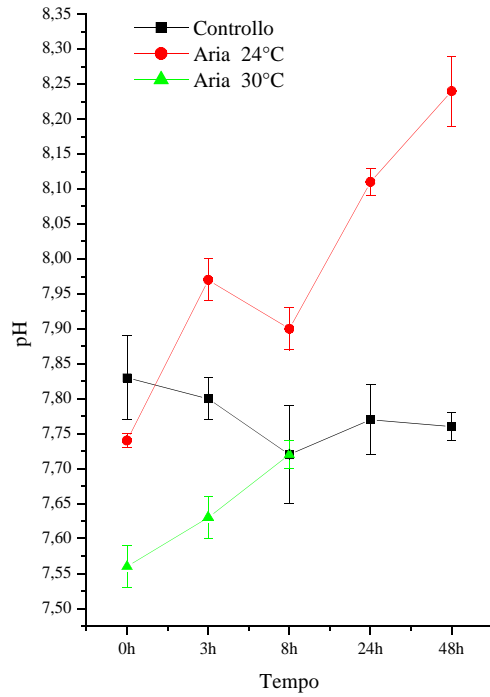
I granchi (n=10) posti a 4° C non hanno subito variazioni significative della concentrazione di proteine né rispetto al tempo 0h né dal gruppo di controllo.

Il passaggio all'aria a 24° C ha determinato una diminuzione costante delle proteine totali presenti nell'emolinfa. La loro concentrazione pari a $4,10 \pm 0,35$ es g dL⁻¹ al tempo 0h è significativamente calata dopo 3, 8 e 24h di esposizione (rispettivamente P=0,0001, P=0,0001, P=0,003 vs 0h). Questo gruppo non è però significativamente diverso da quello di controllo (P>0,05) (Appendice, tavola 5D; figure 17G e 17H).

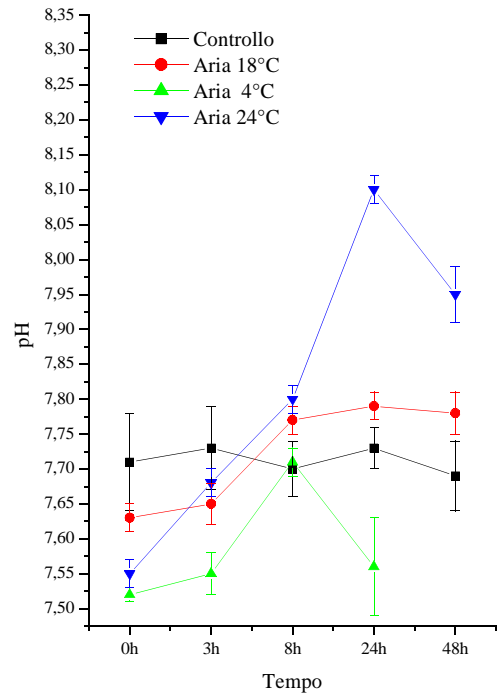
3.1.6.5 pH

Dopo il passaggio di due gruppi di granchi (n=10) dalle vasche di stabulazione a 22° C ad ambiente subaereo a 24° C o a 30° C il valore iniziale del pH dell'emolinfa, aumenta in maniera significativa a tutti i tempi sia rispetto al tempo 0h che rispetto al gruppo di controllo (P<0,05).

L'esposizione di questa specie (n=10) all'aria a 18° C, partendo dalla condizione di 18° C, ha causato un aumento progressivo nel valore del pH; la media iniziale di $7,63 \pm 0,02$ es è infatti passata a $7,77 \pm 0,02$ es al tempo 8h (P=0,0001). Il pH si è mantenuto significativamente alto rispetto alla condizione iniziale anche ai tempi successivi (P<0,05). Non si evidenziano però differenze significative (P>0,05) rispetto al controllo.



I



L

Figura 17: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *C. aestuarii* esposto in ambiente subaereo a diverse temperature; in I sono riportate le medie \pm es nei gruppi partiti da acqua a 24° C, in L quelle nei gruppi partiti da 18° C.

Nell'emersione a 4° C la media iniziale del pH è stata $7,52 \pm 0,01$ es; durante il corso dell'esperimento solo il picco ottenuto a 8h ($7,71 \pm 0,02$ es) è risultato significativamente diverso dalle 0h ($P=0,0001$). Le medie ai tempi 0 e 3h sono state significativamente diverse dagli stessi tempi nel gruppo di controllo ($P<0,05$).

Anche il trasferimento del gruppo di granchi ($n=10$) da 18° C a condizioni subaeree a 24° C ha causato un costante innalzamento del pH significativo a tutti i tempi di prelievo ($P<0,05$); le medie ai tempi 24 e 48h sono significativamente diverse da quelle ottenute agli stessi tempi nel gruppo di controllo ($P<0,05$) (Appendice, tavola 5E; figure 17I e 17L).

3.1.6.6 Cloruri

Considerando la concentrazione di cloruri nei due gruppi di granchi ($n=20$) stabulati a 22° C e poi esposti all'aria a 24 e 30° C, il valore iniziale rispettivamente di $8,05 \pm 0,29$ es mmoL L^{-1} e $9,79 \pm 0,17$ es mmoL L^{-1} , è aumentato significativamente rispetto al tempo 0h ($P<0,05$). I due gruppi non sono significativamente diversi dal gruppo di controllo ($P>0,05$).

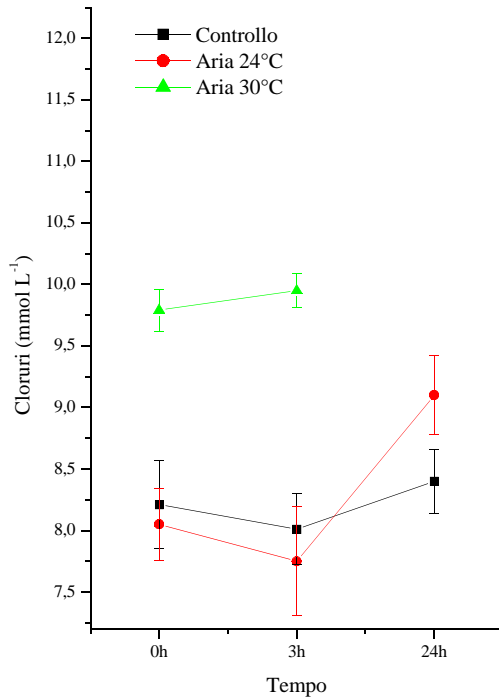
La concentrazione iniziale dei cloruri nel gruppo di granchi utilizzato per l'esposizione all'aria a 18° C ($n=10$) è stata $8,85 \pm 0,18$ es mmoL L^{-1} con un picco dopo 3h di $9,50 \pm 0,28$ es mmoL L^{-1} ($P=0,014$ vs 0h, $P>0,05$ vs controllo) il valore poi torna sul livello iniziale ($P>0,05$) e non risulta significativamente diverso neppure dal gruppo di controllo ($P>0,05$).

Dopo il passaggio dalle vasche di stabulazione a 18° C ad ambiente subaereo a 4° C, si assiste ad un calo nella concentrazione dei cloruri dei granchi ($n=10$) da $10,00 \pm 0,37$ es mmoL L^{-1} a $9,14 \pm 0,20$ es mmoL L^{-1} ($P=0,045$) nell'arco delle 3h. Il gruppo non è significativamente diversa da quello di controllo ($P>0,05$).

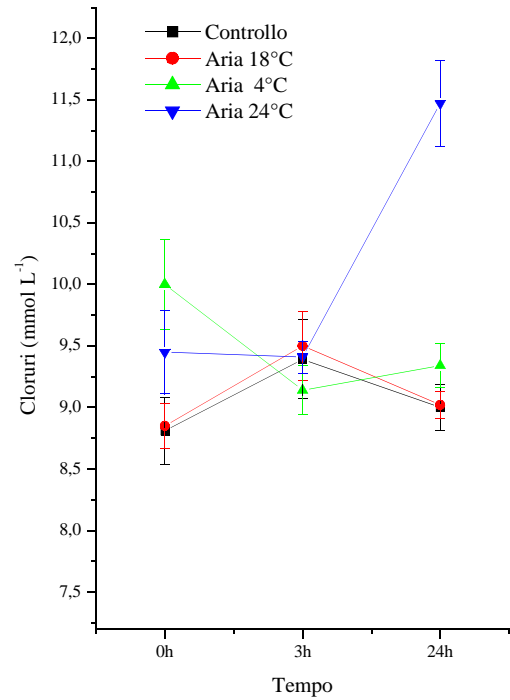
L'esposizione all'aria a 24° C, partendo dalla stabulazione a 18° C, ha indotto un aumento significativo nella concentrazione dei cloruri nell'emolinfa dei granchi ($n=10$) nell'arco delle 24h, tempo al quale la media è stata $11,47 \pm 0,35$ es mmoL L^{-1} ($P=0,0001$ vs 0h, $P=0,0001$ vs controllo) (Appendice, tavola 5F; figure 17M e 17N).

3.1.6.7 Calcio

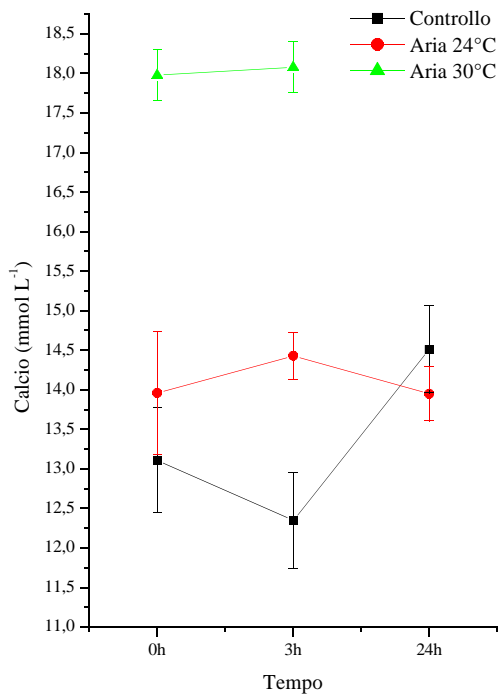
Come descritto per i cloruri, anche la concentrazione di calcio non è stata significativamente diversa dalla condizione iniziale ($P>0,05$) nei granchi utilizzati per gli esperimenti di emersione da 22° a 24° C ($n=20$). Il picco ottenuto nel gruppo esposto a 24° C a 3h è significativamente diverso da quello nel gruppo di controllo ($14,43 \pm 0,30$ es mmoL L^{-1} , $P=0,009$); nel gruppo esposto a 30° C sono



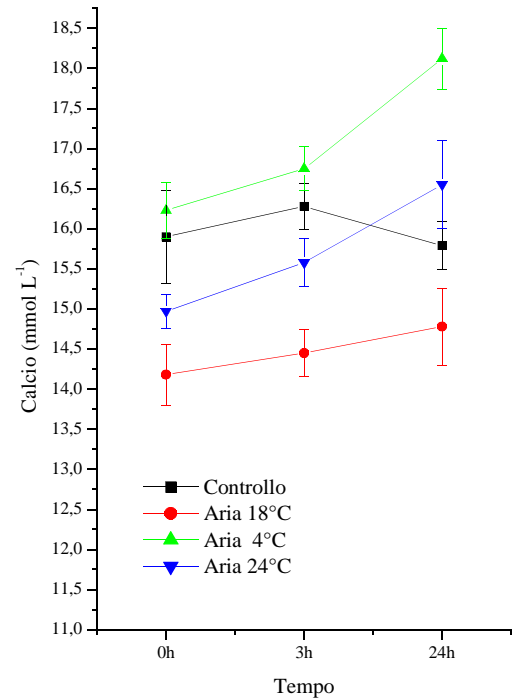
M



N



O



P

Figura 17: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *C. aestuarii* esposto in ambiente subaereo a diverse temperature; in M e O sono riportate le medie \pm es nei gruppi partiti da acqua a 24° C, in N e P quelle nei gruppi partiti da 18° C.

significativamente diversi dai dati misurati nel controllo quelli rilevati a 0h e 3h ($P < 0,05$) (Appendice, tavola 5G).

In seguito al trasferimento di *C. aestuarii* ($n=10$) all'aria alla temperatura di 18° C la concentrazione del calcio è aumentata ma non significativamente rispetto al tempo 0h ($P > 0,05$). La media iniziale ($14,18 \pm 0,18$ es mmoL L^{-1}) e quella a 3h ($14,45 \pm 0,29$ es mmoL L^{-1}) sono però significativamente diverse rispetto al gruppo di controllo ($P=0,025$ e $P=0,0001$ rispettivamente).

La concentrazione iniziale del calcio nei granchi utilizzati per l'esposizione all'aria a 4° C ($n=10$) è stata $16,23 \pm 0,35$ es mmoL L^{-1} . Il progressivo aumento fino al tempo 24h è stato significativo sia rispetto al tempo 0h che al gruppo di controllo ($18,12 \pm 0,35$ es mmoL L^{-1} , $P=0,010$ vs 0h, $P=0,0001$ vs controllo).

Anche il passaggio dall'acqua a 18° C all'aria a 24° C ha causato un progressivo aumento del calcio infatti partendo dalla concentrazione di $14,97 \pm 0,21$ es mmoL L^{-1} al tempo 0h la media aumenta fino a $16,55 \pm 0,55$ es mmoL L^{-1} a 24h ($P=0,007$). Le medie ottenute in questo gruppo non sono state significativamente diverse da quelle ai medesimi tempi nel gruppo di controllo ($P > 0,05$) (Appendice, tavola 5G; figure 17O e 17P).

In sintesi: partendo dalla temperatura dell'acqua di 22° C l'esposizione all'aria a 24 e 30° C causa alterazioni significative di tutti i parametri fisiologici, più evidenti alla temperatura maggiore. Nel caso dei gruppi partiti dalla temperatura dell'acqua di 18° C, nel gruppo esposto all'aria a 18° C, gli andamenti delle risposte fisiologiche sono stati simili a quelli osservati nei gruppi di controllo, sebbene vi siano state delle variazioni significative della glicemia, delle proteine totali e del pH. Negli altri due gruppi (aria a 4 e 24° C) si sono osservate variazioni significative di tutti i parametri fisiologici.

3.2 Palaemon elegans

3.2.1 Mortalità

Gruppi di animali sono stati utilizzati per verificare la sopravvivenza della specie all'esposizione diretta alle diverse condizioni sperimentali. Nella seguente tabella (tab. 4) vengono riportati i dati ottenuti, espressi in percentuale di individui morti.

Tabella 4: mortalità osservata in *P. elegans* durante gli esperimenti di esposizione diretta alle diverse condizioni (dati espressi in percentuale).

	0h	3h	8h	24h	48h	TOT
6°C	0	0	0	0	0	0
12°C	0	0	0	0	0	0
18°C	0	0	0	0	0	0
24°C	0	0	17	33	90	90
30°C	0	11	29	86	100	100
6 PSU	0	0	0	10	17	17
16 PSU	0	0	0	0	3	3
26 PSU	0	0	0	0	0	0
36 PSU	0	0	0	0	0	0
46 PSU	0	0	0	0	0	0

La mortalità indotta dall'esposizione graduale è sempre stata annotata sia nel corso delle modificazioni delle condizioni di salinità o temperatura, che durante il periodo di adattamento. Di seguito viene riportata la tabella 5 (percentuale di individui morti) in cui sono indicati i dati osservati dopo il raggiungimento di una salinità o temperatura definitiva, e dopo il periodo di adattamento di 14 giorni.

Tabella 5: mortalità osservata in *P. elegans* durante gli esperimenti di esposizione graduale alle diverse condizioni (dati espressi in percentuale).

	0h	14d	TOT
6°C	0	0	0
12°C	0	0	0
6 PSU	95,0	5,0	100,0
16 PSU	87,8	12,2	100,0
26 PSU	14,7	2,0	16,7
46 PSU	6,7	8,7	15,3

3.2.2 Esposizione diretta: salinità

3.2.2.1 Glicemia

La concentrazione del glucosio nell'emolinfa di *P. elegans* (n=25) a 36 PSU prima dell'esposizione alle diverse salinità (tempo 0h e controllo) è stata $12,20 \pm 0,58$ es mg dL⁻¹.

Gli andamenti glicemici nel tempo, a tutte le salinità, sono riportate nel grafico in figura 18A.

Nei gamberetti (n=120) posti alla salinità 6 PSU, la glicemia aumenta gradualmente nell'arco delle 48h, quando la media di $12,20 \pm 0,58$ es mg dL⁻¹ è significativamente diversa dal tempo 0h (P=0,008).

In *P. elegans* esposto a 16 PSU (n=120) nonostante il picco glicemico osservato dopo 3h e i livelli di glucosio più alti rispetto al tempo 0h essi non risultano statisticamente significativi (P>0,05).

La salinità 26 PSU causa invece un progressivo aumento della concentrazione di glucosio fino al tempo 8h ($18,80 \pm 1,36$ es mg dL⁻¹, P=0,005 tornando poi sui valori iniziali (P>0,05).

L'esposizione di *P. elegans* (n=120) a 46 PSU ha determinato un immediato significativo aumento della glicemia rispetto al valore iniziale ($22,00 \pm 2,97$ es mg dL⁻¹, P=0,028) ma le medie ai tempi successivi non sono significativamente diverse dal controllo (P>0,05). (Appendice, tavola 6A)

3.2.2.2 Acido lattico

La concentrazione di acido lattico iniziale nei gamberetti (n=25) a 36 PSU, è stata $6,62 \pm 1,16$ es mg dL⁻¹.

Il grafico in figura 18B mostra come l'esposizione di *P. elegans* alla salinità 6 PSU (n=120) e alla salinità 16 PSU (n=120) ha indotto un aumento significativo della concentrazione di acido lattico a tutti i tempi (P<0,05).

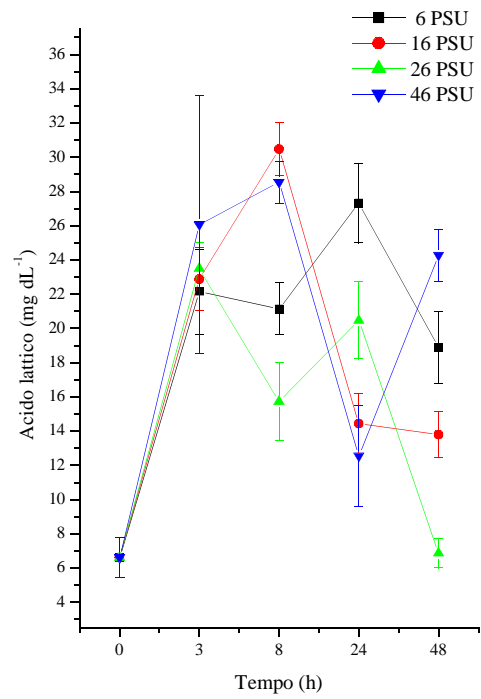
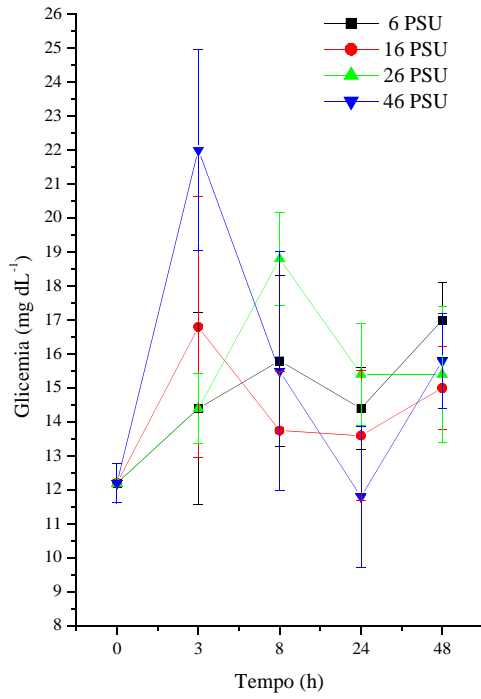
La salinità 26 PSU ha invece causato aumenti significativi nella concentrazione di acido lattico nell'emolinfa di *P. elegans* (n=120) fino a 24h (P<0,05), mentre a 48h i valori si approssimano a quello iniziale (P>0,05).

A 46 PSU assistiamo ad un aumento della concentrazione di acido lattico fino a 8h, quando la media di $28,55 \pm 1,24$ es mg dL⁻¹ è significativamente diversa dal tempo 0h (P=0,0001). Dopo una successiva diminuzione osservata al tempo 24h, a 48h l'acido lattico torna ad aumentare in maniera significativa rispetto al valore iniziale (P=0,0001) (Appendice, tavola 6B, figura 18B).

3.2.2.3 Densità

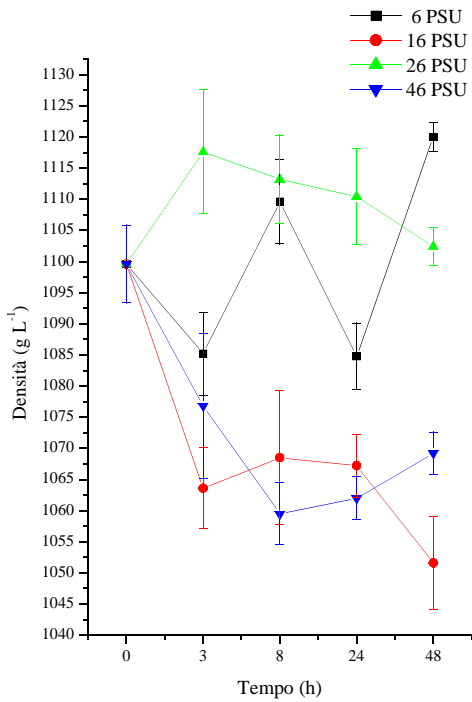
Prima dell'esposizione alle diverse salinità, la densità dell'emolinfa dei gamberetti (n=25) è stata $1099,60 \pm 6,24$ es mg dL⁻¹.

In Appendice, tavola 6C, e dal grafico in figura 18C, si possono osservare gli andamenti delle medie delle densità dell'emolinfa nei gruppi sperimentali alle diverse salinità.



A

B



C

D

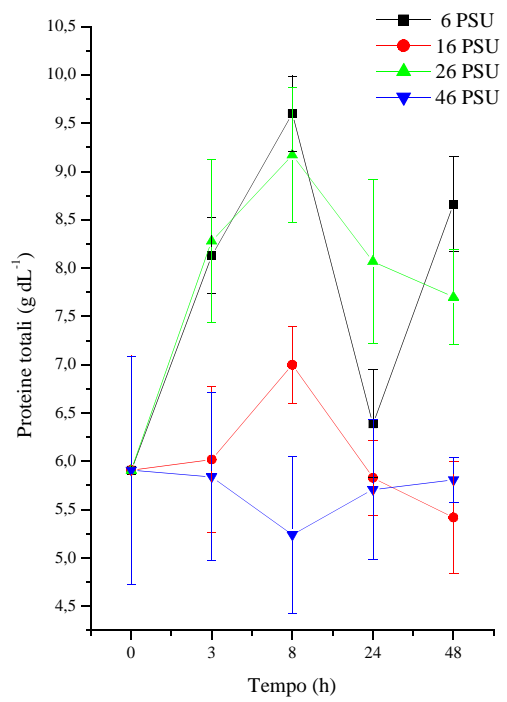


Figura 18: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *P. elegans* esposto direttamente alle diverse salinità.

Le variazioni della densità dell'emolinfa di *P. elegans* a 6 PSU (n=120) non sono risultate significative ($P>0,05$) fino al tempo 24h, mentre la media ottenuta a 48 h ($1120,00 \pm 2,28$ es mg dL^{-1}) è significativamente più alta ($P<0,05$) rispetto al tempo 0h. La salinità 16 PSU induce un'immediata diminuzione della densità emolinfatica risultata significativamente diversa da quella iniziale a tutti i tempi ($P<0,05$) contrariamente a 26 PSU non si sono osservate variazioni significative della densità dell'emolinfa ($P>0,05$).

L'esposizione a 46 PSU dei gamberetti (n=120) causa una diminuzione della densità dell'emolinfa; le medie ottenute ai tempi 8, 24 e 48h sono risultate significativamente diverse da quella iniziale ($P<0,05$).

3.2.2.4 Proteine

La concentrazione delle proteine totali emolinfatiche in *P. elegans* (n=25) mantenuto alla salinità 36 PSU è stata $6,51 \pm 0,84$ es g dL^{-1} .

A 6 PSU si rileva un aumento delle proteine totali nell'emolinfa fino a 8h quando la media ($9,60 \pm 0,39$ es g dL^{-1}) è risultata significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,027$).

Tutte le altre salinità (16, 26 e 46 PSU), non hanno indotto variazioni significative ($P>0,05$ sempre) della concentrazione delle proteine totali nell'emolinfa dei gamberetti utilizzati (n=120 per ciascun gruppo) (Appendice, tavola 6D; figura 18D).

3.2.2.5 pH

Il pH dell'emolinfa nei gamberetti a 36 PSU (n=25), prima della loro esposizione a salinità modificata, è stato $7,62 \pm 0,04$ es; gli andamenti temporali del parametro alle diverse condizioni sperimentali sono mostrati nel grafico in figura 18E.

Alla salinità di 6 PSU il pH dell'emolinfa di *P. elegans* (n=120) aumenta già dopo 3h ($7,96 \pm 0,01$ es, $P=0,001$), e rimane significativamente più alto rispetto al tempo 0h ($P<0,05$) fino a 24h.

La salinità 16 PSU non ha causato variazioni significative ($P>0,05$) nel pH dell'emolinfa dei gamberetti utilizzati per l'esperimento (n=120).

Dopo 3h di esposizione a 26 PSU, il pH aumenta fino a $7,91 \pm 0,04$ es, media significativamente più alta rispetto al tempo 0h ($P=0,0001$). Ai tempi successivi fino a 24h il parametro si mantiene significativamente più alto ($P<0,05$).

Il pH dell'emolinfa di *P. elegans* esposto a 46 PSU (n=120) invece non subisce variazioni statisticamente significative a nessun tempo considerato ($P>0,05$) (Appendice, tavola 6E).

3.2.2.6 Cloruri

La concentrazione iniziale dei cloruri in *P. elegans* mantenuto a 36 PSU (n=25) è $5,64 \pm 0,80$ es mmol L⁻¹.

Nel grafico 18F si possono seguire gli andamenti delle medie in seguito all'esposizione dei gamberetti alle diverse salinità.

A 6 PSU i cloruri nell'emolinfa di *P. elegans* (n=120) aumentano significativamente dopo 3h ($8,65 \pm 1,00$ es mmol L⁻¹, P=0,047) ma al tempo 24h la media non è significativamente diversa dal tempo 0h (P>0,05).

La salinità 16 PSU non causa variazioni significative (P>0,05) nella concentrazione dei cloruri nell'emolinfa.

L'esposizione di *P. elegans* alle salinità 26 PSU (n=120) e 46 PSU (n=120) ha invece determinato un graduale aumento dei cloruri fino a 24h, quando le medie, rispettivamente di $8,46 \pm 0,31$ es mmol L⁻¹ e $8,23 \pm 0,21$ es mmol L⁻¹, sono risultate significativamente diverse dal tempo 0h (P<0,05) (Appendice, tavola 6F).

3.2.2.7 Calcio

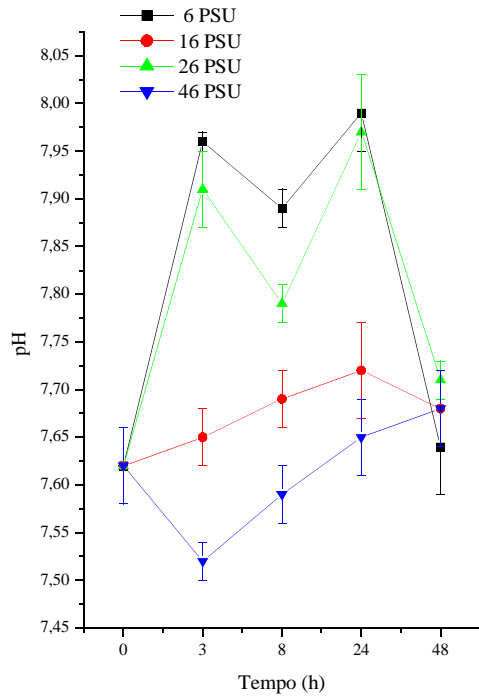
Al tempo 0h il calcio nell'emolinfa del gruppo di controllo è stato $11,23 \pm 0,34$ es mmol L⁻¹ (n=25).

L'esposizione a 6 PSU (n=120) determina una graduale diminuzione del calcio fino a 24h, quando la media è risultata significativamente diversa dal tempo 0h (P=0,032).

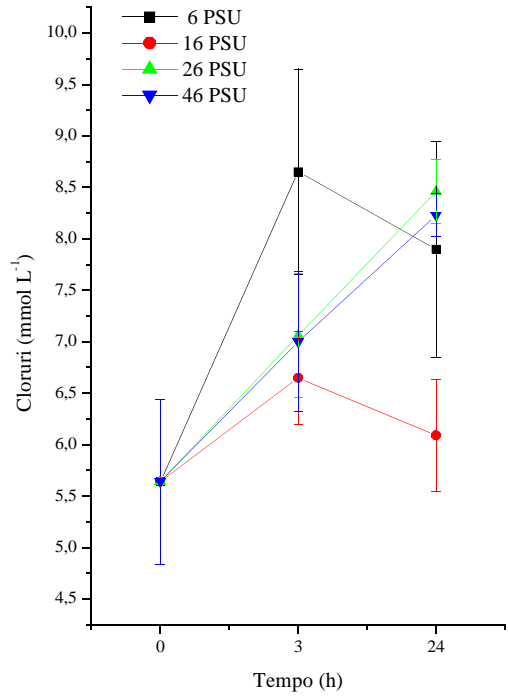
Le variazioni del calcio nell'emolinfa dei gamberetti esposti alle salinità 16 PSU (n=120), 26 PSU (n=120) e 46 PSU (n=120) non sono mai state significativamente diverse dal controllo (P>0,05) (Appendice, tavola 6G; figura 18G).

Lo stress osmotico acuto induce in *P. elegans* alterazione di tutti i parametri fisiologici. L'esposizione a 46 PSU è quella che causa un maggior aumento della glicemia e l'unica che determina una diminuzione della concentrazione delle proteine totali entro le 8h e diminuzione del pH.

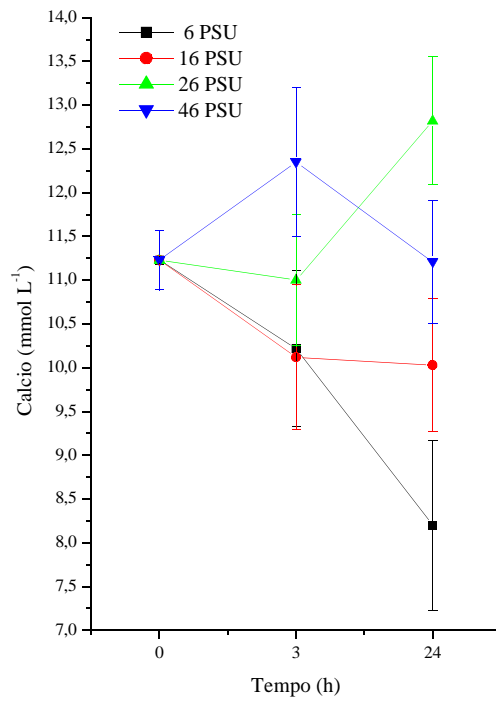
Dall'analisi dell'andamento del cloro è risultato che l'esposizione a salinità modificata determina sempre aumenti nella concentrazione dei cloruri entro 3h, e del calcio a 26 PSU dopo 24h.



E



F



G

Figura 18: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *P. elegans* esposto direttamente alle diverse salinità.

3.2.3 Esposizione graduale e adattamento: salinità

Vengono di seguito descritti gli andamenti dei parametri fisiologici in *P. elegans* in seguito all'esposizione graduale alle diverse salinità. Per le salinità 6 e 16 PSU, vista l'elevata mortalità, è stato possibile valutare solo il tempo 0h.

3.2.3.1 Glicemia

L'esposizione graduale di *P. elegans* (n=200) alla salinità 6 PSU non ha causato variazioni significative ($P>0,05$) della concentrazione di glucosio rispetto al controllo mantenuto a 36 PSU; viceversa, l'esposizione a 16 PSU (n=180) ha indotto una diminuzione della glicemia ($10,50 \pm 0,29$ es mg dL⁻¹) significativa rispetto al controllo ($P=0,042$) (Appendice, tavola 7A; figura 19A).

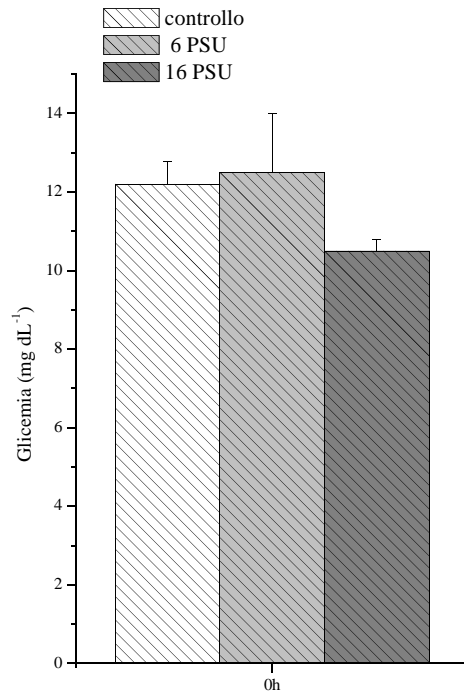
Dopo il trasferimento dei gamberetti da 36 PSU a 26 PSU (n=150) la glicemia iniziale è stata $10,75 \pm 0,48$ es mg dL⁻¹ ($P>0,05$ vs controllo). Ai tempi successivi, gli aumenti osservati non sono risultati significativamente diversi dal tempo 0h ($P>0,05$), ma il valore di picco ottenuto 8h ($12,75 \pm 1,44$ es mg dL⁻¹) è significativamente diverso da quello ottenuto allo stesso tempo nel gruppo posto direttamente alla stessa salinità ($P=0,019$). Dopo due settimane di permanenza a questa salinità la concentrazione di glucosio circolante nell'emolinfa è significativamente più bassa rispetto al controllo mantenuto a 36 PSU ($10,00 \pm 0,58$ es mg dL⁻¹, $P=0,041$) (Appendice, tavola 7A; figure 19B e 19D).

La glicemia al tempo 0h nel gruppo trasferito gradualmente a 46 PSU (n=150) è stata $12,50 \pm 1,04$ es mg dL⁻¹, non significativamente diversa dal controllo ($P>0,05$). Come si può vedere dal grafico in figura 19C, nell'arco delle 48h successive non si sono osservate variazioni significative ($P>0,05$) rispetto al tempo 0h; i valori ottenuti a 3h ($13,75 \pm 1,03$ es mg dL⁻¹) e 8h ($11,25 \pm 1,03$ es mg dL⁻¹) sono però significativamente più bassi rispetto a quelli misurati agli stessi tempi nel gruppo posto direttamente a 46 PSU ($P<0,05$). Al tempo 14d la glicemia non è significativamente diversa dal controllo ($P>0,05$) (Appendice, tavola 7A; figura 19D).

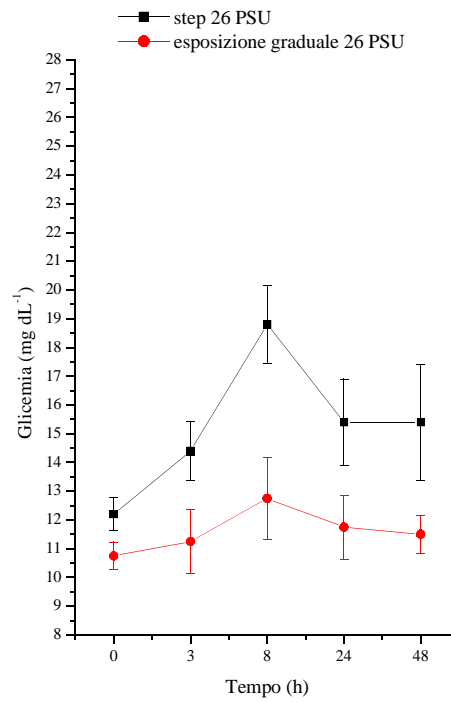
3.2.3.2 Acido lattico

Il trasferimento progressivo alle salinità 6 PSU (n=200) e 16 PSU (n=180) non ha causato variazioni significative nella concentrazione di acido lattico nell'emolinfa di *P. elegans* ($P>0,05$) (Appendice, tavola 7B; figura 20A).

La concentrazione iniziale di acido lattico nell'emolinfa misurata a 26 PSU è $12,45 \pm 2,06$ es mg dL⁻¹ ($P>0,05$ vs controllo). Ai tempi successivi non si sono osservate

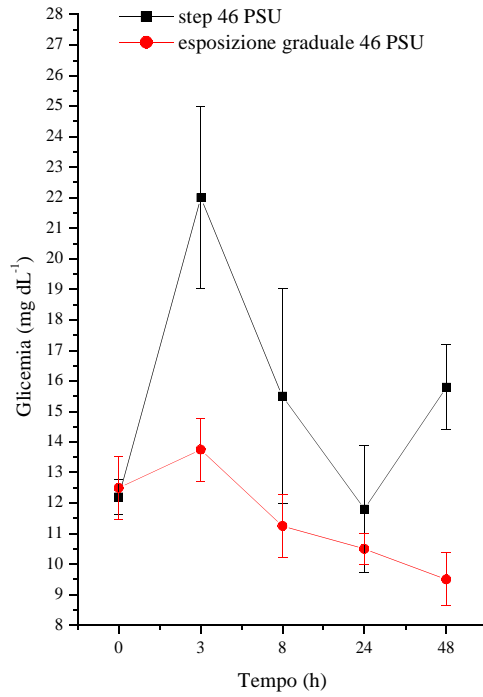


A

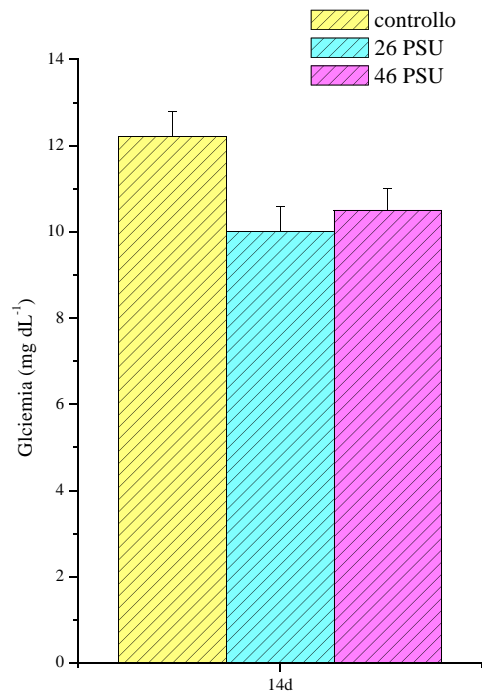


B

Figura 19: in A glicemia in *P. elegans* dopo il periodo di esposizione graduale a 6 e 16 PSU; in B andamento nel tempo della glicemia in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 26 PSU.

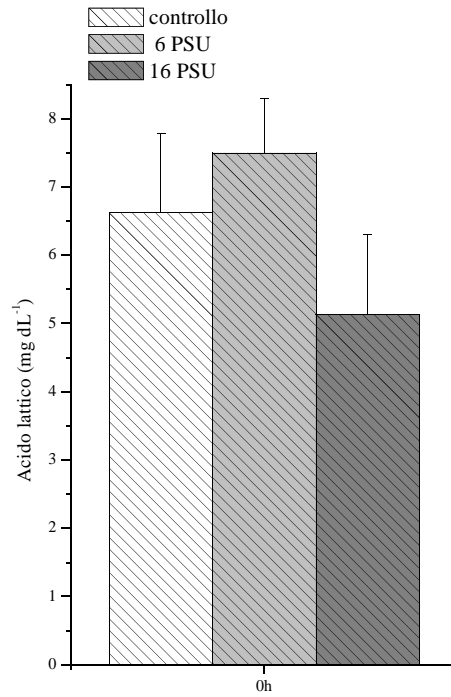


C

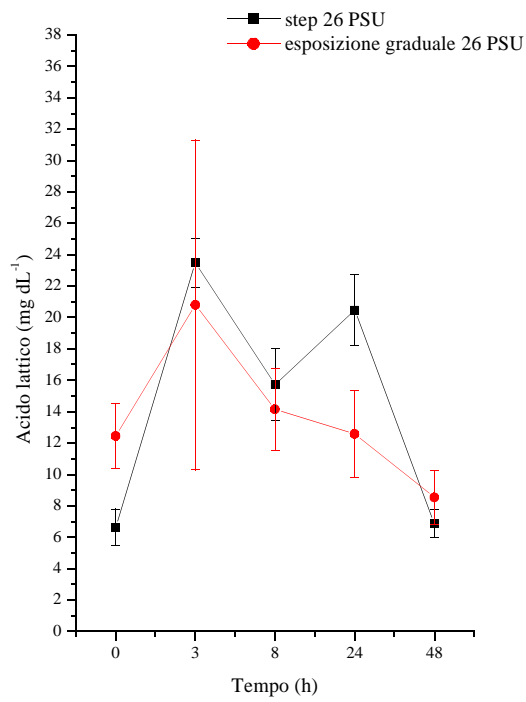


D

Figura 19: in C andamento nel tempo della glicemia in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 46 PSU; in D glicemia in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 26 e 46 PSU.

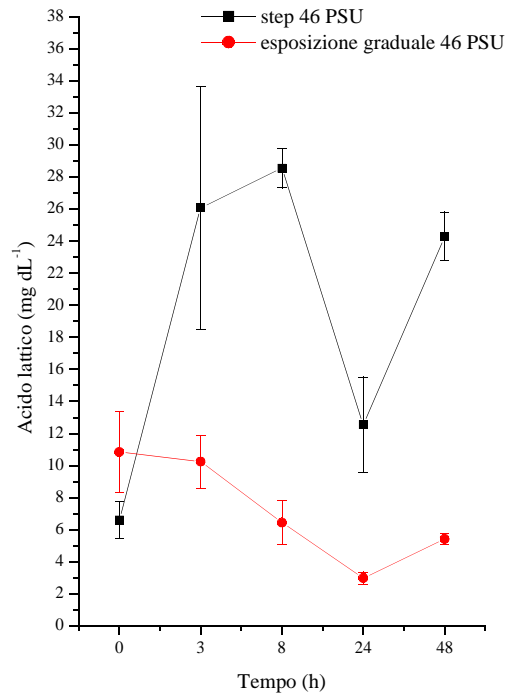


A

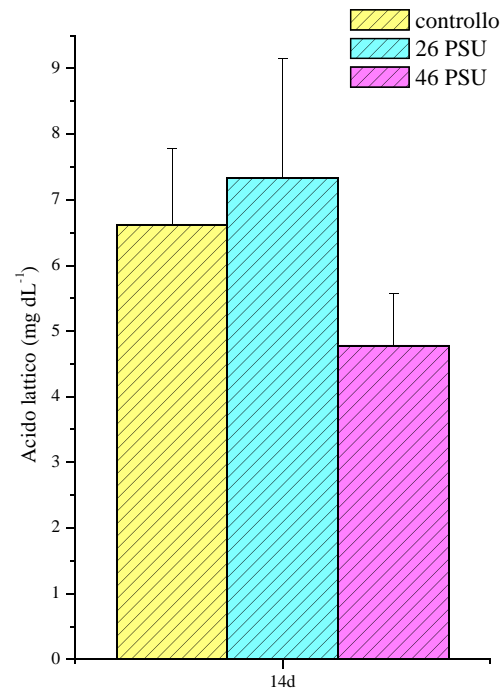


B

Figura 20: in A latticemia in *P. elegans* dopo il periodo di esposizione graduale a 6 e 16 PSU; in B andamento nel tempo della latticemia in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 26 PSU.



C



D

Figura 20: in C andamento nel tempo della latticemia in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 46 PSU; in D latticemia in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 26 e 46 PSU.

variazioni significativamente diverse né dal tempo 0h né dal gruppo utilizzato nello step a 26 PSU ($P>0,05$) (Appendice, tavola 7B; grafici 20B e 20D).

La salinità 46 PSU, dove la concentrazione iniziale di acido lattico in *P. elegans* ($n=150$) è stata $10,85 \pm 2,51$ es mg dL⁻¹, non ha prodotto variazioni significative rispetto al tempo 0h ($P>0,05$). Dal confronto con il gruppo esposto direttamente alla stessa salinità però sono risultate significative più basse le medie ai tempi 8, 24 e 48h ($P<0,05$). Dopo 14d, l'acido lattico pari a $4,78 \pm 0,69$ es mg dL⁻¹ non è significativamente diverso dal controllo ($P>0,05$) (Appendice, tavola 7B; figure 20C e 20D).

3.2.3.3 Densità

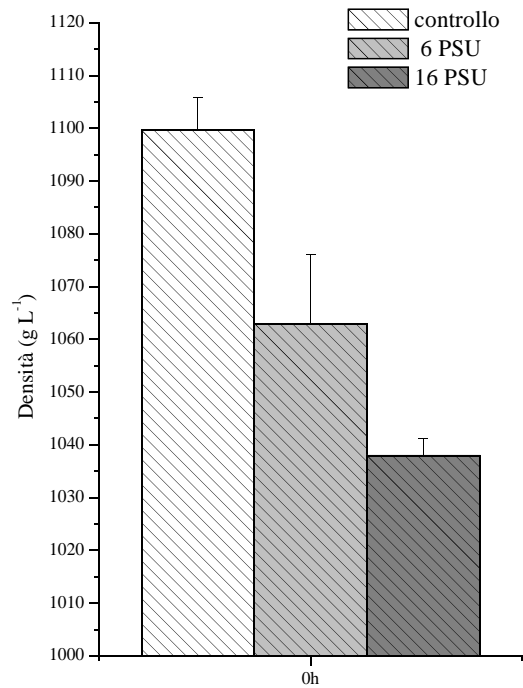
La densità iniziale dell'emolinfa di *P. elegans* esposto a 6 PSU ($n=200$) è stata di $1063,00 \pm 13,00$ es g L⁻¹ non significativamente diversa dal controllo ($P=0,167$). Alla salinità 16 PSU invece la densità di $1038,00 \pm 3,16$ es g L⁻¹ è significativamente più bassa rispetto al controllo ($P=0,0001$) (Appendice, tavola 7C; figura 21A).

Il trasferimento graduale dei gamberetti dalla salinità di 36 PSU a 26 PSU ha causato una diminuzione significativa della densità dell'emolinfa ($1059,00 \pm 3,42$ es g L⁻¹) rispetto al controllo ($P=0,001$). Come si può vedere dal grafico in figura 21B, nelle 48h sperimentali, la densità dell'emolinfa non ha subito variazioni significative rispetto al tempo 0h ($P>0,05$), ma si è sempre mantenuta significativamente più bassa rispetto al gruppo esposto direttamente a 26 PSU ($P<0,05$). A 14d la densità ($1060,00 \pm 4,00$ es g L⁻¹) è significativamente più bassa rispetto al controllo ($P=0,002$) (Appendice, tavola 7C; figura 21D).

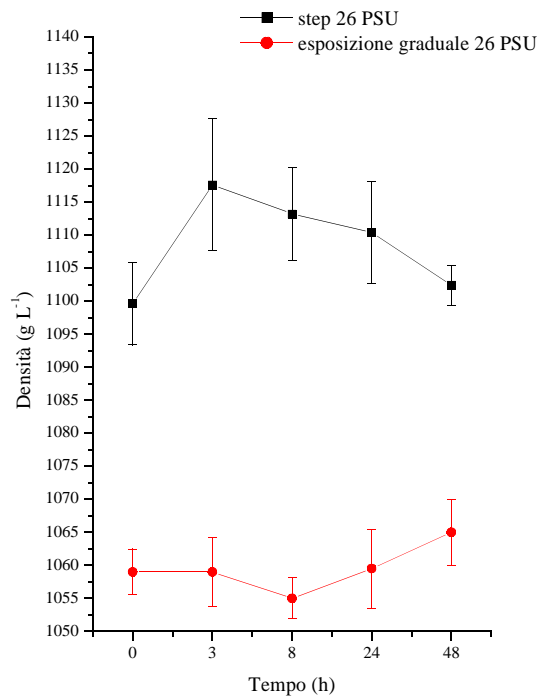
Dopo il trasferimento graduale alla salinità 46 PSU ($n=150$), la densità dell'emolinfa è risultata significativamente diversa dal controllo ($1078,50 \pm 6,08$ es g L⁻¹, $P=0,046$). Nell'arco dei tempi successivi dopo una prima diminuzione significativa osservata a 3h ($1054,50 \pm 5,97$ es g L⁻¹, $P=0,030$), la densità aumenta, ma rimane non significativamente diversa dal tempo 0h ($P>0,05$); i valori non sono mai risultati significativamente diversi da quelli agli stessi tempi nel gruppo utilizzato esposto direttamente alla medesima salinità ($P>0,05$). Dopo il periodo di adattamento di due settimane a 46 PSU, la densità di $1058,50 \pm 3,59$ es g L⁻¹, è significativamente più bassa rispetto al controllo ($P=0,001$) (Appendice, tavola 7C; figure 21C e 21D).

3.2.3.4 Proteine

Sia il trasferimento graduale di *P. elegans* alla salinità di 6 PSU ($n=200$) che alla salinità di 16 PSU ($n=180$) non causa variazioni significative ($P>0,05$) della

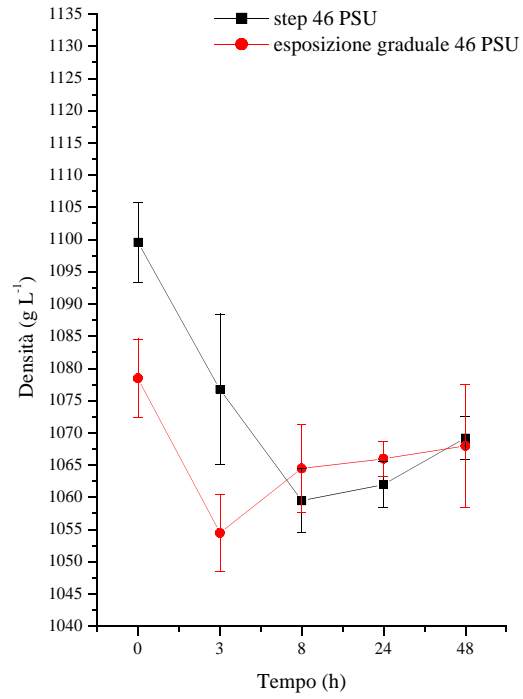


A

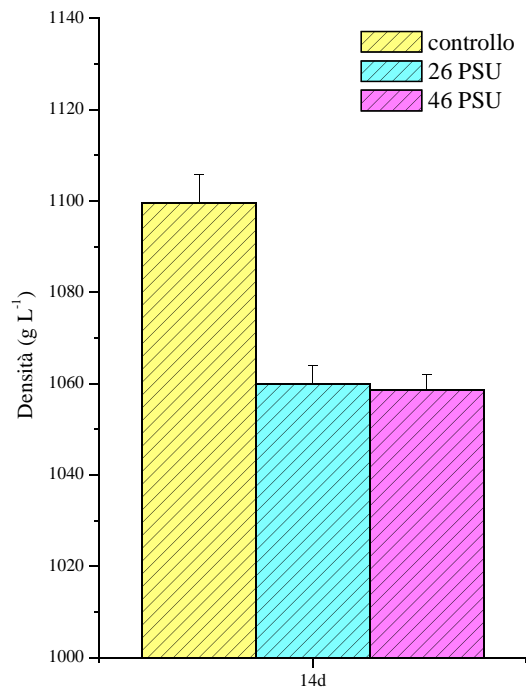


B

Figura 21: in A densità dell'emolinfa in *P. elegans* dopo il periodo di esposizione graduale a 6 e 16 PSU; in B andamento nel tempo della densità dell'emolinfa in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 26 PSU.

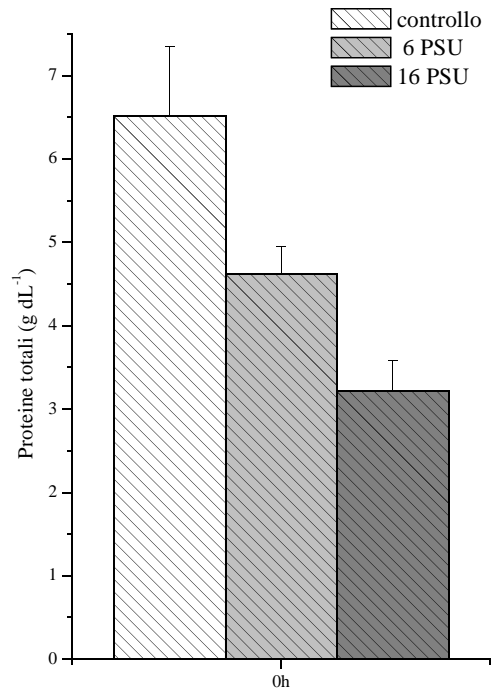


C

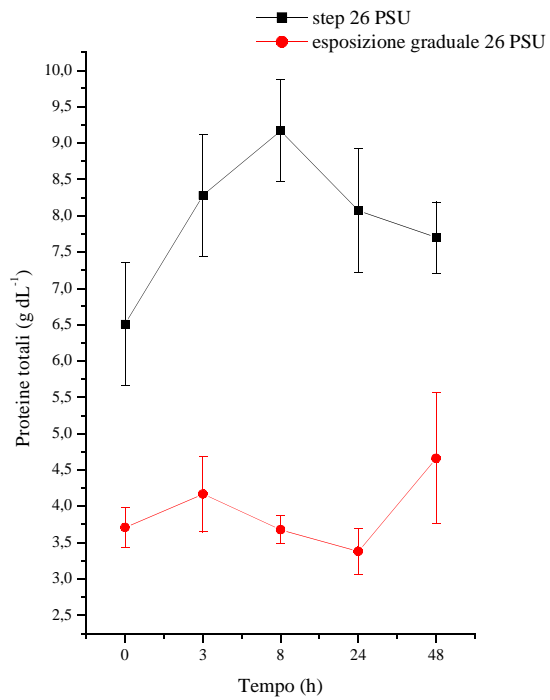


D

Figura 21: in C andamento nel tempo della densità dell'emolinfa in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 46 PSU; in D densità dell'emolinfa in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 26 e 46 PSU.

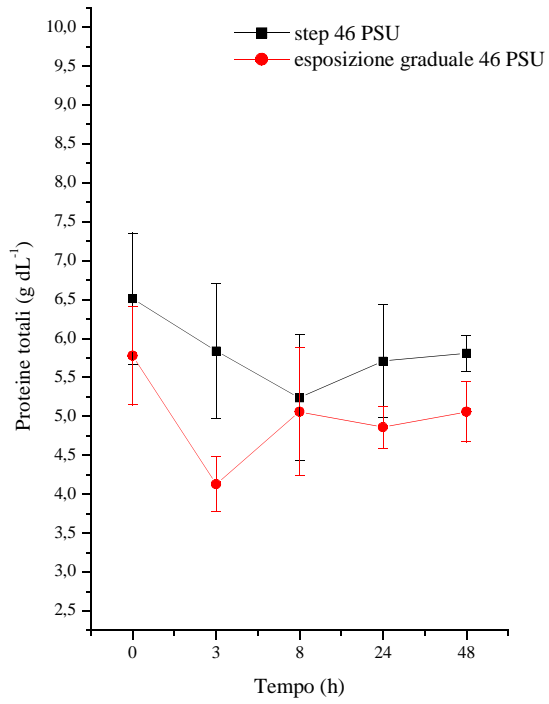


A

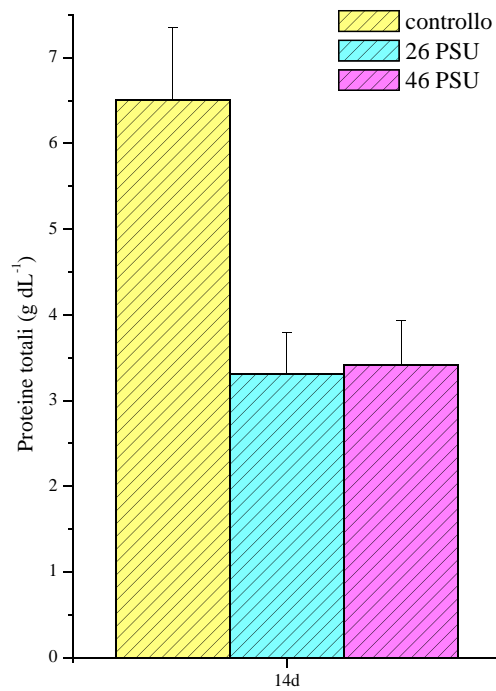


B

Figura 22: in A concentrazione delle proteine totali emolinfatice in *P. elegans* dopo il periodo di esposizione graduale a 6 e 16 PSU; in B andamento nel tempo della concentrazione delle proteine emolinfatice in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 26 PSU.



C



D

Figura 22: in C andamento nel tempo della concentrazione delle proteine emolinfatice in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 46 PSU; in D concentrazione delle proteine emolinfatice in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 26 e 46 PSU.

concentrazione delle proteine totali rispetto al controllo (Appendice, tavola 7D; figura 22A).

Il valore iniziale delle proteine ($3,71 \pm 0,27$ es g dL^{-1}) nell'emolinfa di *P. elegans* (n=150) portato a 26 PSU non è significativamente diverso dal controllo mantenuto a 36 PSU ($P>0,05$). Sebbene ai tempi successivi non si siano verificate variazioni significative delle proteine circolanti nell'emolinfa ($P>0,05$) rispetto al tempo 0h, la loro concentrazione è sempre significativamente più bassa rispetto al gruppo che ha subito lo step a 26 PSU ($P<0,05$). Al tempo 14d, le proteine totali ($3,31 \pm 0,48$ es g dL^{-1}) non sono significativamente diverse dal controllo ($P=0,095$) (Appendice, tavola 7D; figure 22B e 22D).

A 46 PSU le proteine totali non hanno subito variazioni significative nell'arco delle due settimane sperimentali ($P>0,05$), e non sono mai risultate significativamente diverse da quelle misurate negli animali esposti direttamente a 46 PSU ($P>0,05$) (Appendice, tavola 7D; figure 22C e 22D).

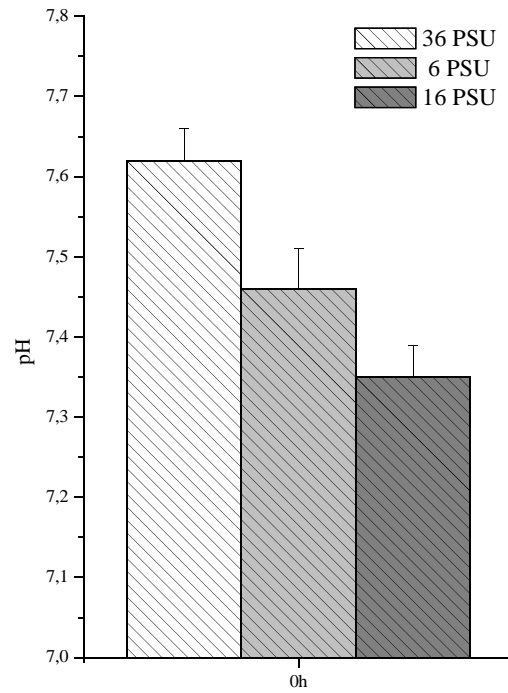
3.2.3.5 pH

Nei grafici in figura 23 vengono riportati gli andamenti del pH dell'emolinfa dei gamberetti esposti gradualmente alle diverse temperature.

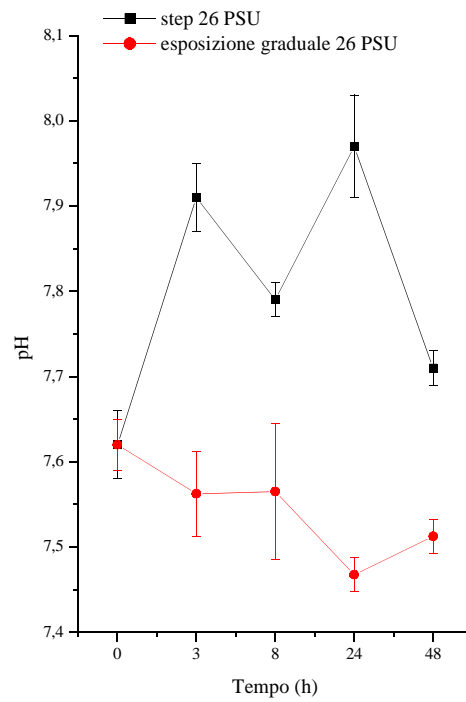
Il passaggio graduale dei gamberetti alla salinità 6 PSU (n=200), non ha determinato variazioni significative del pH dell'emolinfa rispetto a quello ottenuto nel gruppo di controllo ($P>0,05$). Viceversa il raggiungimento graduale della salinità 16 PSU determina una diminuzione del pH dell'emolinfa dei gamberetti esposti (n=180), risultato di $7,35 \pm 0,04$ es, significativo rispetto al controllo ($P=0,004$).

Il pH iniziale dell'emolinfa di *P. elegans* esposto gradualmente a 26 PSU (n=150) è stato $7,62 \pm 0,03$ es ($P>0,05$ vs controllo). Nel corso delle ore successive il pH subisce una progressiva diminuzione significativamente diversa dal tempo 0h ai tempi 24 e 48h (rispettivamente $7,46 \pm 0,02$ es, $P=0,007$; $7,51 \pm 0,02$ es, $P=0,025$). Rispetto al gruppo di gamberetti utilizzato per l'esposizione diretta a 46 PSU, è risultato significativamente più basso ($P<0,05$) il pH misurato al prelievo a 3, 24 e 48h (Appendice, tavola 7E). Dopo due settimane di adattamento a questa salinità il pH si mantiene significativamente più basso rispetto al controllo ($P<0,05$).

Nel passaggio da 36 PSU a 46 PSU (n=150), il pH dell'emolinfa ($7,73 \pm 0,03$ es) non è significativamente diverso dal controllo mantenuto a 36 PSU ($P>0,05$). Dopo 3h a 46 PSU il valore di pH ($7,85 \pm 0,02$ es) è significativamente diverso sia dal tempo 0h ($P=0,014$) che dallo quello misurato nel gruppo esposto direttamente a questa salinità

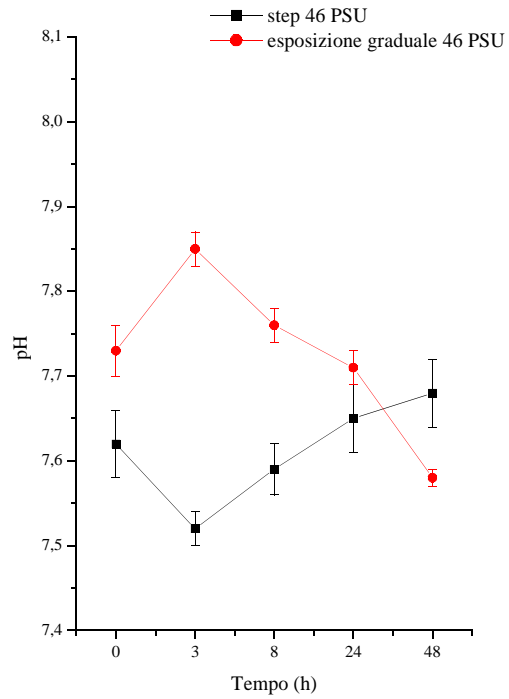


A

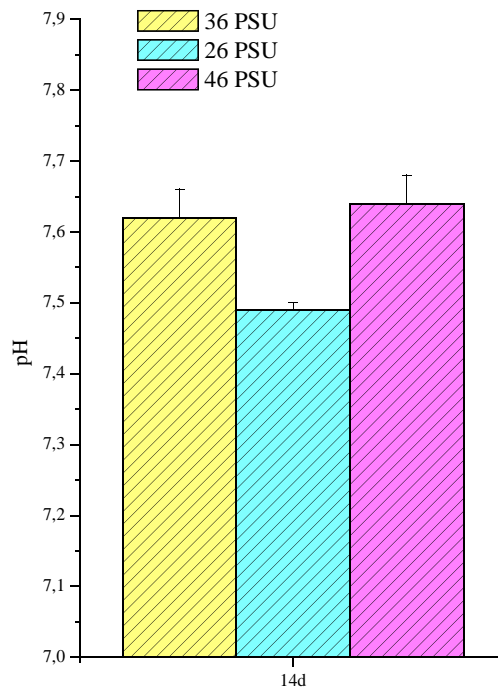


B

Figura 23: in A pH dell'emolinfa in *P. elegans* dopo il periodo di esposizione graduale a 6 e 16 PSU; in B andamento nel tempo del pH dell'emolinfa in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 26 PSU.



C



D

Figura 23: in C andamento nel tempo del pH dell'emolinfa in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 46 PSU; in D pH dell'emolinfa in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 26 e 46 PSU.

($P=0,0001$). Ai tempi successivi il pH torna a diminuire portandosi a 48h a $7,58 \pm 0,01$ es valore significativamente più basso dal tempo 0h ($P=0,005$). Dopo 14d, il pH non è significativamente diverso dal controllo ($P>0,05$) (Appendice, tavola 7E).

3.2.3.6 Cloruri

L'esposizione graduale di *P. elegans* a 6 PSU ($n=200$) e 16 PSU ($n=180$) non hanno determinato variazioni significative ($P>0,05$) della concentrazione dei cloruri nell'emolinfa rispetto al controllo (Appendice, tavola 7F; figura 24A).

Dal grafico in figura 24B è evidente che i cloruri nell'emolinfa dei gamberetti posti a 26 PSU (inizialmente $7,55 \pm 0,33$ es mmol L^{-1} , $n=150$), non subiscono variazioni nell'arco delle 24h ($P>0,05$). I valori ottenuti ai vari tempi di prelievo, non sono risultati significativamente diversi da quelli ottenuti nel gruppo sottoposto a step a 26 PSU ($P>0,05$). Anche dopo due settimane di permanenza a questa salinità i cloruri nell'emolinfa ($6,99 \pm 0,19$ es mmol L^{-1}) non sono significativamente diversi dal controllo ($P>0,05$) (Appendice, tavola 7F; figura 24D).

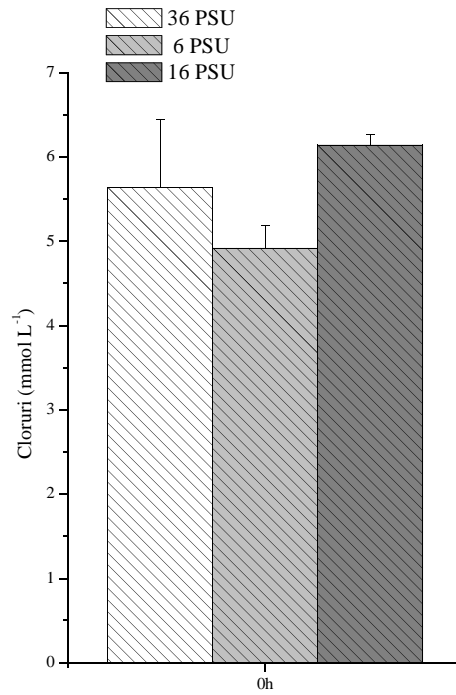
La concentrazione iniziale dei cloruri negli animali portati gradualmente a 46 PSU è stata $9,04 \pm 0,88$ es mmol L^{-1} ($P=0,026$ vs controllo). Ai tempi successivi, i cloruri non sono mai stati significativamente diversi né dal tempo 0h né dal gruppo esposto direttamente a 46 PSU ($P>0,05$). A 14d la media ottenuta di $9,22 \pm 0,53$ es mmol L^{-1} , è significativamente più alta rispetto al controllo ($P=0,008$) (Appendice, tavola 7F; figure 24C e 24D).

3.2.3.7 Calcio

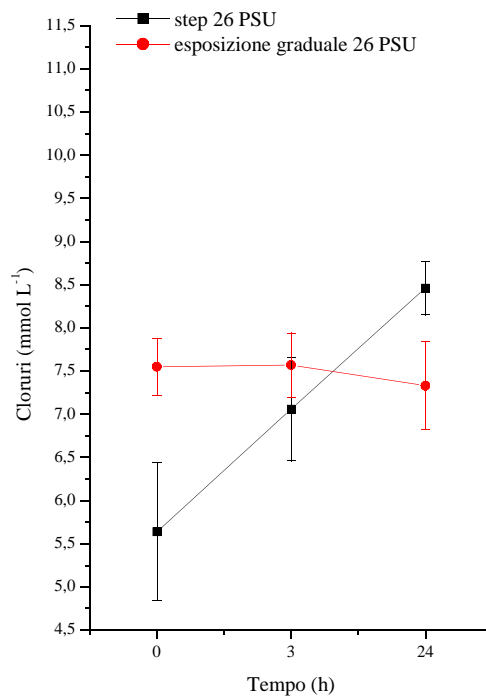
L'esposizione progressiva dei gamberetti ($n=200$) alla salinità 6 PSU non ha causato differenze significative ($P>0,05$) rispetto al controllo nella concentrazione di calcio circolante nell'emolinfa.

Come si può vedere dal grafico in figura 25A la concentrazione del calcio nel periodo di passaggio da 36 PSU a 16 PSU è significativamente ($P=0,042$) più alta rispetto al controllo ($16,95 \pm 1,71$ es mmol L^{-1}).

Analogamente a quanto appena descritto anche il trasferimento graduale a 26 PSU ($n=150$) causa un innalzamento significativo della concentrazione del calcio ($17,41 \pm 1,23$ es mmol L^{-1} , $P=0,012$) rispetto al controllo. Nelle 24h successive, sebbene non subisca modificazioni significative rispetto al tempo 0h ($P>0,05$), la concentrazione del calcio nell'emolinfa rimane significativamente più alta ($P>0,05$) rispetto a quella osservata nel gruppo esposto direttamente alla stessa salinità (Appendice, tavola 7G;

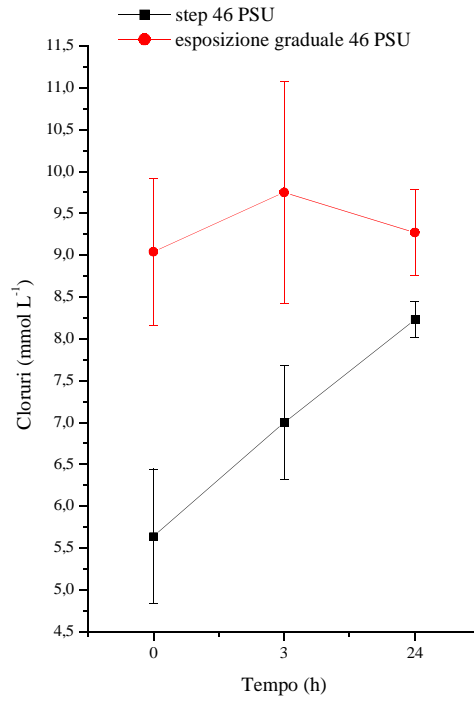


A

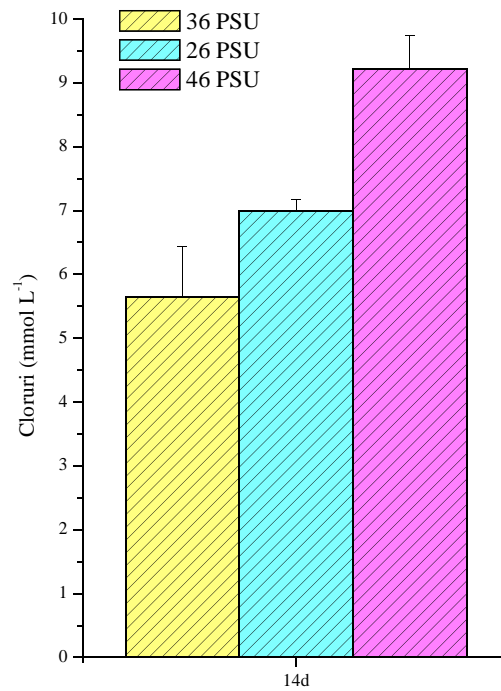


B

Figura 24: in A concentrazione dei cloruri nell'emolinfa di *P. elegans* dopo il periodo di esposizione graduale a 6 e 16 PSU; in B andamento nel tempo della concentrazione dei cloruri nell'emolinfa di *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 26 PSU.

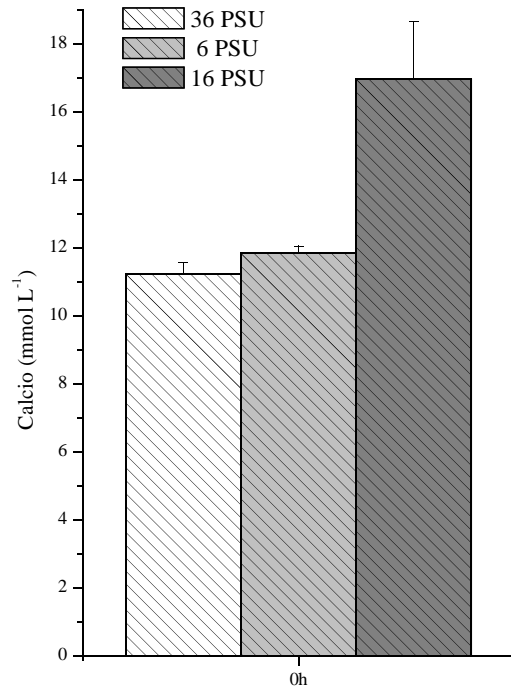


C

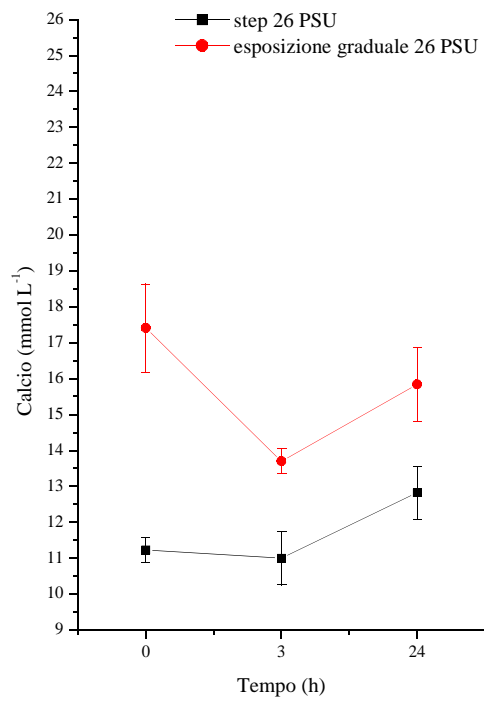


D

Figura 24: in C andamento nel tempo della concentrazione dei cloruri nell'emolinfa di *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 46 PSU; in D concentrazione dei cloruri nell'emolinfa di *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 26 e 46 PSU.

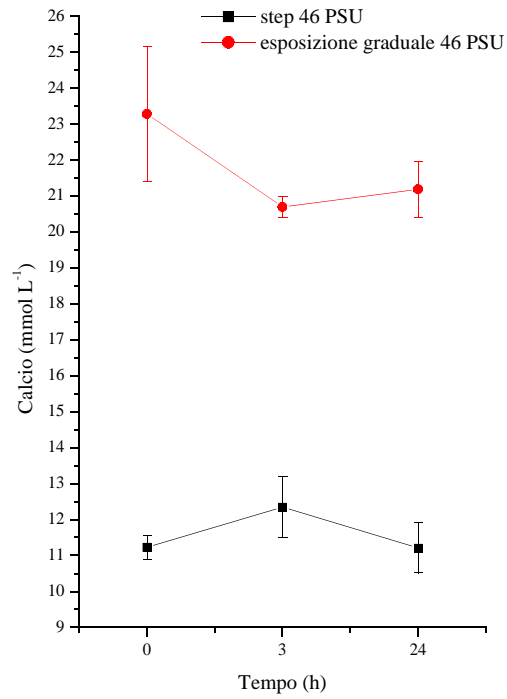


A

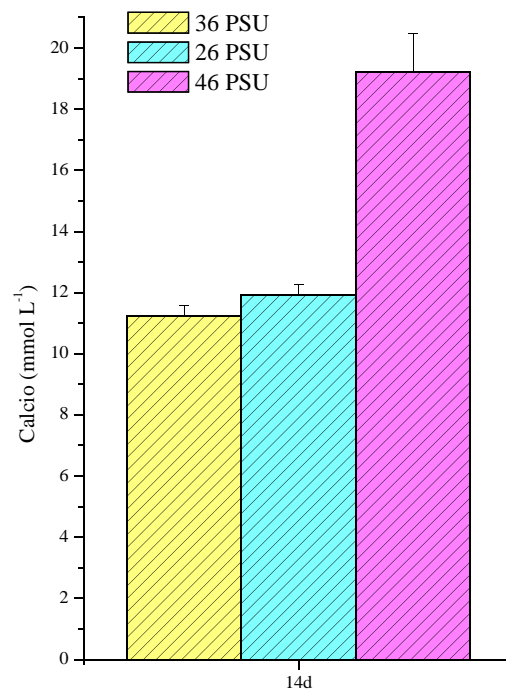


B

Figura 25: in A concentrazione del calcio nell'emolinfa di *P. elegans* dopo il periodo di esposizione graduale a 6 e 16 PSU; in B andamento nel tempo della concentrazione del calcio nell'emolinfa di *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 26 PSU.



C



D

Figura 25: : in C andamento nel tempo della concentrazione del calcio nell'emolinfa di *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 46 PSU; in D concentrazione del calcio nell'emolinfa di *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 26 e 46 PSU.

figura 25B). Dopo due settimane di adattamento i valori ottenuti non sono significativamente diversi dal controllo ($P>0,05$) (Figura 25D).

Anche in seguito al passaggio graduale alla salinità 46 PSU il calcio presente nell'emolinfa di *P. elegans* ($n=150$) è più alto rispetto al controllo ($23,29 \pm 1,87$ es mmol L^{-1} , $P=0,007$). In seguito i valori non sono mai significativamente diversi dal tempo 0h ($P>0,05$) mentre lo sono sempre da quelli misurati agli stessi tempi nel gruppo utilizzato nello step a 46 PSU ($P<0,05$). Dopo due settimane di permanenza a questa salinità, il calcio la cui media è di $19,21 \pm 1,28$ es mmol L^{-1} , è significativamente diversa dal controllo mantenuto a 36 PSU ($P=0,006$) (Appendice, tavola 7G; figure 25C e 25D).

In generale per quanto riguarda le risposte fisiologiche in *P. elegans* in seguito all'esposizione graduale alle diverse salinità e a stress osmotico prolungato per 14d, si può evidenziare che glicemia e acido lattico non subiscono variazioni particolarmente intense, la densità e le proteine totali subiscono invece delle diminuzioni dal tempo 0h fino a 14d, il pH a 46 PSU a differenza delle altre salinità aumenta, e gli elettroliti, che durante gli step subiscono delle variazioni evidenti, rimangono circa costanti.

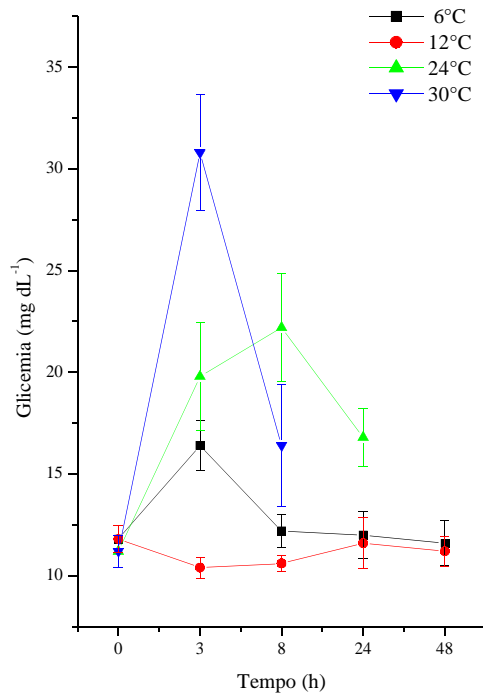
3.2.4. Esposizione diretta: temperatura

Anche per questa specie sono stati creati quattro gruppi sperimentali utilizzati per l'esposizione diretta a modificazioni di temperatura; di seguito sono riportati i risultati ottenuti per i parametri fisiologici valutati.

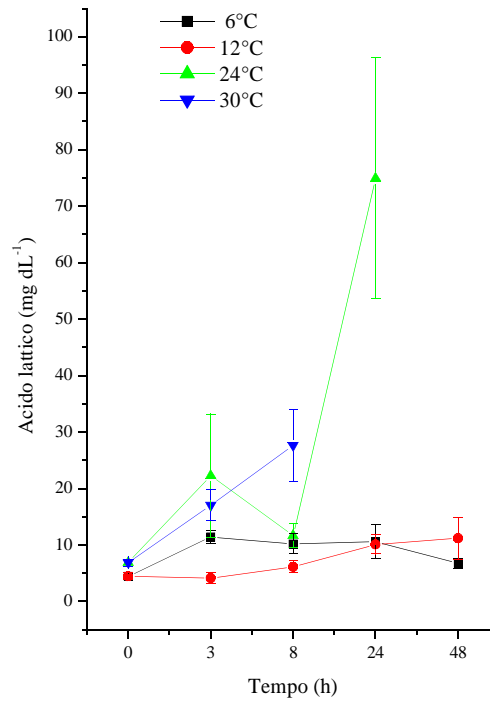
3.2.4.1 Glicemia

La concentrazione di glucosio nell'emolinfa di *P. elegans* nel gruppo utilizzato come confronto per i gruppi sperimentali esposti a basse temperature ($n=25$) e in quello per i gruppi esposti a temperature elevate ($n=25$), è stata di $11,80 \pm 0,66$ es mg dL^{-1} e $11,20 \pm 0,80$ es mg dL^{-1} rispettivamente, valori non significativamente diversi tra loro ($P>0,05$). Il grafico in figura 26A mostra gli andamenti nel tempo del glucosio alle diverse temperature.

A 6°C la glicemia ($n=120$) aumenta fino a 3h, quando la media di $16,40 \pm 1,21$ es mg dL^{-1} , è risultata significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,015$). Ai tempi



A



B

Figura 26: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *P. elegans* esposto direttamente alle diverse temperature.

successivi la concentrazione di glucosio diminuisce e non è mai stata significativamente diversa dal tempo 0h ($P>0,05$) (Appendice, tavola 8A).

Il passaggio diretto a 12° C non ha determinato variazioni significative ($P>0,05$) nella concentrazione di glucosio nell'emolinfa dei gamberetti esposti ($n=120$).

La temperatura di 24° C invece ha causato un progressivo del glucosio nell'emolinfa di *P. elegans* ($n=120$); infatti a tutti i tempi le medie ottenute sono risultate significativamente più alte rispetto al tempo 0h ($P<0,05$).

Come si può osservare dal grafico in figura 26A, la glicemia nei gamberetti esposti a 30° C ($n=120$) subisce un immediato e significativo aumento fino alla concentrazione di $30,80 \pm 2,85$ es mg dL⁻¹ ($P=0,002$). Sebbene la glicemia rimanga più elevata, la media, al tempo 8h, non è significativamente diversa dal tempo 0h ($P>0,05$) (Appendice, tavola 8A).

3.2.4.2 Acido lattico

Le concentrazioni di acido lattico nei due gruppi di gamberetti utilizzati come controllo sono risultate significativamente diverse tra loro ($4,44 \pm 0,61$ es mg dL⁻¹ e $6,88 \pm 0,61$ es mg dL⁻¹, $P=0,023$).

La temperatura 6° C ha determinato un rapido aumento del glucosio fino a 3h, quando la media di $11,42 \pm 1,14$ es mg dL⁻¹ è risultata significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,002$). Ai tempi successivi l'acido lattico diminuisce e solo la media ottenuta a 8h è significativamente diversa dal controllo ($P<0,05$) (Appendice, tavola 8B; figura 26B).

Il passaggio diretto a 12° C non ha causato variazioni significative ($P>0,05$) nella concentrazione di acido lattico nell'emolinfa di *P. elegans* fino a 8h; ma a 24h la media di $10,10 \pm 0,71$ es mg dL⁻¹ è significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,026$).

A 24° C l'acido lattico emolinfatico aumenta progressivamente nell'arco delle 24h, fino a $74,94 \pm 21,30$ es mg dL⁻¹, concentrazione significativamente diversa dal tempo 0h ($P=0,033$) (Appendice, tavola 8B; figura 26B).

Anche a 30° C, la concentrazione di acido lattico aumenta progressivamente e significativamente rispetto al tempo 0h ($P<0,05$).

3.2.4.3 Densità

Nei due gruppi utilizzati come controllo ($n=25$ ciascuno) la densità dell'emolinfa è stata rispettivamente di $1086,80 \pm 6,89$ es mg dL⁻¹ e di $1106,40 \pm 11,62$ es mg dL⁻¹ ($P>0,05$).

In seguito al trasferimento diretto dei gamberetti (n=120) da 18° C a 6° C, la densità diminuisce nell'arco di 3h ($1054,80 \pm 4,13$ es mg dL^{-1} , $P=0,006$), e si mantiene significativamente più bassa rispetto al tempo 0h per tutta la durata dell'esperimento ($P<0,05$) (Appendice, tavola 8C; figura 26C).

Come si può osservare dal grafico in figura 26C, anche in seguito all'esposizione a 12° C la densità dell'emolinfa diminuisce e si mantiene significativamente bassa nell'arco delle 48h sperimentali ($P<0,05$).

A differenza di ciò che è appena stato descritto per le altre temperature, l'esposizione a 24° C dei gamberetti (n=120) determina l'aumento progressivo della densità dell'emolinfa (Appendice, tavola 8C; figura 26C), anche se mai significativamente diverso rispetto al tempo 0h ($P>0,05$).

La temperatura di 30° C non ha causato variazioni significative ($P>0,05$) della densità dell'emolinfa di *P. elegans* (n=120).

3.2.4.4 Proteine

Le medie delle proteine totali, riportate in Appendice, tavola 8D, nell'emolinfa di *P. elegans* utilizzati come controllo, non sono risultate significativamente diverse tra loro ($P>0,05$).

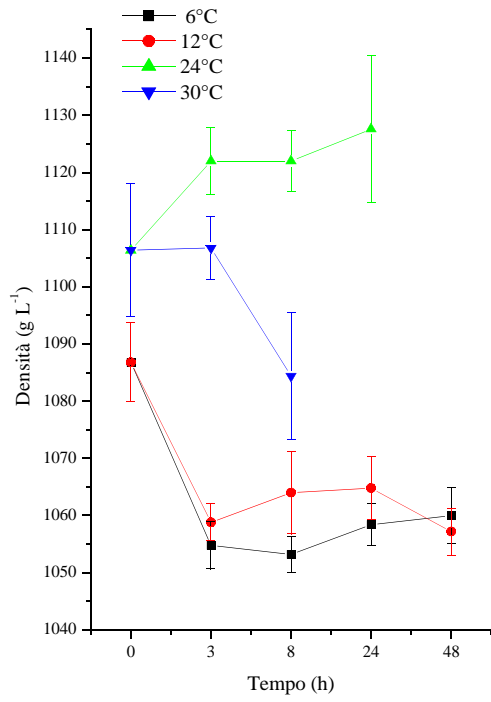
La temperatura di 6° C (n=120) ha indotto la diminuzione della concentrazione delle proteine totali circolanti nell'emolinfa di *P. elegans* (Appendice, tavola 8D; grafico 26D) risultata a tutti i tempi significativamente diversa rispetto al controllo ($P<0,05$).

In seguito all'esposizione a 12° C si verifica un'iniziale diminuzione delle proteine totali fino alla concentrazione di $3,70 \pm 0,44$ es g dL^{-1} ($P=0,035$ vs 0h). Nonostante nell'arco delle ore successive si sia osservato un aumento non significativo ($P>0,05$) delle proteine fino a $5,26 \pm 0,44$ es g dL^{-1} a 24h, la loro concentrazione a 48h ($2,81 \pm 0,39$ es g dL^{-1}) è significativamente più bassa rispetto al tempo 0h ($P=0,004$) (Appendice, tavola 8D; figura 26D).

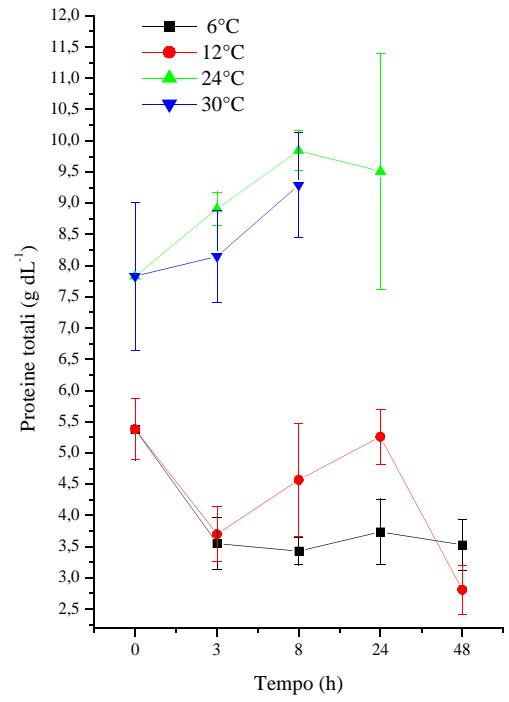
3.2.4.5 pH

Il valore del pH dell'emolinfa dei gamberetti utilizzati in ciascun controllo (n=25) è stato rispettivamente di $7,56 \pm 0,03$ es e di $7,94 \pm 0,08$ es dati significativamente diversi tra loro ($P=0,005$).

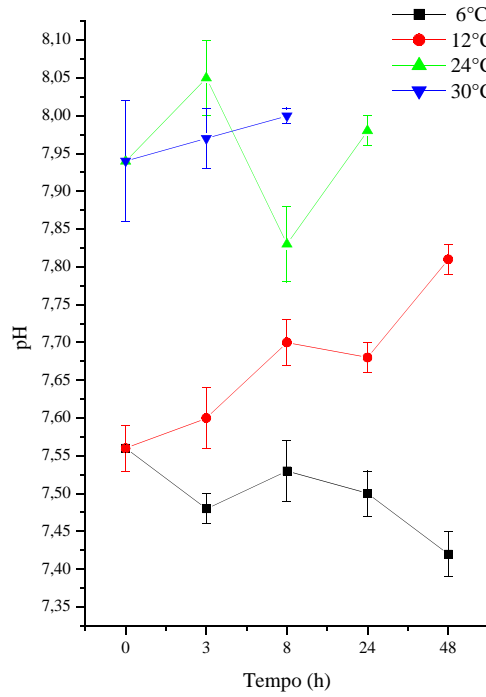
Come si può vedere dal grafico in figura 26E, l'esposizione a 6° C ha causato una graduale diminuzione del pH fino a 48h, quando la media di $7,42 \pm 0,03$ es è risultata significativamente diversa dal controllo ($P=0,012$).



C



D



E

Figura 26: andamento nel tempo dei parametri fisiologici in *P. elegans* esposto direttamente alle diverse temperature.

In seguito all'esposizione di *P. elegans* a 12° C (n=120) il pH subisce progressivi e significativi aumenti ai tempi 8, 24, 48h (P<0,05).

Come si può vedere dai dati riportati in Appendice, tavola 8E e nel grafico in figura 26E, sia il pH dell'emolinfa dei gamberetti esposti a 24° C (n=120) che quello dell'emolinfa dei gamberetti esposti a 30° C (n=120) ha subito delle variazioni, che tuttavia non sono mai significativamente diverse dal controllo mantenuto a 18° C (P>0,05).

Riassumendo i dati appena descritti, durante il trasferimento graduale di *P. elegans* a 6 e 12° C non si sono osservate importanti variazioni glicemiche, mentre l'acido lattico subisce variazioni rilevabili a 6° C. La densità, le proteine totali e il pH dell'emolinfa hanno gli stessi andamenti osservati durante gli step alle stesse temperature, anche se a 12° C densità e proteine totali si mantengono più alti.

3.2.5 Esposizione graduale e adattamento: temperatura

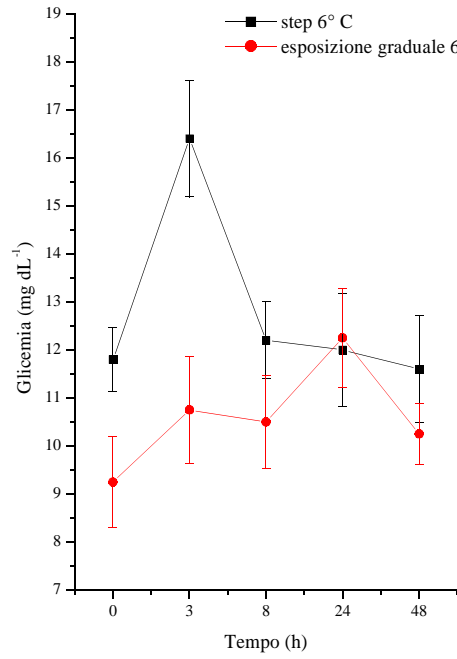
3.2.5.1 Glicemia

La glicemia iniziale nei gamberetti portati gradualmente alla temperatura 6° C (n=150) è stata $9,25 \pm 0,25$ es mg dL⁻¹, non significativamente dal controllo (tempo 0h esperimenti di step) (P>0,05). Nell'arco delle ore successive gli aumenti osservati non sono statisticamente significativi (P>0,05) (Figura 27A). Dopo il periodo di adattamento di 14d la glicemia di $10,00 \pm 0,41$ es mg dL⁻¹, non è significativamente diversa dal controllo (P>0,05).

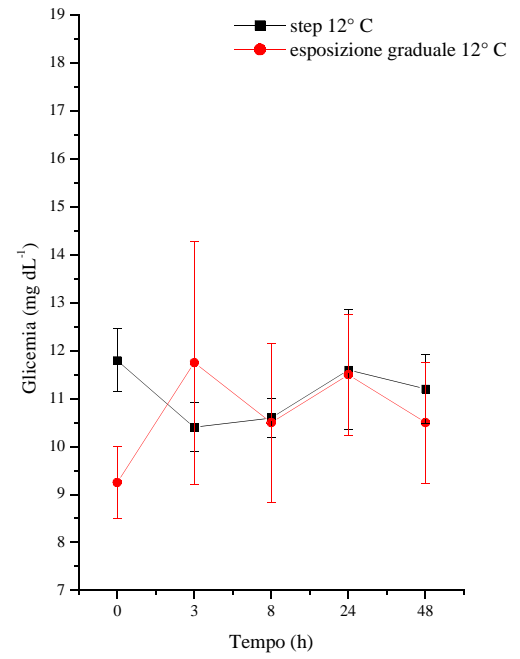
Nei gamberetti portati gradualmente a 12° C la glicemia al tempo 0h è $9,25 \pm 0,75$ es mg dL⁻¹ (P=0,041 vs controllo). Ai tempi successivi le medie ottenute non sono mai state significativamente diverse né dal tempo 0h né dal gruppo esposto direttamente alla stessa temperatura (P>0,05). A 14d il valore ottenuto di $9,50 \pm 0,29$ es mg dL⁻¹, non è significativamente diverso dal controllo (P>0,05).

3.2.5.2 Acido lattico

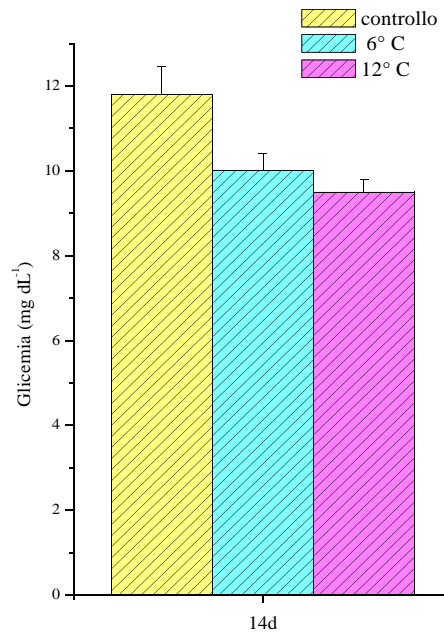
Come riportato in Appendice, tavola 9B, la concentrazione iniziale di acido lattico nell'emolinfa dei gamberetti esposti a 6° C è stata $15,05 \pm 3,03$ es mg dL⁻¹, significativamente più alta rispetto al controllo (P=0,037). Nel grafico in figura 28A si evidenzia che dopo un'iniziale diminuzione registrata dopo 3h, l'acido lattico aumenta progressivamente fino a 24h (P>0,05), con la concentrazione a 48h ($6,35 \pm$



A

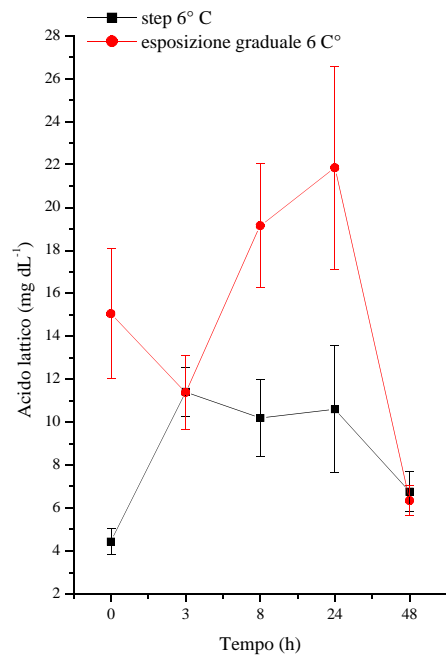


B

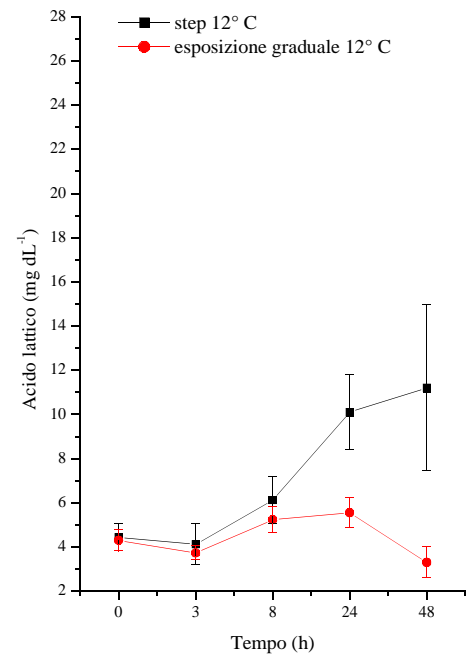


C

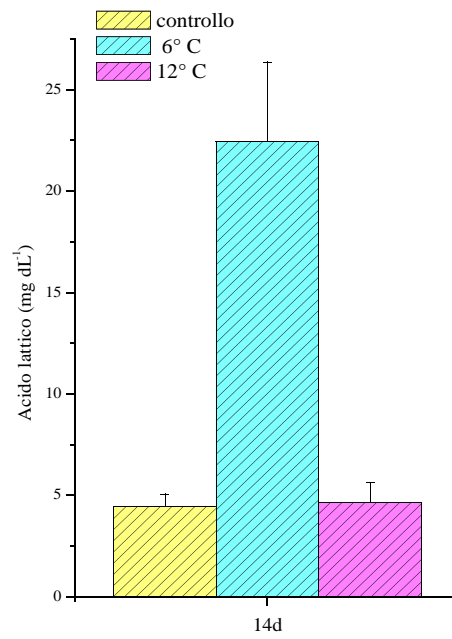
Figura 27: in A e B andamento nel tempo della glicemia in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 6 e 12° C; in C glicemia in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 6 e 12° C.



A



B



C

Figura 28: in A e B andamento nel tempo della latticemia in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 6 e 12° C; in C latticemia in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 6 e 12° C.

0,69 es mg dL⁻¹) significativamente diversa (P>0,05). Dopo 14d a questa temperatura l'acido lattico nell'emolinfa si mantiene alto (22,45 ± 3,93 es mg dL⁻¹) e statisticamente significativo rispetto al controllo (P=0,018).

Come si può osservare nei grafici nelle figure 28B e 28C, la concentrazione di acido lattico nell'emolinfa dei gamberetti esposti gradualmente a 12° C (n=150), non subisce variazioni significative né rispetto al tempo 0h, né al gruppo che è stato esposto direttamente alla stessa temperatura (P>0,05).

3.2.5.3 Densità

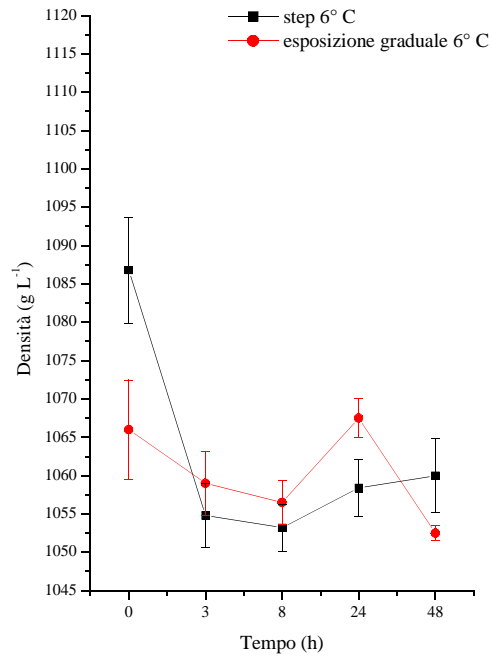
La densità iniziale dell'emolinfa di *P. elegans* trasferito progressivamente da 18 a 6° C è stata di 1066,00 ± 6,48 es mg dL⁻¹ (P>0,05 vs controllo). Nei prelievi ai tempi successivi non si sono misurate variazioni del parametro statisticamente significative (P>0,05), solo dopo due settimane di adattamento, la densità di 1058,50 ± 3,30 es mg dL⁻¹ è significativamente più bassa rispetto al controllo (P=0,011).

In seguito all'esposizione graduale dei gamberetti a 12° C (n=150) la densità è stata di 1108,00 ± 9,20 es mg dL⁻¹, non significativamente diversa dal controllo (P>0,05). Ai tempi successivi la densità diminuisce rispetto al valore iniziale e risultata statisticamente significativa a 8 e 48h è (P<0,05 vs 0h). Dal confronto con il gruppo esposto direttamente a 12° C, sono risultate significativamente diverse le medie ai tempi 3 e 24h. Dopo 14d di permanenza a 12° C la densità non è risultata significativamente diversa dal controllo (P>0,05).

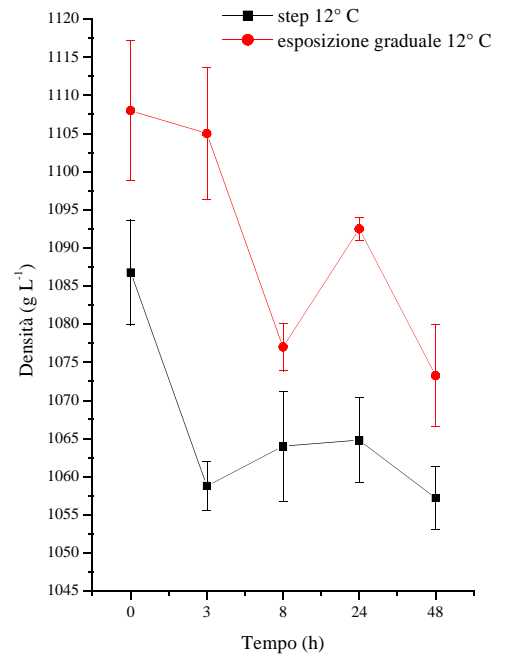
3.2.5.4 Proteine

Nei gamberetti portati gradualmente a 6° C (n=150) il valore iniziale delle proteine emolinfatiche è stato 4,43 ± 0,21 es g dL⁻¹ (P>0,05 vs controllo). Nel figura 30A è riportato l'andamento di questi metabolici che non risultano mai significativamente diversi dal gruppo che ha subito lo step a 6° C (P>0,05). Rispetto al tempo 0h sono risultate invece significativamente inferiori le medie ai tempi 3 e 48h (P<0,05; Appendice, tav. 9D). A 14d, le proteine totali (4,14 ± 0,46 es g dL⁻¹) non sono significativamente diverse dal controllo (P>0,05).

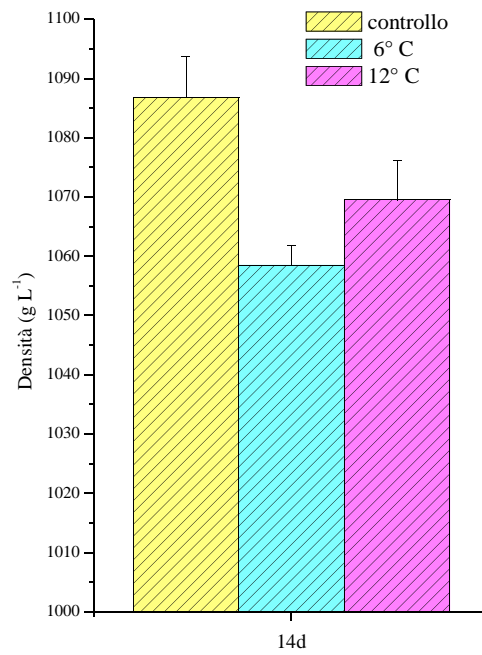
In seguito all'esposizione graduale di *P. elegans* a 12° C (n=150) le proteine sono risultate più alte rispetto al controllo (P=0,003). Le concentrazioni osservate ai tempi 8 e 48h, e riportate in Appendice, tavola 9D, sono significativamente diverse dal tempo 0h (P<0,05), mentre a 3 e 24h sono significativamente diverse dai medesimi tempi del gruppo esposto direttamente a 12° C (P<0,05). Dopo due settimane di



A

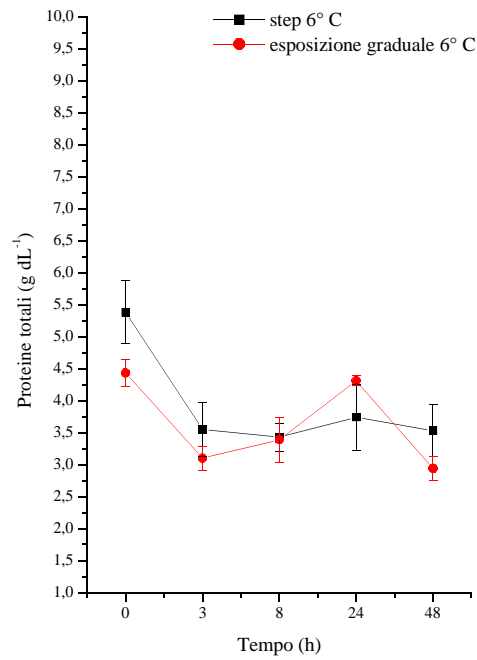


B

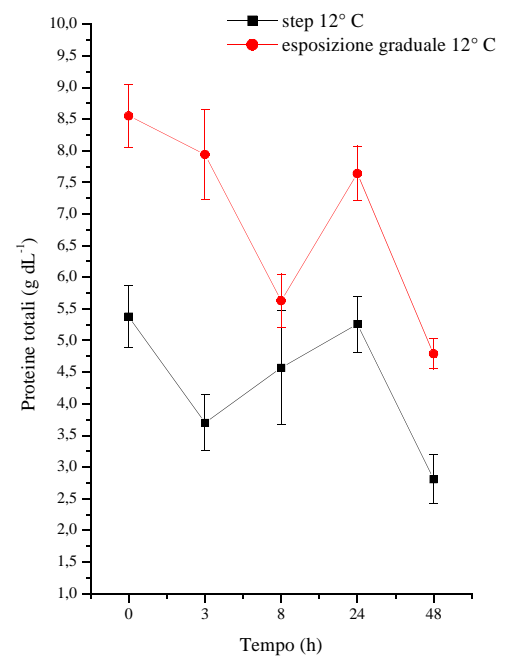


C

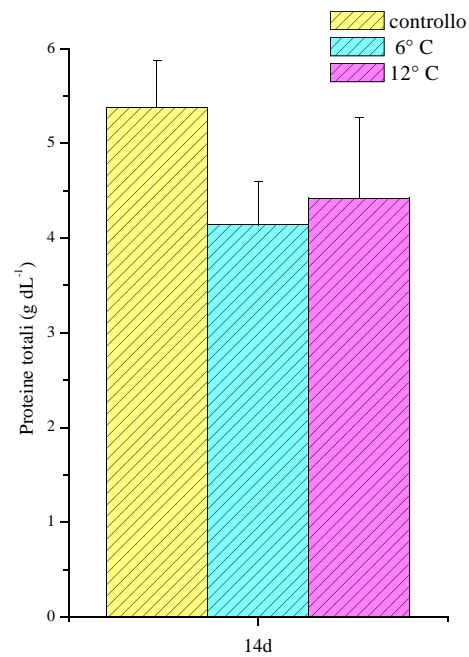
Figura 29: in A e B andamento nel tempo della densità dell'emolinfia in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 6 e 12° C; in C densità dell'emolinfia in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 6 e 12° C.



A

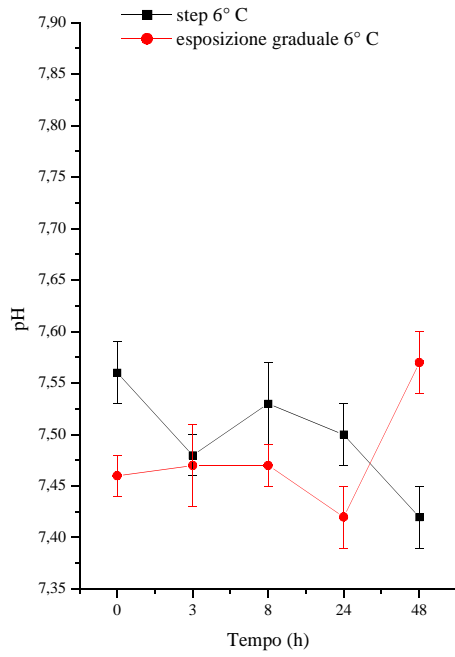


B

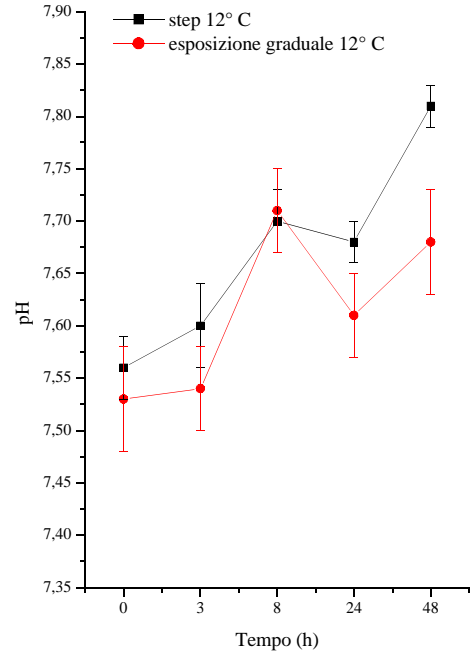


C

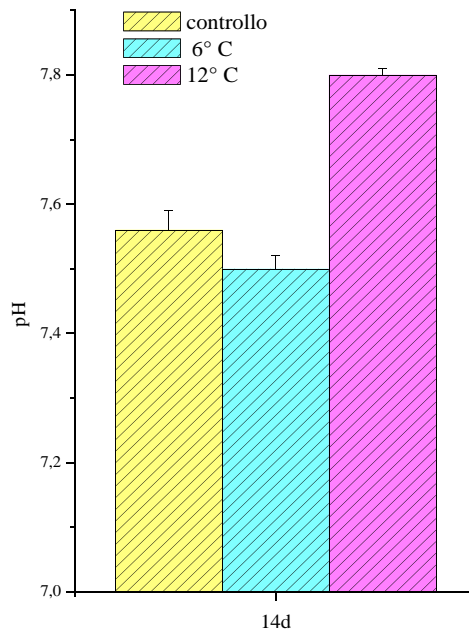
Figura 30: in A e B andamento nel tempo della concentrazione dello proteine totali dell'emolinfa in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 6 e 12° C; in C concentrazione delle proteine totali dell'emolinfa in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 6 e 12° C.



A



B



C

Figura 31: in A e B andamento nel tempo del pH dell'emolinfa in *P. elegans* esposti direttamente vs gradualmente a 6 e 12° C; in C pH dell'emolinfa in *P. elegans* dopo il periodo di adattamento a 6 e 12° C.

adattamento le proteine totali circolanti nell'emolinfa non sono significativamente diverse dal controllo ($P > 0,05$).

3.2.5.5 pH

Il trasferimento dei gamberetti a 6° C ($n=150$) ha determinato una diminuzione significativa del pH dell'emolinfa rispetto al controllo ($7,46 \pm 0,02$ es; $P=0,032$). Nell'arco delle 24h successive non si sono verificate variazioni significative rispetto al tempo 0h ($P > 0,05$), mentre a 48h il pH è significativamente più alto sia rispetto al tempo 0h ($P=0,037$) che allo stesso tempo nel gruppo che ha subito step a 6° C ($P=0,014$). A 14d il pH non è significativamente diverso dal controllo ($P > 0,05$).

Il pH dell'emolinfa dei gamberetti trasferiti gradualmente da 18 a 12° C ($n=150$) è stato $7,53 \pm 0,05$ es ($P > 0,05$ vs controllo) successivamente non si sono osservate variazioni significative del pH né rispetto al tempo 0h né rispetto al gruppo utilizzato per lo step a 12° C ($P > 0,05$). Dal grafico in figura 31C è evidente che dopo 14d di mantenimento a 12° C il pH è significativamente più alto rispetto al controllo ($P=0,001$).

Riassumendo i dati appena descritti, durante il trasferimento graduale di *P. elegans* a 6 e 12° C non si sono osservate importanti variazioni glicemiche, mentre l'acido lattico subisce variazioni rilevabili a 6° C. La densità, le proteine totali e il pH dell'emolinfa hanno gli stessi andamenti osservati durante gli step alle stesse temperature, anche se a 12° C densità e proteine totali si mantengono più alti.

3.3 Upogebia pusilla

3.3.1 Prove di mantenimento e manipolazione

Tutte le prove di stabulazione effettuate con questa specie hanno causato il 100% di mortalità nell'arco di 5 giorni.

Nei gruppi creati per le prove di manipolazione ($n=5$) si è osservato il 100% di mortalità dopo 3h.

In Appendice, tavola 10, sono riportati i dati relativi alle prove di mantenimento in acqua ($n=5$) e aria ($n=5$).

La concentrazione di glucosio nei gamberetti mantenuti in acqua, passa dal valore iniziale medio di $7,00 \pm 0,55$ es mg dL⁻¹ a $8,60 \pm 1,44$ es mg dL⁻¹ dopo 3h; l'aumento

a questo tempo non è significativamente diverso da quello iniziale ($P>0,05$). Analogamente, per i gamberetti mantenuti all'aria, la glicemia cresce passando dal valore iniziale di $6,00 \pm 0,84$ es mg dL⁻¹ a $11,00 \pm 3,30$ es mg dL⁻¹, ma non in maniera significativa rispetto al tempo 0h ($P>0,05$).

La sola manipolazione dei gamberetti utilizzati come controllo (mantenimento in acqua) determina aumenti di acido lattico a tutti i tempi, che non sono risultati significativamente diversi dal tempo 0h ($P>0,05$) (Appendice, tavola 10). L'acido lattico nell'emolinfa dei gamberetti trasferiti in ambiente subaereo, passa da $4,76 \pm 1,91$ es mg dL⁻¹ a $54,12 \pm 9,68$ es mg dL⁻¹ nell'arco di 3h; a tutti i tempi le medie sono state statisticamente significative rispetto al tempo 0h.

Durante il mantenimento in acqua, sia la densità che le proteine subiscono delle variazioni. La densità, inizialmente di $1066,80 \pm 5,12$ es g L⁻¹ diminuisce nell'arco di 3h fino a $1045,20 \pm 4,50$ es g L⁻¹ ($P=0,021$). Analogamente le proteine subiscono delle diminuzioni significative ($P<0,05$). Per i gamberetti esposti all'aria, sebbene vi siano state delle diminuzioni sia della densità che delle proteine totali (Appendice, tavola 10), non sono mai state significativamente diverse dal tempo 0h.

Il pH nell'emolinfa di *U. pusilla* mantenuto in acqua VALORE T0?, dopo un primo picco a 0,5h, non significativamente diverso dal valore iniziale ($P>0,05$), torna a diminuire ai tempi successivi ($P>0,05$ vs tempo 0h). Per i gamberetti mantenuti all'aria, dopo un picco iniziale al tempo 0,5h, non statisticamente significativo ($P>0,05$) il pH diminuisce dopo 2h fino al valore di $7,79 \pm 0,04$ es ($P=0,025$ vs tempo 0h).

I due gruppi, per nessun parametro e a nessun tempo, sono mai stati significativamente diversi tra di loro ($P>0,05$).

3.4 Correlazione densità e proteine

Considerando per le tre specie, oggetto di studio in questo lavoro, i dati ottenuti di densità e proteine totali, sia nei gruppi di controllo che quelli sperimentali, e a tutti i tempi, è stato possibile correlare i due metaboliti. Nei grafici in figura 32 vengono riportate le rette di regressione per ciascuna specie. In ciascuna specie vediamo come ci sia una forte correlazione (tab. 6) e le proteine totali crescono linearmente con la densità.

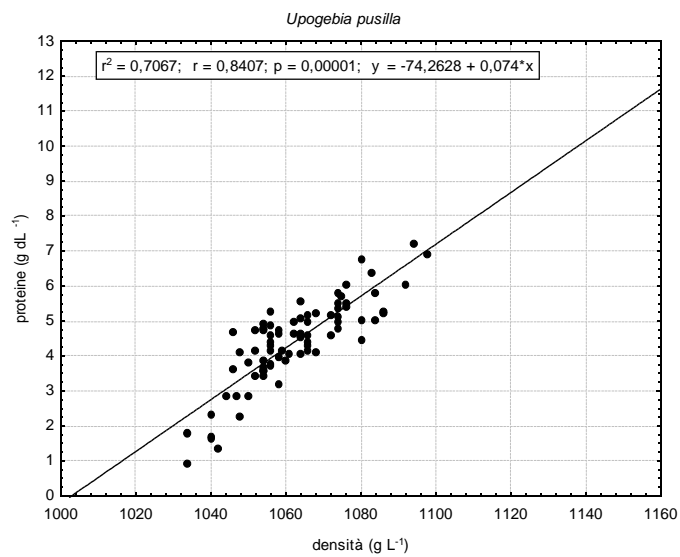
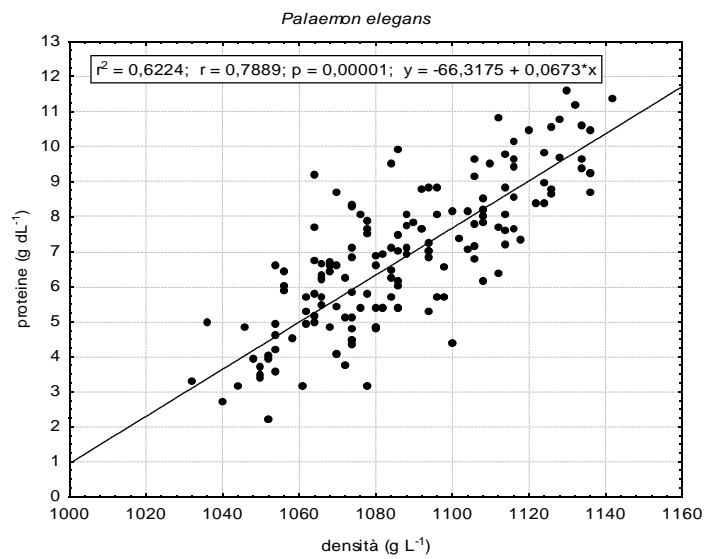
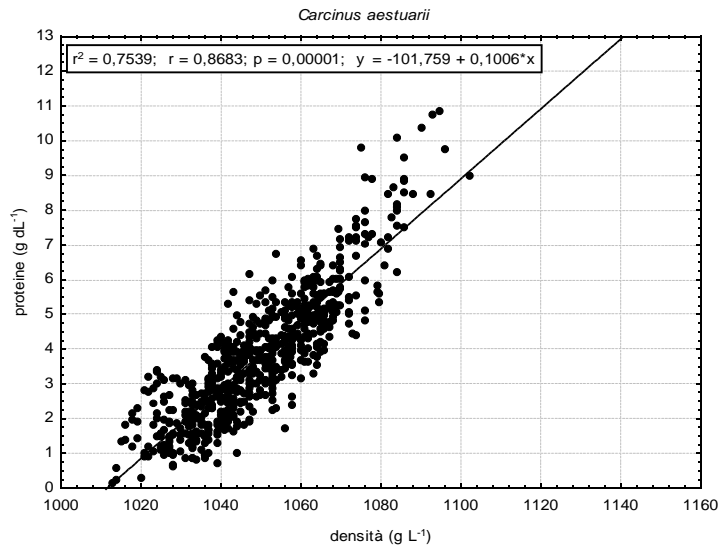


Figura 32: rette di regressioni densità – proteine totali nelle tre specie.

Tabella 6: dati statistici delle regressioni lineari.

	<i>n</i>	<i>a</i>	Std. Err <i>a</i>	<i>B</i>	Std. Err <i>b</i>	<i>r</i> ²	<i>F</i>	<i>p</i>	Std Err Estimate
<i>P.elegans</i>	164	-66.318	4.476	0.0673	0.0041	0.6224	267.07	0.00001	1.3376
<i>U. pusilla</i>	79	-74.2628	5.7762	0.074	0.00543	0.7029	185.529	0.00001	0.6682
<i>C. aestuarii</i>	656	-101.76	2.453	0.101	0.00234	0.754	1853.723	0.0001	0.936

3.5 Gel

Alcuni campioni di emolinfa prelevati dai granchi sottoposti ad emersione alle diverse temperature, sono stati utilizzati per le corse elettroforetiche. Tra queste quelle più rappresentative sono state utilizzate per l'analisi densitometrica. È risultato evidente che in tutti i casi la maggior parte delle proteine totali è rappresentato dalle emocianine (70 KDa circa). In figura 33 è riportato un esempio tratto dallo stesso gel, rappresentante il tempo 0h di tre granchi mantenuti in acqua a 24° C ed in seguito trasferiti a 30° C.

3.6 Altre osservazioni in fase sperimentale

Durante ciascun esperimento si sono potute effettuare delle osservazioni, che riguardano innanzi tutto il comportamento degli animali.

Nella specie *C. aestuarii* sia durante l'esposizione diretta che quella graduale a 6 e 16 PSU si sono osservati aumenti dell'attività degli animali e della loro aggressività, che si è manifestata prevalentemente contro gli altri individui sottoposti allo stesso esperimento. Al contrario durante l'esposizione a 6° C l'attività dei granchi diminuisce.

Queste alterazioni comportamentali non sono invece state osservate nei gamberetti, nei quali invece durante l'esposizione diretta a 46 PSU si sono osservate variazioni della pigmentazione.

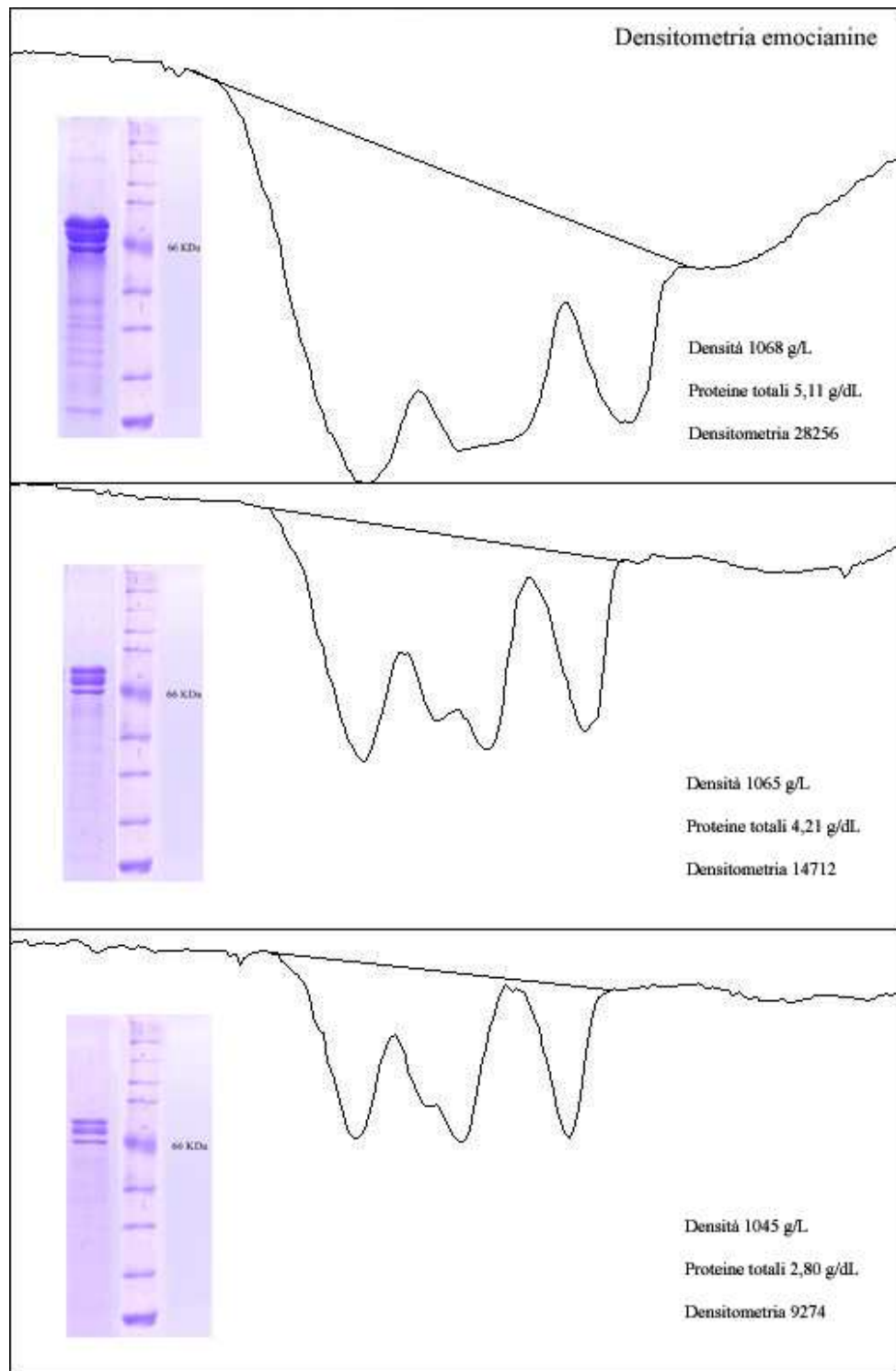


Figura 33: corse elettroforetiche di tre campioni di emolinfia di *C. aestuarii* mantenuti in acqua a 22° C (tempo 0h) ed in seguito esposti all'aria a 30° C, e densitometrie relative alle bande delle emocianine.

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

4.1 *Carcinus aestuarii* e *Palaemon elegans*: valutazione della mortalità

La mortalità negli animali di entrambe le specie nel periodo di stabulazione, di due settimane prima degli esperimenti, è stata limitata a pochi casi, ed è probabilmente imputabile a cause intrinseche, quali ad esempio infezioni batteriche precedenti l'immissione degli animali nelle vasche di stabulazione.

La variazione della salinità rispetto al valore considerato fisiologico (36 PSU) ha indotto mortalità durante le fasi sperimentali di *C. aestuarii*, un granchio che è stato ritrovato in alcune aree in cui la salinità oscilla tra i 36 e 39 PSU (Balkis e Kurun 2008). In particolare, dopo 48h di esposizione diretta a 6 PSU la mortalità è del 100%, e si riduce progressivamente durante l'esposizione alle salinità di 16 e 26 PSU. Dai risultati ottenuti durante gli esperimenti di adattamento si può tuttavia concludere che, se queste condizioni di salinità vengono raggiunte gradualmente, una certa percentuale di granchi riesce a sopravvivere per i 14 giorni successivi. Peculiare è il comportamento ottenuto alla salinità di 26 PSU: mentre lo stress acuto non induce mortalità, la permanenza per 14 giorni dei granchi a questa salinità la porta al 40%.

Dai dati ottenuti risulta evidente che *C. aestuarii* è una specie adattata in ambienti paralici come gli estuari, in cui la salinità varia anche per brevi periodi in seguito a piene improvvise.

Per *P. elegans* esposto direttamente alle diverse salinità si è osservata mortalità ma bassa solo a 6 e 16 PSU. Nonostante questi dati confermino l'euriialinità della specie, durante l'esposizione graduale (2 PSU ogni due giorni partendo da 36 PSU fino alla condizione definitiva) è stato notato che gli animali cominciano a morire dopo il sesto giorno di esposizione, ovvero dopo il passaggio a 30 PSU.

In generale durante lo stress osmotico si sono quindi osservate le seguenti condizioni:

- gamberetti che sopravvivono per almeno un giorno dopo uno sbalzo di 30 PSU (da 36 a 6 PSU) o di 20 PSU (da 36 a 16 PSU);
- gamberetti che dopo 6 giorni di diminuzione della salinità (da 36 a 30 PSU e nei passaggi successivi) muoiono;

- gamberetti (in minima percentuale) che comunque sopravvivono fino a 6 PSU, raggiunti dopo 30 giorni dall'inizio dell'esperimento.

Da questo si può concludere che 30 PSU, sebbene non sia una salinità letale sul breve periodo, rappresenti una soglia oltre la quale, se il tempo di esposizione aumenta, i gamberetti muoiono probabilmente a causa di un indebolimento dovuto a fattori non considerati in questo lavoro, quali ad esempio infezioni batteriche (Vincent *et al.* 2004; Ridgway *et al.* 2006) o fungine (Corbel *et al.* 2001), che vanno ad aggiungersi allo stress osmotico.

Quanto appena detto ha permesso di trarre alcune conclusioni che riguardano *Palaemon elegans*. Nella definizione di "specie eurialina" non viene considerato il tempo di esposizione a salinità modificate. Dai dati ottenuti in questo lavoro, *P. elegans* sembra essere una specie eurialina quando la salinità varia per un breve periodo, ad esempio per effetto di intense piogge, mentre non lo è se i periodi di esposizione aumentano.

Per quanto riguarda la temperatura per entrambe le specie, è evidente sia dagli esperimenti di esposizione diretta che di adattamento, che le temperature più alte rispetto al controllo (18° C) sono letali mentre l'esposizione a 6 o 12° C sono ben tollerate. Anche in altre specie è stata dimostrata la preferenza per le basse temperature. Nell'astice *H. americanus* è stato ad esempio provato che le alterazioni fisiologiche in risposta agli stress causati dai passaggi durante la commercializzazione, sono inferiori se il trasporto degli animali avviene a 6° C, piuttosto che a 15° C (Lorenzon *et al.* 2007), e che durante il mantenimento in laboratorio sembra avere una preferenza termica (Juri e Watson 2000) adattandosi a temperature comprese tra 12 e 18° C, piuttosto che quelle più alte (20-23° C) o più basse (al di sotto dei 10° C) (Crossin *et al.* 1998).

Durante gli esperimenti di esposizione all'aria di *C. aestuarii*, si è visto che le basse temperature sono comunque ben tollerate solo in acqua: si è infatti ottenuto il 100% di mortalità oltre che a 30° C anche a 4° C. Come dimostrato nelle specie *Jasus edwardsii* (Morris e Oliver 1999), *Panulirus interruptus* (Ocampo *et al.* 2003) e *Homarus americanus* (Lorenzon *et al.* 2007), questo è probabilmente imputabile al doppio effetto causato da temperatura-mancanza di scambio con il mezzo.

Il significato ecologico dei dati ottenuti è che la salinità, è un parametro che influisce molto sulla vitalità delle specie considerate in questo lavoro nei periodi invernali. In tali periodi in alcune zone come le foci dei fiumi le abbondanti piogge, aumentano

l'apporto di acque dolci, provocando improvvise e momentanee diminuzioni della salinità. La temperatura e i suoi aumenti che si verificano soprattutto in specchi d'acqua confinati, come gli stagni costieri o le pozze di marea, incidono invece maggiormente nei periodi estivi.

4.2 C. aestuarii e P. elegans: risposte fisiologiche in seguito a modificazioni dei parametri ambientali

Prima di affrontare nel dettaglio le risposte fisiologiche per *C. aestuarii* e per *P. elegans* vengono proposte delle tabelle riassuntive che rappresentano un'alternativa nella visualizzazione dei dati.

Questo è stato fatto, vista anche la complessità ed articolazione dei dati ottenuti durante il lavoro, per agevolare eventuali confronti tra diverse tipologie di esperimento per la stessa specie e per evidenziare similitudini o diversità tra le due specie.

In ogni tabella vengono riportati per ciascun parametro fisiologico e per ciascun esperimento l'effetto e il tempo al quale questo è stato massimo. I dati riguardanti l'esposizione graduale si riferiscono alle 48h successive al raggiungimento della condizione definitiva. Per questo motivo per le esposizioni graduali a 6 e 16 PSU di *P. elegans*, esperimenti ai quali il tasso di mortalità è stato elevato rendendo possibile il solo prelievo al tempo 0h, non sono stati riportati i dati.

Il dato relativo alle due settimane di adattamento, essendo già stato visualizzato nei grafici, non è stato qui riportato.

La freccia rossa rivolta verso l'alto rappresenta un aumento del parametro fisiologico rispetto al tempo 0h, la freccia verde rivolta verso il basso una sua diminuzione rispetto al tempo 0h, e la linea gialla indica che nell'arco delle 48h non si sono avute variazioni.

Carcinus aestuarii

	Glucosio	Ac. Lattico	Densità	Proteine tot.	pH	Ammoniaca	Cloruri	Calcio
Controllo 36 PSU	↑ (3h)	↓ (8h)	↓ (48h)	↓ (48h)	■	↑ (3h)	■	↑ (24h)
Step 6 PSU	↑ (3h)	↑ (24h)	↓ (48h)	↓ (48h)	↑ (24h)	↑ (3h)	↓ (24h)	↓ (24h)
Esposizione graduale 6 PSU	↑ (48h)	↓ (24h)	↑ (3h)	↑ (3h)	↓ (48h)	↑ (3h)	↓ (24h)	■
Step 16 PSU	↑ (3h)	↑ (3h)	↓ (48h)	↓ (48h)	↑ (24h)	↑ (3h)	↓ (24h)	↓ (24h)
Esposizione graduale 16 PSU	↑ (3h)	↑ (48h)	↓ (48h)	↑ (48h)	↑ (48h)	■	↓ (24h)	■
Step 26 PSU	↑ (3h)	↑ (24h)	↓ (48h)	↓ (48h)	↑ (24h)	↑ (3h)	↓ (24h)	↓ (24h)
Esposizione graduale 26 PSU	↑ (3h)	↑ (48h)	↓ (48h)	↓ (48h)	↑ (24h)	↑ (3h)	■	■
Step 46 PSU	↑ (3h)	↑ (8h)	■	↓ (48h)	■	↓ (3h)	↑ (24h)	↑ (24h)
Esposizione graduale 46 PSU	↑ (48h)	↑ (8h)	■	■	↑ (48h)	↑ (3h)	■	↑ (24h)

Palaemon elegans

	Glucosio	Ac. Lattico	Densità	Proteine tot.	pH	Ammoniaca	Cloruri	Calcio
Step 6 PSU	↑ (48h)	↑ (24h)	↑ (48h)	↑ (8h)	↑ (24h)		↑ (3h)	↓ (24h)
Step 16 PSU	↑ (3h)	↑ (8h)	↓ (48h)	↑ (8h)	↑ (24h)		↑ (3h)	↓ (24h)
Step 26 PSU	↑ (8h)	↑ (3h)	↑ (3h)	↑ (8h)	↑ (24h)		↑ (24h)	↑ (24h)
Esposizione graduale 26 PSU	↑ (8h)	↑ (3h)	↓ (8h)	↑ (3h)	↓ (24h)		■	↓ (3h)
Step 46 PSU	↑ (3h)	↑ (24h)	↓ (48h)	↓ (8h)	↓ (3h)		↑ (24h)	↑ (3h)
Esposizione graduale 46 PSU	↑ (3h)	↓ (24h)	↓ (3h)	↓ (3h)	↑ (3h)		↑ (3h)	↓ (3h)

Carcinus aestuarii

	Glucosio	Ac. Lattico	Densità	Proteine tot.	pH
Controllo 18° C			(48h)	(48h)	
Step 6° C	(3h)	(3h)	(48h)	(48h)	(3h)
Esposizione graduale 6° C	(8h)		(48h)	(48h)	(3h)
Step 12° C	(3h)	(3h)	(48h)	(3h)	(48h)
Esposizione graduale 12° C	(48h)		(24h)	(48h)	(48h)
Step 24° C	(3h)		(48h)	(48h)	(48h)
Esposizione graduale 24° C	(48h)		(48h)	(8h)	(48h)
Step 30° C	(48h)	(48h)	(48h)	(48h)	(48h)
Esposizione graduale 30° C	(48h)	(48h)		(8h)	(8h)

Palaemon elegans

	Glucosio	Ac. Lattico	Densità	Proteine tot.	pH
Step 6° C	(3h)	(3h)	(3h)	(3h)	(48h)
Esposizione graduale 6° C	(24h)	(24h)	(8h)	(3h)	(48h)
Step 12° C		(48h)	(3h)	(3h)	(48h)
Esposizione graduale 12° C	(3h)	(24h)	(8h)	(8h)	(8h)
Step 24° C	(8h)	(24h)	(24h)	(24h)	(3h)
Step 30° C	(3h)	(48h)	(8h)	(8h)	(8h)

4.2.1 Modificazioni della salinità e stress osmotico

Le specie oggetto di studio trascorrono parte del loro ciclo vitale in ambienti paralici, come lagune ed estuari. In questi ambienti alcuni parametri ecologici subiscono variazioni stagionali. Ad esempio nella laguna di Grado e Marano, luogo in cui sono stati pescati i granchi utilizzati in questo lavoro, la salinità varia tra 1 e 40 PSU (<http://www.arpa.fvg.it/index.php?id=187>).

È noto dalla bibliografia come le alterazioni della salinità inducano nei Crostacei Decapodi risposte fisiologiche quali ad esempio la variazione della permeabilità corporea, l'aumento della richiesta energetica, alterazioni del metabolismo proteico e perdita dell'equilibrio acido-base (Pèqueux 1995; Rainbow e Black 2001; Rowe 2002; Torres *et al.* 2002).

In entrambe le specie è stato osservato che la prima risposta messa in atto è la mobilitazione di glucosio. È questo infatti un metabolita che viene utilizzato per il mantenimento dei processi metabolici e che in seguito a stress fisiologico viene mobilitato dai siti di riserva per garantire una sufficiente quantità di ATP, e quindi di energia da utilizzare per il ripristino dell'omeostasi. La variazione della glicemia, che nei Crostacei è modulata dal cHH, un neuroormone prodotto e rilasciato dal complesso SG-XO posizionato nel peduncolo oculare (Govind 1992; Santos e Keller 1993; Fanjul-Moles 2006), è stata osservata, anche in *Callinectes danae* (Lacerda e Sawaya 1986), in *Crangon crangon* (Spaargaren e Haefner 1987) e più recentemente in *Neomysis integer* (Verslycke e Janssen 2002), sottoposti a stress osmotico.

In accordo con quanto trovato in *Chasmagnathus granulata*, i cui processi di gluconeogenesi nell'epatopancreas -con conseguente sintesi ed aumento della concentrazione di glucosio- aumentano durante l'esposizione ad ambienti diluiti (Oliveira e da Silva 2000), in *C. aestuarii* i maggiori aumenti della glicemia si sono osservati a 6 PSU, salinità alla quale la glicemia rimane elevata per tutta la durata dell'esperimento, e a 16 PSU. Le salinità 26 e 46 PSU invece non sembrano influire su questo parametro. Gli andamenti osservati con questa specie indicano che a 6 PSU viene attuato un tentativo di compensare le modificazioni ambientali. Vista però l'elevata mortalità osservata, la salinità estrema di 6 PSU sembra tuttavia essere al di fuori dell'intervallo tollerato da questa specie. E' quindi probabile che in questo caso lo stress imposto induca l'alterazione di altri processi con ripercussioni su altri parametri fisiologici, quali ad esempio le proteine totali emolinfatice, le cui variazioni sono discusse più avanti in questo paragrafo. La mobilitazione di glucosio

utilizzato nei processi di osmoregolazione sembra invece avere un effetto positivo nei granchi esposti a 16 PSU.

In *P. elegans*, sempre sottoposto a step di salinità, le risposte sono state opposte rispetto a quelle appena discusse per i granchi, con aumenti della glicemia più elevati a 46 PSU e più contenuti alle altre salinità. Per questa specie si è osservato che la salinità 6 PSU causa incrementi costanti della glicemia, mentre a 16 e 26 PSU dopo i picchi iniziali, la glicemia torna ad essere prossima ai valori iniziali. In accordo con quanto trovato in *Neomysis integer*, in cui la mobilitazione di zuccheri è maggiore in caso di esposizione ad ambienti ipersalini (Verslycke e Janssen 2002), sembra quindi che per questa specie lo sforzo metabolico sia maggiore durante gli aumenti della salinità piuttosto che durante le sue diminuzioni. Tuttavia dai dati riguardanti la mortalità e dal fatto che il glucosio viene rapidamente consumato prima della fine dell'esperimento, si può dedurre che *P. elegans* riesce a superare lo stress ipersalino e ad adattarsi a queste condizioni.

L'esposizione graduale induce variazioni di glucosio molto più contenute rispetto a quelle rilevate nell'esposizione diretta.

Il fatto che la glicemia in *C. aestuarii* dopo il periodo di variazione costante della salinità rimane alta, potrebbe indicare sia che se le modificazioni delle condizioni esterne si prolungano nel tempo i processi di osmoregolazione necessitano di un maggiore apporto energetico, che il consumo degli zuccheri è necessario per l'adattamento a nuove condizioni.

Per i gamberetti adattati alle diverse salinità le risposte glicemiche durante l'esposizione graduale sono state meno evidenti rispetto a quelle osservate per i granchi e più contenute rispetto a quanto visto per l'esposizione diretta. In questo lavoro non si sono effettuati prelievi dopo i passaggi effettuati durante l'esposizione graduale per il raggiungimento della salinità definitiva, ma dal confronto con i dati relativi agli step, sembra probabile che quando *P. elegans* deve affrontare costanti variazioni della salinità mobiliti glucosio entro periodi brevi, dopo il cambiamento delle condizioni esterne. Nel caso di stress iposalini estremi la quantità mobilitata non è probabilmente sufficiente a garantire l'adattamento, cosa che invece avviene a 26 e 46 PSU.

Quando lo sforzo metabolico e la richiesta di energia aumentano, si ha il passaggio dalla glicolisi aerobia a quella anaerobia con conseguente incremento della concentrazione di acido lattico (Spicer *et al.* 1990). Anche questo metabolita, come

gli enzimi coinvolti nei suoi processi di sintesi, può quindi essere utilizzato come biomarker della fisiologia degli animali sottoposti a stress (Morris e Oliver 1999; Ocampo *et al.* 2003; Menezes *et al.* 2006; Elumalai *et al.* 2007; Lorenzon *et al.* 2007, 2008).

Durante l'esposizione di *C. aestuarii* a salinità modificate, l'acido lattico nell'emolinfa si modifica solo alle condizioni estreme di 6 e 46 PSU, mentre in *P. elegans* si sono osservate variazioni della concentrazione di questo metabolita esclusivamente durante l'esposizione diretta.

In letteratura l'effetto diretto della salinità sulla latticemia è scarsamente documentato. Esso viene presentato come effetto secondario, assoggettato all'alterazione dei processi di respirazione durante stress osmotici. Sembra infatti che le modificazioni della salinità, causino variazioni sia della frequenza del battito degli scafognatiti con conseguenze sugli scambi gassosi, che del ritmo cardiaco con conseguenze sull'ossigenazione dei tessuti (Dufort *et al.* 2001; Lemos *et al.* 2001; Rosas *et al.* 2001). In *P. elegans* si è osservata iperventilazione, identificata con l'aumento del battito delle branchie (osservazione personale dato non presentato). È plausibile dunque che, anche nelle specie qui considerate, la modificazione della salinità, determinando sia l'aumento della richiesta di ATP che il passaggio al metabolismo anaerobio abbia delle ripercussioni sul flusso branchiale, identificabili con l'incremento della concentrazione di acido lattico.

Come di seguito descritto (paragrafo 4.6), la densità dell'emolinfa è correlata alla concentrazione delle proteine totali. Questo è risultato evidente anche per gli animali sottoposti a stress osmotico ($y=0,0875x-88,431$ $R^2=0,601$).

È noto dalla bibliografia che le proteine emolinfatiche vengono utilizzate durante i processi di osmoregolazione. Nelle specie *Farfantepenaeus paulensis* (Lemos *et al.* 2001), *Litopenaeus vannamei* (Rosas *et al.* 2001, 2002) e *Neomysis integer* (Fockedey *et al.* 2005) è stato infatti dimostrato che la deaminazione delle proteine fornisce amminoacidi liberi (FAA) che vengono utilizzati come fonte energetica nei processi di osmoregolazione. Infatti nei momenti di stress fisiologico, le riserve di glucosio possono venire rapidamente consumate e gli zuccheri forniti con la dieta non essere sufficienti per il sostenimento dei processi di osmoregolazione (da Silva e Kucharski 1992; Oliveira e da Silva 2000; Rosas *et al.* 2001). Gli amminoacidi, alimentando i processi gluconeogenetici con conseguente neosintesi di glucosio, potrebbero quindi essere fondamentali durante stress osmotico. In *C. granulata*, *C.*

maenas, *M. japonicus* e *P. keratulus* è inoltre stato evidenziato che gli FAA sono osmoliti fondamentali per il mantenimento degli equilibri osmotici dell'emolinfa (Tan e Choong 1982; Olivera e Da Silva 2000; Lee e Chen 2003).

In questo lavoro è stato osservato che con l'esposizione diretta di *C. aestuarii* alle salinità 6, 16 e 26 PSU, sia la densità dell'emolinfa che la concentrazione delle proteine totali subiscono una progressiva diminuzione, mentre durante l'esposizione a 46 PSU la densità dell'emolinfa rimane costante e le proteine totali diminuiscono. Queste osservazioni sembrano confermare l'utilizzo delle proteine durante i processi di osmoregolazione, e di conseguenza i tentativi compiuti da questa specie di compensare gli stress ambientali. La discordanza degli andamenti di densità e proteine osservata durante lo stress ipersalino, potrebbe essere dovuta all'aumento della concentrazione di ioni nell'emolinfa. In effetti le concentrazioni dei cloruri e del calcio aumentano durante l'esposizione a 46 PSU. Gli andamenti di densità e proteine totali durante l'esposizione graduale dei granchi a 26 e 46 PSU sono paralleli a quelli osservati ai relativi step, ma i loro valori sono più alti. Da ciò si può dedurre che il passaggio graduale a queste salinità (tempo 0h) provochi la mobilitazione di proteine, che nell'arco delle 48h successive al raggiungimento della condizione definitiva, vengono utilizzate per i processi di osmoregolazione. Gli andamenti rilevati a 16 e 6 PSU potrebbero indicare che anche la permanenza a salinità molto basse, proprio perché si è osservata un'alternanza tra mobilitazione e utilizzo delle proteine, riesce ad essere superata dai granchi.

In *P. elegans* esposto direttamente a salinità modificate la densità dell'emolinfa ha avuto diversi andamenti, mentre durante l'esposizione graduale ed in seguito ad adattamento sia la densità che le proteine totali diminuiscono a tutte le salinità. La differenza degli andamenti di proteine e densità in *P. elegans* osservata tra i due tipi di sperimentazioni indica che entro tempi brevi si ha mobilitazione delle proteine totali che vengono utilizzate quando le condizioni di stress si prolungano nel tempo. Il fatto che durante lo stress ipersalino acuto la concentrazione delle proteine totali abbia un andamento opposto rispetto alle altre salinità, conferma quanto già detto per la mobilitazione degli zuccheri, cioè che questa condizione è quella che crea maggiore stress fisiologico in questa specie.

Le proteine totali nell'emolinfa sono rappresentate per l'80-90 % dalle emocianine, che sono i pigmenti respiratori dei Crostacei, responsabili del trasporto dell'ossigeno (Chen e Cheng 1995; Watt *et al.* 1999; Chausson *et al.* 2004; Giomi e Beltramini

2007). Sono queste proteine oligomeriche costituite da più subunità (Mangum e Greaves 1996; Hodgson e Spicer 2001; Giomi e Beltramini 2007), dotate di un nucleo rameico capace di legare reversibilmente l'ossigeno (Martin *et al.* 1977; Abdenmour 1997; Spinozzi *et al.* 2005).

Come appena descritto, durante lo stress osmotico le proteine dell'emolinfa, quindi le emocianine potrebbero subire proteolisi per i processi di mantenimento dell'osmolalità dei fluidi corporei, con conseguenze sull'ossigenazione dei vari tessuti. È noto che in condizioni di stress durante le quali si verifica una diminuzione della concentrazione delle emocianine, la presenza di alcuni modulatori sia organici che inorganici, tra cui gli aumenti del pH dell'emolinfa, agiscono in modo da aumentare la loro affinità con l'ossigeno (Zeis *et al.* 1992; Whiteley e Taylor 1997; Taylor *et al.* 2000). In questo lavoro il pH dell'emolinfa degli animali sottoposti a stress osmotico ha subito sempre delle variazioni. Per entrambe le specie si sono osservati aumenti di pH durante lo stress iposalino acuto, mentre durante l'esposizione graduale aumenta a 6 PSU in *C. aestuarii* e a 46 PSU in *P. elegans*.

Il valore del pH è influenzato dalla presenza di metaboliti come acido lattico e ammoniaca. Nel caso degli stress osmotici, gli aumenti osservati sembrano essere condizionati dalla concentrazione di ammoniaca che viene prodotta in seguito alla deaminazione degli amminoacidi (Lee e Chen 2003; Lin *et al.* 2000; Weihrauch *et al.* 2004). In questo lavoro è stata determinata la concentrazione dell'ammoniaca in *C. aestuarii*. Dai dati ottenuti è evidente che, durante l'esposizione diretta, le salinità 6, 16 e 26 PSU inducono aumenti della concentrazione di ammoniaca, mentre a 46 PSU l'ammoniaca rimane costante. Sebbene non vi sia evidenza statistica, gli andamenti osservati per stress iposalini sembrano essere correlati proprio con la diminuzione delle proteine totali e con gli aumenti del pH.

Data l'importanza del mantenimento degli equilibri ionici all'interno dei fluidi corporei per il corretto funzionamento dei processi metabolici, in questo lavoro sono state misurate le concentrazioni di cloruri, calcio e ione ammonio, derivato dal catabolismo di amminoacidi e proteine.

Quando i Crostacei vengono esposti a salinità differenti rispetto a quelle a cui sono adattati, attraverso le superfici corporee ed i tessuti osmoregolatori si innescano movimenti ionici (Campbell e Jones 1990; Onken 1999; Rainbow e Black 2001), il cui scopo è quello di mantenere la loro concentrazione entro livelli fisiologici. Questi movimenti avvengono per diffusione passiva o per trasporto attivo grazie alla

presenza, sulle membrane degli ionociti delle branchie, di enzimi come la Na^+/K^+ -ATPasi, l' H^+ -ATPasi e l'anidrasi carbonica (Piller *et al.* 1995; Henry 2001; Henry *et al.* 2003; Ling Mo *et al.* 2003). È noto che stress osmotici inducono in numerose specie alterazioni dell'attività di questi enzimi o alterazioni nella loro concentrazione, al fine di mantenere nei Crostacei la capacità di controllare gli equilibri ionici (Charmantier 2001; Henry 2005; Serrano *et al.* 2007).

Nei Crostacei osmoregolatori, esiste un intervallo di salinità entro la quale la specie è conforme con l'ambiente esterno. Oltre a questo intervallo, vengono innescati i processi di ionoregolazione (Péqueux 1995). Verificare come variano le concentrazioni degli ioni nell'emolinfa dei Crostacei sottoposti a stress osmotico, è fondamentale quindi per comprendere quali siano gli intervalli di conformità, quelli in cui la specie innesca processi di osmo- ionoregolazione e quelli che rappresentano condizioni alle quali la specie non riesce a compensare.

Durante gli esperimenti di esposizione diretta alle diverse salinità di *C. aestuarii* si è osservato che gli stress iposalini causano progressive diminuzione della concentrazione dei cloruri e del calcio, mentre la salinità 46 PSU causa un loro aumento. Da questi dati sembra che questa specie, per intervalli di salinità compresi tra 6 e 46 PSU, sia osmoconforme con l'ambiente esterno, se il tempo di esposizione è ridotto (stress acuto).

Nei granchi *Menippe mercenaria* e *Libinia dubia* è stato osservato che le concentrazioni di cloro e glucosio sono correlate. Sembra infatti che a basse salinità, quindi a basse concentrazioni di cloro, venga stimolata l'attività dell'enzima epatopancreatico glucosio 6-fosfatasi fondamentale nei processi gluconeogenetici (Scholnick *et al.* 2006). La mancanza di scambi ionici attivi, e quindi il mantenimento della conformità, durante gli stress osmotici acuti in *C. aestuarii*, potrebbe quindi essere un adattamento associato all'aumento della richiesta energetica rispecchiata dal concomitante aumento della glicemia.

Dai dati riguardanti l'esposizione graduale e l'adattamento di due settimane alle diverse condizioni osmotiche dei granchi, è risultato evidente che se i tempi di esposizione aumentano la specie mantiene la conformità a 26 e 46 PSU. A queste salinità le concentrazioni ioniche interne probabilmente non subiscono modificazioni tali da richiedere l'intervento dei processi di osmoregolazione. Al contrario a 6 e 16 PSU vengono innescati movimenti ionici che garantiscono il mantenimento dell'equilibrio interno.

Sia la concentrazione dei cloruri che del calcio infatti dopo una prima diminuzione entro le 24h dal raggiungimento della salinità definitiva, che ha comunque un tenore inferiore rispetto a quello osservato durante gli step, aumenta avvicinandosi ai valori iniziali.

Per *P. elegans* l'immediato trasferimento dei gamberetti a tutte le salinità sperimentali, ha causato aumenti nella concentrazione dei cloruri. Per quanto riguarda il calcio invece, la sua concentrazione è aumentata a 26 e 46 PSU ed è diminuita alle altre salinità. In questo caso è evidente che nella specie si innescano movimenti ionici, soprattutto legati al cloro, già durante gli stress osmotici di breve durata. Queste conclusioni sono state confermate dagli esperimenti di esposizione graduale ed adattamento.

Quindi dai dati ottenuti durante il lavoro con *C. aestuarii* e *P. elegans* trasferiti direttamente o gradualmente alle diverse salinità si possono trarre alcune conclusioni riguardanti la loro capacità di adattamento alle nuove condizioni mediante risposte fisiologiche omeostatiche.

Per entrambe le specie, le risposte legate sia al metabolismo degli zuccheri che a quello delle proteine vengono attivate molto presto presumibilmente subito dopo la percezione dell'avvenuto cambiamento delle condizioni esterne. Per quanto riguarda la ionoregolazione si può concludere che mentre i gamberetti attivano processi di scambio ionico durante gli stress acuti, nei granchi questi sono ritardati ed innescati solo se il tempo di esposizione aumenta.

La differenza osservata nelle risposte legate a glicemia, proteine totali ed elettroliti nelle due specie è riconducibile alla loro ecologia e al loro habitat.

P. elegans, più sensibile a stress ipersalini, è una specie che si sposta tra il mare aperto e le lagune e che può essere esposta ad aumenti della salinità in maniera occasionale durante l'eventuale isolamento temporaneo dal mare (pozze di marea) durante i periodi estivi, quando l'evaporazione dell'acqua ne determina l'aumento della salinità.

C. aestuarii è una specie fossoria, che scava tane all'interno delle quali la salinità può anche essere piuttosto elevata. Nonostante gli osmocettori presenti sulle superfici esterne dei granchi regoli, tramite meccanismi di feedback, l'omeostasi comportamentale quindi gli impulsi alla fuga, è questo il probabile motivo per cui l'aumento della salinità è fisiologicamente meglio sopportata.

4.2.2 Modificazioni della temperatura e stress termico

Oltre alla salinità, la temperatura è un altro parametro che influenza sia la sopravvivenza che il benessere fisiologico dei Crostacei. Questo parametro nell'ambito degli ecosistemi costieri subisce variazioni giornaliere e stagionali, aggravate dalle attività antropiche.

Come già osservato per lo stress osmotico, una delle prime risposte messe in atto sia da *C. aestuarii* che da *P. elegans* in seguito a modificazioni della temperatura è la variazione della concentrazione di glucosio. Dalla bibliografia è noto che l'esposizione a temperature che si discostano di molto da quelle tollerate dalla specie, induce la mobilitazione di questo metabolita. È stato infatti osservato in *Homarus americanus* (Lorenzon *et al.* 2005, 2007), in *Panulirus interruptus* (Ocampo *et al.* 2003), in *Procambarus clarkii* (Zou *et al.* 2003) e nel gamberetto *Macrobrachium rosenbergii* (Kuo e Yang 1999) che le modificazioni della temperatura causano variazioni della glicemia.

Dai dati ottenuti in seguito all'esposizione diretta dei granchi alle diverse temperature, è possibile concludere che quelle che inducono maggiori stress, sono quelle estreme di 6 e 30° C. Il significato di questi andamenti è diverso: mentre le mobilitazioni di glucosio durante l'esposizione a basse temperature hanno un effetto positivo con conseguenze sulla sopravvivenza degli animali, quelle osservate a 30° C, temperatura alla quale il tasso di mortalità è elevato, esprimono solo un tentativo di compensazione al cambiamento ambientale. In *P. elegans* invece le maggiori variazioni della concentrazione di glucosio, sono state osservate durante le esposizioni a 24 e 30° C. Le temperature più fredde rispetto a quella di partenza, sembrano non determinare stress fisiologico tale da richiedere supporti energetici. Questa specie, riesce infatti ad adattarsi perfettamente alle temperature fredde, ma non a quelle calde. Le conclusioni riguardanti le risposte glicemiche appena discusse per entrambe le specie, sono state confermate dagli esperimenti di esposizione graduale e di adattamento, durante i quali si sono tuttavia osservate variazioni meno marcate rispetto a quelle viste per gli esperimenti di step a temperature modificate.

La temperatura influisce direttamente su altri parametri chimico-fisici dell'ambiente e principalmente sulla quantità di ossigeno disciolto, la cui pressione parziale è inversamente proporzionale alla temperatura dell'acqua. Quindi molto spesso per un animale acquatico l'aumento della temperatura significa dover fronteggiare sia lo

stress termico che quello ipossico, con conseguente passaggio dal metabolismo aerobio a quello anaerobio e relativa produzione di acido lattico (Spicer *et al.* 1990). In *C. aestuarii* esposto direttamente alle diverse temperature, si sono osservati incrementi della concentrazione di acido lattico, a 6 e 30° C. Nel primo caso, l'aumento si è verificato entro le 3h di esposizione, mentre nel secondo, l'aumento verificatosi dopo 48h di esposizione è stato causato dalla elevata variabilità della risposta fisiologica legata all'acido lattico negli animali sopravvissuti (vedi paragrafo 4.3). Durante il trasferimento graduale da 18 a 30° C invece, sebbene la capacità di tollerare le modificazioni sia più alta rispetto al relativo esperimento di esposizione diretta, si è osservata un'elevata concentrazione di acido lattico nell'emolinfa dei granchi fino al termine dell'esperimento, avvenuto a 48h, tempo dopo il quale nessun animale sopravvive. Da questo si può dedurre che, in accordo con quanto descritto per la risposta glicemica, durante lo stress termico cronico *C. aestuarii* tenta di compensare le modificazioni ambientali senza tuttavia riuscire ad adattarsi.

In *P. elegans* le maggiori variazioni della concentrazione di acido lattico si sono osservate a 30° C e soprattutto a 24° C, dato che conferma la suscettibilità di questa specie all'aumento della temperatura, e a 6° C nel caso di esposizione graduale. A questa temperatura alla quale non si è osservata mortalità, la richiesta metabolica aumenta nel corso del tempo e viene fronteggiata con il passaggio dal metabolismo aerobio a quello anaerobio.

I dati qui ottenuti sono in accordo con quanto trovato in altre specie di Crostacei, tra cui *Panulirus interruptus* (Ocampo *et al.* 2003), *Macrobrachium malconsonii* (Selvakumar e Geraldine 2003) e *Nephrops norvegicus* (Ridgeway *et al.* 2006) in cui si sono osservate alterazioni della latticemia, e in *H. americanus* (Juri e Watson 2000; Lorenzon *et al.* 2007) e *P. elegans* (Morris e Taylor 1985), in cui oltre alle variazioni nella concentrazione di acido lattico si sono osservate modificazioni dell'attività respiratoria e cardiaca.

Oltre a diminuire l'ossigeno disponibile per i Crostacei, le alterazioni della temperatura influiscono sulla concentrazione delle proteine totali nell'emolinfa che, come già evidenziato nel paragrafo precedente, sono rappresentate prevalentemente dalle emocianine.

In alcune specie di Crostacei è stato dimostrato che le variazioni della temperatura determinano alterazioni della concentrazione dell'emocianina circolante

nell'emolinfa (Engel *et al.* 2001; Sanchez *et al.* 2001). Come accade in queste specie anche in *C. aestuarii* e *P. elegans* la temperatura influenza il metabolismo proteico.

Gli andamenti di proteine e densità in relazione alla temperatura in *C. aestuarii* indicano come alla temperatura più bassa il susseguirsi dei prelievi di emolinfa incide sulla concentrazione delle proteine totali, che non vengono ripristinate probabilmente perché la specie entra in uno stato di inattività con conseguente calo dell'attività metabolica. Questo è in accordo con quanto trovato in *C. maenas*, in cui al di sotto dei 9° C l'inattività degli animali può essere ricondotta ad una diminuzione del metabolismo, (Cohen *et al.* 1995), ed è ulteriormente rafforzata dai dati ottenuti durante gli esperimenti di esposizione graduale dove la progressiva diminuzione della temperatura fino a 6° C induce un graduale calo delle proteine totali. La mobilitazione delle proteine alla temperatura di 24° C e il mantenimento della loro concentrazione durante l'esposizione a 30° C, cioè alle condizioni alle quali si manifesta oltre a stress termico quello legato alla carenza di ossigeno, può essere spiegata con la necessità di mantenere l'ossigenazione dei tessuti.

In *P. elegans* durante l'esposizione diretta alle diverse temperature si sono osservati andamenti opposti alle temperature calde e fredde. Infatti mentre a 24 e 30° C la concentrazione delle proteine totali aumenta, a 6 e 12° C diminuisce. Anche in questo caso gli andamenti osservati possono essere ricondotti alla necessità di mantenere l'ossigenazione dei tessuti: la diminuzione dell'ossigeno disciolto ad elevate temperature potrebbe indurre la mobilitazione di emocianine.

Gli esperimenti di esposizione sia dei granchi che dei gamberetti, sono stati effettuati in momenti diversi dell'anno al fine di simulare in laboratorio delle condizioni che rispecchiassero le condizioni climatiche negli ambienti lagunari. Per entrambe le specie, si sono osservate delle differenze nella concentrazione iniziale delle proteine. Dal momento che in alcune specie di Crostacei è stato dimostrato che esiste una differenza tra la concentrazione proteica nei mesi estivi ed invernali (daSilva-Castiglioni *et al.* 2007; Dutra *et al.* 2008), anche in *C. aestuarii* e *P. elegans* le differenze osservate potrebbero essere legate alla stagionalità.

In *C. aestuarii* è stato osservato che le proteine totali sono più elevate nei periodi tardo invernali, durante i quali si sono effettuati gli esperimenti a 6° C, diminuiscono drasticamente durante il periodo primaverile – estivo durante il quale si sono effettuati gli esperimenti a 24 e 30° C e si è creato il gruppo di controllo mantenuto a 18° C, tornano ad aumentare leggermente in autunno, dato riscontrato durante gli

esperimenti di esposizione a 12° C. Viceversa per i gamberetti appartenenti alla specie *P. elegans*, le concentrazioni maggiori di proteine sembrano essere legate ai periodi caldi, mentre durante i mesi freddi la loro concentrazione è significativamente inferiore. Per entrambe le specie le differenze appena descritte sono probabilmente riconducibili al ciclo vitale: i granchi infatti si riproducono in febbraio, mentre i gamberetti nel periodo estivo. Durante questi periodi probabilmente la concentrazione delle proteine aumenta per un correlato aumento delle vitellogenine, le proteine responsabili dello sviluppo ovarico nelle femmine dei Crostacei (Tsukimura 2001; Raviv *et al.* 2006).

L'alterazione della temperatura oltre a variare la concentrazione delle proteine totali causa la destabilizzazione della struttura delle emocianine e la diminuzione della loro capacità di legare l'ossigeno (Morris e Bridges 1985; Whiteley e Taylor 1997; Adamczewska e Morris 1998; Taylor *et al.* 2000). È stato inoltre ampiamente dimostrato che esistono numerosi modulatori sia organici che inorganici che hanno il doppio effetto di mantenere la stabilità delle emocianine e di aumentarne l'affinità con l'ossigeno. Tra i primi modulatori organici presi in esame durante gli stress ambientali, c'è l'acido lattico (Truchot 1980; McMahon 2001; Giomi e Beltramini 2007), mentre tra quelli inorganici c'è il pH dell'emolinfa (Zeis *et al.* 1992; Adamczewska e Morris 1998; Taylor *et al.* 2000; Bridges 2001; McMahon 2001).

In questo lavoro, a differenza di quanto osservato in *H. americanus*, in cui il pH varia in maniera inversamente proporzionale alla temperatura (Qadri *et al.* 2007), si sono osservate sia in *C. aestuarii* che in *P. elegans* aumenti del valore del pH dell'emolinfa durante l'esposizione a 12, 24 e 30° C. Nei granchi il trasferimento graduale da 18 a 30° C è l'unico che causa un'iniziale diminuzione del valore di pH. Questo andamento è spiegato dall'acidificazione dell'emolinfa indotta dal concomitante aumento dell'acido lattico.

Questi incrementi sono probabilmente correlati al mantenimento della stabilità delle emocianine e della loro capacità di legare l'ossigeno. A parte nei casi in cui il pH è evidentemente influenzato da un'elevata concentrazione di acido lattico, l'alcalosi metabolica è probabilmente dovuta all'attivazione di un meccanismo tampone, messo in atto proprio per il mantenimento della funzionalità delle emocianine. Sebbene il sistema tampone prevalentemente attivato negli animali sia quello legato ai carbonati, è probabile che durante gli stress termici sia la produzione di ammoniaca a causare innalzamenti del pH dell'emolinfa. I Crostacei sono infatti

ammoniotelici, e come prodotto di scarto derivato dal catabolismo delle proteine producono ammoniaca (Durand *et al.*, 1998; 2000; Lee e Chen 2003; Weihrauch *et al.* 2004). Confrontando i dati relativi alla concentrazione delle proteine totali e al pH nello stesso gruppo di animali risulta evidente che la produzione di ammoniaca avvenga a carico di proteine diverse da quelle emolinfatichiche: a temperature estreme, come ad esempio a 30° C sebbene rimanga elevata la concentrazione delle proteine totali, aumenta anche il valore del pH.

In seguito al lavoro effettuato con le specie *C. aestuarii* e *P. elegans* trasferiti direttamente o gradualmente alle diverse temperature, si possono trarre le seguenti conclusioni. Sia dall'analisi dei dati di mortalità che da quelli riguardanti l'esposizione diretta e graduale a temperature modificate è evidente che per entrambe le specie 12° C non rappresenta una temperatura che determina stress fisiologico. Non si sono infatti osservate variazioni elevate dei parametri fisiologici, e quando si sono verificate sono servite per la compensazione dei cambiamenti ambientali e per la sopravvivenza a nuove condizioni. La temperatura 30° C sia per i granchi che per i gamberetti è una condizione che non viene tollerata, e nonostante si siano verificate risposte fisiologiche che dimostrano il tentativo di fronteggiare lo stress termico, gli animali non si adattano. Lo stress termico causato dall'esposizione a 24° C è meglio superato dai granchi piuttosto che dai gamberetti. Infine alla temperatura più bassa, i gamberetti mettono in atto risposte fisiologiche che determinano sia il superamento delle alterazioni metaboliche che l'adattamento, i granchi tendono a diminuire il loro metabolismo.

Anche per lo stress termico, come quello osmotico, si sono osservate delle differenze nelle risposte fisiologiche messe in atto dalle due specie. Spesso alla stessa temperatura si sono osservati andamenti opposti degli stessi parametri fisiologici. Questa differenza è probabilmente legata al diverso ciclo vitale delle due specie, caratterizzato da differenti momenti riproduttivi.

4.2.3 Emersione

Nelle zone costiere, durante i periodi di bassa marea, i Crostacei possono rimanere isolati in pozze di marea ed essere sottoposti a periodi di diminuzione dell'ossigeno disponibile. In questo lavoro, i granchi appartenenti alla specie *C. aestuarii* sono stati sottoposti ad esperimenti di emersione per verificare quali siano le risposte fisiologiche legate ad ipossia.

Prolungate esposizioni all'aria causano in numerose specie di Crostacei alterazioni del metabolismo respiratorio identificabile attraverso alcuni biomarkers fisiologici, tra cui il glucosio e l'acido lattico (Taylor e Spicer 1987; Morris e Oliver 1999; Watt *et al.* 1999; Speed *et al.* 2001; Morris 2002). Il significato della mobilitazione di glucosio e della produzione di acido lattico, in seguito al passaggio dalla glicolisi aerobia a quella anaerobia, è già stato precedentemente descritto per gli esperimenti di modificazione di salinità o temperatura: entrambi questi metaboliti vengono mobilitati o sintetizzati per il rifornimento energetico durante momenti in cui la richiesta metabolica aumenta, quindi durante momenti di stress.

I risultati qui ottenuti in *C. aestuarii*, concordano con quelli ottenuti in *Munida rugosa* e *Liocarcinus depurator* in cui glucosio e acido lattico subiscono variazioni in seguito ad emersione (Bergmann *et al.* 2001) e confermano l'importanza di questi metaboliti nelle risposte all'ipossia. Entrambi i parametri infatti hanno subito incrementi significativi ed è stato inoltre osservato che, come in altre specie di Crostacei (Morris e Oliver 1999; Ocampo *et al.* 2003; Lorenzon *et al.* 2007), la combinazione di temperatura ed emersione influisce sul tenore delle risposte. Le condizioni che hanno causato i maggiori incrementi di glucosio e acido lattico sono il passaggio in ambiente subaereo a 30° C e a 24° C partendo da vasche rispettivamente riempite con acqua a 22 e 18° C. L'accumulo di acido lattico in seguito a questo tipo di stress è probabilmente responsabile dell'elevata mortalità osservata in questi gruppi. Durante il trasferimento dei granchi in ambiente subaereo a 18° C partendo da acqua alla stessa temperatura, si sono osservati aumenti costanti sia della glicemia che della latticemia, per tutta la durata dell'esperimento. Nonostante questo, visto che in questo gruppo la totalità dei granchi riesce a sopravvivere, gli zuccheri vengono utilizzati con successo per il mantenimento dell'omeostasi durante un periodo di stress. È noto che prolungati periodi di esposizione a condizioni ipossiche o anossiche, causano anche in *P. elegans* evidenti aumenti sia della glicemia che dell'acido lattico (Taylor e Spicer 1987).

Un'ulteriore risposta messa in atto sia dai granchi che durante l'emersione è la variazione delle proteine totali, rappresentate dalle emocianine.

Le emocianine, come già discusso, sono i pigmenti respiratori, e sono responsabili del trasporto dell'ossigeno verso tutti i tessuti (Chausson *et al.* 2004; Giomi e Beltramini 2007). Nello scampo *Nephrops norvegicus* e nel gamberetto *Crangon crangon* esposti a condizioni di ipossia è stato evidenziato un aumento delle

emocianine (Giomi e Beltramini 2007), ed in altri Crostacei i risultati sono stati analoghi (Mangum 1994; Mangum e McKenney 1996; Mangum e Joy 1997; Engel *et al.* 2001; Sanchez *et al.* 2001). I risultati ottenuti in *C. aestuarii* durante questo lavoro di ricerca non sono in accordo con quanto trovato in bibliografia. Infatti in tutti i gruppi, si sono osservate diminuzioni sia della densità che delle proteine dell'emolinfa che potrebbero essere collegate con l'utilizzo di queste ultime nei processi di osmoregolazione. Come già sottolineato nel paragrafo in cui sono stati discussi gli stress osmotici, la proteolisi delle proteine dell'emolinfa libera amminoacidi che vengono utilizzati per il mantenimento dell'osmolalità dell'emolinfa (Lemos *et al.* 2001; Rosas *et al.* 2001, 2002; Fockedei *et al.* 2005). L'emersione infatti provoca sia alterazioni nella volemia corporea che nei processi di ionoregolazione, con ripercussioni sull'osmolalità dell'emolinfa. In *Ucides cordatus* e in *Carcinus maenas* infatti sono state osservate alterazioni dei processi di escrezione, con ripercussioni sia sull'equilibrio idrico che sul bilancio ionico (Harris *et al.* 1993).

Associati alla diminuzione delle proteine totali si sono osservati in tutti i gruppi esposti all'aria aumenti del valore del pH dell'emolinfa, probabilmente dovuti proprio all'accumulo di ammoniaca nell'emolinfa. È infatti stato dimostrato che in *Maia squinado* esposta all'aria aumenta la quantità di ammoniaca accumulata nell'emolinfa (Durand *et al.* 2000), e in *Cancer pagurus* la quantità di urina escreta varia tra granchi mantenuti in acqua e in granchi mantenuti in ambiente subaereo (Regnault 1992). Le variazioni sia della capacità escretorie ma soprattutto dell'accumulo di ammoniaca, che viene scambiata a livello dei tessuti osmoregolatori, in particolare a livello delle branchie grazie alla presenza di pompe di scambio (Weihrauch *et al.* 2002), potrebbe dimostrare che l'emersione ha influenza sugli scambi ionici (Durand *et al.* 2000). In effetti in questo lavoro si sono osservate alterazioni nelle concentrazioni di cloruri e calcio durante l'emersione di *C. aestuarii*. A parte nel gruppo trasferito da acqua a 18° C ad ambiente subaereo a 18° C, cioè nel gruppo in cui gli animali meglio reagiscono allo stress e in cui i cloruri hanno andamento molto simile a quello osservato nel controllo, in tutti gli altri gruppi sperimentali dopo un'iniziale diminuzione si è verificato un loro aumento. Analogamente durante il corso degli esperimenti il calcio tende ad accumularsi nell'emolinfa.

4.3 Casi individuali

I dati fisiologici appena discussi, hanno sempre riguardato le medie dell'intero gruppo sperimentale. Per alcuni casi però è opportuno specificare l'andamento di casi individuali, in cui la risposta fisiologica è stata concorde con quella degli altri individui dello stesso gruppo, ma con un' intensità maggiore.

Nel caso ad esempio dell'esposizione graduale alla salinità 46 PSU, al tempo 8h, la media dell'acido lattico è stata $6,70 \pm 4,23$ es mg dL^{-1} (fig. 4D). L'ampiezza dell'errore standard è determinato dalla deviazione rispetto alla media di un unico individuo in cui l'acido lattico aumenta fino alla concentrazione di $44,7 \text{ mg dL}^{-1}$ e questo animale non sopravvive fino al prelievo del tempo successivo. Nello stesso gruppo, si sono avuti sia granchi che sono sopravvissuti fino alla fine dell'esperimento che granchi che muoiono prima del suo termine, senza che vi fossero aumenti di questo metabolita. Di seguito sono riportati gli esempi appena descritti.

Ac. Lattico	0h	3h	8h	24h	48h	14d
1	5,9	3,4	2,5	1,7	3,0	
2	2,1	2,2	4,0			
3	4,0	5,6	3,2	5,2	9,4	1,8
4	2,9	13,6	44,7			

Questi andamenti possono essere ricondotti a due motivazioni. Da un lato esiste per ciascun parametro fisiologico un ampio spettro di risposte possibili, che sono alla base della variabilità individuale di ogni specie animale. Dall'altro, il fatto che l'acido lattico aumenta notevolmente in un solo individuo, può essere spiegato con le conoscenze bibliografiche che dimostrano che la sua concentrazione può essere alterata da numerosi fattori, oltre allo stress osmotico, tra cui la competizione che si instaura con altri individui (Huntingford et al. 1995), in questo caso mantenuti nelle stesse vasche sperimentali.

Altri casi anomali si sono osservati durante l'esposizione di *C. aestuarii* a 30°C (fig. 11A e B). In questo caso sia la glicemia che l'acido lattico aumentano in uno solo dei tre individui sopravvissuti dopo 48h di esposizione. Anche in questo caso le spiegazioni possono essere quelle appena discusse per l'esempio precedente, ma vista la criticità del fattore stressogeno, che si riflette sia sulla mortalità che sul coinvolgimento di più parametri fisiologici, è più probabile che la variabilità

osservata possa essere ricondotta ad un mancanza di compensazione e di ripristino dell'omeostasi.

4.4 Altre osservazioni effettuate in fase sperimentale

Durante ciascuna fase sperimentale, oltre alla determinazione della mortalità e alla misurazione dei parametri fisiologici, si sono effettuate delle osservazioni per monitorare lo stato generale degli animali.

Come già osservato in precedenti lavori, le modificazioni della salinità provocano alterazioni del comportamento, ed in particolare in *Carcinus maenas* si sono osservati incrementi nell'attività motoria (McGaw *et al.* 1999), mentre nello Stomatopode *Squilla mantis* e nel Decapode *Astacus leptodactylus* si è osservato l'aumento dell'aggressività (Martinis 2003). Quest' ultimo effetto sembra essere stato riconfermato in questo lavoro nel granchio *C. aestuarii*. Sia durante l'esposizione diretta a 6 e 16 PSU che durante i periodi di diminuzione graduale della salinità, si sono osservati aumenti dell'attività degli animali e della loro aggressività.

Il comportamento nei Crostacei è mediato da alcuni neurotrasmettitori, tra cui la serotonina (5-HT). È stato dimostrato che elevate concentrazioni di questa bioamina nell'emolinfa determinano aumenti dell'aggressività di alcune specie di Decapodi (Edwards e Kravitz 1997; Sneddon *et al.* 1999). È inoltre noto che questo neurotrasmettitore modula il rilascio di cHH, l'ormone iperglicemizzante dei Crostacei, influenzando quindi sulle risposte glicemiche (Santos *et al.* 2001; Lorenzon *et al.* 2004a).

Le osservazioni qui fatte danno un'indicazione sul ruolo ecologico della 5-HT: il suo duplice effetto è preparatorio sia per possibili spostamenti, che richiedono energia in aggiunta a quella consumata nei processi osmoregolatori, che per eventuali atteggiamenti di difesa da predatori o competitori.

In *C. aestuarii* è stato osservato che durante le due settimane di adattamento alla temperatura 6° C, sia l'attività motoria che e l'alimentazione degli animali si riducono (osservazioni personali dati non riportati). Questa osservazione sembra confermare da un lato le conclusioni raggiunte da Cohen *et al.*, (1995) in *Carcinus maenas*, in cui richiesta metabolica e la predazione diminuiscono rispettivamente al di sotto di 6° e 9° C, dall'altro il fatto che la temperatura influisce sul comportamento dei Crostacei (Crossin *et al.* 1998; Juri e Watson III 2000). Le informazioni bibliografiche al riguardo sono molto scarse, e riguardano poche specie tra cui

l'astice *Homarus americanus* (Crossin *et al.* 1998). È necessario dunque prendere in considerazione questo aspetto dei Crostacei per definirne meglio l'etoecologia.

In *Palaemon elegans* non è stata osservata nessuna alterazione del comportamento in seguito a modificazioni dei parametri ambientali, al contrario i gamberetti sembrano entrare in uno stato di quiescenza. Questo comportamento trova accordo con quanto osservato da Taylor e Spicer (1987) durante l'esposizione di questa specie ad ambienti ipossici.

Durante i periodi di esposizione prolungata alla salinità 46 PSU però si sono osservate però delle anomalie nella pigmentazione dei gamberetti (fig. 34).

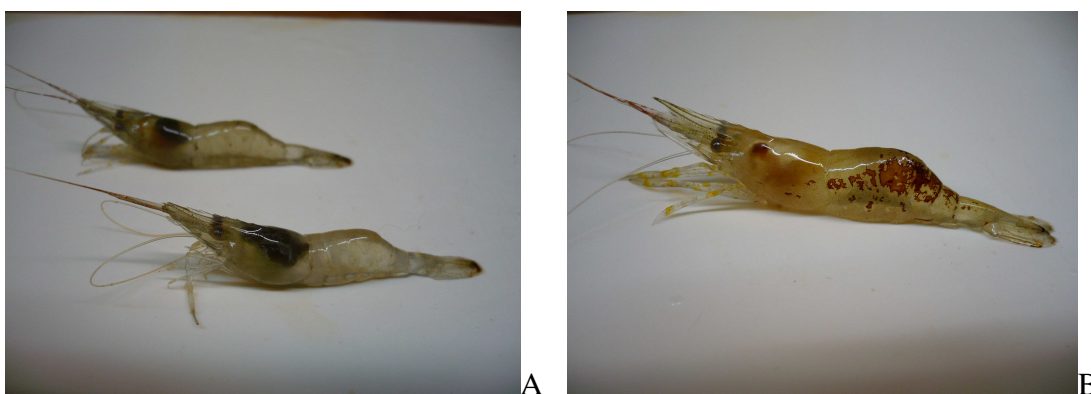


Figura 34: in A gamberetti mantenuti a 36 PSU, in B gamberetti esposti gradualmente a 46 PSU con anomalie della pigmentazione.

I cambiamenti fisiologici del colore sono tipici dei Crostacei, come di altri animali, e si verificano in seguito a stimolazioni ambientali (Nery e Castrucci 1997). I meccanismi che determinano gli spostamenti centripeti e centrifughi dei granuli cromatofori, tipici delle cellule dei tegumenti esterni, si innescano sotto stimolazione di due ormoni prodotti dal complesso ghiandola del seno/organo-X nel peduncolo oculare: il pigment concentrating hormone (PCH) e il pigment dispersing hormone (PDH). Questo potrebbe far supporre che lo stress iperosmotico causi in *P. elegans* degli scompensi ormonali.

Dalla bibliografia è noto che la concentrazione del calcio, soggetto a ionoregolazione, è coinvolto nei processi di cambiamenti del colore (McNamara e Ribeiro 2000). Nonostante questo le informazioni al riguardo sono però scarse, e ulteriori studi dovrebbero essere condotti per spiegare la correlazione tra cambiamenti fisiologici del colore e stress ambientali.

4.5 Upogebia pusilla

Prima di impostare il disegno sperimentale per questa specie mai utilizzata presso i laboratori universitari, è stato necessario cercare le condizioni di stabulazione ideali, che garantissero cioè sia la sopravvivenza che buone condizioni fisiologiche dei gamberetti.

Partendo dal presupposto che *U. pusilla* è specie fossoria si è tentato di controllare soprattutto la quantità di substrato presente sul fondo delle vasche, l'aerazione dell'acqua e l'illuminazione.

Nonostante i gamberetti siano sopravvissuti più a lungo nelle vasche prevalentemente riempite con acqua, rispetto a quelle in cui era maggiore lo spessore di sabbia sul fondo, la morte degli animali è sempre verificata entro 5 giorni dalla loro immersione nelle vasche.

Parallelamente alle prove per la stabulazione, si è voluto verificare il numero di prelievi di emolinfa, la quantità prelevabile e a che distanza di tempo senza indurre eccessivo stress fisiologico. Anche in questo caso, indipendentemente dalla quantità di emolinfa prelevata, il 100% di mortalità si è osservata entro 3h. Da queste prove si può concludere che *U. pusilla* è una specie difficilmente stabulabile, e con le strutture a noi disponibili non utilizzabile all'interno di un disegno sperimentale.

Dagli ulteriori gruppi creati per ottenere le prime informazioni sulla fisiologia di questa specie e sulle risposte maggiormente implicate nel caso di stress, è risultato evidente che, sia la sola manipolazione (gamberetti mantenuti in acqua) che il mantenimento all'aria, si riflette sul metabolismo degli zuccheri e sul metabolismo anaerobio. I significativi aumenti di acido lattico in questa specie, sono infatti stati osservati in altri talassinidi (Pritchard e Eddy 1979; Zebe 1981).

4.6 Correlazioni densità – proteine totali e corse elettroforetiche

In questa tesi è stato dimostrato che nelle specie *C. aestuarii* e *P. elegans* sia lo stress osmotico, che quello termico, che quello legato all'emersione causano variazioni nella concentrazione delle proteine totali. Questo stesso effetto è stato dimostrato in altri Crostacei (Mangum 1994; Mangum e McKenney 1996; Mangum e Joy 1997; Juri e Watson 2000; Engel *et al.* 2001; Lemos *et al.* 2001; Rosas *et al.* 2001, 2002; Sanchez *et al.* 2001; Ocampo *et al.* 2003; Selvakumar e Geraldine 2003; Fockedey *et al.* 2005; Rdigeway *et al.* 2006; Lorenzon *et al.* 2007, 2008).

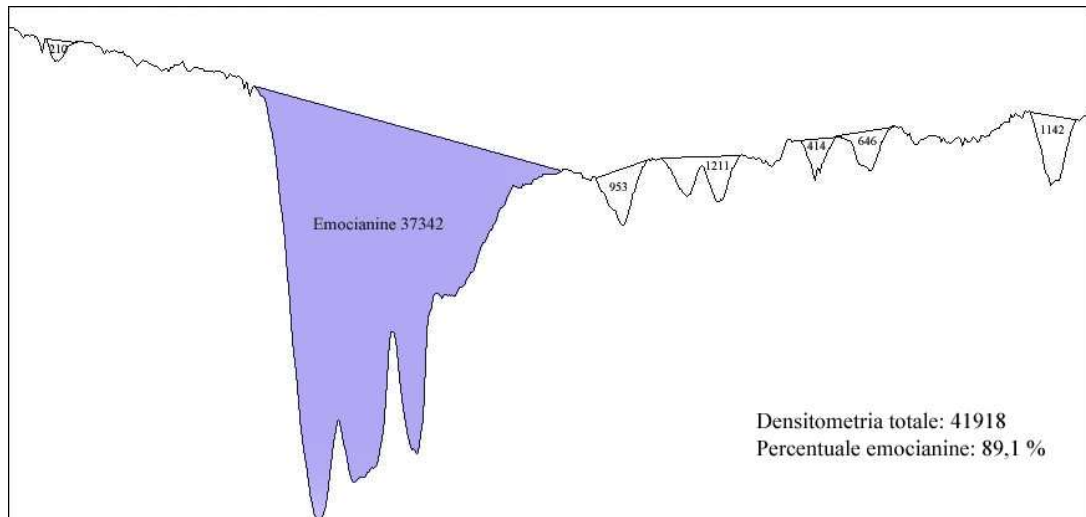
La determinazione delle proteine totali può dunque essere fondamentale per la valutazione dello stato di salute dei Crostacei sottoposti a condizioni di stress. Dai risultati ottenuti, le proteine totali dell'emolinfa di tutte e tre le specie, misurate con metodo fotometrico, risultano altamente correlate alla densità dell'emolinfa, misurata mediante l'uso di un refrattometro (fig. 32).

Come sottolineato in un nostro recente lavoro, effettuato su diverse specie di crostacei, (Lorenzon *et al.* in press) questo risultato è importante, oltre che per il significato fisiologico, anche dal punto di vista metodologico. L'utilizzo del refrattometro ottico infatti, utilizzato per la misurazione della densità, è infatti pratico e veloce e meno costoso rispetto ai metodi colorimetrici di laboratorio tipicamente usati per la determinazione della concentrazione delle proteine totali. Quindi l'utilizzo della rifrattometria per la quantificazione delle proteine offre un valido strumento da utilizzare in campo non avendo inoltre esigenze particolari di pre-trattamento del campione.

Le corse elettroforetiche effettuate con l'emolinfa di *C. aestuarii* esposto all'aria, hanno evidenziato in tutti i casi che le proteine totali sono rappresentate per la maggior parte dalle emocianine. Questo conferma ciò che è già stato affermato per altre specie di Crostacei (Chen e Cheng 1995; Watt *et al.* 1999; Chausson *et al.* 2004; Lorenzon *et al.* 2007), ovvero che le emocianine rappresentano l'80-90% delle proteine totali nell'emolinfa.

L'analisi densitometrica del pattern elettroforetico dell'emolinfa è un metodo semi quantitativo dal quale di volta in volta si può ottenere la frazione rappresentante le emocianine. L'acquisizione di dati in questo senso, potrebbe aggiungere alla correlazione tra densità e proteine totali, quella tra densità ed emocianine. In basso è riportato un esempio di densitometria.

In questo lavoro si è provato a effettuare la densitometria di gel colorati in blu di Coomassie. Dal momento che questo tipo di colorazione non è molto sensibile e che evidenzia bande diverse dalle emocianine solo nel caso in cui la concentrazione delle proteine totali è elevata, una migliore resa del metodo potrebbe essere raggiunta utilizzando la colorazione argentea.



4.7 Domande aperte

Il lavoro svolto ha portato a rispondere ad alcune domande, sia ecologiche che ecofisiologiche. Nonostante questo si sono aperti nuovi quesiti.

In questo lavoro infatti si sono considerate le risposte fisiologiche in seguito al passaggio delle specie considerate dalle condizioni di stabulazione, considerate fisiologiche, a condizioni ambientali modificate. Non si è invece esaminato cosa accade durante il recupero, quindi durante il ripristino delle condizioni fisiologiche dopo un periodo di stress.

Un altro aspetto che dovrebbe essere approfondito è quello etologico. Andrebbero quindi acquisite informazioni che riguardano le interazioni che intercorrono tra le specie e i loro predatori, durante effettivi momenti di stress ambientale.

È noto infine che le alterazioni dei parametri chimico-fisici dell'acqua modifichino il comportamento delle sostanze inquinanti. Nell'ambito di uno studio ecologico che riguarda le reti trofiche questo lavoro potrebbe essere uno spunto per un'indagine ecotossicologica (bioaccumulo) ed ecologica (biomagnificazione).

5 BIBLIOGRAFIA

Abdennour C., 1997. Copper, zinc and haemocyanin concentration in four caridean decapods (Crustacea): size relationships. *Hydrobiologia*, 346, 1-9.

Adamczewska A. M., Morris S., 1998. The functioning of the haemocyanin of the terrestrial Christmas island red crab *Gecarcoidea natalis* and roles for organic modulators. *Journal of Experimental Biology*, 201, 3233-3244.

Anger K., Spivak E., Luppi T., 1998. Effects of reduced salinities on development and bioenergetics of early larva shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 220, 287-304.

Backwell P. R. Y., O'Hara P. D., Chrysty J. H., 1998. Prey availability and selective foraging in shorebirds. *Animal Behaviour*, 55, 1659-1667.

Balkis H., Kurun A., 2008. The crab species found in the Edremit bay (NE Aegean Sea). *Journal of Black sea/Mediterranean Environment*, 14, 39-51.

Barradas C., Dunel – Erb S., Lignon J., Péqueux A., 1999a. Superimposed morphofunctional study of ion regulation and respiration in single gill filaments of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Crustacean Biology*, 19, 14–25.

Barradas C., Wilson J. M., Dunel – Erb S., 1999b. Na^+/K^+ -ATPase activity and immunocytochemical labeling in podobranchial filament and lamina of the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz : evidence for the existence of sodium transport in the filaments. *Tissue & Cell*, 31, 523–528.

Barret R. T., Camphuysen K. (C. J.), Anker – Nilssen T., Chardine J. W., Furness R. W., Garthe S., Huppopp O., Leopold M. F., Montevecchi W. A., Veit R. R., 2007. *Journal of Marine Science Advance Access*, 1-17.

Bergmann M., Taylor A. C., Moore P. G., 2001. Physiological stress in decapod crustaceans (*Munida rugosa* and *Liocarcinus depurator*) discarded in the Clyde Nephrops fishery. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259, 215-229.

Beyenbach K. W., Wieczorek H, 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological role and regulation. *Journal of Experimental Biology*, 209, 577-589.

Botto F., Iribarne O., 2000. Contrasting effects of two borrowing carbs (*Chasmagnathus granulata* and *Uca uruguayensis*) on sediment composition and transport in estuarine environments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51, 141-151.

Bridges C. R., 2001. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. *Journal of Experimental Biology*, 203, 1021-1032.

Brouwer M., Larkin P., Brown-Peterson N., King C., Manning S., Denslow N., 2004. Effects of hypoxia on gene and protein expression in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Environmental Research*, 58, 87–792.

Burton R. F., 1995. Cation balance in crustacean haemolymph: relationship to cell membrane potentials and membrane surface charge. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111A, 121-131.

Cameron J. N., 1989. *The respiratory physiology of animals*. Oxford university Press, New York.

Campbell P. J., Jones M. B., 1990. Water permeability of *Palaemon longirostris* and other euryhaline caridean prawns. *Journal of Experimental Biology*, 150, 145–158.

Chang E. S., Keller R., Chang S. A., 1998. Quantification of crustaceans Hyperglycemic Hormone by ELISA in haemolymph of the lobster *Homarus americanus*, following various stress. *General Comparative Endocrinology*, 111, 359-366.

Charmantier G., Haond C., Lignot G. H., Charmantier-Daures M., 2001. Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: a review in homarid lobsters. *Journal of Experimental Biology*, 204, 967-977.

Chausson F., Sanglier S., Leize E., Hage`ge A., Bridges C. R., Sarradin P. M., Shillito B., Lallier F. H., Zal F., 2004. Respiratory adaptations to the deep-sea hydrothermal vent environment: the case of *Segonzacia mesatlantica*, a crab from the Mid-Atlantic Ridge. *Micron*, 35, 31–41.

Chen J. C., Cheng S. Y., 1995. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. *Journal of Comparative Physiology*, 164B, 530-535.

Cheng W., Chen J. C., 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 10, 387-391.

Chung K. F., Lin H. C., 2006. Osmoregulation and Na,K-ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144A, 48-57.

Cieluch U., Charmantier G., Grousset E., Charmantier-Daures M., Anger K., 2005. Osmoregulation, Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase, and Ultrastructure of Branchial Epithelia in the Developing Brown Shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Physiological and Biochemical Zoology*, 78, 1017–1025.

Cimino E. J., Owens L., Bromage E., Anderson T. A., 2002. A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on levels of hso86 in *Cherax*

quadricarinatus and *Penaeus monodon*. Comparative Biochemistry and Physiology, 132A, 591-598.

Cohen A. N., Carlton J. T., Fountain M. C., 1995. Introduction, dispersal and potential impacts of the green crab *Carcinus maenas* in San Francisco bay, California. Marine Biology, 122, 225-237.

Corbel V., Zuprizal Z., Shi C., Huang, Sumartono, Arcier J. M., Bonami J. R., 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Fish Diseases, 24, 377-382.

Crossin G. T., Al-Ayoub S. A., Jury S. H., Howell W. H., Watson H., 1998. behavioural thermoregulation in the American lobster *Homarus americanus*. Journal of Experimental Biology, 291, 365-374.

Cuculescu M., Hyde D., Bowler K., 1998. Thermal tolerance of two species of marine crab, *Cancer pagurus* and *Carcinus maenas*. Journal of Thermal Biology, 23, 107-110.

Da Silva-Castiglioni D., Dutra B. K., Oliveira G. T., Buckup G. B., 2007. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). Comparative Biochemistry and Physiology, 148, 204-213.

Da Silva R. S. M., Kucharski L. C. R., 1992. Effect of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet. Comparative Biochemistry and Physiology, 101A, 631-634.

DeFur P. L., Pease A., Siebelink A., Elfers S., 1988. Respiratory responses of blue crabs, *Callinectes sapidus*. Comparative Biochemistry and Physiology, 89A, 97-101.

De Pirro M., Marchetti G. M., Chelazzi G., 1999. Foraging interaction among three benthic fish in a *Posidonia oceanica* reef lagoon along the Tyrrhenian coast. Journal of Fish Biology, 54 1300-1309.

Devescovi M., Lucu C., 1995. Seasonal changes of the copper level in shore crabs *Carcinus mediterraneus*. Marine Ecology Prog. Series 120, 169-174.

Dolashka-Angelova P., Beltramini M., Dolashki A., Salvato B., Hristova R., Voelter W., 2001. Carbohydrate *Composition of Carcinus aestuarii* Hemocyanin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 389, 153–158.

Dove A. D. M., Sokolowski M. S., Bartlett S. L., Bowser P. R., 2005. Spatio-temporal variation in serum chemistry of the lobster, *Homarus americanus* Milne-Edwards. Journal of Fish Diseases, 28, 663-675.

Dufort C. G., Juri S. H., Newcomb J. M., O'Grady III D. F., Watson III W. H., 2001. Detection of salinity by the lobster, *Homarus americanus*. Biological Bulletin, 201, 424–434.

Dunel – Erb S., Barradas C., Lignon J., 1997. Morphological evidence for the existence of two distinct types of mitochondria rich cells in the gill of the crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz. Acta Zoologica, 78, 195–203.

Durand F., Devillers N., Lallier F. H., Regnault M., 2000. Nitrogen excretion and changes in blood components during emersion of the subtidal spider crab *Maia squinado* (L.). Comparative Biochemistry and Physiology, 127A, 259-271.

Durand F., Regnault M., 1998. Nitrogen metabolism of two portunid crabs, *Carcinus maenas* and *Necora puber*, during prolonged air exposure and subsequent recovery: a comparative study. Journal of Experimental Biology, 201, 2515–2528.

Dutra B. K., Santos R. B., Bueno A. A. P., Oliveira G. T., 2008. Seasonal variation in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyaella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). Comparative Biochemistry and Physiology, 151A, 322-328.

Eckhardt E., Pierrot C., Thuet P., Van Herp F., Charmantier – Daures M., Trilles J. P., Charmantier G., 1995. Stimulation of osmoregulation processes in the perfused

gills of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. *General and Comparative Endocrinology*, 99, 169–177.

Edwards D. H., Kravitz E. A. 1997. Serotonin, social status and aggression. *Current Opinion in Neurobiology*, 7, 812-819.

Elumalai M., Antunes C., Guilhermino L., 2007. Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho river estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. *Chemosphere*, 66, 1249-1255.

Egglestone D. B., Etherington L. L., Ward, E. E., 1998. Organism response to habitat patchiness: species and habitat- dependent recruitment of decapod crustaceans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 223, 111–132.

Engel D. W., Brouwer M., Mercaldo-Allen R., 2001. Effects of molting and environmental factors on trace metal body-burdens and hemocyanin concentration in American lobster, *Homarus americanus*. *Marine Environmental Research*, 52, 257-269.

Erk M., Muysen B. T. A., Ghekiere A., Janssen J. R., 2008. Metallothioneins and cytosolic metals in *Neomysis integer* axposed to cadmium at different salinity. *Marine Environmental Research*, 65, 437-444.

Eshky A. A., Taylor A. C., Atkinson R. J. A., 1996. The effects of temperature on aspects of respiratory physiology of the semi-terrestrial crabs *Uca inversa* (Hoffman) and *Metopograpsus messor* (Forsk.) from the red sea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114A, 297-304.

Fairchild E. A., Howell W. H., 2000. Predator-prey size relationship between *Pseudopleuronectes americanus* and *Carcinus maenas*. *Journal of Sea Research*, 44, 81-90.

Fanjul-Moles M. L., 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142C, 390-400.

Fernando D., Elizabeth S., Denisse R., Leticia R., 2002. behavioural thermoregulation and critical thermal limits of *Macrobrachium acanthurus* (Weigman). *Journal of Thermal Biology*, 27, 423-428.

Fingerman, M., 1987. The endocrine mechanism of crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 7, 1-24.

Fockedey N., Mees J., Vangheluwe M., Versljkce T., Janssen C. R., Vincx M., 2005. Temperature and salinity effects on post-marsupial growth of *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 326, 27-47.

Fraser P. J., 1990. Effects of temperature on statocyst afferents of the crab *Carcinus maenas*. *Journal of Thermal Biology*, 15, 25-31.

Frederich M., Portner H. O., 2000. Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in the spider crab, *Maja squinado*. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279, 1531-1538.

Frederich M., Sartoris F. J., Portner H. O., 2000a. Haemolymph Mg^{2+} regulation in decapod crustaceans: physiological correlates and ecological consequences in polar areas. *Journal of Experimental Biology*, 203, 1383-1393.

Frederich M., DeWachter B., Sartoris F. J., Portner H. O., 2000b. Cold tolerance and the regulation of cardiac performance and haemolymph distribution in *Maja squinado* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Physiological and Biochemical Zoology*, 73, 406-415.

Genovese G., Ortiz N., Urcola M. R., Luquet C. M., 2005. Possible role of carbonic anhydrase, V-H⁺-ATPase and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in electrogenic ion transport across the gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142A, 362–369.

Genovese G., Senek M., Ortiz N., Regueira M., Towle D. W., Tresguerres M., Luquet C. M., 2006. Dopaminergic regulation of ion transport in gills of euryhaline semiterrestrial crab *Chasmagnathus granulatus*: interaction between D1- and D2-like receptors. *Journal of Experimental Biology*, 209, 2785-2793.

Gillikin D. P., De Wachter B., Tack J. F., 2004. Physiological responses of two ecologically important Kenyan mangrove crabs exposed to altered salinity regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 301, 93-109.

Giomi F., Beltramini M., 2007. The molecular heterogeneity of hemocyanin: its role in the adaptive plasticity of Crustacea. *Gene*, 398, 192-201.

Giulianini P. G., Bierti M., Lorenzon S., Battistella S., Ferrero E. A., 2006. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron* 38, 49-57.

Govind, C. K., 1992. Nervous system. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (F. W. Haarison & A. G. Humers eds), 10, 395 – 438. Wiley Liss Inc. New York.

Hagerman L., Sondergaard T., Weile K., Hosie D., Uglow R. F., 1990. Aspects of blood physiology and ammonia excretion in *Nephrops norvegicus* under hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 67A, 311-320.

Harris R. R., Carmo M., Santos F., 1993. Ionoregulatory and urinary responses to emersion in the mangrove crab *Ucides cordatus* and the intertidal crab *Carcinus maenas*. *Journal of Comparative Physiology*, 163B, 18-27.

Henry R. P., 2001. Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans. *Journal of Experimental Biology*, 204, 991-1002.

Henry R. P., 2005. Critical salinity, sensitivity, and commitment of salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of two euryhaline species of decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology*, 303, 45-56.

Henry R. P., Borst D. W., 2006. Effects of eyestalk ablation on carbonic anhydrase activity in the euryhaline blue crab *Callinectes sapidus*: neuroendocrine control of enzyme expression. *Journal of Experimental Zoology*, 305A, 23-31.

Henry R. P., Gehrich S., Weihrauch D., Towle D. W., 2003. Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136A, 243-258.

Hodgson E., Spicer J. I., 2001. Subunit composition of crustacean haemocyanins are species-specific: evidence from non-decapod species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128A, 873-888.

Hongyu L., Luqing P., Fu L., 2006. Effect of salinity on hemolymph osmotic pressure, sodium concentration and Na⁺-K⁺-ATPase activity of gill of Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Journal of Ocean University of China*, 7, 77-82.

Hsieh S. L., Chen S. M., Yang Y. H., Kuo C. M., 2006. Involvement of norepinephrine in the hyperglycemic response of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, under cold shock. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143A, 254-263.

Huntingford F. A., Taylor A. C., Smith I. P., Thorpe K. E., 1995. Behavioural and physiological studies of aggression swimming crabs. *Journal of Experimental Biology*, 202, 3497-3506.

Korhonen I. A., Lagerspetz K. Y. H., 1995. Heat shock response and thermal acclimation in *Asellus aquaticus*. *Journal of Thermal biology*, 21, 49-56.

Kuo C. M., Yang Y.H., 1999. Hyperglycemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Comparative Physiology*, 169B, 49-54.

Janas U., Spicer J. I., 2008. Does the effect of low temperature on osmoregulation by the prawn *Palaemon elegans* Rathke, 1837 explain winter migration offshore? *Marine Biology*, 153, 937-943.

Juri S. H., Winsor H. Watson III, 2000. Thermosensitivity of the lobster, *Homarus americanus*, as a determined by cardiac assay. *Biology Bulletin*, 199, 257-264.

Iribarne O., Bruschetti M., Escapa M., Bava J., Botto F., Gutierrez J., Palomo G., Delhey K., Petracci P., Gagliardini A., 2005. Small- and large- scale effect of the SW Atlantic Burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* on habitat use by migratory shorebirds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 315, 87-101.

Ismael D., Moreira G. S., 1997. Effect of temperature and salinity on respiratory rate and development of early larval stages of *Macrobrachium acathurus* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A, 871–876.

Lacerda T. P., Sawaya P., 1986. Effects of hypo – osmotic conditions on haemolymph glucose concentration in *Callinectes danae* Smith 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85A, 509–512.

Lamy J. Truchot J. P., Gilles R., 1985. Respiratory pigments in animals: relation, structure and function. Springer-Verlag, Berlin.

Lee W. C., Chen J. C., 2003. Hemolymph ammonia, urea and uric acid levels and nitrogenous excretion of *Marsupenaeus japonicus* at different salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 288, 39-43.

Lemos D., Phan V. N., Alvarez G., 2001. Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* Pérez – Farfante (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities. *Journal of Marine Biology and Ecology*, 261, 55–74.

Lewis S., Handy R. D., Cordi B., Billingham Z., Depledge M. H., 1999. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 8, 351-368.

Lignot J. H., Cochard J. C., Soyeux C., Lemaire P., Charmantier G., 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 170, 72 – 92.

Lignot J. H., Spanings–Pierrot C., Charmantier G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*, 191, 209–245.

Lin S. C., Liou C. H., Cheng J. H., 2000. The role of antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 127A, 121–129.

Ling Mo J., Greenaway P., 2001. cAMP and sodium transport in the freshwater crayfish *Cherax destructor*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129A, 843–849.

Ling Mo J., Devos P., Trausch G., 2003. Active absorption of Cl⁻ and Na⁺ in posterior gills of Chinese crab *Eriocheir sinensis*: modulation by dopamine and cAMP. *Journal of Crustacea Biology*, 23, 505–512.

Lorenzon, S., Giulianini P. G., Ferrero, E. A., 1997. Lipopolysaccharide – induced hyperglycemia is mediated by CHH release in crustaceans. *General and Comparative Endocrinology*, 108, 395–405.

Lorenzon S., Pasqual P., Ferrero E. A., 2002. Different bacterial lipopolysaccharides as toxicants and stressors in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish and Shellfish Immunology*, 13, 27-45.

Lorenzon S., Brezovec S., Ferrero E. A., 2004a. Species-specific effects on hemolymph glucose control by serotonin, dopamine, and L-enkephalin and their inhibitors in *Squilla mantis* and *Astacus leptodactylus* (Crustacea). *Journal of Experimental Zoology*, 301, 727-736.

Lorenzon S., Edomi P., Giulianini P. G., Metullio R., Ferrero E. A., 2004b. Variation of crustacean Hyperglycemic Hormone (cHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. *Journal of Experimental Biology*, 207, 4205-4213.

Lorenzon S., Edomi P., Giulianini P. G., Metullio R., Ferrero E. A., 2005. Role of biogenic amines and cHH in the crustaceans hyperglycemic stress response. *Journal of Experimental Biology*, 208, 3341-3347.

Lorenzon S., Giulianini P. G., Martinis M., Ferrero E. A., 2007. Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in the American lobster *Homarus americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147, 94-102.

Lorenzon S., Giulianini P. G., Libralato S., Martinis M., Ferrero E. A., 2008. Stress effect of two different transport systems on the physiological profiles of the crab *Cancer pagurus*. *Aquaculture*, 278, 156-153.

Lorenzon S., Martinis M., Ferrero E. A., Accepted. Measure of hemolymph total protein concentration in seven different crustacean species by a density-salinity refractometer. *Aquaculture*.

Lucu C., Devescovi M., 1999. Osmoregulation and branchial Na^+ , K^+ -ATPase in the lobster *Homarus gammarus* acclimated to dilute seawater. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 234, 291-304.

Lucu C., Towle D. W., 2003. Na⁺+K⁺ -ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135A, 195–214.

Mangum C. P., Greaves J., 1996. Hemocyanins of the genus *Uca*: structural polymorphisms and native oligomers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 199, 1-15.

Mangum C. P., Subunit composition of the hemocyanins of *Callinectes sapidus*: phenotypes from naturally hypoxic waters, and isolated oligomers. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108B, 537-541.

Mangum C. P., McKenney A. L., 1996. Subunit composition of the crustacean hemocyanins: divergence during speciation. *Biological Bulletin*, 191, 33-41.

Mangum C. P., Joy P. J., 1997. Hemocyanin subunit composition in the American lobster *Homarus americanus*. *Journal of Crustacean Biology*, 17, 1-5.

Manush S. M., Pal A. K., Chatterjee N., Das T., Mukerjee S. C., 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of *Macrobrachium rosenbergii* acclimated to three temperatures. *Journal of thermal Biology*, 29, 15-19.

Marbà N., Duarte C. M., 1997. Interannual changes in seagrass (*Posidonia oceanica*) growth and environmental change in the Spanish Mediterranean littoral zone. *Limnology and Oceanography*, 42 (5), 800–810.

Martin D. J., Rainbow P. S., 1998. Haemocyanin and the binding of cadmium and zinc in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *The Science of Total Environment*, 214,133-152.

Martin J. L. M., Van Wormhoudt A., Ceccaldi H. J., 1977. Zinc-haemocyanin binding in the hemolymph of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 58A, 193-195.

Martinis M., 2003. Tesi di Laurea: risposte fisiologiche a variazioni di salinità in tre specie di Crostacei Decapodi.

Masui D. C., Furriel R. P. M., McNamara J. C., Mantelatto F. L. M., Leone F. A., 2002. Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na⁺,K⁺)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132C, 471–482.

Mauro N. A., Mangum C. P., 1982. The role of the blood in the temperature dependence of oxidative metabolism in decapod crustaceans. Intraspecific responses to seasonal differences in temperature. *Journal of Experimental Zoology*, 219, 179-188.

McGaw I. J., Reiber C. L., Guadagnoli J. A., 1999. Behavioral physiology of four crab species in low salinity. *Biological Bulletin*, 196, 163-176.

McMahon B. R., 2001. Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans. *Respiration Physiology*, 128, 349-364.

McNamara J. C., Ribeiro M. R., 2000. The calcium dependence of pigment translocation in freshwater shrimp red ovarian chromatophores. *Biological Bulletin*, 198, 357-366.

Menezes S., Soares A. M. V. M., Guilhermino L., Peck M. R., 2006. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335, 114-122.

Mercaldo-Allen R., Thuberg F., 1987. Heart and gill ventilatory activity in the lobster, *Homarus americanus*, at various temperatures. *Fishery Bulletin*, 85, 643-644.

Moreira F., 1997. The importance of shorebirds to energy fluxes in a food web of a south European estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 44, 67-78.

Morris S., Brdige C. R., 1985. An investigation of haemocyanin oxygen affinity in the semi-terrestrial crab *Ocypode saratan* Forsk. *Journal of Experimental Biology*, 117, 119-132.

Morris S., Taylor A. C., 1985. Oxygen consumption by *Palaemon elegans* (Rathke) in response to temperature change: a determinant of distribution. *Journal of Experimental Biology*, 44, 255-268.

Morris S., Oliver S., 1999. Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii*: simulation studies of commercial shipping methods. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112A, 299-308.

Morris S., 2002. The ecophysiology of air-breathing in crabs with special reference to *Gecaroidea natalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131B, 559-570.

Nakamura M., Tani M., Kuramoto T., 1994. Effects of rapid cooling on heart-rate of the Japanese lobster in-vivo. *Zoological Science*, 11, 375-379.

Nery L. E. M., de Lauro Castrucci A. M., 1997. Pigment cell signalling for physiological color change. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A, 1135-1144.

Ocampo L., Patino D., Ramirez C., 2003. Effect of temperature on hemolymph lactate and glucose concentrations in spiny lobster *Panulirus interruptus* during progressive hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296, 71-77.

Oliveira G. T., da Silva R. S. M., 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high – protein or carbohydrate – rich diets. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 127B, 375-381.

Onken H., 1999. Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of chinese crabs (*Eriocheir sinensis*) adapted to different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 123A, 377–384.

Onken H., Riestenpatt S., 1998. Active NaCl absorption across split lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119A, 883–893.

Palomo G., Botto F., Navarro D., Escara M., Iridarne O., 2003. Does the presence of the Sw Atlantic borrowing crab *Chasmagnathus granulatus* Dana affect predator – prey interactions between shorebirds and polychaetes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 290, 211-228.

Pascual C., Sanchez A., Sanchez A., Vargas-Albores F., LeMoullac G., Rosas C., 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males : the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 218, 637-650.

Paterson B. D., Spanoghe P. T., 1997. Stress indicators in marine decapod crustaceans, with particular reference to the grading of western rock lobsters (*Panulirus Cygnus*) during commercial handling. *Marine Freshwater Research*, 48, 829-834.

Paterson B. D., Thorne M. J., 1995. Measurement of oxygen uptake, heart and gill bailer rates of the callinassid burrowing shrimp *Trypaea australiensis* Dana and its responses to low oxygen tensions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 194, 39-52.

Paula J., Nogueira Mendes R., Paci S., McLaughlin P., 2001. Combined effects of temperature and salinity on the larval development of the estuarine mud prawn *Upogebia africana* (Crustacea, Thalassinidea). *Hydrobiologia*, 449, 141-148.

Pavicic – Hamer D., Devescovi M., Lucu C., 2003. Activation of carbonic anhydrase in branchial cavity tissues of lobster (*Homarus gammarus*) by dilute seawater exposure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 287, 79–92.

Pedersen S. N., Lundebye A. K., 1996. Metallothionein and stress proteins levels in shore crab (*Carciuns maenas*) along a trace metal gradient in the Fal Estuary (UK). *Journal of Marine Environmental Research*, 42, 241-246.

Péqueux A., 1995. Osmotic regulation in crustacea. *Journal of Crustacean Biology*, 15, no. 1, 1–60.

Perez-Velazquez M., Bray W. M., Lawrence A. L., Gatlin D. M., Gonzalez-Felix M. L., 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 198, 209-218.

Piller S. C., Henry R. P., Doeller J. E., Kraus D. W., 1995. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. *Journal of Experimental Biology*, 198, 349-358.

Pritchard A. W., Eddy S., 1979. Lactate formation in *Callinassa californiensis* e *Upogebia pugettensis* (Crustacea: Thalassinidea). *Marine Biology*, 50, 249-253.

Qadri S. A., Camacho J., Wang H., Taylor J. R., Grosell M., Worden M. K., 2007. Temperature and acid-base balance in the American lobster *Homarus americanus*. *Journal of Experimental Biology*, 210, 1245-1254.

Radziejewska T., Chabior M., 2004. Climatic and hydrological controls over the zoobenthos in a southern Baltic coastal lagoon. *Hydrobiologia*, 514, 171-181.

Rainbow P. S., Black W. H., 2001. Effects of changes in salinity on the apparent water permeability of three crabs species: *Carcinus maenas*, *Eriocheir sinensis* and *Necora puber*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 264, 1–13.

Rainbow P. S., Wong V. W. T., 1986. Two metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83A, 149-156.

Rasmussen A. D., Bjerregaard P., 1995. The effect of salinity and calcium concentration on the apparent water permeability of *Cherax destructor*, *Astacus Astacus* and *Carcinus maenas* (Decapoda, Crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111A, 171–175.

Ravaux J., Toullec J. Y., Léger N., Lopez P., Gaill F., Shillito B., 2007. First hsp70 from two hydrothermal vent shrimps, *Mirocaris fortunata* and *Rimicaris exoculata*: Characterization and sequence analysis. *Gene*, 386, 162-172.

Raviv S., Parnes S., Segall C., David C., Sagi A., 2006. Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. *General and Comparative Endocrinology*, 145, 39–50.

Re A. D., Diaz F., Sierra E., Rodriguez J., Perez E., 2005. Effect of salinity and temperature on thermal tolerance of brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus* (Ives) (Crustacea, Penaeidae). *Journal of thermal Biology*, 30, 618-622.

Regnault M., 1992. Effect of air exposure on nitrogen – metabolism in the crab *Cancer pagurus*. *Journal of Experimental Zoology*, 264, 372-380.

Regnault M., 1996. Air exposure – induces increase in acetylglucosamine content of some soft tissues and haemolymph of a crab (*Cancer pagurus*). *Journal of Experimental Zoology*, 275, 421-430.

Ridgway I. D., Taylor A. C., Atkinson R. J. A., Stentiford G. D., Chang E. S., Chang S. A., Neil D. M., 2006. Morbidity and mortality in Norway lobsters, *Nephrops norvegicus*: physiological, immunological and pathological effects of aerial exposure. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology*, 328, 251-264.

Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Le Priol Y., Pascual C., Rossignol J., Contreras F., Sanchez A., Van Wormhoudt A., 2001. Metabolism and growth of juveniles

Litopenaeus vannamei: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259, 1–22.

Roast S. D., Rainbow P. S., Smith B. D., Nimmo M., Jones M. B., 2002. Trace metal uptake by Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: the role of osmoregulation. *Marine Environmental Research*, 53, 453–464.

Robertson J. D., 1961. Osmotic and ionic regulation. In: *The physiology of the crustacea*, vol. 1, cap. 9, 317–339, Academic Press New York.

Rome M. S., Young-Williams A. C., Davis G. R., Hines A. H., 2005. Linking temperature and salinity tolerance to winter mortality of Chesapeake Bay blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 319, 129–145.

Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Le Priol Y., Pascual C., Rossignol J., Contreras F., Sanchez A., Van Wormhoudt, 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259, 1–22.

Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Le Priol Y., Pascual C., Taboada G., Arena L., Van Wormhoudt A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental and Marine Biology and Ecology*, 268, 47–67.

Rosas C., Ocampo L., Gaxiola G., Sanchez A., Soto L. A., 1999. Effect of salinity on survival, growth, and oxygen consumption of postlarvae (PL 10 – PL 21) of *Litopenaeus setiferus*. *Journal of Crustacean Biology*, 19, 244–251.

Rowe C. L., 2002. Differences in maintenance energy expenditure by two estuarine shrimp (*Palaemonetes pugio* e *P. vulgaris*) that may permit partitioning of habitats by salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132A, 341–351.

Sanchez A. J., 1997. Habitat preference of *Penaeus duorarum* Burkenorad (Crustacea: Decapoda) in a tropical coastal lagoon, southwest gulf of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 217, 107-117.

Sanchez A., Pascual C., Sanchez A., Vargas-Albores F., LeMoullac G., Rosas C., 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males : the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198, 13-28.

Sanchez A., Van Wormhoudt A., 2001. Metabolism and growth of juveniles *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259, 1–22.

Santos F. H., McNamara J., 1996. Neuroendocrine modulation of osmoregulatory parameters in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 206, 109-120.

Santos E. A., Keller R., 1993. Regulation of circulating levels of the crustaceans hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system. *Journal of Comparative Physiology*, 163, 374–379.

Sartoris F. J., Portener H. O., 1997. Increased concentration of haemolymph Mg^{2+} protect intracellular pH and ATP levels during temperature stress and anoxia in the common shrimp *Crangon crangon*. *Journal of Experimental Biology*, 200, 785-792.

Schmitt A. S. C., Uglow R. F., 1997. Haemolymph constituent levels and ammonia efflux rates of *Nephrops norvegicus* during emersion. *Marine Biology*, 127, 403–410.

Scholnick D. A., Barbas A. E., Cowan S. S., 2006. The influence of chloride on glucose export in marine crabs: sensitivity of glucose-6-phosphatase to chloride ion. *Journal of Crustacean Biology*, 26, 510-514.

Selavakumar S., Geraldine P., 2003. Thermal modulation of pyruvate metabolism in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: the role of lactate dehydrogenase. *Fish Physiology and Biochemistry*, 29, 149-157.

Serrano L., Blanvillain G., Soyez D., Charmantier G., Grousset E., Aujoulat F., Spanings – Pierrot C., 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Experimental Biology*, 206, 979–988.

Serrano L., Halanych K. M., Henry R. P., 2007. Salinity-stimulated changes in expression and activity of two carbonic anhydrase isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Biology*, 210, 2320-2332.

Skaggs H. S., Henry R., P., 2002. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133C, 605–612.

Smith V. J., Söderhäll K., 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental & Comparative Immunology* 15, 251-261.

Sneddon L. U., Taylor A. C., Huntingford F. A., Watson D.G. 1999. Agonistic behaviour and biogenic amines in shore crabs *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Biology*, 203, 537-545.

Söderhäll K., Smith V. J., 1986. Prophenoloxidase - activating cascade as a recognition and defense system in arthropods. In: *Haemocytic and Humoral Immunity in Arthropods* A.P. Gupta, ed., 251-285.

Spaargaren D. H., Haefner P. A., 1987. The effect of environmental osmotic conditions on blood and tissue glucose levels in the brown shrimp, *Crangon crangon* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87A, 1045–1050.

Spanings – Pierrot C., Soyez D., Van Herp F., Gompel M., Skaret G., Grousset E., Charmantier G., 2000. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the

control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 119, 340–350.

Speed S. R., Baldwin J., Wong R. J., Wells R. M. G., 2001. Metabolic characteristics of muscles in the spiny lobster, *Jasus edwardsii*, and response to emersion during simulated live transport. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128A, 435-444.

Spicer I. J., Hill A. D., Taylor A. C., Strang R. H., 1990. Effects of aerial exposure on concentration of selected metabolites in the blood of the Norwegian lobster *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Nephropidae). *Journal of Marine Biology*, 105,129-135.

Spicer I. J., Baden S. P., 2000. Natural variation in the concentrations of haemocyanin from three decapod crustaceans, *Nephrops norvegicus*, *Liocarcinus depurator* and *Hyas aranaeus*. *Marine Biology*, 136, 55-61.

Spinozzi F., Gatto S., De Filippis V., Carsughi F., Di Muro P., Beltramini M., 2005. Contribution of the copper ions in the dinuclear active site to the stability of *Carcinus aestuarii* hemocyanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 439, 42-52.

Sung H. H., Chang H. J., Her C. H., Chang J. C., Song Y. L., 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71, 26-33.

Susanto G. N., Charmantier G., 2001. Crayfish freshwater adaptation starts in eggs: ontogeny of osmoregulation in embryos of *Astacus leptodactylus*. *Journal of Experimental Zoology*, 289, 433–440.

Tan C. H., Choong K. Y., 1981. Effect of hyperosmotic stress on hemolymph proteins, muscle ninhydrine – positive substances and free amino acids in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 70 A, 485–489.

Taylor A. C., Astall C. M., Atkinson R. J. A., 2000. A comparative study of the oxygen transporting properties of the haemocyanin of five species of thalassinidean mud-shrimps. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 244, 265-283.

Taylor A. C., Spicer J. I., 1987. Metabolic response of the prawn *Palaemon elegans* and *P. serratus* (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. *Marine Biology*, 95, 521-530.

Taylor D. L., Eggleston D. B., 2000. Effects of hypoxia on an estuarine predator – prey interaction: foraging behaviour and mutual interference in the blue crab *Callinectes sapidus* and the infaunal clam *Mya arenaria*. *Marine Ecology*, 196, 221-237.

Taylor E. W., Wheatley M. G., 1980. Ventilation heart rate and respiratory gas exchange in the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) submerged in normoxic water and after 3 h exposure in air at 15° C. *Journal of Comparative Physiology*, 138, 67-68.

Taylor H. H., Seneviratna D., 2005. Ontogeny of salinity tolerance and hyperosmoregulation by embryos of the intertidal crabs *Hemigrapsus edwardsii* and *Hemigrapsus crenulatus* (Decapoda, grapsidae): survival of acute hyposaline exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140A, 495-505.

Torres G., Giménez L., Anger K., 2002. Effects of reduced salinity on the biochemical composition (lipid, protein) of zoea 1 decapod crustacean larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 277, 43-60.

Towle D. W., Paulsen R. S., Weihrauch D., Kordylewski M., Salvador C., Ligno J. H., Spanings-Pierrot C., 2001. Na⁺/K⁺-ATPase in gills of the blue crabs *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity related expression of α -subunit mRNA and protein. *Journal of Experimental Biology*, 204, 4005-4012.

Truchot J. P., 1980. Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. *Journal of Experimental Zoology*, 214, 205-208.

Tsai J., Lin R., 2007. V-type H⁺-ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimatation. *Journal of Experimental Biology*, 210, 620-627.

Tsukimura B., 2001. Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *American Zoology*, 41, 465-476.

Verslycke T., Janssen C. R., (2002). Effects of a changing abiotic environment on the energy metabolism in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279, 61–72.

Vincent A. G., Breland V. M., Lota J. M., 2004. Experimental infection of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with Necrotizing Heptopancreatitis (NHP) bacterium by per os exposure. *Diseases of aquatic organisms*, 61, 227-233.

Viscido S. V., Wetthey D. S., 2002. Quantitative analysis of fiddler crab flock movement: evidence for “selfish herd” behaviour. *Animal Behaviour*, 63, 735-741.

Watt A. J. S., Whiteley N. M., Taylor E. W., 1999. An in situ study of respiratory variables in three British sublittoral crabs with different routine rates of activity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 239, 1-21.

Webster S. G., 1996. Measurement of crustacean Hyperglycemic Hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *Journal of Experimental Biology*, 199, 1579-1585.

Weihrauch D., Morris S., Towle D. W., 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *Journal of Experimental Biology*, 207, 4491-4504.

Weihrauch D., Ziegler A., Siebers D., Towle D. W., 2002. Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of Na⁺,K⁺-ATPase, V-type H⁺-ATPase and functional microtunules. *Journal of Experimental Biology*, 205, 2765-2775.

Whiteley N. M., Taylor E. W., El Haj A. J., 1997. Seasonal and latitudinal adaptation to temperature in crustaceans. *Journal of Thermal Biology*, 22, 419-427.

Worden M. K., Clark C. M., Conaway M., Qadri S. A., 2005. Temperature dependence of cardiac performance in the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Experimental Biology*, 209, 1024-1034.

Young J. S., Peck L. S., Matheson T., 2006. The effects of temperature on peripheral neuronal function in eurythermal and stenothermal crustaceans. *Journal of Experimental Biology*, 209, 1976-1987.

Zanotto F. P., Wheatly M. G., 2002. Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects of physiological regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133, 645-660.

Zanotto F. P., Wheatly M. G., 2006. Ion Regulation in Invertebrates: Molecular and Integrative Aspects. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79, 357-362.

Zatta P., 1987. Dopamine, noradrenaline and serotonin during hypo – osmotic stress of *Carcinus maenas*. *Marine Biology*, 96, 479-481.

Zebe E., 1982. Anaerobic metabolism in *Upogebia pugettensis* and *Callinassa californiensis* (Crustacea, Thalassinidea). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 72B, 613-617.

Zeis B., Nies A., Bridges C. R., Grieshaber M. K. 1992. Allosteric modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-lactate and urea in the lobster *Homarus vulgaris*. *Journal of Experimental Biology*, 168, 93-110.

Zou E., Du N., Lai W., 1996. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114A, 105-109.

Zou H., Juan C., Chen S., Wang H., Lee C., 2003. Dopaminergic regulation of crustaceans Hyperglycemic Hormone and glucose levels in the hemolymph of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of Experimental Zoology*, 298, 44-52.

6. APPENDICE

Carcinus aestuarii

36 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
Media	5,10	6,70	5,60	5,30	5,80
Es	0,50	1,12	0,64	0,52	0,42

6 PSU	0h	3h	8h	24h
Media	3,80	6,10	6,20	6,00
Es	0,59	0,98	0,76	1,15

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
Media	4,20	5,50	5,10	4,30	4,33
Es	0,77	0,86	0,59	0,47	0,47

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
Media	4,20	4,60	4,00	4,10	4,00
es	0,51	1,09	0,93	0,41	0,49

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,10	3,70	3,00	2,56	2,00
es	0,41	0,33	0,33	0,24	0,00

Tav. 1A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

36 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,10	2,90	2,51	2,85	2,65
es	0,27	0,32	0,37	0,38	0,44

6 PSU	0h	3h	8h	24h
media	3,16	3,47	3,52	3,57
es	0,26	0,36	0,39	0,32

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,34	3,59	3,16	3,26	2,81
es	0,25	0,35	0,26	0,24	0,25

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,45	3,54	3,52	3,86	3,54
es	0,36	0,22	0,39	0,39	0,36

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,28	3,79	4,28	3,77	3,44
es	0,23	0,43	0,42	0,51	0,73

Tav. 1B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

36 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	1045,90	1043,20	1040,56	1039,50	1037,00
es	4,06	3,34	2,08	2,95	2,16

6 PSU	0h	3h	8h	24h
media	1048,60	1041,60	1037,40	1030,29
es	4,21	4,14	4,02	3,04

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	1052,40	1043,80	1040,20	1036,20	1035,33
es	4,77	4,21	4,61	3,63	3,80

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	1046,00	1042,20	1041,20	1039,80	1038,00
es	3,98	4,03	4,41	5,65	4,06

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	1048,60	1047,40	1048,00	1048,89	1045,60
es	2,21	1,93	2,29	2,36	3,31

Tav. 1C: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L^{-1}) durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

36 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,68	2,44	2,06	2,19	1,73
es	0,46	0,42	0,21	0,31	0,24

6 PSU	0h	3h	8h	24h
media	3,30	2,78	2,92	2,27
es	0,51	0,45	0,48	0,32

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,22	2,79	2,68	2,33	2,09
es	0,52	0,42	0,55	0,48	0,46

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,52	1,92	1,71	1,51	1,94
es	0,51	0,43	0,54	0,44	0,39

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,40	2,12	1,80	2,04	1,67
es	0,30	0,29	0,19	0,26	0,33

Tav. 1D: medie ed errori standard della concentrazione di proteine totali nell'emolinfa (g dL^{-1}) durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

36 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,83	7,80	7,72	7,77	7,76
Es	0,06	0,03	0,07	0,05	0,02

6 PSU	0h	3h	8h	24h
media	7,68	7,90	8,18	8,29
es	0,05	0,08	0,06	0,04

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,82	7,91	8,06	8,08	7,99
es	0,04	0,04	0,03	0,02	0,02

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,84	7,89	7,88	7,95	7,88
es	0,02	0,03	0,03	0,03	0,07

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,90	7,89	7,89	7,85	7,87
es	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02

Tav. 1E: medie ed errori standard dei valori di pH durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

36 PSU	0h	3h	24h
media	0,19	0,25	0,12
es	0,04	0,08	0,01

6 PSU	0h	3h	24h
media	0,17	0,34	0,21
es	0,02	0,05	0,01

16 PSU	0h	3h	24h
media	0,21	0,31	0,30
es	0,02	0,05	0,08

26 PSU	0h	3h	24h
media	0,16	0,28	0,25
es	0,01	0,05	0,04

46 PSU	0h	3h	24h
media	0,19	0,16	0,18
es	0,02	0,02	0,02

Tav. 1F: medie ed errori standard della concentrazione di ammoniaca (mmoL L⁻¹) nell'emolinfia durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

36 PSU	0h	3h	24h
media	8,21	8,01	8,40
es	0,36	0,29	0,26

6 PSU	0h	3h	24h
media	9,29	7,51	4,20
es	0,30	0,29	0,31

16 PSU	0h	3h	24h
media	9,31	8,27	7,41
es	0,28	0,26	0,37

26 PSU	0h	3h	24h
media	8,92	8,31	7,88
es	0,20	0,23	0,12

46 PSU	0h	3h	24h
media	8,82	9,59	10,16
es	0,22	0,22	0,22

Tav. 1G: medie ed errori standard della concentrazione dei cloruri (mmol L⁻¹) nell'emolinfa durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

36 PSU	0h	3h	24h
media	13,11	12,35	14,51
es	0,66	0,61	0,55

6 PSU	0h	3h	24h
media	13,04	12,56	4,51
es	0,40	0,55	0,13

16 PSU	0h	3h	24h
media	13,03	12,77	9,64
es	0,95	0,69	0,54

26 PSU	0h	3h	24h
media	14,07	13,07	11,49
es	0,49	0,38	0,74

46 PSU	0h	3h	24h
media	13,79	14,80	16,04
es	0,31	0,28	0,42

Tav. 1H: medie ed errori standard della concentrazione del calcio (mmol L⁻¹) nell'emolinfa durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

6 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,10	4,40	4,70	4,30	5,00	4,75
es	0,69	0,64	0,42	0,42	0,76	1,03

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,10	8,60	5,50	5,80	7,78	5,20
es	0,62	0,79	0,22	0,53	0,55	1,02

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	5,40	6,70	5,30	5,30	6,10	4,33
es	0,58	0,78	0,68	0,50	0,64	0,76

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,80	4,20	5,10	6,14	6,86	3,83
es	1,10	1,06	0,75	1,16	1,44	0,91

Tav. 2A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	21,28	21,17	20,05	16,48	17,46	18,33
es	0,37	0,38	0,90	1,09	0,94	1,13

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1,86	2,46	2,42	2,37	2,58	2,42
es	0,11	0,09	0,18	0,22	0,19	0,09

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	2,21	2,05	3,27	3,37	3,11	2,47
es	0,21	0,21	0,82	0,56	0,45	0,15

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	3,39	3,87	6,70	3,39	3,46	3,33
es	0,50	1,14	4,23	0,80	1,01	0,62

Tav. 2B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1020,80	1039,70	1039,10	1035,10	1033,29	1028,75
es	1,37	3,08	3,22	3,08	3,44	4,68

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1044,10	1040,60	1040,40	1040,00	1040,44	1035,20
es	4,16	3,46	3,74	3,66	3,60	1,96

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1054,40	1051,10	1048,50	1051,70	1047,20	1047,33
es	4,62	3,53	2,88	3,62	3,62	4,07

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1062,50	1059,00	1057,50	1057,43	1057,29	1055,67
es	4,23	3,86	3,19	2,98	1,69	3,07

Tav. 2C: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	2,59	3,38	2,92	3,23	2,28	1,90
es	0,28	0,35	0,29	0,38	0,46	0,61

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	3,66	3,58	3,10	3,65	4,09	3,00
es	0,49	0,50	0,45	0,46	0,58	0,28

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,69	4,07	3,52	3,76	3,04	4,31
es	0,44	0,40	0,42	0,37	0,33	0,57

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,36	4,41	4,05	4,24	3,98	4,76
es	0,53	0,39	0,38	0,28	0,29	0,47

Tav. 2D: medie ed errori standard delle proteine totali nell'emolinfa (g dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	8,04	7,96	7,93	7,95	7,89	7,92
es	0,02	0,02	0,05	0,03	0,04	0,10

16 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,73	7,76	7,80	7,92	8,02	7,72
es	0,02	0,03	0,04	0,04	0,03	0,02

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,75	7,75	7,78	7,89	7,75	7,83
es	0,01	0,05	0,01	0,01	0,02	0,04

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,60	7,74	7,76	7,79	7,93	7,84
es	0,02	0,01	0,03	0,02	0,04	0,02

Tav. 2E: medie ed errori standard del pH dell'emolinfa durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h	3h	24h	14d
media	0,24	0,31	0,15	0,26
es	0,02	0,03	0,01	0,04

16 PSU	0h	3h	24h	14d
media	0,22	0,20	0,20	0,36
es	0,03	0,02	0,04	0,06

26 PSU	0h	3h	24h	14d
media	0,19	0,29	0,14	0,16
es	0,04	0,02	0,02	0,02

46 PSU	0h	3h	24h	14d
media	0,31	0,32	0,24	0,28
es	0,08	0,06	0,04	0,09

Tav. 2F: medie ed errori standard della concentrazione di ammoniaca (mmoL L⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h	3h	24h	14d
media	8,28	6,01	5,42	7,56
es	0,34	0,20	0,38	0,25

16 PSU	0h	3h	24h	14d
media	7,46	7,26	7,10	8,01
es	0,10	0,09	0,08	0,32

26 PSU	0h	3h	24h	14d
media	7,92	8,13	7,95	7,99
es	0,12	0,18	0,09	0,05

46 PSU	0h	3h	24h	14d
media	10,52	9,87	10,41	12,19
es	0,35	0,28	0,26	0,47

Tav. 2G: medie ed errori standard della concentrazione dei cloruri (mmol L⁻¹) nell'emolinfa durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h	3h	24h	14d
media	8,23	5,25	7,69	6,88
es	0,21	0,26	0,50	0,38

16 PSU	0h	3h	24h	14d
media	9,57	7,43	7,72	8,91
es	0,42	0,29	0,33	0,65

26 PSU	0h	3h	24h	14d
media	11,05	11,14	10,92	9,38
es	0,39	0,57	0,54	0,35

46 PSU	0h	3h	24h	14d
media	13,42	13,41	14,39	15,09
es	0,30	0,29	0,60	0,73

Tav. 2H: medie ed errori standard della concentrazione del calcio (mmol L⁻¹) nell'emolinfa durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

18° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,90	4,30	4,40	3,60	3,60
es	0,55	0,62	0,50	0,43	0,34

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	4,30	9,50	9,30	6,80	6,90
es	0,33	0,96	1,09	1,19	1,04

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,70	3,80	2,80	2,60	2,90
es	0,50	0,77	0,36	0,64	0,38

24° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,70	4,90	3,40	3,20	2,88
es	0,26	0,55	0,34	0,29	0,23

30° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,90	4,20	4,10	3,86	9,33
es	0,31	0,68	0,74	1,08	6,33

Tav. 3A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature. L'errore standard al tempo 48h nel gruppo Esposto a 30° C è dovuto alla variabilità delle risposte fisiologiche misurate negli individui sopravvissuti (n=3).

18° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	4,71	5,14	4,69	5,39	4,58
es	0,57	0,88	0,58	0,70	0,41

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,88	11,30	6,53	2,50	2,75
es	0,47	3,54	1,87	0,29	0,40

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	4,71	1,63	2,49	4,37	2,26
es	0,29	0,12	0,62	2,04	0,43

24° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,83	4,21	3,90	3,56	3,09
es	0,39	0,75	0,67	0,63	0,28

30° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,25	4,01	3,23	2,76	17,03
es	0,26	0,44	0,35	0,35	11,03

Tav. 3B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature. L'errore standard al tempo 48h nel gruppo Esposto a 30° C è dovuto alla variabilità delle risposte fisiologiche misurate negli individui sopravvissuti (n=3).

18° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	1046,30	1046,40	1045,10	1041,30	1035,80
es	4,62	4,57	4,20	3,63	2,21

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	1063,80	1062,60	1059,20	1054,10	1053,00
es	2,81	2,85	2,89	3,25	3,01

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	1053,20	1047,40	1044,10	1042,90	1043,60
es	5,23	5,29	4,90	5,08	5,40

24° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	1044,20	1043,20	1041,40	1041,60	1044,75
es	3,22	2,98	2,89	2,38	3,14

30° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	1048,50	1047,50	1049,40	1052,00	1057,33
es	5,29	4,73	5,03	5,07	6,12

Tav. 3C: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature.

18° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,74	2,41	2,18	1,69	1,65
es	0,55	0,46	0,37	0,26	0,27

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	5,35	4,88	4,34	3,85	3,89
es	0,33	0,27	0,22	0,22	0,21

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,83	3,11	2,67	3,52	3,97
es	0,48	0,39	0,29	0,44	0,53

24° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,61	2,30	2,41	2,38	2,49
es	0,38	0,33	0,32	0,33	0,39

30° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,03	2,58	2,49	2,74	3,49
es	0,60	0,50	0,56	0,61	0,69

Tav. 3D: medie ed errori standard della concentrazione di proteine totali nell'emolinfa (g dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature.

18° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,71	7,73	7,70	7,73	7,69
es	0,07	0,06	0,04	0,03	0,05

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,63	7,78	7,70	7,64	7,65
es	0,07	0,04	0,02	0,02	0,03

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,68	7,86	7,89	7,88	7,92
es	0,01	0,02	0,05	0,04	0,03

24° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,64	7,87	7,96	8,00	7,99
es	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02

30° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,76	7,82	7,87	7,95	8,08
es	0,03	0,02	0,02	0,02	0,06

Tav. 3E: medie ed errori standard del pH nell'emolinfia durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature.

18° C	0h	3h	24h
media	0,28	0,24	0,14
es	0,09	0,08	0,02

6° C	0h	3h	24h
media	0,17	0,08	0,14
es	0,04	0,02	0,05

12° C	0h	3h	24h
media	0,24	0,14	0,10
es	0,04	0,02	0,02

24° C	0h	3h	24h
media	0,27	0,20	0,26
es	0,10	0,04	0,03

30° C	0h	3h	24h
media	0,17	0,23	0,18
es	0,01	0,04	0,01

Tav. 3F: medie ed errori standard della concentrazione di ammoniaca (mmoL L⁻¹) nell'emolinfia durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	5,40	5,10	6,40	5,40	5,10	3,40
es	0,85	0,64	0,64	0,73	0,74	0,31

12° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	3,70	3,40	3,50	3,00	4,80	3,10
es	0,62	0,52	0,48	0,33	0,73	0,38

24° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,20	5,40	4,80	5,60	7,00	5,00
es	0,59	0,52	0,51	0,56	1,09	1,26

30° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,90	4,80	3,20	3,50	3,00	
es	0,41	0,84	0,55	0,62	0,45	

Tav. 4A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	2,74	3,04	1,91	2,14	2,79	1,63
es	0,43	0,87	0,11	0,27	0,45	0,16

12° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	2,25	2,20	2,82	3,84	2,53	2,16
es	0,25	0,23	0,33	1,85	0,36	0,14

24° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	2,71	2,02	3,77	3,00	3,16	4,05
es	0,50	0,22	1,03	0,46	0,40	1,02

30° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	18,55	18,02	21,29	25,94	22,82	
es	1,88	0,50	0,69	0,68	2,20	

Tav. 4B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

6°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1052,60	1052,20	1050,30	1047,00	1046,70	1046,10
es	5,54	5,04	4,42	3,90	3,85	3,99

12°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1063,90	1057,70	1053,70	1050,60	1054,60	1044,20
es	3,33	2,65	2,25	2,40	2,90	2,30

24°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1048,90	1046,60	1044,90	1044,30	1044,33	1042,50
es	5,00	4,59	4,05	4,05	3,81	3,10

30°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1027,80	1025,40	1027,00	1023,50	1024,67	
es	2,13	2,21	2,31	1,93	1,93	

Tav. 4C: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

6°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	3,85	3,70	3,40	3,19	3,07	2,88
es	0,56	0,54	0,37	0,32	0,37	0,43

12°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	5,59	4,90	5,05	4,59	4,32	3,83
es	0,36	0,30	0,27	0,27	0,35	0,39

24°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,20	3,55	2,68	3,12	4,06	3,89
es	0,50	0,48	0,42	0,45	0,53	0,43

30°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,05	3,92	4,37	4,12	3,68	
es	0,58	0,48	0,72	0,50	0,46	

Tav. 4D: medie ed errori standard della concentrazione di proteine totali nell'emolinfa (g dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

6°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,63	7,72	7,66	7,72	7,69	7,64
es	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,05

12°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,74	7,73	7,74	7,77	7,79	7,69
es	0,02	0,03	0,01	0,03	0,04	0,03

24°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,70	7,71	7,74	7,75	7,89	7,68
es	0,03	0,01	0,03	0,03	0,06	0,04

30°C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,39	7,64	7,76	7,71	7,75	
es	0,05	0,02	0,02	0,05	0,03	

Tav. 4E: medie ed errori standard del pH nell'emolinfia durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

24-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,50	5,70	5,50	9,80	10,44
es	0,22	0,86	1,13	0,25	0,41

24-30°	0h	3h	8h
media	3,90	7,20	6,40
es	0,38	0,42	0,93

18-18°	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,30	6,80	6,80	5,50	8,40
es	0,21	0,92	0,59	0,54	0,60

18-4°	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,90	7,30	10,67	23,14	
es	0,71	0,93	1,18	5,23	

18-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,30	4,90	6,30	8,40	4,33
es	0,40	0,84	0,63	1,83	0,33

Tav. 5A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante l'emersione alle diverse temperature.

24-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	4,81	8,01	7,35	4,38	7,82
es	0,50	1,03	1,10	0,48	2,27

24-30°	0h	3h	8h
media	2,68	22,76	29,97
es	0,43	6,67	14,46

18-18°	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,11	4,48	5,94	6,33	7,06
es	0,14	1,56	2,84	3,07	4,90

18-4°	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,61	8,03	9,02	28,40	
es	0,40	1,21	3,50	14,89	

18-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	2,39	4,07	6,82	12,03	2,63
es	0,24	1,01	2,60	4,37	0,73

Tav. 5B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante l'emersione alle diverse temperature.

24-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	1039,50	1040,70	1039,80	1039,00	1040,56
es	1,71	1,36	1,60	1,43	1,58

24-30°	0h	3h	8h
media	1047,70	1048,00	1049,80
es	3,79	3,11	3,07

18-18°	0h	3h	8h	24h	48h
media	1047,00	1046,40	1045,10	1044,80	1044,60
es	3,82	3,96	3,89	3,63	3,59

18-4°	0h	3h	8h	24h	48h
media	1055,30	1053,60	1050,56	1052,86	
es	3,43	3,69	3,47	3,69	

18-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	1045,10	1044,20	1045,10	1045,10	1044,33
es	2,74	2,73	2,53	2,53	4,18

Tav. 5C: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L^{-1}) durante l'emersione alle diverse temperature.

24-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	1,98	1,75	1,78	1,69	1,59
es	0,22	0,11	0,17	0,18	0,18

24-30°	0h	3h	8h
media	3,07	2,42	2,75
es	0,36	0,36	0,26

18-18°	0h	3h	8h	24h	48h
media	3,81	3,65	3,86	3,34	2,72
es	0,45	0,43	0,36	0,40	0,35

18-4°	0h	3h	8h	24h
media	3,95	3,33	3,27	3,43
es	0,38	0,44	0,31	0,32

18-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	4,10	3,63	3,13	3,39	2,88
Es	0,35	0,32	0,36	0,25	0,39

Tav. 5D: medie ed errori standard della concentrazione di proteine totali nell'emolinfa (g dL^{-1}) durante l'emersione alle diverse temperature.

24-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,74	7,97	7,90	8,11	8,24
es	0,01	0,03	0,03	0,02	0,05

24-30°	0h	3h	8h
media	7,56	7,63	7,72
es	0,03	0,03	0,02

18-18°	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,63	7,65	7,77	7,79	7,78
es	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03

18-4°	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,52	7,55	7,71	7,56	
es	0,01	0,03	0,02	0,07	

18-24°	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,55	7,68	7,80	8,10	7,95
es	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04

Tav. 5E: medie ed errori standard del pH nell'emolinfa durante l'emersione alle diverse temperature.

24-24°	0h	3h	24h
media	8,05	7,75	9,10
es	0,29	0,44	0,32

24-30°	0h	3h
media	9,79	9,95
es	0,17	0,14

18-18°	0h	3h	24h
media	8,85	9,50	9,02
es	0,18	0,28	0,11

18-4°	0h	3h	24h
media	10,00	9,14	9,34
es	0,37	0,20	0,18

18-24°	0h	3h	24h
media	9,45	9,41	11,47
es	0,34	0,13	0,35

Tav. 5F: medie ed errori standard della concentrazione dei cloruri (mmol L⁻¹) nell'emolinfa durante l'emersione alle diverse temperature.

24-24°	0h	3h	24h
media	13,96	14,43	13,95
es	0,78	0,30	0,34

24-30°	0h	3h
media	17,98	18,08
es	0,32	0,32

18-18°	0h	3h	24h
media	14,18	14,45	14,78
es	0,38	0,29	0,48

18-4°	0h	3h	24h
media	16,23	16,75	18,12
es	0,35	0,27	0,38

18-24°	0h	3h	24h
media	14,97	15,58	16,55
es	0,21	0,30	0,55

Tav. 5G: medie ed errori standard della concentrazione del calcio (mmol L⁻¹) nell'emolinfa durante l'emersione alle diverse temperature.

Palaemon elegans

6PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	12,20	14,4	15,8	14,4	17
es	0,58	2,82	2,52	1,21	1,10

16PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	12,20	16,80	13,75	13,60	15,00
es	0,58	3,84	1,75	1,91	1,22

26PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	12,20	14,4	18,8	15,4	15,4
es	0,58	1,03	1,36	1,50	2,01

46PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	12,20	22,00	15,5	11,80	15,80
es	0,58	2,97	3,52	2,08	1,39

Tav. 6A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

6PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	6,62	22,16	21,14	27,32	18,90
es	1,16	2,49	1,52	2,32	2,09

16PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	6,62	22,88	30,48	14,44	13,80
es	1,16	1,83	1,53	1,76	1,36

26PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	6,62	23,50	15,72	20,48	6,88
es	1,16	1,55	2,28	2,26	0,87

46PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	6,62	26,08	28,55	12,56	24,28
es	1,16	7,56	1,24	2,96	1,51

Tav. 6B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

6PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	1099,60	1085,20	1109,60	1084,80	1120,00
es	6,24	6,65	6,76	5,31	2,28

16PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	1099,60	1063,60	1068,50	1067,20	1051,60
Es	6,24	6,49	10,72	5,08	7,49

26PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	1099,60	1117,60	1113,20	1110,40	1102,4
es	6,24	9,99	7,06	7,70	3,06

46PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	1099,60	1076,80	1059,50	1062,00	1069,20
es	6,24	11,67	4,99	3,52	3,38

Tav. 6: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L^{-1}) durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

6PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	6,51	8,13	9,60	6,39	8,66
es	0,84	0,39	0,39	0,56	0,49

16PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	6,51	6,02	7,00	5,83	5,42
es	0,84	0,76	0,40	0,39	0,58

26PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	6,51	8,28	9,17	8,07	7,70
es	0,84	0,84	0,70	0,85	0,49

46PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	6,51	5,84	5,24	5,71	5,81
es	0,84	0,87	0,81	0,72	0,23

Tav. 6D: medie ed errori standard della concentrazione di proteine totali nell'emolinfa (g dL^{-1}) durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

6PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,62	7,96	7,89	7,99	7,64
es	0,04	0,01	0,02	0,04	0,05

16PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,62	7,65	7,69	7,72	7,68
es	0,04	0,03	0,03	0,05	0,04

26PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,62	7,91	7,79	7,97	7,71
es	0,04	0,04	0,02	0,06	0,02

46PSU	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,62	7,52	7,59	7,65	7,68
es	0,04	0,02	0,03	0,04	0,04

Tav. 6E: medie ed errori standard dei valori di pH durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

6PSU	0h	3h	24h
media	5,64	8,65	7,90
es	0,80	1,00	1,05

16PSU	0h	3h	24h
media	5,64	6,65	6,09
es	0,80	0,45	0,54

26PSU	0h	3h	24h
media	5,64	7,06	8,46
es	0,80	0,60	0,31

46PSU	0h	3h	24h
media	5,64	7,00	8,23
es	0,80	0,68	0,21

Tav. 6F: medie ed errori standard della concentrazione dei cloruri (mmoL L⁻¹) nell'emolinfa durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

6PSU	0h	3h	24h
media	11,23	10,22	8,20
es	0,34	0,89	0,97

16PSU	0h	3h	24h
media	11,23	10,12	10,03
es	0,34	0,83	0,76

26PSU	0h	3h	24h
media	11,23	11,00	12,82
es	0,34	0,75	0,73

46PSU	0h	3h	24h
media	11,23	12,35	11,21
es	0,34	0,85	0,70

Tav. 6G: medie ed errori standard della concentrazione del calcio (mmol L⁻¹) nell'emolinfia durante l'Esposizione diretta alle diverse salinità.

6 PSU	0h
media	12,50
es	1,50

16PSU	0h
media	10,50
es	0,29

26PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	10,75	11,25	12,75	11,75	11,5	10
es	0,48	1,11	1,44	1,11	0,65	0,58

46PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	12,50	13,75	11,25	10,50	9,50	10,50
es	1,04	1,03	1,03	0,50	0,87	0,50

Tav. 7A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h
media	7,50
es	0,80

16 PSU	0h
media	5,13
es	1,18

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	12,45	20,8	14,15	12,58	8,53	7,33
es	2,06	10,51	2,60	2,78	1,72	1,82

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	10,85	10,25	6,45	3,00	5,43	4,78
es	2,51	1,65	1,37	0,38	0,34	0,79

Tav. 7B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h
media	1063,00
es	13,00

16 PSU	0h
media	1038,00
es	3,16

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1059,00	1059	1055	1059,5	1065	1060
es	3,42	5,20	3,11	6,02	5,00	4,00

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1078,50	1054,50	1064,5	1066,00	1068,00	1058,50
es	6,08	5,97	6,85	2,71	9,56	3,59

Tav. 7C: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h
media	4,62
es	0,33

16 PSU	0h
media	3,21
es	0,37

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	3,71	4,17	3,68	3,38	4,66	3,31
es	0,27	0,52	0,19	0,32	0,90	0,48

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	5,78	4,13	5,06	4,86	5,06	3,41
es	0,63	0,35	0,82	0,27	0,39	0,52

Tav. 7D: medie ed errori standard delle proteine totali nell'emolinfia (g dL^{-1}) durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h
media	7,46
es	0,05

16 PSU	0h
media	7,35
es	0,04

26 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,62	7,5625	7,565	7,4675	7,5125	7,49
es	0,03	0,05	0,08	0,02	0,02	0,01

46 PSU	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,73	7,85	7,76	7,71	7,58	7,64
es	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,04

Tav. 7E: medie ed errori standard del pH dell'emolinfia durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h
media	4,92
es	0,27

16 PSU	0h
media	6,14
es	0,13

26 PSU	0h	3h	24h	14d
media	7,55	7,57	7,33	6,99
es	0,33	0,37	0,51	0,19

46 PSU	0h	3h	24h	14d
media	9,04	9,75	9,27	9,22
es	0,88	1,33	0,52	0,53

Tav. 7F: medie ed errori standard della concentrazione dei cloruri (mmol L⁻¹) nell'emolinfa durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6 PSU	0h
media	11,83
es	0,22

16 PSU	0h
media	16,95
es	1,71

26 PSU	0h	3h	24h	14d
media	17,41	13,70	15,84	11,93
es	1,23	0,35	1,02	0,34

46 PSU	0h	3h	24h	14d
media	23,29	20,70	21,19	19,21
es	1,87	0,28	0,78	1,28

Tav. 7G: medie ed errori standard della concentrazione del calcio (mmol L⁻¹) nell'emolinfa durante l'Esposizione graduale alle diverse salinità.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	11,80	16,40	12,20	12,00	11,60
es	0,66	1,21	0,80	1,18	1,12

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	11,80	10,40	10,60	11,60	11,20
es	0,66	0,51	0,40	1,25	0,73

24° C	0h	3h	8h	24h
media	11,20	19,80	22,20	16,80
es	0,80	2,65	2,65	1,43

30° C	0h	3h	8h
media	11,20	30,80	16,40
es	0,80	2,85	2,98

Tav. 8A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	4,44	11,42	10,20	10,60	6,76
es	0,61	1,14	1,79	2,95	0,93

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	4,44	4,12	6,12	10,10	11,20
es	0,61	0,93	1,08	1,71	3,75

24° C	0h	3h	8h	24h
media	6,88	22,28	11,70	74,94
es	0,61	10,92	2,10	21,30

30° C	0h	3h	8h
media	6,88	17,04	27,64
es	0,61	2,70	6,27

Tav. 8B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	1086,80	1054,80	1053,20	1058,40	1060,00
es	6,89	4,13	3,07	3,66	4,82

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	1086,80	1058,80	1064,00	1064,80	1057,20
es	6,89	3,26	7,24	5,54	4,13

24° C	0h	3h	8h	24h
media	1106,40	1122,00	1122,00	1127,60
es	11,62	5,90	5,33	12,86

30° C	0h	3h	8h
media	1106,40	1106,80	1084,40
es	11,62	5,46	11,12

Tav. 8C: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	5,38	3,55	3,43	3,74	3,53
es	0,49	0,42	0,22	0,52	0,41

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	5,38	3,70	4,57	5,26	2,81
es	0,49	0,44	0,90	0,44	0,39

24° C	0h	3h	8h	24h
media	7,83	8,91	9,84	9,51
es	1,19	0,27	0,32	1,89

30° C	0h	3h	8h
media	7,83	8,15	9,29
es	1,19	0,74	0,84

Tav. 8D: medie ed errori standard della concentrazione di proteine totali nell'emolinfa (g dL⁻¹) durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,56	7,48	7,53	7,50	7,42
es	0,03	0,02	0,04	0,03	0,03

12° C	0h	3h	8h	24h	48h
media	7,56	7,60	7,70	7,68	7,81
es	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02

24° C	0h	3h	8h	24h
media	7,94	8,05	7,83	7,98
es	0,08	0,05	0,05	0,02

30° C	0h	3h	8h
media	7,94	7,97	8,00
es	0,08	0,04	0,01

Tav. 8E: medie ed errori standard del pH nell'emolinfa durante l'Esposizione diretta alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	9,25	10,75	10,50	12,25	10,25	10,00
es	0,95	1,11	0,96	1,03	0,63	0,41

12° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	9,25	11,75	10,50	11,50	10,50	9,50
es	0,75	2,53	1,66	1,26	1,26	0,29

Tav. 9A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	15,05	11,38	19,15	21,85	6,35	22,45
es	3,03	1,74	2,89	4,72	0,69	3,93

12° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,30	3,73	5,23	5,55	3,30	4,65
es	0,47	0,31	0,58	0,68	0,70	0,98

Tav. 9B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1066,00	1059,00	1056,50	1067,50	1052,50	1058,50
es	6,48	4,20	2,87	2,50	0,96	3,30

12° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	1108,00	1105,00	1077,00	1092,50	1073,25	1069,50
es	9,20	8,70	3,11	1,50	6,70	6,65

Tav. 9C: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	4,43	3,10	3,39	4,31	2,94	4,14
es	0,21	0,19	0,35	0,08	0,18	0,46

12° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	8,55	7,94	5,63	7,64	4,79	4,42
es	0,50	0,71	0,42	0,43	0,24	0,85

Tav. 9D: medie ed errori standard della concentrazione di proteine totali nell'emolinfa (g dL⁻¹) durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

6° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,46	7,47	7,47	7,42	7,57	7,50
es	0,02	0,04	0,02	0,03	0,03	0,02

12° C	0h	3h	8h	24h	48h	14d
media	7,53	7,54	7,71	7,61	7,68	7,80
es	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,01

Tav. 9E: medie ed errori standard del pH nell'emolinfa durante l'Esposizione graduale alle diverse temperature.

Upogebia pusilla

Acqua	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	7,00	7,60	8,40	10,20	8,60
es	0,55	0,93	1,81	2,71	1,44

Aria	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	6,00	6,20	8,40	13,20	11,00
es	0,84	0,37	1,29	3,79	3,30

Tav. 10A: medie ed errori standard di glicemia (mg dL⁻¹) durante le prove di stabulazione e mantenimento alla'aria.

Acqua	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	2,06	18,44	25,00	35,00	43,40
es	0,25	14,50	13,48	18,98	17,17

Aria	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	4,76	19,14	23,16	35,10	54,12
es	1,91	9,73	6,14	3,81	9,68

Tav. 10B: medie ed errori standard di acido lattico (mg dL⁻¹) durante le prove di stabulazione e mantenimento alla'aria.

Acqua	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	1066,80	1056,40	1049,20	1046,40	1045,20
es	5,12	4,02	3,38	4,40	4,50

Aria	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	1072,80	1058,80	1061,60	1058,00	1058,40
es	6,89	2,58	3,97	4,20	3,43

Tav. 10C: medie ed errori standard della densità dell'emolinfa (g L⁻¹) durante le prove di stabulazione e mantenimento alla'aria.

Prot	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	4,97	4,42	3,93	2,78	2,51
es	0,27	0,54	0,77	0,54	0,56

Prot	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	4,44	3,93	4,61	4,62	4,03
es	0,45	0,23	0,25	0,17	0,25

Tav. 10D: medie ed errori standard della concentrazione di proteine totali nell'emolinfa (g dL⁻¹) durante le prove di stabulazione e mantenimento alla'aria.

pH	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	7,93	7,97	7,89	7,80	7,86
es	0,02	0,04	0,05	0,05	0,07

pH	0h	0,5h	1h	2h	3h
media	7,92	8,01	7,73	7,79	7,99
es	0,05	0,10	0,07	0,04	0,12

Tav. 10E: medie ed errori standard del pH nell'emolinfa durante le prove di stabulazione e mantenimento alla'aria.

RINGRAZIAMENTI

La realizzazione di questo lavoro è stata possibile grazie a molte persone, tra cui il Prof. Ferrero, la Dott.ssa Lorenzon e il Dott. Sponza, che ringrazio per l'aiuto e la disponibilità che mi hanno dato in ogni momento di questi tre anni.

Ringrazio Emanuele per la fiducia e la pazienza dimostrate e per il sostegno che non mi ha fatto mai mancare, e Liam e Nichte Ha per la serenità e il coraggio che inconsapevolmente mi danno.

Un grazie di cuore a mio papà, a mia mamma e a mia sorella per aver creduto ancora una volta in me.

Questo lavoro è dedicato al mio cuore, Leonardo.