

DR/26/8

Pho 682

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

DOTTORATO DI RICERCA IN METODOLOGIE DI BIOMONITORAGGIO

E QUALITÀ DELL'AMBIENTE

- XIV CICLO -

**ANALISI DELLA STRUTTURA E COMPOSIZIONE DEGLI
OTOLITI DI *CHONDROSTOMA NASUS NASUS* (LINNEO, 1758)
(OSTEICHTHYES, CYPRINIDAE) NEI BACINI DEL FIUME
ISONZO E NATISONE**

Dottorando

Dott. Silvia Vanzo '68

es

Coordinatore

Prof. G. A. Amirante

Dipartimento di Biologia

Università degli Studi di Trieste

G. A. Amirante

Tutore

Prof. G. A. Amirante

Dipartimento di Biologia

Università degli Studi di Trieste

G. A. Amirante

RIASSUNTO.....	1
INTRODUZIONE	3
SISTEMATICA.....	5
Classificazione:	5
CIPRINIFORMI.....	5
CYPRINIDAE.....	6
<i>CHONDROSTOMA</i> Agassiz, 1835	7
Specie <i>Chondrostoma nasus</i> (Linneo, 1758)	7
Sottospecie <i>Chondrostoma nasus nasus</i> (Linneo, 1758).....	9
BIOLOGIA.....	10
Ecologia.....	10
Alimentazione	10
Riproduzione	11
Accrescimento.....	12
Distribuzione	13
STRUTTURA DELL'ORECCHIO INTERNO NEI TELEOSTEI.....	14
Organi otolitici	15
Funzione del labirinto.....	16
BIOINDICATORI	18
Gli otoliti come bioindicatori	18
FIUME ISONZO	21
FIUME NATISONE.....	23
MATERIALI E METODI	25
Determinazione dell'età	25
Analisi cristallografica	26
Analisi morfologica.....	27
Analisi morfometrica.....	28
Analisi microelementare.....	30
Analisi componente organica	33
ANALISI DEI DATI.....	39
Determinazione dell'età	39
Analisi cristallografica	40
Analisi morfologica.....	41
Analisi morfometrica.....	58
Analisi microelementare.....	80
Analisi componente organica	92
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	96
BIBLIOGRAFIA.....	102
RINGRAZIAMENTI	114

RIASSUNTO

Scopo della presente tesi è stato quello di testare attraverso l'analisi microelementare l'utilizzo degli otoliti per il biomonitoraggio ambientale. Il lavoro ha però riguardato anche le caratteristiche morfologiche e strutturali sia della parte inorganica che di quella organica poiché si è visto che influiscono nell'incorporazione elementare.

Sono stati utilizzati gli otoliti (lapilli, sagitte ed asterischi) di *Chondrostoma nasus nasus*, Ciprinide reofilo, alloctono e poco noto in Italia, la cui presenza ha assunto carattere invasivo nelle acque del Friuli-Venezia Giulia.

Gli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus* sono stati pescati nell'asta principale del fiume Isonzo, del fiume Natisone, nel Canale dei Dottori e nella roggia di Manzano.

I siti di campionamento sono stati scelti in base alle caratteristiche idrologiche dei due fiumi, e dal fatto che le popolazioni di questa specie ittica risultano isolate tra loro, pur essendo la popolazione del fiume Natisone originata da esemplari provenienti dal fiume Isonzo.

I campioni sono stati catturati tramite utilizzo di un elettrostorditore ad impulsi, con potenza massima di 4000 Watt.

Gli otoliti sono risultati costituiti da carbonato di calcio e da una matrice organica. Le tre diverse coppie di otoliti presentano la stessa modalità di sviluppo caratterizzata da deposizioni successive a partire da primordia di nucleazione.

Nei lapilli e nelle sagitte di *Chondrostoma nasus nasus* è stato osservato che il carbonato di calcio è presente nella forma di aragonite mentre negli asterischi è presente nella forma di vaterite. La matrice organica è sempre presente e funge da struttura portante per la crescita dei cristalli.

Per rilevare alcune caratteristiche dell'accrescimento dei lapilli e degli asterischi sono stati misurati diversi parametri dimensionali. Da questa analisi è emerso che non vi è alcuna differenza tra l'otolite destro e quello sinistro evidenziando l'assenza di asimmetria di queste strutture in questa specie. Dal confronto delle medie di ciascun parametro dimensionale in ciascuna classe d'età, sono emerse differenze statisticamente significative soprattutto tra le prime classi d'età. Dall'analisi delle relazioni esistenti tra alcuni parametri quali l'area, il perimetro ed il peso dell'otolite con la lunghezza totale e il peso totale degli esemplari è risultato che ci sono delle notevolissime correlazioni confortate da coefficienti di determinazione significativi e molto elevati.

E' stata rilevata la concentrazione elementare di tutti e tre i tipi di otolite tramite l'analisi con la spettrometria di emissione al plasma induttivamente accoppiato. Sono state indagate le concentrazioni di undici elementi, ed è emerso che il calcio è il più abbondante costituendo circa il 34% della concentrazione totale. La concentrazione degli elementi chimici indagati è risultata subordinata al tipo di allomorfo di cui era costituito l'otolite.

Non sono state riscontrate concentrazioni di accumulo elementare differenti nelle diverse classi d'età, ne' nei due sessi.

Lo stronzio è risultato elemento discriminante in tutti e tre i tipi di otolite dei diversi siti di campionamento.

La frazione organica è stata analizzata in tutti e tre i tipi di otolite e mediamente costituisce il 2,3% del peso nelle sagitte, il 2,5 % nei lapilli e 1,7% negli asterischi. La composizione aminoacidica è molto simile a quella riportata in letteratura, non è stato rinvenuta l'idrossiprolina e quindi nella frazione organica degli otoliti di *Chondrostoma nasus nasus* non è presente collagene.

Negli asterischi è stata individuata una proteina di 66581 Da.

Dalle analisi microelementari è risultato che anche per questa specie vi sono elementi la cui concentrazione è in relazione alle caratteristiche ambientali e quindi gli otoliti, grazie anche alla loro fisiologia, presentano delle capacità applicative tali da poter essere utilizzati come bioindicatori.

INTRODUZIONE

Il crescente degrado ambientale impone la necessità di un controllo sistematico dei livelli d'inquinamento e della qualità dell'ambiente.

La capacità degli inquinanti di interagire con la materia vivente all'interno di un ecosistema può indurre cambiamenti e danni sugli organismi a diversi livelli di complessità strutturale, non identificabili mediante la sola analisi chimico-fisica del comparto abiotico.

Un organismo vivente anzitutto discrimina i composti biologicamente disponibili da quelli che non lo sono; inoltre l'organismo può costituire una sorta di memoria storica in quanto è in grado di manifestare effetti dovuti ad esposizioni prolungate a basse concentrazioni di contaminanti. La capacità degli inquinanti di interagire con la materia vivente all'interno di un ecosistema può indurre cambiamenti e danni sugli organismi a diversi livelli di complessità strutturale.

Gli indicatori ambientali, in particolare quelli biologici, hanno la prerogativa di fornire dei dati sintetici di situazioni complesse permettendo di aggirare problemi estremamente complicati come quelli di sinergia, di metabolismo e di antagonismo, propri di molte sostanze inquinanti e, nella maggior parte dei casi, non individuabili in altro modo.

Generalmente nelle indagini sull'ambiente acquatico vengono utilizzati organismi bentonici o sessili o loro organi e tessuti.

I pesci tuttavia non sono passivi registratori dei cambiamenti ambientali, in quanto rispondono attuando meccanismi adattativi e di resistenza a differenti livelli di complessità a seconda dell'intensità, della durata, delle caratteristiche del disturbo. Possono essere considerati buoni indicatori delle variazioni della qualità di un corso d'acqua. Infatti modificazioni a carico della composizione in specie della comunità ittica o a carico della struttura e dinamica delle singole popolazioni possono rappresentare un segnale della presenza di un eventuale perturbazione ambientale.

Come spesso accade l'elemento o la sostanza che entra nell'organismo può non raggiungere affatto organi bersaglio, oppure può raggiungerli ma essere prontamente smaltito, secreto o inviato a particolari siti nei quali viene scomposto per essere poi eliminato mediante i processi catabolici. Studi relativi all'incorporazione dei metalli nei pesci hanno dimostrato che organi come fegato, muscoli e branchie rimuovono prontamente composti potenzialmente tossici rigenerando i tessuti danneggiati.

In definitiva, anche se gli organi dei pesci trattengono gli inquinanti per periodi più o meno prolungati e spesso in concentrazioni maggiori dell'acqua, i segnali in traccia possono essere persi a seguito di un rapido turnover dei tessuti stessi.

L'otolite essendo una struttura che si accresce costantemente per continua apposizione di nuova sostanza, può essere identificato come un registratore permanente delle condizioni ambientali e fisiologiche, inoltre per gli otoliti non è conosciuto alcun meccanismo di detossificazione da parte dell'organismo, quindi un qualsiasi elemento che venga intrappolato, sia nella frazione organica che in quella inorganica, non può più essere rimosso.

Per questi motivi gli otoliti sono diventati degli utili strumenti, oltre che per la conoscenza dell'età e di tutte le informazioni che da essa derivano, anche per la comprensione di aspetti legati all'ambiente colonizzato dalla specie in esame.

Per questo motivo, lo scopo del presente lavoro è stato quello di testare attraverso l'analisi microelementare l'utilizzo di queste strutture per il biomonitoraggio ambientale. Il lavoro però ha cercato di offrire una panoramica abbastanza estesa sulle caratteristiche morfologiche, strutturali sia della parte inorganica che di quella organica che si è visto influiscono entrambe nell'incorporazione elementare.

SISTEMATICA

Classificazione:

Classe: OSTEICHTHYES
Sottoclasse: ATTINOPTERIGI
Ordine: CYPRINIFORMES
Famiglia: CYPRINIDAE
Genere: *CHONDROSTOMA*
Specie: *CHONDROSTOMA NASUS*
Sottospecie: *CHONDROSTOMA NASUS NASUS*

CIPRINIFORMI

Corpo fusiforme nella maggior parte delle specie, di rado allungato o anche serpentiforme (Tortonese, 1970). Bocca più o meno protrattile, con margine boccale superiore generalmente formato da soli premaxillari. Dentatura variabile, sempre assente sul vomere e sulle mascelle e presente sulle ossa faringee inferiori, che sono grandi e falciformi. 3-5 raggi branchiostegi. Scaglie generalmente cicloidi, assenti sul capo. Pinne sostenute da raggi molli (malacopterigi) e quasi sempre prive di raggi spiniformi. Le pinne ventrali sono in posizione addominale, la pinna caudale è omocerca (Gandolfi et Al., 1991).

E' sempre presente l'apparato di Weber, struttura ossea che determina una connessione morfo-funzionale tra il labirinto dell'orecchio interno e la vescica gassosa. Questo apparato, costituito da una serie di piccole ossa (claustro, scaffio, intercalare e tripode), derivate da parti delle prime vertebre, è finalizzato alla regolazione dell'equilibrio e della posizione del pesce, ma sembra essere anche in relazione con la ricezione e la produzione di suoni.

Insieme ad altri ordini, tra i quali i Siluriformi, anch'essi dotati dell'apparato di Weber, i Cipriniformi costituiscono il gruppo degli Ostariofisi, che può essere considerato un superordine (Nelson, 1984).

I Cipriniformi noti a partire dal Cretaceo superiore hanno avuto un'ampia radiazione evolutiva nell'era Cenozoica, differenziandosi in alcuni sottordini, varie famiglie e

numerosi generi. Nella fauna italiana risultano presenti tre Famiglie: Cyprinidae, Cobitidae, Homalopteridae (Gandolfi et Al., 1991).

CYPRINIDAE

Margine boccale superiore costituito da soli premaxillari. I denti faringei poco numerosi e disposti in 1-3 serie su ciascun osso faringeo, si oppongono ad una placca connessa al basioccipitale, derivante dalla fusione delle ossa faringee superiori. L'azione delle ossa faringee inferiori contro la piastra provoca la triturazione del cibo. La forma dei denti faringei e la loro disposizione sono in relazione al tipo di alimentazione e rivestono importanza sistematica nella determinazione dei generi. Barbigli assenti o presenti in 1-2 paia, generalmente poco sviluppati. 3 raggi brachiostegi, vescica gassosa divisa in due camere (Gandolfi et Al., 1991). Nei maschi le pinne pari sono leggermente più lunghe, con il primo o i primi due raggi più robusti dei successivi. All'epoca riproduttiva possono comparire livree particolari – con tinte rosse o aranciate sul corpo e sulle pinne, o con parziali annerimenti, e si sviluppano i cosiddetti tubercoli nuziali. Questi consistono in formazioni cornee transitorie, arrotondate o coniche, sparse sul capo e talora anche sul corpo e sulle pinne, soprattutto nei maschi, nelle femmine sono più piccoli e meno numerosi. Le uova sono demerse e vengono disposte sul fondo oppure attaccate alle piante acquatiche (Tortonese, 1970).

In natura sono abbastanza frequenti i casi di ibridazione interspecifica e intergenica (Gandolfi et Al., 1991). Talvolta gli ibridi sono risultati fecondi e sembra che ai fini dell'ibridazione siano importanti anche alcune caratteristiche delle uova oltre all'affinità sistematica delle specie parentali (Tortonese, 1970).

I Ciprinidi costituiscono la famiglia con il maggior numero di specie, comprendente circa 200 generi e oltre 2000 specie distribuite in Asia, Europa, Africa e America settentrionale. Sono noti a partire dall'Oligocene e l'Asia meridionale rappresenta probabilmente il centro di origine della famiglia. La gran parte delle specie è stenoalina dulcicola, alcune tollerano l'acqua salmastra, mentre nelle zone costiere del mar Nero e dell'Estremo oriente, a bassa concentrazione salina vivono specie il cui comportamento può dirsi anadromo (Tortonese, 1970).

Come conseguenza dell'ampia distribuzione adattativa del gruppo, i caratteri ecologici ed etologici delle diverse specie risultano notevolmente diversificati: sono segnalate specie

bentoniche, nectoniche, reofile, altre tipiche di acque lentiche, specie che prediligono acque fredde, altre acque calde; alcune specie, non europee sono cavernicole.

In Italia sono presenti 17 specie indigene e almeno una decina di specie introdotte; tra queste la carpa e i carassi sono acclimatati ormai da secoli e ampiamente diffusi, altri come le carpe erbivore non sono in grado di riprodursi nei nostri ambienti; altre ancora, di recentissima introduzione, hanno distribuzione limitata a pochi bacini, ma sembrano in grado di riprodursi e di espandersi rapidamente.

Le specie indigene (comprendendo anche la carpa e il carassio acclimatati da oltre un secolo) appartengono a 11 generi in cui vengono inclusi 4 sottofamiglie: Leuciscinae (*Alburnus*, *Chondrostoma*, *Phoxinus*, *Rutilus*, *Scardinius*, *Tinca*), Barbinae (*Barbus*), Gobioninae (*Gobio*), Cyprininae (*Cyprinus*, *Carassius*) (Gandolfi et Al., 1991).

CHONDROSTOMA Agassiz, 1835

Corpo fusiforme, più o meno pigmentato o punteggiato sopra la linea laterale e biancastro sotto. Bocca inferiore o subterminale, diritta terminante come un ferro di cavallo; labbro superiore nettamente prominente e quello inferiore di natura cornea, dura e tagliente. Non presenta barbighi. L'inserzione della pinna dorsale si trova sulla verticale tracciata dall'origine delle pinne pelviche. Presenta 8-10 raggi molli nella pinna dorsale, 12-18 nelle pinne pettorali, 8-9 nelle pinne pelviche, 8-12 nella pinna anale, e 17 raggi molli (tra due spinosi più lunghi) nella pinna caudale. Il profilo della pinna dorsale e anale è concavo, di rado dritto o leggermente convesso. La pinna dorsale è profondamente biloba. La linea laterale è completa con 44-106 scaglie. Sono presenti da 42 a 49 vertebre (Elvira, 1987).

Il genere *Chondrostoma* comprende 26 specie ed è distribuito nell'Europa centrale e meridionale, dalla penisola Iberica ai monti Urali, e nel Medio Oriente dalla penisola Anatolica all'Iran (Elvira, 1997). *Chondrostoma soetta* e *Chondrostoma genei* sono le sole specie tipiche della regione italiana (Nelva et Al., 1988).

Specie *Chondrostoma nasus* (Linneo, 1758)

Di *Chondrostoma nasus* sono state distinte 7 sottospecie: *Chondrostoma nasus nasus*, *Chondrostoma nasus borysthenicum*, *Chondrostoma nasus ohridanus*,

Chondrostoma nasus angorensis, *Chondrostoma nasus prespensis*, *Chondrostoma nasus vardarensis*, *Chondrostoma nasus variabilis* (Elvira, 1997).

Chondrostoma nasus nasus si trova in Europa centrale e occidentale, dall'Atlantico al mar Nero: Francia, Belgio, Germania, Polonia, ex Cecoslovacchia, Ungheria, Romania (Nelva et Al., 1988)

Chondrostoma nasus borysthenicum si trova in alcuni bacini della regione centro-europea (Dniestr, Bug, Dnipr) (Nelva et Al., 1988).

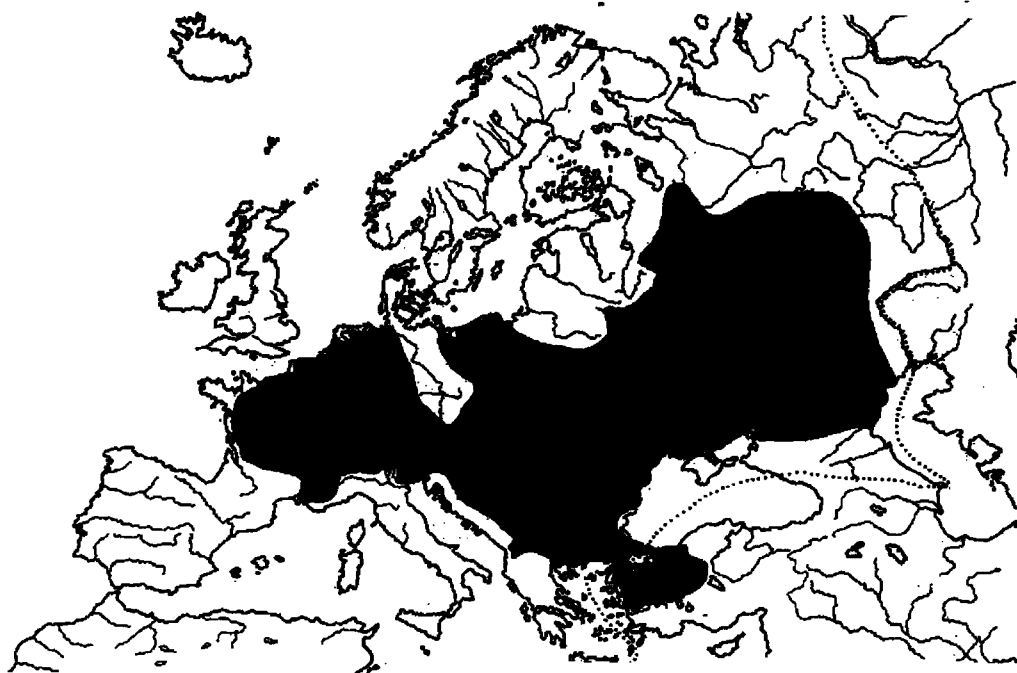
Chondrostoma nasus ohridanus è presente nella penisola Balcanica, nei laghi di Ohrid, Skadar e nei fiumi Drim e Aoos (Albania) (Nelva et Al., 1988).

Chondrostoma nasus angorensis è distribuito nei bacini dei fiumi Sakarya e Kizilirmak (nord Anatolia, Asia) (Elvira, 1997).

Chondrostoma nasus prespensis è endemico del lago di Prespa e dei suoi immissari (Macedonia) (Nelva et Al., 1988)

Chondrostoma nasus vardarensis si trova nei fiumi della Macedonia e della Tracia che sfociano nel mar Egeo: Vadar, Struoma, Mesta, Maritza, e alcuni affluenti dell'Aliakmon e dell'Edessos (Nelva et Al., 1988).

Chondrostoma nasus variabilis vive in Russia nei bacini del Don, della Volga e dell'Oural, dell'Emba e della Kuma (Nelva et Al., 1997).



Distribuzione di *Chondrostoma nasus nasus* (Povz e Sket, 1990)

Sottospecie Chondrostoma nasus nasus (Linneo, 1758)

Presenta corpo allungato, compresso lateralmente, ricoperto da scaglie grandi cicloidi, disposte in linee dritte, ordinate. Il dorso è scuro, grigio verde, i fianchi sono chiari e il ventre bianco. Ha bocca infera con labbra dritte e molto dure. La pinna dorsale e caudale sono grigiastre, le altre rossastre o arancioni (Povz e Sket, 1990).

Di seguito sono riportate in tabella i principali caratteri meristici riportati da alcuni Autori.

L.L.	N.V	L.L. sup.	L.L. inf.	D.F.	Br.	R. D.	R. A.	P.	Autori
(56)58-64(66)		8-9	(4)5-6	(5/6)6/6(7/6)		III-IV/(8)9(10)	III/(8)10-11(12)		Banarescu (1964)
(56)57-63		8-9	4-6	6/6(7/6)		III-IV/(8)9(10)	III/(9)10-11(12)		Berg (1964)
55-67				5-6	27-34	III/8-10	III/9-11		Opalatenko (1966)
56-64		8-9	4-6			III-IV/(9)11(12)	III/(9)10-11(12)		Vasiliu e Eugen (1966)
53-66		(7)8-9(10)	(4)5-6(7)	(5/6)6/6(6/5-7/6)	27-35	III/(8)9-10	III/(9)10-11(12)		Lusk (1968)
59-63					6-5	8-9	9-10	15-16	Krupka et Al. (1985)
55-56		8-9	5-6	6/6		III/8-10	III/9-11		Nelva (1985)
52-66				6/6		9-10	9-11	15-18	Elvira (1987)
59-63	40-42			6/6		11-12	11-12	15-16	Pizzul et Al. (1994)

LL.: numero scaglie linea laterale; N.V.: numero vertebre; L.L. sup.: numero scaglie sopra la linea laterale; L.L. inf.: numero scaglie sotto la linea laterale; D.F.: denti faringei; Br.: branchiospine; R.D.: raggi pinna dorsale; R.A.: raggi pinna anale; P.: raggi pinna pettorale

BIOLOGIA

Ecologia

Chondrostoma nasus nasus, comunemente chiamato naso, è un Ciprinide reofilo che vive nella cosiddetta zona a barbo dei maggiori fiumi dell'Europa centrale (Nelva, 1985; Lelek, 1987). Predilige acque particolarmente ricche di ossigeno (Riedel, 1974), anche se può sopportare temperature relativamente alte. La specie, fortemente gregaria, vive usualmente in grossi banchi formati da 20-80 e più individui (Maier et Al., 1995) che spesso migrano compiendo grandi distanze lungo l'asta fluviale (Buschek, 1978) al fine di raggiungere le zone di riproduzione, caratterizzate da fondali ghiaiosi poco profondi con una buona corrente e ossigenazione (Maier et Al., 1995), o le zone di nutrizione. Possono percorrere anche più di 23 km al giorno e compiere migrazioni di oltre 100 km (Povz, 1988).

Nelva (1989; 1997) ha analizzato la struttura delle popolazioni di naso in alcuni fiumi francesi osservando che gli esemplari si distribuiscono in banchi costituiti da differenti classi di taglia e età, in relazione ad alcune caratteristiche morfologiche e idrologiche del corso d'acqua, quali la pendenza delle rive, la velocità della corrente, la profondità e la natura del substrato. L'Autore individua tre gruppi: il primo costituito da giovani esemplari che raggiungono il primo anno d'età e occupano corsi d'acqua dal letto piuttosto ampio, con profondità attorno al mezzo metro, con corrente nulla o debole e rive con scarsa pendenza; il secondo da individui immaturi (2-3 anni) che si localizzano in tratti di fiume con caratteristiche simili ai precedenti ma con corrente modesta; il terzo gruppo infine è formato da esemplari di 4 anni e più che colonizzano fiumi e canali di modesta larghezza, con profondità variabile tra 0,5 e 1,5 m e forte corrente.

Alimentazione

Con la bocca e le labbra infere molto dure raschia la copertura vegetale che cresce sul fondo. Si nutre quindi di alghe, prevalentemente diatomee, ma anche di una piccola percentuale di microrganismi che si rinvencono nella vegetazione (Lelek, 1987; Nelva, 1997). Durante gli stadi giovanili il regime alimentare è prevalentemente carnivoro: gli avannotti si nutrono di Protozoi, Nematodi, Oligocheti, Rotiferi, Crostacei e larve di

Chironomidi, Efemerotteri, Tricotteri (Nelva, 1997; Povz, 1988), e dai 5-7 mesi di vita la dieta risulta prevalentemente costituita da diatomee (Nelva, 1997).

L'alimentazione è diurna, incostante, nulla durante il periodo riproduttivo e a temperature intorno ai 4-5°C e 23-24°C (Nelva, 1985).

Riproduzione

La riproduzione nel fiume Isonzo avviene tra la fine di maggio e gli inizi di luglio (Pizzul et Al., 1994).

Kappus et Al. (1997) studiando la distribuzione e la biologia del naso del fiume Jagst (Baden-Württemberg, Germania) rilevano che la riproduzione avviene agli inizi di aprile quando la temperatura dell'acqua è maggiore di 8°C, anche se probabilmente un controllo viene esercitato dal fotoperiodo in accordo con quanto riportato anche da Lelek e Penaz (1963).

Matvejev (1983 a, b) e Povz (1988) riportano che il periodo riproduttivo nel fiume Sava (Ljubljana, Slovenia) avviene quando le acque hanno una temperatura compresa tra 10-12°C e cioè nei mesi di aprile e maggio; ed in alcuni casi può estendersi fino a giugno.

Nel fiume Isonzo la maturità sessuale viene raggiunta, in entrambi i sessi, verso il quinto anno d'età (Pizzul et Al., 1994).

Nel fiume Sava la maturità sessuale viene raggiunta a partire dal VII-VIII anno (Povz, 1988).

Secondo Hochman e Penaz (1991) le femmine sono mature tra il IV e VI anno, mentre i maschi tra il III e IV anno, raggiungendo il massimo potenziale riproduttivo tra VIII e XII anno.

Nelva (1997) in una ricerca condotta sulle popolazioni di naso dell'alto Reno, riporta che la maturità viene raggiunta abbastanza precocemente intorno al III- IV anno.

In periodo riproduttivo appaiono sul capo i tubercoli nuziali soprattutto nei maschi, mentre la livrea cambia da verde scuro a quasi nero (Povz, 1988).

Le uova hanno un diametro di 2-2,2 mm, si schiudono dopo 23 giorni (223 gradi giorno), il sacco vitellino viene riassorbito dopo una settimana e dopo 2 mesi i piccoli nasi sono in grado di nuotare nell'acqua (Povz, 1988).

Il numero delle uova riscontrato da Pizzul et Al. (1994) nel fiume Isonzo è compreso tra 15000 e 20000 in esemplari di circa 400 g fino ad arrivare a 47000 in femmine di 650-700 g di peso.

Chondrostoma nasus nasus è una specie a strategia riproduttiva di tipo r: ha la più alta fecondità tra i Ciprinidi reofili quali il cavedano, il vairone e il barbo (Phillipart, 1981), e un'elevata mortalità nelle classi iniziali d'età (Nelva, 1997).

Accrescimento

Da studi condotti da Pizzul et Al. (1994), su esemplari provenienti dal bacino del fiume Isonzo, *Chondrostoma nasus nasus* raggiungerebbe la taglia massima di 44,5 cm (decima classe d'età).

Secondo Forneris et Al. (1990) la taglia massima raggiungibile è di 50 cm.

Lelek (1987) riporta lunghezza massima di 40 cm e peso di 1.5 kg.

Di seguito sono riportate, sotto forma di tabella, le lunghezze totali medie in cm per ciascuna classe d'età rilevate da alcuni Autori.

Classi d'età	Matvejev (1983a)	Povz (1983)	Pizzul et Al. (1994)
0		62	42
1	60	94	96.3
2	100	123	123.6
3	138	222	155
4	174	257	201.8
5	205	306	255.9
6	235	339	324.2
7	258	360	350.4
8	275	395	370.5
9	295	408	290.4
10	309	421	445
11	333	423	-
12	365	442	-
13	360	425	-
14	-	-	-
15	387	478	-

Distribuzione

Chondrostoma nasus nasus è una specie alloctona per il Friuli-Venezia Giulia in quanto originaria del bacino del Danubio. Nei primi anni sessanta pescatori sportivi sloveni per motivi alieutici introdussero nel fiume Vipacco esemplari provenienti dal fiume Drava di lunghezza totale di circa 20 cm per un totale di 150 Kg. Per alcuni anni dopo l'introduzione non furono notati cambiamenti nella struttura della comunità ittica, probabilmente per il fatto che i pescatori non erano abili a catturare questa specie. Dal 1968 il numero di catture però aumentò: da 16 esemplari pescati nel 1968 si arrivò a 6513 catture di pesci di peso maggiore di un chilo nel 1988 (Povz, 1995).

La presenza della specie ha interessato da prima il corso italiano del fiume Vipacco e successivamente, il fiume Isonzo, il Canale dei Dottori, i torrenti Torre, Judrio, Corno e Malina (Pizzul et Al., 1992; Pizzul et Al., 1995).

Chondrostoma nasus nasus è stato successivamente introdotto anche nel fiume Natisone, dove però il suo areale è limitato al tratto medio-basso da uno sbarramento posto all'altezza di Cividale (Pizzul et Al., 1997). Dal fiume Natisone si è poi diffuso nella Roggia di Manzano, canale artificiale che capta l'acqua del Natisone in località Case nel comune di Manzano.

E' presente anche nel torrente Groina, affluente in riva sinistra del fiume Isonzo (Pizzul et Al., in stampa), ed è stato catturato nel torrente Versa (Pivec, 2000).

La specie occupa principalmente acque che corrispondono alla zona a temolo e a barbo definite da Huet (1970) per i fiumi del centro Europa. Queste zone, nella nostra regione, sono tipicamente abitate anche dalla trota marmorata (*Salmo [trutta] marmoratus*) prezioso endemismo padano-veneto (Pizzul et Al., 1992).

Si è notato, inoltre, che la comparsa del naso nei corsi d'acqua del bacino dell'Isonzo ha portato la scomparsa della savetta (*Chondrostoma genei*) endemismo del bacino Adriatico (Povz, 1995).

STRUTTURA DELL'ORECCHIO INTERNO NEI TELEOSTEI

Nei Teleostei la percezione dell'equilibrio e dei suoni ha sede nell'orecchio interno. Quest'organo stato-acustico può essere considerato come un organo della linea laterale altamente specializzato.

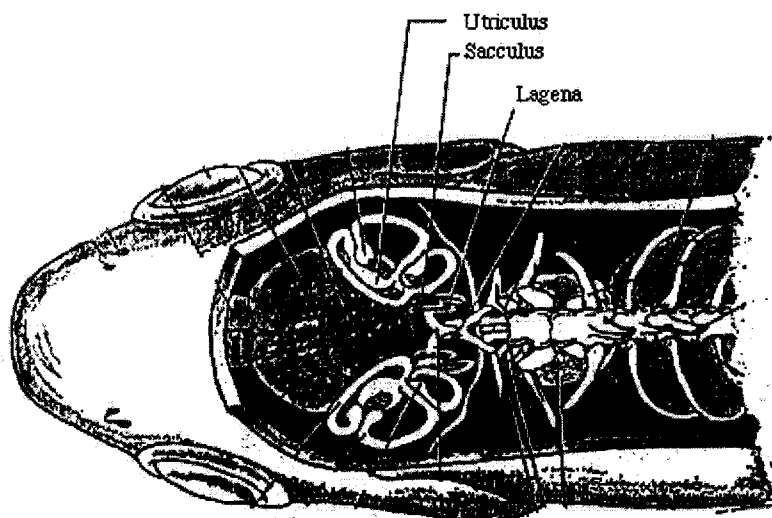
Embriologicamente l'abbozzo dell'orecchio è costituito da un placode otico, di origine ectodermica, presente uno per lato della testa, allineato con gli altri placodi che daranno origine ai bottoni della linea laterale.

Il placode otico si infossa e forma la vescicola otica che si posiziona tra la cartilagine dell'arcata mandibolare e quella dell'arcata ioidea.

La vescicola otica comunica all'esterno con il dotto endolinfatico per qualche tempo, ma poi tale canale si chiude, formando così un seno endolinfatico. La vescicola otica, per successiva evoluzione, darà origine al labirinto membranoso in cui è contenuta l'endolinfa. Il labirinto non è direttamente aderente alla parete ossea, ma rimane un'intercapedine detta spazio perilinfatico.

Il labirinto membranoso è formato da 3 canali semicircolari, orientati secondo i tre piani dello spazio, comunicanti con tre camere (utricolo, sacculo e lagena) nelle quali sono presenti gli organi otolitici.

Il labirinto si può suddividere in due parti: la pars superior formata dai canali semicircolari e dall'utricolo e la pars inferior comprendente il sacculo e la lagena.



Posizione degli organi otolitici nel cranio dei Teleostei

Organi otolitici

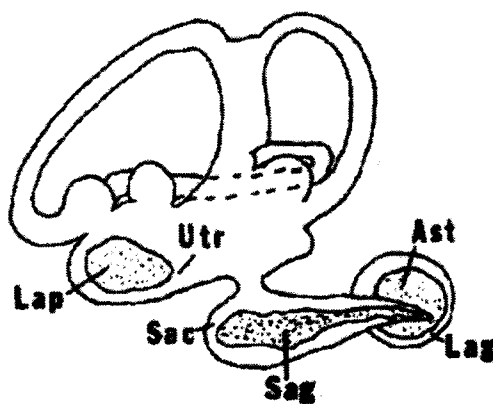
Questi organi sono formati da un epitelio sensoriale detto macula, costituito da cellule con un sistema apicale di processi ciliari e cellule di supporto, al di sopra del quale è situata una struttura cristallina composta di materia organica e sali carbonatici denominata otolite.

L'otolite è ancorato alle pareti membranose del labirinto tramite un sistema di fibre di tessuto connettivo. La macula e l'otolite sono separati da una sottile membrana otolitica formata da mucopolisaccaridi, questa trattiene l'otolite sopra la macula e fornisce un collegamento fisico tra l'otolite e le cellule sensoriali.

Le ciglia delle cellule sensoriali si incastrano nella sovrastante membrana otolitica, sulla cui superficie superiore sono inglobati gli otoliti. Le cellule capellute, attivate dalle deformazioni del loro ciglio, fungono da meccanocettori rilevando i movimenti dell'endolinfa indotti da variazioni dell'assetto del capo nello spazio.

La macula dell'utricolo è disposta sul pavimento del sacco endolinfatico, in un piano orizzontale; la macula del sacculo, invece, è situata in posizione verticale sulla parete interna. Una depressione a forma di tasca si trova sul pavimento del sacculo vicino alla sua estremità posteriore e contiene la macula della lagena.

Nei Teleostei gli otoliti sono strutture solide con forma caratteristica della specie (Nolf, 1985), del genere (Gaemers, 1984) e del determinato tipo di organo otolitico all'interno del labirinto.



Tessuto membranoso in un pesce Osteariofise. La parte anteriore del pesce è a sinistra del disegno, quella dorsale è in alto: Lap: lapillo; Utr: utricolo; Sac: sacculo; Sag: sagitta; Lag: lagena; Ast: asterisco.

Sono presenti tre tipi di otoliti:

sagitta: localizzata nel sacco. E' solitamente compressa lateralmente ed ha forma ellittica, anche se varia considerevolmente in base alla specie. Nei pesci non-Ostariofisi la sagitta è l'otolite più grande (Retzius, 1881; Frisch, 1936; Werner, 1960) e, generalmente, viene usato per la determinazione dell'età dell'animale. Nei pesci Ostariofisi, invece, è molto piccola e fragile.

lapillo: posizionato nell'utricolo. E' il più dorsale degli otoliti, spesso assume la forma di una sfera schiacciata ed è più piccolo della sagitta.

asterisco: situato nella lagena. Nei pesci non Ostariofisi è piccolo ed ha la forma di un quarto di luna, mentre nei pesci Ostariofisi è circolare e compresso lateralmente ed è considerevolmente più grande della sagitta; infatti, in questi pesci viene preferito alla sagitta per la determinazione dell'età.

Funzione del labirinto

Nei pesci ossei il labirinto membranoso è deputato a svolgere varie funzioni. In particolare i canali semicircolari e le ampolle associate regolano il tono muscolare e rilevano l'accelerazione angolare, mentre gli organi otolitici svolgono la funzione vestibolare e uditiva (Platt e Popper, 1981; Platt, 1983).

Recentemente si è visto che gli organi otolitici possono avere funzioni differenti in specie diverse ed in molte di esse ciascun organo ha sia la funzione vestibolare che uditiva (Popper e Fay, 1993; Popper e Platt, 1993).

Il ruolo specifico svolto da ogni singolo otolite non è totalmente noto (Popper e Lu, 2000), anche se alcuni Autori (Platt, 1983; Popper, 1983) riportano che l'utricolo partecipa alla percezione vestibolare insieme ai canali semicircolari, mentre il sacco e la lagena sono deputati alla ricezione dei suoni.

L'otolite possiede peso specifico maggiore dell'endolinfa in cui è immerso ed a causa della spinta gravistatica tende a posizionarsi al livello più basso possibile. In questo modo scivola lungo l'epitelio sensoriale ogni volta che questo si discosta dalla posizione perfettamente orizzontale. Questo spostamento viene percepito da cellule sensoriali della macula generando un impulso nervoso che permette di stabilire l'orientamento e la posizione del capo.

Le cellule capellute sono responsabili anche della trasduzione dello stimolo acustico in nervoso. Quando si deformano, a causa del movimento dell'otolite con cui sono strettamente a contatto, provocano la stimolazione dell'ottavo nervo cranico (Roberts et Al., 1988). Il fascio delle ciglia è morfologicamente polarizzato e quindi la deformazione nelle possibili direzioni provoca differenti livelli di stimolazione nervosa (Popper e Lu, 2000).

I suoni possono raggiungere l'orecchio tramite due vie: direttamente, avendo il corpo del pesce la stessa densità dell'acqua trasmette il suono con la stessa intensità, mentre l'otolite, essendo più denso, lo trasmette con diversa intensità e quindi può stimolare l'epitelio ciliato; oppure indirettamente tramite la vibrazione delle pareti della vescica natatoria, ciò è possibile solo se la vescica natatoria e l'orecchio interno sono molto vicini o vi è una connessione diretta tramite gli ossicini di Weber (Fay e Popper, 1974; 1975).

I pesci che percepiscono il suono per via diretta, sono detti uditori generalisti e riescono a percepire una banda di frequenze più stretta, presentando una minor sensibilità rispetto agli uditori specialisti (Fay, 1988). Quest'ultimi invece sono in grado di recepire suoni con frequenza oltre i 1000 Hz, con una buona sensibilità sotto i 1000-1500 Hz (Popper e Lu, 2000). Entrambe le categorie sono in grado di sentire gli infrasuoni e segnali a bassa frequenza (35 Hz) (Karlsen, 1992; Knudsen et Al., 1994).

BIOINDICATORI

Il biomonitoraggio e cioè il monitoraggio dell'inquinamento mediante l'impiego di organismi viventi si basa sulla valutazione delle variazioni provocate dagli inquinanti sugli organismi. Tali variazioni si manifestano fondamentalmente in tre modi:

- Accumulo delle sostanze inquinanti
- Modificazioni morfologiche degli organismi
- Modificazioni nella composizione delle comunità animali e/o vegetali.

Generalmente la stima dei gradi di inquinamento di un dato ambiente tramite bioindicatori riflette la situazione generale media, in altre parole si riferisce a un periodo piuttosto ampio e quindi più fedele e completo rispetto a quello derivante da misurazioni puntiformi sia nello spazio che nel tempo. I bioindicatori possono essere considerati delle centraline permanenti. La scelta di un organismo, o di un gruppo di organismi adatti ad essere usati per il biomonitoraggio ambientale dipende da numerosi fattori, tra cui i principali sono:

- Accertata sensibilità all'inquinamento
- Scarsa mobilità
- Presenza diffusa sul territorio da esaminare
- Eventuale capacità di accumulo di sostanze inquinanti

Inoltre è da tenere presente che diversi organismi sono più sensibili a certi tipi di inquinanti rispetto ad altri, e quindi a volte la scelta dipende anche dal tipo di inquinante che si vuole rilevare.

Gli otoliti come bioindicatori

La crescita degli otoliti è un complesso fenomeno che coinvolge sia fattori endogeni che esogeni, per questo motivo oltre ad essere utilizzati per determinare l'età dei pesci, hanno assunto, da circa una trentina d'anni, importanza come indicatori della qualità dell'ambiente in cui si sviluppa e vive il pesce.

L'utilizzo di queste strutture si basa sul fatto che sono metabolicamente inerti e si accrescono continuamente per deposizioni successive di materiale durante tutta la vita dell'organismo. Rispetto alla maggior parte dei tessuti corporei, che presentano meccanismi di controllo e di rigenerazione, gli otoliti non hanno mai mostrato fenomeni di riassorbimento. Numerosissimi studi sulla composizione chimica elementare di questi

organi hanno evidenziato che le caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente influenzano il tasso di incorporazione degli elementi in tracce depositati sulla superficie dell'otolite (Campana, 1999).

Attraverso lo studio della composizione chimica possono venire utilizzati per ricostruire la storia metabolica di un organismo, e infatti trovano applicazione nella ricostruzione delle caratteristiche ambientali, soprattutto delle variazioni di temperatura e pH dell'ambiente acquatico (Patterson, et Al., 1993; Gauldie et Al., 1980; Ratke, 1989, Ratke e Morales-Nin, 1989), nella rilevazione di specie anadrome (Secor, 1992), nella determinazione di rotte migratorie (Thresher et Al., 1994), nell'identificazione degli stock (Edmonds et Al., 1989), come indicatori del tasso metabolico (Schwarcz et Al., 1998) e anche per studi di conferma dell'età (Kalish, 1993).

Elementi come il sodio, il potassio, lo zolfo, il fosforo e il cloro sono probabilmente soggetti a una forte regolazione fisiologica e quindi non riflettono la composizione dell'ambiente fisico e quindi vengono utilizzati solo per studi di rilevamento o identificazione degli stock (Thresher et Al., 1994; Proctor et Al., 1995). Elementi quali lo stronzio, il bario, il manganese, il ferro e il piombo (e probabilmente il litio, il magnesio, il rame e il nichel) vengono incorporati in misura diversa in relazione alle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente e in particolare della temperatura (Fowler et Al., 1995; Farrell e Campana 1996; Dove e Kingsford, 1998).

Spesso per studi di caratterizzazione ambientale vengono studiati gli isotopi dello stronzio (Kennedy et Al., 1997), dell'ossigeno (Devereux, 1967; Thorrold et Al., 1997) e del carbonio (Kalish, 1991; Iacumin et Al., 1992; Schwarcz et Al., 1998; Thorrold et Al., 1997). Infatti gli otoliti vengono depositati in equilibrio isotopico con quello dell'ambiente acquatico. Le composizioni stabili isotopiche sono misurate come rapporto tra isotopi pesanti e leggeri. Differenti masse di acqua possono variare nella composizione isotopica e la differenza è si riflette negli otoliti.

Gli organismi acquatici inoltre presentano la capacità di bioconcentrare i metalli pesanti, particolarmente interessante è risultato rilevare la loro presenza attraverso la deposizione negli otoliti che sono strutture metabolicamente inerti (Gauldie e Nathan, 1977; Papadopoulou et Al., 1980; Grady et Al., 1989). Gli studi finora effettuati hanno permesso di notare che l'accumulo non avviene costantemente durante la vita del pesce, ma vi è un maggior accumulo nelle prime fasi della vita del pesce, subito dopo il riassorbimento del sacco vitellino e quindi nella zona nucleare (Gauldie e Nathan, 1977; Grady et Al., 1989; Brothers et Al., 1976).

Molte applicazioni di queste metodologie non hanno ancora raggiunto il loro massimo potenziale, i progressi fatti negli ultimi anni sono indubbiamente dovuti a miglioramenti nella strumentazione, anche se nello studio degli otoliti come bioindicatori sono stati poco studiati alcuni fattori quali ad esempio l'influenza che esercitano le proteine dell'otolite nell'incorporazione degli elementi in tracce.

FIUME ISONZO

Il fiume Isonzo ha origine da alcune sorgenti poste in Slovenia che scaturiscono a quota 940 m dal versante Sud-orientale fra il monte Gialuz e Cima Moistrocca. Nei pressi di S. Lucia riceve l'apporto del torrente Idrija, caratterizzato normalmente da una portata media di 30 mc/sec, e dopo un percorso tortuoso esce in pianura a monte di Gorizia. Il fiume si allarga quindi in un ampio alveo ghiaioso molto permeabile che assorbe buona parte dell'acqua.

Presso Savogna nell'Isonzo confluisce il torrente Vipacco. Quest'ultimo si origina in territorio sloveno da ampie risorgive carsiche e scorre su alluvioni ghiaiose o flysch privo di infiltrazioni.

A Sud di Casseglia l'alveo isontino appare frequentemente quasi asciutto, a causa delle perdite naturali di subalvea e delle sottrazioni per scopi irrigui, anche dopo la confluenza del torrente Torre. Nei chilometri immediatamente a valle, attraversando la zona delle risorgive, recupera una parte delle acque (Mosetti, 1983).

Presso S. Canziano ha inizio il grande apparato deltizio, costituito da vari rami di cui solo alcuni sono attualmente attivi (Valessi, 1964).

All'Isonzo si attribuisce un bacino di ben 3300 Km² sulla sezione di Pieris, compresi però i bacini del torrente Torre e del fiume Natisone (Mosetti, 1983).

La portata media si attesta intorno ai 100 mc/s e quella minima intorno ai 25 mc/s. In seguito ai contributi di Torre, Natisone e alle rialimentazioni delle risorgive, alla foce si stima un valore di circa 150 mc/s (Mosetti, 1983).

	E.T.P. (1981-1989)	Regione F.-V. G.(1992)	Stefanini (1970)	ACEGAS (1984)	Massari (1997)
temperatura acqua	10,04	11,848			
materiali in sospensione		17,623			
torbidità		4,445			
durezza	161,2	6,750			
pH	7,99	8,095			
ossigeno	11,14	11,422			12,2
alluminio		87,963			
calcio		41,280	39	42	43
cromo		0,001			
ferro		0,064			
magnesio		6,810	7	7,3	10
manganese		0,018			
nicel		0,001			

	E.T.P. (1981-1989)	Regione F.-V. G.(1992)	Stefanini (1970)	ACEGAS (1984)	Massari (1997)
piombo		0,001			
potassio		0,400	1,3	0,6	
rame		0,003			
sodio		0,900	3	1,5	
stronzio		0,105			
zinco		0,008			
carbonati					173
cloruri		65,611			
solforati		18,774		8	7
solfiti			0,3	1,4	3,2
fluoruri		0,040			
fosforo		0,049			
conducibilità	258,83	230,000			

E.T.P.: da Agnoletti et Al. (1984a; 1984b; 1985a; 1985b; 1987; 1989; 1990); Stefanini (1970) e ACEGAS (1984) da Mosetti e Mosetti (1997).

FIUME NATISONE

Il fiume Natisone nasce col rio Bianco dalle falde sudorientali del monte Maggiore. Il corso d'acqua, al principio nettamente torrentizio, scorre in valli profondamente incise, in territori prevalentemente marnosi, ma qua e là con la presenza di calcari.

Nato in territorio italiano dopo qualche chilometro il Natisone passa in territorio sloveno e vi scorre, con frequenti cambiamenti di direzione, fino alla sella di Caporetto ove piega verso Sud, passando per la gola di Stupizza e ritornando in territorio italiano.

Dalla zona di Stupizza il fiume scorre incassato tra i calcari del monte Matajur a est e del monte Mia a ovest. A Pulfero il Natisone è un modesto corso d'acqua, più a valle riceve maggiori contributi specie dalla riva sinistra dove il bacino si allarga sulla vasta zona arenacea (flysch) di S. Pietro al Natisone. Da questa zona riceve grossi affluenti in media abbastanza ricchi d'acqua quale il sistema Alberone-Erbezzo e vari altri rami tutti confluenti prima di Cividale.

Giunto a Cividale si infossa in una forra e scorre su un letto scavato nell'arenaria di emersioni di flysch (Mosetti, 1983).

Nei periodi di magra fluviale eccessiva o di siccità il Natisone perde le sue acque, già all'altezza di Cividale; spesso però l'acqua riesce a giungere pressappoco fino a Manzano, e solamente nelle piene fluviali alla confluenza con il torrente Torre. Le acque disperse nel sottosuolo conserverebbero una certa individualità e presso Aiello vi sarebbe un forte e distinto flusso sotterraneo nelle alluvioni, in direzione del fiume Natissa o delle sue risorgive. La assonanza tra Natisone-Natissa potrebbe trovare questa giustificazione (Mosetti e Mosetti, 1997).

Il fiume Natisone presenta un bacino di 286 Km² fino a Cividale, 322 fino a Trivignano con massime piene di 1600 mc/sec (Foramitti, 1973).

	E.T.P. 1981-1989	Regione F.-V. G. (1992)	Stefanini (1970)	ACEGAS (1984)	Massari (1997)
Temperatura acqua	11,9	11,18			
Materiali sedimentabili		0,05			
Materiali in sospensione		0,92			
pH	7,99	8,17			
ossigeno	11,43	10,71			10,9
zinco		0,02			
magnesio			3,4	5,3	5,1

	E.T.P. 1981-1989	Regione F.-V. G. (1992)	Stefanini (1970)	ACEGAS (1984)	Massari (1997)
calcio			45	47	51
sodio			2,5	2,1	
potassio			1,3	0,80	
carbonati					163
cloruri		2,16			2,6
solforati		7,85		7,00	7
solfiti			0,7	2,10	1,9
conducibilità	252,25	262,22			
durezza	159,18				

E.T.P.: da Agnoletti et Al. (1984a; 1984b; 1985a; 1985b; 1987; 1989; 1990); Stefanini (1970) e ACEGAS (1984) da Mosetti e Mosetti (1997).

MATERIALI E METODI

Gli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus* sono stati pescati nell'asta principale del fiume Isonzo (in località Sagrado), nel fiume Natisone (in località Case nel comune di Manzano), lungo tutto il corso del Canale dei Dottori che prende le acque dal fiume Isonzo in località Sagrado e lungo tutto il corso della roggia di Manzano che prende le acque del fiume Natisone in località Case.

I siti di campionamento sono stati scelti in base alle caratteristiche idrologiche dei due fiumi, e dal fatto che le popolazioni di questa specie ittica risultano isolate tra loro, pur essendo la popolazione del fiume Natisone originata da esemplari provenienti dal fiume Isonzo.

I campioni sono stati catturati tramite utilizzo di un elettrostorditore ad impulsi, con potenza massima di 4000 Watt.

Sui campioni provenienti dal fiume Natisone e dal fiume Isonzo sono state eseguite le misure della lunghezza totale al millimetro ed è stato misurato il peso in grammi.

Successivamente in laboratorio è stato determinato il sesso degli esemplari mediante schiacciamento della gonade e successiva analisi al microscopio.

Sui campioni provenienti dalle asciutte del canale dei Dottori e dalla roggia di Manzano è stata effettuata unicamente la misura della lunghezza totale.

Sono stati estratti tutti i tre tipi di otoliti tramite sezione sagittale del cranio; gli otoliti sono stati lavati accuratamente in acqua MilliQ, riposti a secco in una provetta eppendorf e conservati in congelatore a -20°C .

Gli otoliti estratti dagli esemplari provenienti dalle asciutte del Canale dei Dottori e dalla Roggia di Manzano sono stati utilizzati per la determinazione della frazione proteica, tutti gli altri sono stati impiegati per la determinazione dell'età degli esemplari, per le analisi cristallografiche, morfologiche, morfometriche e per la determinazione della componente microelementare.

Determinazione dell'età

L'età è stata determinata tramite la lettura dei lapilli. Poiché non è stato possibile conteggiare gli annuli per trasparenza al microscopio ottico, si è utilizzata la tecnica proposta da Deelder (1981) che consiste nell'ottenere una sezione di 0,2 mm lungo l'asse longitudinale passante per il nucleo. Il lapillo viene spezzato lungo l'asse longitudinale con

l'ausilio di pinzette. La parte che contiene il nucleo viene levigata manualmente con carta abrasiva (di grana 400) ad acqua. La parte levigata viene così incollata a un vetrino porta oggetti. Successivamente si opera sulla parte non levigata sempre con carta abrasiva ad acqua fino a ottenere una sezione sottile. Gli otoliti così preparati sono stati osservati per trasparenza al microscopio ottico utilizzando come chiarificatore olio di cedro.

Analisi cristallografica

E' stata determinata la mineralogia delle sagitte, dei lapilli e degli asterischi.

Lo strumento utilizzato è il diffrattometro per polveri SIEMENS D500 (radiazione $\text{CuK}\alpha$ a 40 kV e 20 mA), in uso presso il Dipartimento di Scienze della Terra dell'Università degli Studi di Trieste.

Il portacampione, nel quale sono stati polverizzati gli otoliti, è posto in posizione perpendicolare rispetto ad un cerchio goniometrico, su di un supporto che si trova al centro del cerchio stesso. Sul bordo del cerchio stanno sia la sorgente dei Raggi X, in posizione fissa, sia il contatore che invece è in grado di ruotare attorno all'asse del goniometro. La velocità angolare del contatore è doppia rispetto a quella del portacampione, cosicché se questo ruota di un angolo pari a θ , il rilevatore di raggi diffratti ruota di un angolo pari a 2θ . E' possibile, in tal modo, raccogliere i raggi diffratti dal nostro campione facendo ruotare il contatore in modo continuo da 25 fino a valori prefissati (nel nostro caso fino a $2\theta=32^\circ$). Contemporaneamente, e con velocità pari a metà di quella del contatore, il portacampione ruota dalla posizione di 0° verso valori angolari che sono, in ogni istante, uguali alla metà di quelli relativi al contatore. Il tempo di scansione considerato è stato di 2 secondi, lo step di $0,1^\circ$.

L'analisi diffrattometrica così effettuata consente di individuare le fasi mineralogiche presenti nei campioni, attraverso lo studio degli effetti di diffrazione dei Raggi X da parte dei cristalli presenti nei campioni. I Raggi X emessi dalla sorgente arrivano sul campione, i cui granuli, orientati casualmente, emettono dei raggi diffratti rispetto ad un angolo 2θ , cosicché i piani reticolari soddisfano la legge di Bragg:

$$2 d \sin \theta = \lambda$$

dove:

λ = lunghezza d'onda del raggio incidente

θ = angolo di riflessione uguale all'angolo di incidenza

d = distanza interplanare

I raggi diffratti vengono raccolti dall'apposito contatore, che li trasforma in impulsi elettrici, dopo averli amplificati. In base a questi impulsi, vengono elaborati da un calcolatore dei diffrattogrammi, la cui analisi dei picchi più intensi fornisce un'indicazione sulla presenza dei minerali all'interno della polvere considerata.

Analisi morfologica

Per l'analisi al microscopio elettronico a scansione, i campioni sono stati preparati secondo varie modalità a seconda se si voleva far risaltare la componente organica o carbonatica.

Gli otoliti sono stati dapprima limati, utilizzando carta abrasiva ad acqua, in modo da ottenere una sezione passante nei pressi del centro dell'otolite stesso. Sono state effettuate sezioni sagittali (lungo l'asse antero-posteriore), trasversali (asse dorso-ventrale) e frontali (perpendicolare alle sagittali). Le sezioni così ottenute sono state ulteriormente levigate con della polvere abrasiva ad acqua in modo da eliminare le più piccole gibbosità. Successivamente le parti levigate sono state appoggiate su dei vetrini portaoggetti, fissate con della resina termoindurente. La parte non trattata è stata molata fino ad ottenere una sezione sottile passante per il centro dell'otolite ed infine levigata con polvere abrasiva ad acqua.

Le sezioni, utilizzate per lo studio della parte inorganica, sono state brevemente immerse in HCl (0,1 M), sciacquate in acqua MilliQ e lasciate ad asciugare.

Le altre sono state trattate per l'analisi della matrice proteica con l'utilizzo della soluzione proposta da Morales-Nin (1987). Le parti di otolite sono state quindi dapprima immerse per qualche secondo in sodio cacodilato (0, 1 M), quindi tenute per 30 minuti in una soluzione di sodio cacodilato (0,1 M) contenete 2,5 % di gluteraldeide, 2% di paraformaldeide, 4% di cetilpiridinium cloride (CPC). Successivamente sono state immerse in acidotetracetico etilendinitrile (EDTA, pH=7,5) per 5 minuti, e deidratate fino al punto critico. Per disidratarle, sono state passate in alcool 30°, 60°, 90° ed infine in alcool 100°. Ogni passaggio durava circa 20 minuti, tranne l'ultimo passaggio (in alcool 100°), che è durato 40 minuti. Alla fine le sezioni sono state lasciate ad asciugare.

Successivamente, tutte le sezioni così incise sono state montate su apposito sostegno e metallizzate per l'osservazione al SEM.

Analisi morfometrica

Per quanto riguarda l'orientazione degli otoliti è stato adottato il metodo riportato da Gauldie et Al. (1991) e cioè come se essi stessero adagiati sul piano della faccia con il sulcus sotto. Secondo questa nomenclatura è possibile individuare una superficie sulcale e antisulcale, denominate anche faccia interna e esterna da Pannella (1980). La distinzione in otolite destro e sinistro deriva dalla loro posizione rispetto al corpo del pesce con il muso in avanti visto da dietro.

Per la misurazione dei parametri degli otoliti, al fine di considerare un campione sufficientemente rappresentativo e omogeneo della popolazione rilevata (proveniente dal fiume Isonzo), sono stati scelti tre esemplari ogni due centimetri di lunghezza totale.

Gli otoliti dei campioni scelti sono stati essiccati per 24 ore a 60°C e pesati al decimo di milligrammo.

Mediante una telecamera digitale (Color video camera JVC) collegata al microscopio e interfacciata al computer tramite software per l'elaborazione di immagini (Ipwin), calibrata con vetrino micrometrico, sono state acquisite le immagini delle coppie (otolite destro e sinistro) degli asterischi e dei lapilli.

I parametri misurati sono così definiti:

area: superficie visibile osservando l'otolite lungo una direzione perpendicolare alla superficie maggiore;

perimetro: lunghezza della linea che racchiude l'otolite;

minimo raggio: distanza minima tra il bordo dell'oggetto e il centroide;

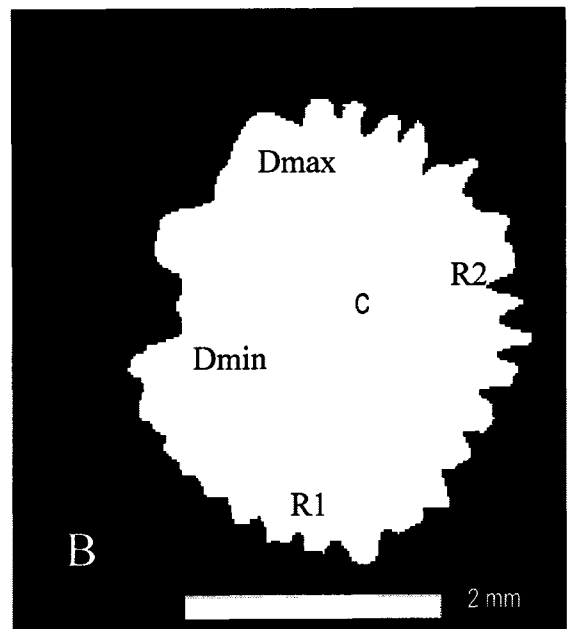
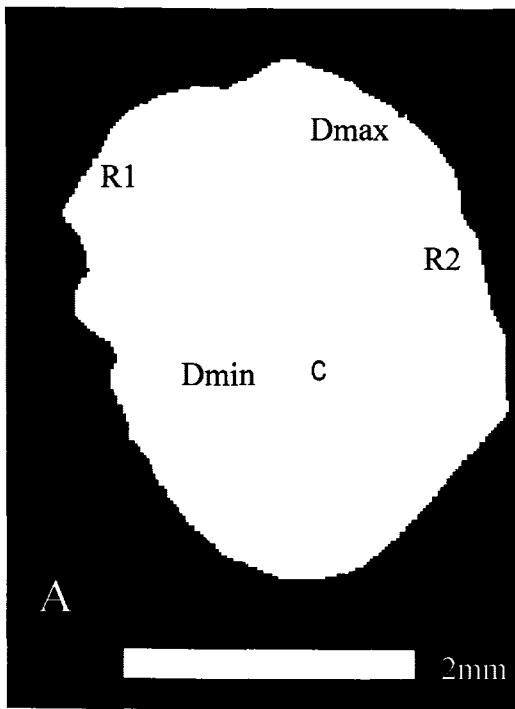
massimo raggio: distanza massima tra il bordo dell'oggetto e il centroide;

minimo diametro: lunghezza della linea più corta che unisce due punti opposti del perimetro dell'otolite e passante per il centroide;

massimo diametro: lunghezza della linea più lunga che unisce due punti opposti del perimetro dell'otolite e passante per il centroide;

rapporto raggi: rapporto tra massimo raggio e minimo raggio;

rotondità: rotondità dell'oggetto determinata con la seguente formula:
(perimetro²)/(4*π*area).



Misure rilevate mediante l'analizzatore di immagini. A sinistra è rappresentato un lapillo (A) a destra un asterisco (B). C: centroide; R1: raggio massimo; R2: raggio minimo; Dmax: diametro massimo; Dmin: diametro minimo.

Analisi microelementare

Nelle sagitte, negli asterischi e nei lapilli sono state determinate le concentrazioni di undici elementi: l'alluminio (Al), il ferro (Fe), il calcio (Ca), il fosforo (P) il magnesio (Mg), il potassio (K), il sodio (Na), lo stronzio (Sr), lo zolfo (S), lo zinco (Zn) ed il rame (Cu).

La determinazione chimica elementare è stata eseguita mediante la tecnica analitica strumentale della spettrometria di emissione con plasma induttivamente accoppiato (ICP-AES) che consente di effettuare un numero elevato di determinazioni di diversi elementi simultaneamente dando risultati analitici affidabili su un'ampia gamma di concentrazioni. Tale tecnica analitica presenta caratteristiche di elevata sensibilità, consentendo determinazioni di elementi a concentrazione anche dell'ordine del ppm, seppure vi sia una fase preparatoria del metodo e dello strumento piuttosto laboriosa: è, infatti, necessario individuare quell'insieme di parametri strumentali (flusso dell'argon, lunghezze d'onda, ecc.) e chimici (tipo di reagenti, loro grado di purezza, ecc.) che consentono di ottimizzare la determinazione analitica. Benché la strumentazione consenta la determinazione di molti elementi, previa opportuna preparazione del campione, vi sono dei limiti obiettivi, determinati soprattutto dall'eccessiva diluizione dell'analita.

Lo strumento ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy), opera in emissione atomica/ionica, che consiste nell'emissione d'onde elettromagnetiche da parte di atomi/ioni che sono stati eccitati. Dalla misura della lunghezza d'onda ed intensità delle radiazioni emesse, si può risalire all'elemento che le ha generate ed alla sua concentrazione

Con la tecnica ICP-AES, che impiega una sorgente a plasma, si possono raggiungere temperature massime dell'ordine dei 10000 K, il che determina un notevole aumento delle popolazioni nei livelli eccitati, con conseguente implementazione delle possibilità analitiche della tecnica spettroscopica d'emissione.

Il plasma, un gas elettricamente neutro, ma altamente ionizzato, presenta molte caratteristiche vantaggiose per l'analisi quali: un'elevata temperatura, la possibilità di operare in atmosfera inerte (argon), buona stabilità ottica, alta riproducibilità dei processi d'eccitazione e ionizzazione, un eccellente rapporto segnale/disturbo. Infine, il plasma è molto sottile e quindi, rispetto a qualsiasi altra sorgente, minimizza i fenomeni di autoassorbimento.

Grazie alle elevate temperature d'esercizio, sono ridotte le interferenze dovute all'effetto matrice; inoltre la ionizzazione non crea particolari problemi, perché in genere gli elementi sono presenti nel plasma in forma ionizzata, come ioni monovalenti.

Per quanto riguarda le possibilità analitiche quantitative, la spettrofotometria al plasma consente limiti di rilevabilità analoghi a quelli della spettrofotometria d'assorbimento atomico *flameless*, con fornello di grafite (GFAAS), la tecnica attualmente più impiegata nella determinazione microanalitica di metalli.

Esistono diversi modi per generare un plasma, ma quello di gran lunga più impiegato in questi strumenti è il cosiddetto ICP, Inductively Coupled Plasma (plasma ad accoppiamento induttivo). Esso viene ottenuto innescando la formazione di ioni in un flusso d'argon con una scarica elettrica ed accelerando gli ioni mediante un campo magnetico oscillante, generato da una bobina di induzione a radiofrequenza.

Il continuo apporto di energia da parte della bobina consente di mantenere il plasma e di raggiungere temperature d'esercizio di circa 7000 K, nella zona di eccitazione-osservazione.

Temperature così alte vengono raggiunte grazie al trasferimento di energia dalla bobina di induzione alle particelle cariche presenti nel gas ionizzato. Tale energia viene assorbita dalle particelle sotto forma di energia cinetica e rilasciata come calore che si sviluppa a causa degli urti e degli attriti tra le particelle.

Il flusso degli ioni accelerati è soggetto ad attriti, che provocano un forte riscaldamento locale, in prossimità del plasma, per effetto Joule. Inoltre, gli urti di particelle cariche con atomi di argon costituiscono un'ulteriore fonte di ionizzazione del gas: si ha così un maggior numero di particelle cariche soggette al trasferimento d'energia da parte della bobina d'induzione. Inizia, così, un processo di ionizzazioni a catena che genera il plasma.

Il plasma, una volta avviato, viene mantenuto da un continuo apporto d'energia da parte della bobina d'induzione. A regime il plasma assume la caratteristica forma a fiammella, apparentemente immobile, lunga qualche centimetro ed alta un paio di centimetri, la quale emette una luce bianca brillante molto intensa (per osservarla vi è un particolare vetro oscurato).

Il campione è immesso nel plasma come aerosol. Il sistema di nebulizzazione adottato si basa sull'effetto Venturi.

Nel plasma si possono individuare tre zone in base alle temperature raggiunte:

zona cava in cui arriva il campione (circa 7000 K).

zona del plasma concentrato (circa 10000 K).

zona d'eccitazione-osservazione (circa 6000 K); le radiazioni emesse in questa zona escono attraverso una fenditura circolare del diametro di qualche decimo di millimetro, vengono focalizzate da una lente ed inviate alla fenditura d'ingresso di un monocromatore.

Questo spettrometro impiega due monocromatori, con reticoli di riflessione piani e concavi,

che con opportuni accorgimenti consentono l'analisi simultanea di vari elementi.

In ogni strumento, sia il sistema d'elaborazione del segnale che quello della presentazione dei dati sono computerizzati, come, d'altronde, anche la gestione ed ottimizzazione delle varie fasi operative.

Preparazione dei campioni per l'analisi all' ICP-AES

Gli otoliti, di diversa età, sesso e luogo di campionamento vengono trattati separatamente (dividendoli in vari gruppi) con 0.5 mL di acido nitrico superpuro, a circa 70-80 °C fino a quasi completa secchezza e il trattamento viene ripetuto 2 volte. Al termine del secondo trattamento si riprende con acqua MilliQ e si porta a volume di 25 mL aggiungendo 0.1 mL di acido nitrico, la soluzione deve risultare limpida. Le soluzioni sono così pronte per l'analisi in ICP-AES e si conservano in frigorifero fino al momento della misura.

La quantità di campione iniziale dipende da molti fattori (età, numero di pesci, ecc.) e varia da 40 a 600 mg.

Prima dell'analisi, a causa delle interferenze dovute alla presenza del Ca in concentrazioni molto elevate, alcuni campioni sono stati adeguatamente diluiti.

Reattivi

Acqua ultra pura MilliQ di grado reagente ottenuta da un sistema MilliQ₁₈₅ Plus (Millipore – USA).

1. Soluzioni standard degli elementi, per spettroscopia SPECTRASCAN[®]: Na, Al, P, S, K, Fe, Zn, e Sr in concentrazione 1000.0 ± 0.5 ppm (a 20°C) della TEKNOLAB A/S.
2. Soluzioni standard degli elementi per spettroscopia SPECTRASCAN[®]: Ca e Mg 10000 ± 5 ppm (a 20°C) della TEKNOLAB A/S.
3. Acido Nitrico superpuro, reagente RS della Carlo Erba (code n. 408112).
4. Soluzione “matrice”: 1000 ppm di Ca con 0.5 mL di acido nitrico concentrato.
5. SOLUZIONE STANDARD 1: contenente Na (5 ppm), Al (25 ppb), P (2.5 ppm), S (1.25 ppm), K (1.25 ppm), Fe (25 ppb), Zn (75 ppb), Sr (1.25 ppm) e Mg (1.25 ppm); a questa soluzione, prima di portare a volume finale con la soluzione matrice, si aggiungono 0.5 mL di acido nitrico concentrato.
6. SOLUZIONE STANDARD 2: contenente gli stessi elementi della soluzione standard 1, ma con concentrazioni doppie; a questa soluzione, prima di portare a volume finale con la soluzione matrice, si aggiungono 0.5 mL di acido nitrico concentrato.
7. SOLUZIONE STANDARD 3: contenente gli stessi elementi della soluzione standard 1,

ma con concentrazioni quadruple; a questa soluzione, prima di portare a volume finale con la soluzione matrice, si aggiungono 0.5 mL di acido nitrico concentrato.

8. SOLUZIONE STANDARD "0": In un matraccio a parte si preleva la soluzione matrice che verrà successivamente impiegata nella misura come standard "0".

9. Soluzione al 5% (circa) di acido nitrico in acqua MilliQ per il lavaggio dello strumento.

Procedimento

L'effetto matrice ha una rilevanza notevole per la bontà dei risultati analitici. Questo problema è tipico nelle analisi di campioni reali, quando si impiega la metodica della retta di calibrazione che è la procedura più usata per la determinazione quantitativa.

Per ogni elemento si preparano 4 soluzioni standard, mediante diluizione di soluzioni concentrate degli elementi, specifiche per analisi ICP-AES; si prepara inoltre una soluzione contenente la sola matrice quale zero della retta di calibrazione e costituita dagli elementi maggiori presenti nel campione reale (determinati in precedenza con un'analisi semiquantitativa: in questo caso solo il calcio).

Lo strumento ricava la retta di calibrazione impiegando le tre soluzioni standard e la soluzione della matrice. Con una procedura di regressione lineare traccia la miglior retta di calibrazione e fornisce ulteriori informazioni (ad esempio il Detection Limit e il coefficiente di regressione). Da questa retta si ricavano successivamente le concentrazioni delle soluzioni incognite. I risultati ottenuti in $\mu\text{g/l}$ sono stati trasformati, in base al volume della soluzione e al peso dell'otolite in esso disciolto, in $\mu\text{g/g}$.

Analisi componente organica

L'analisi della componente organica è stata effettuata utilizzando diverse metodologie. Infatti dapprima si è eliminata la componente carbonatica dell'otolite. Dalla soluzione sono state effettuate delle cromatografie HPLC e infine per determinare la frazione proteica sono state effettuate corse elettroforetiche e analisi spettrometriche.

Per eliminare la componente carbonatica dell'otolite il campione di otoliti è stato trattato con una soluzione di ipoclorito di sodio all' 1% per 24 ore. Lo scopo di tale trattamento è la rimozione della membrana organica esterna presente negli otoliti. La rimozione avviene attraverso un processo ossidativo.

Dopo il trattamento in ipoclorito gli otoliti sono stati lavati diverse volte in H₂O e lasciati asciugare all'aria. Il campione secco è stato macinato in mortaio di agata. La macinazione avviene molto lentamente in modo da non riscaldare troppo il campione per attrito.

La polvere ottenuta viene dispersa in un volume di circa 10 mL di H₂O. La miscela eterogenea che si ottiene viene posta all'interno di un tubo da dialisi.

Il tubo da dialisi, con la soluzione contenente la polvere di otoliti, viene poi posto in una soluzione contenente una resina scambiatrice solfonica, Dowex 50W, la quale scambia protoni con gli ioni calcio che derivano dalla dissoluzione della parte minerale degli otoliti.

Il processo di dissoluzione della parte minerale richiede un periodo di tempo che spazia tra i 4 e i 5 giorni per 0.5 g di materiale. Durante tale processo la soluzione in cui è stata dispersa la resina viene cambiata quotidianamente e così facendo il pH si stabilizza in un intervallo tra 4 e 5. Alla fine del processo di dissoluzione all'interno del tubo di dialisi rimane il materiale organico, il quale viene separato per centrifugazione nella sua componente solubile, la matrice organica solubile, e la sua componente insolubile. Solo la matrice organica solubile viene utilizzata negli studi successivi.

La soluzione così ottenuta è stata conservata liofilizzata. Successivamente i campioni vengono risospesi in acqua milliQ, filtrati attraverso dei filtri da 0.45 µm (Ultrafree MC - Millipore) ed iniettati direttamente nel sistema cromatografico.

Configurazione del sistema cromatografico:

- 1) sistema di degasaggio mediante gorgogliamento di elio;
- 2) pompa binaria Perkin-Elmer Series 200 LC PUMP;
- 3) colonna cromatografica Vydac Protein C4, 2.1 mm x 150 mm;
- 1) rilevatore UV Perkin-Elmer 785A UV/VIS DETECTOR;

I solventi utilizzati sono:

Solvente A: Acqua 0.1 % TFA (acido tri-fluoro-acetico)

Solvente B: 95% CH₃CN - 5% H₂O - 0.1% TFA

Gradiente 1:

Periodo	Durata (min)	Flusso (ml/min)	% Solvente A	% Solvente B	Condizione
1	1	0.15	92	8	isocratica
2	7	0.15	86	14	variazione lineare
3	35	0.15	76	24	variazione lineare
4	5	0.15	0	100	variazione lineare
5	10	0.15	0	100	isocratica

La lettura spettrofotometrica viene effettuata a 220 nm.

Le corse elettroforetiche sono state effettuate con gel di poliacrilamide in SDS e gel di poliacrilamide in SDS - minigel

Analisi elettroforetica su gel di poliacrilamide in SDS

Il tipo di gel utilizzato è di tipo discontinuo:

stacking gel - gel di poliacrilamide (T=7.5%, C=2.6%) in Tris/HCl 0.075 M, SDS 0.1%, 0.7 mg/ml persolfato d'ammonio pH 8.8 - 10 ml fatti polimerizzare per aggiunta di 7 μ l di TEMED.

running gel - gel di poliacrilamide (T=15%, C=1.3%) in Tris/HCl 0.63 M, Tricina 0.08 M, SDS 0.1%, 2 mg/ml persolfato d'ammonio, pH \cong 8.65 - 31 ml fatti polimerizzare per aggiunta di 60 μ l di TEMED.

spessore del gel: 0.75 mm - lunghezza: *stacking* gel 1.5 cm / *running* gel 22.5 cm - larghezza 14 cm.

Il solvente bagno con il quale viene condotta la corsa elettroforetica è una soluzione Tricina 0.025 M, SDS 0.1% portata a pH 8.1 con Tris base.

La corsa elettroforetica si divide in due parti:

accumulo - 50 V per 1 ora;

separazione - 200 V per 16-17 h.

I campioni per essere analizzati devono essere resi 1% SDS, 15% saccarosio, 0.075 M Tris/HCl pH 8.8.

Analisi elettroforetica su gel di poliacrilamide in SDS - minigel

Il tipo di gel utilizzato è di tipo discontinuo:

stacking gel: gel di poliacrilamide (T=7.5%, C=3.3%) in Tris/HCl 0.13 M, SDS 0.1%, 1 mg/ml persolfato d'ammonio pH 6.8 - 1 ml fatti polimerizzare per aggiunta di 2 μ l di TEMED;

running gel: gel di poliacrilamide (T= 15%, C=3.3%) in Tris/HCl 0.38 M, SDS 0.1%, 1 mg/ml persolfato d'ammonio, pH 8.8 - 10 ml fatti polimerizzare per aggiunta di 4 μ l di TEMED;

spessore del gel: 0.75 mm - lunghezza: *stacking* gel 0.5 cm / *running* gel 8 cm - larghezza 8 cm.

Il solvente bagno con il quale viene condotta la corsa elettroforetica è una soluzione Tricina 0.025 M portata a pH 8.1 con Tris base, SDS 0.1%.

La corsa elettroforetica si divide in due parti:

accumulo - 70 V per 1 ora;

separazione - 120 V per 2 ore circa.

I campioni per essere analizzati devono essere resi 1% SDS, 15% saccarosio, 0.13 M Tris/HCl pH 6.8.

Al termine delle elettforesi, i gel vengono colorati con una soluzione di Blue Coomassie allo 0.05% w/v in metanolo, acqua ed acido acetico, in rapporto 5:4:1. La presenza del metanolo permette di fissare le proteine al gel. La decolorazione viene effettuata dopo un giorno con una soluzione composta da tre parti di acqua e una di metanolo.

Per avere una maggiore sensibilità, si può eseguire una colorazione argentica, trattando il gel nel seguente modo: dopo la decolorazione dal Blue Coomassie, si equilibria il gel in acqua distillata per un giorno, al fine di eliminare il più possibile i solventi organici. Si incuba il gel per circa tre ore in una soluzione costituita da 400 mg di triisopropilnaftalene-sodio-solfonato in 800 ml di acqua distillata; si esegue un lavaggio in acqua e si colora il gel con blu di metilene (20 mg in 800 ml di acqua distillata, per circa un ora e mezza. Si tratta quindi il gel con una soluzione argentica. Si fanno sciogliere 1.5 g di nitrato di argento in 20 ml di acqua distillata; si unisce questa soluzione ad una costituita da 270 ml di acqua distillata, 6 ml di idrossido di sodio 1N e 6 ml di ammoniaca concentrata (al 30%). Dopo mezz'ora, si eseguono alcuni rapidi lavaggi con acqua distillata e si sviluppa il gel tramite una soluzione di 250 mg di acido citrico in 500 ml di acqua e 1 ml di formaldeide al 37%: Quest'ultima ha la funzione di ridurre lo ione argento, legato le proteine ad argento metallico. Si blocca lo sviluppo con la soluzione di fissaggio costituita da etanolo acqua e acido acetico in rapporto 5:4:1 e si lascia il gel fino al giorno dopo in acqua e metanolo (3:1) al 5% di glicerina.

Analisi di spettrometria di massa

Strumentazione:

Spettrometro di massa a singolo quadrupolo PE-SCIEX API1 con interfaccia ionizzante del tipo *Ion-spray*.

Modalità di analisi

a) infusiva:

Il campione proteico viene sciolto in una soluzione acqua/acetonitrile (1:1), 0.1% acido formico e iniettato ad un flusso pari a 1.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ direttamente nello spettrometro tramite una pompa infusiva (Pump 11 - HARVARD).

Parametri d'acquisizione: *step*: 0.1 m/z (precisione nella lettura); *dwell time*: 0.5 ms (tempo speso su ciascun valore m/z); intervallo di scansione: in dipendenza del campione che si analizza; si opera in modalità MCA (lo spettro di massa finale è il risultato della somma di più scansioni).

Software di acquisizione: TUNE 2.0 PE-SCIEX.

Software di elaborazione: MAC SPEC 3.22 PE-SCIEX e BIO MULTIVIEW 1.3.1 PE-SCIEX.

b) LC/MS (in accoppiamento con un sistema cromatografico)

Il sistema cromatografico è quello descritto precedentemente, l'unica alterazione è che all'uscita della colonna cromatografica viene posto un raccordo a T che serve a ripartire il flusso dell'eluente fra il rilevatore UV e lo spettrometro di massa in rapporto circa 1:50. Operando con flussi cromatografici di 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ si ottiene un flusso verso lo spettrometro di massa pari a circa 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ che rientra nei limiti operativi dell'interfaccia ionizzante.

Parametri d'acquisizione:

Analisi estratti proteici mediante PCA: intervallo di scansione: 850-1350 (m/z); *step*: 0.1 m/z; *dwell time* 0.64 ms (corrisponde ad una scansione completa ogni 4 secondi).

Analisi digeriti triptici: intervallo di scansione: 432-2200 (m/z); *step* 0.2 m/z; *dwell time* 0.72 ms (corrisponde ad una scansione completa circa ogni 6 secondi).

Software di acquisizione: RAD 2.5 PE-SCIEX.

Software di elaborazione: MAC SPEC 3.22 PE-SCIEX e BIO MULTIVIEW 1.3.1 PE-SCIEX.

Lo spettrometro prima delle analisi viene calibrato mediante l'analisi sia di una soluzione di PPG (poli-propilenglicole) che di una proteina a peso molecolare noto. La calibrazione viene ritenuta buona se il peso molecolare teorico della proteina standard utilizzata si discosta meno di un 1 Da dal peso molecolare ottenuto sperimentalmente.

Le analisi del tipo LC-MS da noi condotte danno origine a 2 differenti cromatogrammi:

a) Cromatogramma Assorbanza vs Tempo (derivante dalle letture di assorbanza effettuate dal rilevatore UV del sistema cromatografico)

b) Cromatogramma TIC (*Total Ion Count*). In ciascuna scansione che lo spettrometro di massa effettua ad ogni segnale m/z rilevato viene assegnato un valore che corrisponde al numero di ioni che hanno raggiunto il rivelatore in un secondo (cps - conte per secondo) e per ogni scansione viene effettuata la somma di tutte le cps di tutti i rapporti m/z rilevati. Il grafico che riporta in ordinata il valore delle somme relative alle singole scansioni ed in ascissa il numero della scansione stessa (ovvero il tempo dall'inizio dell'analisi in cui essa è stata effettuata) rappresenta un cromatogramma TIC. Da un cromatogramma TIC è possibile selezionare una determinata zona e tramite un *software* ottenere lo spettro di massa medio derivante da tutti gli spettri di massa in essa contenuti; dallo spettro di massa è possibile quindi procedere alla ricostruzione delle masse in esso presenti.

Presso il Dipartimento di Biologia Strutturale dell'Istituto di Scienze Weizmann di Rehovot (Israele) sono state effettuate le analisi per la determinazione della componente aminoacidica nei tre tipi di otolite.

Presso il Dipartimento di Chimica Analitica dell'Università di Bologna, attraverso l'utilizzo di una bilancia termica, sono state determinate le percentuali della frazione organica nei tre tipi di otolite.

ANALISI DEI DATI

Determinazione dell'età

Per la valutazione dell'accrescimento è stata utilizzata l'equazione di von Bertalanffy (1938), che rappresenta il modello specifico per l'accrescimento lineare delle specie ittiche.

L'equazione generale è del tipo:

$$LTA = L_{inf}(1 - e^{-K(t-t_0)})$$

Dove:

LTA= lunghezza totale del pesce

L_{inf}= massima lunghezza media teorica raggiungibile dal pesce

K= coefficiente di crescita

t= età del pesce espressa in anni

t₀= "età" che il pesce avrebbe avuto al tempo zero se fosse cresciuto in accordo con l'equazione suddetta

Nella tabella seguente sono riassunti i dati relativi all'analisi degli otoliti degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*:

età in anni	LTA media in cm
1	12.61
2	15.76
3	20.76
4	27.44
5	30.88
6	37.95
7	40.9
8	41.96
9	44.82
10	47.18
11	50.73
12	51.2
13	50
14	53.6

Sulla base di questi valori risulta la seguente relazione:

$$LTA = 62.78(1 - e^{-0.1338[t+0.3708]})$$

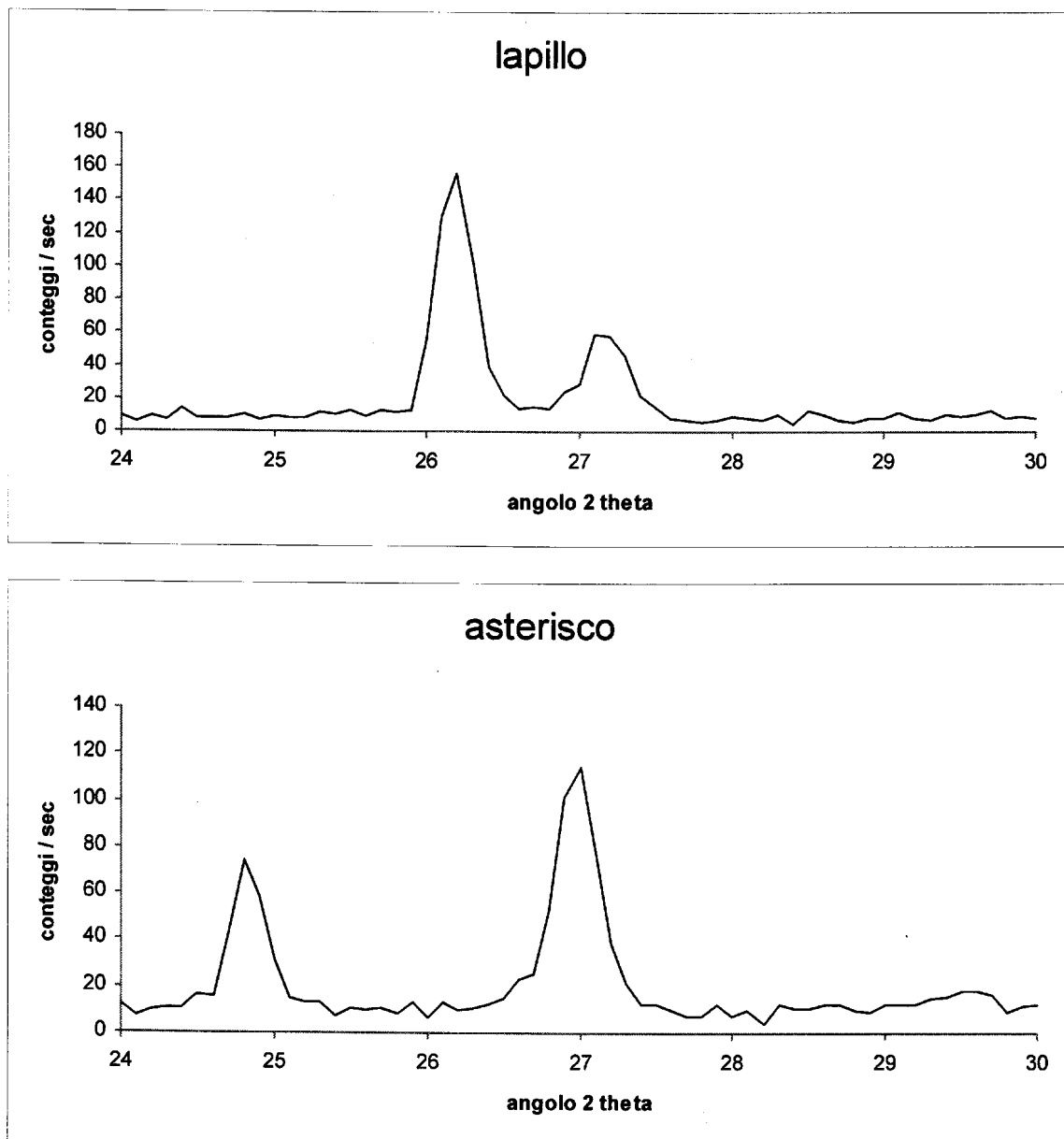
Con un coefficiente di determinazione $r^2=0.98$

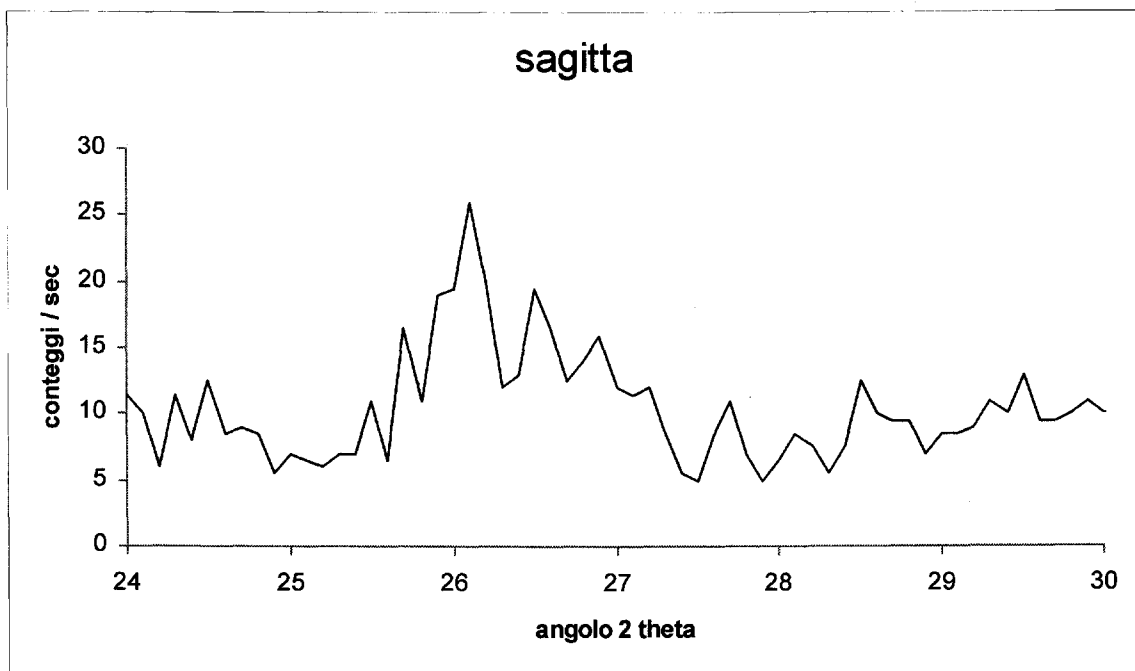
Analisi cristallografica

Dall'analisi della conformazione cristallina si sono potuti individuare i diversi allomorfi in cui si cristallizza il carbonato di calcio. Dalle nostre analisi risulta che nei lapilli e nelle sagitte il carbonato di calcio è sempre presente sottoforma di aragonite, gli asterischi presentano invece la struttura cristallina tipica della vaterite. Non sono stati mai rinvenuti otoliti polimorfici.

Sono riportati (fig. 1) i diffrattogrammi nei tre tipi di otolite. L'aragonite presenta il picco principale a 26.2, la vaterite a 27, mentre la calcite, che in queste strutture non è stata mai rilevata presenta un picco a 29.4.

Fig. 1: diffrattogramma a raggi X





Il diffrattogramma delle sagitte presenta un elevato rumore di fondo a causa dell'esiguità di materiale. Infatti le misurazioni sono state condotte analizzando un otolite alla volta.

Analisi morfologica

Le osservazioni effettuate al microscopio elettronico a scansione sui lapilli, sulle sagitte e sugli asterischi hanno permesso di studiarne la microstruttura.

Questi organi presentano forme molto varie che dipendono sia dalla struttura della capsula otica e del cranio, sia dalla macula che ne regola la crescita (Gauldie, 1988; Lombarte e Morales-Nin, 1995). La forma è responsabile anche della ricezione di precise frequenze di suoni (Gauldie, 1988) e può essere considerata un carattere sistematico essendo sia specie-specifica (Nolf, 1985) che genere-specifica (Gaemers, 1984).

Il lapillo si rinviene nell'utricolo, rispetto alla sagitta e all'asterisco occupa una posizione più dorsale e laterale. Si trova alla stessa altezza della cavità orbitale e ha una collocazione più arretrata.

Il lapillo ha forma rotondeggiante: la faccia mesiale è più appiattita e presenta un innalzamento dall'aspetto globulare nella parte posteriore (foto 1). La faccia laterale è convessa i lati ventrale e dorsale sono regolari, quello anteriore è appuntito e quello posteriore lobato presenta una profonda incisura con grossi fasci cristallini ben evidenti (foto 2).

L'otolite inizia a formarsi come primordium (Morales-Nin, 2000) che costituirà il nucleo e proseguirà nella crescita per deposizione successiva di carbonato e materiale organico (foto

3). La crescita è continua e legata al metabolismo giornaliero del calcio e alla sintesi di aminoacidi, portando alla formazione delle cosiddette unità di crescita giornaliera. Ciascuna unità è costituita da una zona continua o incrementale, depositata durante il periodo attivo di metabolismo del calcio, e una zona discontinua (Pannella, 1971). Si possono notare nella sezione trasversale del lapillo (foto 4) delle zone chiare interposte a zone scure più strette. La zona chiara è costituita principalmente da carbonato di calcio mentre in quella opaca prevale la matrice organica. La differente colorazione è causata dal cambiamento della densità ottica dovuta alla variazione del rapporto carbonato di calcio/proteina, reso più evidente dal trattamento compiuto sulla sezione di lapillo tramite l'utilizzo di HCl che incide maggiormente la zona discontinua.

Molto importante nello studio della microstruttura è la forma cristallina assunta dal carbonato di calcio. Negli otoliti dei pesci il carbonato può cristallizzarsi in quattro modi, sottoforma di calcite, aragonite, vaterite e calcio monoidrato. Queste forme allomorfe presentano comportamenti diversi ad alte temperature e pressioni (Carlson, 1983). L'allomorfo depositato dipende dalla presenza e dalla concentrazione di alcuni aminoacidi (Kitano e Hood, 1965), particolarmente importanti sembrano essere i residui aminoacidici della matrice organica e gli aminoacidi liberi (Weiner et Al., 1983).

Come riportato dall'analisi ai raggi X, i lapilli di *Chondrostoma nasus nasus* hanno la struttura carbonatica nella forma di aragonite. Nella foto 5 è possibile notare questa struttura cristallina che consiste in microcristalli aciculari, con apice rombico, disposti parallelamente all'asse di crescita. I microcristalli di un prisma sono disposti in diversi strati concentrici, che hanno origine dal nucleo e si sviluppano radialmente verso il bordo dell'otolite (foto 6). I microcristalli tendono a crescere lungo lo stesso asse, anche se talvolta si accrescono lungo due diverse direzioni (foto 7). In quest'ultimo caso essi vengono detti "twinned crystals", e sono tipiche formazioni costituite da strutture cristalline di aragonite biogenica. In effetti, una parte di un singolo microcristallo si accresce molto più velocemente dell'altra parte dello stesso microcristallo dando luogo, quindi, a due diversi assi di crescita (foto 8). Questo complesso fenomeno sembra che stabilizzi il cristallo e aumenti il tasso di crescita (Gauldie, 1993b).

Poiché la crescita cristallina non è costante è possibile individuare delle discontinuità nelle quali prevale la componente organica. Nelle sezioni di foto 9 si può osservare che la componente organica consiste di una matrice reticolare, la quale funge da stampo per la cristallizzazione del carbonato di calcio (Degens et Al., 1969; Lowestam, 1981; Ross e Pote, 1984).

Le sagitte sono ubicate nel sacco, occupando la posizione più centrale e ventrale delle tre coppie degli otoliti. Si trovano addossate alla lagena separate dagli asterischi dalle membrane otolitiche.

Le sagitte hanno forma piriforme, di spessore fine. La faccia antisolcale è convessa (foto 10), quella solcale è concava (11). La superficie ventrale presenta un'ala alquanto sviluppata con rostro prominente.

Le sagitte, come precedentemente osservato nei lapilli, sono costituite da aragonite. Analogamente i microcristalli sono aciculari (foto 12), ad apice rombico, con assi di crescita paralleli. Nella sezione sagittale (foto 13) si notano le unità di accrescimento periodiche e regolari disposti in modo concentrico. Le discontinuità si osservano come zone opache che a maggior ingrandimento appaiono come delle interruzioni concentriche nella crescita cristallina (foto 14), che separano le zone incrementali tramite ponti costituiti da sostanze organiche (foto 15). La struttura della matrice organica, come si può osservare nella foto 16, forma un reticolo nel quale sono immersi i cristalli.

Gli asterischi si trovano nella lagena, occupano la posizione più arretrata e più centrale dei tre tipi di otoliti e l'asse più lungo è ortogonale alla sagitta

Gli asterischi presentano forma discoidale con le facce appiattite e il sulcus ben evidente. La forma dei margini è dentellata. Le concrezioni cristalline, ben visibili a livello del sulcus si appiattiscono e si uniformano procedendo verso i margini dell'otolite la cui superficie è liscia (foto 17, 18).

Nel reticolo cristallino degli asterischi il carbonato di calcio è presente sottoforma di vaterite. Questo allomorfo benché in natura sia metastabile, negli otoliti è la forma più comune dopo l'aragonite (Gauldie, 1993b). Le diverse forme di carbonato di calcio sono prodotte da variazioni nella geometria dei cristalli che deriva da differenze nell'impacchettamento degli ioni calcio nel reticolo cristallino (Mckie e Mckie, 1986). Pach et Al. (1990) riportano che nel processo di cristallizzazione la viscosità è importante nella formazione di questo allomorfo.

Nell'asterisco (foto 19) si notano i fasci cristallini disposti radialmente, interrotti trasversalmente da linee di discontinuità profonde tipiche degli otoliti di vaterite (Gauldie, 1993b). Ogni fascio cristallino è costituito da microcristalli paralleli tra loro. Le interruzioni nella crescita sono molto frequenti ed appaiono come una scanalatura che interrompe la sequenza dei microincrementi (sezione trasversale di asterisco; foto 20). Come si può notare dalla foto oltre alle discontinuità periodiche nella crescita, visibili come delle scanalature regolari e continue che seguono il contorno dell'otolite, vi sono delle discontinuità non

periodiche che appaiono come delle scanalature irregolari che interrompono il susseguirsi dei fasci cristallini soltanto in determinate zone.

Queste discontinuità, a differenza delle discontinuità periodiche legate alle variazioni regolari del metabolismo del calcio dovrebbero essere legate a fenomeni esogeni stressanti per il pesce quali scarsità di alimentazione, repentino abbassamento della temperatura, periodo riproduttivo, ecc. (Morales-Nin, 1987). Questo fatto probabilmente è dovuto ad una diminuzione improvvisa della concentrazione di calcio nel plasma; quando questa torna ai livelli ottimali, riprende con lo stesso andamento la crescita cristallina dell'otolite (Mugiya, 1974). I dati di letteratura indicano che la presenza di discontinuità è molto maggiore nelle zone dell'otolite che vengono associate al periodo di accrescimento invernale che coincide anche con condizioni ambientali sfavorevoli per il pesce. Molti Autori hanno notato che l'ampiezza degli incrementi non è costante ma diminuisce con l'età. Questo può essere correlato con i cambiamenti del metabolismo che provocano un abbassamento del pH dei tessuti ripercuotendosi così sul tasso di accrescimento dell'otolite (Love, 1980; Gauldie e Nelson, 1990).

I cristalli degli asterischi si presentano piuttosto differenti rispetto a quelli dei lapilli e delle sagitte. Infatti essendo costituiti da vaterite i cristalli hanno un aspetto globoso, concrezionato e alquanto amorfo tipico dell'abito botroidale di questa forma cristallina (foto 21 e 22). Mentre l'allomorfo in cui cristallizza il carbonato di calcio è determinato dalla geometria imposta dalla matrice organica, l'abito cristallino è determinato dalla velocità di cristallizzazione, dalla temperatura e dalla viscosità del mezzo (Li et Al., 1991).

E' possibile notare il reticolo organico in una sezione frontale di asterisco (foto 23), dove sono visibili le fibre che costituiscono la matrice.

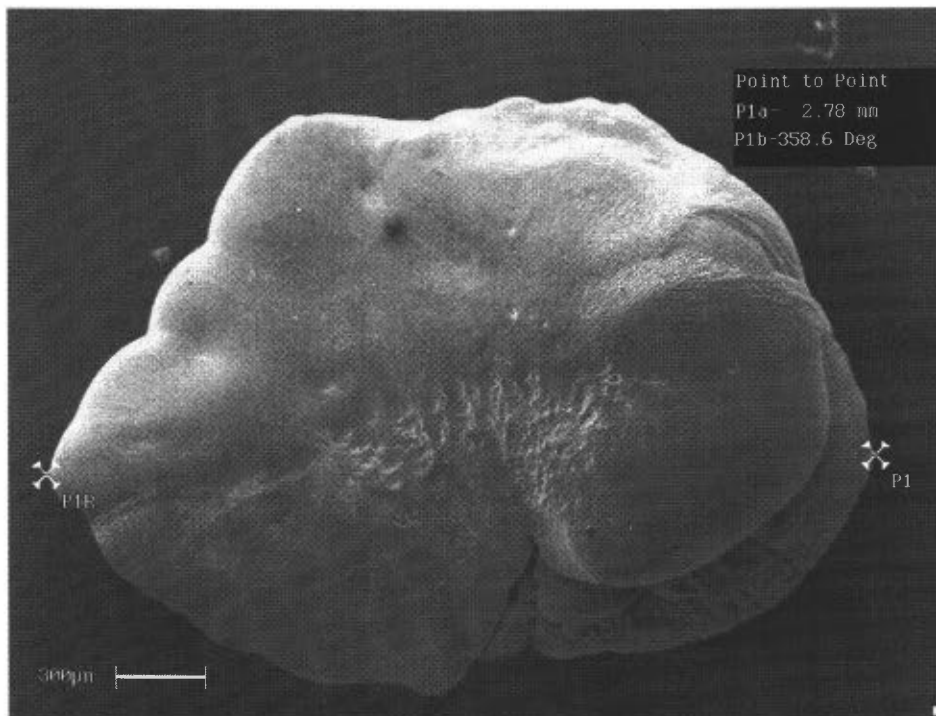


Foto 1: faccia mesiale del lapillo

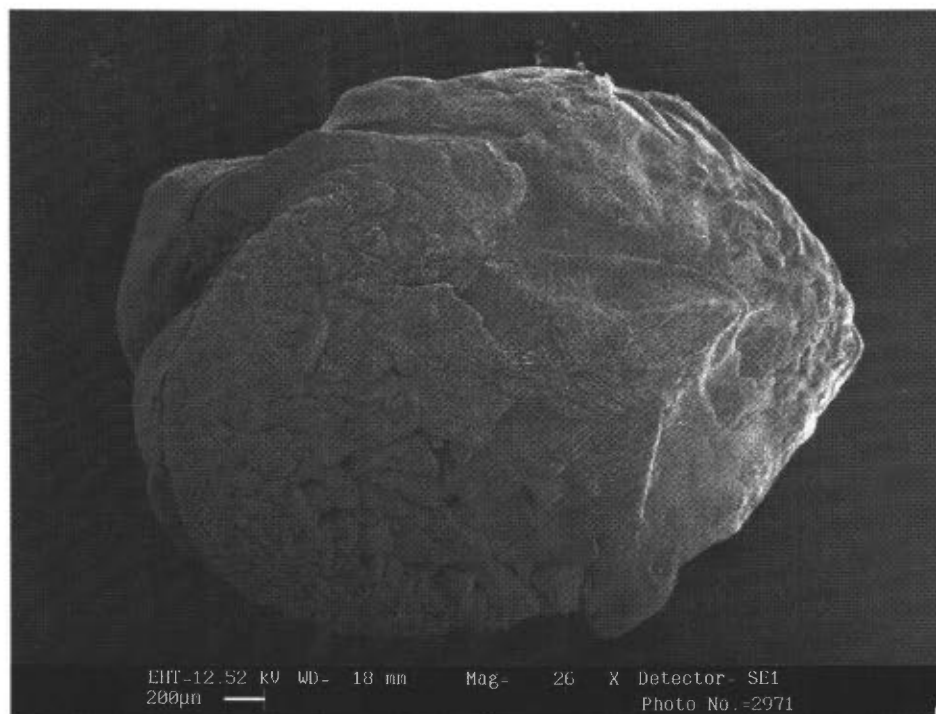


Foto 2: faccia laterale del lapillo

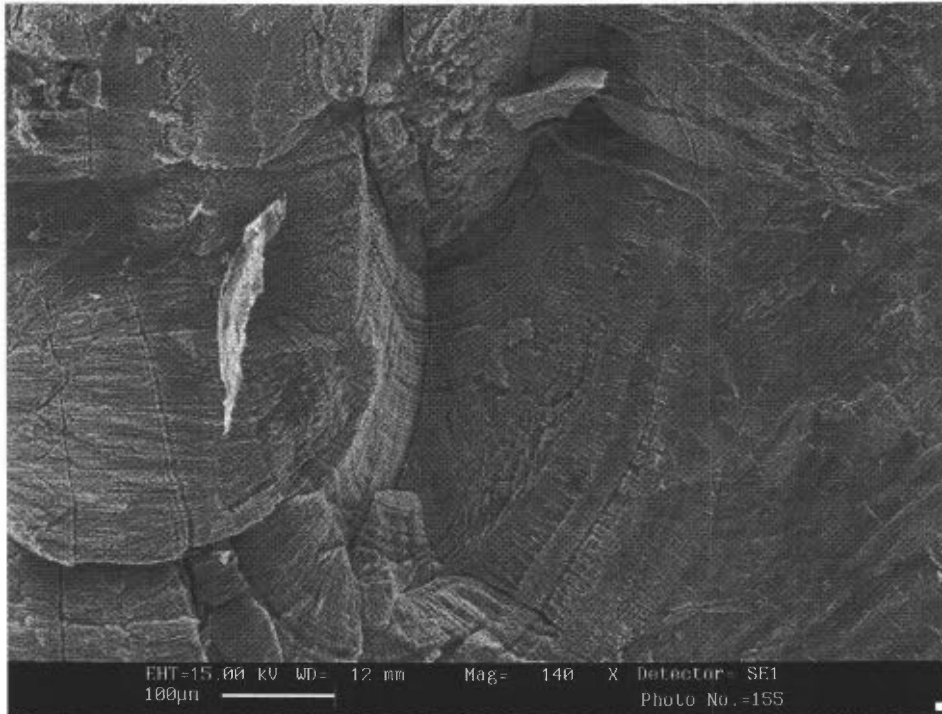


Foto 3: accrescimenti concentrici a partire dal nucleo

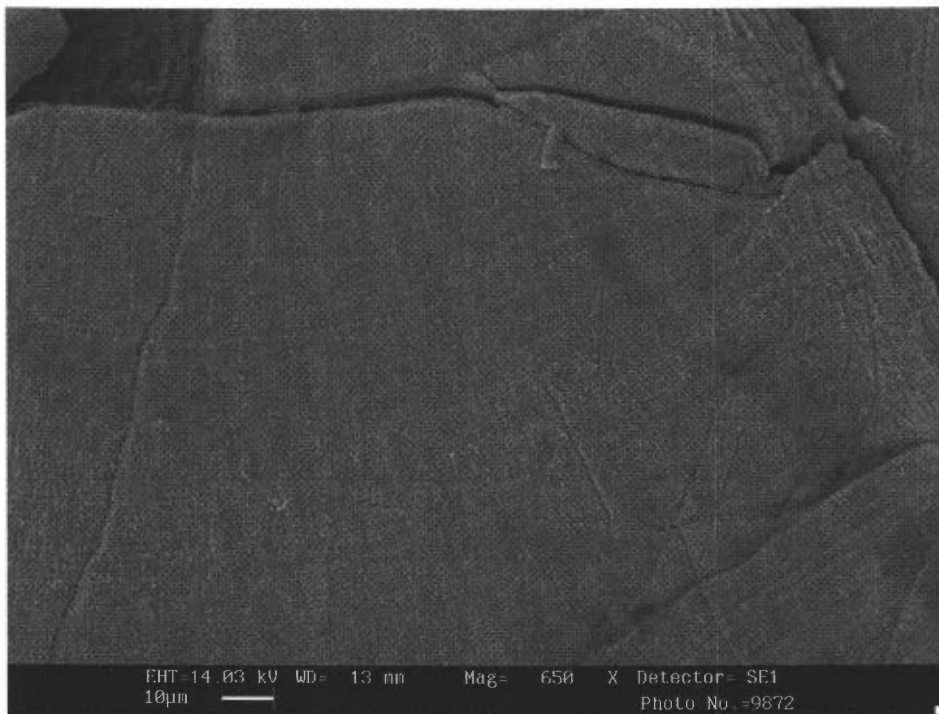


Foto 4: incrementi giornalieri in lapillo

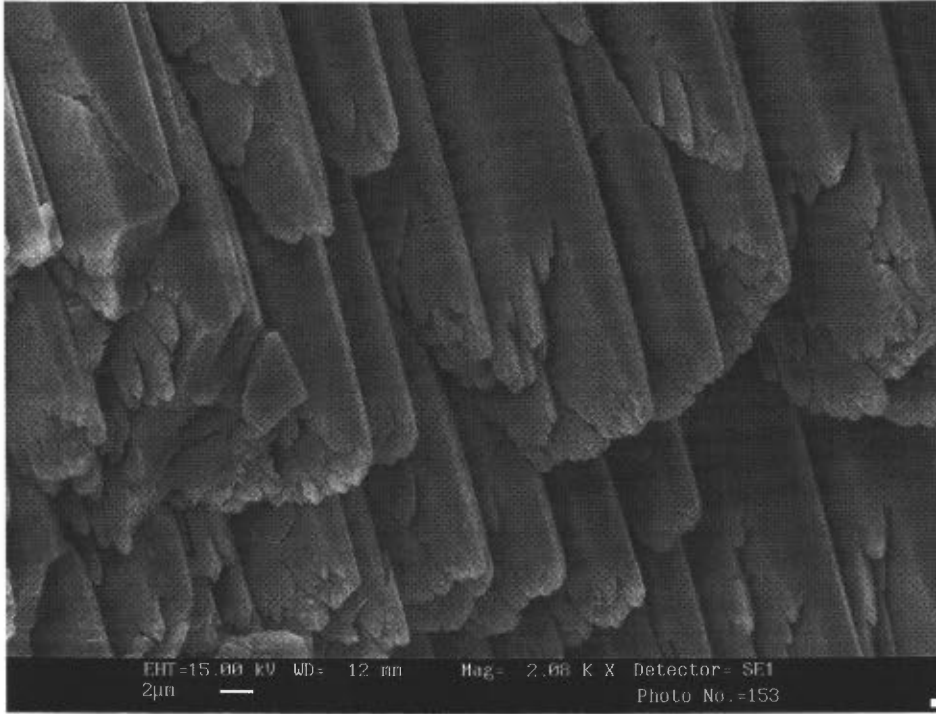


Foto 5: terminazioni aciculari dei cristalli di aragonite

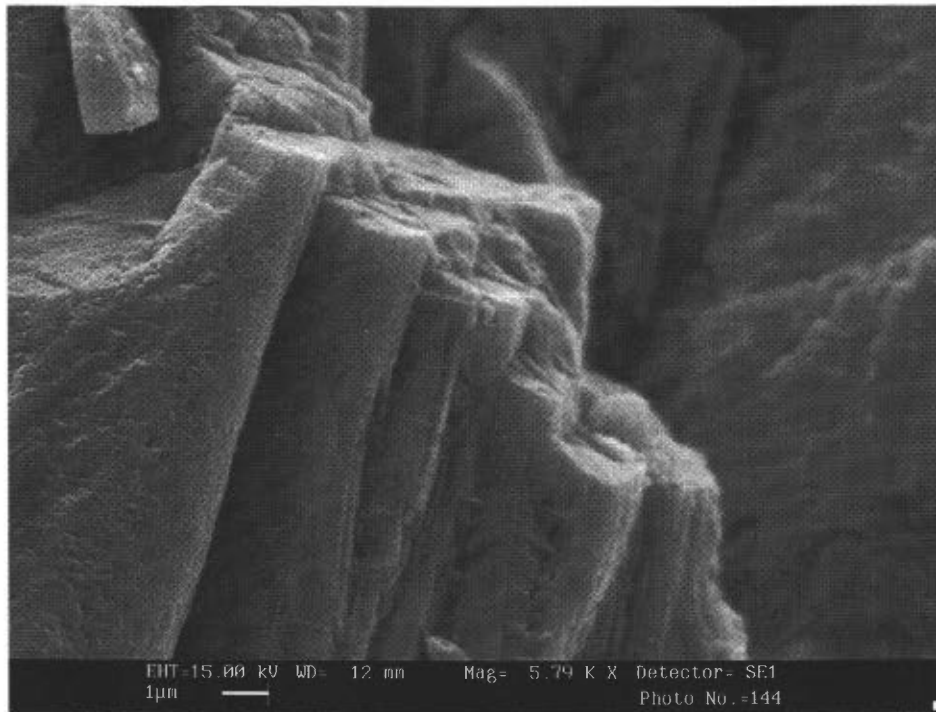


Foto 6: strati cristallini

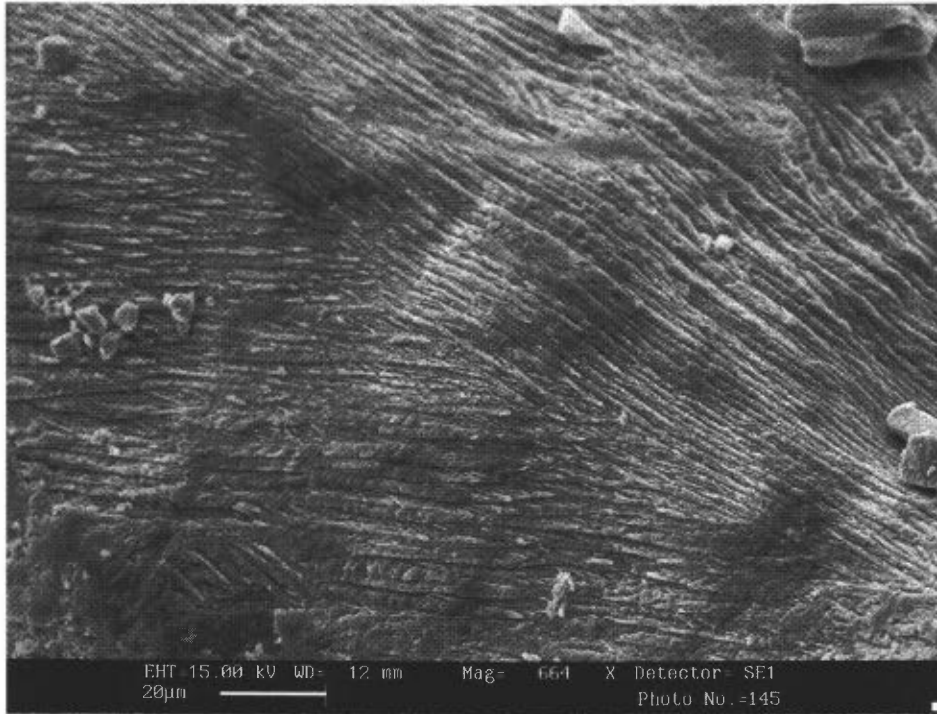


Foto 7: direzione di crescita dei cristalli di aragonite

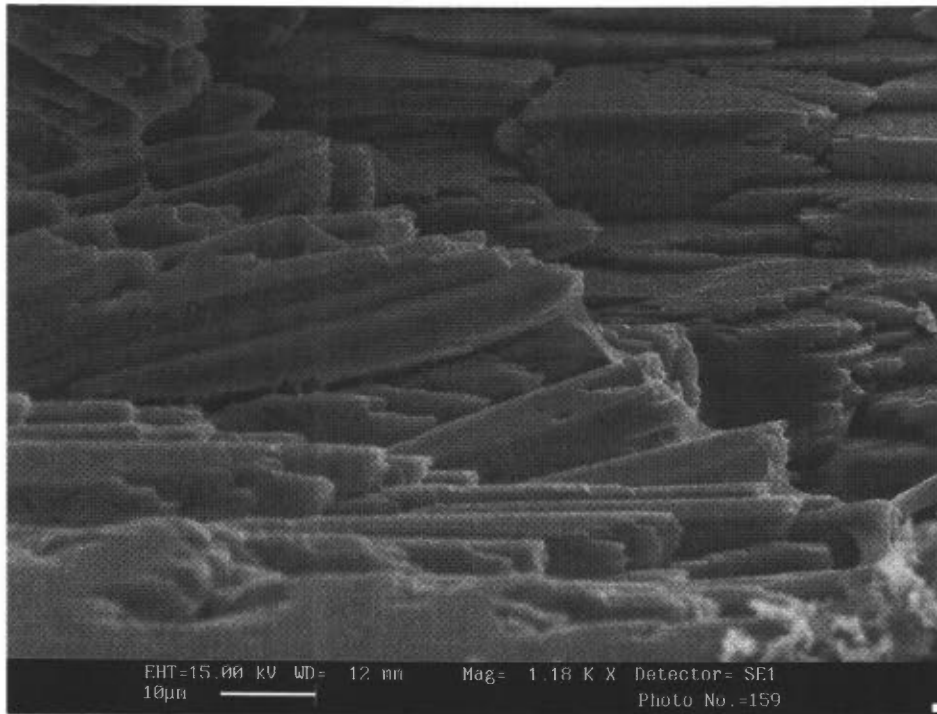


Foto 8: twinned-crystal

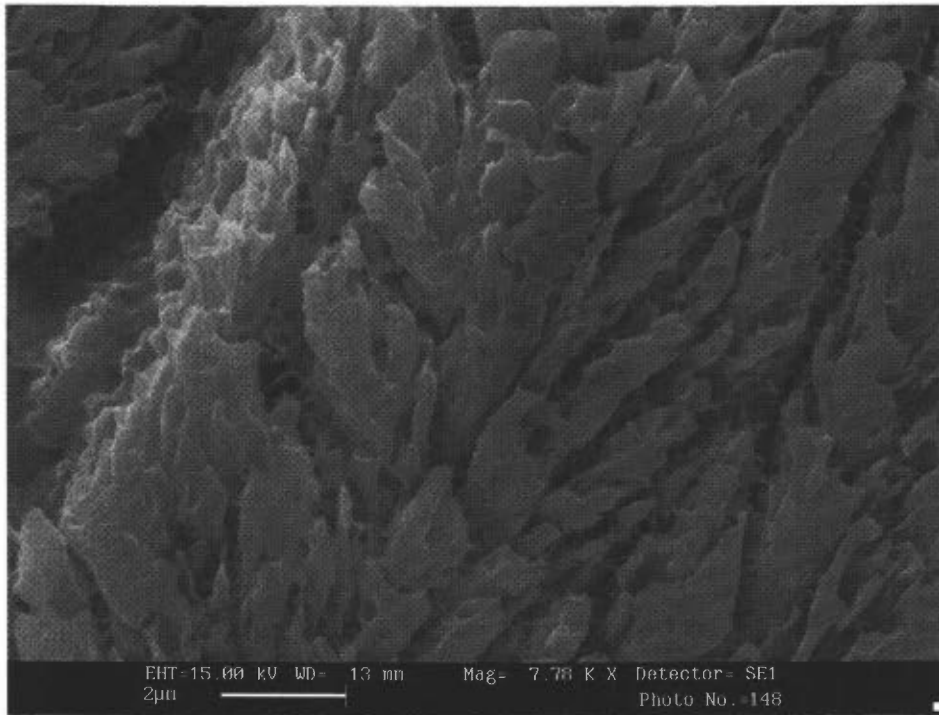


Foto 9: matrice organica

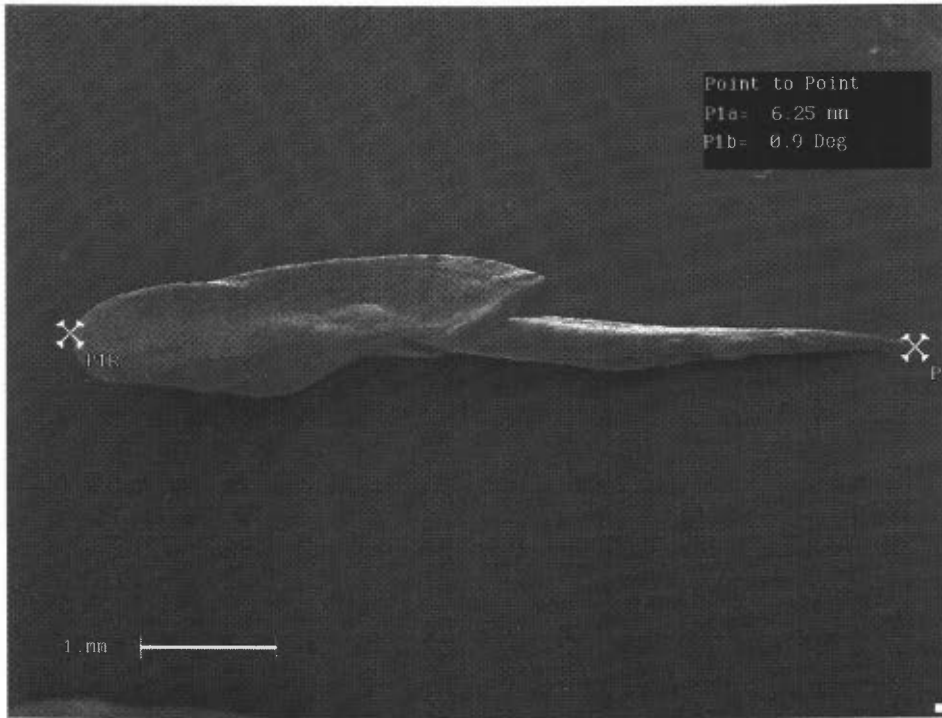


Foto 10: faccia anti-sulcale della sagitta

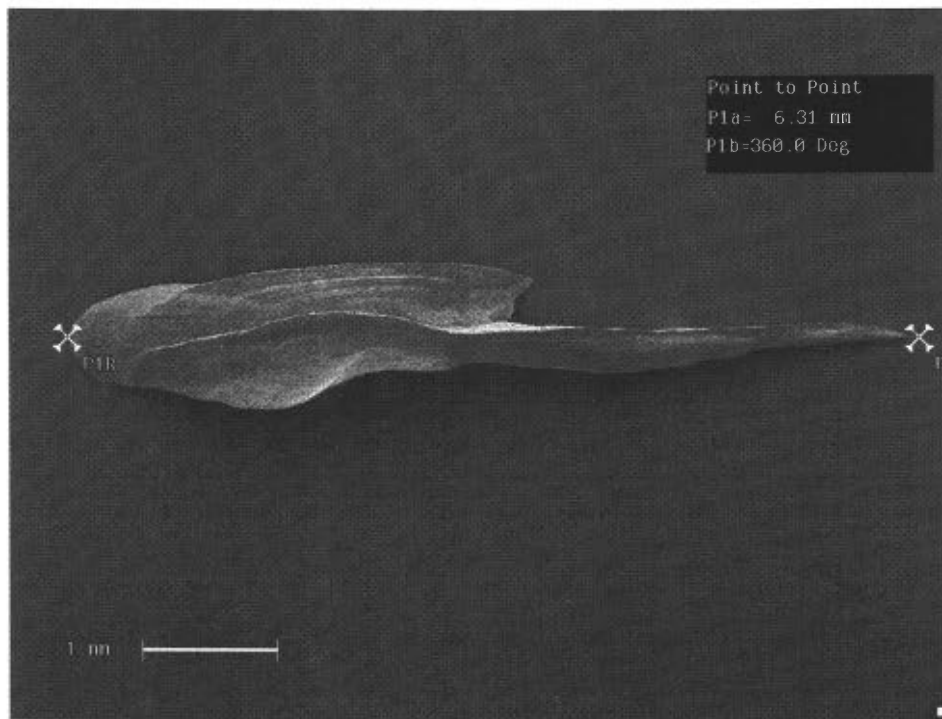


Foto 11: faccia sulcale della sagitta

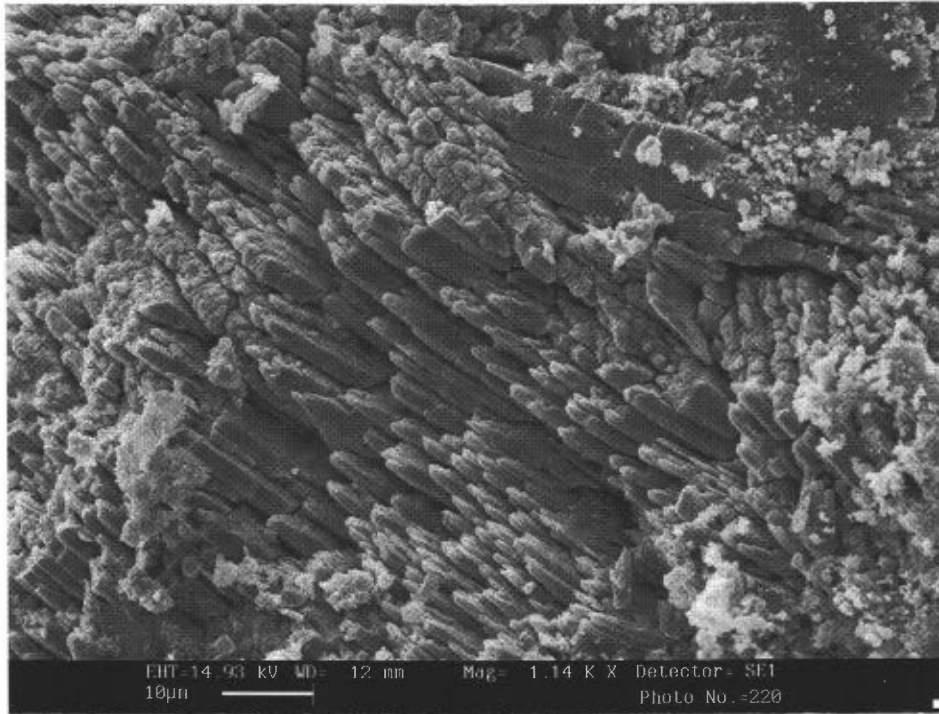


Foto 12: microcristalli aciculari di aragonite

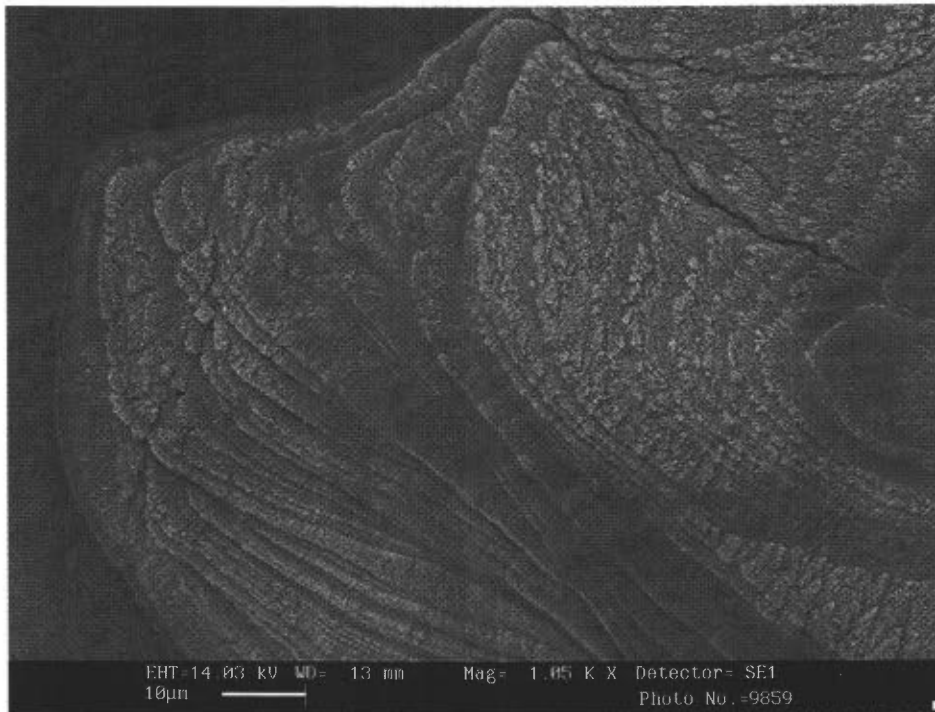


Foto 13: accrescimenti giornalieri

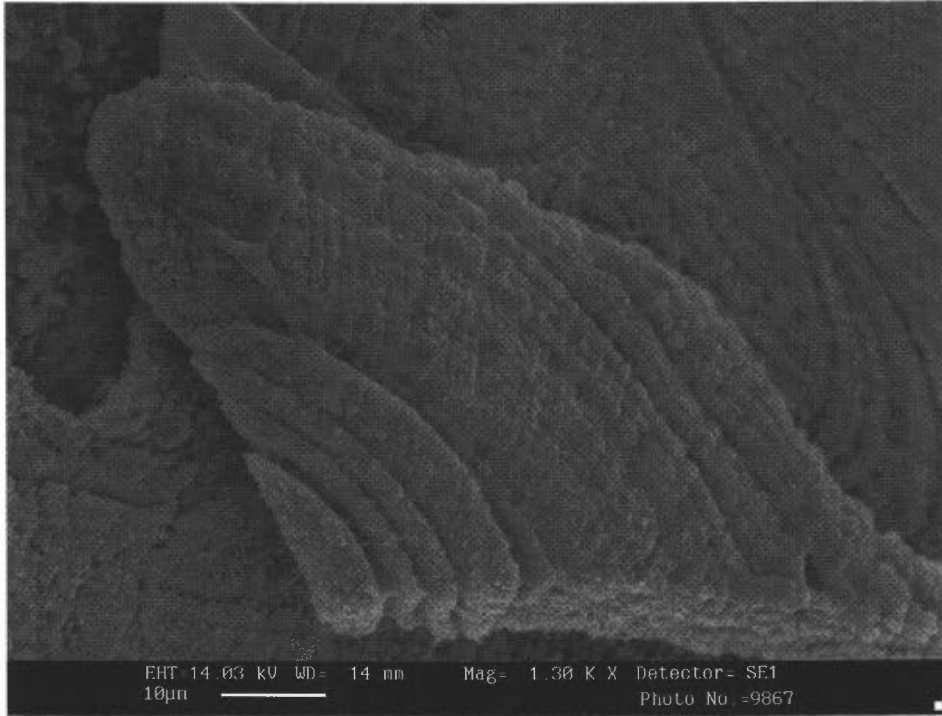


Foto 14: anelli concentrici di crescita

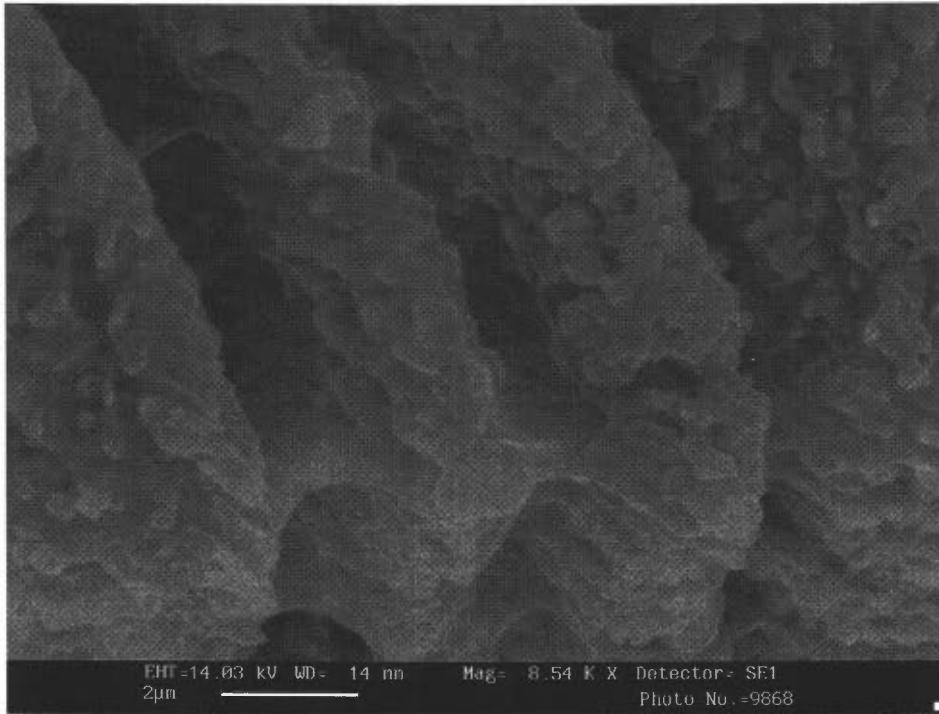


Foto 15: ponti proteici

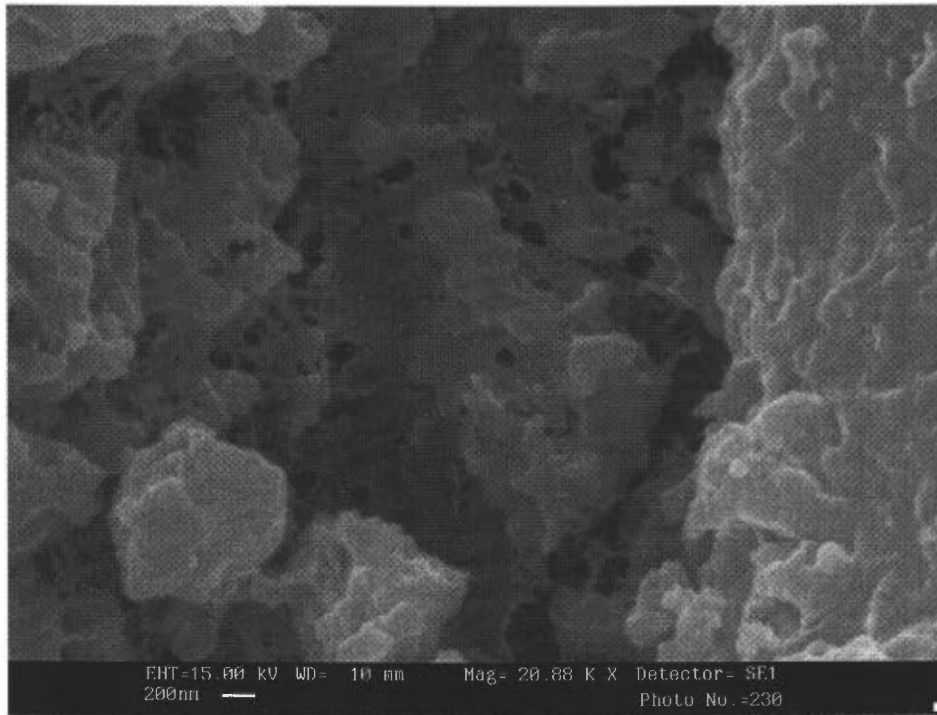


Foto 16: matrice organica

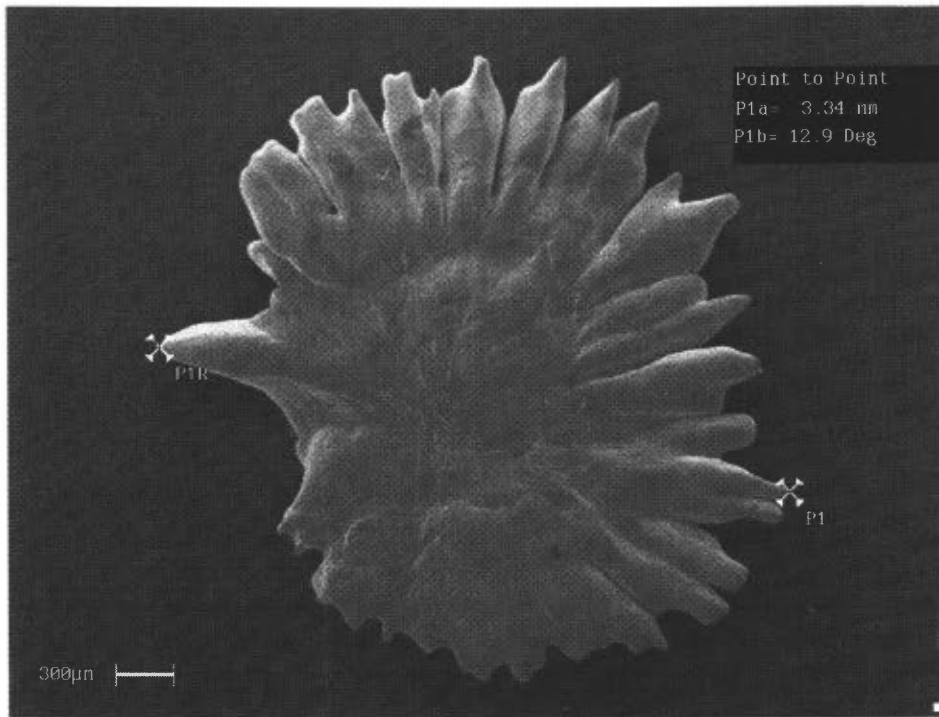


Foto 17: faccia anti-sulcale dell'asterisco

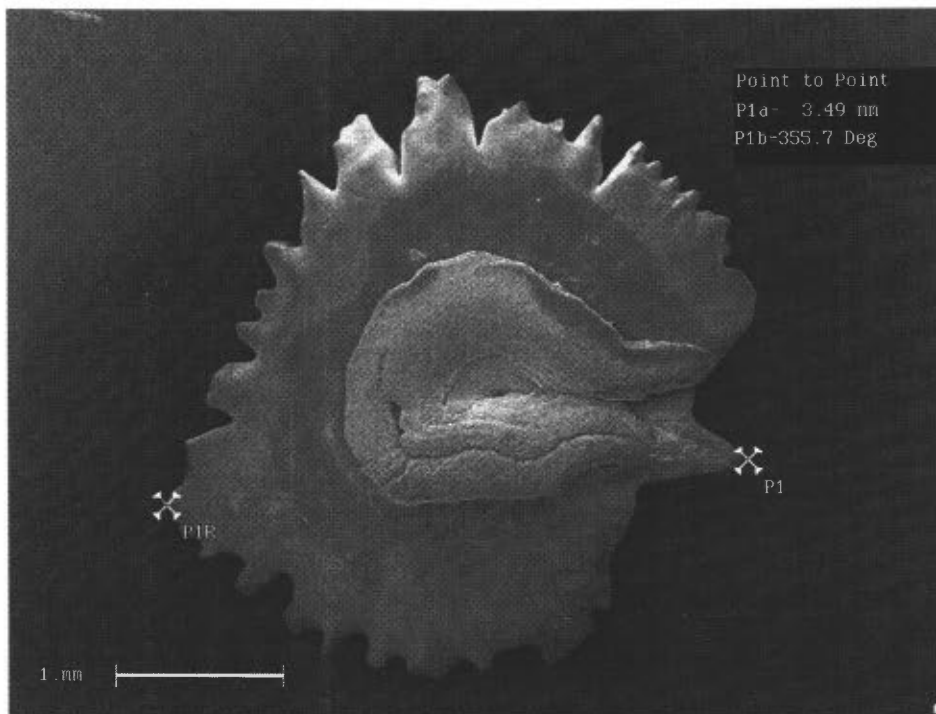


Foto 18: faccia sulcale dell'asterisco

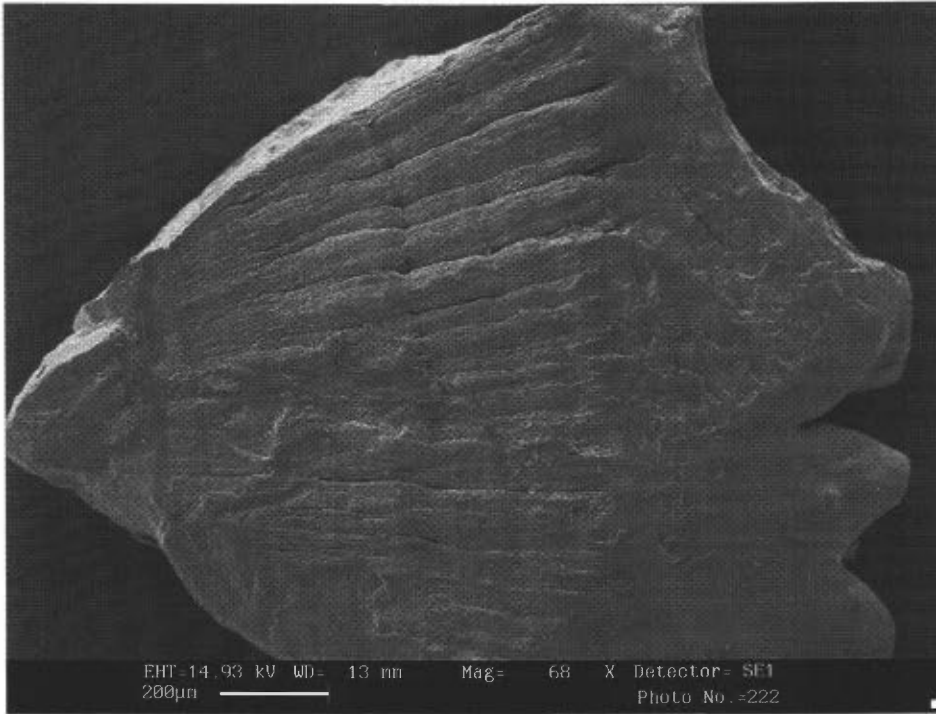


Foto 19: superficie dell'aterisco

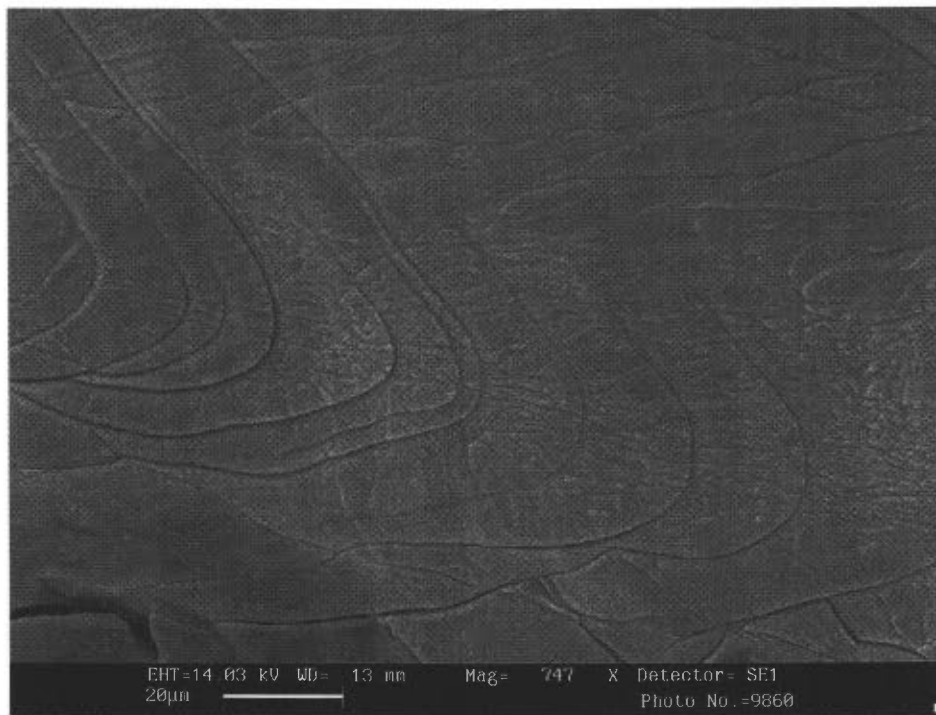


Foto 20: discontinuità nella crescita cristallina

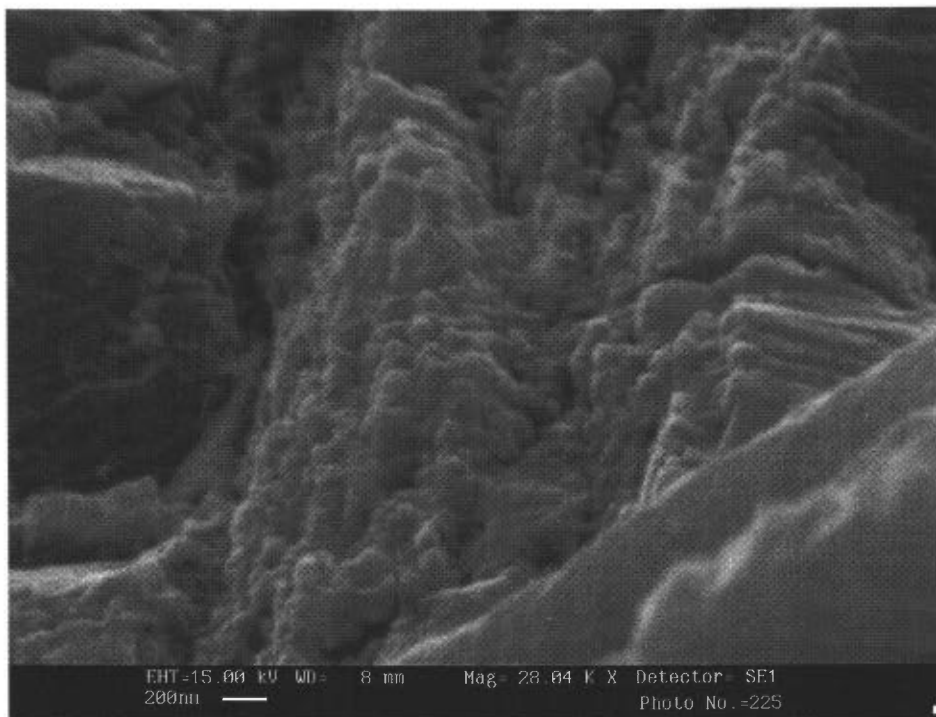


Foto 21: cristalli di vaterite

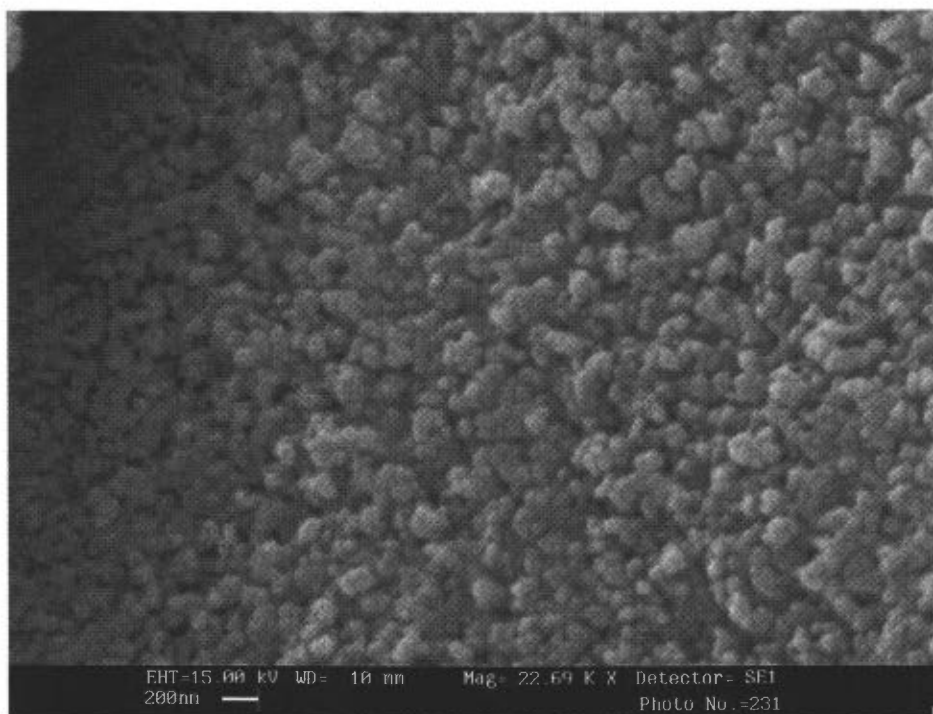


Foto 22: abito botroidale dei cristalli di vaterite

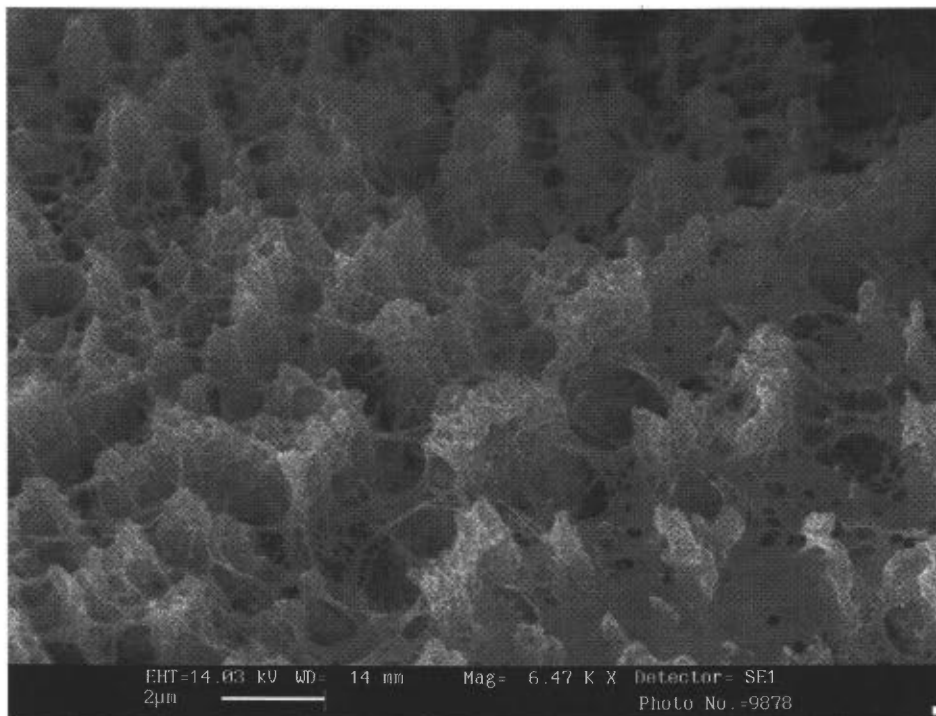


Foto 23: matrice organica

Analisi morfometrica

Di seguito sono analizzati i parametri dimensionali misurati sui lapilli e sugli asterischi di *Chondrostoma nasus nasus*. Gli otoliti provenivano dalla popolazione rinvenuta nel fiume Isonzo e al fine di ottenere un campione rappresentativo per questo tipo di indagine sono stati scelti tre esemplari ogni due centimetri di lunghezza totale, per un totale di 67 esemplari.

In tab. 1 sono riportate le principali statistiche del peso e della lunghezza del subcampione considerato. Il peso degli esemplari è stato misurato al grammo, mentre quello degli otoliti al decimo di milligrammo e al fine di uniformare le unità di misura, questa variabile è stata espressa in mg. La lunghezza totale degli esemplari è stata ottenuta con precisione al mm, mentre le misure acquisite tramite il microscopio ottico sono state ottenute al decimo di millimetro; la lunghezza è espressa in mm. La lunghezza totale degli esemplari analizzati è compresa tra 83 e 540 mm, il peso tra 6000 e 1864000 mg. Nelle tabelle, inoltre, sono riportate le significatività dei coefficienti di asimmetria e curtosi al fine di rilevare i diversi casi in cui la distribuzione delle variabili si discosta dalla normalità.

Tab. 1: Statistiche generali delle variabili biometriche misurate sugli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*

	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
W	67	6000	1864000	530090.62	66103.58	541081.15	1.01**	-0.135/
LTA	67	8.3	54	31.93	1.59	13.03	-0.01/	-1.173*

/ non significativo

* significativo al livello del 5%

** significativo al livello dell'1%

In tab. 2 sono riportate lo stesso tipo di statistiche per le stesse variabili distinte per sesso. Poiché alcuni esemplari si presentavano molto giovani e sessualmente immaturi e quindi di difficile determinazione, è stato possibile determinare il sesso solo su 40 esemplari. Dall'analisi della differenza tra le medie si evince che non vi sono differenze significative tra i maschi e le femmine.

Tab. 2: Statistiche generali delle variabili biometriche degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus* distinte per sesso

	sex	N	mini	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
LTA	M	16	28.1	50.7	40.84	1.74	6.98	-0.27/	-1.002/
					/				
LTA	F	25	23.1	54	39.87	1.92	9.58	-0.127/	-1.075/
W	M	16	217347	1528000	822955.94	110467.64	441870.57	0.367/	-1.259/
					/				
W	F	25	115501.67	1864000	810867.17	112794.26	563971.31	0.613/	-0.893/

/ non significativo * significativo al livello del 5% ** significativo al livello dell'1%

Sui lapilli sono stati calcolati nove parametri dimensionali e in tab. 3 sono riportate le principali statistiche dei valori ottenuti. Dalla tab. 4 si nota che non vi sono differenze significative tra le variabili nei due sessi, e quindi si può ipotizzare che gli otoliti presentino lo stesso tasso di accrescimento.

Tab. 3: Statistiche generali delle misure effettuate sui lapilli

	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
area	132	0.73	10.61	5.60	0.26	3.03	0.17 *	-1.38 **
max diam	132	1.11	4.67	2.94	0.08	0.92	-0.07 /	-1.17 **
max rag	132	0.57	2.39	1.52	0.04	0.48	-0.04 /	-1.12 **
min diam	132	0.76	3.17	2.08	0.05	0.63	-0.01 /	-1.12 **
min rag	132	0.34	1.51	0.97	0.03	0.30	0.05 /	-1.10 **
perimetro	132	3.25	15.39	9.14	0.25	2.92	-0.70 **	-1.16 **
w otolite	130	1.3	37.8	13.7	1	10	1 **	-1 *
rotondità	132	1.15	1.78	1.28	0.01	0.09	1.99 **	7.29 **
rap. raggi	132	1.31	2.22	1.57	0.02	0.18	1.54 **	2.87 **

Tab.4: Statistiche generali delle misure eseguite sui lapilli distinte per sesso

	sex	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
area	M	32	4.82	10.51	7.79	0.34	1.91	-0.29 /	-1.38 /
area	F	48	3.51	10.61	7.40	0.34	2.32	-0.28 /	-1.35 *
max diam	M	32	2.84	4.38	3.62	0.09	0.50	-0.22 /	-1.33 /
max diam	F	48	2.41	4.67	3.49	0.09	0.62	-0.21 /	-1.00 /
max rag	M	32	1.46	2.39	1.88	0.05	0.28	0.00 /	-1.19 /
max rag	F	48	1.23	2.37	1.81	0.05	0.32	-0.19 /	-0.92 /
min diam	M	32	1.94	3.15	2.54	0.07	0.38	-0.11 /	-1.36 /
min diam	F	48	1.62	3.17	2.45	0.07	0.45	-0.20 /	-1.26 /
min rag	M	32	0.89	1.51	1.19	0.03	0.19	0.01 /	-1.36 /
min rag	F	48	0.75	1.48	1.14	0.03	0.22	-0.12 /	-1.38 *
perimetro	M	32	8.74	13.34	11.21	0.28	1.56	-0.41 /	-1.28 /
perimetro	F	48	7.45	15.39	10.97	0.29	2.02	-0.19 /	-0.88 /
W otolite	M	32	8.90	35.20	19.79	1.29	7.28	0.06 /	-0.70 /
W otolite	F	48	5.80	37.80	19.56	1.38	9.54	0.16 /	-1.13 /
rotondità	M	32	1.19	1.52	1.30	0.01	0.07	0.98 *	2.13 **
rotondità	F	48	1.21	1.78	1.32	0.01	0.10	2.57 **	9.12 **
rap. raggi	M	32	1.31	2.11	1.59	0.03	0.18	1.11 **	1.24 /
rap. raggi	F	48	1.33	2.22	1.61	0.03	0.19	1.15 **	1.85 **

/ non significativo

* significativo al livello del 5%

** significativo al livello dell'1%

In tab. 5 sono riportate lo stesso tipo di statistiche distinguendo i lapilli a seconda della loro posizione occupata nei labirinti destro o sinistro. Dall'analisi delle medie emerge l'assenza di differenze significative che quindi denota l'assenza di asimmetria per queste strutture, confermata peraltro dall'analisi discriminante eseguita secondo il metodo stepwise che ha permesso di distinguere correttamente le due posizioni solo nel 65% dei casi.

Tab. 5: Statistiche generali delle misure eseguite sui lapilli distinti in destro e sinistro

		N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.		curt.	
area	des	66	0.73	10.47	5.53	0.37	3.01	0.17	/	-1.39	*
					/						
area	sin	66	0.73	10.61	5.67	0.38	3.07	0.16	/	-1.38	*
max diam.	des	66	1.13	4.45	2.93	0.11	0.92	-0.08	/	-1.21	*
					/						
max diam.	sin	66	1.11	4.67	2.95	0.11	0.91	-0.06	/	-1.13	/
max rag.	des	66	0.59	2.37	1.52	0.06	0.48	-0.06	/	-1.15	/
					/						
max rag.	sin	66	0.57	2.39	1.53	0.06	0.48	-0.02	/	-1.09	/
min. diam.	des	66	0.76	3.17	2.05	0.08	0.62	0.02	/	-1.11	/
					/						
min. diam.	sin	66	0.77	3.15	2.11	0.08	0.64	-0.04	/	-1.13	/
min. rag.	des	66	0.36	1.48	0.95	0.04	0.30	0.12	/	-1.10	/
					/						
min. rag.	sin	66	0.34	1.51	0.99	0.04	0.31	-0.02	/	-1.07	/
perimetro	des	66	3.38	14.19	9.07	0.35	2.87	-0.10	/	-1.20	*
					/						
perimetro	sin	66	3.25	15.39	9.22	0.37	2.99	-0.05	/	-1.14	/
W otolite	des	65	1.30	36.80	13.62	1.27	10.21	0.58		-0.90	/
					/						
W otolite	sin	65	1.40	37.80	13.80	1.29	10.38	0.58	/	-0.88	/
rotondità	des	66	1.15	1.53	1.28	0.01	0.07	1.05	**	1.71	**
					/						
rotondità	sin	66	1.15	1.78	1.28	0.01	0.10	2.18	**	7.38	**
rap. raggi	des	66	1.31	2.22	1.61	0.03	0.21	1.41	**	1.71	**
					/						
rap. raggi	sin	66	1.33	1.99	1.54	0.02	0.13	0.93	**	1.03	/

/ non significativo

* significativo al livello del 5%

** significativo al livello dell'1%

La determinazione dell'età degli esemplari ha permesso di individuare 14 classi d'età da 1 a 14 anni.

Nella tabella 6 sono riportate le statistiche delle variabili dimensionali rilevate sui lapilli nelle singole classi d'età, si nota che per quanto riguarda l'area, il massimo raggio, il massimo diametro, il perimetro e il peso dell' otolite, vi sono differenze statisticamente significative soprattutto tra le prime classi d'età (1-3 anni). Questa tendenza è probabilmente imputabile al

tasso d'accrescimento più elevato durante i primi anni di vita, inoltre il fatto che questo andamento non è stato riscontrato per il minimo raggio e il minimo diametro è forse dovuto alla forma dell' otolite che si accresce maggiormente lungo una direzione.

Tab. 6: Statistiche generali delle misurazioni effettuate sui lapilli distinte per ciascuna classe d'età

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
area	1	12	0,73	1,68	1,35	0,09	0,33	-1,20	0,44
					**				
area	2	22	1,75	3,20	2,34	0,10	0,46	0,32	-1,17
					**				
area	3	12	2,63	3,93	3,34	0,14	0,49	-0,53	-1,54
					**				
area	4	17	3,47	10,51	4,73	0,40	1,65	2,96	10,33
					/				
area	5	12	4,67	6,47	5,22	0,17	0,60	1,64	1,66
					/				
area	6	8	5,35	6,88	6,07	0,23	0,65	0,14	-2,15
					/				
area	7	10	6,23	9,14	7,38	0,27	0,85	0,90	0,98
					*				
area	8	8	8,46	9,31	8,86	0,10	0,29	0,22	-0,87
					/				
area	9	10	8,42	10,51	9,14	0,21	0,68	1,03	0,42
					/				
area	10	6	8,34	10,34	9,57	0,34	0,83	-0,86	-1,39
					/				
area	11	6	8,66	10,50	9,52	0,28	0,69	0,38	-1,20
					/				
area	12	4	9,49	10,16	9,87	0,14	0,29	-0,69	0,05
					/				
area	13	4	9,09	10,61	9,91	0,37	0,75	-0,18	-4,64
					/				
area	14	2	10,28	10,51	10,40	0,12	0,16	,	,

continua

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
max diam	1	12	1,11	1,63	1,47 **	0,05	0,18	-1,27	0,43
max diam	2	22	1,61	2,27	1,94 **	0,04	0,20	-0,13	-1,38
max diam	3	12	2,12	2,50	2,35 *	0,05	0,16	-0,74	-1,50
max diam	4	17	2,38	4,67	2,79 /	0,13	0,53	3,01	10,61
max diam	5	12	2,67	3,53	2,95 /	0,07	0,24	1,56	2,83
max diam	6	8	2,94	3,41	3,16 *	0,06	0,17	0,08	-1,28
max diam	7	10	3,29	3,73	3,51 *	0,05	0,16	0,12	-1,66
max diam	8	8	3,66	3,97	3,80 /	0,03	0,09	0,53	0,94
max diam	9	10	3,62	4,11	3,89 /	0,06	0,19	-0,39	-1,46
max diam	10	6	3,86	4,27	4,07 /	0,06	0,15	-0,05	-1,01
max diam	11	6	4,19	4,38	4,27 /	0,03	0,06	1,23	3,19
max diam	12	4	3,97	4,39	4,19 /	0,11	0,21	-0,13	-5,00
max diam	13	4	3,76	4,01	3,90 /	0,05	0,10	-0,79	0,44
max diam	14	2	4,45	4,67	4,56	0,11	0,16	,	,
max rag	1	12	0,57	0,85	0,76 **	0,03	0,10	-1,16	0,17
max rag	2	22	0,84	1,16	1,00 **	0,02	0,10	-0,08	-1,33
max rag	3	12	1,07	1,31	1,21 *	0,03	0,09	-0,70	-1,54
max rag	4	17	1,21	2,37	1,46 /	0,07	0,27	2,64	8,72
max rag	5	12	1,37	1,82	1,52 /	0,04	0,13	1,48	2,20
max rag	6	8	1,51	1,78	1,64 *	0,03	0,09	-0,02	-1,25
max rag	7	10	1,73	1,92	1,81 /	0,03	0,08	0,44	-1,91
max rag	8	8	1,86	2,11	1,95 /	0,03	0,07	1,28	3,10
max rag	9	10	1,85	2,16	2,01 /	0,04	0,12	-0,26	-1,73
max rag	10	6	1,97	2,18	2,09 /	0,04	0,09	-0,55	-1,57
max rag	11	6	2,20	2,39	2,28 /	0,03	0,06	1,20	2,51
max rag	12	4	2,04	2,32	2,18 /	0,06	0,13	0,00	-3,40
max rag	13	4	1,99	2,14	2,05 *	0,03	0,07	1,16	1,55
max rag	14	2	2,37	2,37	2,37	0,10	0,01	,	,

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
min diam	1	12	0,76	1,25	1,08	0,05	0,16	-1,33	1,20
					**				
min diam	2	22	1,13	1,70	1,43	0,04	0,17	0,09	-1,04
					/				
min diam	3	12	1,39	1,86	1,64	0,05	0,16	-0,17	-1,74
					*				
min diam	4	17	1,70	2,69	1,93	0,06	0,24	2,18	6,20
					*				
min diam	5	12	1,90	2,33	2,08	0,04	0,13	0,52	-0,67
					/				
min diam	6	8	1,99	2,54	2,27	0,08	0,23	-0,10	-2,15
					/				
min diam	7	10	2,13	2,88	2,45	0,08	0,24	0,55	-0,72
					*				
min diam	8	8	2,66	2,97	2,85	0,04	0,10	-0,68	-0,07
					/				
min diam	9	10	2,64	3,13	2,86	0,05	0,15	0,48	-0,14
					/				
min diam	10	6	2,45	3,17	2,84	0,12	0,30	-0,30	-2,04
					/				
min diam	11	6	2,34	3,15	2,68	0,13	0,32	0,65	-1,38
					/				
min diam	12	4	2,66	3,08	2,87	0,09	0,17	-0,01	1,42
					/				
min diam	13	4	2,84	3,06	2,95	0,05	0,10	0,01	-3,73
					/				
min diam	14	2	2,5	2,69	2,59	0,10	0,14	,	,
min rag	1	12	0,34	0,60	0,51	0,02	0,08	-1,43	1,38
					**				
min rag	2	22	0,50	0,79	0,67	0,02	0,09	-0,09	-1,17
					/				
min rag	3	12	0,59	0,89	0,76	0,03	0,10	-0,33	-0,78
					/				
min rag	4	17	0,80	1,29	0,90	0,03	0,13	2,24	5,82
					*				
min rag	5	12	0,89	1,09	0,98	0,02	0,07	0,34	-1,43
					/				
min rag	6	8	0,88	1,21	1,05	0,04	0,11	-0,19	-1,04
					/				
min rag	7	10	0,95	1,38	1,14	0,05	0,15	0,28	-1,16
					*				
min rag	8	8	1,24	1,43	1,35	0,02	0,07	-0,76	-0,56
					/				
min rag	9	10	1,23	1,51	1,36	0,03	0,09	0,43	-0,16
					/				
min rag	10	6	1,04	1,48	1,33	0,08	0,18	-0,92	-0,87
					/				
min rag	11	6	1,01	1,49	1,22	0,08	0,18	0,50	-1,13
					/				
min rag	12	4	1,26	1,40	1,33	0,03	0,06	-0,01	1,49
					/				
min rag	13	4	1,34	1,41	1,37	0,02	0,03	0,16	-2,58
					/				
min rag	14	2	1,1	1,29	1,20	0,09	0,13	,	,

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
perimetro	1	12	3,25	5,06	4,46 **	0,17	0,59	-1,30	0,76
perimetro	2	22	5,06	6,98	5,95 **	0,14	0,65	0,24	-1,33
perimetro	3	12	6,37	8,04	7,30 /	0,19	0,65	-0,56	-1,60
perimetro	4	17	7,28	13,28	8,64 /	0,36	1,50	2,11	5,26
perimetro	5	12	8,50	10,44	9,10 /	0,17	0,58	1,69	2,01
perimetro	6	8	9,05	10,72	9,81 /	0,22	0,63	0,19	-1,87
perimetro	7	10	10,03	12,21	11,00 *	0,23	0,73	0,55	-0,69
perimetro	8	8	11,85	12,73	12,25 /	0,10	0,29	0,34	-0,47
perimetro	9	10	11,24	13,32	12,17 /	0,21	0,67	0,66	-0,68
perimetro	10	6	11,83	13,03	12,57 /	0,20	0,50	-0,84	-1,32
perimetro	11	6	12,13	13,34	12,70 /	0,17	0,41	0,41	0,38
perimetro	12	4	12,69	13,37	12,94 /	0,15	0,30	1,55	2,69
perimetro	13	4	12,03	15,39	13,50 /	0,79	1,58	0,44	-3,10
perimetro	14	2	13,28	13,46	13,37	0,09	0,13	,	,
W otolite	1	10	1,3	1,9	1,69 **	0,07	0,21	-0,96	-0,54
W otolite	2	22	1,90	5,30	3,25 **	0,21	0,96	0,69	-0,13
W otolite	3	12	4,20	6,70	5,56 *	0,28	0,97	-0,54	-1,55
W otolite	4	17	5,90	29,30	9,35 /	1,32	5,44	3,40	12,87
W otolite	5	12	8,70	14,80	10,73 /	0,58	2,02	1,28	0,91
W otolite	6	8	11,50	16,80	13,64 /	0,76	2,14	0,39	-1,72
W otolite	7	10	13,80	22,50	18,23 /	0,97	3,07	-0,22	-1,28
W otolite	8	8	20,10	26,90	22,98 /	1,00	2,82	0,32	-1,99
W otolite	9	10	21,10	27,40	24,73 /	0,73	2,32	-0,41	-1,32
W otolite	10	6	34,20	37,80	36,20 **	0,53	1,29	-0,62	-0,23
W otolite	11	6	21,40	28,50	25,30 **	1,07	2,62	-0,61	-0,75
W otolite	12	4	27,00	30,00	28,28 /	0,64	1,28	0,90	0,73
W otolite	13	4	25,30	27,50	26,45 /	0,45	0,90	-0,33	1,32
W otolite	14	2	28,9	29,3	29,10	0,20	0,28	,	,

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
rotondità	1	12	1,15	1,26	1,19	0,01	0,03	0,69	0,16
					/				
rotondità	2	22	1,16	1,40	1,21	0,01	0,05	2,76	9,61
					/				
rotondità	3	12	1,21	1,49	1,27	0,02	0,07	2,33	6,36
					/				
rotondità	4	17	1,20	1,56	1,28	0,02	0,09	2,49	7,33
					/				
rotondità	5	12	1,19	1,37	1,27	0,02	0,06	0,81	-0,73
					/				
rotondità	6	8	1,20	1,33	1,26	0,01	0,04	0,07	1,12
					/				
rotondità	7	10	1,26	1,52	1,31	0,02	0,08	2,72	7,82
					/				
rotondità	8	8	1,28	1,44	1,35	0,02	0,05	0,62	0,88
					/				
rotondità	9	10	1,19	1,44	1,29	0,02	0,07	1,13	1,84
					/				
rotondità	10	6	1,26	1,38	1,32	0,02	0,05	0,08	-0,63
					/				
rotondità	11	6	1,32	1,40	1,35	0,01	0,03	0,70	0,58
					/				
rotondità	12	4	1,32	1,40	1,35	0,02	0,03	1,40	1,67
					/				
rotondità	13	4	1,27	1,78	1,47	0,12	0,24	0,84	-1,32
					/				
rotondità	14	2	1,34	1,4	1,37	0,03	0,05		
rap. raggi	1	12	1,38	1,67	1,50	0,03	0,10	0,74	-0,93
					/				
rap. raggi	2	22	1,38	2,07	1,52	0,03	0,15	2,84	9,85
					/				
rap. raggi	3	12	1,46	2,20	1,61	0,06	0,20	2,49	7,22
					/				
rap. raggi	4	17	1,50	1,84	1,62	0,03	0,10	0,89	0,45
					/				
rap. raggi	5	12	1,39	1,75	1,56	0,03	0,12	0,20	-1,02
					/				
rap. raggi	6	8	1,41	1,85	1,58	0,05	0,15	0,79	-0,23
					/				
rap. raggi	7	10	1,37	1,96	1,62	0,06	0,20	0,48	-0,85
					/				
rap. raggi	8	8	1,33	1,58	1,45	0,04	0,10	-0,01	-1,90
					/				
rap. raggi	9	10	1,31	1,76	1,49	0,04	0,14	0,64	-0,03
					/				
rap. raggi	10	6	1,41	1,89	1,59	0,07	0,18	0,80	-0,41
					/				
rap. raggi	11	6	1,61	2,22	1,90	0,10	0,25	0,10	-1,93
					/				
rap. raggi	12	4	1,50	1,78	1,64	0,07	0,14	0,05	-5,34
					/				
rap. raggi	13	4	1,43	1,58	1,49	0,03	0,06	1,14	2,16
					/				
rap. raggi	14	2	1,83	2,15	1,99	0,16	0,22		

Nelle figg. 2 e 3 sono riportate le regressioni del perimetro e dell'area del lapillo sulla lunghezza totale degli esemplari. Le regressioni calcolate sono risultate lineari e presentano degli elevatissimi coefficienti di determinazione denotando così un'altissima correlazione tra le variabili considerate.

Fig. 2: Regressione del perimetro del lapillo sulla lunghezza totale degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*

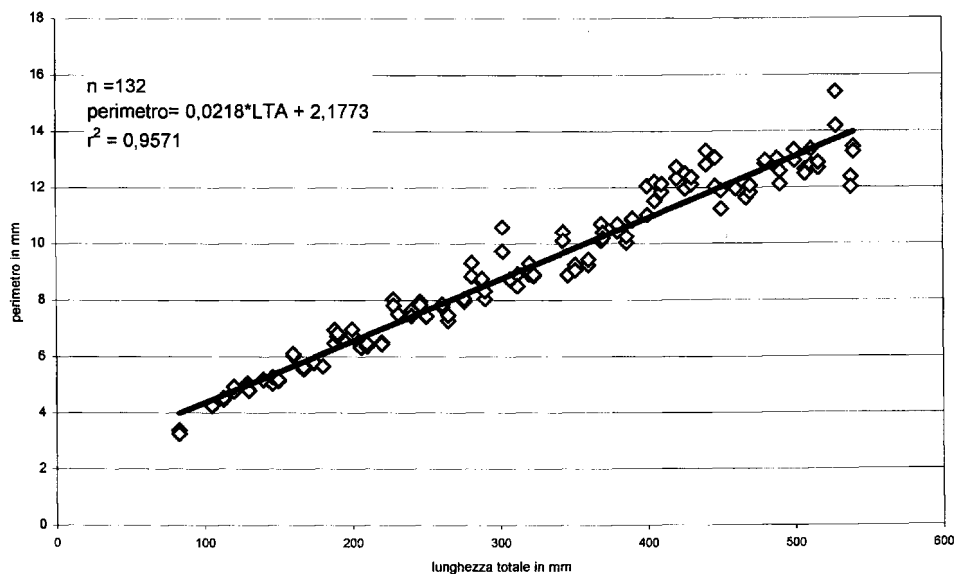
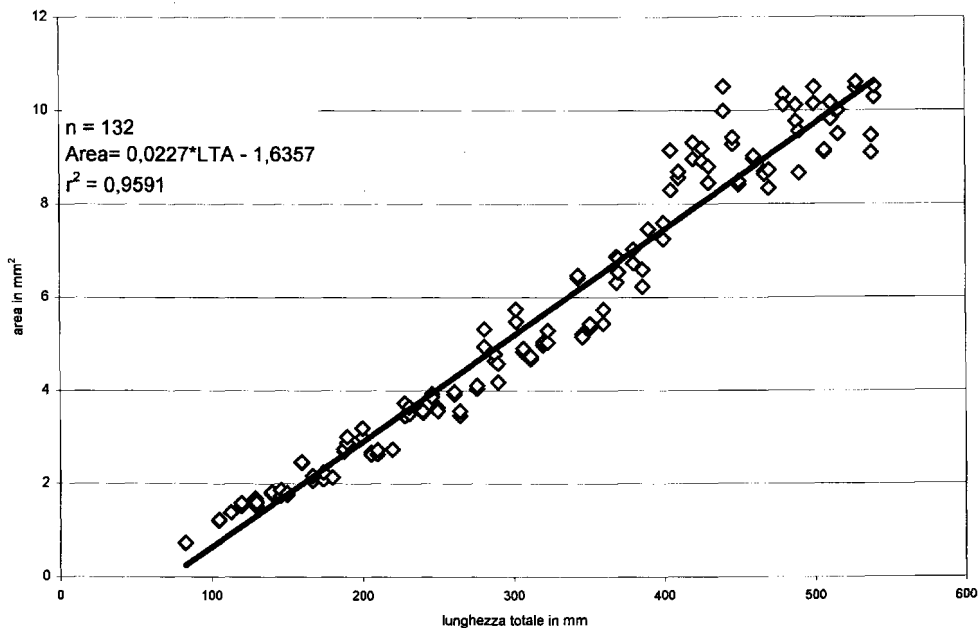


Fig. 3: Regressione dell'area del lapillo sulla lunghezza totale degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*



Nelle figg. 4-5 sono riportate le regressioni del perimetro e dell'area sul peso degli esemplari. Anche in questo caso i coefficienti di determinazione risultano molto elevati e i punti sono risultati interpolati da un'equazione di potenza.

Fig. 4: Regressione del perimetro del lapillo sul peso degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*

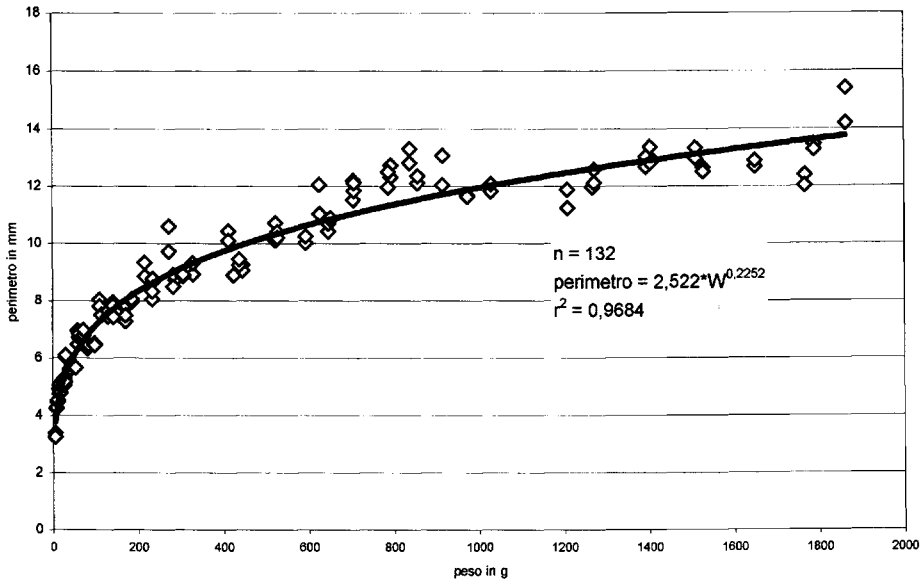
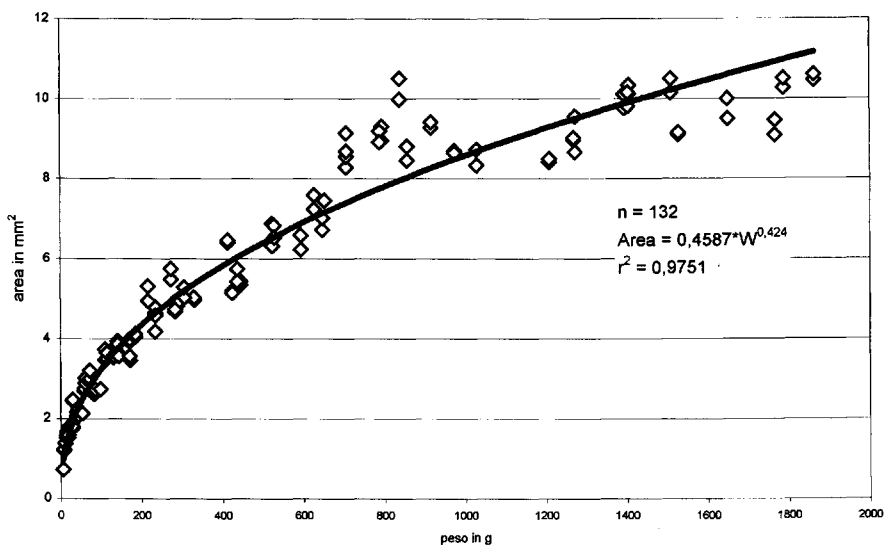


Fig. 5: Regressione dell'area del lapillo sul peso degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*



Nelle figg. 6-7 sono riportate le regressioni del peso dei lapilli sulla lunghezza totale e sul peso degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*. Le regressioni sono state calcolate trasformando i dati nei corrispondenti logaritmi naturali al fine di diminuire la dispersione e linearizzare le regressioni tra variabili ponderali e lineari. In entrambe le regressioni si nota una notevole correlazione tra le variabili analizzate.

Fig. 6: Regressione del peso dei lapilli (W) sulla lunghezza totale (LTA) degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*

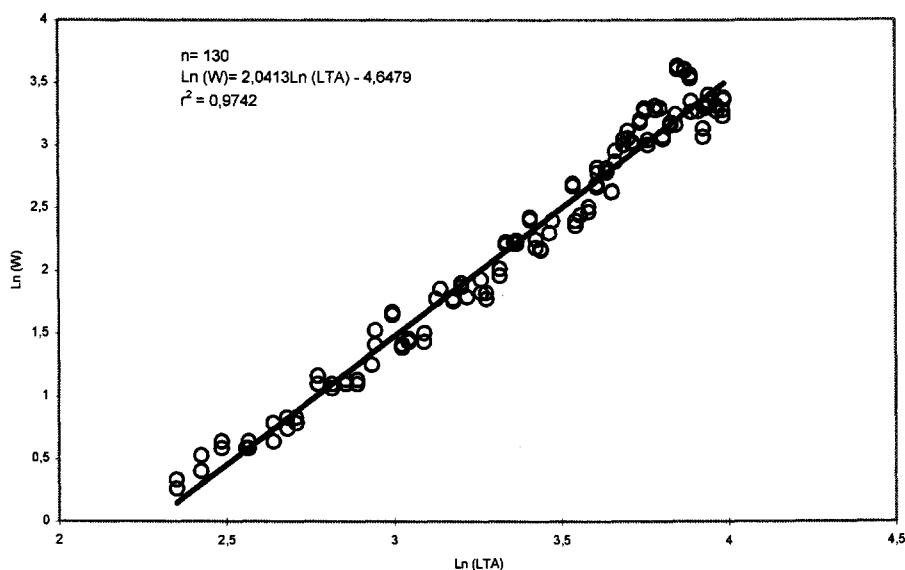
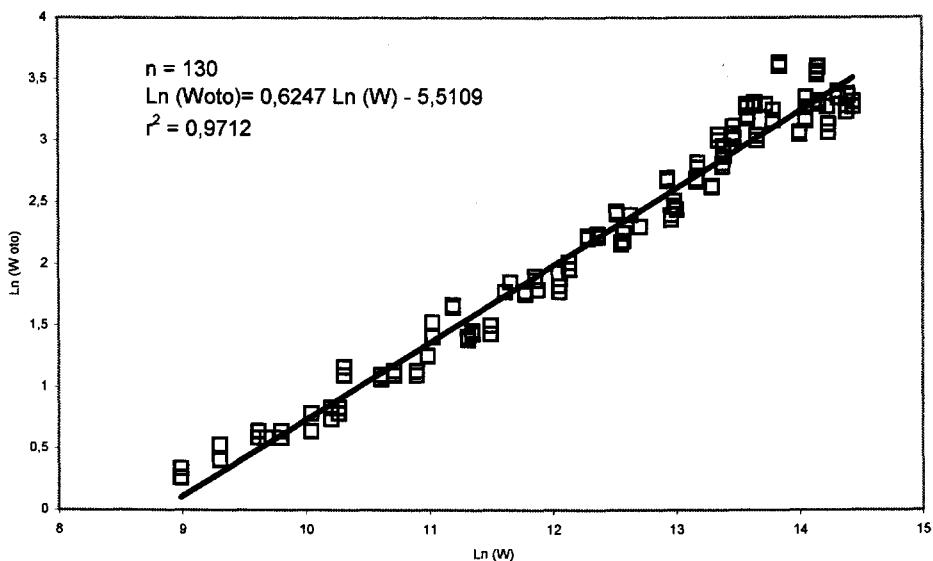


Fig. 7: Regressione del peso dei lapilli (Woto) sul peso (W) degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*



Anche per gli asterischi sono state calcolate le statistiche generali dei parametri considerati, sia per tutto il campione (tab. 7), sia distinguendo in otolite in destro e sinistro (tab. 8), che nei due sessi (tab. 9).

Tab. 7: Statistiche generali delle misure effettuate sugli asterischi

	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.	
area	133	1,09	18,43	8,69	0,43	4,97	0,24	/	-1,23 **
max diam	133	1,35	5,92	3,65	0,11	1,23	-0,69	**	-1,15 **
max rag	133	0,73	3,2	1,94	0,06	0,68	-0,03	/	-1,18 **
min diam	133	1,04	3,91	2,55	0,07	0,78	-0,08	/	-1,22 **
min rag	133	0,48	1,8	1,16	0,03	0,36	-0,03	/	-1,20 **
perimetro	133	4,98	33,67	16,91	0,56	6,47	0,153	/	-0,31 /
w otolite	133	4,98	33,67	16,92	0,56	6,47	0,15	/	-0,31 /
rotondità	133	0,4	7,3	2,86	0,08	0,93	1,45	**	3,85 **
rap. raggi	133	1,36	7,03	2,86	0,08	0,94	1,45	**	3,85 **

Tab. 8: Statistiche generali delle misure eseguite sugli asterischi distinti in destro e sinistro

		N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.	
area	des	67	1,09	17,82	8,53	0,60	4,94	0,23	/	-1,25 /
					/					
area	sin	66	1,50	18,43	8,85	0,62	5,02	0,24	/	-1,22 *
max diam.	des	67	1,35	5,73	3,62	0,15	1,24	-0,07	/	-1,17 *
					/					
max diam.	sin	66	1,49	5,92	3,68	0,15	1,22	-0,06	/	-1,14 /
max rag.	des	67	0,73	3,20	1,92	0,08	0,69	0,00	/	-1,19 *
					/					
max rag.	sin	66	0,77	3,16	1,96	0,08	0,68	-0,03	/	-1,18 *
min. diam.	des	67	1,04	3,78	2,52	0,10	0,78	-0,13	/	-1,23 *
					/					
min. diam.	sin	66	1,19	3,91	2,58	0,10	0,79	-0,04	/	-1,22 *
min. rag.	des	67	0,48	1,77	1,15	0,04	0,36	-0,09	/	-1,22 *
					/					
min. rag.	sin	66	0,53	1,80	1,17	0,04	0,36	0,02	/	-1,20 *
perimetro	des	67	4,98	33,67	16,70	0,79	6,46	0,18	/	-0,13 /
					/					
perimetro	sin	66	5,27	32,57	17,15	0,80	6,53	0,13	/	-0,41 /
W otolite	des	67	0,40	36,40	8,28	0,85	6,95	1,34	**	2,70 **
					/					
W otolite	sin	66	0,40	36,80	8,48	0,86	7,02	1,30	**	2,58 **
rotondità	des	67	1,36	5,15	2,84	0,11	0,87	0,73	*	0,48 /
					/					
rotondità	sin	66	1,44	7,03	2,87	0,12	1,01	1,92	**	5,70 **
rap. raggi	des	67	1,26	2,04	1,64	0,02	0,16	0,26	/	0,04 /
					/					
rap. raggi	sin	66	1,33	2,46	1,65	0,02	0,19	1,47	**	4,43 **

/ non significativo

* significativo al livello del 5%

** significativo al livello dell'1%

Tab. 9: Statistiche generali delle misure eseguite sugli asterischi distinte per sesso

	sex	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
area	M	32	6,51	18,43	12,01	0,57	3,20	0,03	/ -0,33 /
					/				
area	F	50	4,95	18,19	11,61	0,56	3,97	-0,15	/ -1,27 /
max diam	M	32	3,28	5,8	4,50	0,11	0,65	-0,11	/ -0,04 /
					/				
max diam	F	50	2,8	5,92	4,40	0,12	0,88	-0,23	/ -1,10 /
max rag	M	32	1,74	3,15	2,39	0,06	0,36	0,09	/ 0,13 /
					/				
max rag	F	50	1,43	3,2	2,37	0,07	0,51	-0,27	/ -1,14 /
min diam	M	32	2,26	3,91	3,08	0,08	0,47	-0,03	/ -0,91 /
					/				
min diam	F	50	2,1	3,83	3,03	0,07	0,51	-0,45	/ -1,07 /
min rag	M	32	1,02	1,8	1,40	0,03	0,22	-0,05	/ -1,00 /
					/				
min rag	F	50	0,95	1,77	1,38	0,03	0,25	-0,38	/ -0,99 /
perimetro	M	32	14,09	33,5	22,29	0,83	4,67	0,43	/ 0,48 /
					*				
perimetro	F	50	12,8	33,67	20,08	0,56	3,99	1,14	** 2,54 **
W otolite	M	32	5	24,6	11,96	0,84	4,78	0,72	/ 0,88 /
					/				
W otolite	F	50	3	36,8	12,19	1,03	7,31	1,40	** 3,13 **
rotondità	M	32	2,43	6,48	3,37	0,16	0,88	1,94	** 4,39 **
					*				
rotondità	F	50	2,03	5,06	2,92	0,10	0,70	1,42	** 1,45 *
rap. raggi	M	32	1,45	2,46	1,72	0,03	0,18	2,47	** 9,55 **
					/				
rap. raggi	F	50	1,48	1,99	1,71	0,02	0,13	0,32	/ -0,97 /

/ non significativo

* significativo al livello del 5%

** significativo al livello dell'1%

Anche in queste strutture non vi è asimmetria nella crescita, né differenze nella forma tra maschi e femmine. L'analisi delle medie dei parametri dimensionali misurati negli asterischi, tra la popolazione maschile e quella femminile, ha evidenziato delle differenze significative al livello del 5% per il perimetro e la rotondità. Non è stato però possibile discriminare l'appartenenza al sesso in base ad alcuno dei parametri considerati.

In tab. 10 sono riportate le principali statistiche delle variabili dimensionali degli asterischi in ciascuna classe d'età. Anche in questo caso i confronti tra i valori medi dei parametri nelle prime classi d'età risultano significativi. Per l'area, il massimo diametro ed il peso dell' otolite, il confronto è significativo fino alla sesta classe d'età.

Tab. 10: Statistiche generali delle misurazioni effettuate sugli asterischi distinte per ciascuna classe d'età

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
area	1	11	1,09	2,18	1,80 **	0,10	0,33	-1,12	0,75
area	2	22	2,04	4,62	3,20 **	0,16	0,75	0,22	-0,64
area	3	12	4,4	5,22	4,88 **	0,09	0,31	-0,61	-1,30
area	4	16	5,2	8,24	6,51 *	0,26	1,06	0,37	-1,20
area	5	14	6,72	9,13	7,91 **	0,23	0,88	0,16	-1,82
area	6	8	8,69	11,47	10,28 /	0,38	1,07	-0,37	-1,50
area	7	10	9,78	13,31	11,66 /	0,40	1,26	-0,13	-1,61
area	8	8	12,6	14,3	13,35 /	0,19	0,55	0,10	0,38
area	9	10	11,6	16,66	13,67 *	0,46	1,46	0,79	0,96
area	10	6	15,4	18,43	16,71 /	0,43	1,05	0,72	0,74
area	11	6	12,95	17,75	15,20 /	0,84	2,05	0,18	-1,87
area	12	4	14,07	16,12	14,92 /	0,43	0,86	1,16	2,18
area	13	4	14,72	18,19	16,56 /	0,85	1,71	-0,14	-4,75
area	14	2	15,6	16,97	16,28 /	0,69	0,97	,	,
max diam	1	11	1,35	1,83	1,65 **	0,05	0,16	-0,89	-0,44
max diam	2	22	1,82	2,68	2,24 **	0,06	0,28	0,02	-1,26
max diam	3	12	2,61	2,94	2,80 **	0,03	0,11	-0,65	-1,00
max diam	4	16	2,94	3,58	3,28 *	0,06	0,23	-0,08	-1,49
max diam	5	14	3,28	4,1	3,67 *	0,08	0,29	0,31	-1,67
max diam	6	8	3,77	4,42	4,17 /	0,09	0,26	-0,99	-0,77
max diam	7	10	4,1	4,91	4,42 /	0,08	0,27	0,35	-0,74
max diam	8	8	4,6	5,19	4,72 /	0,07	0,20	2,37	5,97
max diam	9	10	4,48	5,11	4,81 *	0,08	0,25	-0,01	-1,91
max diam	10	6	4,96	5,52	5,31 /	0,09	0,22	-0,83	-0,58
max diam	11	6	4,69	5,8	5,26 /	0,18	0,45	-0,11	-1,83
max diam	12	4	5,04	5,3	5,14 /	0,06	1,11	0,11	1,85
max diam	13	4	5,22	5,92	5,59 /	0,15	0,30	-0,23	-1,52
max diam	14	2	5,36	5,69	5,52 /	0,17	0,24	,	,

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
max rag	1	11	0,73	0,95	0,86 **	0,02	0,07	-0,89	-0,62
max rag	2	22	0,95	1,39	1,17 **	0,03	0,14	0,05	-1,17
max rag	3	12	1,35	1,52	1,45 **	0,02	0,06	-0,50	-1,21
max rag	4	16	1,49	1,96	1,72 /	0,04	0,15	0,01	-1,00
max rag	5	14	1,74	2,22	1,94 /	0,05	0,18	0,44	-1,68
max rag	6	8	1,97	2,38	2,20 /	0,05	0,15	-0,62	-0,90
max rag	7	10	2,19	2,54	2,38 /	0,04	0,12	-0,24	-1,28
max rag	8	8	2,36	2,78	2,60 /	0,06	0,16	-0,43	-1,56
max rag	9	10	2,35	2,95	2,59 /	0,06	0,20	0,83	-0,19
max rag	10	6	2,59	3,12	2,82 /	0,07	0,18	0,72	1,10
max rag	11	6	2,48	3,15	2,83 /	0,11	0,27	-0,55	-1,55
max rag	12	4	2,71	2,89	2,80 /	0,04	0,09	0,03	-4,66
max rag	13	4	2,82	3,2	3,05 /	0,09	0,17	-1,03	-0,05
max rag	14	2	2,81	3,05	2,93 /	0,12	0,17	,	,
min diam	1	11	1,04	1,41	1,27 **	0,03	0,10	-1,07	1,39
min diam	2	22	1,35	2,05	1,67 **	0,04	0,19	0,18	-0,48
min diam	3	12	1,93	2,19	2,07 /	0,02	0,08	-0,22	-1,14
min diam	4	16	1,95	2,78	2,26 /	0,06	0,25	0,34	-0,66
min diam	5	14	2,28	2,87	2,51 *	0,05	0,19	0,39	-1,00
min diam	6	8	2,71	3,18	2,89 /	0,07	0,19	0,96	-0,68
min diam	7	10	2,97	3,49	3,19 /	0,06	0,21	0,30	-1,75
min diam	8	8	3,19	3,46	3,31 /	0,03	0,09	0,40	-0,39
min diam	9	10	2,77	3,61	3,27 *	0,08	0,25	-0,67	0,10
min diam	10	6	3,54	3,88	3,67 /	0,06	0,14	0,92	-0,71
min diam	11	6	2,9	3,91	3,42 /	0,16	0,38	0,03	-1,20
min diam	12	4	3,26	3,59	3,41 /	0,07	0,14	0,73	1,73
min diam	13	4	3,48	3,83	3,69 /	0,08	0,16	-0,88	-0,32
min diam	14	2	3,4	3,58	3,49 /	0,09	0,13	,	,

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
min rag	1	11	0,48	0,68	0,60	0,02	0,06	-0,35	0,17
					**				
min rag	2	22	0,62	0,89	0,76	0,02	0,09	0,02	-1,12
					**				
min rag	3	12	0,91	1,02	0,96	0,01	0,04	0,22	-0,93
					/				
min rag	4	16	0,82	1,26	1,03	0,03	0,13	-0,17	-1,02
					/				
min rag	5	14	0,97	1,3	1,14	0,03	0,12	0,01	-1,69
					*				
min rag	6	8	1,22	1,49	1,32	0,03	0,09	1,15	0,96
					/				
min rag	7	10	1,33	1,64	1,48	0,04	0,12	0,01	-1,49
					/				
min rag	8	8	1,44	1,54	1,49	0,01	0,04	-0,01	-1,27
					/				
min rag	9	10	1,07	1,65	1,45	0,06	0,19	-0,97	0,30
					/				
min rag	10	6	1,47	1,8	1,65	0,04	0,11	-0,53	1,12
					/				
min rag	11	6	1,44	1,77	1,59	0,05	0,12	0,49	-0,38
					/				
min rag	12	4	1,44	1,72	1,56	0,06	0,12	0,65	-0,89
					/				
min rag	13	4	1,61	1,77	1,72	0,04	0,07	-1,72	3,16
					/				
min rag	14	2	1,46	1,63	1,55	0,09	0,12	,	,
perimetro	1	11	4,98	7,78	6,04	0,21	0,71	1,27	3,79
					**				
perimetro	2	22	6,69	14,32	10,18	0,48	2,23	0,19	-0,62
					**				
perimetro	3	12	11,32	16,15	13,67	0,46	1,58	0,07	-1,42
					/				
perimetro	4	16	12,22	17,87	14,68	0,42	1,69	0,37	-1,02
					*				
perimetro	5	14	14,68	21,16	17,40	0,56	2,11	0,68	-0,82
					/				
perimetro	6	8	16,51	21,93	18,88	0,65	1,84	0,41	-0,44
					/				
perimetro	7	10	17,1	29,23	21,28	1,21	3,81	0,92	0,54
					/				
perimetro	8	8	20,65	26	21,96	0,62	1,75	2,17	5,13
					/				
perimetro	9	10	21,72	32,57	24,28	0,99	3,12	2,43	6,73
					/				
perimetro	10	6	20,83	24,64	23,30	0,65	1,59	-0,81	-0,97
					/				
perimetro	11	6	21,16	33,5	25,10	2,09	5,12	1,20	-0,34
					/				
perimetro	12	4	22,07	24,94	23,22	0,61	1,22	1,28	2,44
					/				
perimetro	13	4	19,6	33,67	26,59	3,61	7,23	0,01	-5,48
					/				
perimetro	14	2	21,7	23,67	22,68	0,98	1,39	,	,

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
W otolite	1	11	0,4	1,1	0,84 **	0,08	0,28	-0,69	-1,33
W otolite	2	22	1,1	3	1,90 **	0,11	0,52	0,31	-0,44
W otolite	3	12	2,4	4	3,18 **	0,15	0,52	-0,05	-1,03
W otolite	4	16	3,4	6,2	4,85 *	0,24	0,97	0,02	-1,47
W otolite	5	14	4,9	8,2	6,42 **	0,33	1,23	0,27	-1,39
W otolite	6	8	7,6	10,3	8,85 /	0,36	1,01	0,12	-1,23
W otolite	7	10	9,2	14,2	10,96 /	0,61	1,93	0,81	-1,05
W otolite	8	8	11,4	15,9	13,84 /	0,58	1,64	-0,73	-0,57
W otolite	9	10	11,2	19	14,40 /	0,76	2,39	0,84	0,40
W otolite	10	6	19,6	36,8	26,88 /	3,17	7,76	0,72	-1,87
W otolite	11	6	12,2	17	14,58 /	0,84	2,06	-0,20	-1,86
W otolite	12	4	16,4	18,2	17,13 /	0,41	0,81	0,89	-0,68
W otolite	13	4	16	19,4	17,65 /	0,93	1,85	0,02	-5,86
W otolite	14	2	17,5	17,6	17,55	0,05	0,07	,	,
rotondità	1	11	1,36	4,43	1,74 /	0,27	0,90	3,29	10,85
rotondità	2	22	1,49	7,03	2,73 /	0,27	1,27	2,16	5,59
rotondità	3	12	2,32	4,01	3,06 /	0,16	0,56	0,40	-1,36
rotondità	4	16	2,03	4,44	2,69 /	0,15	0,61	2,03	4,31
rotondità	5	14	2,28	4,62	3,11 /	0,20	0,76	0,72	-0,93
rotondità	6	8	2,42	3,36	2,77 /	0,12	0,33	0,73	-0,58
rotondità	7	10	2,28	5,23	3,12 /	0,28	0,87	1,71	3,52
rotondità	8	8	2,51	4	2,89 /	0,17	0,48	2,18	5,25
rotondità	9	10	2,83	6,48	3,52 /	0,35	1,09	2,68	7,65
rotondità	10	6	2,24	2,85	2,59 /	0,10	0,24	-0,51	-1,08
rotondità	11	6	2,46	5,15	3,33 /	0,42	1,02	1,44	1,46
rotondità	12	4	2,64	3,07	2,88 /	0,09	0,19	-0,57	-1,17
rotondità	13	4	2,08	5,06	3,47 /	0,75	1,51	0,12	-5,11
rotondità	14	2	2,4	2,63	2,51	0,11	0,16	,	,

	età	N	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
rap. raggi	1	11	1,3	1,55	1,44	0,03	0,08	-0,52	-0,91
					/				
rap. raggi	2	22	1,26	1,84	1,54	0,03	0,14	0,45	0,53
					/				
rap. raggi	3	12	1,47	1,57	1,52	0,09	0,03	0,12	-0,74
					/				
rap. raggi	4	16	1,48	2,21	1,68	0,05	0,19	1,91	3,53
					/				
rap. raggi	5	14	1,57	1,83	1,71	0,02	0,08	-0,14	-1,30
					/				
rap. raggi	6	8	1,52	1,85	1,66	0,04	0,11	0,31	-0,34
					/				
rap. raggi	7	10	1,45	1,83	1,62	0,03	0,11	0,52	0,89
					/				
rap. raggi	8	8	1,61	1,9	1,75	0,04	0,12	0,21	-2,07
					/				
rap. raggi	9	10	1,57	2,46	1,81	0,04	0,27	1,78	3,86
					/				
rap. raggi	10	6	1,6	1,96	1,72	0,05	0,13	1,53	2,58
					/				
rap. raggi	11	6	1,65	1,94	1,79	0,05	0,12	0,21	-2,14
					/				
rap. raggi	12	4	1,68	1,91	1,80	0,05	0,09	-0,30	1,28
					/				
rap. raggi	13	4	1,61	1,99	1,78	0,08	0,16	0,70	1,50
					/				
rap. raggi	14	2	1,87	1,92	1,90	0,03	0,04	,	,

/ non significativo

* significativo al livello del 5%

** significativo al livello dell'1%

Nelle figg. 8-9 sono riportate le regressioni del perimetro e dell'area degli asterischi sulla lunghezza totale degli esemplari. I punti vengono interpolati da una retta e presentano un elevato coefficiente di correlazione.

Fig. 8: Regressione del perimetro dell'asterisco sulla lunghezza totale degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*

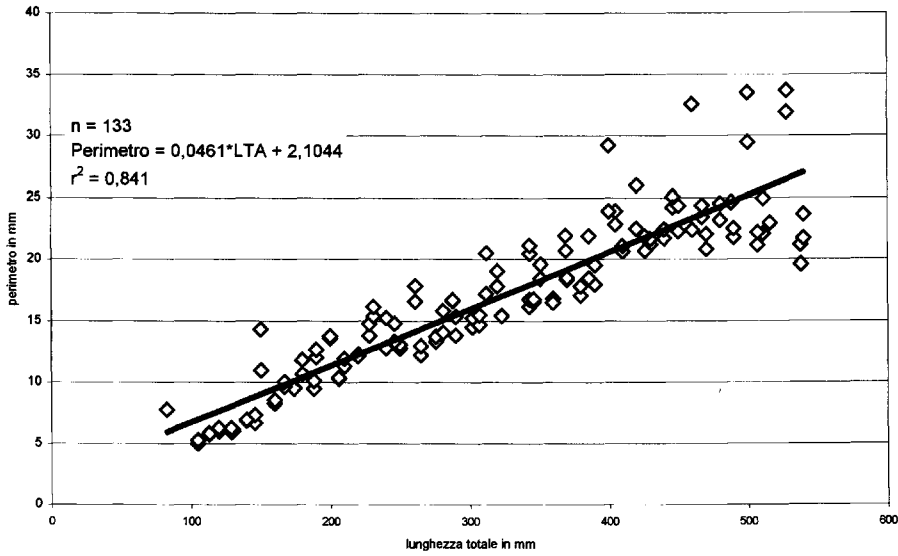
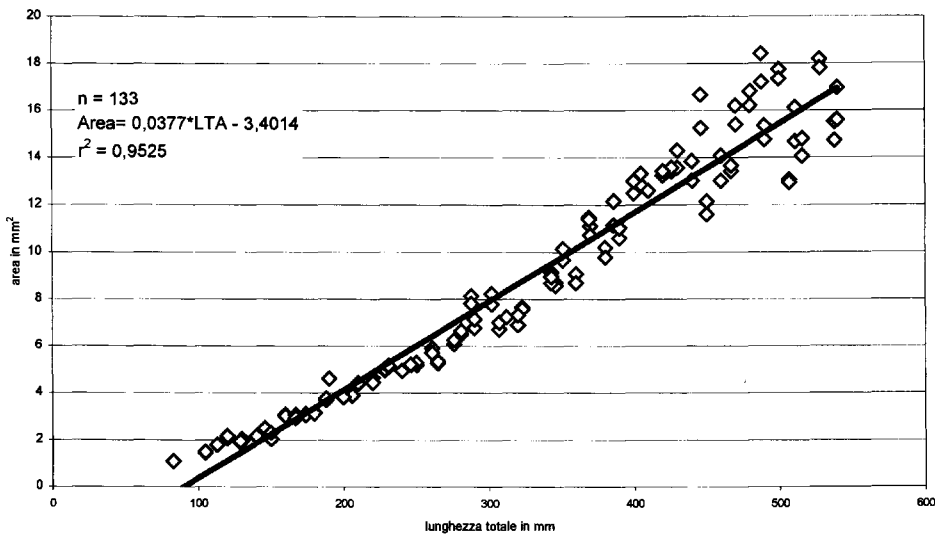


Fig. 9: Regressione dell'area dell'asterisco sulla lunghezza totale degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*



Le regressioni del perimetro e dell'area degli asterischi sul peso degli esemplari sono anche in questo caso altamente significative e sono rappresentate da un equazione di potenza (figg. 10-11).

Fig. 10: Regressione del perimetro dell'asterisco sul peso degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*

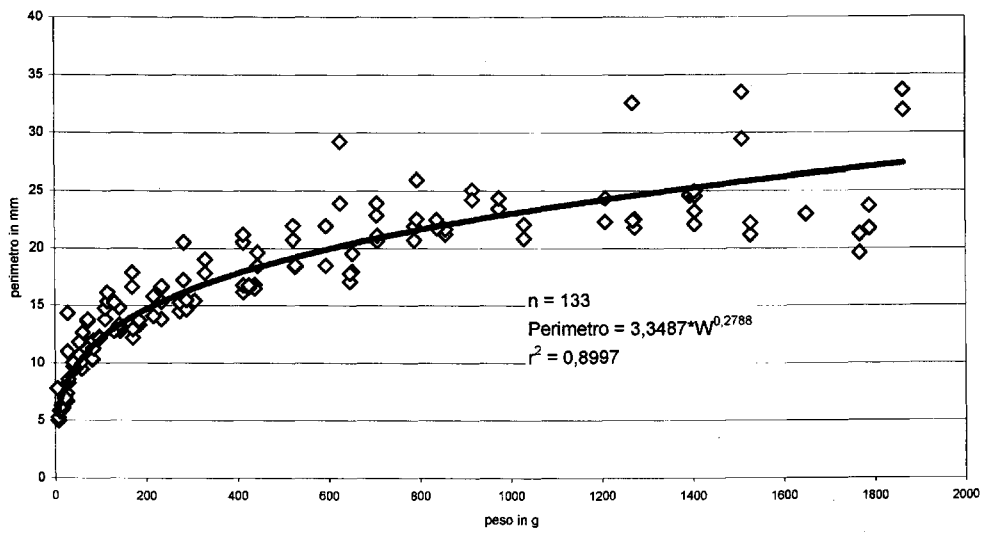
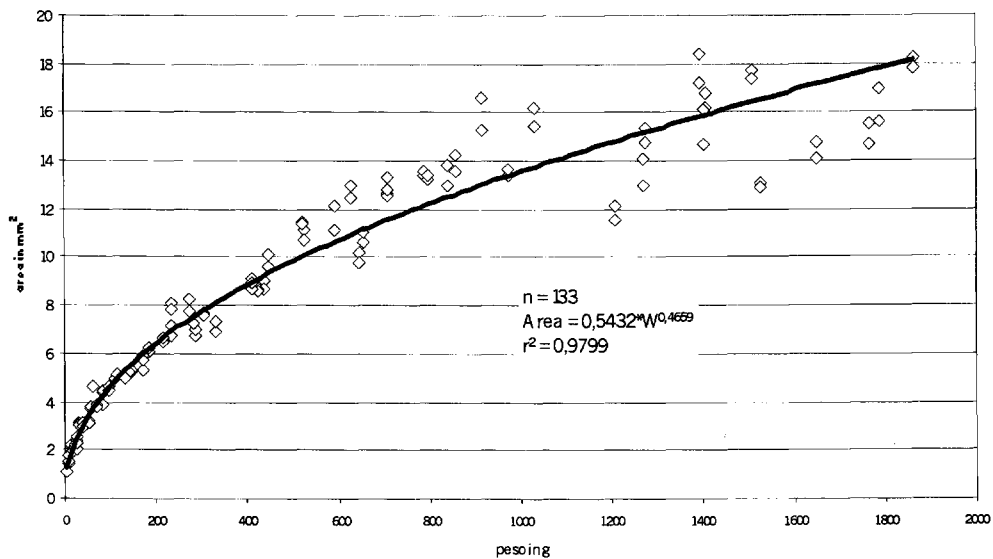


Fig. 11: Regressione dell'area dell'asterisco sul peso degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*



In figg. 12-13 sono riportate le regressioni del peso degli asterischi sulla lunghezza totale degli esemplari e del peso degli asterischi sul peso totale. Anche in queste regressioni i valori

sono stati trasformati nei rispettivi logaritmi naturali, le rette di regressione risultano quindi lineari e presentano elevatissimi coefficienti di determinazione.

Fig. 12: Regressione del peso degli asterischi sulla lunghezza totale degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*

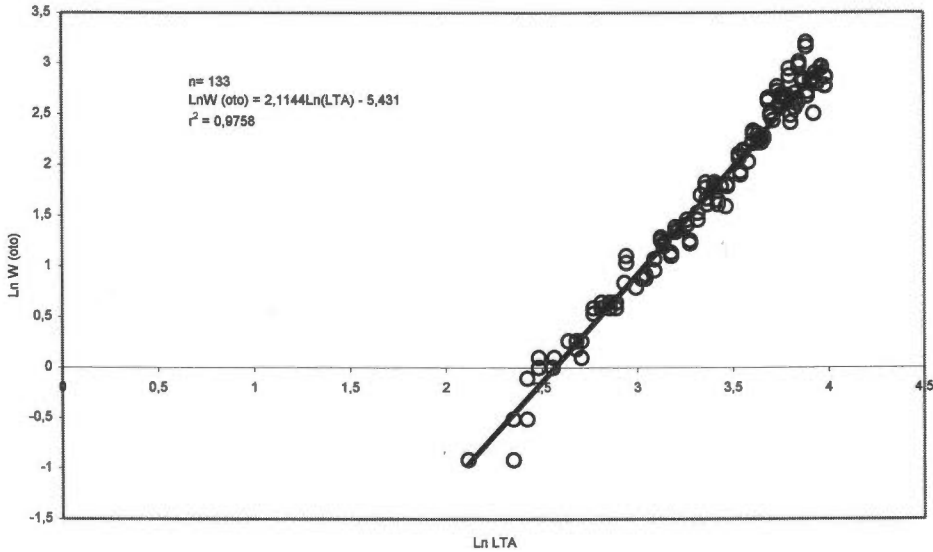
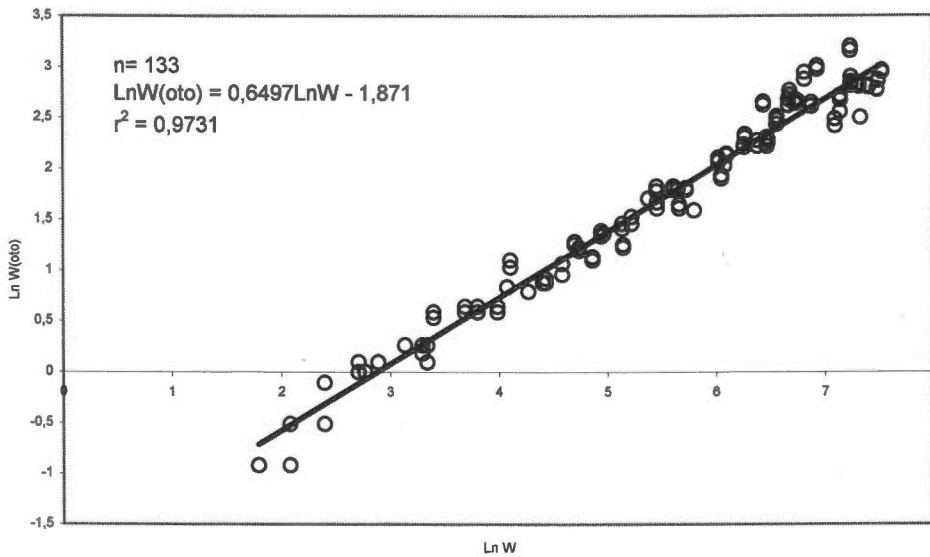


Fig. 13: Regressione del peso degli asterischi sul peso degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*



Le sagitte sono delle strutture estremamente fragili e molto spesso la sola manipolazione con le pinzette comportava la rottura di parti dell' otolite e quindi non è stato possibile rilevare,

per un significativo numero di strutture, i dati dimensionali. Nelle figg. 14-15 sono riportate le regressioni tra le variabili biometriche considerate negli esemplari di naso e il peso delle sagitte. I valori di entrambe le variabili sono stati trasformati nei logaritmi naturali e gli otoliti destro e sinistro sono stati pesati assieme. Le regressioni anche in questo caso presentavano elevatissimi coefficienti di determinazione.

Fig. 14: Regressione del peso delle sagitte sulla lunghezza totale di *Chondrostoma nasus nasus*

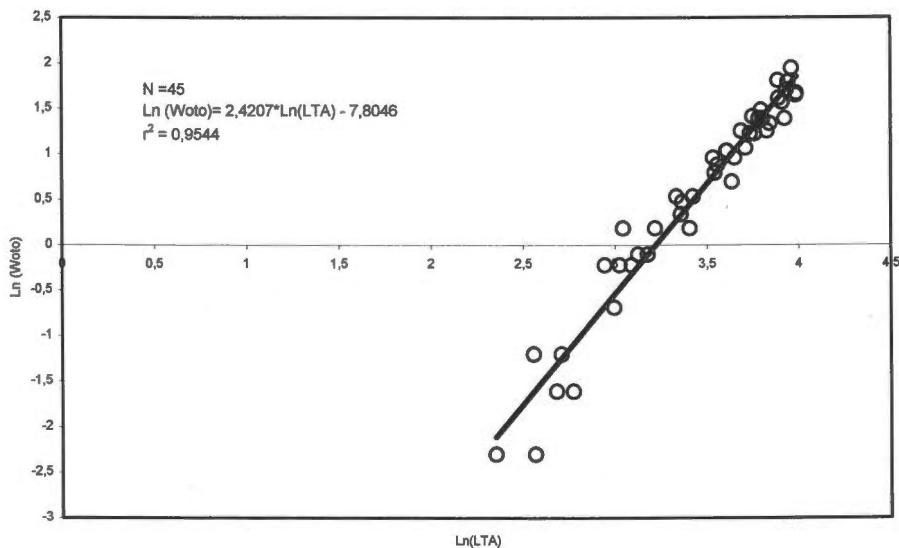
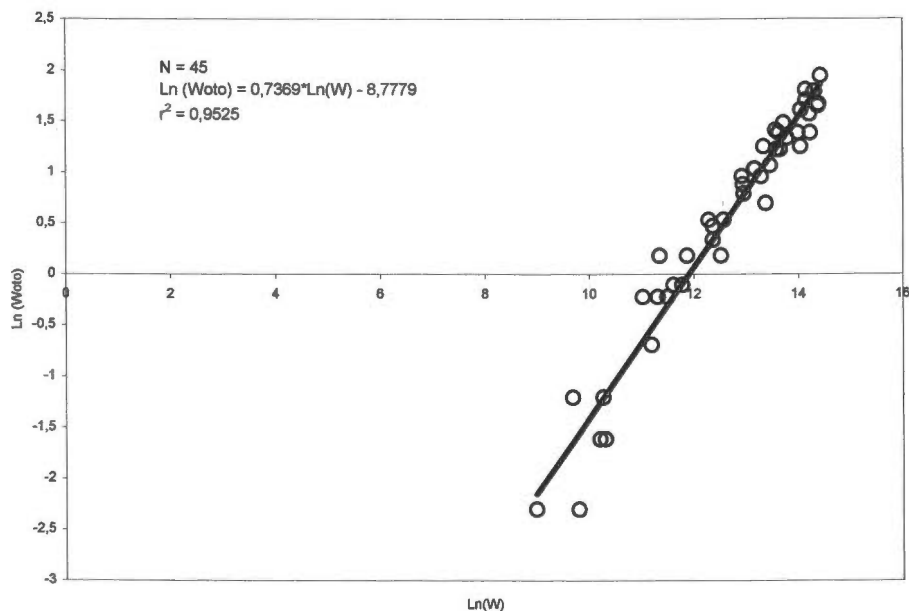


Fig. 15: Regressione del peso delle sagitte sul peso degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*



Analisi microelementare

E' stata analizzata la composizione microelementare dei lapilli, degli asterischi e delle sagitte di *Chondrostoma nasus nasus* con lo scopo di testare queste strutture come indicatori dell'ambiente. A tal fine come precedentemente detto sono stati presi in esame 11 elementi: alluminio (Al), calcio (Ca), rame (Cu), ferro (Fe), potassio (K), magnesio (Mg), sodio (Na), fosforo (P), zolfo (S), stronzio (Sr) e zinco (Zn). La scelta degli elementi indagati è stata suggerita dalla letteratura (Kalish, 1989; Kalish et Al., 1996; Edmonds et Al., 1989; Edmonds et Al., 1994; Gauldie et Al., 1986; Hoff e Fuiman, 1995) e da precedenti studi svolti presso il laboratorio di Ittiologia e Plancton dell'Università di Trieste per alcune specie dulciaquicole (Adami et Al., 1999; Miletic et Al., in stampa).

Poiché la tecnica utilizzata (ICP-AES) non permetteva un accurato rilevamento delle concentrazioni microelementari da ogni singolo otolite, i campioni impiegati per l'analisi sono stati raggruppati secondo il seguente criterio: tipo di otolite, classe d'età, sesso e sito di provenienza. Sono stati così sottoposti all'esame 33 campioni di lapilli e 29 di asterischi. Le sagitte sono state raggruppate soltanto per sito di provenienza e quindi sono stati analizzati 4 campioni. Per queste strutture non si è potuto seguire il criterio sopraddetto poiché essendo molto leggere e fragili, sono state analizzate soltanto quelle che dopo l'estrazione presentavano entrambe le sagitte integre. A causa del loro peso (circa 3,5 mg ciascuna) ogni campione era costituito da circa 40 otoliti.

I campioni analizzati sono stati suddivisi per tipo di otolite perché si è visto che la presenza dei diversi allomorfi del carbonato di calcio rende queste strutture diversamente affini ai vari elementi (Chesney et Al., 1998; Brown e Severin 1999); la distinzione per classi d'età è stata effettuata perché in letteratura risulta che in alcune specie l'accumulo degli elementi è influenzato dall'età degli individui (Miletic, 1999; Papadopoulou et Al., 1976; 1980; Grady et Al., 1989). Si sono distinti poi per sesso, nelle classi d'età in cui diventano sessualmente maturi, per valutare l'eventuale influenza che i cambiamenti ormonali possono esercitare sull'accumulo di alcuni elementi (Miletic et Al., in stampa); infine la distinzione per sito di provenienza è stata effettuata per valutare l'influenza dell'ambiente sul bioaccumulo negli otoliti (Campana et Al., 1994; Kalish, 1990).

Nelle tabelle 11, 12 e 13 sono riportate le statistiche generali della concentrazione degli elementi rilevati distinte per ciascun tipo di otolite; il calcio essendo l'elemento preponderante è stato espresso in %, mentre gli altri elementi sono riportati in ppm ($\mu\text{g/g}$).

Tab. 11: Statistiche generali delle concentrazioni degli elementi rilevati sui lapilli

	N	min	max	media	err.std.	dev.std	asim.		curt.	
AL	33	0,26	7,05	1,24	0,34	1,93	2,40	**	4,82	**
CA	33	12,29	50,77	35,72	1,35	7,73	-0,56	/	1,55	/
CU	33	1,57	3,55	1,94	0,09	0,52	1,45	**	1,56	**
FE	33	0,52	13,6	2,78	0,65	3,74	1,80	**	2,18	**
K	33	382,39	1912,22	1087,20	43,29	248,67	0,46	/	4,38	**
MG	33	7,85	85,01	16,00	3,01	17,32	3,31	**	10,51	**
NA	33	1288	7900,49	4078,67	180,72	1038,15	1,12	**	6,48	**
P	33	55,53	215,21	117,86	4,38	25,15	1,49	**	7,14	**
S	33	179,69	691,75	387,28	13,13	75,41	1,61	**	9,70	**
SR	33	189,61	823,22	398,70	24,07	138,27	1,14	**	1,64	*
ZN	33	0,52	12,75	4,33	0,65	3,75	0,84	*	-0,35	/

Tab. 12: Statistiche generali delle concentrazioni degli elementi rilevati sugli asterischi

	N	min	max	media	err.std.	dev.std	asim.		curt.	
AL	29	15,09	0,26	15,35	1,07	2,92	4,58	**	22,25	**
CA	29	24,01	41,20	34,25	0,87	4,69	-0,57	/	-0,41	/
CU	29	1,57	10,28	2,52	0,32	1,67	3,68	**	16,05	**
FE	29	0,52	7,56	1,13	0,32	1,73	2,92	**	7,82	**
K	29	195,85	431,05	280,03	9,35	50,37	0,80	/	1,73	*
MG	29	265,26	980,01	371,32	23,08	124,30	4,43	**	22,16	**
NA	29	1039,44	1443,97	1273,25	19,40	104,44	-0,57	/	-0,12	/
P	29	76,38	153,19	104,07	3,35	18,05	0,96	*	1,39	/
S	29	336,51	518,23	374,33	6,02	32,42	3,24	**	14,07	**
SR	29	24,76	77,29	44,42	2,33	12,55	0,44	/	0,11	/
ZN	29	0,52	23,77	3,26	0,96	5,16	2,83	**	8,93	**

Tab. 13: Statistiche generali delle concentrazioni degli elementi rilevati sulle sagitte

	N	min	max	media	err.std.	dev.std	asim.		curt.	
AL	4	0,26	3,47	1,06	0,80	1,61	2,00	*	4,00	/
CA	4	27,78	37,92	33,50	2,15	4,29	-0,81	/	0,86	/
CU	4	1,57	1,57	1,57	0,00	0,00				
FE	4	0,52	5,49	1,76	1,24	2,49	2,00	/	4,00	/
K	4	984,84	1093,75	1043,10	23,96	47,92	-0,35	/	-1,75	/
MG	4	8,97	31,00	15,25	5,27	10,53	1,97	/	3,89	/
NA	4	3757,81	3991,06	3885,19	48,38	96,76	-0,64	/	1,31	/
P	4	272,08	398,35	316,85	28,95	57,90	1,37	/	1,36	/
S	4	413,07	454,26	433,44	9,06	18,12	0,05	/	-2,08	/
SR	4	377,80	673,05	522,54	76,33	152,66	0,03	/	-5,53	*
ZN	4	1,93	9,74	4,14	1,87	3,74	1,97	/	3,90	/

/ non significativo

* significativo al livello del 5%

** significativo al livello dell'1%

Dalle tabelle si evince che il sodio è l'elemento che, dopo il calcio, si trova in concentrazione maggiore. La quantità di magnesio sembra invece dipendere strettamente dalla struttura cristallina assunta dal carbonato di calcio: infatti vi è una differenza di circa un ordine di

grandezza nella concentrazione di questo elemento tra gli otoliti di aragonite e quelli di vaterite. Nei lapilli e nelle sagitte la concentrazione media è rispettivamente 16 e 15,25 ppm, mentre negli asterischi è 371,32 ppm.

Nelle sagitte inoltre non è stato possibile determinare la concentrazione del rame a causa dei limiti di rilevabilità dello strumento.

In fig. 16 sono rappresentate sottoforma di boxplot, al fine di visualizzare la struttura delle distribuzioni statistiche e di avere un'immediata rappresentazione del grado di normalità della distribuzione e del suo livello di asimmetria, le concentrazioni degli elementi investigati, ad eccezione del calcio, per ogni tipo di otolite. La suddivisione in gruppi di elementi (alluminio-rame-ferro-zinco; potassio-sodio; magnesio-fosforo-zolfo-stronzio) è stata compiuta sia per la loro affinità chimica che per i valori di concentrazione.

Dall'analisi della varianza delle concentrazioni degli elementi distinti per classi di età, calcolata con il metodo di Games-Howell che non richiede come assunto l'omogeneità delle varianze, si è visto che non vi è alcuna differenza significativa nei confronti tra le diverse classi d'età.

Per verificare invece eventuali differenze nella concentrazione tra i due sessi è stato utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis. Anche in questo caso non è emersa nessuna differenza significativa nella concentrazione di tutti gli 11 elementi investigati.

Nelle figg. 17-18 sono riportate sottoforma di boxplot le concentrazioni elementari nei lapilli e negli asterischi distinte per sito di provenienza.

In tab. 14 sono riportate le statistiche generali della concentrazione elementare nei lapilli distinguendo però il sito di provenienza degli esemplari. Dal test non parametrico di Kruskal-Wallis si evince che vi sono differenze nella concentrazione dell'alluminio, ferro, fosforo, stronzio e zinco. In tab. 15 sono riportate lo stesso tipo di statistiche eseguite però sulle concentrazioni rilevate negli asterischi specificando il sito di provenienza. Si sono riscontrate differenze nella concentrazione del calcio, del ferro, del potassio, del magnesio, del sodio e dello stronzio.

Per evidenziare le differenze nella concentrazione degli elementi studiati nei tre organi otolitici è stata effettuata un'analisi della varianza utilizzando il modello di Games-Howell. Dalla tab. 16 si osserva che il potassio, il magnesio, il sodio e lo stronzio presentano delle differenze statisticamente significative delle concentrazioni nei lapilli e nelle sagitte rispetto agli asterischi; le concentrazioni di fosforo risultano differenti tra tutti e tre i tipi di otolite, mentre la concentrazione di zolfo delle sagitte è significativamente differente rispetto a quella misurata nei lapilli e negli asterischi.

Fig. 16: Boxplot delle concentrazioni elementari nei lapilli (L), negli asterischi (A) e nelle sagitte (S)

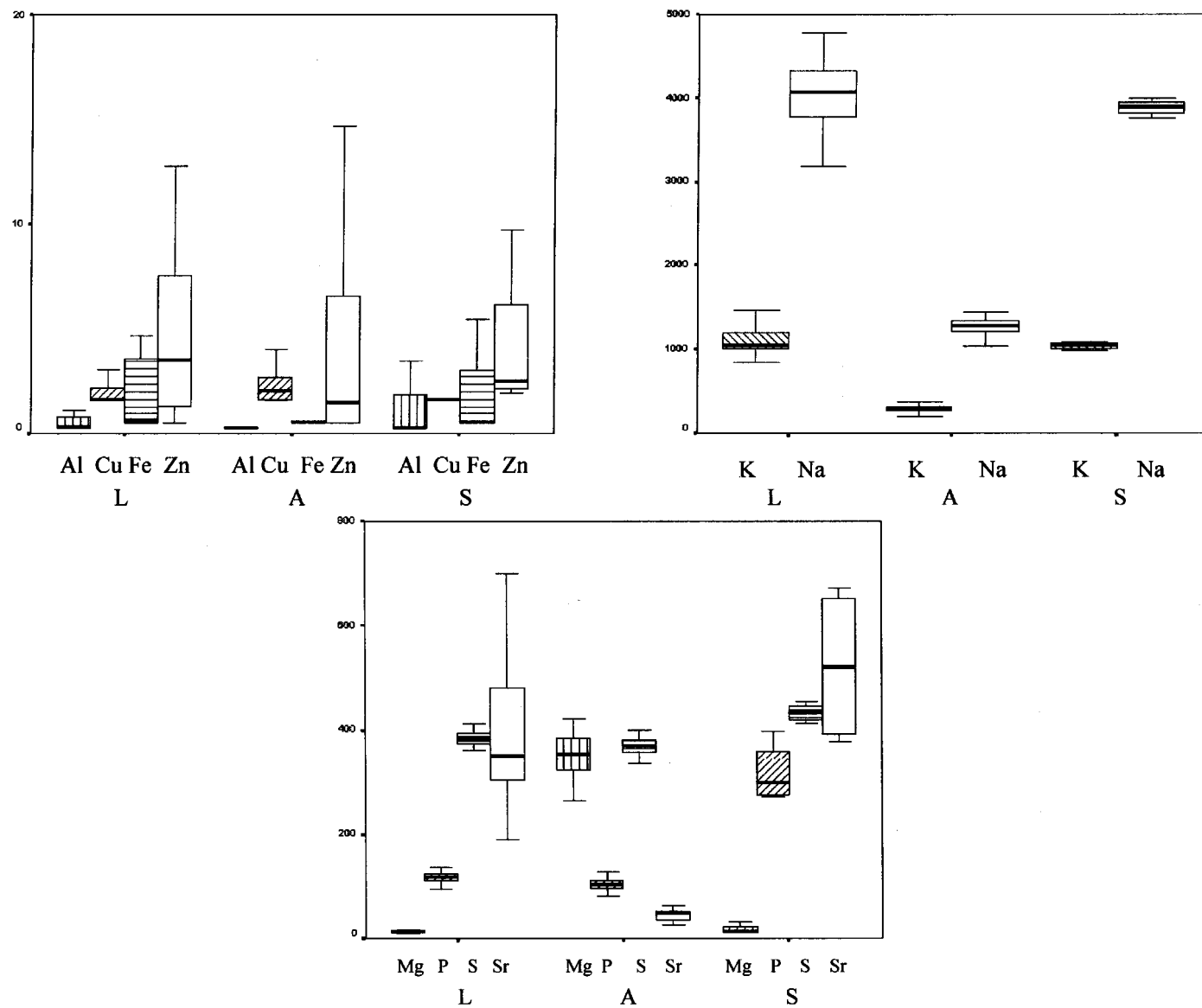


Fig. 17: Boxplot delle concentrazioni elementari nei lapilli distinte per sito di provenienza degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*

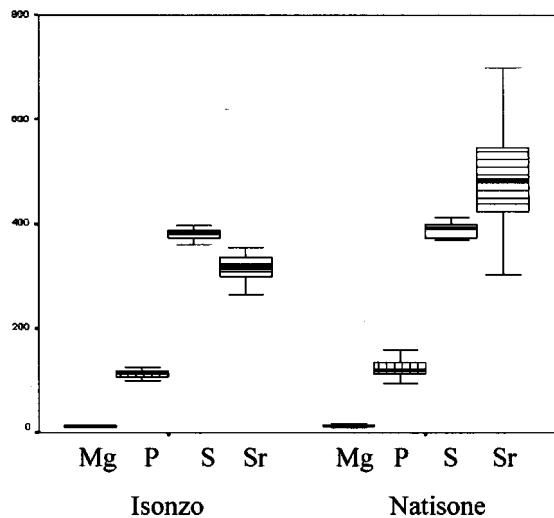
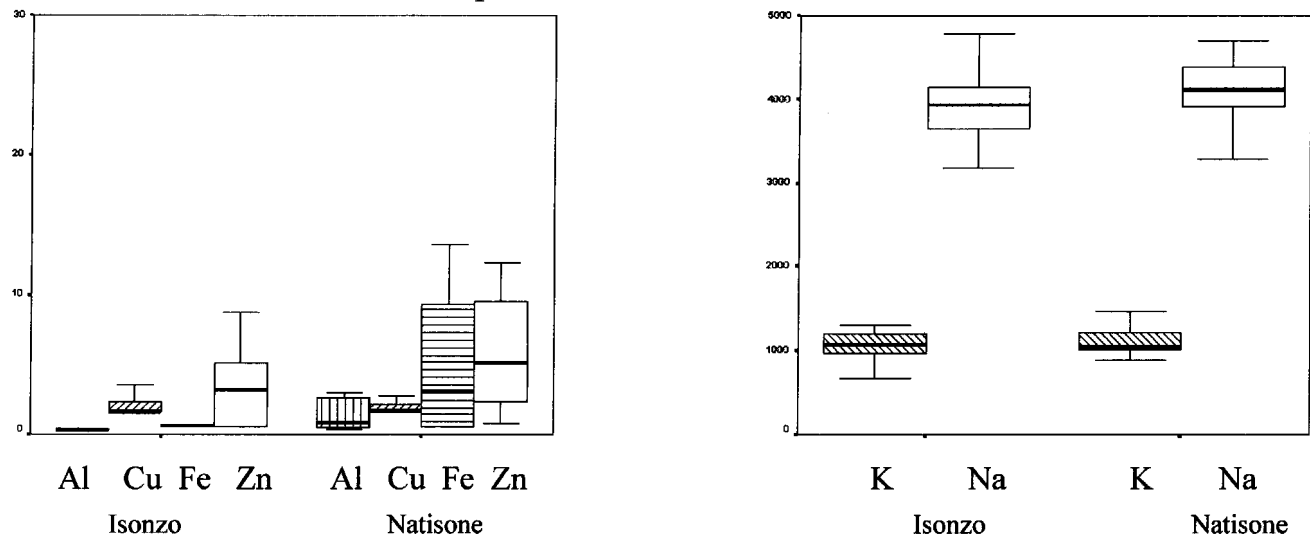
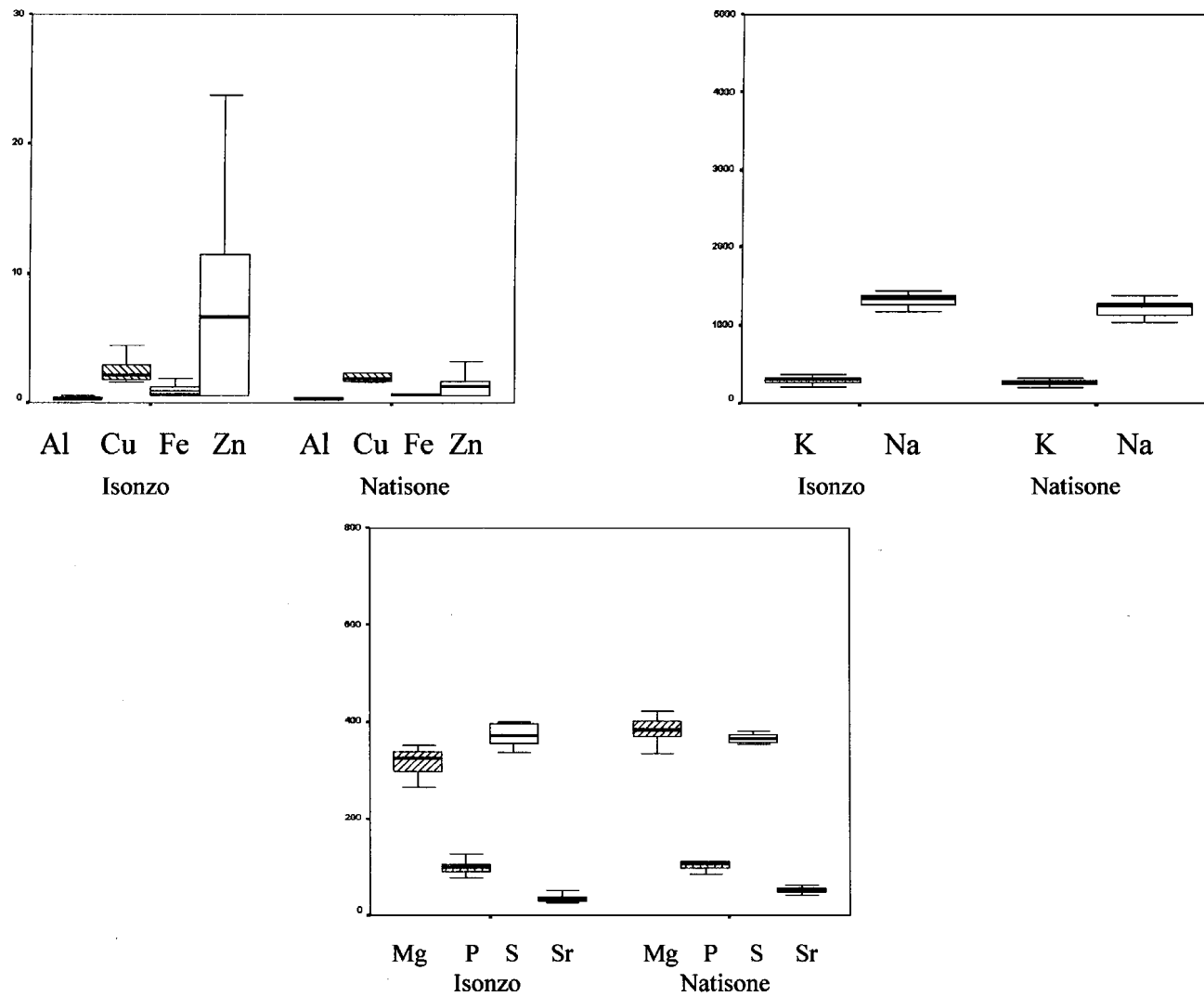


Fig. 18: Boxplot delle concentrazioni elementari negli asterischi distinte per sito di provenienza degli esemplari di *Chondrostoma nasus nasus*



Tab. 14: Statistiche generali delle concentrazioni degli elementi rilevati sui lapilli distinti nei due corsi d'acqua esaminati

	N	fiume	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
AL	17	I	0,26	2,14	0,43	0,11	0,46	3,55	13,37
					**				
AL	16	N	0,26	7,05	2,10	0,62	2,49	1,39	2,32
CA	17	I	24,26	42,63	35,78	1,07	4,42	-1,05	1,18
					/				
CA	16	N	12,29	50,77	35,65	2,58	10,33	-0,43	7,13
CU	17	I	1,57	3,55	1,98	0,15	0,62	1,45	0,12
					/				
CU	16	N	1,57	2,8	1,90	0,10	0,41	1,00	15,47
FE	17	I	0,52	4,29	0,99	0,25	1,01	2,62	1,12
					**				
FE	16	N	0,52	13,6	4,69	1,15	4,60	0,82	1,15
K	17	I	673,22	1313,59	1064,36	41,96	172,99	-0,41	10,36
					/				
K	16	N	382,39	1912,22	1111,48	78,57	314,28	0,41	1,26
MG	17	I	7,85	71,72	14,39	3,65	15,06	3,87	1,29
					/				
MG	16	N	7,85	85,01	17,71	4,95	19,79	3,11	0,43
NA	17	I	2452,7	4785,51	3924,91	143,81	592,95	-0,69	0,09
					/				
NA	16	N	1288	7900,49	4242,03	341,77	1367,08	0,85	-0,14
P	17	I	84,48	134,13	111,64	2,82	11,64	-0,48	-0,84
					*				
P	16	N	55,53	215,21	124,46	8,35	33,39	0,89	3,61
S	17	I	277,66	411,22	376,37	6,83	28,16	-2,87	9,94
					/				
S	16	N	179,69	691,75	398,87	26,23	104,91	1,08	3,99
SR	17	I	220,3	424,4	312,69	11,66	48,09	0,05	3,76
					**				
SR	16	N	189,61	823,22	490,09	36,25	145,01	0,30	4,61
ZN	17	I	0,52	12,75	3,56	0,86	3,56	1,26	1,66
					*				
ZN	16	N	0,52	12,27	5,16	0,97	3,88	0,57	-1,01

I = Fiume Isonzo

N = Fiume Natisone

/ non significativo

* significativo al livello del 5%

** significativo al livello dell'1%

Tab. 15: Statistiche generali delle concentrazioni degli elementi rilevati sugli asterischi distinti nei due corsi d'acqua esaminati

	N	fiume	min	max	media	err.std.	dev.std.	asim.	curt.
AL	15	I	0,26	15,35	1,77	1,03	3,99	3,26	2,18
					/				
AL	14	N	0,26	1,15	0,33	0,06	0,24	3,71	11,14
CA	15	I	24,01	41,07	32,62	1,18	4,57	-0,38	10,44
					*				
CA	14	N	26,81	41,2	36,00	1,15	4,31	-1,04	3,49
CU	15	I	1,57	10,28	2,81	0,57	2,22	3,10	0,02
					/				
CU	14	N	1,57	3,99	2,21	0,23	0,85	1,36	-0,38
FE	15	I	0,52	7,56	1,70	0,59	2,30	1,83	-0,22
					*				
FE	14	N	0,52	0,52	0,52	0,00	0,00		1,34
K	15	I	211,08	431,05	300,96	13,99	54,17	0,71	14,22
					*				
K	14	N	195,85	313,78	257,61	9,48	35,48	-0,36	7,17
MG	15	I	265,26	980,01	359,85	44,78	173,43	3,73	-0,52
					**				
MG	14	N	335,09	421,68	383,61	6,43	24,04	-0,25	13,80
NA	15	I	1171,6	1443,97	1324,46	20,49	79,35	-0,47	0,23
					**				
NA	14	N	1039,4	1389,55	1218,39	27,32	102,22	-0,41	0,37
P	15	I	76,38	128,13	98,77	3,82	14,78	0,05	
					/				
P	14	N	83,81	153,19	109,75	5,34	19,99	1,18	-0,43
S	15	I	336,51	518,23	382,03	11,21	43,43	2,31	-0,08
					/				
S	14	N	353,48	382,03	366,09	2,56	9,57	0,32	-0,51
SR	15	I	24,76	51,84	35,61	2,08	8,04	0,60	0,73
					**				
SR	14	N	40,36	77,29	53,86	2,45	9,18	1,17	-1,17
ZN	15	I	0,52	23,77	4,94	1,75	6,76	1,86	2,30
					/				
ZN	14	N	0,52	4,03	1,45	0,30	1,13	1,22	0,62

I = Fiume Isonzo

N = Fiume Natisone

/ non significativo

* significativo al livello del 5%

** significativo al livello dell'1%

Tab. 16: Confronto delle concentrazioni degli elementi nei tre tipi di otolite

			Diff. Medie	Err. Std	p
AL	lapillo	asterisco	0,1643	0,613	0,964
		sagitta	0,1745	1,275	0,978
	asterisco	lapillo	-0,1643	0,613	0,964
		sagitta	1,014E-02	1,284	1
	sagitta	lapillo	-0,1745	1,275	0,978
		asterisco	-1,0142E-02	1,284	1
CA	lapillo	asterisco	1,4626	1,631	0,635
		sagitta	2,2141	3,392	0,675
	asterisco	lapillo	-1,4626	1,631	0,635
		sagitta	0,7516	3,417	0,944
	sagitta	lapillo	-2,2141	3,392	0,675
		asterisco	-0,7516	3,417	0,944
CU	lapillo	asterisco	-0,5793	0,304	0,198
FE	lapillo	asterisco	1,6488	0,752	0,07
		sagitta	1,0181	1,564	0,761
	asterisco	lapillo	-1,6488	0,752	0,07
		sagitta	-0,6307	1,575	0,88
	sagitta	lapillo	-1,0181	1,564	0,761
		asterisco	0,6307	1,575	0,88
K	lapillo	asterisco	807,1732(*)	45,989	0
		sagitta	44,1079	95,659	0,65
	asterisco	lapillo	-807,1732(*)	45,989	0
		sagitta	-763,0654(*)	96,369	0
	sagitta	lapillo	-44,1079	95,659	0,65
		asterisco	763,0654(*)	96,369	0
MG	lapillo	asterisco	-355,3198(*)	21,334	0
		sagitta	0,75	44,376	0,992
	asterisco	lapillo	355,3198(*)	21,334	0
		sagitta	356,0698(*)	44,706	0
	sagitta	lapillo	-0,75	44,376	0,992
		asterisco	-356,0698(*)	44,706	0
NA	lapillo	asterisco	2805,4148(*)	189,232	0
		sagitta	193,4796	393,613	0,561
	asterisco	lapillo	-2805,4148(*)	189,232	0
		sagitta	-2611,9352(*)	396,536	0
	sagitta	lapillo	-193,4796	393,613	0,561
		asterisco	2611,9352(*)	396,536	0
P	lapillo	asterisco	13,7857(*)	6,368	0,04
		sagitta	-198,9949(*)	13,245	0,012
	asterisco	lapillo	-13,7857(*)	6,368	0,04
		sagitta	-212,7805(*)	13,343	0,01
	sagitta	lapillo	198,9949(*)	13,245	0,012
		asterisco	212,7805(*)	13,343	0,01

continua

segue tab. 16

			Diff. Medie	Err. Std	p
S	lapillo	asterisco	12,9422	14,779	0,646
		sagitta	-46,1652(*)	30,741	0,023
	asterisco	lapillo	-12,9422	14,779	0,646
		sagitta	-59,1074(*)	30,969	0,004
	sagitta	lapillo	46,1652(*)	30,741	0,023
		asterisco	59,1074(*)	30,969	0,004
SR	lapillo	asterisco	354,2815(*)	26,563	0
		sagitta	-123,8413	55,253	0,372
	asterisco	lapillo	-354,2815(*)	26,563	0
		sagitta	-478,1227(*)	55,664	0,017
	sagitta	lapillo	123,8413	55,253	0,372
		asterisco	478,1227(*)	55,664	0,017
ZN	lapillo	asterisco	-3,4951	5,401	0,819
		sagitta	2,3025	11,235	0,698
	asterisco	lapillo	3,4951	5,401	0,819
		sagitta	5,7975	11,319	0,574
	sagitta	lapillo	-2,3025	11,235	0,698
		asterisco	-5,7975	11,319	0,574

Per determinare però quali variabili siano più importanti per caratterizzare il tipo di otolite si è ricorsi all'utilizzo di metodi di analisi multivariata. In particolare si è utilizzata l'analisi discriminante impiegando il metodo stepwise. Questa analisi, che effettua la comparazione tra i tre gruppi sulla base di tutte le variabili considerate, ha distinto correttamente il 100% dei casi indicando come fattori primari nella separazione dei tre gruppi (lapilli, asterischi e sagitte) la concentrazione dello stronzio e del potassio. In particolare però lo stronzio è risultato l'elemento discriminante degli asterischi nei confronti dei lapilli e delle sagitte, mentre il fosforo è risultato l'elemento che offre il maggior contributo nella distinzione tra i lapilli e le sagitte.

Lo stesso tipo di analisi è stata poi utilizzata per vedere se in base alle concentrazioni microelementari era possibile distinguere il corso d'acqua di provenienza degli otoliti di *Chondrostoma nasus nasus*. L'analisi discriminante effettuata distintamente per tutti e tre i tipi di otolite, esaminando però ciascun tipo separatamente, ha classificato correttamente il 100% dei casi sia nei lapilli, che negli asterischi che nelle sagitte e ha individuato la concentrazione dello stronzio quale fattore maggiormente importante per distinguere il corso d'acqua di origine in tutte e tre le strutture.

In tab. 17 sono riportati i valori medi della temperatura superficiale dell'acqua, ricavati da Agnoletti et Al. (1984a; 1984b; 1985a; 1985b; 1987; 1989; 1990), e i rapporti medi della concentrazione dello stronzio sul calcio nei tre tipi di otolite. La concentrazione dello stronzio sul calcio è infatti spesso utilizzata per risalire alla temperatura dell'acqua.

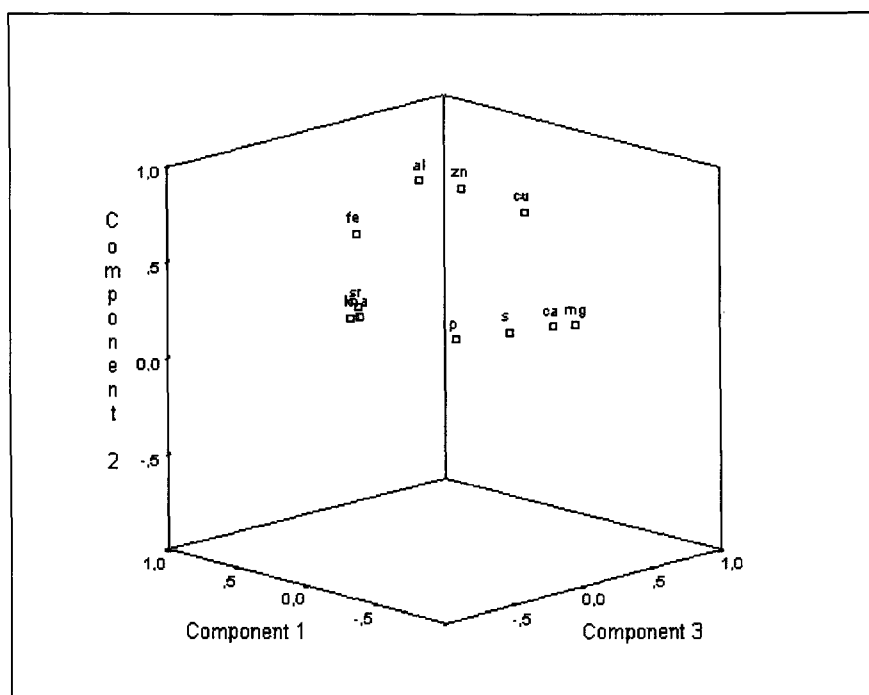
Tab. 17: Siti di campionamento, temperatura dell'acqua e rapporto Sr/Ca

	temperatura	Sr/Ca		
		lapilli	asterischi	sagitte
Isonzo	10.04	8.90E-04	1.11E-04	1.29E-04
Natisone	11.92	1.42E-04	1.52E-04	1.79E-02

Infine per ridurre il numero di variabili e individuare strutture nelle relazioni tra le variabili è stata effettuata su tutto il campione l'analisi fattoriale, utilizzando il metodo delle componenti principali. Questa analisi ha evidenziato 3 componenti principali che spiegano il 78% della varianza totale e ha creato tre sottogruppi così formati (fig. 19):

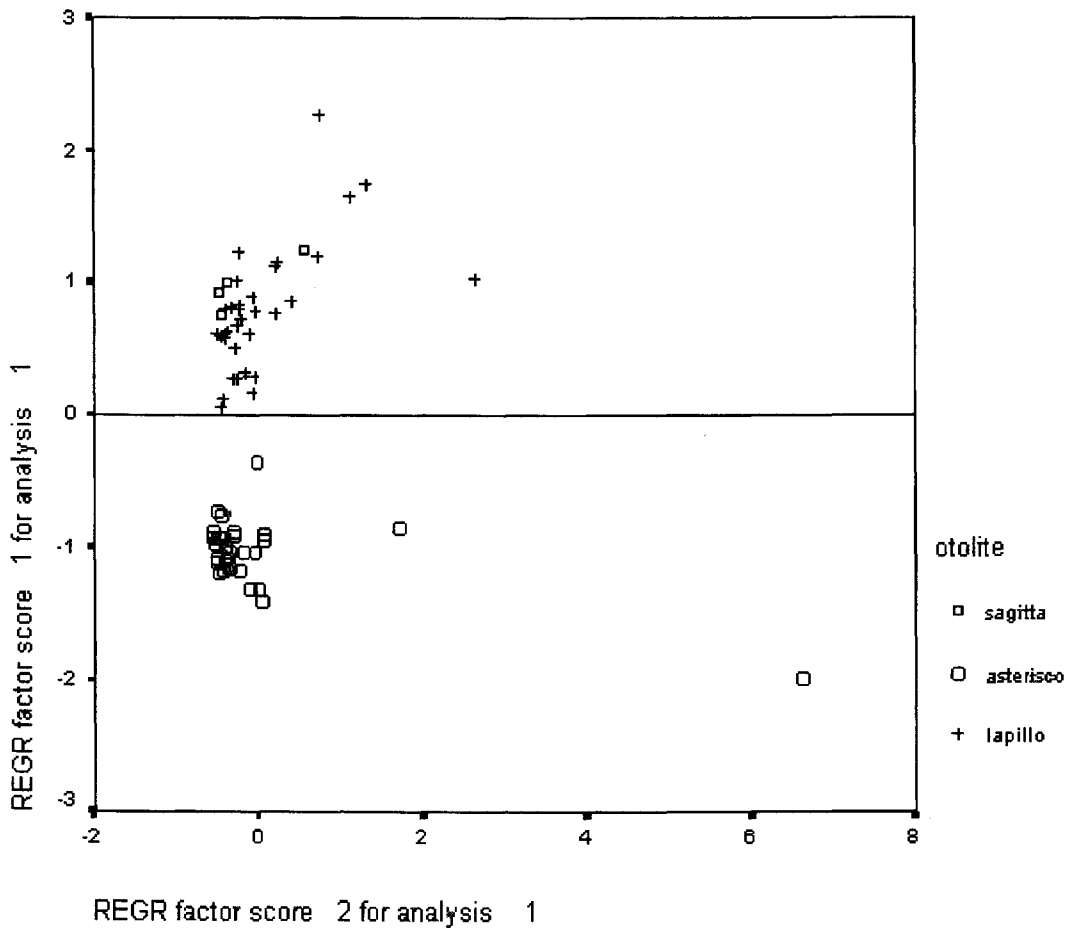
1. potassio, sodio, stronzio e magnesio (quest'ultimo con trend di concentrazione inverso)
2. alluminio, zinco, rame e ferro
3. calcio, zolfo e fosforo

Fig. 19: Analisi fattoriale delle componenti principali



I risultati dell'analisi fattoriale sono stati visualizzati nel diagramma a dispersione (fig. 20) che riporta la posizione delle varie variabili nello spazio dei fattori. Considerando solo il contributo fornito dalle prime due componenti principali (che spiegano il 65% della varianza totale) si evidenzia la distinzione degli otoliti in base alla differente mineralogia.

Fig. 20: Diagramma a dispersione in base ai risultati dell'analisi fattoriale



Analisi componente organica

Si è studiata la composizione della frazione proteica della matrice organica degli otoliti di *Chondrostoma nasus nasus*. In questa fase della ricerca sono stati utilizzati gli otoliti provenienti da esemplari catturati durante le asciutte del canale dei Dottori e della roggia di Manzano.

Tutti e tre i tipi di otolite sono stati bruciati al fine di determinare la percentuale della frazione organica. Nei lapilli la frazione organica costituiva mediamente il 2,5% del peso dell'otolite, negli asterischi il 1,7% e nelle sagitte il 2,3%.

Inoltre al fine di paragonare l'eventuale presenza di materiale proteico con i dati presenti in letteratura si sono effettuate delle analisi aminoacidiche dei tre tipi di otolite. Da come risulta dalla tabella 18 si vede che in tutti e tre i tipi la componente aminoacidica è molto simile – soltanto nei lapilli è stata individuata glicina in percentuale peraltro molto bassa - e gli aminoacidi con frequenza percentuale maggiore sono quelli acidi come riportato da Morales-Nin (1986b) e Degens et Al. (1969).

Tab. 18: Frequenza percentuale degli aminoacidi rinvenuti nei tre tipi di otolite

	Asterisco	Lapillo	Sagitta
Aspartico acido	20.08327	19.12156	23.53205
Serina	12.11286	11.00482	11.10311
Glutammico acido	13.71258	13.45136	14.96573
Glicina	9.844888	13.94399	8.184721
Istidina	1.706471	2.673085	0
Arginina	1.25594	0.963897	1.175921
Treonina	8.089813	7.288834	7.793396
Alanina	8.554327	9.343066	8.548789
Prolina	7.236911	4.931303	5.677128
Cisteina		0.080622	0
Tirosina	0.693108	1.102962	0.778756
Valina	4.907464	4.570059	4.75625
Metionina	0.771452	0.995133	1.016276
Lisina	3.906973	3.681842	5.303325
Isoleucina	1.783483	1.902873	1.95857
Leucina	3.693248	3.375011	3.527763
Fenilalanina	1.647214	1.569583	1.678218

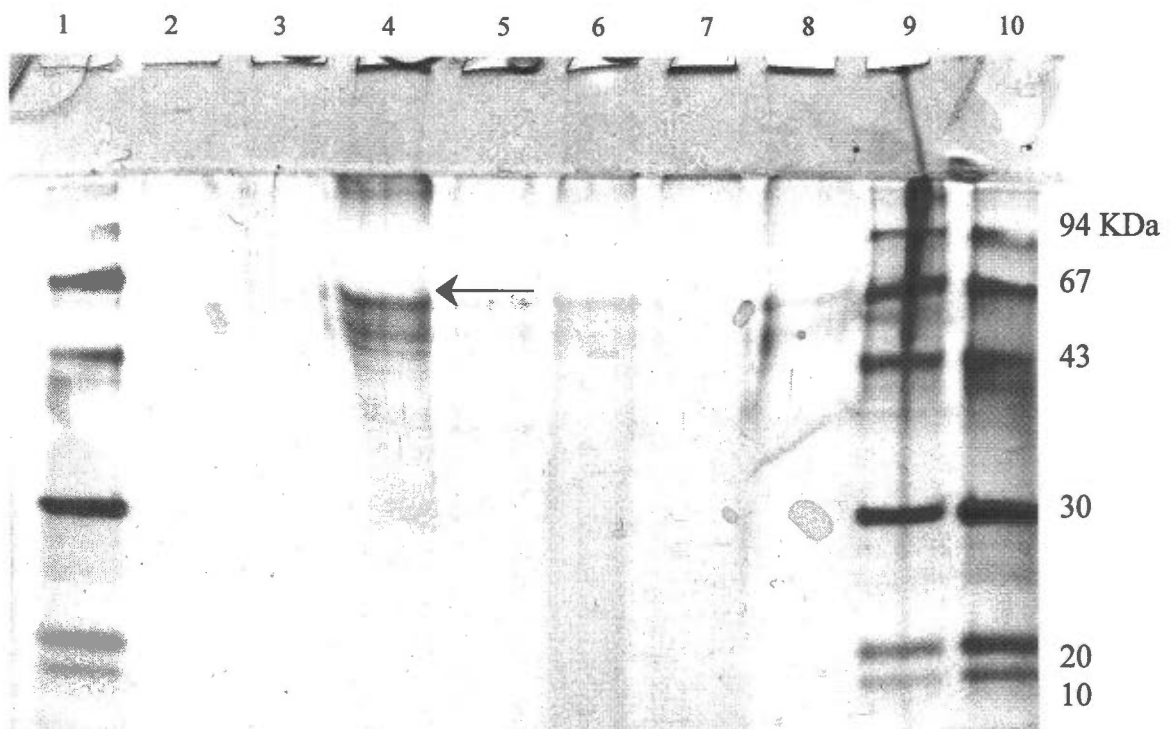
Dalla soluzione ottenuta dalla calcificazione degli otoliti attraverso l'utilizzo di una resina scambiatrice è stata dapprima, in maniera del tutto preliminare, effettuata una corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide in SDS (minigel) al fine di individuare eventuali bande e quindi provare l'esistenza in queste soluzioni di materiale proteico. Poiché sono state

individuare alcune bande evidenziate sia con l'utilizzo del colorante blue Coomassie che con colorazione argentica, si è passati alla fase successiva, che in questa fase di lavoro ha interessato soltanto gli asterischi.

Dalle soluzioni ottenute eliminando la frazione carbonatica degli asterischi sono state condotte delle cromatografie in fase liquida ad elevate prestazioni in maniera di subfrazionare la soluzione e separare maggiormente la frazione proteica della soluzione da eventuali composti organici costituenti la matrice. I campioni provenienti da numerose cromatografie sono stati utilizzati per altre corse elettroforetiche e per un'analisi di spettrometria di massa.

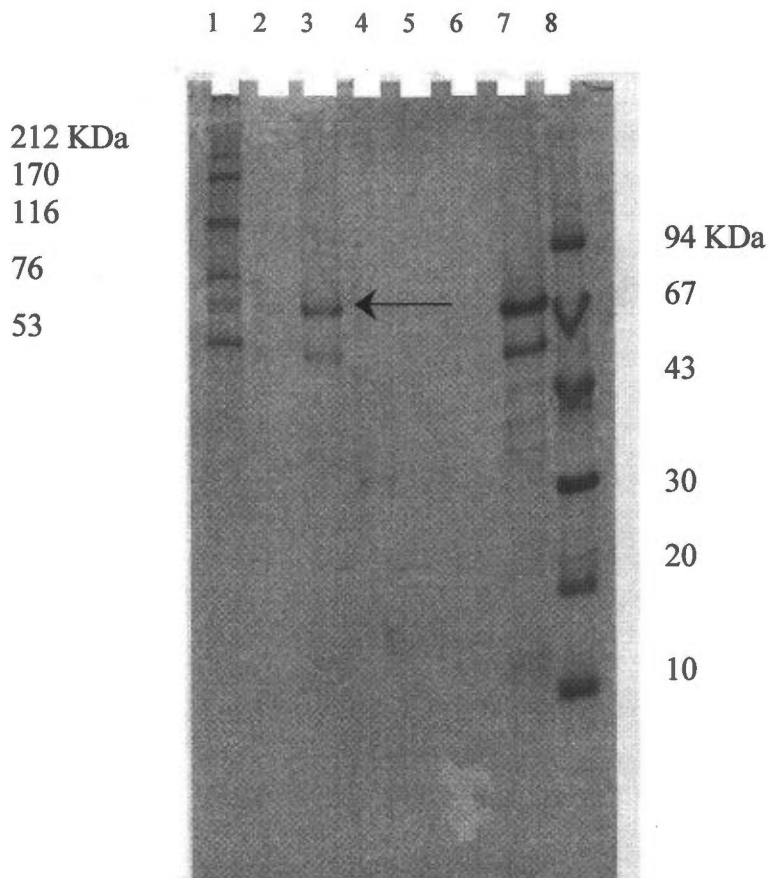
In fig. 21 è riportata l'immagine del gel di poliacrilamide in SDS (minigel) trattato con colorazione argentica, nel quale nel primo, nel nono e nel decimo pozzetto sono stati fatti correre i pesi molecolari di riferimento, nel secondo fino al sesto pozzetto sono state caricate le frazioni ricavate dalla cromatografia, mentre i pozzetti sette e otto sono vuoti. Dalla figura si nota che è presente una banda che dovrebbe corrispondere ad una proteina di circa 67 KDa.

Fig. 21: elettroforesi gel di poliacrilamide in SDS (minigel) in cui è evidenziata la banda principale



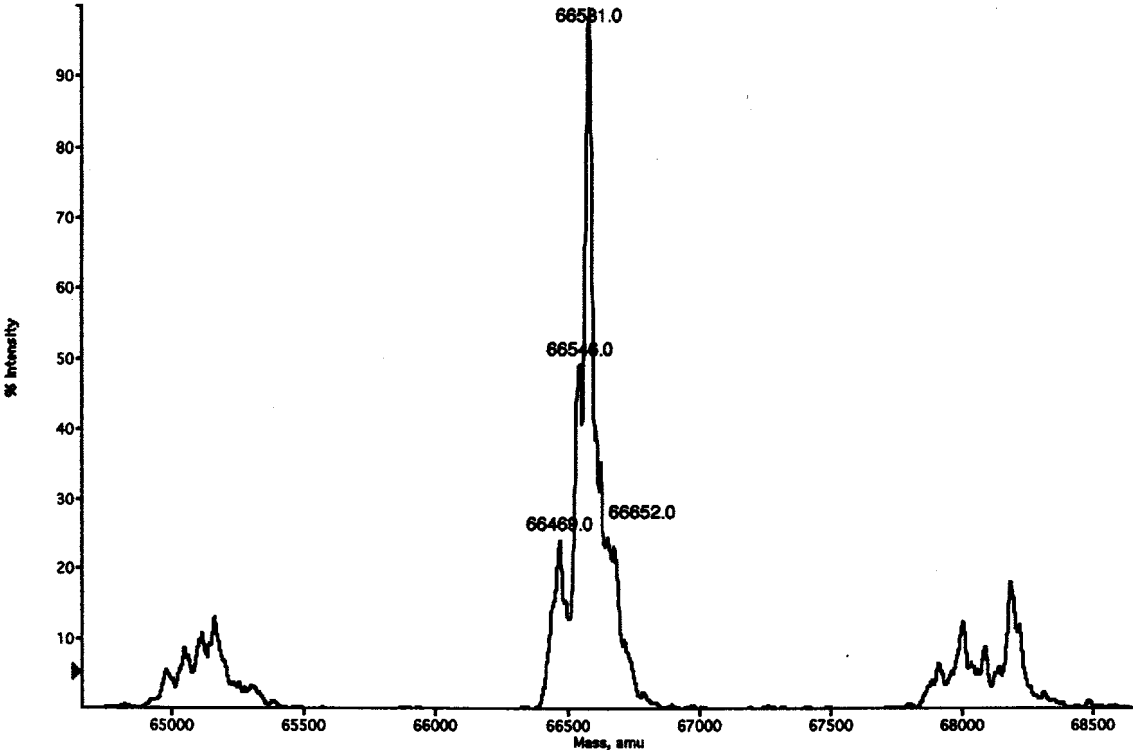
Al fine di confermare i risultati ottenuti dalle corse elettroforetiche in minigel, è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide per separare maggiormente le eventuali bande di materiale proteico (fig. 22). Nel primo e nel ottavo pozzetto sono stati caricati i pesi molecolari di riferimento, nel settimo pozzetto tutta la soluzione ottenuta dalla decalcificazione degli asterischi, mentre dal secondo al sesto pozzetto sono state caricate le frazioni ottenute dalla cromatografia. Anche in questo caso è presente nel terzo pozzetto una banda che corrisponde a 67 KDa.

Fig. 22: elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (trattato con Blue Coomassie) in cui è evidenziata la banda principale



Dall'analisi spettrometrica (fig. 23) è emerso che negli asterischi vi è una buona concentrazione di una proteina con peso molecolare di 66581 Dalton, dato confermato dalle elettroforesi.

Fig. 23: cromatogramma della frazione proteica selezionata



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questa ricerca è stata intrapresa sia in relazione all'assoluta mancanza di informazioni sulla struttura degli otoliti di *Chondrostoma nasus nasus* che in continuazione con alcuni studi che hanno interessato gli aspetti morfologici ed microelementari di alcune specie di Ciprinidi presenti nel Friuli-Venezia Giulia (Pizzul et Al., 1999; Miletic, 1999). Si è quindi cercato di inquadrare queste strutture sotto diversi aspetti in modo da evidenziare eventuali correlazioni morfo-funzionali.

La presente ricerca è iniziata con l'analisi diffrattometrica su tutti i tre tipi di otolite. Infatti alcuni Autori hanno notato che la forma assunta dal carbonato di calcio è controllata dalla matrice organica sia per quanto riguarda la conformazione cristallina, che la stabilità (Mann, 1989; Gauldie, 1993a). L'allomorfo assunto dal carbonato di calcio a causa della distanza degli ioni è importante sia nella costituzione del reticolo cristallino che nella precipitazione elementare e quindi comporta differenti affinità ai vari elementi chimici. La repulsione tra gli ioni e la matrice cristallina determina la stabilità dell'allomorfo (Evjen, 1932).

E' stato osservato in *Chondrostoma nasus nasus* che i lapilli e le sagitte sono costituiti da aragonite, mentre negli asterischi il carbonato di calcio è presente sottoforma di vaterite .

In letteratura risulta che nei Teleostei gli otoliti sono costituiti da aragonite, vaterite o calcite (Carlstrom, 1963; Palmork et Al., 1963; Mugiya, 1972; Campana, 1983; Morale-Nin, 1985; Gauldie, 1986, 1990, 1993a; Lenaz e Miletic, 2000). Aragonite e vaterite in normali condizioni sono instabili e si trasformano in calcite in tempi molto lunghi (Carlstrom, 1963). A differenza degli otoconia dei mammiferi che sono costituiti da calcite, la maggior parte delle sagitte sono composte da aragonite (Degens et Al., 1969; Mann et Al., 1983; Morales-Nin, 1986b; Lecomte-Finiger, 1992; Oliveira et Al., 1996). Non si riesce a trovare una spiegazione della schiacciante predominanza dell'aragonite: la calcite ha conformazione romboidale, mentre l'aragonite è ortorombica, sono quindi delle strutture cristalline molto simili e differiscono soprattutto nell'organizzazione delle molecole di carbonato inserite tra gli strati di calcio (Falini et Al., 1996). Piccole quantità di ioni bivalenti come Sr e Mg favoriscono la formazione dell'aragonite sulla calcite (Carlstrom, 1963), ma non è ancora noto se questa condizione è sufficiente per spiegare la presenza dell'aragonite negli otoliti (Campana, 1999). E' comunque da notare che i differenti polimorfi sembrano legati ai differenti tipi di otolite. Mentre l'aragonite è il modello per le sagitte e i lapilli, la maggior parte degli asterischi è di vaterite (Lowerstam e Weiner, 1989, Oliveira et Al., 1996). La vaterite è inoltre il principale polimorfo che si riscontra in forme aberranti (Mugiya, 1972;

Gauldie 1986) e si può ritrovare in regioni circoscritte di otoliti aragonitici (Strong et Al., 1986; Brown e Severin, 1999), mentre regioni costituite da calcite sono molto più rare (Davies et Al., 1988). Gauldie (1993a) riporta l'esistenza di otoliti polimorfici costituiti da aragonite, vaterite e calcite.

Nel corso dello studio è stato osservato che sia le sagitte che i lapilli e gli asterischi presentano le stesse modalità di formazione e accrescimento prendendo forma da primordia e accrescendosi per continua apposizione di nuova sostanza sulla superficie in accordo con quanto riportato da Gauldie e Nelson (1990). Nella crescita dei cristalli sono state notate delle discontinuità dovute, probabilmente per quanto riportato da Campana (1984), Neilson et Al., (1985) e Geffen (1996), sia a fattori endogeni (metamorfosi, riassorbimento del sacco vitellino, periodo riproduttivo), che esogeni (migrazioni, stress ambientali).

Mentre la forma allomorfica dei cristalli riflette la geometria della matrice (gli angoli di legame tra il calcio e il carbonato), l'abito assunto dal cristallo dipende dalla grandezza della faccia dello stesso che a sua volta è determinata dalla velocità di cristallizzazione, dalla temperatura e dalla viscosità del liquido endolinfatico (Li et Al., 1991). I cristalli di aragonite di *Chondrostoma nasus nasus* presentano abito prismatico a cristalli gemminati, mentre negli asterischi del naso la vaterite è sempre presente con abito botroidale.

In tutti e tre i tipi di otolite è stata osservata la matrice organica che si presenta come una maglia di fibre che si sviluppano perpendicolarmente agli incrementi di crescita. Zhang (1992) riporta una maggior concentrazione di fibre nelle zone di discontinuità e una modesta presenza nelle zone incrementali, quest'ultime sono dalle 3 alle 4 volte più larghe rispetto alle zone di discontinuità; Morales-Nin (1987) riporta inoltre che la matrice organica è più densa nella zona nucleare.

Per rilevare alcune caratteristiche dell'accrescimento degli otoliti di naso sono stati misurati diversi parametri dimensionali ed il peso. Infatti gli otoliti, usati anche per studi sistematici, presentano forme caratteristiche che determinano così la capacità di trasmettere determinate frequenze acustiche. La grandezza dell'otolite è altamente correlata con quella dell'intero pesce essendo entrambe controllate dagli stessi processi metabolici (Radtke et Al., 1985; Secor e Dean, 1989). Studi morfometrici sugli otoliti sono stati condotti per la determinazione dell'età (Boehlert, 1985; Pawson, 1990; Shafer, 2000), ma anche per l'analisi del contenuto stomacale di grandi pesci o mammiferi (Harkonen, 1986).

Dei tre tipi di otolite estratti da *Chondrostoma nasus nasus* soltanto il lapillo e l'asterisco sono stati utilizzati in questa fase di studi. Dall'analisi dei parametri dimensionali è emerso che gli otoliti non possono essere utilizzati per determinare il sesso dell'esemplare, metodo

che risulta valido invece per alcune specie marine e d'acqua dolce appartenenti alla famiglia dei Cichlidae e Ophididae (Gaemers e Crapon de Crapona, 1986; Schwarzhans, 1994). Inoltre non è stata rilevata alcuna differenza, per quanto concerne i parametri da noi analizzati, tra l'otolite destro e quello sinistro evidenziando l'assenza di asimmetria in queste strutture in questa specie, come del resto succede anche in altre specie con simmetria bilaterale (Pawson, 1990; Hunt, 1992).

Dal confronto delle medie di ciascun parametro dimensionale in ciascuna classe d'età, misurato negli asterischi e nei lapilli, sono emerse differenze statisticamente significative soprattutto tra le prime classi d'età. Questo andamento è imputabile verosimilmente al tasso di accrescimento che è molto più rapido durante i primi anni di vita. Si nota inoltre una notevole diminuzione del tasso di accrescimento a partire dall'ottava classe di età. Il dato riscontrato in *Chondrostoma nasus nasus* è anche confermato da studi analoghi riportati in letteratura dove viene riferito che, negli otoliti, le zone incrementali man mano che gli esemplari crescono diminuiscono in spessore (Morales-Nin, 2000).

Dall'analisi delle relazioni esistenti tra alcuni parametri quali l'area, il perimetro, il peso dell'otolite con la lunghezza totale e il peso totale degli esemplari è risultato che ci sono delle notevolissime correlazioni confortate da coefficienti di determinazione significativi e molto elevati: r^2 pari a 0.98 nella regressione tra l'area e il peso sia negli asterischi che nei lapilli. Questi dati possono dare delle utili indicazioni sulla possibilità di utilizzo di questi due tipi di otoliti quali strutture per la determinazione dell'età. È emerso inoltre che le relazioni tra variabili di lunghezza sono di tipo lineare, mentre tra le variabili lineari e quelle ponderali le relazioni sono espresse da equazioni di potenza. Questo dato è in accordo con quanto riportato da Secor e Dean (1989) per *Morone saxatilis*.

Gli otoliti presentano una composizione relativamente pura rispetto alla maggior parte delle strutture biologiche e mineralogiche, essendo costituiti prevalentemente da carbonato di calcio e da una piccola frazione di matrice organica. In studi finora svolti sono stati rinvenuti circa 31 elementi, esclusi quelli radioattivi come il torio e il radio. Il calcio, l'ossigeno e il carbonio sono quelli più abbondanti costituendo la matrice carbonatica. Gli altri elementi si trovano inclusi nel reticolo del carbonato di calcio oppure fanno parte degli elementi costituenti la frazione organica. La maggior parte degli elementi è presente in piccole quantità. In relazione alla loro concentrazione vengono suddivisi in microelementi ed in elementi in tracce a seconda che la loro parte sia maggiore o minore di 100 ppm. Probabilmente molti elementi in tracce devono essere ancora identificati. Il sodio, lo stronzio, il potassio, lo zolfo, l'azoto, il cloro e il fosforo sono considerati generalmente microelementi (Campana, 1999).

Degli undici elementi indagati è emerso che il calcio è il più abbondante costituendo circa il 34% della concentrazione totale.

Come del resto è riportato in letteratura (Chesney et Al., 1998; Gauldie, 1996) la concentrazione degli elementi chimici indagati è risultata subordinata al tipo di allomorfo di cui era costituito l'otolite. Infatti il potassio, il sodio, il fosforo, lo zolfo e lo stronzio, nei lapilli e nelle sagitte di *Chondrostoma nasus nasus*, presentano delle concentrazioni tali da poter essere considerati microelementi, l'alluminio, il rame il ferro il magnesio e lo zinco, negli stessi tipi di otolite, sono elementi in tracce. Negli asterischi invece sono da considerare microelementi il potassio, il magnesio, il sodio, il fosforo e lo zolfo, mentre l'alluminio, il rame, il ferro, lo stronzio, e lo zinco presentano concentrazioni minori di 100 ppm.

La differenza nelle concentrazioni elementari nei lapilli, nelle sagitte e negli asterischi, non si è rilevata solamente tra gli otoliti nei quali il carbonato di calcio è presente sottoforma di aragonite o di vaterite, ma tra tutti e tre i tipi. Attraverso l'utilizzo di metodi statistici multivariati, quali l'analisi discriminante, è stato possibile distinguere correttamente nel 100% dei casi i tre tipi di otolite. La concentrazione dello stronzio è stata individuata come quella che fornisce il maggior contributo nella distinzione tra lapilli e sagitte rispetto agli asterischi, mentre la concentrazione del fosforo è quella che permette di distinguere i lapilli dalle sagitte. E' stato poi osservato che gli elementi alcalino e alcalino terrosi sono quelli che caratterizzano i due tipi di allomorfi: in particolare lo stronzio e il magnesio sono elementi molto simili al calcio e sono vicarianti dello stesso. Il fosforo e lo zolfo sono invece i due elementi, fra tutti quelli considerati, che si ritrovano più frequentemente come componenti di macromolecole organiche ed infatti la loro concentrazione è significativamente differente in tutti e tre i tipi di otolite.

Alcuni Autori riportano eterogeneità nell'incorporazione dei vari elementi chimici a seconda del sesso e dell'età degli esemplari (Grady et Al., 1989; Papadopoulou et Al., 1976; Kalish, 1989; Miletic, 1999). In *Chondrostoma nasus nasus* non si è rilevata nessuna difformità nelle concentrazioni elementari misurate legata a questi due fattori. Queste caratteristiche suffragano la possibilità di utilizzo degli otoliti come bioindicatori in quanto l'assorbimento dall'ambiente avviene in maniera costante nel tempo e non viene influenzato dall'appartenenza all'uno o all'altro sesso.

L'analisi della concentrazione elementare degli otoliti estratti da esemplari provenienti dal fiume Isonzo e dal fiume Natisone ha fornito diverse informazioni. Lo stronzio è risultato elemento discriminante in tutti e tre i tipi di otolite. Questo dato è in accordo con la letteratura. Infatti questo è l'elemento che normalmente viene utilizzato negli studi ambientali.

Lo stronzio e soprattutto il rapporto stronzio-calcio, viene analizzato per studi nei quali si vogliono individuare eventuali cambiamenti ambientali soprattutto per quanto riguarda variazioni di temperatura. I risultati riportati in letteratura sono alquanto discordanti in quanto secondo alcuni Autori ci sarebbe una correlazione positiva tra il rapporto stronzio-calcio e la temperatura (Kalish, 1989; Arai et Al., 1995, 1996; Fowler et Al., 1995; Hoff e Fuiman, 1995), secondo altri negativa (Townsend et Al., 1992, 1995; Radtke et Al., 1990; Sadovy e Severin, 1992; Secor et Al., 1995) e secondo altri ancora non ci sarebbe nessuna relazione (Gallahar e Kingsford, 1996; Tzeng, 1996). I dati in nostro possesso hanno permesso di evidenziare una correlazione positiva tra la temperatura dell'acqua e il suddetto rapporto. Infatti il fiume Natisone presenta un temperatura media dell'acqua (11.92 °C) significativamente maggiore rispetto a quella del fiume Isonzo (10.04 °C) e il rapporto stronzio-calcio nei tre tipi di otolite risulta sempre maggiore in quelli provenienti dal fiume Natisone.

La matrice organica degli otoliti riveste, come già detto precedentemente, un ruolo molto importante per la struttura e quindi per la funzione degli stessi. E' stato dimostrato infatti che le glicoproteine costituenti la frazione solubile della matrice proteica legano il calcio e svolgono la funzione di inibire e regolare il tasso di accrescimento dei cristalli (Wright, 1991). Mentre la frazione inorganica è molto studiata, le ricerche riguardanti la frazione organica e soprattutto la parte proteica sono molto poche.

La frazione proteica costituisce da 0.1 al 10% del peso degli otoliti e varia a seconda della specie e dell'età degli esemplari (Degens et Al., 1969; Morales-Nin, 1986a, Hoff e Fuiman, 1993; Asano e Mugiya 1993).

Degens et Al. (1969) definirono la composizione e la struttura molecolare delle sagitte, costituite da aragonite, di 25 specie ittiche sia di esemplari marini che dulciacquicoli. Questo lavoro, primo nel suo genere, identificò la presenza di una proteina maggiore di 150 KDa, denominata otolina e costituita soprattutto da aminoacidi quali l'idrossiprolina, la prolina, la serina e aminoacidi acidi. Successivamente Morales-Nin (1986) analizzò la frazione organica degli otoliti di *Dicentrarchus labrax* e *Merluccius capensis* indagando però eventuali differenze nella composizione aminoacidica a seconda dell'età degli organismi. Secondo questo Autore infatti durante le fasi giovanili la percentuale di aminoacidi non-polari è doppia rispetto all'età adulta, mentre è bassa la percentuale di aminoacidi acidi quali asparagina, glicina, serina.

Recentemente Sasagawa e Mugiya (1996) hanno studiato le proprietà biochimiche delle proteine idrosolubili di *Oreochromis niloticus*. Questi Autori hanno individuato diverse frazioni proteiche di cui la maggiore costituita da una proteina di 52 KDa.

In *Chondrostoma nasus nasus* la percentuale della frazione organica è stata analizzata in tutti e tre i tipi di otolite e mediamente costituisce il 2.3% del peso nelle sagitte, il 2,5 % nei lapilli e 1,7% negli asterischi. La composizione aminoacidica è molto simile a quella riportata da Asano e Mugiya (1996) ad eccezione della cisteina che è stata presente soltanto nei lapilli in percentuale peraltro molto bassa. Nella nostra ricerca non è stato rinvenuta l'idrossiprolina quindi nella frazione organica degli otoliti di naso non c'è collagene.

Inoltre negli asterischi è stata individuata una proteina di 66581 Da.

In conclusione potremmo affermare che i dati ottenuti in questa ricerca forniscono un'approfondita conoscenza per quanto riguarda la struttura cristallina, la morfologia, la morfometria e l'analisi microelementare degli otoliti di *Chondrostoma nasus nasus*, offrendo inoltre una prima esplorazione sulla frazione proteica della matrice organica.

Attraverso l'analisi delle caratteristiche chimiche dell'otolite di *Chondrostoma nasus nasus* si è potuto confermare anche in questa specie che vi sono elementi la cui concentrazione è in relazione alle caratteristiche di situazioni ambientali e quindi che gli otoliti, grazie anche al fatto che non presentano meccanismi di depurazione, presentano delle grandi potenzialità applicative e possono rientrare nella categoria di bioindicatori.

BIBLIOGRAFIA

- AA. VV. – 1992 – Piano generale per il risanamento delle acque. Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia.
- AGNOLETTI M. C., BUDA-DANCEVICH M., PARADISI S., PORTANOVA C., SILLANI L., SPECCHI M., STOCH F. -1984a - Dati Idrologici marzo-dicembre 1981. *Quaderni E.T.P.*, suppl.1.
- AGNOLETTI M. C., BUDA-DANCEVICH M., PARADISI S., PORTANOVA C., SILLANI L., SPECCHI M., STOCH F. -1984b - Dati Idrologici gennaio-dicembre 1982. *Quaderni E.T.P.*, suppl.2.
- AGNOLETTI M. C., BUDA-DANCEVICH M., PARADISI S., PORTANOVA C., SILLANI L., SPECCHI M., STOCH F. -1985a - Dati Idrologici gennaio-dicembre 1983. *Quaderni E.T.P.*, suppl.3.
- AGNOLETTI M. C., BUDA-DANCEVICH M., PARADISI S., PORTANOVA C., SILLANI L., SPECCHI M., STOCH F. -1985b - Dati Idrologici gennaio-dicembre 1984. *Quaderni E.T.P.*, suppl.4.
- AGNOLETTI M. C., BUDA-DANCEVICH M., SPECCHI M. -1987 - Dati Idrologici gennaio-dicembre 1985. *Quaderni E.T.P.*, suppl.5.
- AGNOLETTI M. C., BUDA-DANCEVICH M., SPECCHI M. -1989 - Dati Idrologici gennaio-dicembre 1986. *Quaderni E.T.P.*, suppl.6.
- AGNOLETTI M. C., BUDA-DANCEVICH M., SPECCHI M. -1990 - Dati Idrologici gennaio-dicembre 1987. *Quaderni E.T.P.*, suppl.7.
- ADAMI G., MILETIC M., BARBIERI P., BONA F., PISELLIA S., REISENHOFER E. – 1999 – Trace metal voltammetric determination of otoliths of tench *Tinca tinca* (L.): its possible uses in monitoring the quality of fresh waters. *Chemistry and Ecology*, 16: 257-267.
- ARAI N., SAKAMOTO W., MAEDA K. – 1995 – Analysis of trace elements in otoliths of red sea *Pagrus major*. *Fish. Sci.*, 61: 43-47.
- ARAI N., SAKAMOTO W., MAEDA K. – 1996 – Correlation between ambient seawater temperature and strontium-calcium concentration ratios in otoliths of red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.*, 62: 662-653.
- ASANO M. e MUGIYA Y. – 1993 – Biochemical and calcium-binding properties of water soluble proteins isolated from otoliths of the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 104(1): 201-205.
- BANARESCU P. – 1964 – Pisces Osteichthyes. Fauna Republicii populare Romîne. *Acad. Rep. Pop. Rom. Bucuresti*, 13: 961 pp.

- BERG L. S. – 1964 – Freshwater fishes of the URSS and adjacent countries. Acad. Sc. URSS, 2: 496 pp.
- BERTALLANFY L. von – 1938 – A quantitative theory of organic growth. *Hum. Biol.*: 118-123.
- BOEHLERT B. W. – 1985 – Using objective criteria and multiple regression models for age determination in fish. *Fish. Bull. U. S.*, 83(2): 103-119.
- BROTHERS E. B., MATHEWS C. P., LASKER R. – 1976 - Daily growth increments in otoliths from larval and adult fishes. *Fish. Bull. U.S.*, 74: 1-8.
- BROWN R. e SEVERIN K. P. – 1999 – Elemental distribution within polymorphic inconnu (*Stenodus leucichthys*) otoliths is affected by cristal structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 56: 1898-1903.
- BUSCHEK E. – 1978 – Fischwanderungen. *Österreichs Fischerei*, 31 (7): 113-118.
- CAMPANA S. E. – 1983 - Feeding periodicity and the production of daily growth increments in the otoliths of the steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Can. J. Zool.*, 61: 1591-1597.
- CAMPANA S. E. – 1984 – Lunar cycles of otolith growth in the juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Mar. Biol.*, 80: 239-246.
- CAMPANA C. – 1999 – Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 188: 263-297.
- CAMPANA S. E., FOWLER A. J., JONES C. M. – 1994 – Otolith elemental fingerprinting for stock identification of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using laser ablation ICPMS. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 1942-1950.
- CARLSON W. D. – 1983 – The polymorphs of CaCO₃ and the aragonite-calcite transformation. *Rev. Mineral.*, 11: 191-226.
- CARLSTROM D. – 1963 - A crystallographic study of vertebrate otolith. *Biol. Bull.*, 125: 441-463.
- CHESNEY E. J., MCKEE B. M., BLANCHARD T., CHAN L.-H. – 1998 – Chemistry of otoliths from juvenile menhaden *Brevoortia patronus*: evaluating strontium, strontium:calcium and strontium isotope ratios as environmental indicators. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 171: 261-273.
- DAVIES N. M., GAULDIE R. W., CRANE S. A., THOMPSON R. K. – 1988 – Otolith ultrastructure of smooth oreo, *Pseudocyttus maculatus*, and black oreo, *Allocyttus sp.*, species. *Fish. Bull.*, 86: 499-515.
- DEELDER C. L. –1981- On the age and growth of cultured eels (*Anguilla anguilla* L.). *Aquaculture*, 26: 13-22.

- DEGENS E. T., DEUSER W. G., HAEDRICH R. L. - 1969 - Molecular structure and composition of fish otolith. *Mar. Biol.*, 2: 105-113.
- DEVEREUX I. - 1967 - Temperature measurements from oxygen isotope ratios of fish otoliths. *Science*, 155: 1684-1685.
- DOVE S. G. e KINGSFORD M. J. - 1998 - Use of otoliths and eye lenses for measuring trace-metal incorporation in fishes: a biogeographic study. *Mar. Biol.*, 130: 377-387.
- ELVIRA B. - 1987 - Taxonomic revision of the genus *Chondrostoma* Agassiz, 1835 (Pisces, Cyprinidae). *Cybium*, 11(2): 111-140.
- ELVIRA B. - 1997 - Taxonomy of the genus *Chondrostoma* (Osteichthyes, Cyprinidae): an update review. *Folia Zoologica*, 46 (1): 1-14.
- EDMONDS J. S., MORAN M. J., CAPUTI N., MORITA M. - 1989 - Trace element analysis of fish sagittae as aid to stock identification: pink snapper (*Chrysophrys auratus*) in Western Australia water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 50-54.
- EDMONDS J. S., CAPUTI N., MORAN M. J., FLETCHER W. J., MORITA M. - 1994 - Population discrimination by variation in concentrations of minor and trace elements in sagittae of two Western Australian Teleosts. In: Recent developments in fish otolith research. Secor D. H., Dean J. M. & Campana (eds), Belle W. Baruch Library in Marine Science, University of South Carolina Press, Columbia, SC, USA: 655-670.
- EVJEN H. M. - 1932 - On the stability of certain heteropolar crystals. *Phy. Rev.*, 39: 675-687.
- FALINI G., ALBECK S., WEINER S., ADDADI L. - 1996 - Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, 271: 67-69.
- FARRELL J. e CAMPANA S. E. - 1996 - Regulation of calcium and strontium deposition on the otoliths of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 115: 103-109.
- FAY R. R. - 1988 - Hearing in Vertebrates: A Psychophysics Data-book. Hill-Fay Associates, Winnetka: 621 pp.
- FAY R. R. e POPPER A. N. - 1974 - Acoustic stimulation of the ear of the goldfish (*Carassius auratus*). *J. Exp. Biol.*, 61: 243-260.
- FAY R. R. e POPPER A. N. - 1975 - Models of stimulation of teleost ear. *J. Exp. Biol.*, 62: 379-387.
- FORAMITTI R. - 1973 - Il Natisone. Studio preliminare del piano generale di sistemazione del bacino idrografico. Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia, Assessorato dei Lavori Pubblici.
- FORNERIS G., PARADISI S., SPECCHI M. - 1990 - Pesci d'acqua dolce. Carlo Lorenzini Editore: 214pp.

- FOWLER A. J., CAMPANA S. E., JONES C. M., THORROLD S. R. – 1995 – Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using solution-based ICPMS. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 1421-1430.
- FRISCH K. von – 1936 - Uber de Gehorsinn der Fische. *Biol. Rev.*, 11: 210-246.
- GALLAHAR N. K. e KINGSFORD M. J. – 1996 – Factors influencing Sr/Ca ratios in otoliths of *Girella elevata*: an experimental investigation. *J. Fish. Biol.*, 41: 749-763.
- GANDOLFI G., TORRICELLI P., ZERUNIAN S., MARCONATO A. – 1991- I pesci delle acque interne italiane. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma: 617 pp.
- GAEMERS P. A. M. – 1984 – Taxonomic position of the Cichlidae (Pisces, Perciformes) as demonstrated by the morphology of their otoliths. *Neth. J. Zool.*, 34: 566-595.
- GAEMERS P. A. M. e CRAPON de CRAPONA – 1986 – Sexual dimorphism in otoliths of Haplochromines (Pisces, Cichlidae). *Ann. Mus. Roy. Afr. Centr. Sc. Zool.*, 251: 151-155.
- GAULDIE R. W. – 1986 - Vaterite otoliths from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.*, 20: 209-217.
- GAULDIE R. W. – 1988 – Function, form and time-keeping properties of fish otoliths. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 91 (2): 395-402.
- GAULDIE R. W. – 1990 - Vaterite otoliths in the opah, *Laprís immaculatus*, and two species of sunfish, *Mola mola* e *M. ramsay*. *Acta Zool. Stockh.*, 71: 193-199.
- GAULDIE R. W. – 1993a - Polymorphic crystalline structures of fish otoliths. *J. Morphol.*, 218: 1-28.
- GAULDIE R. W. – 1993b - Continuous and discontinuous growth in the otolith of *Macruronus novaezealandiae* (Merlucciidae: Teleostei). *J. Morphol.*, 216: 271-294.
- GAULDIE R. W. – 1996 – Effects of temperature and vaterite replacement on the chemistry of metal ions in the otoliths of *Oncorhynchus tshawytscha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 2015-2026.
- GAULDIE R. W. e NATHAN A. – 1977 - Iron content of the otoliths of tarakihi (Teleostei: Cheilodactylidae). *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.*, 11(2): 179-191.
- GAULDIE R. W. e NELSON D. G. A. – 1990 – Otolith growth in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 97 (2): 119-135.
- GAULDIE R. W., GRAYNOTH E. J., ILLINGWORTH J. – 1980 – The relation of the iron content of some fish otolith to temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 66: 19-24.
- GAULDIE R. W., FOURNIER d. a., DUNLOP D. E., COOTE G. – 1986 – Atomic emission and proton microprobe studies of the ion content of otoliths of chinook salmon aimed at recovering the temperature life history of individuals. *Comp. Bioch. Physiol. A*, 83 (A): 607-615.

- GAULDIE R. W., COOTE G., MULLIGAN K. P., WEST I. F., MERRET N. R. - 1991 - Otoliths of deepwater fishes: structure, chemistry and chemically-coded life histories. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 100: 1-32.
- GEFFEN A. - 1996 - Effect of experimental manipulation of feeding conditions on the population structure of larval Cod (*Gadus morhua*) and Herring (*Clupea harengus*). *Mar. Freshw. Res.*, 47: 291-300.
- GRADY J. R., JOHNSON A. G., SANDER M. - 1989 - Heavy metal content in otolith of king mackerel (*Scomberomorus cavalla*) in relation to body length and age. *Mar. Sci.*, 31: 17-23.
- HARKONEN T. - 1986 - Guide to the otoliths of the bony fishes of the northeast Atlantic. Danbiu Aps., Hellerup, Denmark: 256 pp.
- HOCHMAN L. e PENAZ M. - 1991 - The nase: stripping and rearing of the fry. *Res. Inst. Fish Cul. and Hydrobiol., Czechoslovakia*: 1-12.
- HOFF G. R. e FUIMAN L. A. - 1993 - Morphometry and composition of red drum otoliths: changes associated with temperature, somatic growth rate and age. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 106(2): 209-219.
- HOFF G. R. e FIUMAN L. A. - 1995 - Environmentally induced variation in elemental composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths. *Bull. Mar. Sci.*, 56: 578-591.
- HUET M. - 1970 - *Trat  de pisciculture. Ch. de Wyngaert, Bruxelles*: 1-718.
- HUNT J. J. - 1992 - Morphological characteristic of otoliths for selected fish in Northwest Atlantic. *J. Northw. Atl. Fish.*, 13: 63-75.
- IACUMIN P., BIANUCCI G., BRAND U., CAMPANA S. E. - 1992 - Oxygen and carbon isotopic composition of fish otoliths. *Mar. Biol.*, 113: 537-542.
- KALISH J. M. - 1989 - Otolith biochemistry: validation of the effect of physiology, age and environment on otolith composition. *Journ. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 132: 151-178.
- KALISH J. M., - 1990 - Use of otolith microchemistry to distinguish the progeny of sympatric anadromous and non-anadromous salmonids. *Fish. Bull.*, 88: 657-666.
- KALISH J. M. - 1991 - Oxygen and carbon stable isotopes in the otoliths of wild and laboratory-reared Australian salmon (*Arripis trutta*). *Mar. Biol.*, 110: 37-47.
- KALISH J. M. - 1993 - Pre- and post-bomb radiocarbon in fish otoliths. *Earth Planet Sci. Lett.*, 114: 549-554.
- KALISH J. M., LIVINGSTON M. E., SCHOFIELD K. A. - 1996 - Trace elements in the otolith of New Zealand blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*) as an aid to stock discrimination. *Marine and Freshwater Research*, 47: 537-542.

- KAPPUS B. M., JANSEN W., BÖHMER J., RAHMANN H. – 1997 – Historical and present distribution and recent habitat use of nase, *Chondrostoma nasus*, in the lower Jagst river (Baden-Württemberg, Germany). *Folia Zoologica*, 46 (suppl.1): 51-60.
- KARLSEN H. E. – 1992 – The inner ear is responsible for detection of infrasound in the perch (*Perca fluviatilis*). *J. Exp. Biol.*, 171: 163-172.
- KENNEDY B. D., FOLT C. L., BLUM J. D., CHAMBERLAIN C. P. – 1997 – Natural isotope markers in salmon. *Nature*, 387: 766-767.
- KITANO Y. e HOOD D.W. – 1965 - The influence of organic material on the polymorphic crystallisation of calcium carbonate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 29: 29-41.
- KNUDSEN F. R., ENGER P. S., SAND O. – 1994 – Avoidance responses to low frequency sound in downstream migrating Atlantic salmon smolt, *Salmo salar*. *J. Fish Biol.*, 45: 227-233.
- KRUPKA I., SEDLAR J., STRANAI I. – 1985 – The occurrence of the natural hybrid *Rutilus rutilus* x *Chondrostoma nasus*. *Pr. Lab. Ryb. Hydrobiol. Bratisl.*, 5: 217-299.
- LECOMTE-FINIGER R. – 1992 – The crystalline ultrastructure of otoliths of the eel (*A. anguilla*). *J. Fish. Biol.*, 40: 181-190.
- LELEK A. – 1987 – Threatened fishes of Europe. *The Freshwater fishes of Europe*, Aula-Verlag, Wiesbaden, 9: 343 pp.
- LELEK A. e PENAZ M. – 1963 – Spawning of *Chondrostoma nasus* (L.) in the Brumovka River. *Zoologické Listy*, 12(2): 121-134.
- LENAZ D. e MILETIC M. – 2000 – Vaterite otoliths in some freshwater fishes of the lower Friuli Plain (NE Italy). *N. Jb. Miner. Mh.*, 11: 522-528.
- LI Y., STEIN M., JUNGnickel B. J. – 1991 – Competition between crystallization and phase separation in polymer blends. Diffusion controlled supermolecular structures and phase morphologies in poly(ϵ -caprolactone)/(polystyrene blends). *Colloid. Polym. Sci.*, 269: 772-780.
- LOMBARTE A. e MORALES-NIN B. – 1995 – Morphology and ultrastructure of saccular otoliths from five species of the genus *Coelorhynchus* (Gadiformes: Macrouridae) from Southeast Atlantic. *J. Morphol.*, 225: 1-14.
- LOVE R. M. – 1980 – The chemical biology of fishes. Advances. Academic Press, New York, 2.
- LOWESTAM H. A. – 1981 - Mineral formed by organism. *Science*, 211: 1126-1131.
- LOWESTAM H. A. e WEINER S. – 1989 – On biomineralization. Oxford University Press, New York.
- LUSK S. – 1968 – Variability of meristic characters in *Chondrostoma nasus* (Linnaeus, 1758) in the water of Czechoslovakia. *Acta Soc. Zool. Bohemoslov.*, 32(4): 365-376.

- MAIER K. J., ZEH M., ORTLEPP J., ZBINDEN S. – 1995 – Verbreitung und Fortpflanzung der in der Schweiz vorkommenden *Chondrostoma*- Arten. *Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (Hrsg.) Bern, Mitteilungen zur Fischerei*, 53: 1-61.
- MANN S. – 1989 – Crystallochemical strategies in biomineralization. In Mann S., Webb J., Williams R.J.P. (eds): 35-62.
- MANN S., PARKER S. B., ROSS M. D., SKARNULIS A. J., WILLIAMS R. J. P. – 1983 - The ultrastructure of the calcium carbonate balance organs of the inner ear: an ultra-high resolution electron microscopy study. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 218: 415-424.
- MASSARI G. – 1997 – Caratterizzazione stratigrafica e geochemica delle falde acquifere della pianura friulana area orientale. Tesi di Laurea. Università degli Studi di Trieste.
- MATVEJEV S. D. – 1983a – Age group and sexual maturity of *Chondrostoma nasus* L. from the Sava river near Ljubljana. *Ichthyologia*, 15(2): 1-16.
- MATVEJEV S. D. – 1983b – Some data on spawning and migration of *Chondrostoma nasus* L. in the Gameljscica and Sava near Ljubljana. *Ichthyologia*, 15(1): 65-70.
- MCKIE D. e MCKIE C. – 1986 - Essentials of Crystallography. Oxford, Melbourne, Blackwell Scientific Publications.
- MILETIC M. – 1999 – Indagini sulla composizione chimica elementare e sulla struttura cristallina negli otoliti di *Tinca tinca* (L., 1758) (Osteichthyes, Cyprinidae), *Cyprinus carpio* L., 1758 (Osteichthyes, Cyprinidae) e *Esox lucius* L., 1758 (Osteichthyes, Esocidae) nella Bassa Pianura Friulana. Tesi di Dottorato di Ricerca. Università degli Studi di Trieste: 92 pp.
- MILETIC M., ADAMI G., PIZZUL E., VANZO S. - - Analisi microelementare degli otoliti di *Cyprinus carpio* (Osteichthyes, Cyprinidae) in un canale della Bassa Pianura Friulana. Atti dell'VIII Convegno A.I.I.A.D. *Quaderni E.T.P.*, 30 (in stampa).
- MORALES-NIN B. – 1985 - Carateristicas de los otolitos cristalinos de *Genypterus capensis* (Smith, 1947) (Pisces Ophidiidae). *Invest. Pesq.*, 49: 379-386.
- MORALES-NIN B. – 1986a – Chemical composition of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Pisces: Serranidae) otoliths. *Cybiurn*, 10(2): 115-120.
- MORALES-NIN B. – 1986b – Structure and composition of *Merluccius capensis* otoliths. *South Afr. J. Mar. Sci.*, 4: 3-10.
- MORALES-NIN B. - 1987 - Ultrastructure of the organic and inorganic constituents of the otoliths of the sea bass. R.C. Summerfelt and G.E. Hall (eds.), The age and growth of fish. The Iowa State University Press, Ames, Iowa: 331-343.
- MORALES-NIN B. – 2000 – Review of the growth regulation process of otolith daily increment formation. *Fish. Res.*, 46(1-3): 53-67.

- MOSETTI F. – 1983 – Sintesi sull'idrologia del Friuli-Venezia Giulia. *Quaderni E.T.P.*, 6: 1-295.
- MOSETTI P. e MOSETTI F. – 1997 – Idrologia del fiume Natisone. *Quaderni E.T.P.*, 26: 39-45.
- MUGIYA Y. – 1972 - On aberrant sagittas of teleostean fishes. *Jpn. Journ. of Ichthyology*, 19: 11-14.
- MUGIYA Y. – 1974 – Calcium-45 behaviour at the level of the otolithic organs of rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Fish.*, 40: 457-463.
- NEILSON J. D. e GEEN G. H. - 1984 - Effects of feeding regimes and diel temperature cycle on otolith increment formation in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish. Bull. US*, 83: 91-101.
- NELSON J. S. – 1984 – Fishes of the world. 2nd ED., Wiley, New York, XV+523 pp.
- NELVA A. – 1985 – Biogéographie, démographie et écologie de *Chondrostoma nasus nasus* (L., 1758) (Hotu, Poisson, Téléostéen, Cyprinidé). Theèse Doct. D'Etat: 365 pp.
- NELVA A. - 1989 – Structure de population en classes de taille et structure en brancs chez le Hotu, *Chondrostoma nasus* (Pisces, Cyprinidae), dans le Haut-Rhône français. *Cybiurn*, 13(3): 221-223.
- NELVA A. – 1997 – La pénétration du hotu, *Chondrostoma nasus nasus* (Poisson Cyprinidae), dans le réseau hydrographique français et ses conséquences. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 344/345: 253-269.
- NELVA A., COLLARES-PEREIRA M. J., COELHO M. – 1988 – Systematique et repartition du genre *Chondrostoma* Agassiz, 1835 (Pisces, Cyprinidae). *Arch. Hydrobiol.*, 113(1): 93-112.
- NOLF D. – 1985 – Otolithi Piscium. Handbook of Paleochthyology, Paul Durey, New York 10 A.
- OLIVEIRA A. M., FARINA M., LUDKA I. P., KACHAR B. – 1996 - Vaterite, calcite and aragonite in otoliths of three species of piranha. *Naturwissenschaften*, 83: 133-135.
- OPALATENKO L. K. – 1966 – *Chondrostoma nasus* in the upper part of the Dniestr River. *Sb. Ekol. Istor. Khrebetnikh Fauni Ukraini* : 169-177.
- PACH L., HRABE S., KOMARNENI S., ROY R. – 1990 – Controlled crystallization of vaterite from viscous solutions of organic colloids. *J. Mater. Res.*, 5: 2928-2932.
- PALMORK K. H. , TAYLOR M. E. U., COATES R. – 1963 - The crystal structure of aberrant otoliths. *Acta Chemica Scandinavica*, 17: 1457-1458.
- PANNELLA G. – 1971 - Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* (Wash. DC.), 173: 1124-1127.

- PANNELLA G. - 1980 - Growth patterns in fish sagittae. In D. C. Rhoads and R. A. Lutz (eds.) Skeletal growth of aquatic organism: biological records of environmental change. Plenum Press, New York, NY.: 519-560.
- PAPADOPOULOU C. G., KANIAS G., MORAITOPOULOU-KASSIMATI E. - 1976 - Zinc content otoliths of *Scomber japonicus colias* from the Aegean Sea, versus age and total length. In Protection du littoral Méditerranée, première partie, IIIes Journées Etudes Pollutions, Split, Commission International pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée: 69-73.
- PAPADOPOULOU C. G., KANIAS G., MORAITOPOULOU-KASSIMATI E. - 1980 - Trace element content in fish otolith in relation to age and size. *Mar. Poll. Bull.*, 11(3): 68-72.
- PATTERSON W. P., SMITH G. R., LOHMANN K. C. - 1993 - Continental paleothermometry and seasonality using the isotopic composition of aragonitic otoliths of freshwater fishes. *Geophy Monogr.*, 78: 191-202.
- PAWSON M. G. - 1990 - Using otolith weight to age fish. *J. Fish. Biol.*, 36: 521-531.
- PHILLIPART J. C. - 1981 - Démographie du Hotu (*Chondrostoma nasus* L.) (Teleostei: Cyprinidae) dans l'Ourthe (Bassin de la Meuse, Belgique). *Ann. Soc. Roy. Zool., Belg.*, 110 (3-4): 199-219.
- PIVEC E. - 2000 - Distribuzione e analisi della struttura e dinamica delle popolazioni ittiche del torrente Versa (Friuli-Venezia Giulia, Italia Nord-Est). Tesi di Laurea, Università degli Studi di Trieste.
- PIZZUL E., SPECCHI M., VALLI G. - 1992 - Sulla recente colonizzazione di *Chondrostoma nasus nasus* (L.) (Osteichthyes, Cyprinidae) delle acque del Friuli-Venezia Giulia. *Gortania, Atti Mus. Friul. Sto. Nat.*, 14: 207-211.
- PIZZUL E., SALPIETRO L., SPECCHI M., VALLI G. - 1994 - Osservazioni sulla biologia di *Chondrostoma nasus nasus* (L.) (Osteichthyes, Cyprinidae) nel bacino del Friuli-Venezia Giulia. *Quaderni E.T.P.*, 23: 1-24.
- PIZZUL E., SPECCHI M., VALLI G. - 1995 - Distribution of *Chondrostoma nasus nasus* in the basin of the river Isonzo (North-Eastern, Italy). *Folia Zoologica*, 44 (suppl.1): 17-20.
- PIZZUL E., SPECCHI M., VANZO S. - 1997 - Struttura delle comunità ittiche del fiume Natisone (Friuli-Venezia Giulia, Italia Nord-Est). *Quaderni E.T.P.*, 26: 59-70.
- PIZZUL E., CASSETTI P., SPECCHI M., VANZO S., AVIAN M. - 1999 - Aspetti preliminari della morfologia degli otoliti di *Leuciscus cephalus* (Linnaeus, 1758) (Osteichthyes, Cyprinidae). Atti del VII Convegno A.I.I.A.D. *Quaderni E.T.P.*, 28: 75-85
- PIZZUL E., VANZO S., MILETIC M., CARRUBA F. - - Prima segnalazione di *Barbus caninus* Bonaparte, 1839 (Osteichthyes, Cyprinidae) nelle acque del torrente Groina

(bacino del fiume Isonzo). Osservazioni sulla biologia della specie. *Gortania, Atti Mus. Friul. Sto. Nat.*, (in stampa).

PLATT C. – 1983 – The peripheral vestibular system in fishes. In: Norhcutt, R. C., Davis, R. E., (Eds.), *Fish Neurobiology*, University of Michigan Press, Ann Arbor, MI: 89-124.

PLATT C. e POPPER A. N. – 1981 – Structure and function in the ear. In: Tavolga, W.N., Popper A. N., Fay, R.R. (Eds.), *Hearing and Sound Communication in Fishes*. Springer, New York: 3-38.

POPPER A. N. – 1983 – Organization of the inner ear and processing of acoustic information. In: Norhcutt, R. C., Davis, R. E., (Eds.), *Fish Neurobiology*, University of Michigan Press, Ann Arbor, MI: 125-178.

POPPER A. N. e FAY R. R – 1993 – Sound detection and processing by fish: critical review and major research questions. *Brain Behav. Evol.*, 41: 14-38.

POPPER A. N. e LU Z. – 2000 – Structure-function relationships in fish otolith organs. *Fish. Res.*, 46(1-3): 15-25.

POPPER A. N. e PLATT C. – 1993 – Inner ear and lateral line of bony fishes. In: Evans, D.H. (Ed.), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, FL: 99-136.

POVZ M. – 1988- Migration of the nase carps (*Chondrostoma nasus* L. 1758) in the river Sava. *J. Acq. Prod.*, 2(2): 149-163.

POVZ M. – 1983 – The change of the areal of two species from genus *Chondrostoma* (Pisces) in Slovenia. *Biol. Vest.*, 31(1): 45-52.

POVZ M. – 1995 – Status of freshwater fishes in the Adriatic catchment of Slovenia. *Biol. Conser.*, 75: 171-177.

POVZ M. e SKET B. – 1990 – Sladkovodne ribe. Založba Mladinska knjiga: 377 pp.

PROCTOR C. H., THRESHER R. E., GUNN J. S., MILLS D. J., HARROWFIELD I. R., SIE S. H. – 1995 – Stock structure of the southern bluefin tuna *Thunnus maccoyi*: an investigation based on probe microanalysis of otolith composition. *Mar. Biol.*, 122: 511-526.

RADTKE R. L. – 1989 – Strontium-calcium concentration ratios in fish otoliths as environmental indicators. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92: 189-193.

RADTKE R. L. e MORALES-NIN B. – 1989 – Mediterranean juvenile bluefin tuna: life history patterns. *J. Fish Biol.*, 35(4): 485-486.

RADTKE R. L., FINE M. L., BELL J. – 1985 – Somatic and otolithic growth in the oyster toadfish (*Opsanus tau* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 90: 259-275.

- RADTKE R. L., TOWNSEND D. W., FOLSOM S. D., MORRISON M. A. – 1990 – Strontium:calcium concentration ratios in otoliths of herring larvae as indicators of environmental histories. *Environ. Biol. Fish.*, 27: 51-61.
- RETZIUS G. – 1881 - Das Gehörorgan der Wirbelthiere. Samson and Stockolm. Vol 1.
- RIEDEL D. – 1974 – Fisch und Fischerei. *Ulmer Verlag, Stuttgart*: 287 pp.
- ROBERTS W. M., HOWARD J., HUDSPETH A. J. – 1988 – Hair cells: transduction, tuning and transmission in the inner ear. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 4: 63-92.
- ROSS M. D. e POTE K. G. – 1984 - Some properties of otoconia. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, 304: 445-452.
- SADOVY Y. e SEVERIN K. P. – 1992 – Trace elements in biogenic aragonite: correlation of body growth rate and strontium levels in the otoliths of the white grunt, *Haemulon plumieri* (Pisces: Haemulidae). *Bull. Mar. Sci.*, 50: 237-257.
- SASAGAWA T. e MUGIYA Y. – 1996 – Biochemical properties of water-soluble otolith proteins and the immunochemical detection of the proteins in serum and various tissues in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish. Sci.*, 62(6): 970-976.
- SCWARZHANS W – 1994 – Sexual and ontogenetic dimorphism in otoliths of the family Ophidiidae. *Cybium*, 18: 71-98.
- SCHWARCZ H. P., GAO Y., CAMPANA S. E., BROWNE D., KNYF M., BRAND U. – 1998 – Stable carbon isotope variations in otoliths of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can J. Fish. Aquat. Sci.*, 55: 1798-1806.
- SECOR D. H. – 1992 – Application of otolith microchemistry analysis to investigate anadromy in Chesapeake Bay striped bass *Morone saxatilis*. *Fish. Bull.*, 90: 798-806.
- SECOR D. H. e DEAN J. M. – 1989 –Somatic growth effects on the otolith fish size relationship in young pond-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46(1): 113-121.
- SECOR D. H., HENDERSON-ARZAPALO A., PICCOLI P. M. – 1995 – Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 192: 15-33.
- SHAFER D. J. – 2000 – Evaluation of periodic and aperiodic otolith structure and somatic-otolith scaling for use in retrospective life history analysis of a tropical marine goby, *Bathygobius coalitus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 199: 217-229.
- STRONG M. B., NEILSON J. D., HUNT J. J. – 1986 - Aberrant crystallization of pollack (*Pollachius virens*) otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 1457-1463.
- THRESHER R. E., PROCTOR C. H., GUNN J. S., HARROWFIELD I. R. – 1994 – An evaluation of electron probe microanalysis of otoliths for stock delineation and identification of nursery areas in a southern temperate groundfish, *Nemadactylus macropterus* (Cheilodactylidae). *Fish. Bull.*, 92: 817-840.

- THORROLD S. R., CAMPANA S. E., JONES C. M., SWART P. K. – 1997 – Factors determining delta C-13 and delta O-18 fractionation in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 61: 2909-2919.
- TORTONESE E. – 1970 – Fauna d'Italia, Osteichthyes, Pesci Ossei. Calderini Ed. Bologna: 545 pp.
- TOWNSEND D. W., RADTKE R. L., CORWIN S., LIBBY D. A. – 1992 – Strontium:calcium ratios in juvenile Atlantic herring *Clupea harengus* L. otoliths as a function of water temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 160: 131-140.
- TOWNSEND D. W., RADTKE R. L., MALONE D. P., WALLINGA J. P. – 1995 – Use of otolith strontium:calcium ratios for hindcasting larval cod distributions relative to water masses on Georges Bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 119: 37-44.
- TZENG W. N. – 1996 – Effects of salinity and ontogenetic movements on strontium:calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 199: 112-122.
- VALESSI G. – 1964 – Le regioni d'Italia: Friuli-Venezia Giulia. Unione Topografico-Editrice Torinese, 5: 89-91.
- VASILIU G. D. e EUGEN I. – 1966 – Contributii la cunoasterea caracterelor meristice si plastice ale Scobarului (*Chondrostoma nasus nasus* (L.), Pisces Cyprinidae) din Lacul Bicaz. *Bull. Inst. Cerc. Proiec. Pisc.*, 25(3): 37-41.
- WEINER S., TALMON Y., TRAUB W. – 1983 – Electron diffraction of mollusk shell organic matrices and their relationship to mineral phase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 5: 325-328.
- WERNER C. F. – 1960 - Das Gehororgan der Wilbetiere und des Menschen. G. Thieme, Leipzig.
- WRIGHT P. J. – 1991 – Calcium binding by soluble matrix of the otoliths of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Biol.*, 38: 625-627.
- WRIGHT P. J., TALBOT C., THORPE J. E. – 1992 – Otolith calcification in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L. and its relation to photoperiod and calcium metabolism. *J. Fish Biol.*, 36: 241-249.
- ZHANG Z. – 1992 – Relationship of saccular ultrastructure to otolith growth in the teleost *Oreochromis niloticus*. *J. Morph.*, 21: 1-10.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro non sarebbe iniziato e continuato senza l'aiuto, la competenza, la pazienza e la disponibilità di molte persone che in questo modo desidero ringraziare:

Il Prof. Specchi per avermi dato la possibilità di fare questa esperienza.

Il Dott. Adami per le analisi chimiche al ICP-AES

Il Prof. Bressan per l'acquisizione delle immagini

Il Dott. Falini per l'estrazione della frazione proteica e le analisi aminoacidiche

Il Prof. Giancotti ed in particolare il Dott. Sgarra per analisi cromatografiche, spettrometriche ed elettroforetiche

Il Dott. Lenaz per le analisi mineralogiche

Il Dott. Miletic per la disponibilità e il costante aiuto durante tutte le fasi del lavoro

La Dott.ssa Pizzul per gli utili suggerimenti nella revisione critica del testo

Il Dott. Giò per l'analisi al SEM e la misurazione degli otoliti

Le guardie ittiche e i volontari dell'ETP per il recupero del materiale ittico