



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in
BIOLOGIA MARINA**

**Gli effetti dei cambiamenti climatici sul metabolismo e il comportamento del
riccio di mare (*Paracentrotus lividus*)**

**The effects of climate change on metabolism and behavior of the sea urchin
(*Paracentrotus lividus*)**

Candidato
Federica Santelia

Relatore
Prof.ssa
Emanuela Fanelli

Correlatore
Dr.
Stefano Marras

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2019/2020

*A Nonna Paolina,
per l'appoggio e i sorrisi che
non mi hai fatto mai mancare.*

Sommario

1. Introduzione	5
1.1. Cambiamenti climatici ed ecosistemi marini	6
1.2. Cambiamenti climatici e Mar Mediterraneo.....	6
1.3. Metabolismo, capacità metabolica e temperatura.....	8
1.3.1. Il metabolismo negli invertebrati	11
1.3.2. Il metabolismo negli Echinodermi.....	13
1.4. Obiettivi della tesi.....	14
1.5. Soggetto sperimentale: <i>Paracentrotus lividus</i>	15
1.5.1. <i>Paracentrotus lividus</i> , anatomia.....	16
1.5.2. <i>Paracentrotus lividus</i> , sistema acquifero	17
1.5.3. <i>Paracentrotus lividus</i> , movimento ed adesione al substrato.....	18
1.5.4. <i>Paracentrotus lividus</i> , riproduzione e sviluppo	19
2. Materiali e metodi	21
2.1. Animali.....	21
2.2. Disegno Sperimentale	22
2.2.1. Temperature sperimentali	23
2.3. Respirimetria	25
2.4. Tunnel del Nuoto.....	28
2.4.1. Biomeccanica	31
2.5. Biometrie	32
2.6. Analisi statistica.....	33
3. Risultati.....	34
3.1. Mortalità.....	36
3.2. Tasso metabolico	38
3.3. Analisi biomeccaniche della tenuta al substrato.....	39
4. Discussione.....	42
5. Conclusioni.....	49
6. Bibliografia.....	50

1. Introduzione

Con il termine “cambiamento climatico” si intendono le variazioni del clima a diverse scale spaziali e temporali che avvengono sul pianeta Terra. Grazie alla paleoclimatologia si sa che la storia climatica della Terra attraversa continuamente fasi di cambiamenti climatici, più o meno rapide; si è osservata infatti, in termini di milioni di anni, l’alternanza di Ere glaciali e Ere interglaciali. Quando invece si assiste a cambiamenti climatici più repentini, si parla propriamente di “anomalia climatica”. Ma se è vero che i cambiamenti climatici sono intrinseci nella storia della Terra, è anche vero che oggi stiamo assistendo ad un evento eccezionale, in particolare secondo l’Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) *"Il riscaldamento del sistema climatico è inequivocabile, e, dal 1950, molti dei cambiamenti osservati non presentano analoghi nei precedenti decenni e millenni. L'atmosfera e gli oceani si sono riscaldati, la massa di neve e ghiaccio è diminuita, il livello del mare è aumentato, e le concentrazioni di gas a effetto serra sono aumentate"* (IPCC, 2014). Tutto questo ha un forte impatto sull’intero pianeta, sui comparti biotici e abiotici, le calotte polari si sciolgono, il livello del mare si innalza, cambiano le conformazioni costiere, ed eventi meteorologici estremi e periodi di siccità sono sempre più frequenti. Gli effetti sono ben visibili non solo per le specie selvatiche animali e vegetali, che stentano ad adattarsi, ma anche per l’uomo, per la salute e l’economia mondiale. Non restano quindi dubbi sul fatto che i cambiamenti climatici incidano fortemente sulla biodiversità terrestre, ma una delle maggiori sfide da affrontare è capire fino a che punto tali cambiamenti influenzeranno gli ecosistemi marini.

1.1. Cambiamenti climatici ed ecosistemi marini

Alla base del funzionamento degli ecosistemi marini vi è la fitta rete di interazioni tra i comparti biotici e abiotici, che permettono la produzione, il consumo e lo scambio di energia nelle reti trofiche (Doney et al., 2012). I cambiamenti climatici e le crescenti pressioni umane stanno avendo conseguenze profonde e diverse su tali ecosistemi. L'aumento delle temperature e l'acidificazione degli oceani sono le maggiori cause di criticità in quanto i loro effetti si ripercuotono su scala globale e in modo irreversibile su scala ecologica (Natl. Res. Counc., 2011). In particolare, l'aumento delle temperature porta ad una serie di variazioni come l'innalzamento del livello del mare, l'aumento della stratificazione delle acque, la diminuzione dell'estensione del ghiaccio marino e l'alterazione dei modelli di circolazione oceanica. Gli effetti di tali variazioni possono essere diretti, ad esempio cambiamenti nella struttura e nell'abbondanza stagionale delle popolazioni, e indiretti, in quanto le specie che subiscono direttamente delle alterazioni vanno ad interagire con le strutture trofiche, così gli effetti dei cambiamenti climatici si propagano nell'intera struttura trofica (Doney et al., 2012).

1.2. Cambiamenti climatici e Mar Mediterraneo

Il Mediterraneo per le sue caratteristiche geologiche e biologiche è considerato dagli oceanografi fisici come un mesocosmo, un "oceano in miniatura", e proprio per questa ragione potrebbe essere utilizzato dalla scienza per comprendere i fenomeni in atto e i loro effetti (Lejeusne et al. 2010). Con un'estensione di 2,51 milioni di Km² ed una profondità

media di 1460 m, è il più grande e profondo bacino semichiuso presente sulla Terra. Si tratta, inoltre, di uno dei maggiori *hotspots* di biodiversità del pianeta: infatti nonostante copra meno dell'1% del volume oceanico globale, il Mediterraneo ospita il 20% di endemismi, per un totale di 17.000 specie marine (Coll et al., 2013).

Studi sulle variazioni di temperatura avvenute in Mediterraneo, mostrano come questa regione sia particolarmente sensibile ai cambiamenti climatici (Hertig et al., 2008) e prevedono un aumento delle temperature di circa 2°C per la metà del XXI secolo e di quasi 4°C per la fine del secolo (Albouy et al., 2012). A ciò si aggiunge che, come tutti gli ecosistemi marini, il mar Mediterraneo è fortemente minacciato dalle diverse attività antropiche che incidono sulla fascia costiera e sull'ambiente marino (forte urbanizzazione, elevata concentrazione di impianti di acquacoltura, scarichi di pesticidi e fertilizzanti derivanti dall'agricoltura e ad una progressiva intensificazione delle attività di pesca).

È stato dimostrato che la ricchezza in specie è uno dei principali motori del funzionamento ecosistemico in molti biomi (Balvanera et al, 2006), ma fondamentale è il ruolo chiave che ogni specie ha all'interno dell'ecosistema (Mouillot et al, 2011). Per tale motivo, è molto importante capire l'effetto dei cambiamenti climatici sulle specie e sui loro possibili adattamenti. Come dimostrato da recenti episodi, ad esempio l'espansione dell'areale di distribuzione di organismi vagili come *Thalassoma pavo* e sessili come *Astroides calycularis* (Lejeusne et al., 2010), o di malattia e mortalità di massa di invertebrati sessili mediterranei (come spugne e coralli), è evidente che i sistemi biologici di tale regione siano estremamente sensibili alle variazioni climatiche e, in particolare, all'attuale innalzamento delle temperature (Lejeusne et al., 2010). Ogni specie presenta infatti un range "naturale" di tolleranza termica e risponde alle fluttuazioni di temperatura mediante adattamenti fisiologici, biochimici e molecolari. Vediamo infatti come la temperatura

ambientale abbia una notevole influenza sulle attività metaboliche degli organismi, limitando la loro distribuzione e condizionando il loro comportamento.

1.3. Metabolismo, capacità metabolica e temperatura

Il termine metabolismo deriva dal greco “μεταβολισμός” = “cambiamento, trasformazione”, esso infatti è l’insieme delle trasformazioni e dei processi biochimici necessari per il mantenimento degli organismi viventi e per lo svolgimento dei processi vitali; esso è costituito da due processi biochimici, il catabolismo (o degradazione), che disgrega la materia organica e produce energia attraverso la respirazione cellulare, e l’anabolismo (o sintesi), che utilizza l’energia per produrre i componenti cellulari.

Il tasso metabolico è un tratto biologico fondamentale, sensibile ai cambiamenti che avvengono nell'ambiente biofisico (Dillon et al., 2010); per tale motivo variazioni a livello del tasso metabolico possono essere utilizzate per osservare le conseguenze biologiche ed ecologiche dovute allo stress causato dalle variazioni delle caratteristiche ambientali (Somero et al., 2017). A seconda delle condizioni fisiologiche, gli organismi presentano differenti livelli metabolici:

- Il tasso metabolico basale (*Standard Metabolic Rate*, SMR), è il dispendio energetico di un organismo vivente a riposo, considerando dunque l’energia necessaria per le funzioni metaboliche vitali di base, come ad esempio respirazione e attività del sistema nervoso;

- Il tasso metabolico di routine (*Routine Metabolic Rate*, RMR) comprende, oltre all'energia richiesta dalle funzioni vitali, l'energia per funzioni come la locomozione, l'accrescimento e la maturazione delle gonadi;
- Il tasso metabolico massimo (*Maximum Metabolic Rate*, MMR) è definito come il massimo consumo di ossigeno che un organismo può raggiungere (Norin et al., 2016). Esso viene calcolato attraverso differenti tecniche, come portare i pesci ad un aumento progressivo della velocità di nuoto.

Dalla differenza tra MMR e SMR è possibile ricavare la capacità metabolica (*Aerobic Scope*, AS), che rappresenta la quantità di energia che un organismo ha a disposizione per provvedere a tutti i fabbisogni metabolici, esclusi quelli basali. L'MMR (e di conseguenza l'AS) è molto variabile, in quanto può essere influenzato da molti fattori, intrinseci ed estrinseci, come la specie, la massa corporea, la temperatura, la digestione e l'ossigeno ambientale. Vediamo infatti che il tasso metabolico è influenzato in gran parte da due processi strettamente interconnessi (Gillooly et al., 2001):

- il fattore di Boltzmann, che descrive la dipendenza dalla temperatura dei processi biochimici;
- la relazione allometrica di un quarto di potenza, che descrive come il tasso metabolico (B) vari con le dimensioni corporee (M), dove $B \propto M^{3/4}$, e quindi $\frac{B}{M} \propto M^{-1/4}$.

Gli effetti più semplici della temperatura si osservano a livello cellulare, e possono interessare:

- le strutture di membrana che comunicano con l'ambiente, in quanto i lipidi di membrana si trovano in un equilibrio compreso tra una struttura molto fluida ed una molto rigida, in modo tale da garantire il corretto funzionamento della componente proteica, ciò avviene grazie all'adattamento omeoviscoso degli acidi grassi;
- gli enzimi coinvolti nell'attività metabolica e fisiologica, in quanto la temperatura agisce in modo diretto sulla cinetica enzimatica, agendo sulla conformazione tridimensionale delle proteine enzimatiche.

La temperatura corporea di un animale dipende dalla quantità di calore contenuta per unità di massa (Poli e Fabbri, 2018). Il calore corporeo a sua volta dipende dall'attività metabolica e dagli scambi termici tra l'animale e l'ambiente. Il metabolismo, e quindi la produzione di calore, possono essere aumentati rapidamente attraverso l'attività o più lentamente attraverso l'acclimatazione. Ogni specie presenta un optimum termico, e svolge le differenti attività entro determinati limiti termici, e gli animali possono essere suddivisi sulla base della relazione tra la temperatura corporea e la temperatura dell'ambiente: se la temperatura del loro corpo si adegua a quella dell'ambiente in cui vivono, vengono chiamati ectotermi; se la temperatura del corpo si innalza al di sopra di quella ambientale, attraverso il calore prodotto dall'attività metabolica, vengono definiti endotermi. Sia gli ectotermi che gli endotermi sono capaci di percepire la temperatura dell'ambiente attraverso termorecettori periferici e centrali, e le informazioni sensoriali raccolte vengono elaborate dai centri nervosi che organizzano risposte fisiologiche o comportamentali nel processo della termoregolazione. Le risposte metaboliche alle variazioni della temperatura sono differenti in ectotermi e endotermi, vediamo che, ad esempio, mentre negli ectotermi un aumento della temperatura porta ad un aumento del consumo di ossigeno, negli endotermi il consumo di ossigeno diminuisce all'aumentare della temperatura (fig. 1).

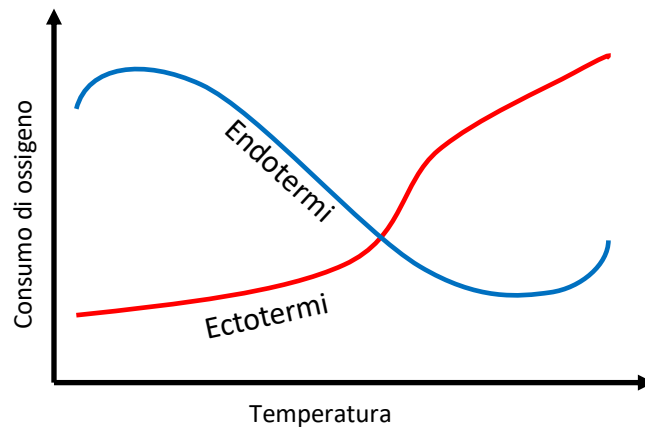


Figura 1: Relazione tra consumo di ossigeno e temperatura dell'ambiente negli endotermi e negli ectotermi. Mentre negli ectotermi il consumo di ossigeno aumenta con l'aumento della temperatura esterna, negli organismi endotermi un aumento della temperatura produce l'effetto opposto.

1.3.1. Il metabolismo negli invertebrati

Gli invertebrati, insieme alla maggior parte di pesci anfibi e rettili, sono organismi ectotermi. Gli ectotermi acquatici tendono ad avere una temperatura corporea uguale a quella dell'ambiente circostante, essi sono provvisti di un centro sensibile alla temperatura (Poli e Fabbri, 2018), che percepisce le variazioni della temperatura ambientale e coordina le risposte fisiologiche dell'animale. Generalmente gli organismi, al variare della temperatura possono reagire in due modi: cercare un ambiente più adatto o adattare il proprio metabolismo e quindi le attività fisiologiche. Negli ectotermi il modo in cui la temperatura influenza il livello di attività degli organismi e quindi la loro capacità metabolica, può essere influenzato sia da fattori comportamentali che da fattori fisiologici (Halsey et al., 2015). Da un punto di vista comportamentale, ad esempio, gli animali possono aumentare i livelli di attività quando vi è una elevata probabilità di trovare del cibo nell'ambiente circostante (Speakman, 1986). Viceversa, l'attività può essere ridotta se il rischio di incontrare predatori

è alto (Anholt et al., 2000), mentre in alcuni casi i tassi di attività possono essere aumentati o diminuiti nel tentativo di cercare condizioni ambientali più favorevoli o di entrare in uno stato di estivazione (Rees e Hand, 1990). Da un punto di vista fisiologico, l'SMR degli ectotermi tende ad aumentare con l'aumento della temperatura. Differentemente, l'MMR aumenta con la temperatura fino al raggiungimento dell'optimum termico dopo di che diminuisce fino ad eguagliare l'SMR (fig. 2). La temperatura alla quale SMR e MMR si eguagliano viene definita temperatura letale in quanto, non avendo più capacità metabolica a disposizione, l'individuo muore. Vi è quindi una elevata variabilità specie-specifica in cui differenti fattori e risposte possono influenzare la capacità metabolica, e la relazione tra temperatura e tasso metabolico.

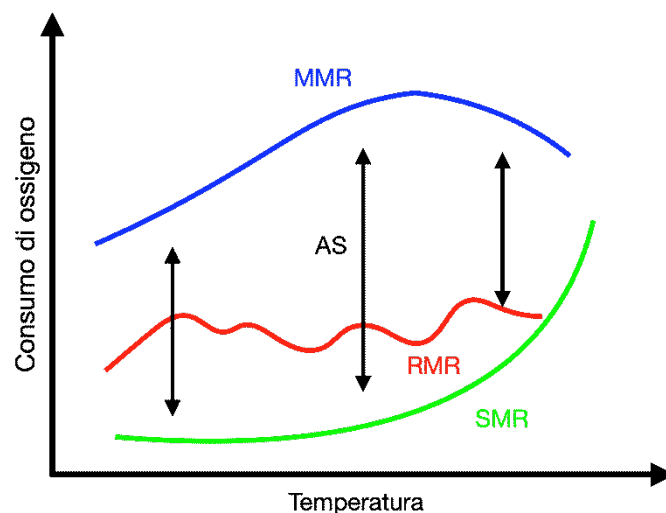


Figura 2: Rappresentazione dei livelli metabolici negli invertebrati. L'SMR aumenta con l'aumentare della temperatura (entro certi limiti), mentre l'MMR aumenta con la temperatura fino all'optimum termico degli organismi, per poi diminuire.

1.3.2. Il metabolismo negli Echinodermi

Ad oggi, gran parte degli studi effettuati sugli echinodermi, ed in particolare sui ricci di mare, sono focalizzati sulle fasi di sviluppo embrionale e larvale, in quanto in tali fasi gli organismi sono particolarmente sensibili allo stress ambientale, che può rappresentare un ostacolo alla sopravvivenza a lungo termine (Przeslawski et al., 2015). Durante queste fasi si registrano tassi metabolici maggiori, mentre in individui adulti è stato misurato come il metabolismo possa essere influenzato da differenti fattori:

- Tipicamente, il tasso metabolico (R) aumenta con l'aumentare delle dimensioni del corpo secondo la legge di potenza, $R = aM^b$ (Agutter e Wheatley, 2004), dove:
 - M è la massa corporea;
 - a è il coefficiente metabolico;
 - b è un esponente di scala.

Si è visto che il coefficiente b è strettamente interessato dalle variazioni di temperatura (Carey e Sigwart, 2014; Killen et al., 2010), suggerendo che le dimensioni del corpo e la temperatura possono modulare l'effetto l'uno dell'altro.

La temperatura ambientale è un fattore chiave del metabolismo negli ectotermi, perché controlla la temperatura corporea, e quindi i tassi di diffusione cellulare e la cinemica enzimatica (entro i limiti fisiologici, Newell e Northcroft, 1967). Per quanto riguarda il pH, influenza organismi come echinodermi, coralli e molluschi, in quanto la riduzione del pH aumenta sostanzialmente il costo energetico di produzione o mantenimento degli scheletri di carbonato di calcio (Kaniewska et al., 2012), aumentando il tasso metabolico. Tuttavia, si è visto anche come l'acidificazione in altri organismi abbia l'effetto

opposto, essendo accompagnata da depressione metabolica (Collard et al., 2013a; Melatunan et al., 2011), a causa degli effetti diretti sulle vie metaboliche come l'interruzione del funzionamento mitocondriale (Kaniewska et al., 2012).

Ad oggi in nessuno studio è stata effettuata una completa caratterizzazione metabolica del *P. lividus*, e non esiste una caratterizzazione della sua curva energetica in funzione dell'intero range di temperature che descrivono il suo areale di distribuzione. In diversi studi effettuati su tale specie, effettuati principalmente a temperature vicine all'optimum termico, è stato evidenziato un metabolismo basale basso, ciò è dovuto principalmente alla scarsa mobilità dell'animale, che effettua spostamenti in maniera casuale sul substrato alla ricerca di cibo o per cercare riparo. Esso mostra inoltre un'elevata tolleranza a variazioni di temperatura e pH (Catarino et al., 2012); tale tolleranza potrebbe essere legata al fatto che si tratta di una specie intertidale spesso soggetta a periodi di emersione, a stress e a variazioni dei parametri ambientali (Lawrence, 1990).

1.4. Obiettivi della tesi

Il presente lavoro è volto a determinare gli effetti dei cambiamenti climatici sulla fisiologia e la biomeccanica di adesione al substrato del riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

Nello specifico, questo studio ha come obiettivi:

- effettuare una caratterizzazione della curva metabolica del riccio di mare *Paracentrotus lividus* in funzione della temperatura di acclimatazione dell'animale;
- determinare gli effetti della temperatura sulla biomeccanica dell'adesione al substrato di tale organismo;

- identificare le eventuali correlazioni individuali esistenti tra il metabolismo e la biomeccanica dell'adesione al substrato.

L'interesse scientifico su cui si fonda questa analisi ha origine dalle scarse conoscenze che si hanno in materia.

1.5. Soggetto sperimentale: *Paracentrotus lividus*

Il *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), comunemente chiamato “riccio viola” o “riccio femmina”, è un invertebrato appartenente al phylum Echinodermata, famiglia Parechinidae. Tale organismo è ampiamente distribuito lungo le coste del Mediterraneo e dell'Atlantico orientale, dalla Scozia alle isole Canarie, e si contraddistingue dalla colorazione ampiamente variabile: violaceo, viola, rosso-marrone, marrone scuro, marrone chiaro o verde scuro. Tale specie è particolarmente comune in regioni dove le temperature invernali delle acque variano dai 10 ai 15 °C, e le estive tra i 18 e i 25 °C (ad esempio Mediterraneo Occidentale e Portogallo, Lawrence 2007); mentre limiti di distribuzione inferiori e superiori corrispondono circa a 8 °C in inverno e 28 °C nel periodo estivo, con una forte variabilità a seconda della posizione geografica. Infatti, in alcune zone del Mediterraneo molti esemplari resistono a temperature superiori ai 30 °C, questo suggerisce una certa diversità fisiologica. Si tratta di una specie principalmente intertidale, pochi esemplari si localizzano fino agli 80m, generalmente distribuita lungo coste e fondali rocciosi o in corrispondenza di praterie di *Posidonia oceanica* e *Zostera marina*.

Dal punto di vista ecologico *P. lividus* è considerata una specie chiave all'interno delle comunità bentoniche litorali, in quanto attraverso l'attività di grazing, quando molto

intensa, può arrivare ad influenzare la transizione da “paesaggi” di macroalghe erette, a veri e propri *barrens*, costituiti in prevalenza da alghe coralline incrostanti (Hereu et al., 2004); sono inoltre importanti nell’intera struttura della comunità in quanto i principali predatori sono crostacei, cefalopodi e pesci come *Diplodus* spp. e *Coris Julius* (Guidetti, 2004). In molti paesi del Mediterraneo, oltre che ad un importante ruolo ecologico, tale specie possiede un elevato valore commerciale a causa dell’elevato valore economico delle sue gonadi (Boudouresque & Verlaque, 2001). L’importante ruolo ecologico, l’elevato valore economico e le caratteristiche della specie fanno sì che *P. lividus* sia ampiamente utilizzato come organismo modello.

1.5.1. Paracentrotus lividus, anatomia

P. lividus appartiene alla sottoclasse Regularia, la specie è infatti caratterizzata da un corpo di forma globosa ricoperto da aculei di carbonato di calcio distribuiti uniformemente. L’endoscheletro è costituito da ossicoli di calcite disposti a formare una teca, ricoperta da un sottile strato epidermico. Allo stadio adulto l’animale presenta simmetria pentaraggiata, la teca infatti si suddivide internamente in 10 settori posti meridionalmente: 5 settori ambulacrali, alternati a 5 settori interambulacrali.

È possibile individuare un emisfero orale, posto ventralmente, al centro del quale si apre la bocca che presenta una struttura interna, la lanterna di Aristotele, dotata di 5 piastre calcaree con 5 dentelli sporgenti che fungono da apparato raschiatore. La lanterna, mediante delle fibre muscolari, può essere protrusa o retratta. A partire da quest’ultima diparte un canale alimentare (fig. 3) costituito da faringe, esofago, stomaco ed intestino, il quale

termina con l'ano nella zona aborale. Attorno all'ano, sono poste 4 piastre genitali dotate di gonopori, e una piastra forata, il Madreporite, in collegamento con il sistema acquifero.

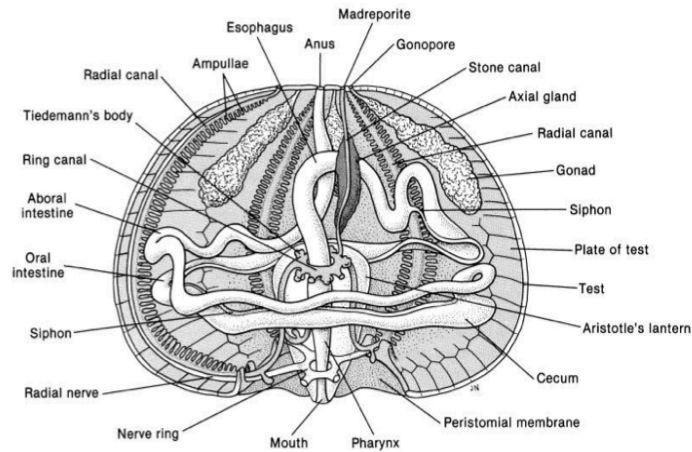


Figura 3: Anatomia del riccio di mare (Ruppert and Barnes, 1994).

1.5.2. *Paracentrotus lividus*, sistema acquifero

Dal celoma secondario si origina il sistema acquifero (fig. 4), coinvolto nella locomozione e negli scambi gassosi. All'interno di tale sistema circola una soluzione costituita dall'acqua di mare in ingresso dal Madreporite; da qui l'acqua attraversa il canale petroso e arriva al canale anulare, che circonda la bocca dell'organismo ed è provvisto di vescicole del Poli ed elementi ghiandolari (corpi di Tiedemann), che con la loro contrazione regolano la pressione all'interno di tutto il sistema acquifero. Dal canale centrale dipartono 5 canali radiali, i quali presentano a destra e a sinistra dei corti canali laterali a loro volta in collegamento con un'ampolla che permette il movimento dei pedicelli ambulacrali.

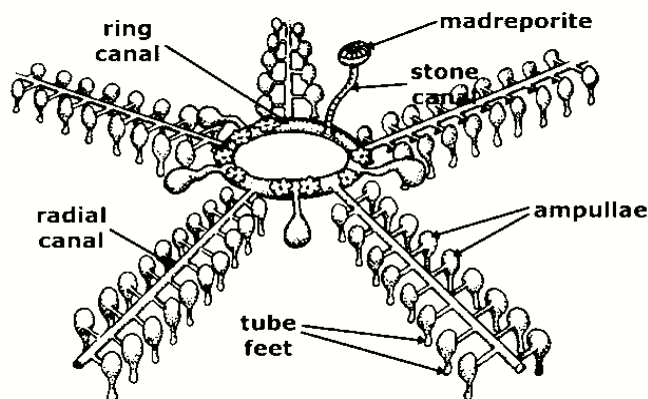


Figura 4: Sistema acquifero di un Echinoderma.

1.5.3. *Paracentrotus lividus*, movimento ed adesione al substrato

Negli echinoidei il movimento è affidato in parte alle spine mobili, che sono articolate sulla piastra calcarea tramite un tubercolo e fibre muscolari, ma principalmente ai pedicelli ambulacrali, strutture tubulari retrattili dotate di ventose terminali utilizzate per spostarsi sul substrato e aderire ad esso (fig. 5). Istologicamente essi sono costituiti da un'epidermide esterna, un plesso nervoso basiepidermico, uno strato di tessuto connettivo e un miomesotelio interno che circonda il lume del sistema acquifero (Santos et al., 2005). I pedicelli vengono estesi grazie alla contrazione delle ampolle: il liquido in esse contenuto è spinto nel pedicello, che in tal modo si estroflette ed allunga. I muscoli pedicellari determinano poi la contrazione del pedicello con il ritorno dell'acqua nell'ampolla. In seguito alla contrazione l'acqua non defluisce nel sistema acquifero grazie alla presenza di una valvola, posta in prossimità dello sbocco del canale laterale del sistema acquifero.

La capacità di adesione è fondamentale per organismi bentonici che colonizzano le aree intertidali e infralitorali, essi sono continuamente esposti a *stressor* come onde, maree

e correnti; da ciò dipende quindi la loro sopravvivenza e la colonizzazione delle *patches* a seconda delle caratteristiche ambientali presenti.

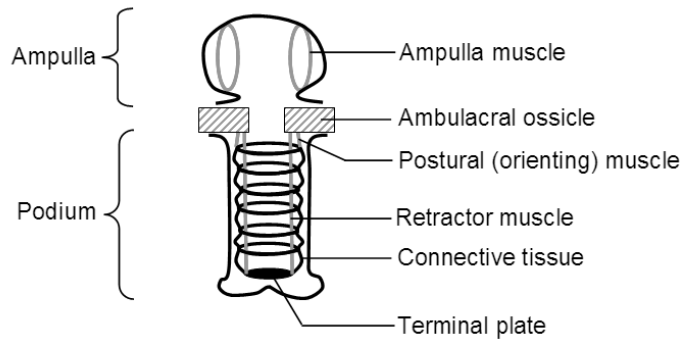


Figura 1: Schema dell'anatomia di un pedicello ambulacrale.

1.5.4. *Paracentrotus lividus*, riproduzione e sviluppo

P. lividus è un organismo dioico, con fecondazione esterna. L'apparato riproduttivo si trova nella zona aborale, ed è composto da 5 gonadi poste nelle regioni interambulacrali, ognuna ricoperta da un epitelio peritoneale flagellato la cui parete è composta da collagene e tessuto muscolare liscio. Le gonadi sono interconnesse da canali genitali celomatici ed ematici e da ognuna diparte un gonodotto, che emerge all'esterno dell'organismo attraverso un gonoporo situato nelle piastre genitali. Dai gonopori, durante lo *spawning*, vengono emessi i gameti che verranno fecondati esternamente. Durante il ciclo gonadico, le gonadi di entrambi i sessi attraversano una serie di cambiamenti strutturali tra cui: l'accumulo di materiale di riserva (fase di crescita), l'effettivo periodo di emissione (fase di maturazione) e il riassorbimento dei gameti relitti (fase di rigenerazione, Byrne et al., 1990; Lozano et al., 1995; Spirlet et al., 1998, Martinez et al., 2003). Il ciclo riproduttivo può essere influenzato da numerosi fattori

come la temperatura, le condizioni idrodinamiche e la disponibilità e la qualità del cibo. Generalmente lungo le coste del Mediterraneo si assiste ad un periodo di emissione che va da ottobre a giugno (Arizzi Novelli et al., 2002). A 48h dalla fecondazione, la larva (pluteo) ha simmetria bilaterale ed è dotata di 4 braccia; durante questo stadio, che dura circa 4-6 settimane, il pluteo viene trasportato dalle correnti marine. Dopo la fase planctonica gli embrioni si fissano al substrato e vanno incontro alla metamorfosi che genera l'adulto del riccio di mare.

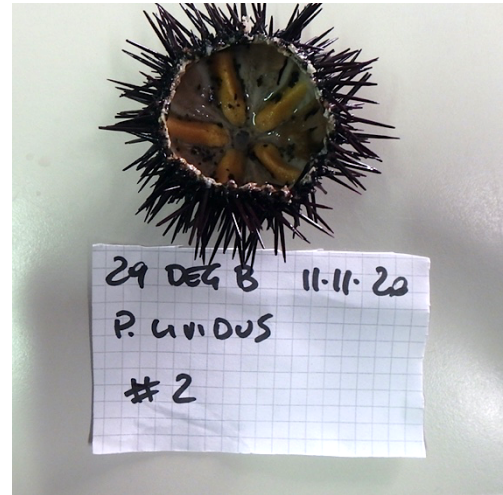


Figura 2: foto di *P. lividus*, gonadi mature.

2. Materiali e metodi

2.1. Animali

Sono stati utilizzati 84 ricci appartenenti alla specie *Paracentrotus lividus* (fig. 7). I ricci sono stati pescati ad Ottobre 2020 all'interno dell'AMP "Penisola del Sinis-Isola di Mal di Ventre" in località "Portu Suedda", nel comune di Cabras (OR, Sardegna). La pesca è stata effettuata in modo diretto dall'operatore, a pochi m dalla riva e ad una profondità di 0,5-1 m. Una volta pescati, gli animali sono stati trasportati presso i laboratori dell'Istituto per lo studio degli impatti Antropici e Sostenibilità in ambiente marino (IAS) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), sede secondaria di Oristano, dove sono stati stabulati.

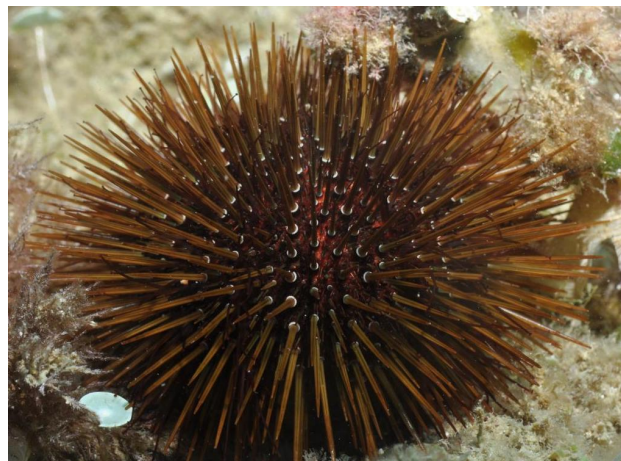


Figura 7: Esempio di Paracentrotus lividus.

2.2. Disegno Sperimentale

Il periodo di stabulazione ha avuto una durata di 10 giorni. I ricci sono stati suddivisi in quattro sistemi da 200L indipendenti tra loro, ogni sistema era costituito da tre vasche per gli animali ($V=45L$, $30 \times 50 \times 30 \text{cm}$), due vasche con filtro biologico e filtro meccanico, pompa e sistema di riscaldamento/raffreddamento automatico per il controllo della temperatura. Gli animali sono stati ripartiti nel seguente modo: 12 individui per sistema, 6 per ogni vasca (venivano utilizzate per la stabulazione solo due delle tre vasche presenti, fig. 8). Durante la stabulazione l'acqua delle vasche è stata mantenuta ad una temperatura di $21 \pm 0,53^\circ\text{C}$ (temperatura misurata nell'area di campionamento). Per le prime 48h gli animali sono stati tenuti al buio e a digiuno per evitare eccessivi fattori di stress dovuti all'immissione in vasca, in seguito l'illuminazione delle vasche era garantita da un sistema di luci automatico, che garantiva un fotoperiodo giorno/notte di "12/12h" e sono stati alimentati ad libitum ogni 5 giorni con alghe Kelp disidratate. Le operazioni di controllo dei parametri delle vasche erano effettuate quotidianamente, mentre le operazioni di sifonatura, rabbocco e cambio parziale dell'acqua (10-30%) una volta ogni 7 giorni.

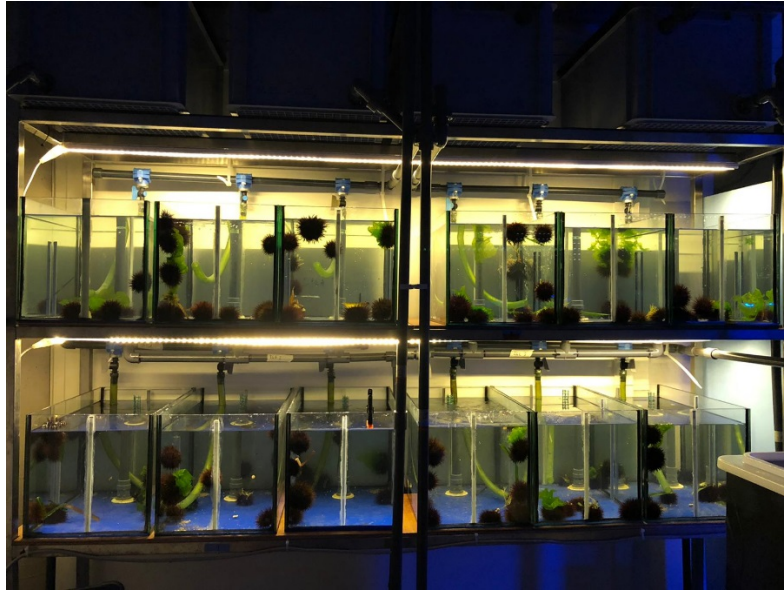


Figura 8: Sistemi di stabulazione e acclimatazione dei ricci. Quattro sistemi indipendenti, dotati di 3 vasche per gli animali, 2 vasche con filtro, pompa e sistema di raffreddamento/riscaldamento.

2.2.1. Temperature sperimentali

Per la fase sperimentale si sono scelte 7 temperature di acclimatazione: 9, 13, 17, 21, 25, 29 e 33°C. Le temperature sperimentali sono state scelte in base a quello che è il range termico del riccio di mare *P. lividus* e alle temperature medie dell'area in cui è avvenuta la pesca degli animali. Le medie mensili e annuali del Mare di Sardegna nella zona Nord Occidentale della regione sono state ottenute dal "Rapporto clima 2019" elaborato dall'ente ISPRA sulla base dei dati NOAA (fig. 9). Secondo il rapporto, il valore medio annuo della zona è di 19.2°C, con temperature minime di circa 14°C tra gennaio e febbraio e massime tra luglio e agosto fino ai 31°, e con un'anomalia positiva nel periodo giugno-dicembre di +1.9°C.

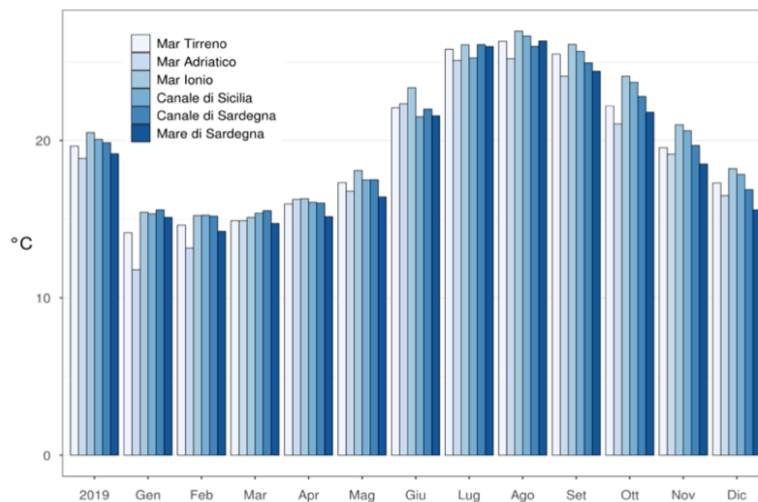


Figura 9: Temperature medie del mar Mediterraneo (annuali e mensili 2019). Elaborazione ISPRA su dati NOAA.

Le sette temperature sperimentali non sono state raggiunte contemporaneamente, vediamo infatti che l'esperimento è stato suddiviso nelle seguenti fasi:

- Stabulazione, della durata di 10 giorni;
- Fase A: Acclimatazione, al termine della stabulazione è stata avviata la prima rampa di acclimatazione, durante la quale, con una variazione di 1°C al giorno, ogni sistema è stato portato ad una temperatura differente, gli animali in tal modo sono stati acclimatati a 17, 21, 25, e 29°C. Fase sperimentale;
- Fase B: Acclimatazione, a partire dalle temperature della fase A, è stata avviata la seconda rampa di acclimatazione, durante la quale con una variazione di 1°C al giorno, sono state raggiunte le nuove temperature sperimentali: 17°C → 13°C, 21°C → 9°C, 29°C → 33°C. Fase sperimentale.

Ciascuna fase di acclimatazione si è conclusa dopo 14 giorni di esposizione alla temperatura sperimentale desiderata, dopo i quali è iniziata la fase sperimentale, suddivisa a sua volta in due fasi, durante le quali sono state eseguite:

- Analisi metaboliche, è stato misurato il tasso metabolico dei ricci in funzione della temperatura di acclimatazione;
- Analisi delle capacità di adesione al substrato e della biomeccanica di adesione.

Durante le fasi sperimentali la temperatura delle vasche utilizzate per i test era sempre uguale a quella delle vasche di provenienza degli animali.

2.3. *Respirometria*

La respirometria consiste nella misurazione del tasso metabolico degli organismi attraverso l'utilizzo di un respirometro, il quale permette di misurare il consumo di ossigeno degli organismi. Il consumo di O₂ permette di misurare in modo diretto il tasso metabolico di un organismo, in quanto l'ossigeno è l'accettore finale di elettroni della fosforilazione ossidativa, la quale consiste nell'ultima fase della respirazione cellulare, il cui scopo è trarre energia dalle sostanze energetiche ed immagazzinarla sotto forma di molecole di ATP. Durante la fosforilazione ossidativa si susseguono reazioni di ossidoriduzione il cui accettore finale di elettroni è l'O₂ che viene ridotto ad H₂O. Misurare quindi il consumo di ossigeno è una misura diretta della produzione di ATP, e quindi del metabolismo cellulare.

Il sistema utilizzato consiste in una vasca all'interno della quale sono poste 6 camere di respirometria: camere ermetiche (una per individuo), ciascuna dotata di una sonda per il consumo di ossigeno (fig. 10). Le sonde sono collegate a due corpi macchina per la misurazione dei parametri (FireSting O2 FSO2-4, tre sonde per macchina), i quali venivano controllati dall'operatore mediante l'utilizzo di due pc con il software dell'*Oxygen Logger* (V 3,317 2020 by Pyroscience) (fig. 12).

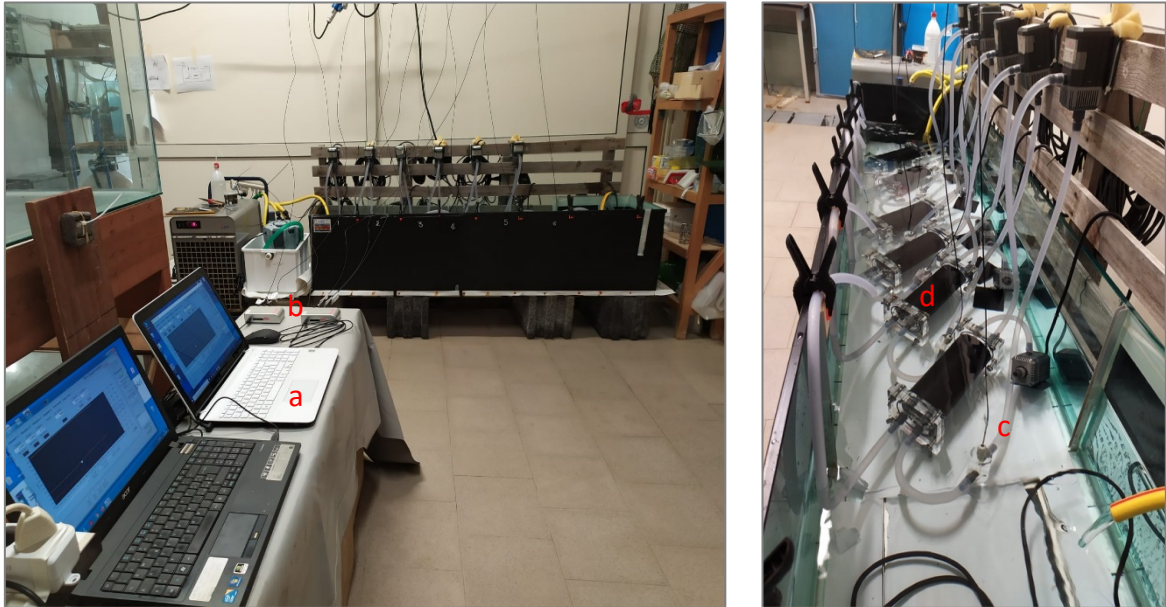


Figura 10: Sistema di respirometria. Nella figura a sinistra è possibile vedere i PC (a) collegati ai misuratori (b), i quali attraverso le sonde (c), visibili nella figura di destra, permettono di misurare le variazioni della concentrazione di O_2 disciolto all'interno delle camere di respirometria (d) in cui venivano inseriti gli animali.

Per l'esperimento è stata utilizzata una tecnica di respirometria statica a circuito intermittente, la quale combina periodi di misurazione in respirometro a ricircolo chiuso, a periodi di ricircolo aperto necessari a garantire la riossigenazione dell'acqua nella camera e l'eliminazione di possibili fenomeni di ipossia e anossia (Forstner, 1983; Steffensen, 1989), per cui dopo ogni ciclo di misurazione, grazie all'intervallo di flusso, veniva ristabilita la saturazione di O_2 disciolto ai valori del 100%. Gli animali venivano posizionati all'interno delle camere di respirometria (fig. 11) e si iniziava il ciclo di misurazione, il quale aveva una durata di 24h in cui si alternavano fasi di 15 minuti misurazione del consumo di ossigeno e fasi 15 minuti di ricircolo dell'acqua nel sistema.



Figura 11: Posizionamento degli animali in camera di respirometria.

Per quantificare l'eventuale consumo batterico di ossigeno sono stati effettuati cicli di misurazione del consumo di ossigeno della durata di 30 minuti, sia prima di inserire gli animali all'interno delle camere, sia dopo la loro rimozione al termine dell'analisi respirometrica. Al termine del test di respirometria, i ricci venivano rimossi dalle camere, e posti per 2 ore in ambienti separati e numerati, all'interno di una vasca di supporto a temperatura controllata.

Il tasso metabolico è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

$$MO_2 = \text{slope } VOL_{\text{resp}} M_b$$

dove MO_2 ($\text{mg Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) rappresenta l'ossigeno consumato, slope (mg h^{-1}) è la diminuzione del contenuto di ossigeno disciolto nell'acqua per unità di tempo, VOL_{resp} (l) è il volume della camera di respirometria meno il volume del riccio e M_b (Kg) è la massa del riccio.

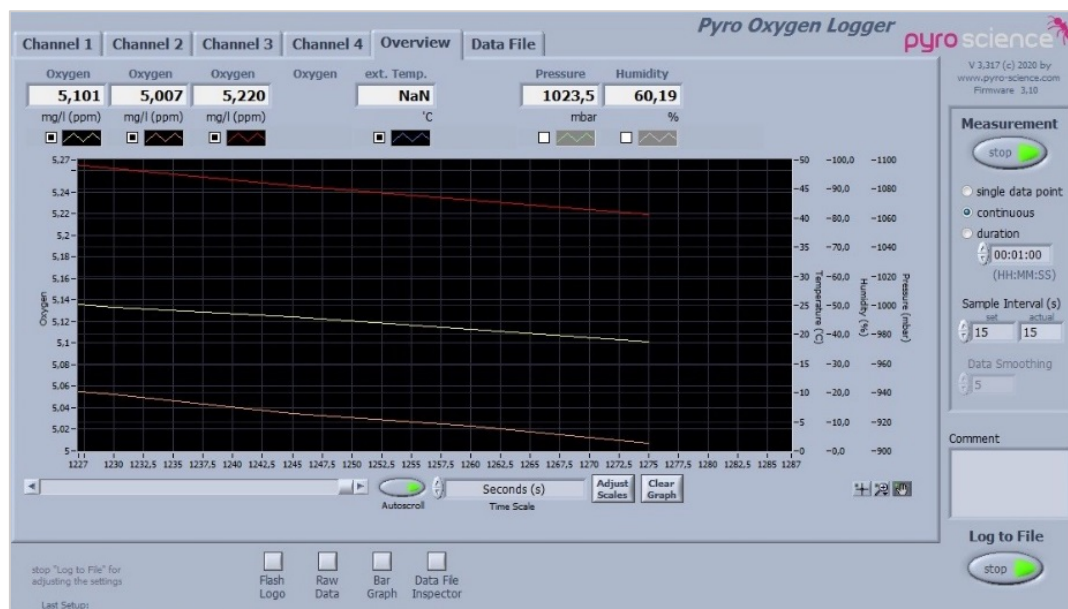


Figura 12: Oxygen Logger (Pyroscience), il grafico rappresenta il consumo di ossigeno nel tempo all'interno delle camere di respirometria.

2.4. Tunnel del Nuoto

Il sistema utilizzato consiste in una vasca (10L) contenente il tunnel di nuoto di 38x10x10cm, la cui temperatura è mantenuta costante, e pari a quella di acclimatazione, grazie ad un sistema di riscaldamento/raffreddamento automatico. Il flusso laminare dell'acqua è permesso da un motore interno ed un sistema di griglie (fig. 14) poste ad entrambe le estremità del tunnel, mentre la velocità del flusso è controllata dall'operatore mediante un controller esterno ed un voltmetro.

La calibrazione del tunnel del nuoto (Fig. 13) è stata effettuata prima dell'inizio della fase sperimentale mediante una sonda di flusso ad alta precisione (Höntzsch Flow Measuring Technology), effettuando test di calibrazione sul fondo e a metà della camera del tunnel, dai quali si è ottenuta l'equazione del flusso applicata in fase sperimentale.

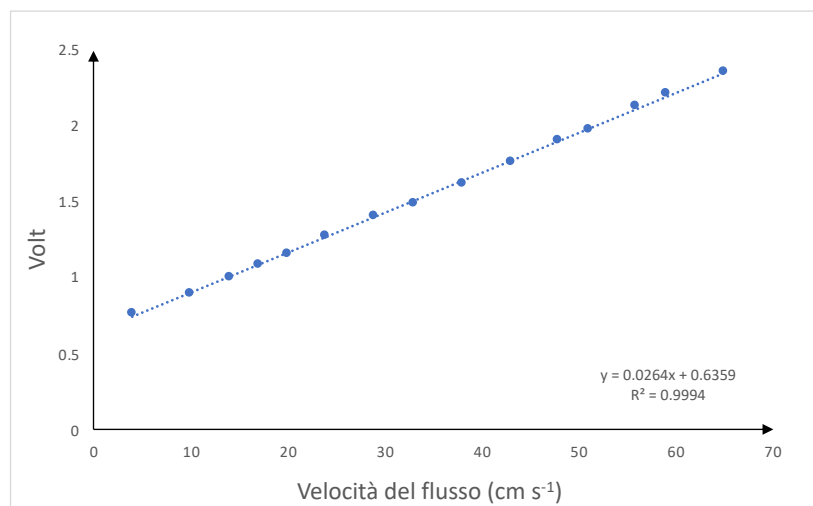


Figura 13: Curva di calibrazione del tunnel del nuoto.

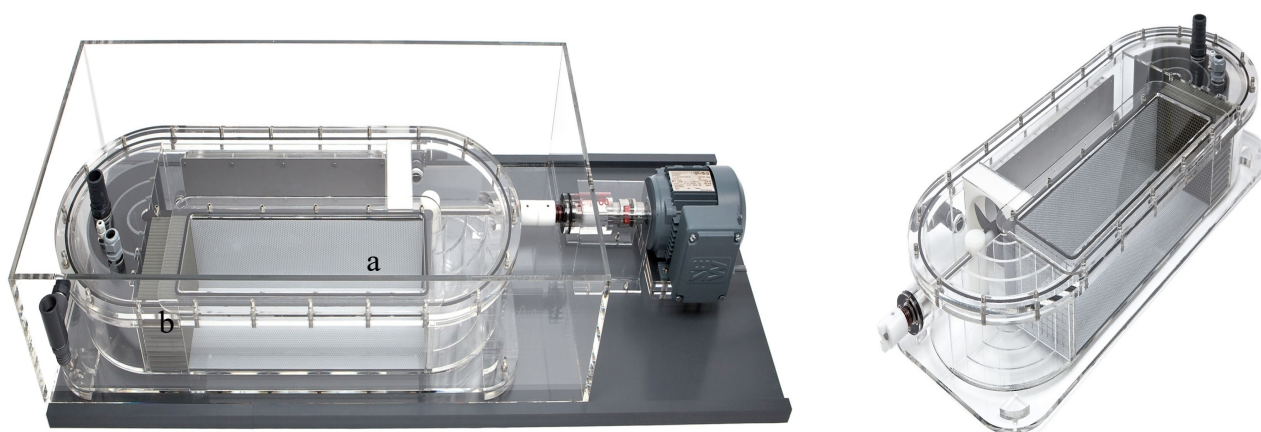


Figura 14: Swim tunnel (10L) Loligo Systems. (a) Camera del tunnel del nuoto; (b) sistema di griglie che garantiscono il flusso laminare.

Al termine delle 2 ore in vasca di supporto, gli animali venivano posti singolarmente all'interno della camera (fig. 14) del tunnel del nuoto. Qui gli animali erano sottoposti ad un test di aumento della velocità ad accelerazione costante del flusso dell'acqua. Questi test hanno permesso di valutare la capacità di adesione al substrato dei ricci attraverso l'analisi

del *dislodgment*, dove per *dislodgment* si intende il distacco degli organismi dal substrato a causa di forzanti biotiche o abiotiche. All'inizio del test, la velocità veniva impostata a 20 cm s^{-1} , l'organismo veniva posto al centro del tunnel e mantenuto in posizione per 1 minuto così da garantire l'adesione al fondo, si provvedeva poi alla chiusura della vasca, e mediante l'utilizzo del controller esterno (fig. 15) si iniziava la fase di accelerazione: partendo da una velocità minima di 20 cm s^{-1} è stato eseguito un incremento di 5 cm ogni 2 minuti fino al distacco dell'animale, o in caso di mancato distacco, fino ad una velocità massima di 70 cm s^{-1} . L'utilizzo di un timer ed un voltmetro ha reso possibile l'individuazione precisa della velocità del flusso alla quale avveniva il distacco dell'animale dal fondo della camera (velocità al distacco) e la durata del test. Quando si raggiungeva una velocità maggiore di 70 cm s^{-1} , per una durata del test pari a 22 minuti, e l'animale restava adeso al fondo della camera, veniva considerato come "non soggetto a dislodgment".

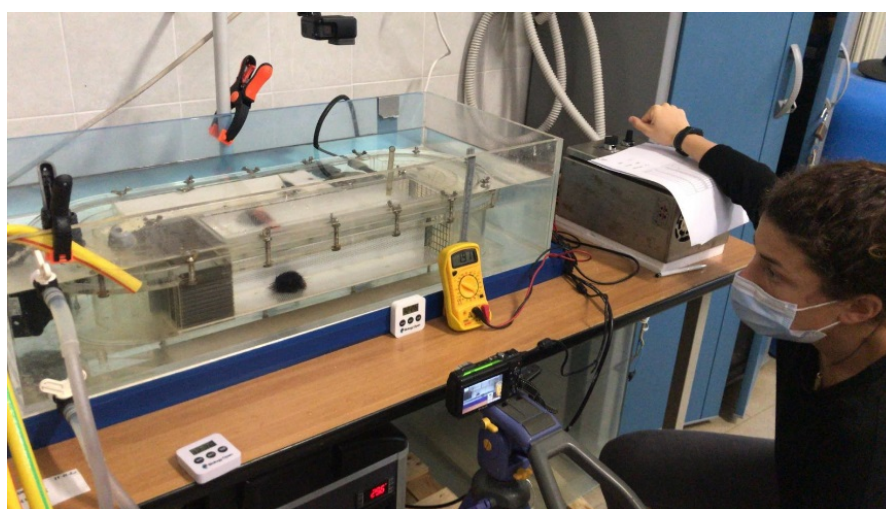


Figura 15: Esempio di un test di adesione al substrato del riccio effettuato con il tunnel del nuoto. Sono visibili l'animale nella camera, le videocamere in posizione e l'operatore che utilizza il controller esterno per la regolazione dell'accelerazione.

2.4.1. Biomeccanica

Durante i test del tunnel del nuoto, sono state effettuate delle registrazioni video a 1080p 30fps, mediante l'utilizzo di due videocamere: una Olympus Stylus TG-870 posta di fronte alla vasca, e una GoPro HERO 6 posta superiormente alla vasca così da riprendere nel campo di registrazione oltre al tunnel da entrambe le prospettive (i.e. laterale e superiore), anche il timer e il voltmetro.

Al termine degli esperimenti le registrazioni sono state utilizzate per le analisi della biomeccanica dell'adesione al substrato: dai video della videocamera laterale sono stati estrapolati i frame (QuikTime Player 10.5) per ogni minuto di registrazione (1 frame min^{-1}), questi sono stati utilizzati per misurare l'angolo (α) formato dell'animale rispetto al fondo dello swim tunnel al momento del distacco e l'altezza (h) dell'animale al distacco (ImageJ 1.52a, fig. 16), mentre dalle riprese della videocamera superiore è stato analizzato lo spostamento effettuato degli animali durante i test (Tracker 5.0.5 fig. 17).

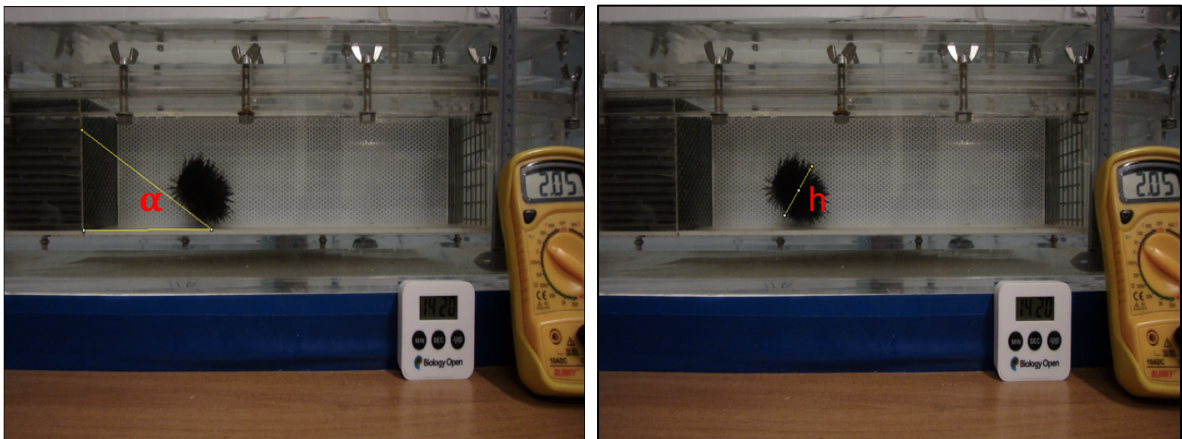


Figura 16: Immagini scattate dalla videocamera frontale, è possibile vedere il tunnel del nuoto, il timer e il voltmetro; a sinistra la misura dell'angolo α al distacco e a destra la misura dell'altezza h al distacco (ImageJ).

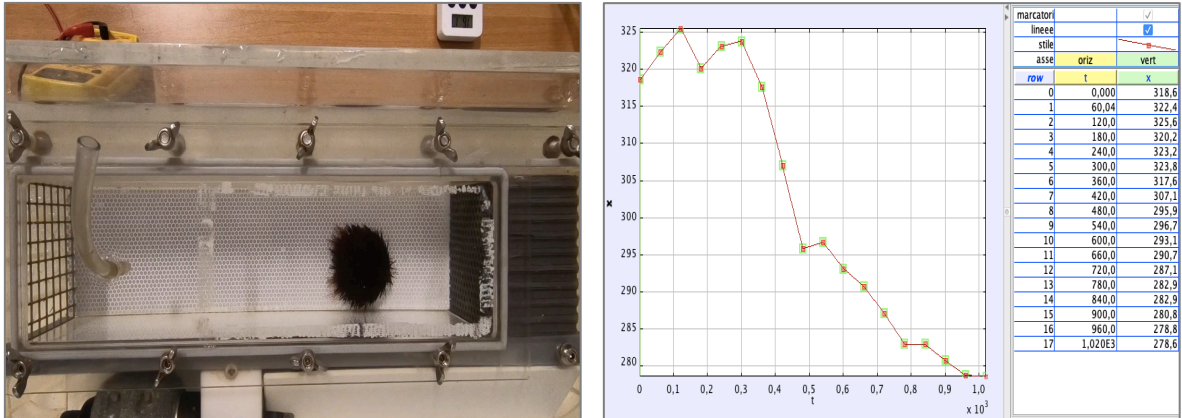


Figura 17: A sinistra un'immagine scattata dalla videocamera superiore, è possibile vedere il tunnel del nuoto ed il timer; a destra l'analisi dello spostamento effettuato dall'animale durante l'esperimento (Tracker).

2.5. Biometrie

Al termine delle fasi sperimentali gli animali sono stati sacrificati per la raccolta delle biometrie. I ricci venivano pesati, poi con l'utilizzo di un calibro venivano misurati il diametro maggiore (\varnothing_{mag} , inteso come la lunghezza totale dell'animale, spine comprese), il diametro minore (\varnothing_{min} , misura dell'animale escludendo le spine), l'altezza maggiore (spine incluse), l'altezza minore (spine escluse) e l'altezza relativa, data dal rapporto tra l'altezza maggiore dell'animale all'inizio e alla fine dell'esperimento ($h_{\text{iniziale}}/h_{\text{finale}} \times 100$). Infine, venivano raccolti i dati del peso del contenuto stomacale e del peso gonadico, e le informazioni riguardo lo stato delle gonadi e il sesso dell'animale (quando lo stadio di maturità sessuale era tale da permetterne l'identificazione).

2.6. *Analisi statistica*

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SigmaPlot 11.0. I dati raccolti alle varie temperature di acclimatazione sono stati confrontati utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA). Tutti i dati sono stati testati per l'omogeneità della varianza e normalità nella distribuzione. Nel caso in cui i dati non fossero distribuiti normalmente è stato utilizzato il test corrispondente non-parametrico dell'ANOVA, il test di Kruskal-Wallis. Per isolare i gruppi sperimentali che differivano statisticamente dagli altri sono state effettuate analisi post-hoc utilizzando il test di Dunn's. Per individuare eventuali relazioni tra le variabili analizzate sono state effettuate le regressioni lineari (*Linear Regression*) tra i trattamenti.

3. Risultati

Tra gli organismi di ciascun trattamento non sono state misurate differenze significative di peso (ANOVA, $P= 0,156$) e diametro minore (\varnothing_{\min} , diametro dell'animale includendo le spine, ANOVA, $P= 0,380$, fig. 18).

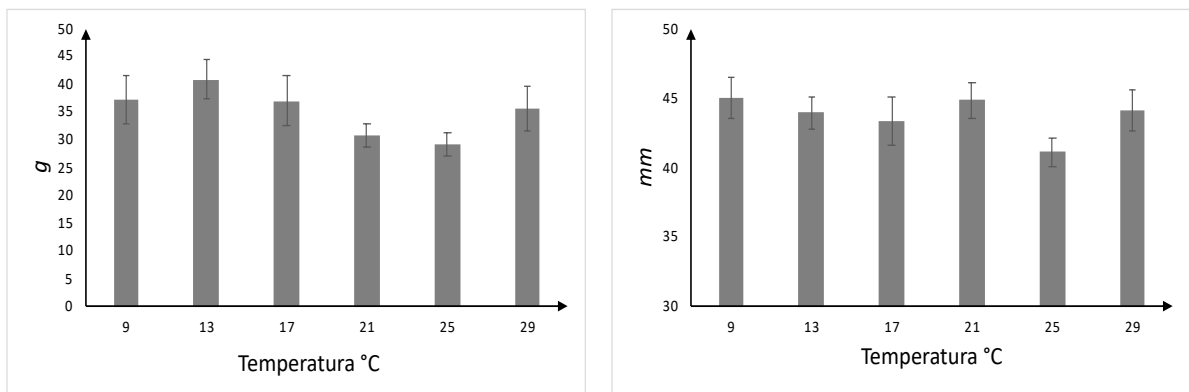


Figura 18: A sinistra, istogramma rappresentante i valori dei dati peso (g); a destra, istogramma rappresentante il diametro minore (\varnothing_{\min} mm) misurato nei gruppi sperimentali in funzione della temperatura di acclimatazione (media \pm errore standard, ES).

Durante le fasi di stabulazione, acclimatazione e durante i test non si sono verificati fenomeni di emissione. Infatti, condizioni di stress elevato possono indurre il rilascio dei gameti. Individui sprovvisti di gonadi o con gonadi poco sviluppate sono stati trovati alle temperature di 21, 25 e 29°C, mentre individui con gonadi mature sono stati trovati alle temperature di 9, 13 e 17 °C. Tra i trattamenti non sono state trovate differenze significative nel peso delle gonadi (Kruskal-Wallis, $P=0,287$, tab. 1, fig.19).

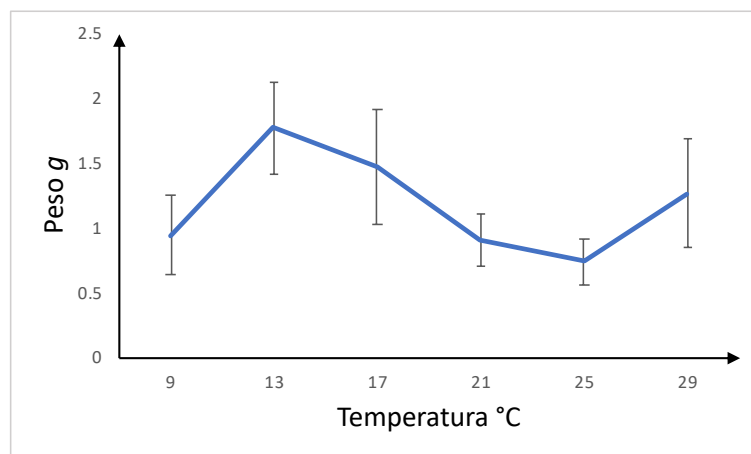


Figura 19: Variazione del peso gonadico misurato nei gruppi sperimentali in funzione della temperatura di acclimatazione (media \pm ES).

È stata osservata una differenza significativa tra il peso del contenuto stomacale degli organismi nei diversi trattamenti (ANOVA, $P < 0,001$, tab.1). Per isolare i gruppi che differiscono dagli altri è stato effettuato post-hoc il test di Dunn's. Vi sono differenze significative tra il peso del contenuto stomacale dei trattamenti 9, 13 e 17°C, rispetto ai trattamenti 21, 25 e 29°C ($P < 0,05$, fig. 20).

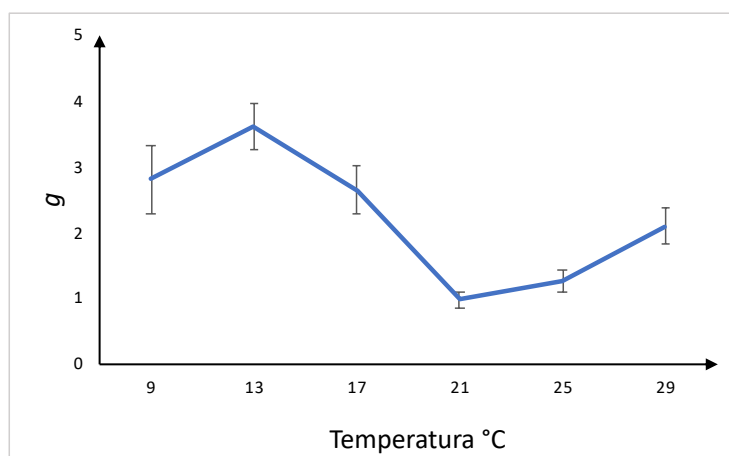


Figura 20: Variazione del peso del contenuto stomacale (g) nei gruppi sperimentali in funzione della temperatura di acclimatazione (media \pm ES).

T	Peso (g)	Diametro (\varnothing_{\min} mm)	Gonadi (g)	Contenuto stomacale (g)
9 °C	37.17 ± 13.27	45.00 ± 4.57	0.95 ± 0.98	2.80 ± 1.65
13 °C	40.82 ± 11.98	43.92 ± 3.92	1.77 ± 1.21	3.60 ± 1.24
17 °C	36.96 ± 15.71	43.33 ± 5.94	1.48 ± 1.53	2.65 ± 1.24
21 °C	30.76 ± 7.60	44.83 ± 4.49	0.90 ± 0.70	0.99 ± 0.42
25 °C	29.03 ± 7.11	41.08 ± 3.63	0.75 ± 0.62	1.26 ± 0.55
29 °C	59.69 ± 9.57	44.08 ± 5.14	1.27 ± 1.45	2.09 ± 0.94

Tabella 1: Dati di peso degli animali (g), diametro minore (mm), peso delle gonadi (g) e peso del contenuto stomacale (g) degli organismi nei differenti trattamenti sperimentali (media ± ES).

3.1. *Mortalità*

Durante il periodo di stabulazione a 21°C si è verificata la morte di due individui, mentre durante la rampa di acclimatazione non vi è stata mortalità in alcun gruppo, tranne che nel gruppo 33 °C in cui è stata misurata una mortalità del 100% degli individui. Questi hanno iniziato a mostrare un cattivo stato di salute il primo giorno che hanno raggiunto la temperatura di 33 °C. Al secondo giorno di acclimatazione si è verificata la morte di 8 individui, al terzo di due individui, il quinto di un solo individuo mentre l'ultimo individuo è sopravvissuto fino al settimo giorno di acclimatazione (fig. 21).

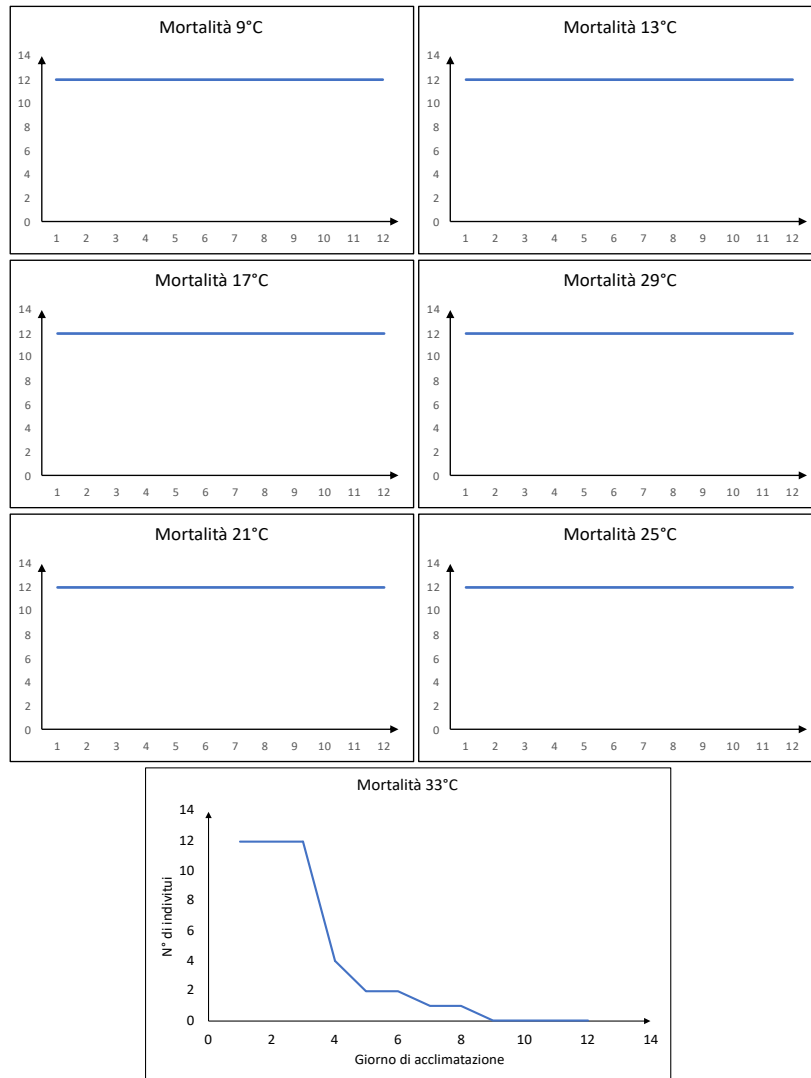


Figura 21: Rappresentazione della mortalità degli organismi (n° di organismi) durante la fase di acclimatazione (14 giorni) alle differenti temperature di acclimatazione.

3.2. *Tasso metabolico*

Sono state trovate differenze significative nel tasso metabolico tra le diverse temperature sperimentali ($P < 0,001$, Kruskal-Wallis, tab. 2, fig. 22). Nello specifico il post-hoc test ha rilevato delle differenze altamente significative tra le temperature di 21, 25 e 29 °C rispetto alle temperature 9, 13 e 17 °C ($P < 0,05$, Dunn's test).

T	Tasso metabolico (mg O ₂ Kg ⁻¹ hr ⁻¹)
9 °C	3.50 ± 2.84
13 °C	9.47 ± 3.15
17 °C	13.24 ± 4.16
21 °C	30.27 ± 11.77
25 °C	20.77 ± 6.74
29 °C	27.71 ± 12.77

Tabella 2: Dati del tasso metabolico degli organismi nei differenti gruppi sperimentali (media ± ES).

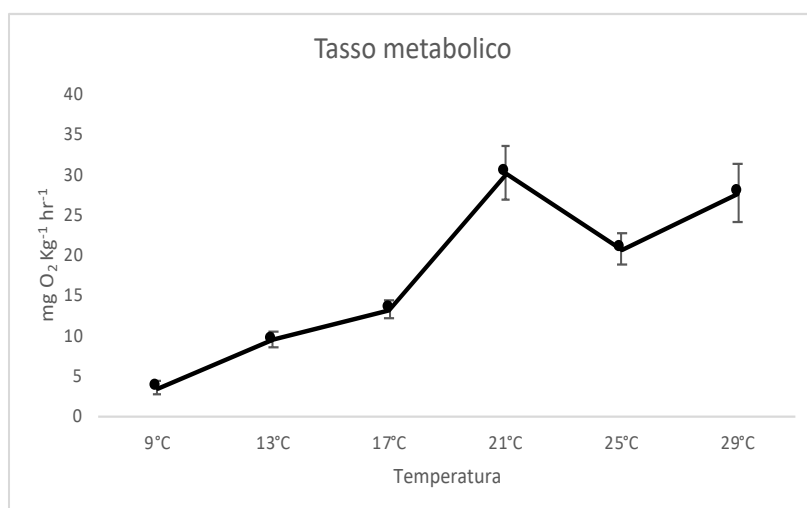


Figura 22: Tasso metabolico degli organismi (mgO₂Kg⁻¹hr⁻¹) in funzione della temperatura di acclimatazione (media ± ES).

3.3. *Analisi biomeccaniche della tenuta al substrato*

Non sono state riscontrate differenze significative tra le velocità del flusso al distacco dal substrato ($P=0,227$ Kruskal-Wallis, tab.3 fig. 23). In alcuni trattamenti sono presenti individui che non sono soggetti a *dislodgment*, e nello specifico n. individui: 13°C= 1, 17°C= 4, 21°C= 3, 29°C= 3.

T	Velocità al distacco (cm s-1)
9 °C	56.42 ± 10.45
13 °C	55.99 ± 17.30
17 °C	63.21 ± 17.96
21 °C	54.71 ± 16.47
25 °C	52.50 ± 12.12
29 °C	59.69 ± 9.57

Tabella 3: Dati della velocità del flusso al distacco degli organismi nei differenti gruppi sperimentali (media ± ES).

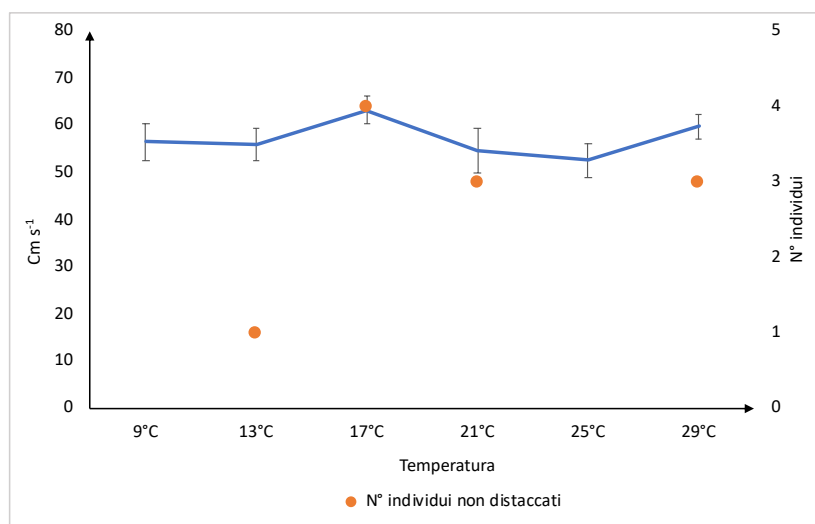


Figura 23: Velocità del flusso al distacco dal substrato in funzione della temperatura di acclimatazione (media ± es).

È stata osservata una relazione positiva tra la variabile indipendente Velocità al distacco e la variabile dipendente Altezza al distacco ciò non accade nelle analisi di regressione lineare tra le diverse temperature.

L'angolo al distacco analizzato mediante test di Kruskal-Wallis mostra significative differenze statistiche ($P = <0,001$), in particolare l'ampiezza dell'angolo al distacco aumentava all'aumentare della temperatura sperimentale. Per isolare i gruppi che differiscono dagli altri si è utilizzato post-hoc il metodo di Dunn's ed anche in questo caso vi è una significativa differenza tra i gruppi 21, 25 e 29 °C rispetto ai gruppi 9, 13 e 17 °C ($P < 0,05$, fig. 24).

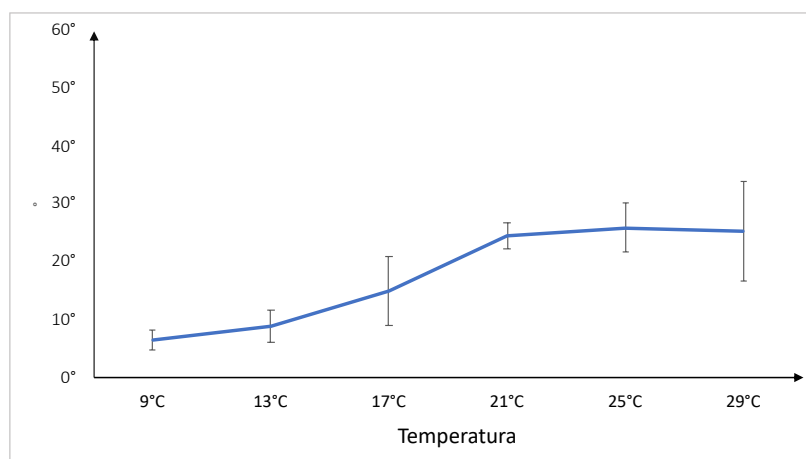


Figura 24: Variazione dell'ampiezza dell'angolo α al distacco in funzione della temperatura di acclimatazione (media \pm ES).

È stata riscontrata una relazione positiva tra la variabile indipendente metabolismo e la variabile dipendente angolo al distacco (*Linear regression* $P < 0,005$), tale relazione non si verifica però tra temperature differenti.

Tra i valori dello spostamento dei i gruppi sperimentali non sono state osservate differenze significative (Kruskal-Wallis, $P=0,761$).

È stata osservata una relazione positiva tra la variabile indipendente metabolismo e dipendente spostamento (*Linear Regression* $P < 0,005$), ma tale risultato potrebbe essere dovuto al caso in quanto la varianza non è costante ($R^2 = 0.31$). Tale relazione non si verifica nelle analisi di regressione lineare effettuate tra le temperature.

Le differenze tra i valori dell'altezza relativa dei gruppi non sono statisticamente significative (Kruskal-Wallis, $P = 0,057$, fig. 25).

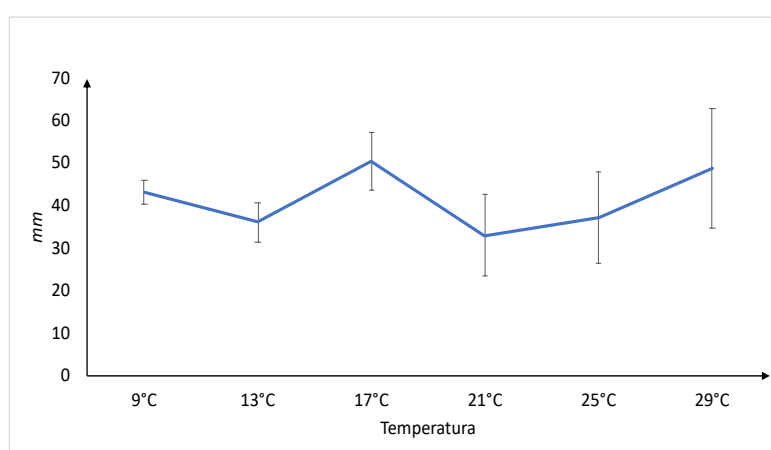


Figura 25: Variazione dell'altezza relativa ($h_{iniziale}/h_{finale} \times 100$) degli animali in funzione della temperatura di acclimatazione (*media \pm ES*).

4. Discussione

Paracentrotus lividus è una specie intertidale il cui range di distribuzione è molto ampio, lo ritroviamo lungo le coste del Mediterraneo e dell'Atlantico orientale, principalmente a profondità comprese tra 0 e 20 m, e in alcuni casi fino agli 80 m. Riesce infatti a sopravvivere a temperature che variano dagli 8 ai 28 °C, e in alcune zone del Mediterraneo resiste a temperature superiori ai 30 °C (Lawrence, 2007). Nel corso di tale sperimentazione è stato descritto il tasso metabolico della specie per l'intero areale di distribuzione, gli animali sono stati acclimatati infatti a sette temperature differenti: 9, 13, 17, 21, 25, 29 e 33 °C. Il tasso di mortalità è pari a zero in tutte le temperature sperimentali, tranne che a 33 °C, dove si è verificato il 100% della mortalità. Gli animali sono quindi riusciti ad acclimatarsi anche a temperature superiori ai 28 °C, spingendosi fino ai 29 °C mantenendo un buono stato di salute.

Gli ectotermi, ed in particolare gli invertebrati marini, con l'aumentare della temperatura tendono ad aumentare il consumo di ossigeno, e quindi il loro tasso metabolico, a causa degli effetti termodinamici sulla cinetica enzimatica (Carey et al., 2016). Questo avviene però in modo limitato, in quanto temperature elevate possono essere letali (Delorme e Sewell, 2016). Tuttavia, con un tempo di acclimatazione sufficiente, si prevede che gli ectotermi riescano a raggiungere un limite di tolleranza termica più elevato rispetto ai conspecifici non acclimatati (Schmidt-Nielsen, 1997; Suckling et al., 2015). L'elevata resistenza mostrata dai soggetti sperimentali fa pensare che questi abbiano sviluppato una maggiore tolleranza termica a causa del progressivo aumento di temperature causato dai cambiamenti climatici in Mediterraneo, e in particolare nella zona del Mar di Sardegna.

Questo lavoro di tesi rappresenta il primo studio in cui è stata effettuata la caratterizzazione metabolica di *P. lividus* in funzione della temperatura di acclimatazione. A differenza di altre specie di vertebrati e invertebrati, in cui è possibile misurare il metabolismo massimale e la capacità metabolica in seguito ad un aumento dell'attività degli animali, nei ricci di mare indurre uno sforzo locomotorio tale da poter misurare il metabolismo massimale non è così evidente. In tale lavoro si è quindi considerato il tasso metabolico di routine (RMR, *Routine Metabolic Rate*) degli organismi.

Nel corso del lavoro si è osservato che il tasso metabolico degli individui aumentava all'aumentare della temperatura di acclimatazione. Ciò non accadeva però secondo un modello gaussiano così come avviene in molte specie di ectotermi ed endotermi (Gillooly et al., 2001), dove il tasso metabolico aumenta con la temperatura fino all'optimum termico, e al raggiungimento di una temperatura critica si ha una depressione metabolica (Storey e Storey, 2004). Infatti, nei soggetti sperimentali l'aumento del tasso metabolico è altamente significativo considerando 2 gruppi di temperature: il primo gruppo 9, 13 e 17 °C, in cui il tasso metabolico aumenta all'aumentare della temperatura, ed il secondo gruppo 21, 25 e 29 °C in cui si raggiunge un plateau metabolico: tra le temperature 21 °C e 29 °C non si ha una significativa diminuzione del tasso metabolico. Oltre i 29 °C si è verificata la morte degli organismi. Vediamo quindi che al contrario di ciò che avviene in molte specie, anche di ricci, come *Heliocidaris erythrogramma*, in cui un aumento della temperatura porta prima ad un aumento del tasso metabolico, e poi ad una depressione di questo (Harianto et al., 2018), *P. lividus* non mostra un decremento nelle performance fisiologiche nell'intero range di temperature di distribuzione, e dimostra in questo modo di avere elevata capacità di adattamento anche in vista dei futuri cambiamenti climatici. La differenza tra i tassi metabolici dei due gruppi di temperature spiega inoltre la differenza ritrovata nel peso dei

contenuti stomacali (fig. 20), gli individui con un tasso metabolico minore presentano contenuti stomacali di peso maggiore.

Dal punto di vista ecologico per gli organismi bentonici, ed in particolare per gli echinodermi, la capacità di adesione al substrato è un fattore fondamentale, da essa dipende perciò la colonizzazione ambientale e la sopravvivenza della specie. Nonostante ciò, ad oggi, pochi studi sono stati effettuati su come le forze idrodinamiche agiscano sugli echinoidi, è però evidente che soprattutto in acque poco profonde, l'azione delle onde può causare spostamenti, danni e persino la morte degli individui (Denny, 1987; Verling et al., 2005). È noto che la mortalità di *P. lividus* aumenta in coincidenza di forti perturbazioni temporalesche caratterizzate da velocità del vento elevate e forte moto ondoso (Verling et al., 2005). Per far fronte alla variabilità delle forze idrodinamiche che caratterizzano l'area intertidale, questi organismi mettono in atto una serie di strategie (Denny, 1987), mostrando risposte a breve, medio e lungo termine. Le risposte a breve termine, consistono in comportamenti specifici durante i quali gli organismi cercano rifugio o cercano di ridurre la superficie esposta alle correnti variando l'orientamento delle spine (Dance, 1987; Stewart e Britton-Simmons, 2011); le risposte a medio termine includono una modulazione della loro adesione, grazie alla regolazione della produzione di composti adesivi (Toubarro et al., 2016); le risposte a lungo termine comportano un adattamento della loro morfologia e delle proprietà meccaniche attraverso la plasticità fenotipica (Cohen e Rengifo, 2017, Trussel, 1997). Abbiamo visto come la resistenza al distacco sia permessa dai pedicelli ambulacrali o dalla possibilità di trovare rifugio in anfratti e cavità. A livello dei pedicelli ambulacrali, vi è una sovraespressione di una proteina di adesione, la nectina, che potrebbe essere coinvolta nella produzione di secrezioni adesive (Toubarro et al, 2016). Secondo studi effettuati su mitili (*Mytilus californianus* e *M. edulis*) tale capacità di adesione al substrato

potrebbe non dipendere solo dalle caratteristiche fisiologiche degli organismi ma anche da altri fattori, come ad esempio la dimensione degli organismi, la posizione all'interno degli aggregati, la presenza di epizoidi e la temperatura ambientale: nei mitili *M. californianus* e *M. edulis*, la forza necessaria a distaccare gli animali dal substrato, risulta essere maggiore per gli organismi di maggiori dimensioni e per quelli posizionati più esternamente agli aggregati (e quindi più esposti), anche la temperatura sembra avere un effetto positivo, in *M. edulis* e *Geukensia demissa* all'aumentare della temperatura ambientale, corrisponde un aumento della produzione del bisso, e quindi delle capacità di adesione al substrato degli organismi (Allen et al., 1976; Van Winkle, 1970). Mentre un'influenza negativa è dovuta alla eventuale presenza di epizoidi, che riducono la capacità dei mitili di resistere al *dislodgment* (Whitman e Suchanek, 1984), dove per “dislodgement” si intende il distacco o la rimozione degli organismi dal substrato in seguito all'esposizione a forzanti biotiche o abiotiche. Vediamo quindi quanto siano numerosi e diversificati i fattori che possono avere effetto sulla capacità di adesione.

Nel corso di questa tesi sperimentale, attraverso test a velocità crescente del flusso effettuati con tunnel del nuoto, è stata testata la correlazione tra capacità e biomeccanica di adesione e la temperatura di acclimatazione degli organismi. La temperatura di acclimatazione non ha avuto effetti sulla capacità di adesione, non vi sono significative differenze tra le velocità di *dislodgment* dei ricci acclimatati alle diverse temperature (fig. 23). Bisogna tener conto che la capacità adesiva potrebbe essere influenzata dalla permanenza in acquario e da una variazione delle condizioni idrodinamiche a cui gli organismi sono esposti. Infatti, in precedenti studi effettuati su *P. lividus* si è visto che l'espressione del gene della nectina, responsabile della produzione delle proteine di adesione nei pedicelli ambulacrali, in animali tenuti in acquario risulta essere ridotta di 1,5 volte

rispetto ad animali appena pescati (Toubarro et al., 2016). Inoltre, in natura la capacità di adesione potrebbe essere influenzata anche dalla possibilità degli animali di trovarsi in prossimità di un riparo o di trovarsi in aggregati, come avviene per *M. californianus* e *M. edulis* (Whitman e Suchanek, 1984).

Prima del distacco dal substrato gli animali hanno mostrato due tipi di comportamenti: alcuni individui si distaccavano improvvisamente scivolando lungo il fondo del tunnel di nuoto, mentre la maggioranza tendeva a resistere alla corrente sollevandosi gradualmente rispetto al fondo, restando attaccati con i pedicelli ambulacrali che progressivamente venivano estesi. L'angolo (α) formato dall'animale rispetto al fondo della camera tende ad aumentare con l'aumento della temperatura di acclimatazione, in particolare è stata osservata una differenza significativa tra i due gruppi di temperature: 9, 13 e 17 °C e 21, 25 e 29 °C (fig. 24), con un netto aumento dell'ampiezza dell'angolo α alla temperatura di 21°C. Tale comportamento trova inoltre una relazione positiva con il tasso metabolico. Gli individui capaci di resistere maggiormente ad un flusso contrario sollevandosi dal fondo, sono gli individui con un tasso metabolico più elevato, tale relazione non risulta però essere influenzata dalla temperatura di acclimatazione.

Il comportamento di *P. lividus* quando esposto ad un flusso crescente, era stato precedentemente descritto. Gli animali tendono a muoversi maggiormente ed in modo casuale in assenza di flusso, a basse velocità di flusso tendono a muoversi più velocemente alla ricerca di un rifugio, mentre a velocità critiche (50 cm s^{-1}) iniziano a fermarsi per poi arrestarsi completamente ad una velocità di 55 cm s^{-1} (Cohen-Rengifo et al., 2019). Anche nel corso di questo lavoro, sono stati osservati questi comportamenti tipici di spostamento, ed è stata osservata una relazione positiva con l'MR. Gli animali che durante gli esperimenti

si sono spostati maggiormente, presentano un MR maggiore, in modo indipendente rispetto alla temperatura di acclimatazione.

È stato dimostrato, che in ambienti esposti come le coste rocciose, l'idrodinamica modifica le dimensioni e la forma di molti invertebrati marini, agendo come un fattore ambientale selettivo che innesca la plasticità fenotipica. Vediamo infatti che in luoghi esposti, una diminuzione delle dimensioni corporee, comporta una minore esposizione a stress idrodinamici, aumentando la resistenza degli organismi e prevenendo il loro spostamento passivo (Denny, 1991; Vogel, 1994). Variazioni fenotipiche del riccio di mare con l'idrodinamica sono state frequentemente segnalate, in particolare è noto che ricci provenienti da coste rocciose, più esposte alle correnti, siano fenotipicamente più piccoli e piatti rispetto ad individui provenienti da habitat poco esposti alle onde (Lewis e Storey, 1984; Edwards e Ebert, 1991; Jacinto e Cruz, 2012). Questo non avviene però in *P. lividus*, animali provenienti da siti differenti, presentano un fenotipo simile nonostante l'esposizione a condizioni idrodinamiche diverse (Cohen-Rengifo, 2017). In questa specie, e in diverse specie di *Strongylocentrotus* sono stati però osservati comportamenti di adattamento a condizioni idrodinamiche avverse, questi sono capaci di riorganizzare l'orientamento delle spine quando esposti a flussi moderati, tale comportamento riduce infatti il rischio di distacco degli animali (Cohen-Rengifo, 2018; George e Carrington, 2014). Anche nel corso del seguente studio si sono osservati comportamenti di riduzione delle dimensioni attraverso la riorganizzazione delle spine, che venivano abbassate lungo il corpo dell'animale all'aumentare della velocità del flusso. Questo accadeva in tutte le temperature sperimentali, i ricci non hanno infatti mostrato differenze significative in tale comportamento alle diverse temperature di acclimatazione.

È noto che *P. lividus* sia una specie con ampie capacità di adattamento alla temperatura ambientale. Durante il lavoro, essi sono infatti riusciti ad acclimatarsi a temperature superiori a quelle del range termico della specie. Ciò potrebbe essere dovuto ai cambiamenti climatici in atto, e al progressivo aumento di temperature a cui gli animali sono esposti in natura. Dal punto di vista metabolico è presente una relazione positiva tra il tasso metabolico e la temperatura di acclimatazione, in particolare, l'RMR degli animali aumenta all'aumentare della temperatura di acclimatazione fino ai 21°C, dopo tale soglia, fino ai 29°C, non si ha un significativo decremento del tasso metabolico. Durante l'acclimatazione gli individui sono andati incontro a morte una volta raggiunti i 33°C. È quindi possibile ipotizzare che *P. lividus* potrebbe riuscire ad acclimatarsi anche a temperature pari a 31-32°C, prima di incorrere in una depressione metabolica, così come avviene in altre specie. La temperatura di acclimatazione non ha effetto sulla capacità degli animali di restare adesi al substrato, anche a velocità elevate del flusso. Questo potrebbe però influenzare il comportamento degli organismi in risposta al flusso. Vediamo infatti come l'angolo al distacco degli organismi sia correlato positivamente all'aumento della temperatura di acclimatazione.

5. Conclusioni

Dal seguente studio appare chiaro che i ricci di mare appartenenti alla specie *P. lividus* non sembrano risentire dell'attuale innalzamento delle temperature causato dai cambiamenti climatici. La capacità di acclimatarsi ad una temperatura di 29 °C, e l'assenza di una depressione metabolica fino a tale temperatura, fa pensare che con il progressivo aumento delle temperature previsto nei prossimi decenni (IPCC, 2014), questi organismi potrebbero aumentare ulteriormente la loro tolleranza termica. È quindi possibile supporre che la riduzione della distribuzione e della taglia media della specie a cui si sta assistendo in questi anni (Guidetti et al., 2004), non sarebbero solo da attribuire ai cambiamenti climatici, ma anche ad altri fattori come, ad esempio, la sovrapesca della specie (Gras, 1987; Regis, 1988; Guidetti et al., 2004). Sulla base dei risultati di questo lavoro di tesi è opportuno effettuare ulteriori studi per capire come questa specie risponderà ad ulteriori variazioni climatiche, incluse la riduzione del tasso di ossigeno disciolto nell'acqua (i.e. ipossia) e della riduzione del pH (i.e. acidificazione oceanica) e quali potrebbero essere gli adattamenti e le risposte comportamentali adottate.

6. Bibliografia

- Albouy C., Guilhaumon F., Leprieur F., Ben Rais Lasram F., Somot S., Aznar R., and others, ‘Projected Climate Change and the Changing Biogeography of Coastal Mediterranean Fishes’, *Journal of Biogeography*, 40.3 (2013), 534–47
- Allen J. A., Cook M., Jackson D. J., Preston, S., Worth, E. M. (1976). Observations on the rate of production and mechanical properties of the byssus threads of *Mytilus edulis* L. *J. moll. Stud.* 42: 279-289
- Arafa S., Sadok S., and El Abed A., ‘Variation in Nitrogenous Compounds and Gonad Index in Fed and Starved Sea Urchins (*Paracentrotus Lividus*) during Live Storage’, *Aquaculture*, 257.1–4 (2006), 525–33
<<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.040>>
- Arevalo E., Larrañaga A., Lang M., Prevost E., and Bardonnnet A., ‘Comparison of the Propensity to Drift for Three Invertebrate Taxa: A Laboratory Study’, *Hydrobiologia*, 830.1 (2019), 243–54
- Arizzi Novelli A., Argese E., Tagliapietra D., Bettiol C., Volpi Ghirardini A., Toxicity of tributyltin and triphenyltin to early life-stages of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) (2002)
- Balvanera P., Pfisterer A. B., Buchmann N., Shen He J., Nakashizuka T., Raffaelli D., and others, ‘Quantifying the Evidence for Biodiversity Effects on Ecosystem Functioning and Services’, *Ecology Letters*, 9.10 (2006), 1146–56
- Blanckaert, K., Garcia X. F., Ricardo A. M., Chen Q., and Pusch M. T., ‘The Role of Turbulence in the Hydraulic Environment of Benthic Invertebrates’, *Ecohydrology*, 6.4 (2013), 700–712

- Boudouresque C.F., Verlaque M. (2001). Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Dev Aquac Fish Sci*, **32**: 177 - 216.
- Byrne M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the West coast of Ireland. *Mar Biol*, **104**: 275 – 289.
- Carey N., and Sigwart J. D., ‘Size Matters: Plasticity in Metabolic Scaling Shows Body-Size May Modulate Responses to Climate Change’, *Biology Letters*, 10.8 (2014)
- Carey N., Harianto J., and Byrne M., ‘Sea Urchins in a High-CO2 World: Partitioned Effects of Body Size, Ocean Warming and Acidification on Metabolic Rate’, *Journal of Experimental Biology*, 219.8 (2016), 1178–86
- Catarino, A. I., Bauwens M., and Dubois P., ‘Acid-Base Balance and Metabolic Response of the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus* to Different Seawater PH and Temperatures’, *Environmental Science and Pollution Research*, 19.6 (2012), 2344–53
- Cohen-Rengifo M., Agüera A., Detrain C., Bouma T. J., Dubois P., and Flammang P., ‘Biomechanics and Behaviour in the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus* (Lamarck, 1816) When Facing Gradually Increasing Water Flows’, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 506.May (2018), 61–71
- Cohen-Rengifo M., Antonio Agüera, Bouma T., M’ZoudiS., Flammang P., and Dubois P., ‘Ocean Warming and Acidification Alter the Behavioral Response to Flow of the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus*’, *Ecology and Evolution*, 9.21 (2019), 12128–43

- Cohen-Rengifo M., Moureaux C., Dubois P., and Flammang P., ‘Attachment Capacity of the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus* in a Range of Seawater Velocities in Relation to Test Morphology and Tube Foot Mechanical Properties’, *Marine Biology*, 164.4 (2017), 1–14
- Coll M., Navarro J., Palomera I., Ecological role, fishing impact, and management options for the recovery of a Mediterranean endemic skate by means of food web models, *Biological Conservation*, Volume 157, (2013)
- Collard, M., Catarino, A. I., Bonnet, S., Flammang, P. and Dubois, P. (2013a). Effects of CO₂-induced ocean acidification on physiological and mechanical properties of the starfish *Asterias rubens*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 446, 355-362.
- Dance, C. (1987). Patterns of activity of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Bay of Port-Cros. *Marine Ecology*, 8(2), 131–142.
- Delorme J. N., Sewell M. A., Effects of warm acclimation on physiology and gonad development in the sea urchin *Evechinus chloroticus* (2016)
- Denny M.W., Life in the maelstrom: the biomechanics of wave-swept rocky shores. *Trends Ecol Evol* 2:61–66 (1987)
- Dillon M.E., Wang G., and Huey R. B., ‘Global Metabolic Impacts of Recent Climate Warming’, *Nature*, 467.7316 (2010), 704–6
- Doney Scott C., Ruckelshaus M., J. Emmett Duffy, Barry J. P., Chan F., English C. A., and others, ‘Climate Change Impacts on Marine Ecosystems’, *Annual Review of Marine Science*, 4 (2012), 11–

- Fernandez C., and Boudouresque C. F., 'Nutrition of the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus* (Echinodermata: Echinoidea) Fed Different Artificial Food', *Marine Ecology Progress Series*, 204 (2000), 131–41
- Frantzis, A., 'Ingestion, Absorption, and Growth Rates of *Paracentrotus Lividus* (Echinodermata: Echinoidea) Fed Different Macrophytes', *Marine Ecology Progress Series*, 95 (1992), 169–83
- Forstner H., Gnaiger E., Calculation of Equilibrium Oxygen Concentration. In: Gnaiger E., Forstner H. (eds) *Polarographic Oxygen Sensors*. (1983). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-81863-9_28
- Gianguzza P., Chiantore M., Bonaviri C., Cattaneo-Vietti R., Vielmini I., and Riggio S., 'The Effects of Recreational *Paracentrotus Lividus* Fishing on Distribution Patterns of Sea Urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy)', *Fisheries Research*, 81.1 (2006), 37–44
- Gillooly, J. F., J. H. Brown, G. B. West, V. M. Savage, and E. L. Charnov, 'Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate', *Science*, 293.5538 (2001), 2248–51
- Gras G., "Evolution des stocks de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* dans le quartier maritime de Marseille (France), soumis a une pêche intensive, entre les campagnes 1984–1985 et 1986–1987." *Colloque International sur Paracentrotus lividus et les Oursins Comestibles. Marseille: GIS Posidonie*. (1987).
- Guidetti P., Terlizzi A., Boero F., Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea), *Fisheries Research*, Volume 66, Issues 2–3, (2004).
- Halsey L. G., Matthews P. G. D., Rezende E. L., Chauvaud L., and Robson A. A., 'The Interactions between Temperature and Activity Levels in Driving Metabolic

- Rate: Theory, with Empirical Validation from Contrasting Ectotherms’, *Oecologia*, 177.4 (2015), 1117–29
- Harianto, J., Nguyen, H. D., Holmes, S. P., & Byrne, M. The effect of warming on mortality, metabolic rate, heat-shock protein response and gonad growth in thermally acclimated sea urchins (*Heliocidaris erythrogramma*). *Marine Biology*, 165(6), 1-12, (2018).
 - Hereu, B., Zabala M., Linares C., and Sala E., ‘Temporal and Spatial Variability in Settlement of the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus* in the NW Mediterranean’, *Marine Biology*, 144.5 (2004), 1011–18
 - Hertig, E., and Jacobeit J., ‘Downscaling Future Climate Change: Temperature Scenarios for the Mediterranean Area’, *Global and Planetary Change*, 63.2–3 (2008), 127–31
 - Kaniewska P., Campbell P. R., Kline D. I., Rodriguez-Lanetty M., Miller D. J., Dove S., and others, ‘Major Cellular and Physiological Impacts of Ocean Acidification on a Reef Building Coral’, *PLoS ONE*, 7.4 (2012)
 - Killen S.S., Atkinson D., Glazier D.S., The intraspecific scaling of metabolic rate with body mass in fishes depends on lifestyle and temperature. *Ecol. Lett.* (2010)13, 184 – 193.
 - Lawrence J., *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology, Second edition* 2007
 - Lejeusne C., Chevaldonné P., Pergent-Martini C., Boudouresque C. F., and Pérez T., ‘Climate Change Effects on a Miniature Ocean: The Highly Diverse, Highly Impacted Mediterranean Sea’, *Trends in Ecology and Evolution*, 25.4 (2010), 250–60

- Lozano J., Galera J., Lòpez S., Turon X., Palacìn C., Morera G. (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar Ecol Progr Ser*, **122**: 179 – 191.
- Marras S., Cucco A., Antognarelli F., Azzurro E., Milazzo M., Bariche M., and others, ‘Predicting Future Thermal Habitat Suitability of Competing Native and Invasive Fish Species: From Metabolic Scope to Oceanographic Modelling’, *Conservation Physiology*, 3.1 (2015), 1–14
- Martínez I., García F.J., Sánchez A.I., Daza J.L., del Castillo F. (2003). Biometric parameters and reproductive cycle of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in three habitats of southern Spain. In: Féral J.P., David B. (eds) *Echinoderm research* (2001), A. A. Balkema, Lisse, 281 - 287.
- Melatunan, S., Calosi, P., Rundle, S. D., Moody, A. J. and Widdicombe, S. (2011). Exposure to elevated temperature and pCO₂ reduces respiration rate and energy status in the periwinkle *Littorina littorea*. *Physiol. Biochem. Zool.* 84, 583-594.
- Morgan R., Sundin J., Finnøen M. H., Dresler G., Martínez Vendrell M., Dey A., and others, ‘OUP Accepted Manuscript’, *Conservation Physiology*, 7.1 (2019), 1–11
- Mouillot, D., Paleczny, M., Palomares, M.L., Steenbeek, J., Trujillo, P., Watson, R. & Pauly, D. (2011) The Mediterranean Sea under siege: spatial overlap between marine bio- diversity, cumulative threats and marine reserves. *Global Ecology and Biogeography*, 21, 465–480.
- Naman S. M., Rosenfeld J. S., Richardson J. S., and Way J. L., ‘Species Traits and Channel Architecture Mediate Flow Disturbance Impacts on Invertebrate Drift’, *Freshwater Biology*, 62.2 (2017), 340–55

- Newell R. C., and Branch G. M., ‘The Influence of Temperature on the Maintenance of Metabolic Energy Balance in Marine Invertebrates’, *Advances in Marine Biology*, 17.C (1980), 329–96
- Norin, T., and Clark T. D., ‘Measurement and Relevance of Maximum Metabolic Rate in Fishes’, *Journal of Fish Biology*, 88.1 (2016), 122–51
- Physical, The, and Science Basis, *CLIMATE CHANGE 2013 Climate Change 2013 Edited By, Researchgate.Net*, 2013
- Poli A., Fabbri E., *Fisiologia degli animali marini*, Seconda edizione, 2018
- Przeslawski R., Byrne M., and Mellin C., ‘A Review and Meta-Analysis of the Effects of Multiple Abiotic Stressors on Marine Embryos and Larvae’, *Global Change Biology*, 21.6 (2015), 2122–40.
- Régis M. B., "Impact et résultats de la Campagne “Sauvon l’oursin comestible: Paracentrotus lividus” (Echinodermata, Echinoida)." *Actes du VI Séminaire International sur les Echinodermes. Ile des Embiez (Var-France)* (1988): 11-22.
- Rummer J. L., Couturier C. S., Stecyk J. A. W., Gardiner N. M., Kinch J. P., Nilsson, G. E. and others, ‘Life on the Edge: Thermal Optima for Aerobic Scope of Equatorial Reef Fishes Are Close to Current Day Temperatures’, *Global Change Biology*, 20.4 (2014), 1055–66 <<https://doi.org/10.1111/gcb.12455>>
- Santos R., Haesaerts D., Jangoux M., and Flammang P., ‘The Tube Feet of Sea Urchins and Sea Stars Contain Functionally Different Mutable Collagenous Tissues’, *Journal of Experimental Biology*, 208.12 (2005), 2277–88
- Schmidt-Nielsen K., *Animal Physiology. Adaptation and Environment* 1997

- Spirlet C., Grosjean P., Jangoux M. (1998). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of the maturity index. *Invertebr Reprod Dev*, **34**(1): 69 - 81.
- Steffensen, J. F. "Some errors in respirometry of aquatic breathers: how to avoid and correct for them." *Fish Physiology and Biochemistry* 6.1 (1989): 49-59.
- Stewart H. L., and Britton-Simmons K. H., 'Streamlining Behaviour of the Red Urchin *Strongylocentrotus Franciscanus* in Response to Flow', *Journal of Experimental Biology*, 214.16 (2011), 2655–59
- Storey B. K., Storey J. M., Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls (2003)
- Suckling, C. C., Clark, M. S., Richard, J., Morley, S. A., Thorne, M. A. S., Harper, E. M., & Peck, L. S. (2015). Adult acclimation to combined temperature and pH stressors significantly enhances reproductive outcomes compared to short-term exposures. *Journal of Animal Ecology*, *84*(3), 773–784.
- Svendsen M. B.S., Bushnell P. G., and Steffensen J. F., 'Design and Setup of Intermittent-Flow Respirometry System for Aquatic Organisms', *Journal of Fish Biology*, 88.1 (2016), 26–50
- Toubarro D., Gouveia A., Mesquita Ribeiro R., Simões N., da Costa G., Cordeiro C., and others, 'Cloning, Characterization, and Expression Levels of the Nectin Gene from the Tube Feet of the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus*', *Marine Biotechnology*, 18.3 (2016), 372–83
- Trussell G.C., 1997. Phenotypic plasticity in the footsize of an intertidal snail. *Ecology* 78, 1033–1048.

- Ulbricht R. J., ‘Effect of Temperature Acclimation on the Metabolic Rate of Sea Urchins’, *Marine Biology*, 19.4 (1973), 273–77
- Van Winkle W., Effect of environmental factors on byssal thread formation. *Mar. Biol.* 7: 143-148 (1970)
- Verling E., Barnes D. K. A., and Crook A. C., ‘Smashing Tests? Patterns and Mechanisms of Adult Mortality in a Declining Echinoid Population’, *Marine Biology*, 147.2 (2005), 509–15
- Vitelletti M. L., ‘Biologia Riproduttiva Di Paracentrotus Lividus (Lamarck, 1816) in Due Zone Della Sardegna’, 2013
- Watson S. A., Morley S. A., Bates A. E., Clark M. S., Day R. W., Lamare M., and others, ‘Low Global Sensitivity of Metabolic Rate to Temperature in Calcified Marine Invertebrates’, *Oecologia*, 174.1 (2014), 45–54
- Whitman J.D., and Suchanek T.H., ‘Mussels in Flow: Drag and Dislodgement by Epizoans’, *Marine Ecology Progress Series*, 16 (1984), 259–68
- Yeruham E., Rilov G., Shpigel M., and Abelson A., ‘Collapse of the Echinoid Paracentrotus Lividus Populations in the Eastern Mediterranean - Result of Climate Change?’, *Scientific Reports*, 5. July (2015), 1–6

Ringraziamenti

Questo lavoro rappresenta una tappa importante di un percorso di crescita personale che non termina qui. Durante gli anni di studio si sono alternati tanti momenti e tante esperienze, ciascuna delle quali ha contribuito a portarmi fin qui, con la consapevolezza di ciò che sono e di ciò che vorrei diventare.

Tante persone mi hanno accompagnato e hanno contribuito, nel loro piccolo, alla mia crescita e a questa grande soddisfazione, e per questo sento di doverle ringraziare.

Grazie alla mia famiglia, senza la quale non sarei ciò che sono. Grazie a mia mamma e mio padre che, con i fatti, mi hanno dimostrato cosa vuol dire non arrendersi e a credere in ciò che si desidera, e grazie a nonna Paolina che mi ha insegnato la pazienza, il sacrificio e l'amore.

Un enorme grazie va poi a Stefano, che con la sua professionalità e disponibilità mi ha insegnato tanto, seguendomi assiduamente durante il mio percorso di tesi, spiegandomi e mostrandomi ogni cosa con pazienza. Grazie, non potevo chiedere di meglio.

Grazie a Francesca, per i mille consigli, per aver trovato sempre un minuto per me, per le serate, per aver condiviso tante passioni (in particolare quella per il LIDL), e soprattutto grazie per le figuracce in cui mi hai sempre sostenuta.

Grazie ad Ale e Ornella, per essere stati una seconda famiglia in Sardegna.

Ringrazio tutto l'istituto IAS-CNR di Oristano, grazie a tutti per avermi accolta con il sorriso e per essere stati sempre disponibili nei miei confronti.

Grazie a Benni ed Andrea, che da sempre sono l'angioletto e il diavoletto che porto sulle spalle.

Grazie al gruppo di Ancona, i migliori amici e compagni che potessi trovare. In particolare, grazie a Chiara, il mio "grillo parlante", a Carlotta, per le avventure in vespa, gli scleri durante le ore di studio e le insalate scondite, e a Charlie, sempre sincera (anche troppo) ed in grado di farmi ragionare.

E come ho già detto in passato, grazie a chi crede in me.