

Università degli Studi di Genova

Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

**Dottorato di ricerca in scienze e tecnologie per l'ambiente e il
territorio (STAT)**

XXX Ciclo

Curriculum: Scienze del Mare

**“Ciclo di sviluppo di *Crassostrea gigas*
(Thunberg, 1793) ed interazioni con organismi
planctonici.”**

Relatore: Prof. Luigi Pane

Candidato: Guido Bonello

INDICE

1. <u>Introduzione</u>	Pag.6
2. <u>Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)</u>	<u>11</u>
2.1 <u>Morfologia</u>	<u>13</u>
<u>2.1.1 Mantello</u>	<u>14</u>
<u>2.1.2 Le Branchie</u>	<u>15</u>
<u>2.1.3 I Palpi Labiali</u>	<u>15</u>
2.2 <u>Riproduzione – Ciclo di sviluppo</u>	<u>16</u>
2.3 <u>Alimentazione</u>	<u>21</u>
<u>2.3.1 Torbidità dell’acqua e morfologia in Crassostrea gigas</u>	<u>26</u>
<u>2.3.2 Seston e Clearance Rate</u>	<u>30</u>
<u>2.3.3 Clearance Rate e Temperatura</u>	<u>33</u>
2.4 <u>Plancton-benthos: ruolo ecologico di Crassostrea gigas</u>	<u>37</u>
<u>2.4.1 Biodeposizione ed arricchimento del sedimento</u>	<u>41</u>
<u>2.4.2 Interazioni con la colonna d’acqua</u>	<u>43</u>
3. <u>Inquinamento da materiale plastico</u>	<u>47</u>
3.1 <u>Microplastiche</u>	<u>52</u>
<u>3.1.1 Biofilm associati a microplastiche</u>	<u>56</u>
<u>3.1.2 Microplastiche e bivalvi</u>	<u>59</u>
<u>3.1.3 Microplastiche ed organismi planctonici</u>	<u>62</u>
<u>3.1.4 Faecal pellets e microplastiche</u>	<u>67</u>
4. <u>Areale di studio</u>	<u>69</u>
4.1 <u>Caratteristiche delle acque</u>	<u>73</u>
4.2 <u>Legislazione di riferimento</u>	<u>75</u>
<u>4.2.1 La direttiva 91/492/CEE</u>	<u>79</u>
4.3 <u>Gli impianti di allevamento</u>	<u>81</u>

<u>5. Attività di monitoraggio</u>	<u>84</u>
<u>5.1 Materiali e metodi</u>	<u>87</u>
<u>5.1.1 Biomassa fitoplanctonica</u>	<u>87</u>
<u>5.1.2 Seston</u>	<u>88</u>
<u>5.1.3 Microplastiche in organismi filtratori</u>	<u>89</u>
<u>5.1.4 Morfologia degli organi palleali di <i>Crassostrea gigas</i></u>	<u>90</u>
<u>5.2 Analisi statistiche</u>	<u>92</u>
<u>5.3 Risultati</u>	<u>93</u>
<u>6. Attività di laboratorio</u>	<u>112</u>
<u>6.1 Alginato e applicazioni</u>	<u>112</u>
<u>6.2 Immobilizzazione di organismi monocellulari</u>	<u>116</u>
<u>6.3 Materiali e metodi</u>	<u>118</u>
<u>6.3.1 Colture fitoplanctoniche</u>	<u>118</u>
<u>6.3.2 Immobilizzazione di organismi fitoplanctonici</u>	<u>120</u>
<u>6.3.3 Reperimento di giovanili di <i>Crassostrea gigas</i></u>	<u>123</u>
<u>6.3.4 Grazing</u>	<u>124</u>
<u>6.3.5 Quantificazione delle proteine totali</u>	<u>126</u>
<u>6.4 Risultati</u>	<u>129</u>
<u>6.5 Prove di mantenimento</u>	<u>134</u>
<u>6.5.1 Alghe libere</u>	<u>135</u>
<u>6.5.2 Alghe immobilizzate</u>	<u>136</u>
<u>6.6 Risultati</u>	<u>137</u>
<u>7. Particellato organico e microplastiche</u>	<u>144</u>
<u>7.1 Materiali e metodi</u>	<u>147</u>

<u>7.1.1 Microsfere di Na-Alginato</u>	<u>147</u>
<u>7.2 Esposizione</u>	<u>149</u>
<u>7.2.1 <i>Tigriopus fulvus</i></u>	<u>149</u>
<u>7.2.2 <i>Crassostrea gigas</i></u>	<u>151</u>
<u>7.2.3 Acetilcolinesterasi</u>	<u>153</u>
<u>7.2.4 Particellato inorganico</u>	<u>158</u>
<u>7.3 Risultati</u>	<u>160</u>
<u>8. Discussioni e conclusioni</u>	<u>171</u>
<u>9. Bibliografia</u>	<u>191</u>

1. Introduzione

La molluschicoltura rappresenta uno dei principali comparti dell'acquacoltura a livello globale, nonché una delle zootecnie più sostenibili ed ecocompatibili (Shumway, 2003); secondo il report FAO (Food and Agriculture Organization, 2015) al 2013 sono state prodotte circa 15 milioni di tonnellate di molluschi, per un valore di circa 20 miliardi di dollari americani. Attualmente vengono allevate a fini commerciali diverse specie di molluschi bivalvi, tra cui mitili (*Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis*), le vongole (*Venerupis philippinarum* e *Venerupis decussata*), pettine (*Pecten maximus*), ostriche (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica* ed *Ostrea edulis*) e circa 553'000 tonnellate sono riconducibili al mollusco bivalve *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Questo organismo rappresenta una produzione marina legata strettamente alla tradizione locale e nazionale, con le quali si interfacciano tecniche di antico retaggio, tecnologie avanzate e sfide a carattere scientifico-ambientale.

In questo contesto, l'approfondimento delle conoscenze sulla biologia di queste specie, in particolare di *Crassostrea gigas*, ricopre un ruolo di primaria importanza in relazione alla complessa rete di interazioni che lega tali organismi alla struttura e alla dinamica della colonna d'acqua ed alla composizione quali-

quantitativa del materiale in sospensione in essa contenuto, ai fini anche della gestione della risorsa.

Lo sviluppo e l'accrescimento dei molluschi bivalvi dipende soprattutto dalla qualità del seston presente nelle zone di allevamento ed in particolare dal contributo energetico derivante dalla sostanza organica particellata (particulate organic matter, POM) vivente (batteri, fitoplancton, microzooplancton) e dall'apporto di energia e materia fornito dal detrito proveniente dal metabolismo di organismi appartenenti a diversi livelli trofici. Una frazione rilevante del seston è rappresentata dai "*faecal pellets*", prodotti principalmente da organismi mesozooplanctonici (crostacei e plancton gelatinoso), che possono contenere sostanze di pregio utili per l'alimentazione degli organismi filtratori (Lowe *et al.*, 2014).

Per quanto riguarda *Crassostrea gigas*, è stata dimostrata la sua capacità di filtrare notevoli volumi d'acqua, rimuovendo dalla colonna d'acqua grandi quantità di particellato (Newell and Ott, 1999). Recentemente è stato dimostrato che tale processo è mediato da complessi meccanismi di riconoscimento delle particelle in sospensione, sulla base delle loro caratteristiche chimiche, fisiche e dimensionali (Ward & Shumway, 2004).

Durante il processo di filtrazione l'ostrica è in grado di "bioconcentrare" sostanze di varia natura utili per il suo metabolismo, ma anche xenobiotici che possono rappresentare un fattore limitante per lo sviluppo ed un fattore di rischio per gli organismi dei livelli trofici superiori. Tra i contaminanti emergenti legati al ciclo di sviluppo dei lamellibranchi, un ruolo chiave è rivestito dalle "microplastiche", intese come "frammenti di materiale plastico aventi dimensioni inferiori a 1 mm (Andrady, 2011)".

Le microplastiche, essendo ubiquitarie e resistenti alla biodegradazione, possono essere rinvenute in ambiente pelagico e neritico, in relazione ai processi di circolazione delle masse d'acqua. Per quanto si dia, principalmente, risalto alle drammatiche condizioni delle zone di accumulo relative ai *gyres* pelagici (Carpenter & Smith, 1972; Wong, Green & Cretney, 1974; Day & Shaw, 1987; Moore et al., 2001; Law et al., 2010; Goldstein, Rosenberg & Cheng, 2012), di notevole interesse appare la contaminazione da sostanze plastiche ambiente marino costiero, ove insistono gli impianti di molluschicoltura (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Li *et al.*, 2015).

In particolare, il trasferimento verticale delle microplastiche lungo la colonna d'acqua legato ai processi di alimentazione degli

organismi planctonici e bentonici, infatti, l'alimentazione di molte specie di questi due comparti dipendono dall'utilizzo della materia organica particellata che la ingeriscono trattenendo sia le sostanze con valore nutrizionale sia quelle presenti come contaminanti. In questo contesto se le microplastiche sono inglobate in matrici organiche quali ad esempio i faecal pellets, che per le loro caratteristiche fisiche tendono a sedimentare, vengono trasferite dagli strati più superficiali verso il fondo ove interesseranno il il comparto bentonico (Turner, 2002).

Obiettivo principale del presente lavoro di tesi di dottorato è stato quello di contribuire all' conoscenza sulla base delle caratteristiche ambientali idonee allo sviluppo di *Crassostrea gigas*, delle complesse interazioni che s'instaurano tra il sistema colonna d'acqua-plancton e il controllo "top down" della POM.

A tale scopo sono stati elaborati i dati, acquisiti durante l'attività di monitoraggio effettuato in campo, nel corso del Progetto Transfrontaliero MARTE+ e successivamente su una stazione di campionamento appositamente individuata nel Golfo di La Spezia; quindi sono state messe a punto modalità di mantenimento in laboratorio di giovanili di *C.gigas* , seguendone l'accrescimento in presenza di differenti regimi alimentari, comprendenti alghe

fitoplanctoniche libere e/o immobilizzate in alginato di sodio, come modello di simulazione di una parte di particolato organico.

L'attività di ricerca è proseguita prendendo in considerazione alcuni aspetti dei meccanismi di trasferimento verticale delle microplastiche, mettendo a punto un modello di laboratorio in grado di simulare la presenza di queste ultime nel particolato organico e di valutarne l'attività di grazing da parte delle ostriche.

2. *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).

Tabella 1 Tassonomia di *C.gigas*

<i>Crassostrea gigas</i>	
Dominio	Eukaryota
Regno	Animalia
Sottoregno	Eumetazoa bilateria
Phylum	Mollusca
Subphylum	Conchifera
Classe	Bivalvia
Sottoclasse	Pteriomorpha
Ordine	Ostreoida
Famiglia	Ostreidae
Genere	<i>Crassostrea</i>
Specie	<i>C.gigas</i>



Figura 1 Esemplare di *Crassostrea gigas*

Crassostrea gigas, detta anche **ostrica concava** o **del pacifico**, appartiene alla Classe dei bivalvi e dal punto di vista morfologico presenta due valve unite dorsalmente, tramite una cerniera. All'estremità posteriore si trova l'**umbone** dal quale si espandono strie di accrescimento concentriche. La circolazione dell'acqua necessaria per l'alimentazione all'interno dell'organismo è garantita da due sifoni, uno inalante ed uno esalante, circondati da un esteso mantello che va a ricoprire la quasi totalità dell'interno delle valve. Le ostriche sono privi di radula, come la

maggior parte dei molluschi bivalvi, non presentano il piede, struttura necessaria per l'ancoraggio al substrato, e l'adesione avviene allo stadio di veliger, tramite una sostanza adesiva secreta dalla ghiandola del bisso.

A seguito di introduzioni a fini di allevamento, *Crassostrea gigas* è diventata una specie estremamente distribuita nelle acque europee, comprese quelle mediterranee.



Figura 2 Distribuzione di *C.gigas* in Italia (FAO, 2017)

Crassostrea gigas è in grado di formare dense zone di aggregazione che escludono le specie intertidali autoctone (Eno et al., 1997). Sulle coste italiane sono attualmente presenti 35 specie di molluschi alloctoni, di cui 22 stabilmente presenti. Il primo

reperito di introduzione di specie di mollusco aliena, il gasteropode *Littorina saxatilis*, è datato 1792 (Crocetta *et al.*, 2013).

2.1 Morfologia

Gli organi interni (branchie, cuore, centri nervosi, intestino, muscolo adduttore, organi riproduttivi, palpi labiali e stomaco) sono protetti dalla conchiglia e dal mantello.

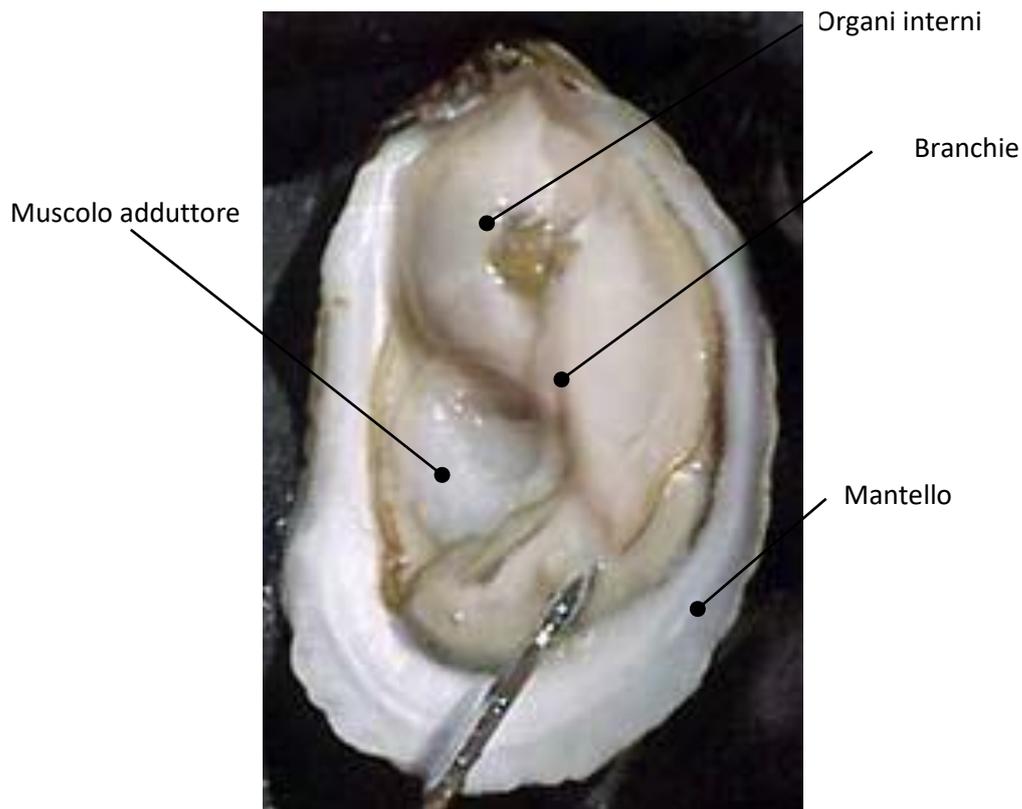


Figura 3 Morfologia interna di *Crassostrea gigas*

2.1.1 Mantello

L'ammasso viscerale è interamente coperto e parzialmente fuso con il mantello; è presente un ampio canale situato tra il muscolo adduttore ed i visceri, che connette la cavità epibranchiale destra con la cavità dorsale. Il mantello può essere suddiviso in tre sezioni, ricopre quasi tutto il tessuto molle ed è caratterizzato dalla presenza di tessuti connettivi, fibre muscolari, una rete circolatoria non distribuita ed un sottile strato di filamenti muscolari trasversi appena sotto l'epitelio. La porzione di mantello sottile è situata principalmente attorno al muscolo adduttore e consiste di uno strato di muscolo subepiteliale ed uno o due strati di muscolo obliquo, con un ben distribuito apparato di distribuzione dell'emolinfa. La struttura dei tessuti connettivi al limite del muscolo adduttore differisce dal resto del mantello per la distribuzione radiale diretta verso i margini del mantello, composto da tre lobi (dorsale, ventrale e posteriore), con tre ripiegamenti. Il ripiegamento esterno è liscio e separata dalla piega adiacente da un solco, il margine distale della porzione anteriore è ricoperto da una fila di papille, nella porzione posteriore sono presenti due o più file di papille e il ripiegamento interno nel margine ha una singola fila di papille.

La superficie interna dei lobi del mantello è ricoperta da un epitelio ciliato, sul quale è presente una porzione del sistema cardio-circolatorio, i due lobi formano uno spazio semichiuso che viene diviso dalle branchie in due camere comunicanti, la camera d'ingresso e quella cloacale.

2.1.2 Le branchie

Le pliche delle branchie sono distribuite regolarmente e composte ciascuna da 10-12 filamenti e da 2 filamenti più spessi, composti da aste scheletriche e vasi sanguigni circondati da tessuti connettivi. Le demi-branchie così costituite sono unite, da setti interlamellari, ai principali filamenti e formano passaggi orientati dorso-ventralmente, che lasciano quattro serie di aperture branchiali basali, il loro diametro diminuisce verso l'estremità ventrale. L'ampia base branchiale presente nella camera epibranchiale porta 5 creste longitudinali. La cresta mediana si connette ventralmente con il muscolo adduttore e la massa dei visceri, formando un setto longitudinale con due camere epibranchiali.

2.1.3 I palpi labiali

I palpi labiali hanno una struttura asimmetrica e presentano una sostanziale differenza dimensionale; essi si fondono con la massa viscerale ed il mantello alle estremità prossimali, ma sono liberi a

quelle distali. L'altezza e la larghezza delle creste presenti sulla superficie dei palpi labiali aumentano verso l'estremità; a livello del palpo labiale avviene la principale selezione delle particelle ingerite durante l'alimentazione. Infatti, i nutrienti selezionati vengono diretti dal palpo allo stomaco, dove saranno sottoposti ad una digestione sia extracellulare che endocellulare.

I lamellibranchi, come organismi sospensivori, effettuano un'efficace filtrazione sul materiale sospeso durante l'alimentazione.

2.2 Riproduzione – Ciclo di sviluppo

Crassostrea gigas è un organismo ermafrodita proterandrico, con fecondazione esterna in grado di maturare caratteristiche sessuali maschili e femminili durante il ciclo di sviluppo, alle nostre latitudini la riproduzione avviene dalla primavera all'autunno, a seconda delle condizioni ambientali e produce tra 100.000 e 1.500.000 uova. In *C.gigas* gli spermatozoi o ovociti, si formano nelle gonadi o ghiandole genitali, che allo stadio di maturità appaiono come una massa biancastra dai contorni indefiniti che circonda l'apparato digestivo, percorso da una serie di sottili cannule convergenti in un canale ciliato. I gameti sono quindi condotti alla cloaca, dalla quale sono emessi tramite un orifizio uro-genitale posto nella camera esalante. Lo sperma è quindi

espulso in acqua dalla corrente cloacale, mentre il percorso delle uova si svolge lungo le ostie dei filamenti branchiali fino alla camera inalante. I gameti sono quindi liberati nella colonna d'acqua a seguito di movimenti alternati di chiusura ed apertura delle valve e la fecondazione avviene nella colonna d'acqua. Un tempo di circa tre settimane intercorre tra la deposizione e la fissazione della larva, di cui meno della metà destinato all'incubazione.

Tabella 2 Stadi di maturazione gonadica di *Crassostrea gigas* durante il processo riproduttivo.

Stadio	Gonade	Descrizione
0-5	Molto magra - vuota	Gonade vuota, corrisponde al riposo sessuale o alla fine dell'espulsione dei gameti
1	Poco grassa - Gonadi in formazione	Inizio della gametogenesi
2	Grassa	Gonadi ben sviluppate, ma la dissociazione dei gameti resta difficile
3	3P Molto grasso maturo Molto grassa 3H Molto grasso o gonadi ipertrofiche	Stato di media replezione della gonade, gameti abbondanti e facilmente dissociabili Stadio di massima replezione, gonade ipertrofica, uno spesso strato bianco crema avvolge la massa viscerale, gameti molto abbondanti ed escono con una leggera pressione
4	Parzialmente vuoto	Stadio di emissione dei gameti, c'è regressione del volume della gonade la cui la colorazione diventa giallastra, la parte anteriore della ghiandola digestiva è visibile, gameti meno abbondanti
5	Vuoto	Deposizione quasi completa, animale magro, simile allo stadio 0.

L'analisi delle gonadi consente la definizione dello stadio riproduttivo, analogamente alla presenza di materiale latteo o dall'apparizione di larve nei campioni di mesozooplankton. La vita larvale e quindi planctonica di *Crassostrea gigas* attraversa differenti modificazioni morfologiche, di accrescimento e variazione del colore e l'apparizione progressiva di organi che consentono di stabilire evoluzione e stadio dello sviluppo embrionale. Nove differenti stadi di sviluppo intercorrono tra le larve e la forma adulta, distinguibili per caratteristiche morfologiche e di sviluppo della conchiglia. Gli stadi iniziali sono comuni a differenti specie di molluschi bivalvi e si compongono di cinque passaggi sequenziali:

uovo fecondato, blastula, gastrula, trocofora e veliger

Fino allo stadio di veliger planctonico, la conchiglia è assente, ma va considerato che gli stadi da uovo fecondato a trocofora si susseguono rapidamente, tanto che in meno di una giornata il primo stadio di sviluppo è completato.

Successivamente si sviluppano i 3 stadi successivi:

prodissoconca I, prodissoconca II e dissoconca.

La differenziazione di questi stadi è determinata dallo sviluppo della conchiglia protettiva, la lunghezza di questa trasformazione

è fortemente dipendente dalle condizioni ambientali, in particolare dalla temperatura. La prodissoconca andrà quindi a formarsi negli stadi successivi al veliger, con la tipica forma a D (D-shaped larva).

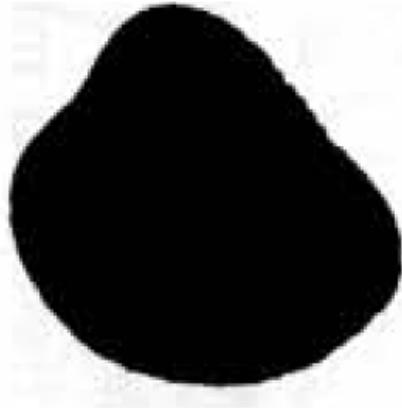


Figura 4 : Larva di *Crassostrea spp* alle dimensioni di 220-240 μ m.

Le larve si fissano al substrato grazie al bisso secreto da ghiandole specializzate, strutture che vengono successivamente riassorbite durante lo sviluppo.

Il veliger si fissa al substrato con una goccia di liquido adesivo proveniente dalla ghiandola del bisso, quindi il mantello attacca la valva sinistra al substrato stesso durante la secrezione della conchiglia.

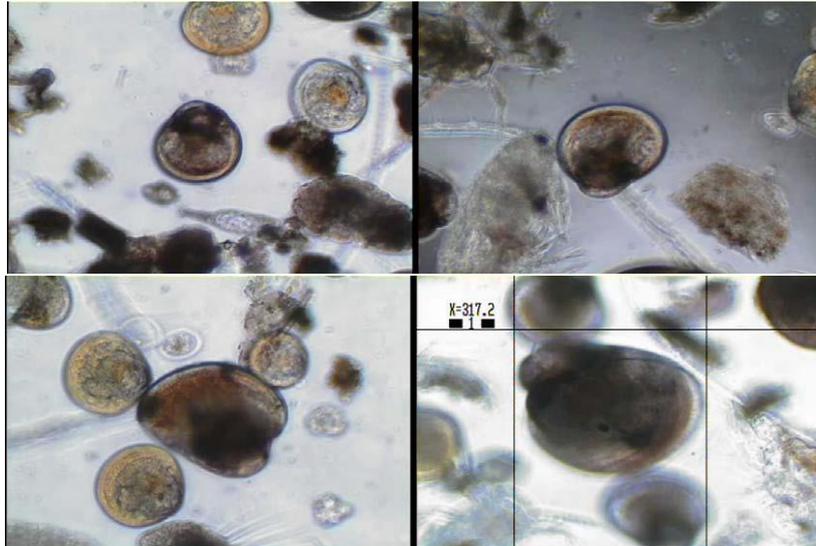


Figura 5 Larve di *Crassostrea* spp. di differente misura, da 155µ a 317µm.

È necessario un periodo di circa un anno affinché gli organismi completino il loro ciclo vitale raggiungendo la forma adulta e siano nuovamente pronti per la riproduzione.

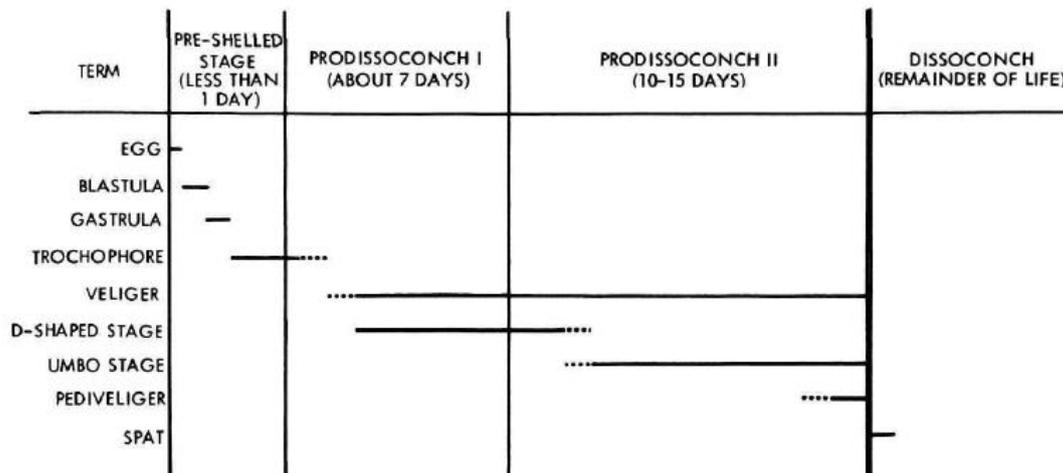


Figura 6 Fasi di sviluppo larvale di *Crassostrea gigas*.

2.3 Alimentazione

Qualità e disponibilità di cibo sono tra i fattori che maggiormente influenzano la crescita dei molluschi bivalvi, sia nelle popolazioni naturali che in quelle allevate. Tradizionalmente, il fitoplancton è sempre stato considerato la principale fonte di alimentazione per questi organismi bentonici (Dame, 1996; Gosling, 2003); numerosi studi hanno però evidenziato come l'energia possa essere ricavata anche da fonti differenti, quali batteri, detrito ed occasionalmente zooplancton di piccole dimensioni (Stuard et al., 1982; Cranfort and Grant, 1990; Langdon and Newell, 1990; Davenport et al., 2000; Lehane and Davenport, 2002, 2006). Tramite il processo di filtrazione, i bivalvi esercitano un ruolo di controllo della produzione primaria nonché di alcuni stadi larvali di organismi planctonici, regolando di fatto un'importante componente dei flussi di energia e nutrienti tra le comunità bentoniche e pelagiche (Dame, 1996). Diversi studi hanno dimostrato come le ostriche siano in grado di filtrare, in media, 15-55 litri di acqua di mare al giorno (Powell *et al.* 1992). Questo meccanismo di filtrazione impatta negativamente la crescita del fitoplancton (Cloern, 1982; Officer *et al.*, 1982); questo processo è definito come un controllo di popolazione top-down. Per quanto la dieta sia principalmente composta da organismi fitoplanctonici, le ostriche consumano

anche detrito organico e possono quindi avere un impatto su abbondanza e distribuzione di questo particolare componente. Un impianto di ostricoltura può quindi porre una pressione tramite competizione per le risorse sulle specie selvatiche di organismi filtratori, che possono essere messe in difficoltà dalle grandi densità monospecifiche di un allevamento commerciale (Haure and Baud, 1991).

Le ostriche tendono a nutrirsi sul materiale sospeso nella colonna d'acqua, generando flussi di corrente che conducano le sostanze nutritive sullo ctenidio; le ciglia laterali sui filamenti di quest'ultimo, creano una corrente d'acqua che fluisce nel sifone inalante, attraverso gli spazi interfilamentari dello ctenidio, nella cavità soprabbranchiale ed in fine nel sifone esalante. Le particelle sospese in questa corrente sono catturate dallo ctenidio e condotte verso i margini ventrali o dorsali dai tratti ciliari frontali. Anche se l'esatto meccanismo di ritenzione è ancora un argomento controverso (Ward et al., 1998b, 2000; Riisgaard and Larsen, 2000b), la cattura avviene quando le particelle sono trattenute dalla superficie frontale del filamento dello ctenidio. Le ciglia latero-frontali facilitano questo processo dirigendo le particelle dal flusso centrale verso i margini e, quindi, verso i filamenti (Riisgaard et al., 1996; Ward et al., 1998b); quest'ultimo

meccanismo aumenta notevolmente le capacità di filtrazione ed in particolare dell'apparato branchiale/ctenidio.

È stato dimostrato che l'efficienza di cattura aumenta in maniera lineare all'aumentare delle dimensioni delle particelle trattenute, fino ad un valore di soglia. In ogni caso, esistono evidenze per cui la varietà di particelle catturate da una singola specie di bivalvi dipende strettamente da adattamenti fisiologici dettati dalle condizioni ambientali in cui essa vive. Le capacità di filtrazione si adattano quindi alla quantità e qualità della materia organica presente nella colonna d'acqua, per sfruttarla nella maniera più efficace (Wright *et al.*, 1982; Langdon and Newell, 1990).

Alcuni studi dimostrano, inoltre, la capacità di selezione chimica da parte dei molluschi bivalvi nella distinzione delle particelle (Loosanoff, 1949; Kiørboe and Møhlenberg, 1981; Ten Winkel and Davids, 1982). In particolare, è stata osservata una selezione in base a fattori qualitativi (fluorescenza, clorofilla *a*, composti azotati) sulla base del materiale ritrovato nelle pseudofeci (Newell and Jordan, 1983; MacDonald and Ward, 1994; Ward *et al.*, 1998a; Levinton *et al.*, 2002). Sono inoltre noti casi di selezione su diversi ceppi fitoplanctonici somministrati a concentrazioni simili (Shumway *et al.*, 1985). La crescita e l'attività di *Crassostrea gigas*, come per molti altri molluschi bivalvi, sono quindi dipendenti

dall'insieme delle particelle eterogenee diluite nell'ambiente. La variabilità dovuta all'eterogeneità strutturale e compositiva viene superata dai numerosi successi adattativi dell'apparato digerente dei bivalvi. Il trasporto della materia organica attraverso l'apparato digerente è quindi mediato da un selettivo movimento ciliare, con una sorta di "sorting" del materiale ingerito basato su fattori fisico-chimici. Il materiale qualitativamente migliore verrà ingerito preferenzialmente, a discapito di quello qualitativamente peggiore. Tutti gli organi dell'apparato digerente sono coinvolti nella digestione dei nutrienti e il meccanismo di alimentazione può essere visto come una serie di passi sequenziali che determinano il destino delle particelle trascinate nella cavità palleale (Levinton *et al.*, 1996; Ward, 1996).

Questi passaggi includono:

- 1) Incontro e ritenzione da parte dello ctenidio;
- 2) Prima selezione e trasporto differenziale dal tratto ciliare frontale;
- 3) Incorporazione in muco con differenti proprietà coesive;
- 4) Trasporto anteriore sui margini dello ctenidio ed interazione con i tratti repulsivi del mantello;
- 5) Riduzione della coesione delle masse mucose da parte dei palpi labiali;

- 6) Seconda selezione sulla superficie dei palpi labiali;
- 7) Ingestione e selezione finale a livello stomacale e di intestino ceco;
- 8) Trasferimento del materiale al diverticolo digestivo per digestione ed assorbimento finale.

Data la complessità della matrice ambientale da cui dipende l'alimentazione di *Crassostrea gigas*, è evidente come tutti questi passaggi/livelli di selezione concorrano all'assunzione della miglior componente alimentare possibile. Tutti questi processi si svolgono sulla base delle caratteristiche fisiche, quantitative e qualitative del particolato organico (Milke and Ward, 2003, 1993), anche se una certa variabilità intraspecifica è anche data dalle differenze morfologiche dei singoli organismi.

Alte densità di questo mollusco si ritrovano in ambienti estuarini ad alta torbidità; è da notare che questa tendenza ad accumularsi in zone ad elevata torbidità non coincide con le caratteristiche d'origine dalle quali il mollusco è stato importato. Infatti, i dati a disposizione, indicano che gli allevamenti di questi organismi, in Giappone, erano distribuiti in zone a bassa torbidità (Ventilla, 1984; Fujisawa et al., 1987; Kobayashi et al., 1997).

Comunque, appare rilevante l'effetto della torbidità sulla filtrazione e sulla selezione delle particelle da parte di *C. gigas*;

per queste due condizioni è stato individuato un limite superiore di 192 mg/l e 150 mg/l rispettivamente: Questi valori risultano comunque inferiore alle concentrazioni di materiale sospeso presente in alcuni ambienti naturali dove l'ostrica pacifica prolifera (Deslous-Paoli et al., 1992; Pastoureaud et al., 1996; Barillè et al., 1997). La notevole capacità filtrante di questi organismi determina anche un controllo della torbidità dell'acqua, fattore importante per quanto riguarda il trofismo dell'ambiente bentonico, in quanto facilita il passaggio della luce verso gli strati inferiori della colonna d'acqua. A tale riguardo, è stato dimostrato che la presenza di questi organismi (Newell and Ott, 1999) migliora la consistenza di praterie di fanerogame marine.

2.3.1 Torbidità dell'acqua e morfologia in *Crassostrea gigas*

Dai dati di letteratura si può dedurre che quantità e qualità del particolato totale determinano variazioni morfologiche di *Crassostrea gigas*, relativamente agli organi che regolano i processi selettivi e conseguentemente la capacità di filtrazione dell'ostrica; in particolare, tali modificazioni riguardano le dimensioni delle branchie e dei palpi labiali, organi che determinano la capacità dell'ostrica di sopportare condizioni di elevata torbidità. Proprio in presenza di tali condizioni, è stato dimostrato come i molluschi bivalvi siano in grado di regolare i

loro meccanismi di alimentazioni al fine di mantenere un equilibrio dinamico tra il costo energetico del processo di ingestione delle particelle ed il loro valore nutritivo. In particolare, variazioni dell'efficacia di ritenzione e la "clearance rate" (CR) contribuiscono a tale processo, impedendo la saturazione degli organi palleali da un sovraccarico di particolato (Bayne et al., 1987; Navarro et al., 1992; Hawkins et al., 1996; Iglesias et al., 1996; Urrutia et al., 1996; Barillé et al., 1997; Navarro and Widdows, 1997).

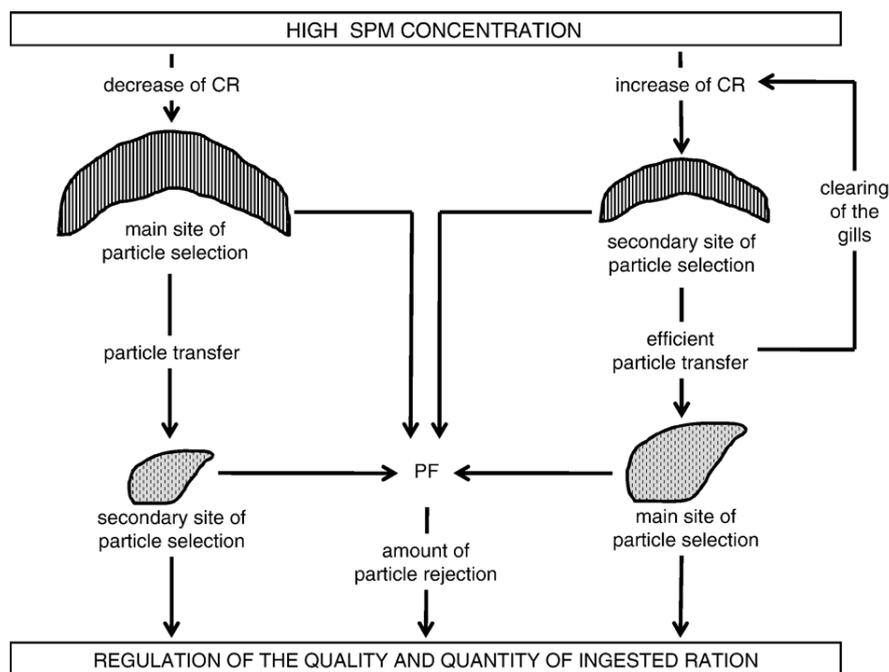


Figura 7 Regolazione di ingestione in condizioni di elevata torbidità (Barillé, 1993).

Alcuni Autori hanno messo in relazione lo sviluppo del muscolo adduttore di *Crassostrea giga* con la torbidità dell'acqua sebbene esso non sia direttamente coinvolto nel processo di selezione

delle particelle (Yonge, 1936; Barillé et al., 2000), rappresentando un buon indicatore delle condizioni ambientali.

Il muscolo adduttore si compone di due parti, una liscia, (responsabile delle possibili chiusure prolungate della conchiglia a causa di condizioni ambientali sfavorevoli) ed una striata, destinata a chiusure rapide in risposta a predazione ed espulsione di materiale di scarto dei processi digestivi (Yonge, 1936; Morrison, 1996).

La misurazione delle dimensioni degli organi interessati da possibili modificazioni derivanti dal carico di particolato nella colonna d'acqua è quindi importante per la definizione di modelli predittivi di crescita e dinamica di popolazione relativi a *C.gigas* (Barillé et al., 1997a; Kobayashi et al., 1997; van der Meer, 2006). Una relazione tra organi palleali di *Crassostrea gigas* e torbidità della colonna d'acqua è stata dimostrata in un ambiente estuarino francese (Baia di Bourgneuf/Estuario della Loira) a differenti gradienti di carico organico; è stata inoltre evidenziata una correlazione tra il rapporto delle dimensioni branchie/palpi labiali e tra le dimensioni e la composizione del muscolo adduttore (Dutertre et al., 2009) e la quantità di particolato sospeso. L'Incremento del rapporto tra le superfici delle branchie e dei palpi labiali e le dimensioni del muscolo adduttore sono risultati

inversamente proporzionali al carico di seston presente nella colonna d'acqua, come illustrato in figura 8.

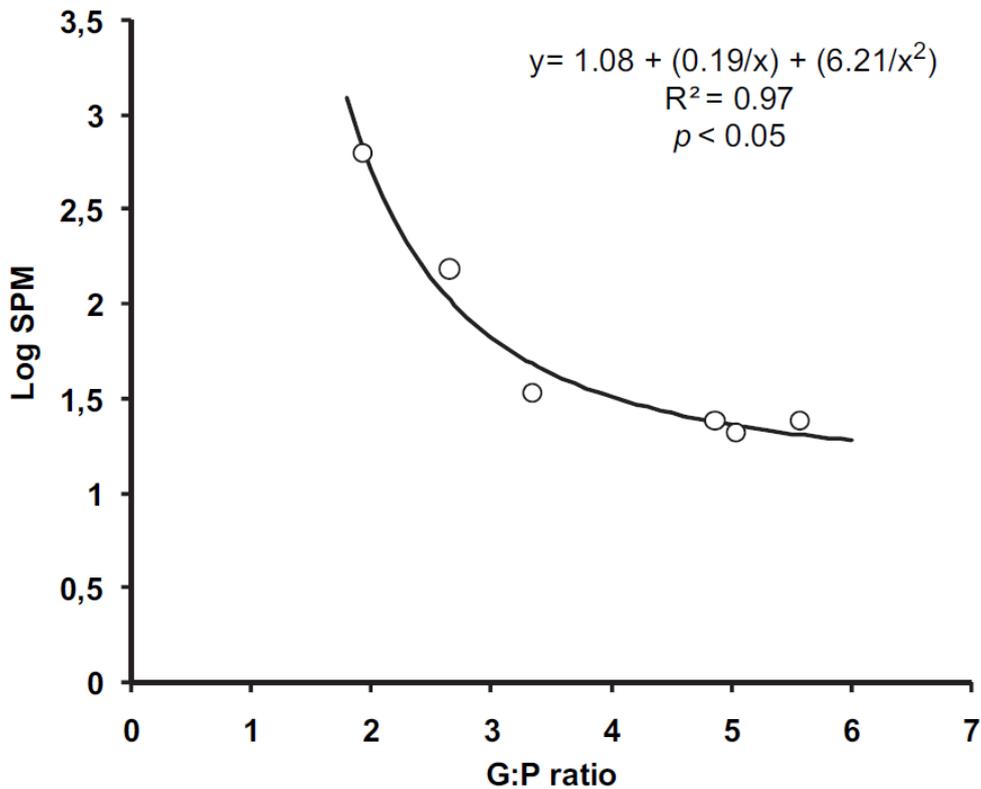


Figura 8 Variazioni morfologiche in *C.gigas* in relazione a diverse condizioni di torbidità (Dutertre et al., 2009).

Lo studio della morfologia interna di *Crassostrea gigas* rappresenta quindi un aspetto importante per la definizione dello stato trofico dell'ambiente di accrescimento, nonché delle sue relazioni con le componenti della colonna d'acqua.

2.3.2 Seston e Clearance Rate

La “Clearance Rate” (CR) è una stima quantitativa della rimozione, da parte di organismi filtratori, di particelle dalla colonna d’acqua durante l’alimentazione. Nel caso dei lamellibranchi, fattori determinanti tale processo risultano la composizione di specie all’interno del fitoplancton e la distribuzione di taglia delle particelle stesse.

In un lavoro svolto nello stagno di Thau (Dupuy *et al.*, 2000), ove si riscontra una generale oligotrofia dell’areale (seston totale 0.65 mg/l), è stata rilevata, per *C. gigas* la seguente preferenza di selezione sulle particelle presenti:

Tabella 3 Contributi di carbonio organico alla dieta di *C. gigas* nello stagno di Thau (Dupuy *et al.*, 2000).

Gruppo	CR (L gDW⁻¹h⁻¹)	POC (µg C L⁻¹)
Picofitoplancton	0.02±0.003	2.4
Diatomee	8.1±1.3	161.5
Flagellati < 5µm	6.8±6.2	0.63
Flagellati > 5µm	16.7±4.8	2.32
Peridinee	14.8±0.8	16.6
Ciliati	12.7±6.1	3.0

Particelle fitoplanctoniche con diametro inferiori al micron non sono trattenute dalle ostriche, mentre meno della metà di quelle fino ad una taglia di 5 μ sono trattenute, con un valore di CR relativamente basso. All'aumentare della taglia delle particelle corrisponde un aumento della loro rimozione dalla colonna d'acqua. La CR è quindi una funzione dipendente da taglia, composizione specifica ed abbondanza delle specie fitoplanctoniche presenti nell' ambiente. In ulteriori studi è stato osservata una diminuzione nell'efficienza di ritenzione delle microparticelle all'aumentare del quantitativo di seston; in particolare, questo fenomeno è più evidente in presenza di particelle tra i 2.97 e 6.83 μ m di diametro. Il limite minimo per il 100% dell'efficacia di ritenzione è stato stimato in 12 μ m (Barillé *et al.*, 1993); tale relazione si deduce nella seguente equazione:

$$RE (\%) = - 12.537 Vol e(-0.304 ESD) + 100$$

Ove:

RE = Retention efficacy,

Vol = volume totale delle particelle ($\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$),

ESD = diametro sferico equivalente delle particelle (μm).

In generale, la variazione di CR può dipendere da un effetto sinergico di variazioni di clorofilla nel seston e distribuzione del volume delle particelle presenti in ambiente. Ad esempio, due seston diversi possono contenere livelli simili di clorofilla, ma differire significativamente nel volume totale delle particelle, con possibili conseguenze sulla curva di risposta del tasso di filtrazione. L'aggiunta di limo a seston naturale contenente clorofilla in ambiente controllato causa una variazione della Clearance Rate, dovuto all'aumento di volume del materiale in sospensione, indipendentemente dal contenuto di clorofilla presente.

Cranford *et al.* (2011) hanno formulato le seguenti generalizzazioni.

In presenza di valori di seston:

- inferiori alla soglia di produzione delle pseudofeci, i bivalvi cambiano la CR in maniera da regolare l'ingestione su valori che ottimizzano digestione ed assorbimento della componente organica;
- al di sopra della soglia di formazione delle pseudofeci, la regolazione di filtrazione è dipendente da selezione o espulsione di particelle post-filtrazione;

- al di sopra della soglia ottimale di filtrazione causano una riduzione della CR e tale risposta dipende dal contenuto organico delle particelle;

Inoltre, un aumento di seston a basso contenuto organico causa, si osserva una minore diminuzione della CR accompagnata da variazioni nel processo di selezione pre-ingestione, al fine di massimizzare l'ingestione di nutrienti.

2.3.3 Clearance Rate e Temperatura

CR presenta un'estrema variabilità legata alla fluttuazione dei parametri ambientali quali la temperatura. (Cranford *et al.*, 2011); le ostriche cambiano la Clearance Rate, in funzione dei cambiamenti di temperatura, al fine di mantenere un'attività di filtrazione sufficiente, indipendentemente dalla temperatura ambientale (Haure *et al.*, 1998; van der Veer *et al.*, 2006); in particolare, il principale effetto della temperatura si esercita sull'attività ciliare (e quindi di alimentazione) con il raggiungimento di un equilibrio tra l'energia disponibile e l'energia necessaria per soddisfare i carichi esterni, relativi alla viscosità dei fluidi a cui le ciglia sono esposte (Humphries, 2013). Infatti la viscosità dell'acqua è inversamente proporzionale alla temperatura e da questa relazione dipende il costo energetico

necessario per la creazione dei flussi d'acqua necessari per la nutrizione, evitando influenze fisico-meccaniche all'apparato ciliare.

In uno studio condotto su *Ostrea edulis* (Newell *et al.*, 1977) è stata studiata la risposta della Clearance Rate al variare delle condizioni di temperatura; gli organismi sono stati esposti, in triplicato, a tre differenti temperature (15°C, 20°C e 25°C) per un tempo compreso tra tre e quattro settimane e successivamente esposti a sette differenti temperature (5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 28°C e 30°C) e ad una valutazione della CR; dai risultati ottenuti è stato possibile descrivere una curva di "performance" termica, con andamento di curva unimodale asimmetrica. Il progressivo spostamento verso destra di tali curve (una per temperatura di acclimatazione) e del relativo massimo picco di ingestione, è stato evidenziato nel processo di acclimatazione. Tale processo ha evidenziato la capacità delle ostriche di limitare il consumo energetico in condizioni di basse concentrazioni di nutrienti, relativamente alla riduzione dei processi respiratori (Newell *et al.*, 1977).

Dai risultati rilevati in bibliografia, si può evincere come temperatura, salinità e disponibilità dei nutrienti influenzino la fisiologia dei bivalvi, in particolare tasso di alimentazione,

circolazione, consumo di ossigeno e tasso di accrescimento. Tale processo è però difficilmente evidenziabile in ambiente, dove effetti sinergici di differenti variabili ambientali possono influenzare i rilevamenti e condurre a conclusioni errate. La disponibilità di nutrienti nella colonna d'acqua segue una generale stagionalità, ma fioriture fitoplanctoniche possono avvenire sia a basse temperature (primavera) che nei periodi di variazione di questo parametro (ad es. in autunno, quando si osserva una diminuzione della temperatura); la distribuzione dei nutrienti dipende inoltre dall'idrodinamismo dell'areale di studio, che va ad influenzare trofismo e risposte fisiologiche degli organismi presenti; il processo di spawning dell'ostrica inoltre altera la fisiologia dell'organismo stesso e sopprime di fatto il CR. I fattori determinanti la capacità di alimentazione dell'ostrica sono estremamente variabili e legate all'ambiente in cui si evolve il ciclo di sviluppo dell'organismo.

Il set di equazioni proposto da Fulford *et al.* (2007) è specifico per la stima della capacità di rimozione di cellule fitoplanctoniche da parte di *Crassostrea spp* in presenza di differenti condizioni ambientali. In particolare, il set di equazioni proposto mette in correlazione la capacità di filtrazione con ossigeno disciolto, temperatura, salinità e particolato totale. *CR* o Clearance Rate è

espresso in $\text{m}^3\text{g}^{-1} \text{ day}^{-1}$, dove g è massa di carbonio trattenuto per ostrica.

$$CR = CR_{max} * f(S) * f(TSS) * f(DO)$$

Ove:

CR_{max}: massimo tasso di filtrazione, è stimato tramite la seguente equazione, dipendente dal valore di temperatura ambientale:

$$f(T) = \exp(-0.015 * (T - 27)^2)$$

T = Temperatura ambientale espressa in °C.

f(S): funzione della salinità (PSU)

f(TSS): funzione del particolato (mg/l)

f(DO): funzione dell'ossigeno disciolto (%).

Tenendo presente i valori ottenuti con il monitoraggio ambientale del Golfo di La Spezia, ove la salinità e l'ossigeno disciolto sono risultati costantemente maggiori di 12 PSU e del 50% di saturazione rispettivamente, nell'equazione relativa alla CR, le funzioni $f(S)$ e $f(DO)$ sono state approssimate a 1 (Fulford *et al.*, 2007).

Pertanto, la relativa equazione applicata nel corso della presente sperimentazione, risulta la seguente:

$$\begin{aligned} CR &= CR_{max} * f(TSS) \\ &= \exp(-0.015 * (T - 27)^2) * 10.4 \\ &\quad * \ln(TSS)^{-2.048} \end{aligned}$$

2.4 Plancton-benthos: ruolo ecologico di *Crassostrea gigas*

Il dominio planctonico ed il dominio bentonico sono collegati da interrelazioni reciproche di differente natura; infatti, esiste un continuo passaggio di energia, materia e nutrienti (legato sia ai processi metabolici degli organismi che alle relazioni trofiche tra i vari comparti) che plasma la struttura dell'ecosistema marino, in un equilibrio dinamico determinato dall'intensità dei differenti flussi.

Negli ambienti costieri e di transizione il bilancio energetico è positivo (ovvero la quantità di materia organica prodotta è maggiore di quella respirata) e diminuisce con la profondità sino a diventare negativo. Il rifornimento di risorse alimentari agli organismi bentonici dipende dal processo di trasferimento di materia ed energia dalla colonna d'acqua al sedimento e la maggior parte delle risorse trofiche provengono dalla zona fotica sotto forma di materia organica particellata vivente e detritale che sedimenta. La velocità di sedimentazione è correlata alla densità

delle particelle che formano aggregati di sostanza amorfa con sostanza organica di varia natura; questi aggregati, in cui si rinvencono “faecal pellets” prodotti dallo zooplancton oltre che sostanze esopolisaccaridiche ospitano una vera e propria comunità di organismi fito-zooplanctonici e batteri. Dal punto di vista quantitativo il processo è più intenso in determinati periodi dell’anno ed in particolare in occasione delle fioriture fitoplanctoniche. Il trasporto per sedimentazione del particolato verso il fondo è amplificato dalla modalità di rilascio di materia organica nella colonna d’acqua in occasione delle migrazioni verticali dello zooplancton.

Gli ambienti neritico/costieri rappresentano hot-spots di biodiversità, variabilità ambientale e trasformazioni biogeochimiche e sono, di conseguenza, tra gli ecosistemi più produttivi al mondo (Nixon, 1988; Berger et al., 1989; Costanza et al., 1995). Questi ecosistemi di transizione sono però spesso popolati ed interessati da molteplici impatti ambientali tra cui si ricordano cambiamenti climatici, carichi di nutrienti e pesca (Lotze et al., 2006; Halpern et al., 2008; Cloern et al., 2016). Lo studio delle connessioni tra plancton e benthos si è tradizionalmente focalizzato sulla deposizione di materia organica non vivente verso gli ambienti bentonici (Hargrave, 1973; Suess, 1980;

Smetacek, 1985; Graf, 1992), sulla bio-risospensione (Graf & Rosenberg, 1997) e sul rilascio di nutrienti inorganici dai sedimenti (Raffaelli *et al.*, 2003). L'intensità dei flussi che collegano i differenti comparti degli ecosistemi è stata valutata in diversi ambienti, considerandone l'eterogeneità stagionale e spaziale (Duineveld *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2006). Nonostante queste ricerche, rimangono sostanziali limitazioni alla capacità predittiva di stima dei flussi e di valutazione della loro intensità. La descrizione e lo studio dei processi che collegano i due comparti si è quindi concentrata sugli eventi che sono mediati da organismi viventi, ad esempio predazione pelagica sulla fauna bentonica, spostamenti ontogenetici nell'utilizzo dell'habitat stesso, flussi riproduttivi, migrazioni nictemerali e/o stagionali ed i processi nutritivi degli organismi filtratori bentonici (Marcus & Boero, 1998; Schindler & Scheuerell, 2002; Raffaelli *et al.*, 2003; Baustian *et al.*, 2014). Le attività antropiche regolano direttamente ed indirettamente queste connessioni tramite interferenza sui parametri fisici (salinità, ossigeno, temperatura) e biologici (specie, comunità, tratti funzionali) relativi all'ecosistema costiero. Un caso emblematico di interferenza sul funzionamento dell'ambiente costiero è quello relativo alla Chesapeake Bay (USA), dove il declino delle popolazioni selvatiche di ostriche, causato dalla sovrapesca effettuata durante il secolo scorso, ha

portato ad una riduzione della capacità di filtrazione del comparto bentonico pari ad un fattore 200; ne è risultata un'eccessiva produzione fitoplanctonica con un conseguente deterioramento della qualità dell'acqua e relativo stato eutrofico (Kemp *et al.*, 2005). Al contrario, l'introduzione di una specie invasiva di vongole nella baia di San Francisco (USA) ha avuto come risultato un incremento nel flusso di energia diretto verso il popolamento bentonico, evento che ha causato un deficit di produzione primaria con conseguente impoverimento dell'ambiente pelagico (Cloern and Jassby, 2012).

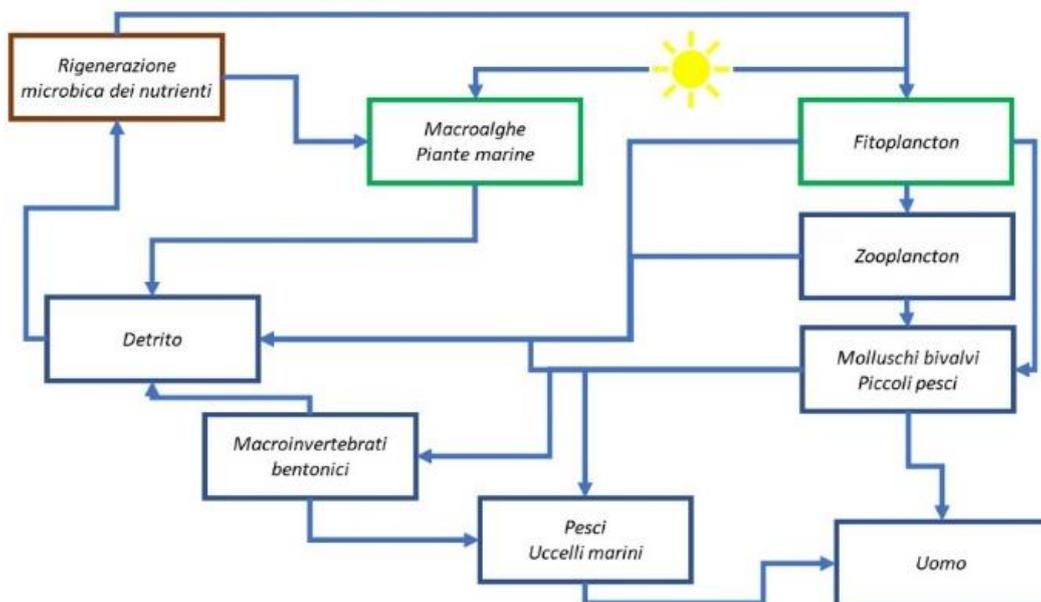


Figura 9 Relazioni trofiche tra componenti dell'ecosistema costiero.

2.4.1 Biodeposizione ed arricchimento del sedimento

Gli impianti di ostricoltura agiscono come un importante filtro biologico che agisce concentrando materia organica dalla colonna d'acqua e dirigendola verso il fondo sotto forma di feci e pseudofeci (Haven and Morales-Alamo, 1966; Kusuli, 1981; Mitchell, 2006). A causa della composizione di tali biodepositi, che sono tendenzialmente formati da particelle fini, il sedimento al di sotto degli impianti di ostricoltura tende ad essere organicamente arricchito al confronto delle zone limitrofe e si può generalmente notare uno strato di sedimenti anossici verso la superficie (Forrest and Creese, 2006). Il processo di arricchimento del sedimento relativo alla grande presenza di biomassa in allevamento è confinato al sito di produzione ed è maggiore in corrispondenza degli impianti rispetto allo spazio tra quest'ultimi (Forrest and Creese, 2006). La magnitudo di tali effetti dipende primariamente da densità e biomassa dello stock di allevamento, unitamente all'idrodinamismo dell'ambiente (Pearson and Black, 2001); si deve inoltre tenere in considerazione la stagionalità della biodeposizione derivante dalle differenti condizioni ambientali, fattore che influenza anche la capacità assimilativa ambientale (Kusuki, 1981; Souchu *et al.*, 2001; Mitchell, 2006). Eventi di estremo arricchimento organico del sedimento sono stati

storicamente descritti unicamente per impianti giapponesi, causati principalmente da eccessive densità risultanti in overstocking (Ito & Imai, 1955; Kusuki, 1981).

La capacità dell'ambiente di assimilare e disperdere rifiuti organici provenienti dall'allevamento dipende comunque principalmente dall'intensità di correnti e moto ondoso dell'areale, fattori che determinano dimensioni e concentrazioni dell'impronta biodepositiva (Souchu *et al.*, 2001), agendo sulla riduzione dell'impronta di biodepositi insieme all'aumento dell'ossigenazione degli strati superficiali del sedimento. Generalmente, siti di acquacoltura posti in condizione di maggior idrodinamismo avranno impronte meno marcate e meno confinate rispetto a quelli esposti a moti della colonna d'acqua meno intensi (Pearson & Black, 2001).

Per quanto riguarda il possibile accumulo di contaminanti, la molluschicoltura è considerato un allevamento estensivo che non impiega, nelle sue procedure, input di materiale che possa causare introduzione di sostanze nocive in ambiente. Una delle possibili eccezioni è rappresentato dal possibile impiego di ipoclorito ed acido acetico come sostanze a contrasto del biofouling. Tali sostanze sono comunque contaminanti non persistenti il cui impiego è estremamente circostanziato e dal relativo impatto

ambientale (Carver *et al.*, 2003; Forrest *et al.*, 2007b). Diverso discorso riguarda alcuni dei trattamenti impiegati in passato per evitare l'usura delle strutture di allevamento, costruite in legno trattato con possibili contaminanti (Rame, Cromo, Arsenico, Creosoto). Tali sostanze hanno causato, in passato, accumulo nei sedimenti circostanti all'impianto di utilizzo, tramite il percolamento nella colonna d'acqua (Locke *et al.*, 2009). Gli effetti nocivi sono però contenuti dai legami che tali sostanze vanno a costruire con particelle di sedimento e materiale organico, che vanno a ridurre la biodisponibilità e la tossicità al biota associato agli impianti (Forstner, 2005).

2.4.2 Interazioni con la colonna d'acqua

A causa della naturale capacità di riduzione del materiale in sospensione, esiste un tangibile interesse nella salvaguardia e nella restaurazione di banchi di ostriche naturali. Questo fattore, combinato all'attività di controllo top-down sulle popolazioni fitoplanctoniche, è stato impiegato nel controllo della densità di microalghe in ambienti estuarini eutrofici (Newell, 2004; Cerco & Noel, 2007; Newell *et al.*, 2002; 2007). In condizioni di densità di allevamento e generali condizioni ambientali paragonabili alle condizioni naturali, l'effetto positivo dell'ostricoltura è evidente e

confermato. Alcuni studi su allevamenti in sospensione del Giappone, hanno identificato una condizione di auto-inquinamento generato dall'eccessivo carico di materiale egesto prodotto dalle ostriche, con elevate produzioni di acido solfidrico (Ito and Imai, 1955; Kusuki, 1981).

Le ostriche hanno anche un ruolo importante nel ciclo dei nutrienti, che va a comporsi delle attività di filtrazione, escrezione, biodeposizione e rimineralizzazione dei nutrienti, ai quali andrà sottratta la quota rimossa durante la raccolta del prodotto (Prins *et al.*, 1998; Newell, 2004; Porter *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2004).

Le interazioni riguardanti il ciclo dei nutrienti vanno comunque messe in relazione a differenti fattori, quali idrodinamismo, temperatura, limpidezza dell'acqua, densità di allevamento e condizioni generali del sedimento. Gli organismi allevati influiscono infatti in termini di rimozione e promozione locale delle risorse fitoplanctoniche e, inoltre, possono migliorare la produttività generale di macroalghe e piante acquatiche bentoniche rallentando il flusso di nutrienti disciolti e riducendo la produzione fitoplanctonica (Prins *et al.*, 1998; Pietros and Rice, 2003; Cerco & Noel, 2007). Nel complesso gli effetti dell'ostricoltura sono relativamente poco impattanti, in quanto è un metodo di allevamento estensivo che non necessita di input di

nutrienti o materiali antropici per l'accrescimento degli organismi. I possibili effetti, su scala locale e non solo, sono riassunti in Figura 10.

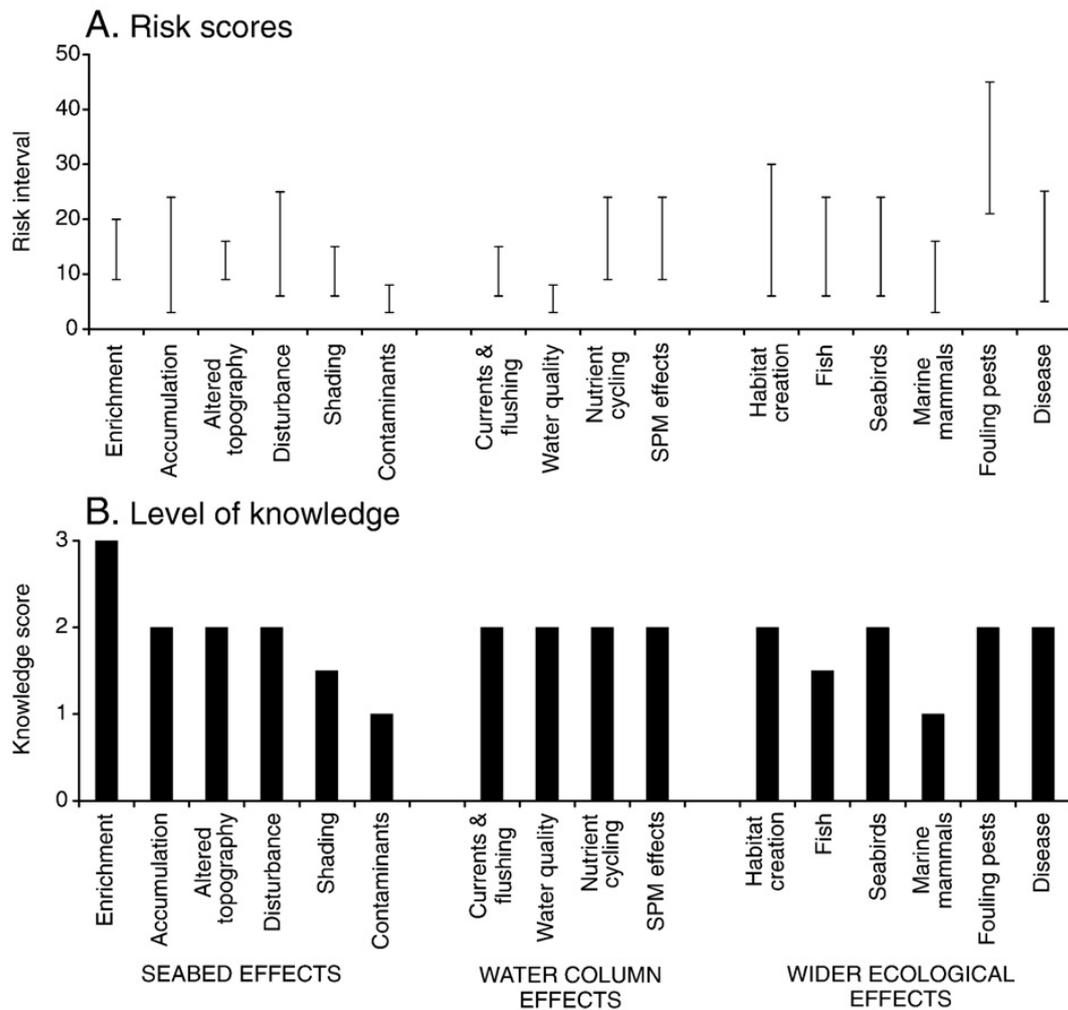


Figura 10 Impatti ambientali dell'ostricoltura (Cerco & Noel, 2007).

Ciononostante, è evidente il ruolo fondamentale di tali organismi nel contesto delle relazioni tra il comparto pelagico e quello bentonico, in termini di trasferimento di materia, nutrienti ed energia, nonché del mantenimento dell'equilibrio dinamico di un

ambiente, quello estuarino/costiero, estremamente variabile e sensibile nei confronti delle attività antropiche.

3. Inquinamento da materiale plastico

La produzione globale di materiale plastico è in aumento dalla metà del XX Secolo, periodo indicativo di sviluppo dei primi polimeri sintetici. Al 2015, la produzione globale di materiale plastico aveva raggiunto i 322 milioni di tonnellate annue, delle quali 58 prodotte in Europa (Statista.com, 2017). È stato stimato che all'incirca il 10% del materiale plastico prodotto annualmente finisca per contaminare l'ambiente marino (Thompson, 2006; Cole *et al.*, 2011) in un ampio range di dimensioni, caratteristiche chimiche e relativa pericolosità per gli organismi marini. L'origine antropogenica delle microplastiche è necessariamente connessa all'ambiente terrestre, dal quale possono essere trasportate con le acque superficiali. L'UNEP (United Nations Environment Programme) definisce inoltre la *Marine Litter* come "un qualsiasi materiale solido persistente, fabbricato o trasformato e in seguito scartato, eliminato, abbandonato o perso in ambiente marino e costiero. Il *marine litter* consiste quindi in oggetti costruiti ed adoperati quotidianamente dall'uomo e poi abbandonati o persi lungo la linea di costa ed in mare, compresi quei materiali che, dispersi sulla terra ferma, raggiungono il mare attraverso i fiumi, il vento, le acque di dilavamento e gli scarichi urbani". Il *Marine litter* è composto per la gran parte da materiale plastico (UNEP,

2005), mediamente per il 70% della massa (Derraik, 2002), valutazione basata principalmente su campionamenti costieri, una percentuale analoga (75%) è stata rilevata nella regione OSPAR (Nord-Est Atlantico) in una campagna di monitoraggio dedicata (OSPAR Commission, 2007). Lo smaltimento indiscriminato di rifiuti urbani è la principale fonte di inquinamento dell'ambiente marino (Lozano and Mouat, 2009; Ryan *et al.*, 2009). Per quanto riguarda l'inquinamento da materiale plastico, possiamo individuare sia vie dirette che indirette tramite le quali questi polimeri possono giungere fino all'acqua. Considerato che circa metà della popolazione mondiale risiede entro una distanza di circa 80km dalla costa, è comprensibile come fino all'80% del materiale plastico rinvenuto in mare abbia origine terrestre (Andrady, 2011). Il materiale plastico può potenzialmente arrivare fino all'ambiente marino attraverso il trasporto fluviale e/o attraverso gli impianti di depurazione di acque chiare e scure, i cui scarichi sono spesso off-shore (Thompson, 2006; Moore, 2008). Diversi studi hanno inoltre dimostrato come il flusso unidirezionale dei sistemi di acqua dolce diriga il movimento del rifiuto plastico verso gli oceani (Moore *et al.*, 2002; Browne *et al.*, 2010). L'intensità di questo fenomeno può essere magnificata da inondazioni o eventi atmosferici di grande intensità, che aumentano il quantitativo di rifiuto

trasportato in acqua dolce (Lattin *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2009). Vanno inoltre incluse nel novero delle sorgenti di inquinamento plastico tutte le attività ricreative e produttive legate all'ambiente marino. Turismo, pesca ricreativa e commerciale, presenza di impianti acquacoltura, contribuiscono più o meno attivamente all'incremento della quantità di plastica nell'ambiente marino. I micro- e macroresidui di attrezzatura da pesca sono tra i frammenti più frequentemente rinvenuti durante i campionamenti (Andrady, 2011). In particolare, il monofilo plastico di nylon che compone la maggior parte dell'attrezzatura da pesca è particolarmente problematico, in quanto per sue proprietà fisiche ha un galleggiamento neutro, che lo rende disponibile a differenti profondità della colonna d'acqua. Durante gli anni '70, inoltre, è stato stimato che globalmente circa 23000 tonnellate di imballaggi plastici sono stati gettati in mare da parte degli equipaggi della flotta da pesca commerciale (Pruter, 1987).

Solo dal 1988 è stato aggiornato il regolamento MARPOL 73/78, o convenzione internazionale per la prevenzione dell'inquinamento causato da navi, che ha implementato il divieto ai naviganti di scaricare rifiuti di plastica in mare. Nonostante questo tentativo di regolamentare la materia lo shipping rimane un'importante fonte di inquinamento plastico nell'ambiente marino (Derraik, 2002;

Lozano and Mouat, 2009) in quanto i controlli istituzionali sono inadeguati e la coscienza ecologica degli equipaggi delle navi è ancora limitata. L'industria della plastica, tuttavia, contribuisce al fenomeno dell'inquinamento sia indirettamente, come illustrato, che direttamente a valle del processo produttivo, ed è responsabile della produzione di elevati quantitativi di plastica sotto diverse forme (Pruter, 1987; Mato *et al.*, 2001; Ivar do Sul *et al.*, 2009). Per fuoriuscita accidentale, uso inappropriato come imballaggio o uscita diretta dagli impianti di trasformazione, questo materiale può entrare nell'ambiente acquatico.

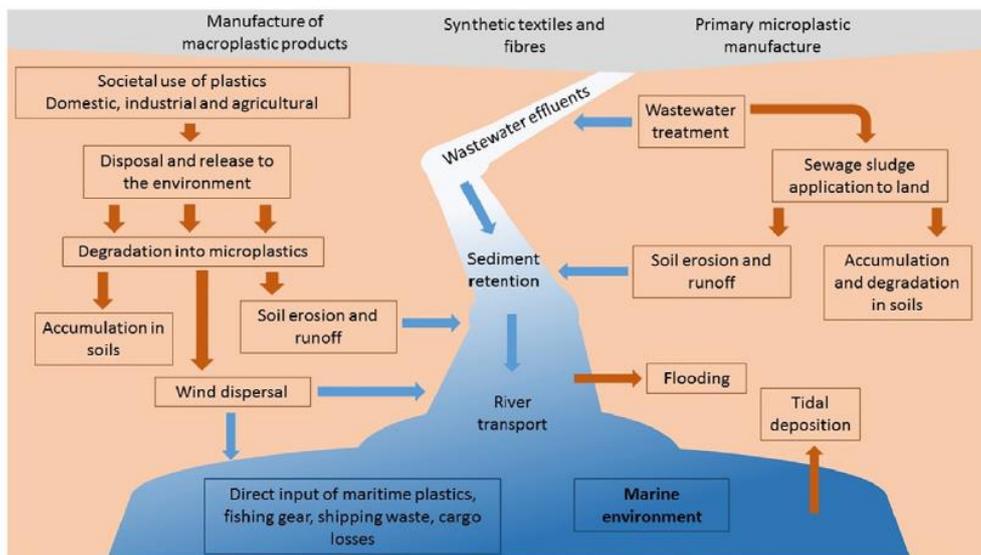


Figura 11 Principali fonti di microplastiche ed ambiente terrestre (Horton *et al.*, 2017).

A seguito della loro interazione con agenti degradanti (chimici, fisici, biologici), le plastiche rilasciano in ambiente sostanze chimiche proprie (nonilfenoli, eteri difenilici, ftalati e bisfenolo A) ed adsorbite, determinando un elevato rischio di bioaccumulo di

tali sostanze negli organismi marini (Mato *et al.*, 2001, Teuten *et al.*, 2009a). Esempi di sostanze contaminanti riconducibili al flusso di materiale plastico diretto in ambiente sono i PBDE (Polibromodifenileteri) ed altri ritardanti di fiamma brominati, che sono intenzionalmente inseriti nei cicli produttivi del materiale plastico. I ritardanti di fiamma, all'interno della plastica, hanno una concentrazione variabile tra il 5 ed il 30%, fattore che dirige la dispersione di tali contaminanti verso l'ambiente; per questo motivo, i piani di gestionali e le valutazioni del rischio relative all'ambiente costiero vanno sovente a considerare tali fonti di emissione. Per quanto riguarda gli ftalati, ad esempio, studi comunitari hanno dimostrato come la plastica dispersa in ambiente ne rappresenti la principale fonte e vettore verso la catena trofica. Per quanto riguarda le sostanze adsorbite alla superficie delle plastiche, relativamente a specifiche combinazioni di polimeri e contaminanti, è stata dimostrata una migrazione all'interno delle particelle da parte delle sostanze adsorbite, che può condurre ad effetti di concentrazione e successiva magnificazione delle sostanze contaminanti. Questo fenomeno è dimostrato per contaminanti organici persistenti (POPs) come policlorobifenili (PCB) e composti aromatici clorurati (DDT). Per quanto non sia ancora stato dimostrato il contributo nella distribuzione globale di tali contaminanti da parte del trasporto

tramite materiale plastico, lo studio di tale relazione è di rilevante importanza in termini ecologico-sanitari, per la protezione dell'ambiente e dei consumatori.

3.1 Microplastiche

Una definizione univoca del termine "*microplastiche*" non è stata ancora coniata, dai dati di letteratura si rileva che un primo riferimento, del 2004, considerava i frammenti plastici di dimensioni intorno ai 20µm (Thompson *et al.*, 2004); successivamente il termine è stato esteso a tutti i frammenti di dimensioni inferiori ai 5 mm (Arthur *et al.*, 2009). Il prefisso "micro", in ogni caso, identifica, intuitivamente, un limite dimensionale superiore a 1 mm, più frequentemente utilizzato in bibliografia (Browne *et al.*, 2011; Claessens *et al.*, 2011; Van Cauwenberghe *et al.*, 2013; Vianello *et al.*, 2013; Dekiff *et al.*, 2014).

Le microplastiche si possono suddividere, in base all'origine, in **primarie** e **secondarie**; le prime per loro scopo ed utilizzo, hanno una dimensione inferiore al millimetro, ad esempio gli scrub o cosmetici per la cura della pelle. Le microplastiche **secondarie**, invece, derivano da frammenti di plastica originariamente di dimensioni maggiori, ma sulle quali l'azione meccanica, chimica e biologica dell'ambiente acquatico ha causato una

frammentazione. Le microplastiche primarie, utilizzate principalmente in cosmetica ed in alcuni processi di sabbiatura, possono entrare nei corsi d'acqua attraverso sistemi di scarico industriali e/o domestici (Derraik, 2002). Per quanto tali sistemi abbiano apparati di filtrazione preposti all'eliminazione dei contaminanti dall'acqua, a causa delle loro dimensioni estremamente ridotte, le microplastiche possono superarli ed arrivare quindi nell'ambiente (Browne *et al.*, 2007; Fendall and Sewell, 2009; Gregory, 1996).

Nell'ambiente e distribuita su scala globale si rinviene la maggior parte dei polimeri sintetici commerciali (poliestere, nylon, polietilene e polipropilene; Barnes *et al.*, 2009); la biodisponibilità di tali frammenti e l'ingestione da parte degli organismi marini è inversamente proporzionale alla loro taglia: minore sarà la dimensione, maggiore sarà il rischio di interazione con il biota marino. Le principali specie di materiale plastico rilevate e le loro caratteristiche fisico-chimiche sono riassunte in tabella 4.

Tabella 4 Specie plastiche rinvenute in ambiente: LDPE – Low-density polyethylene; HDPE - High-density polyethylene; PP - Polypropylene; PS- Polystyrene; PET – Poly(ethylene terephthalate); PA-6 – Polyamide 6 (Nylon 6); PA-66 – Nylon 66 (Andrady, 2017).

Plastica	TIPI						
	LDPE	HDPE	PP	PS	PET	PA-6	PA-66
Temperatura di transizione del vetro (°C)	- 100	- 80	- 25	+ 100	+ 69	N.A.	+ 50
Densità (g/cm ³)	0.91-0.925	0.959-0.965	0.90	1.04	1.29-1.40	1.13-1.15	1.13-1.15
Cristallinità (%)	30–50	80–90	30–50	0	10–30	30–50	30–50
UV/resistenza di ossidazione	Bassa	Bassa	Bassa	Media	Buona	Buona	Buona
Forza (psi)	600–2300	5000–6000	4500–5500	5000–7200	7000–10,500	6000–24,000	14,000
Energia superficiale (MJ/m ²)*	32.4	32.4	33	40.6	45.1	38	41.4

L'ingestione di microplastiche può avvenire intenzionalmente, a causa di confusione con cibo, o durante l'attività di filtrazione (Cole *et al.*, 2013; Besseling *et al.*, 2015; Carlos de Sà *et al.*, 2015). La strategia alimentare delle diverse specie le espone di conseguenza a differenti quantità e qualità di frammenti plastici; in questo contesto, gli organismi filtratori sono ritenuti più a rischio di ingestione rispetto ai predatori attivi. Infatti, si tende a considerare la filtrazione come meno selettiva rispetto alla predazione (Rummel *et al.*, 2015). Su differenti organismi sono stati individuati differenti effetti avversi causati dall'ingestione di microplastiche; si rinvencono infatti nello zooplancton (Cole *et al.*,

2013; Collignon *et al.*, 2012; Desforbes *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2017), nell'ittiofauna (Ramos *et al.*, 2012; Ory *et al.*, 2017) ed in organismi bentonici filtratori (Li *et al.*, 2015; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Gandara e Silva *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2016). Proprio a causa di questa estesa distribuzione, la valutazione dei rischi determinati dall'ingestione di microplastiche richiede un'accurata standardizzazione per definire procedure e specie indicatrici per i differenti contesti presentati. Sono di fatto ancora mancanti dati comparabili e rappresentativi sugli effetti nocivi delle microplastiche negli organismi viventi. Lo studio quali/quantitativo della presenza di tale contaminante ed il loro effetto sui processi biologici è comunque determinante per la comprensione di questo fenomeno (Thompson *et al.*, 2009). L'impiego di idonee specie bioindicatrici è quindi indispensabile al fine di valutare adeguatamente l'incidenza di ingestione di microplastiche da parte di organismi marini. La corretta scelta della specie determina la rilevanza del dato, alcune caratteristiche rilevate in bibliografia riguardano la non-selettività durante l'alimentazione (Graham and Thompson, 2009; Rummel *et al.*, 2016), facilità di campionamento, identificazione, trattamento e conoscenze generali sulla specie (Devriese *et al.*, 2015; Desforbes *et al.*, 2015; Hamer *et al.*, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015a; Von Moos *et al.*, 2012). La principale problematica relativa alla

contaminazione da microplastiche è legata alla refrattarietà del materiale plastico ai processi di biotrasformazione e alla loro persistenza nell'ambiente marino. I principali meccanismi di degradazione dei polimeri plastici includono processi: foto-ossidativi, termici, ozono-dipendenti, mecano-chimici, catalitici nonché di biodegradazione. La composizione chimica dei polimeri plastici è però limitante nell'effetto degli agenti degradativi, a causa delle caratteristiche intrinseche di tale materiale (Andrady, 1994; Singh & Sharma, 2008; Gewert *et al.*, 2015). L'elevata persistenza delle microplastiche nell'ambiente marino ha creato quindi una nuova via di assunzione per i contaminanti chimici nella colonna d'acqua (Gouin *et al.*, 2011; Teuten *et al.* 2007, 2009b; Hammer *et al.* 2012; Browne *et al.* 2013; Rochman 2015; Lusher 2015).

3.1.1 Biofilm associati a microplastiche

I biofilm sono complesse comunità di microorganismi adese a superfici, spesso composte da differenti specie che stabiliscono interazioni interspecifiche e con l'ambiente circostante. I microorganismi vengono a contatto con le particelle tramite interazioni attrattive e repulsive tra la possibile superficie di adesione, la parete cellulare ed il mezzo di sospensione. Il film di condizionamento iniziale ha la capacità di regolare le successive

comunità colonizzatrici modificando le proprietà specifiche del materiale della particella (Taylor *et al.*, 1997; Dang *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2007; Dang *et al.*, 2008). Il biofilm è la base per uno dei più comuni metodi di trasporto in ambiente marino, ossia l'adesione ad oggetti galleggianti, strategia evolutasi nel paleo-oceani (Thiel and Gutow, 2005b; Gregory, 2009). Considerato l'aumento di materiali inerti e persistenti di origine antropica in ambiente marino, tale fattore amplifica l'entità di questo trasporto e le relative interazioni con gli organismi. Una grande varietà di organismi animali, nella fase giovanile o di adulti, appartenenti a diversi phyla si rinvengono adesi al materiale plastico, tra cui Anellida, Artropoda, Briozoa, Cnidaria e Mollusca (Barnes, 2002a; 2002b). Tuttavia anche altri organismi, quali diverse specie di diatomee (Carpenter and Smith, 1972; Carpenter *et al.*, 1972; Briand *et al.*, 2012; Reisser *et al.*, 2014), batteri (Carpenter *et al.*, 1972; Dang *et al.*, 2008; Webb *et al.*, 2009; Briand *et al.*, 2012; Carson *et al.*, 2013; Zettler *et al.*, 2013; Oberbeckmann *et al.*, 2014) e di dinoflagellati sono state identificate in campioni ambientali, tra gli altri, *Ostreopsis spp.*, *Coolia spp.* e *Alexandrium spp.*, specie produttrici di biotossine pericolose per l'umano (Maso *et al.*, 2003). La formazione di biofilm su materiale plastico flottante può inoltre cambiare le

caratteristiche fisiche delle particelle, variandone le capacità di galleggiamento (Lobelle and Cunliffe, 2011).

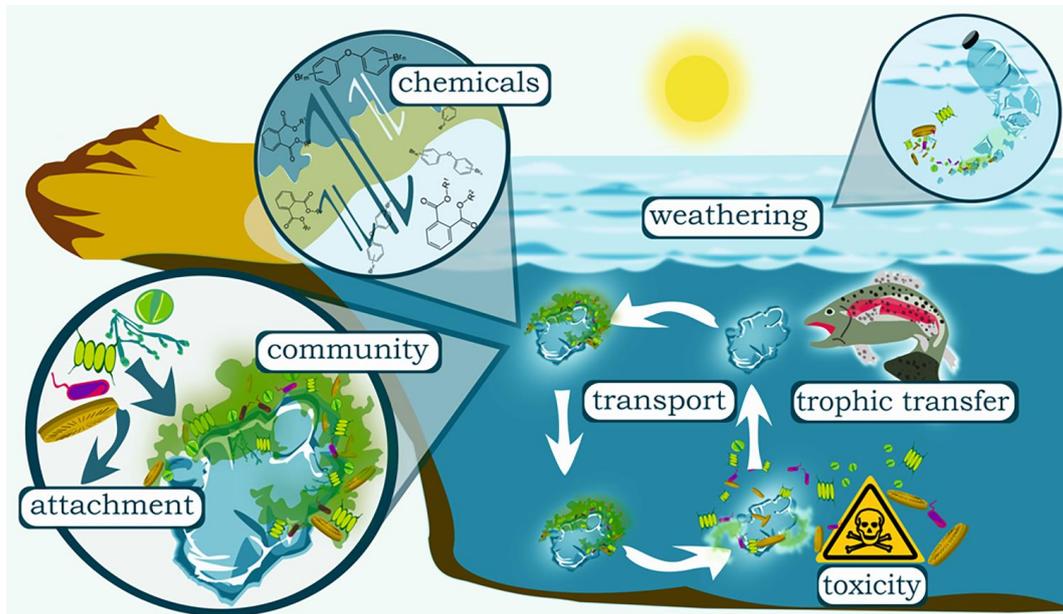


Figura 12 Trasferimento e rischio associato alle microplastiche.

I biofilm presenti sulle superfici sommerse sono il risultato di un attaccamento selettivo di microorganismi, mediato da facilitazione e competizione interspecifica tra le comunità microbiche. L'effetto degli agenti meteorologici può favorire la crescita dei biofilm a causa dell'aumentata superficie disponibile; per contro, esiste un effetto protettivo del materiale plastico ai processi foto-ossidazione, effettuato dal biofilm stesso. In ogni caso, i biofilm possono avere una relativa capacità di biodegradare i polimeri plastici, contenendo inoltre adsorbimento e rilascio di sostanze chimiche associate. Le implicazioni biologiche della formazione dei biofilm includono effetti nel trasferimento trofico

di microplastiche e contaminanti associati, struttura dei popolamenti microbici e potenziale tossicità nei confronti degli organismi filtratori (Rummel *et al.*, 2017). Questo genere di colonizzazione da parte di microorganismi è inoltre determinante per l'avanzare del materiale plastico nei livelli superiori della catena trofica, in quanto la presenza di biofilm può nascondere il materiale polimerico nella selezione delle particelle organiche da parte di organismi filtratori e predatori.

3.1.2 Microplastiche e bivalvi

Alimentandosi per filtrazione, i molluschi bivalvi sono tra gli organismi più esposti al rischio di contaminazione da microplastiche; principalmente, le microplastiche vengono rinvenute nell'apparato digerente di tali organismi (Galloway, 2015), proprio perché trattenute durante l'alimentazione. È stato però dimostrato, con studi *in vivo*, che è possibile un trasferimento dei frammenti plastici nel sistema circolatorio, dove un effetto tossico a livello tissutale e cellulare è stato rilevato in *Mytilus edulis* (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012). Dato che le tecniche di allevamento dei molluschi bivalvi sono applicate in ambiente naturale, trattandosi prevalentemente di

acquacoltura estensiva, questi organismi sono esposti all'estrema varietà di contaminanti presenti nell'ambiente marino. Tra le specie di lamellibranchi in cui siano state rinvenute microparticelle di plastica si possono citare: *Meretrix lusoria*, *Scapharca subcrenata*, *Tegilarca granosa*, *Mytilus galloprovincialis*, *Patinopecten yessoensis*, *Alectryonella plicatula*, *Sinonovacula constricta*, *Ruditapes philippinarum*, *Cyclina sinensi* e *Crassostrea gigas* (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Li *et al.*, 2015).

Le ostriche, così come i mitili e tutti gli organismi marini che vengono consumati interi, sono di particolare interesse per valutare il rischio per la salute umana, in quanto le microplastiche sono spesso presenti nel loro tratto digestivo (Browne, 2008; Galloway, 2015). Van Cauwenberghe e Janssen (2014), hanno valutato la presenza di microplastiche in due bivalvi allevati in Belgio (*Crassostrea gigas* e *Mytilus edulis*), analizzando il tessuto molle di tali organismi dopo una depurazione di circa 3 giorni. Nei tessuti di mitilo sono state rinvenute 0.36 ± 0.07 particelle/g, mentre nelle ostriche 0.47 ± 0.16 particelle/g. Sulla base di questi dati è stata stimata un'assunzione di circa 90 particelle di plastica per porzione media di mitili (250g); considerata la media di

consumo Europea relativa ai molluschi bivalvi, l'ingestione annuale pro capite ammonta a circa 11000 particelle/anno.

A causa delle ridotte dimensioni dei frammenti in esame, la valutazione del quantitativo di microplastiche nella colonna d'acqua è un processo estremamente delicato. I dati relativi a queste particelle nella colonna d'acqua sono quindi abbastanza limitati, soprattutto se comparati con la concentrazione nel sedimento. La concentrazione di frammenti plastici spazia infatti da meno di 1 fibra a m³ fino a diverse centinaia di particelle e fibre per m³ (Thompson *et al.*, 2004; Ng and Obbard, 2006; Van Cauwenberge *et al.*, 2013). Per quanto riguarda il Mar Mediterraneo in particolare, la concentrazione di microplastiche è stata valutata al fine di identificare eventuali zone di accumulo. La media rilevata è stata di 1 frammento plastico per 4m², nella totalità dei campioni prelevati. Questo dato è comparabile con le concentrazioni dei gyres oceanici, tipiche zone di accumulo del materiale plastico (Còzar *et al.*, 2015).

Nei gyres, le concentrazioni di materiale plastico sono sostanzialmente comparabili alle concentrazioni di organismi planctonici, fattore che determina l'aumentato rischio di ingestione in tali zone (Moore, 2008). Gli organismi la cui dieta è basata sulla filtrazione di grandi quantità organismi zooplanctonici

possono quindi essere maggiormente esposti alla contaminazione. Un esempio di tale processo è stato individuato nel mysticete mediterraneo *Balaenoptera physalus*, capace di filtrare approssimativamente 70000l di acqua per volta, durante l'alimentazione, ingerendo sia microplastiche libere che ingerite dal mesozooplancton (Fossi *et al*, 2012).

3.1.3 Microplastiche ed organismi planctonici

Sotto la definizione di Plancton sono compresi gli organismi acquatici che non sono in grado di opporsi al movimento delle correnti e pertanto non sono in grado di prevalere sui moti orizzontali e verticali della colonna d'acqua (Hensen, 1887).

Il plancton è costituito da organismi vegetali, animali e batteri: si suddivide pertanto in fitoplancton, zooplancton e batterioplancton. Nel plancton sono presenti gli stadi larvali di organismi nectonici e/o bentonici. Gli organismi che completano il loro intero ciclo vitale nel comparto planctonico sono definiti *oloplanctonici*, mentre assumo la denominazione di *meroplanctonici* quelli che nel plancton hanno solo un determinato stadio. Sono organismi estremamente adattati alla vita planctonica formanti la base energetica delle catene trofiche acquatiche. Soprattutto in ambiente neritico si rileva un'elevata biodiversità, nonché maggiore densità, rispetto all'ambiente

pelagico, dove è comune la prevalenza di organismi oloplanctonici. Diversi metodi di classificazione sono stati sviluppati nel corso degli anni ed in particolare è stato frequentemente applicato quello relativo alle dimensioni degli organismi, dividendoli in differenti categorie. Di particolare rilevanza ecologica è il gruppo definito come mesozooplankton, che va a racchiudere gli organismi animali planctonici di dimensioni comprese tra i 200 μ ed i 20mm (Tregouboff & Rose, 1957; UNESCO, 1968; Ghirardelli, 1981); questa frazione è rappresentata particolarmente da Crostacei (Copepodi, Cladoceri, Ostracodi, Misidacei, Eufausiacei), Cnidari (Scyphozoa, Hydrozoa), Ctenofori, Molluschi, Anellidi, Chetognati, Tunicati e larve e uova di pesce. Il Mar Ligure, in particolare il Golfo di Genova, è un buon esempio di biodiversità zooplanctonica, dove questo comparto è stato oggetto di ricerca fin dagli anni '60, soprattutto per quanto riguarda i Copepodi, che rappresenta mediamente il 70% della biomassa mesozooplanctonica (Carli & Zunini Sertorio, 1964; Della Croce, 1965; Raozouls, 1972; Carli et al., 1971; 1987; 1990; 1994; Carli & Crisafi, 1983; Bruzzone et al., 1982; Dagnino et al., 1990; Pane et al., 1995; 1998; 2002; 2005; Sei et al., 1998; Licandro & Ibanez, 2000). Un'ulteriore possibile classificazione degli organismi appartenenti al mesozooplankton riguarda la loro strategia durante l'alimentazione. Diversi autori (Longhurst, 1967;

Timonin, 1971; Petipa, 1978; Hopkins, 1982) hanno dato differenti definizioni di classi di nutrizione zooplanctonica, sulla base delle classiche definizioni di produzione primaria, consumo primario e consumo secondario. Come particelle presenti nella colonna d'acqua e non in grado di contrastarne i moti prevalenti, le microplastiche espongono gli organismi planctonici, grazie anche alle ridotte dimensioni, ad un concreto rischio di ingestione. Considerando le due principali modalità di alimentazione, gli organismi che basano l'assunzione di nutrienti sulla filtrazione di rilevanti quantità d'acqua sono maggiormente esposti a tale rischio. Organismi appartenenti ad un livello trofico ed organizzazione inferiori sono inoltre più esposti in quanto in possesso di meccanismi di selezione delle particelle non adeguatamente accurati (Moore, 2008). Tale considerazione include buona parte del mesozooplankton, tra il quale si può citare *Acartia tonsa* (Wilson, 1973), larve di echinodermi (Hart, 1991) e trocofore di *Galeolaria cespitosa* (Bolton & Havenhand, 1998). La presenza delle microplastiche negli strati superficiali della colonna d'acqua le rende disponibili per diversi organismi, tra cui anche stadi larvali di organismi residenti nella zona eufotica e d'interesse commerciale (Fendall and Sewell, 2009; Gregory, 1996). Tale esposizione è quindi più intensa in zone di convergenza di masse d'acqua quali gyres o fronti, risultato per l'accumulo di detrito

attuato dalle correnti (Moore, 2008). Uno studio condotto su *Euphausia pacifica* (Euphausiacea) e *Neocalanus cristatus* (Copepoda Calanoida) nel Pacifico settentrionale ha evidenziato alti tassi di ingestione e ritenzione di microplastiche (Desforbes *et al.*, 2015). Il tasso di incidenza (individui/microplastiche) in *N.cristatus* è risultato di 33.5 ± 6.4 ind/MP, mentre quasi il doppio (16.7 ± 2.8 Ind/MP) è risultato per *E.pacifica*. Sulla base di tali risultati, è stato stimato un tasso di ingestione da parte del salmone del Pacifico (*Oncorhynchus spp.*) specie predatrice dei due crostacei, pari a 2-7 microplastiche al giorno nei giovanili e quasi 91 MP/giorno negli adulti di ritorno a terra per la riproduzione (Desforbes *et al.*, 2015). Il rischio di trasferimento verticale di microplastiche tramite la predazione da parte di organismi superiori sul mesozooplankton è stato valutato anche nell'Oceano Indiano (Sun *et al.*, 2017); in questo caso la valutazione è stata effettuata su cinque gruppi di organismi (copepodi, chetognati, meduse, eupausiacei, larve di pesce). Lo studio effettuato ha evidenziato un elevato tasso di accumulo di microplastiche nelle acque e di conseguenza nel mesozooplankton analizzato.

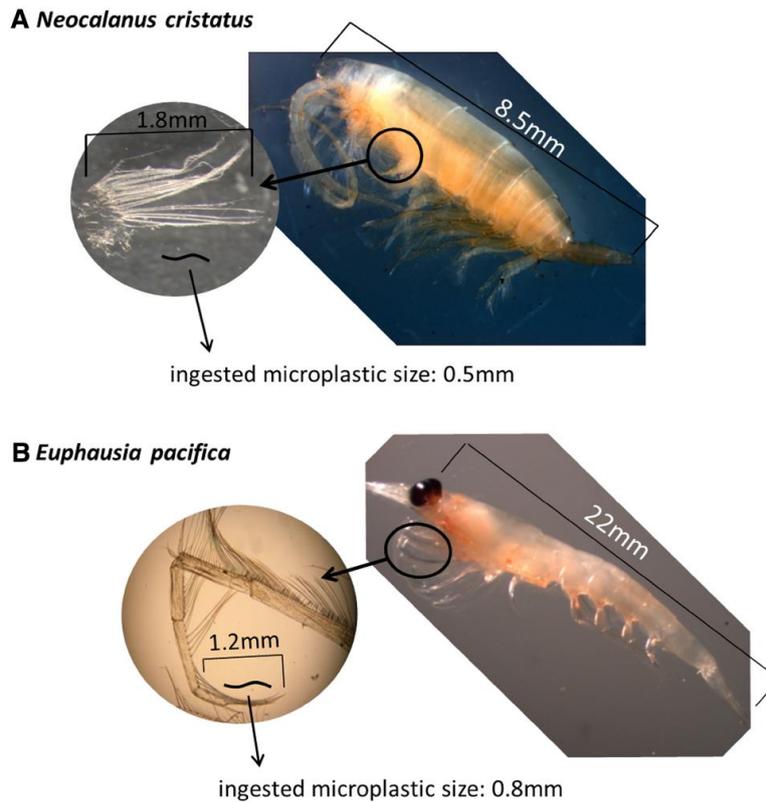


Figura 13 Microplastiche in *N.cristatus* e *E.pacifica* (Desforges et al., 2015)

Al fine di indagare la consistenza delle relazioni tra mesozooplancton e microplastiche, sono state sviluppate diverse metodiche di laboratorio; Cole *et al.* (2013) hanno dimostrato l'ingestione, da parte di differenti taxa zooplanctonici, di particelle di polistirene fluorescente, individuandone 13 in grado di ingerire particelle di 1.7–30.6 μm , con variabilità dipendente dal taxon e stadio di sviluppo. È stato inoltre dimostrato (Cole *et al.*, 2013) come l'ingestione di microplastiche influisce negativamente sulle capacità di grazing da parte di *Centropages typicus* (Copepoda Calanoida). L'ingestione di microplastiche andrebbe quindi ad interferire sul metabolismo energetico delle specie esposte. Un ulteriore aspetto ecologico riguarda, inoltre, il loro trasferimento

verticale derivante dalla presenza di questi contaminanti nell'ambiente; un impatto potenziale è infatti diretto verso l'alto, tramite la predazione e la biomagnificazione di microplastiche e verso il basso, attraverso l'egestione di microplastiche inglobate in faecal pellets. La portata dell'effetto tossico, sugli organismi e sull'ambiente, della presenza di materiale plastico è ancora incerta, ma le caratteristiche fisiche del materiale plastico e la loro diffusione globale depongono per un rischio ambientale di grado elevato.

3.1.4 Faecal pellets e microplastiche

I faecal pellets zooplanctonici giocano un ruolo fondamentale nella pompa biologica, trasportando POM, nutrienti, carbonio ed energia verso il benthos (Fowler et al., 1987; Turner, 2002). I faecal pellets sono inoltre coinvolti nel trasferimento verticale di differenti contaminanti di origine antropica, quali idrocarburi policiclici aromatici (Prahil & carpenter, 1979; Sleeter & Butler, 1982). Come dimostrato da Cole *et al.* (2016), copepodi esposti a microplastiche fluorescenti inglobano quest'ultime nei faecal pellets, fattore che determina un duplice risultato: il primo riguarda l'inglobamento di materiale plastico che causa una riduzione della densità dei faecal pellets (quindi del tasso di

affondamento del materiale organico, di un fattore 2.25 ad es. per *Calanus helgolandicus*) il secondo riguarda il trasporto verso il fondo di materiale che inizialmente si trovava confinato negli strati più superficiali. Un effetto analogo è stato dimostrato per aggregati organici originati dalla diatomea planctonica *Chaetoceros neogracile*, il cui tasso di affondamento del materiale organico è ridotto da 473 a 165 metri/giorno dalla presenza di microplastiche di polistirene (Long et al, 2015). Il diminuire della velocità di sedimentazione può causare un aumento della degradazione chimica, fisica e soprattutto batterica del materiale organico diretto verso il fondo, causando una perdita di materia organica nel collegamento plancto-bentonico aumentando, al contempo, la biodisponibilità delle microplastiche negli strati inferiori della colonna d'acqua. Il trasferimento non è quindi diretto unicamente dal rapporto preda/predatore, ma va ad interessare in egual misura organismi coprofagi e/o filtratori bentonici quali i molluschi bivalvi.

4. Areale di Studio

Il Golfo di La Spezia è delimitato da Punta Bianca (44.036°N; 9.9776°E) e le isole di Tino e Palmaria (44.025°N; 9.853°E); è presente una diga foranea, della lunghezza di 2.2 km, che suddivide l'areale in due zone caratterizzate da differenti condizioni trofiche (Gasparini, 2009). Il golfo è orientato secondo la direttrice Nord-Ovest/Sud-Est, con un'ampiezza di 5 km ed una lunghezza di circa 10 km.

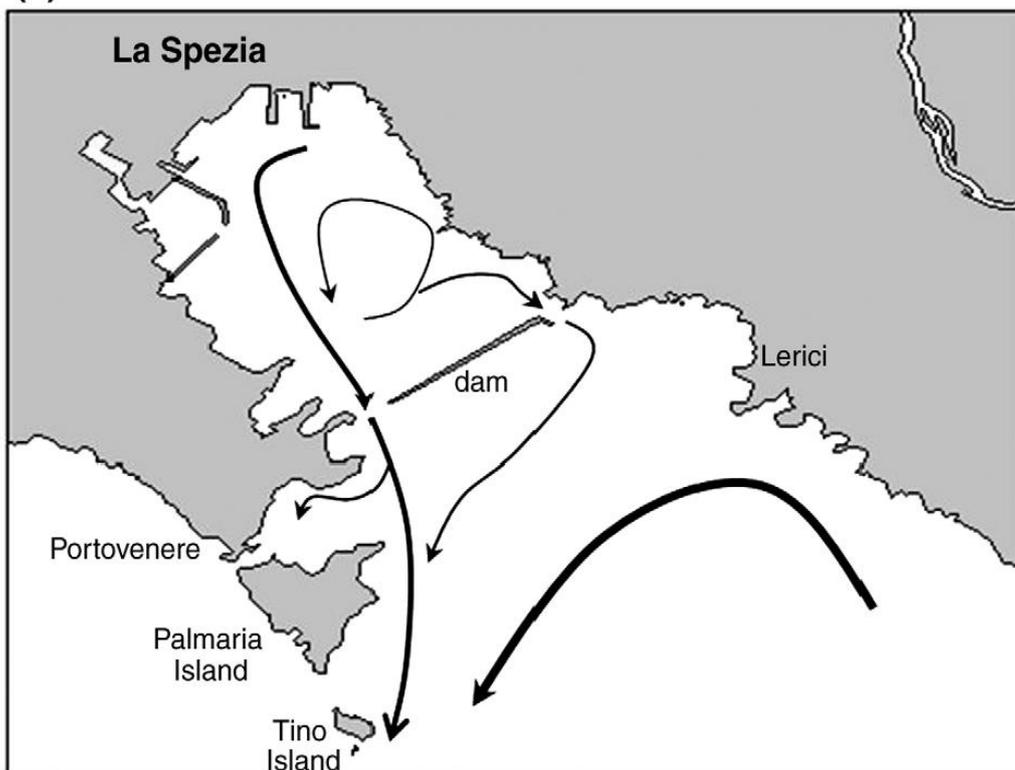
La porzione interna del Golfo raggiunge una profondità massima di circa di circa 12m; la porzione esterna alla diga, che rappresenta un ambiente di transizione verso il mare aperto, ha una batimetria irregolare. La profondità del golfo aumenta progressivamente verso occidente, la massima profondità (-25m) è raggiunta in prossimità delle isole di Tino e Palmaria. La circolazione termalina produce, all'interno della diga, una lenta corrente con un tempo di residenza dell'acqua di circa tre settimane. Il lato occidentale del Golfo è il più energetico, con un rilevante scambio di masse d'acqua attraverso il canale di Portovenere (Gasparini *et al.*, 2009); quest'ultimo rappresenta un'apertura di maggiori dimensioni (360 m) rispetto a quella orientale (180 m). Un ulteriore contributo all'idrodinamismo del Golfo, per quanto riguarda le acque dolci, è dato da diversi corsi d'acqua a carattere

torrentizio e di origine antropogenica, ma una valutazione accurata di tale apporto non è stata ancora effettuata.

Nel complesso, si può identificare una tipica situazione di ambiente estuarino, in cui la diga ha un ruolo centrale nella distribuzione dei parametri chimico-fisici e biologici. La sua influenza si estende anche ai processi di circolazione generali dell'areale.

La circolazione superficiale del Golfo è diretta prevalentemente verso l'apertura occidentale, mentre le condizioni sub-superficiali indicano un maggiore apporto diretto verso l'interno quantificato in un valore di flusso medio di circa $230 \text{ m}^3/\text{s}$. Il considerevole tempo di residenza delle acque nel Golfo consente un riscaldamento delle acque profonde che, in risalita, causano un fenomeno di upwelling che contribuisce alla circolazione superficiale diretta verso l'esterno (Figura 14).

(a)



(b)

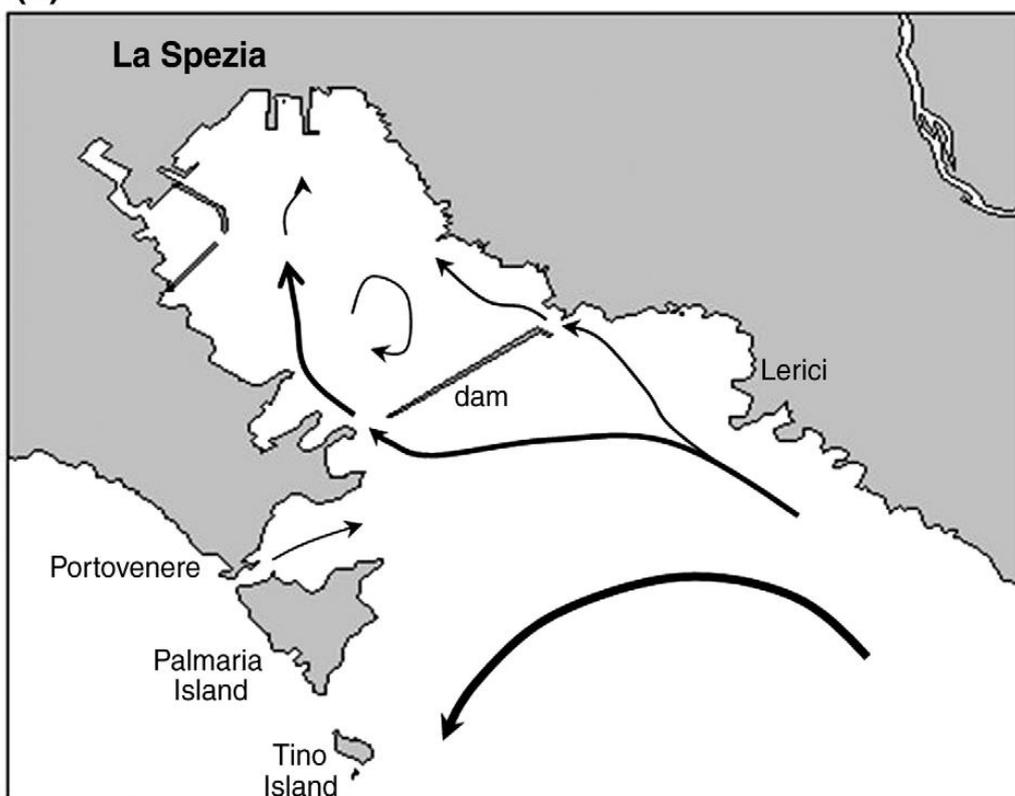


Figura 14 Circolazione profonda (14a) e superficiale (14b) del Golfo di La Spezia (Gasparini *et al.*, 2009)

In uno spazio relativamente ristretto sono ubicate differenti attività antropiche: porto commerciale e militare, impianti di mitilicoltura, cantieri navali ed attività turistiche.

In un indagine effettuata nell'areale nel mese di Giugno 2007 (Gasparini *et al.*, 2009) è stata messa in evidenza una distribuzione (Figura 15) di organismi fitoplanctonici più marcata verso la zona di levante dell'isola di Palmaria (7500-9000 Cell/l), una situazione intermedia a ponente verso Lerici e una diminuzione marcata della densità algale fuori diga (2000 – 1000 Cell/l).

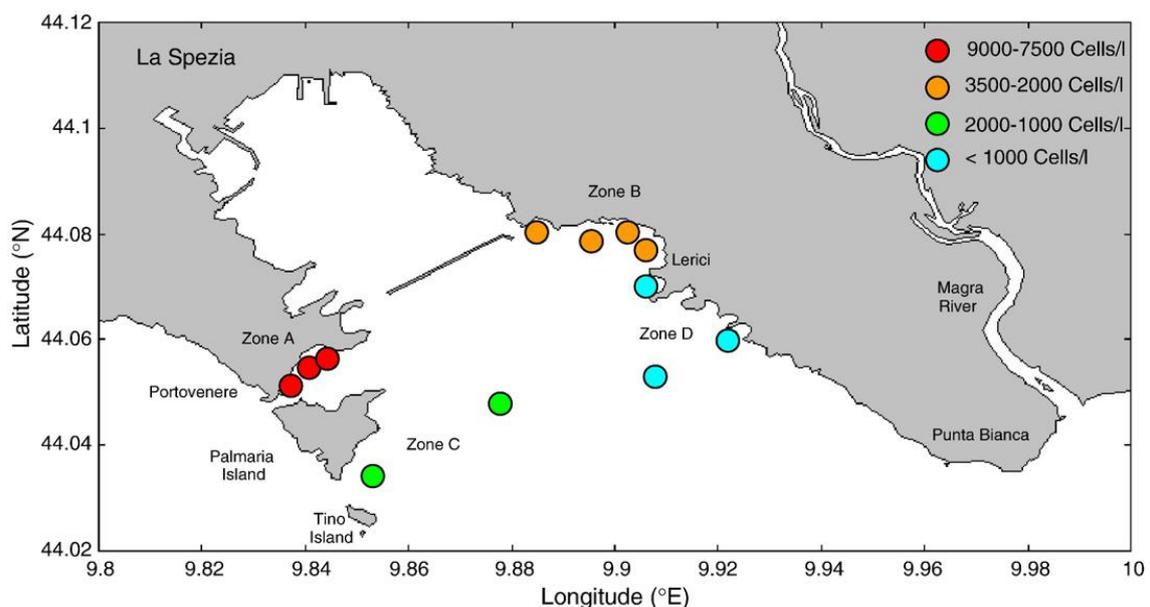


Figura 15 Distribuzione di organismi fitoplanctonici (Gasparini *et al.*, 2009).

Come si può notare la densità fitoplanctonica è più consistente nella zona di maggior accumulo di sostanze nutritive dovuto al particolare regime delle correnti.

Le principali specie fitoplanctoniche individuate nell'areale sono risultate le diatomee (*Leptocylindrus minimus*, *Leptocylindrus danicus*, *Chaetoceros affinis*, *Chaetoceros curvisetus*) con densità elevate e corrispondenti ad un bloom. Nel corso dell'indagine non sono state rinvenute specie di dinoflagellati, ma sono stati individuati esemplari di *Ostreopsis ovata* e *Lingulodinium polyedrum* (Gasparini *et al.*, 2009).

4.1 Caratteristiche delle acque

Ai fini dell'allevamento dei molluschi bivalvi, è necessaria una caratterizzazione della qualità delle masse d'acqua in cui insistono gli impianti. I criteri per la classificazione delle acque destinate alle aree di raccolta di molluschi bivalvi vivi sono forniti dal regolamento CE N. 854/2004, che definisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano; tale classificazione si basa sulla valutazione del quantitativo di colibatteri fecali (*Escherichia coli*) in campioni di polpa di molluschi bivalvi. I criteri e le relative metodologie di stabilizzazione relative alla molluschicoltura sono indicati in tabella 5.

Tabella 5 Criteri per la classificazione delle aree di raccolta dei Molluschi Bivalvi Vivi (MBV) nell'Unione europea

Note:

1 Il metodo di riferimento è dato dalla ISO 16649-3

2 Per riferimento incrociato tra Regolamento CE 854/2004, Regolamento CE 853/2004 e Regolamento CE 2073/2005

3 Dal Regolamento CE 1021/2008

4 Dal Regolamento CE 854/2004

5 Questo livello non è specificato in nessun regolamento ma non è conforme con le classi A, B e C. Per ragioni sanitarie l'Autorità Competente può proibire ogni produzione e raccolta da zone non considerate adatte.

Classe	Standard microbiologico¹	Trattamento di depurazione
A	≤ 230 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvare di MBV ²	Nessuno
B	≤ 4600 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvare di MBV nel 90% dei campioni. Il rimanente 10% non deve superare i ≤ 46000 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvare di MBV ³	Depurazione, stabulazione o trasformazione con metodi riconosciuti
C	≤ 46000 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvare di MBV ⁴	Stabulazione o trasformazione con metodi riconosciuti
Preclusa	> 46000 E. coli per 100 g di polpa e liquido intervalvare di MBV ⁵	Raccolta non permessa

I limiti sono definiti in termini di colibatteri fecali per massa di polpa e volume di liquido intervalvare in campioni di mollusco bivalve vivo (MBV), fattore determinante per l'insorgenza di malattie legate a *E.coli* e connesso all'inquinamento delle acque.

Il Golfo di La Spezia è stato valutato come di categoria B (comunicazioni personali) la commercializzazione delle ostriche è pertanto dipendente da stabulazione preventiva in apposite vasche. Gli standard sanitari di produzione sono imposti dalla direttiva 91/42/CEE, determinante per quanto concerne produzione e commercializzazione di molluschi bivalvi vivi.

4.2. Legislazione di riferimento

C. gigas è specie originaria del Giappone e presente in Corea, Australia, Stati Uniti, Canada e nel Nord America dall'Alaska a Baja California; in Europa è presente lungo le coste dell'Inghilterra, del Portogallo e del Mediterraneo, compreso il Mar Ligure.

Tra i possibili impatti dell'acquacoltura oggetto di particolare attenzione si individuano:

- 1) fuga accidentale ed insediamento in natura di individui di specie alloctone
- 2) impatto genetico e sanitario legato all'introduzione e trasferimento di dette specie oggetto di allevamento

3) trasporto accidentale di organismi associati alle specie allevate.

A tutela quindi delle caratteristiche generali delle zone di allevamento ed in un'ottica di prevenzione di possibili impatti sulla loro biodiversità, sono state prodotte linee guida relative all'immissione di organismi alloctoni in ambiente.

Il quadro normativo di riferimento per l'oggetto in esame si compone quindi varie convenzioni internazionali, tra le quali:

- **Convenzione di Barcellona:** ha l'obiettivo di proteggere, preservare, gestire in maniera idonea le zone prioritarie del bacino del Mediterraneo e le specie animali in pericolo o minacciate.

In particolare l'articolo 6 lettera *d* del protocollo SPA (Special Protected Areas) e Biodiversità richiede alle parti contraenti di regolamentare le reintroduzioni e introduzioni di specie alloctone nelle aree strettamente individuate dal protocollo medesimo.

L'articolo 13, inoltre, impegna le parti contraenti a prendere le misure appropriate per regolamentare l'introduzione intenzionale o accidentale di specie non indigene al fine di proteggere habitat ed ecosistemi.

- **Codice di condotta per l'introduzione e trasferimento di organismi marini (ICES 2003):** identifica ed aggiorna procedure e protocolli finalizzati a minimizzare i rischi derivanti dalle introduzioni intenzionali di organismi marini, fornendo inoltre un

protocollo di valutazione dei rischi di impatto genetico, ecologico e sanitario, oltre al rischio derivante dall'introduzione accidentale di specie non target.

Dai risultati dell'analisi del rischio e della valutazione tecnica di tale analisi, si potrà eventualmente procedere con l'introduzione, ma in caso di risultati non chiari o inadeguati si andrà ad adottare il principio di precauzione tratto dalla Conferenza sull'Ambiente e lo Sviluppo delle Nazioni Unite (ONU, 1992):

“Al fine di proteggere l'ambiente, un approccio cautelativo dovrebbe essere ampiamente utilizzato dagli Stati in funzione delle proprie capacità. In caso di rischio di danno grave o irreversibile, l'assenza di una piena certezza scientifica non deve costituire un motivo per differire l'adozione di misure adeguate ed effettive, anche in rapporto ai costi, dirette a prevenire il degrado ambientale”.

Il regolamento CE N. 708/2007 regola l'**impiego in acquacoltura di specie esotiche e di specie localmente assenti**, il cui articolo 2 è relativo all'ambito di applicazione; esso definisce tramite l'allegato IV una lista di specie per le quali non è necessaria una valutazione del rischio, salvo il caso che lo Stato in questione desideri limitarne l'impiego sul territorio.

Alla data di pubblicazione del detto regolamento, l'allegato IV cita come specie esentate:

- trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*),
- salmerino di fonte (*Salvelinus fontinalis*)
- carpa (*Cyprinus carpio*)
- carpa erbivora (*Ctenopharyngodon idella*)
- carpa argentata (*Hypophthalmichthys molitrix*)
- carpa testa grossa (*Aristichthys nobilis*)
- **ostrica giapponese** (*Crassostrea gigas*.)
- vongola verace (*Ruditapes philippinarum*)
- persico trota (*Micropterus salmoides*)
- salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*).

Una successiva modifica a questo documento (regolamento CE N. 506/2008), inserisce in lista ulteriori specie dulciacquicole, confermando comunque la presenza di *C. gigas* nell'elenco.

In seguito ad introduzioni sperimentali, l'ostrica concava passa quindi da specie alloctona a **specie alloctona naturalizzata**, ossia: "una specie alloctona per una determinata area geografica ove è rappresentata da una o più popolazioni che da tempo si sono insediate con successo ed in grado di auto sostenersi nel lungo periodo"

4.2.1 La direttiva 91/492/CEE

I processi inerenti a produzione, raccolta e commercializzazione di *Crassostrea gigas* devono comunque soddisfare i criteri stabiliti nel decreto legislativo 530 del 30/12/1992, e successiva applicazione della direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi.

Nel decreto sono descritte:

“le norme sanitarie per la produzione e la immissione sul mercato dei molluschi bivalvi vivi destinati al consumo umano diretto o alla trasformazione prima del consumo”

definendo come molluschi bivalvi i molluschi lamellibranchi filtratori, la direttiva pone quindi una serie di condizioni necessarie per la corretta produzione e commercializzazione di tale prodotto ittico se destinato al consumo diretto, principalmente individuando 9 punti fondamentali del processo:

a) devono provenire da zone di produzione che possiedono i requisiti prescritti nel capitolo I dell'allegato; tuttavia, per quanto riguarda i pettinidi, questa disposizione si applica unicamente ai prodotti dell'acquacoltura, come definiti all'articolo 2, punto 2 della direttiva 91/493/CEE del Consiglio, del 22 luglio 1991, che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei prodotti della pesca;

b) devono essere raccolti e trasportati dalla zona di produzione a un centro di spedizione, un centro di depurazione, una zona di stabulazione o uno stabilimento di trasformazione, osservando le norme prescritte nel capitolo II dell'allegato;

c) nei casi previsti dalla presente direttiva, devono essere stati stabulati in zone riconosciute a tal fine e conformi alle norme prescritte nel capitolo III dell'allegato;

d) devono essere stati manipolati in condizioni igieniche e, se del caso, depurati in stabilimenti riconosciuti a tal fine e rispondenti ai requisiti prescritti nel capitolo IV dell'allegato;

e) devono possedere i requisiti fissati nel capitolo V dell'allegato (relativo al controllo delle condizioni di allevamento del pescato);

f) sono oggetto di un controllo sanitario ai sensi delle disposizioni del capitolo VI dell'allegato;

g) sono debitamente confezionati ai sensi delle disposizioni del capitolo VII dell'allegato;

h) sono conservati e trasportati in condizioni igieniche soddisfacenti ai sensi delle disposizioni dei capitoli VIII e IX dell'allegato;

i) recano il bollo sanitario previsto nel capitolo X dell'allegato.

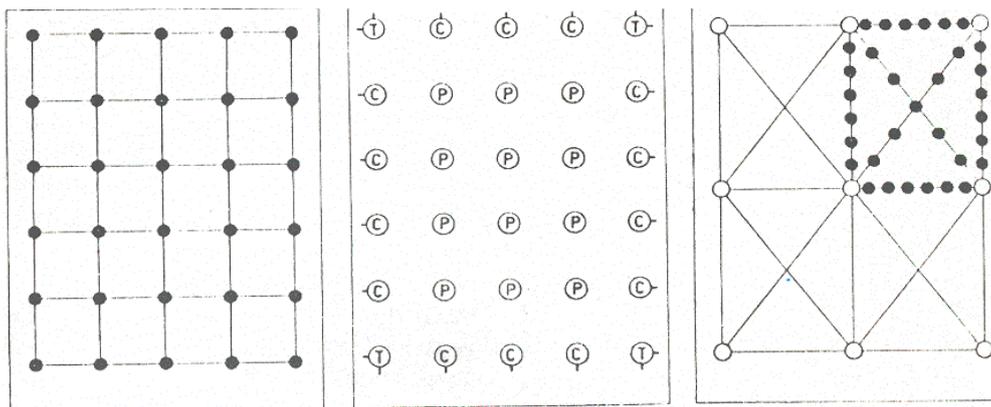
Punti rilevanti del regolamento riguardano inoltre la qualità dell'acqua, l'igiene ed i controlli di sicurezza durante tutto il processo (dalla stabulazione alla commercializzazione) ed evidenzia anche l'importanza di un corretto trattamento ed una buona manutenzione degli impianti.

4.3 Gli impianti di allevamento

Nello stabilimento di La Spezia troviamo due dei tipi di impianto di mitilicoltura: fissi e flottanti.

Gli impianti fissi hanno una storia ultracentennale, ma hanno subito un'evoluzione piuttosto ridotta, in quanto sono mutati principalmente i materiali ma struttura, dimensioni e proporzioni sono rimaste pressoché immutati. La struttura di base degli impianti fissi è costituita da quattro pali disposti a formare riquadri con superfici standard, 500 m² o multipli. I pali sono conficcati da 1.5 a 2.5 metri di profondità, a seconda del fondale e posti ad una distanza di 5 m l'uno dall'altro e sono rinforzati con saette poste in diagonale se questi costituiscono i vertici del quadrato, se invece sono ai lati o di facciata hanno solo un rinforzo laterale a formare la coppiola.

Figura 16 Schema impianto fisso.



pali posti al centro del quadrato sono singoli e sono chiamati piombi. Preparato lo scheletro, si vanno a collocare le ventie che formeranno le camere. A circa 20-25 cm dalla superficie dell'acqua calcolata dal livello medio delle basse maree viene tirata la prima ventia, a salire sono collocate le altre in modo da permettere la disposizione di 9 pergolari per ogni spazio tra palo e palo (3 pergolari per ventia).

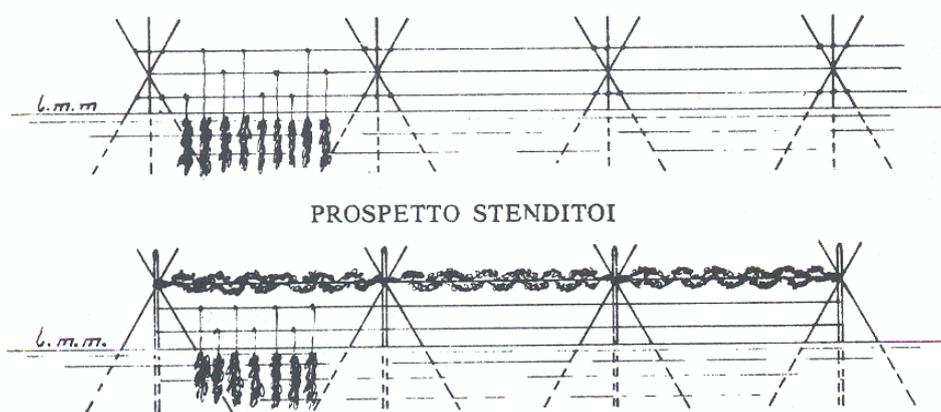


Figura 17 Prospetto stenditoi.

I pergolari, così sistemati, arrivano fino a 2 metri dal fondo, alle ventie vengono inoltre aggiunte corde incrociate chiamate crociere, alle quali si appendono ulteriori pergolari.

Gli impianti dell'isola Palmaria e di Porto Venere sono fissi, come parte di quelli entro diga. Fuori diga, invece, troviamo l'altro tipo di impianto, quello flottante che è utilizzabile in aree non riparate e può quindi sfruttare spazi maggiori di quelli confinati in zone chiuse. Concettualmente molto semplice, si tratta di una serie di galleggianti legati in successione (è anche definito long-line) e può essere a monoventia o a due o tre ventie. I pergolari sono legati tra un galleggiante e l'altro, lo spazio tra gli stessi consente operare con natanti e massimizzare così la manodopera.

5. Attività di monitoraggio

Sulla base dei risultati dello studio effettuato nell'areale (Fig.18) durante il programma transfrontaliero MARTE+ (Progetto Transfrontaliero SFOP UE - Regione Liguria – DISTAV), è stato individuato un sito di campionamento corrispondente alla Stazione 2 (44,078807 N; 9,868214 E). Nel sito sono stati effettuati misure dei principali parametri chimico-fisici e campionamenti mensili di acqua di mare nello strato sub-superficiale (-1,5 m) della colonna d'acqua nel periodo 18/05/2016 – 03/08/2016.

Il mezzo nautico e l'assistenza ai campionamenti sono stati forniti dai soci della Cooperativa Mitilicoltori Associati.

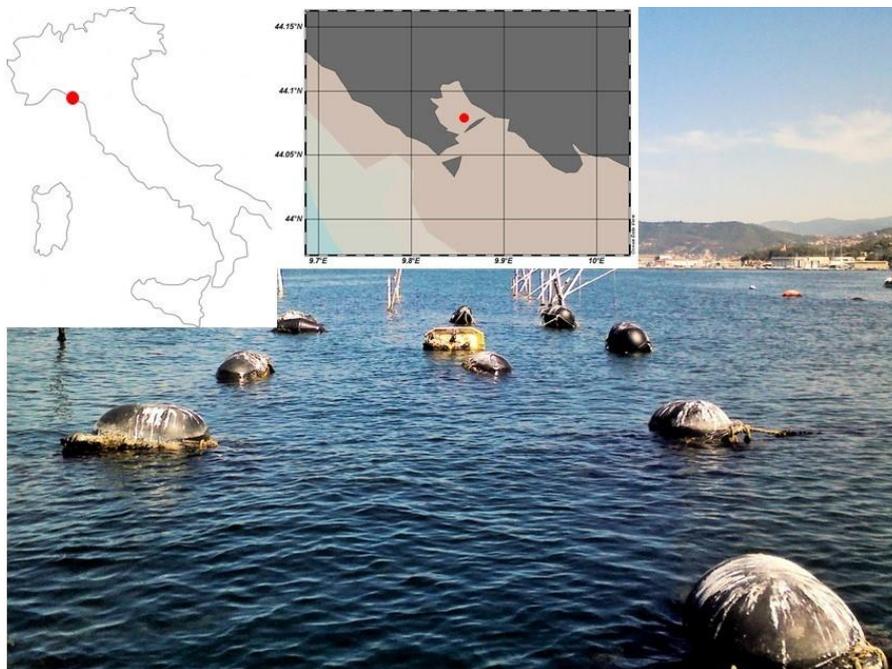


Figura 18 Sito di campionamento ST2 (La Spezia).

Per quanto riguarda i parametri fisico-chimici dell'acqua (temperatura e salinità) le misurazioni sono state effettuate, direttamente in campo, tramite sonda multiparametrica (YSI 30M/50 FT; $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 0.1‰) e pH metro portatile (Etekcity 009, ± 0.1 risoluzione ed accuratezza a 20°C).

I campioni di acqua marina, prelevati utilizzando una bottiglia oceanografica tipo Niskin (Hydro-bios, Kiel) avente capacità di 5 litri, sono stati utilizzati per la valutazione della biomassa fitoplanctonica (Chl a) e del seston; i campioni sono stati trasportati in laboratorio in contenitori di plastica opaca mantenuti alla temperatura di circa 4°C al buio.

Il contenuto di microplastiche è stato valutato in organismi selvatici ed allevati presenti nel Golfo: in particolare sono stati considerate tre diverse specie di molluschi bivalvi (*Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* e *Anomia ephippium*) ed un tunicato (*Ascidia sp*). Gli organismi selvatici sono stati raccolti nell'impianto di mitilicoltura con appositi collettori di plastica durante il progetto MARTE+. I collettori sono rimasti in acqua per 6 mesi (Marzo-Settembre 2012), successivamente, sono stati sezionati e fissati in etanolo al 70% (v:v, Sigma-Aldrich) e conservati in laboratorio sino al momento delle analisi.

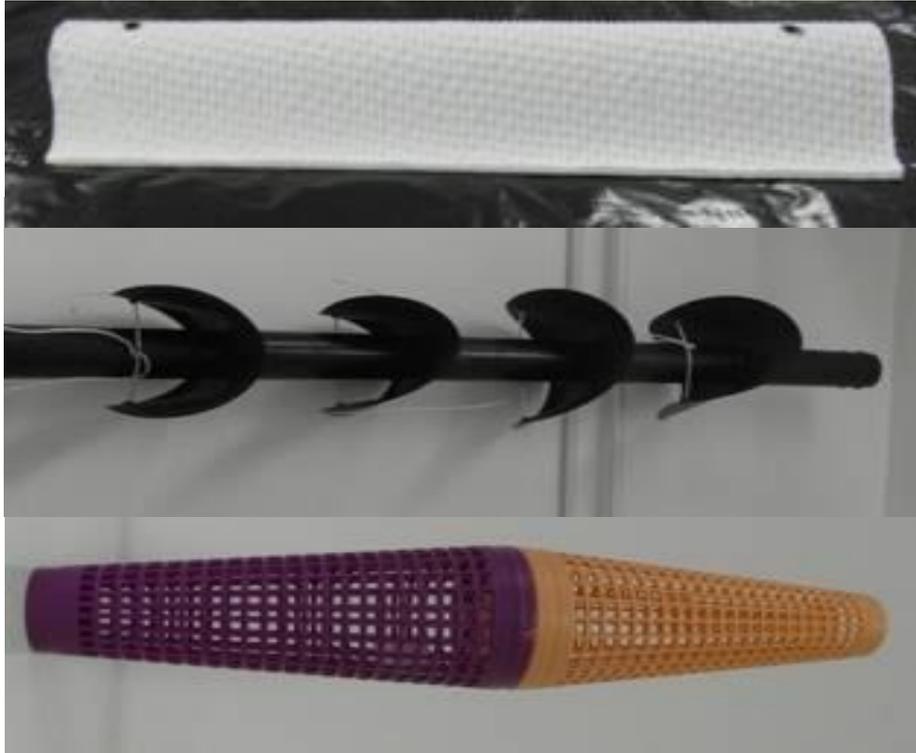


Figura 19 Captatori impiegati durante il progetto MARTE+.

Il programma MARTE + ha avuto come conseguenza applicativa l'avvio della produzione di *Crassostrea gigas* e nel 2016 sono stati prelevati esemplari di ostrica concava, appartenenti a 5 classi dimensionali (::range::) secondo la medesima stagionalità (Marzo-Settembre 2016). Le ostriche di sono state trasportate in contenitore refrigerato asciutto e in laboratorio sono state analizzate per la determinazione del quantitativo di microplastiche in esse presenti.

5.1 Materiali e metodi

5.1.1 Biomassa fitoplanctonica

La valutazione della biomassa fitoplanctonica è stata effettuata in termini di clorofilla a ($\mu\text{g/l}$), parametro ecologico in quanto indice di densità algale indicante diversi stati di trofia; a tale scopo l'acqua è stata filtrata su filtri di lana di vetro (Whatman GF/A) con l'aggiunta di 1ml di MgSO_4 , sugli ultimi 100ml di campione.

L'estrazione dei pigmenti è stata effettuata in acetone e acqua (90% v:v, Sigma-Aldrich) previa frammentazione dei filtri e successiva centrifugazione a 2000 rpm per 10 minuti; i campioni sono quindi stati sottoposti ad analisi spettrofotometrica (Strickland e Parsons, 1960) alle lunghezze d'onda di 750nm, 664nm, 640nm e 630nm. Per il calcolo del contenuto di Chl a è stata utilizzata la seguente formula:

$$[11,85 \times (A_{664} - A_{750}) - 1,54 \times (A_{647} - A_{750}) - 0,08 \times (A_{630} - A_{750})] \times V$$

Chl. a(mg/m^3) = _____

$$V_f \times L$$

Ove **A** = Assorbanza del campione alle diverse lunghezze d'onda,

V = Volume filtrato (l)

V_f = Volume dell'estratto (ml)

L = lunghezza della cuvetta (cm)

5.1.2 Seston

Per seston si intende:

materia vivente (bioseston) o non vivente (abioseston) natante o galleggiante in una colonna d'acqua, trattenuta da un filtro avente porosità di 0.45µm (attualmente 0.22 µm) e previa prefiltrazione su retino da mesozooplancton avente apertura di maglia di 200 µm. Il seston è direttamente correlato alla torbidità ed è collegato alla presenza di nutrienti nella colonna d'acqua. Il seston totale è anche definito: Total Suspended Substance (TSS).

L'analisi ponderale è stata effettuata filtrando 1 l di acqua di mare (prefiltrata) su filtri di nitrato di cellulosa (0,45µm, ø = 45mm, Sartorius, Germany) previamente condizionati in stufa (110°C, 2 ore) ed essiccati su gel di silice (1,5 ore); dopo il ri-condizionamento del filtro si è proceduto all'analisi ponderale utilizzando una bilancia analitica (Sartorius, mod, 0.00001 g), il risultato è stato espresso in mg/l.

5.1.3 Microplastiche in organismi filtratori

La valutazione quantitativa delle microplastiche è stata effettuata sulla parte edule degli esemplari di *Crassostrea gigas* nei diversi stadi di sviluppo; analoga operazione su esemplari di ostriche reperite in commercio di diversa provenienza.

Tutti gli esemplari sono stati sottoposti ad analisi biometrica determinandone lunghezza (cm) e peso (g); per *Crassostrea gigas*, la lunghezza della valva inferiore è stata misurata dall'umbone al margine superiore della stessa, per *Mytilus galloprovincialis* e *Anomia ephippium* è stata misurata la valva superiore. Per quanto riguarda *Ascidia spp.* la dimensione è stata ottenuta considerando la lunghezza totale del corpo dell'organismo, dal piede al margine del sifone.

Per la determinazione della massa l'intero organismo è stato pesato, escludendo la conchiglia, previa essiccazione a bassa temperatura (50°C per 4h) e successivo condizionamento in essiccatore (1,5h).

Per evitare la contaminazione ambientale da microplastiche, tutti i campioni sono stati trattati sotto cappa a flusso laminare (Jupiter BioAir); tutta la vetreria utilizzata durante le operazioni è stata lavata più volte con acqua distillata e sigillata con carta stagnola fino al momento dell'utilizzo e gli operatori sono stati dotati di camici da laboratorio di cotone puliti.

La digestione della materia organica è stata effettuata con 5 ml/g di H₂O₂ (30% v:v; Li *et al.*, 2015) a 60°C per un'ora e messi in agitazione su piastra oscillante (80rpm) fino a completa dissoluzione. Le microplastiche sono state isolate aggiungendo

una soluzione sovrasatura di NaCl che le trasporta verso la superficie del contenitore che veniva successivamente filtrata su filtri di nitrato di cellulosa (porosità 5μ , $\varnothing = 45$ mm, Whatman AE98). I filtri sono stati quindi trasferiti in capsule petri previamente sciacquate in acqua distillata e osservati al binocolare (ZEISS Wild). Le microplastiche sono state quindi classificate (filamentose o frammentate) e misurate con approssimazione del centesimo di millimetro. Per individuare possibili contaminazioni ambientali, sono stati approntati appositi filtri (bianco) che venivano posizionati a fianco dell'operatore durante le analisi.

I risultati sono stati espressi come numero di particelle per grammo di organismo analizzato (MP/g).

5.1.4 Morfologia degli organi palleali di *Crassostrea gigas*

Con l'intento di verificare la correlazione tra morfologia interna di *Crassostrea gigas* ed il quantitativo medio di particolato presente nella colonna d'acqua, è stata effettuata, tramite software dedicato, la biometria degli organi interni e successivo calcolo della loro superficie totale.

Gli organi misurati (cm^2) sono stati:

- Muscolo adduttore (liscio e striato);

- Mantello;
- Branchie;
- Palpi labiali.

A tale scopo è stato utilizzato il software di analisi fotografica ImageJ (NIH, National Institute of Health, USA) che acquisisce le dimensioni di elementi presenti nell'immagine dopo aver stabilito gli opportuni riferimenti dimensionali. Per l'acquisizione delle immagini degli organi interni di *C.gigas*, alcuni esemplari adulti (n=11) sono stati posizionati su sfondo bianco e fotografati (Figura 20). Su questa prima immagine è stata effettuata la misura di muscolo adduttore e mantello.



Figura 20 Organismi adulti analizzati. Il riferimento dimensionale (basso sx) è 5 cm.

Si è quindi proceduto alla dissezione e alla separazione degli organi interni (branchie, palpi labiali) ripetendo la procedura

(Fig.21), al fine di garantire la completa distensione delle diverse sezioni riducendo l'errore strumentale.



Figura 21 Analisi morfometrica organi interni.

Sui dati dimensionali degli organi così ottenuti sono state effettuate elaborazioni statistiche descrittive (media \pm SD); è stato effettuato inoltre un confronto delle dimensioni di tali organi e calcolati i rapporti morfometrici intercorrenti tra gli organi dell'apparato digerente e la massa dell'organismo.

5.2 Analisi statistiche

I dati ambientali sono stati elaborati, tramite il software Ocean Data View (UNESCO, USA) e sono state prodotte elaborazioni grafiche della distribuzione dei parametri misurati. Le elaborazioni riguardano i mesi di ottobre (2011), marzo, luglio ed agosto (2012).

5.3 Risultati

5.3.1 Elaborazione dei dati di campagna (MARTE+)

Le elaborazioni dei dati ambientali relativi alla campagna di monitoraggio relativa al progetto transfrontaliero MARTE+ sono riportate di seguito. Lo studio è stato svolto su un totale di 8 stazioni distribuite sull'areale.

ST ₁) vivaio levante:	44°04'43,56"N – 9°52'05,56"E
ST ₂) vivaio ponente:	44°04'21,76"N – 9°51'28,92"E
ST ₃) filare fuori diga ponente:	44°04'03,48"N – 9°51'33,22"E
ST ₄) filare fuori diga:	44°04'28,71"N – 9°52'29,34"E
ST ₅) vivaio porto venere:	44°03'30,55"N – 9°50'35,11"E
ST ₆) vivaio palmaria:	44°03'04,65"N – 9°51'09,69"E
ST ₇) vivaio palmaria:	44°03'04,01"N – 9°51'04,85"E
ST ₈) vivaio palmaria:	44°02'50,63"N – 9°50'42,95"E

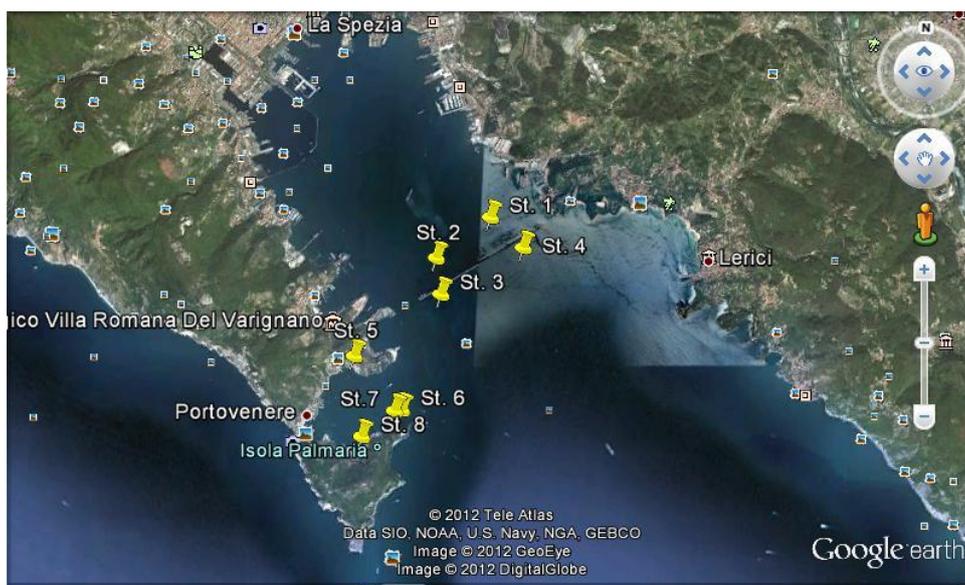


Figura 22 Stazioni posizionate durante il programma MARTE+ (2011/2012).

I valori medi della temperatura pari a $18,3\pm 4,9^{\circ}\text{C}$ hanno oscillato tra un minimo di $11,59^{\circ}\text{C}$ (febbraio) ed un massimo di $26,42^{\circ}\text{C}$ (agosto), mentre per quanto riguarda la salinità è stato rilevato un valore medio di $37,39\pm 0,5$ PSU (Ottobre-Agosto 2011/12), con un minimo di $32,80$ PSU (Ottobre 2011) ed un massimo di $37,91$ PSU (Luglio 2012). Il quantitativo di ossigeno disciolto presente nella colonna d'acqua ha avuto un valore medio dell' $87\pm 8,5\%$, con un minimo di saturazione del 75% (febbraio) ed un massimo del 109% (maggio). Il pH ha oscillato tra gli $8,00$ (febbraio) gli $8,61$ (luglio), con un valore medio di $8,20\pm 0,13$; la torbidità dell'acqua ha avuto un valore medio di $3,19\pm 0,72$ FTU, con un picco massimo di $8,3$ FTU (ottobre) ed un minimo di $2,4$ FTU (luglio), corrispondenti rispettivamente a $6,07$ mg/l e $26,70$ mg/l. Nel complesso del periodo di osservazione la concentrazione di clorofilla *a* ha raggiunto un minimo $0,23$ $\mu\text{g/l}$ (settembre) e un massimo di $2,48$ mg/m^3 (ottobre), con un valore medio di $0,97\pm 0,44$ $\mu\text{g/l}$. Sono state analizzate le condizioni relative allo strato superficiale della colonna d'acqua, dove insiste la maggior parte degli allevamenti (Figure 23, 25, 27, 29); Inoltre sono state elaborate sezioni verticali dei principali parametri: **biomassa fitoplanctonica, temperatura e torbidità dell'acqua** entro-diga (Figure 24, 26, 27, 28).

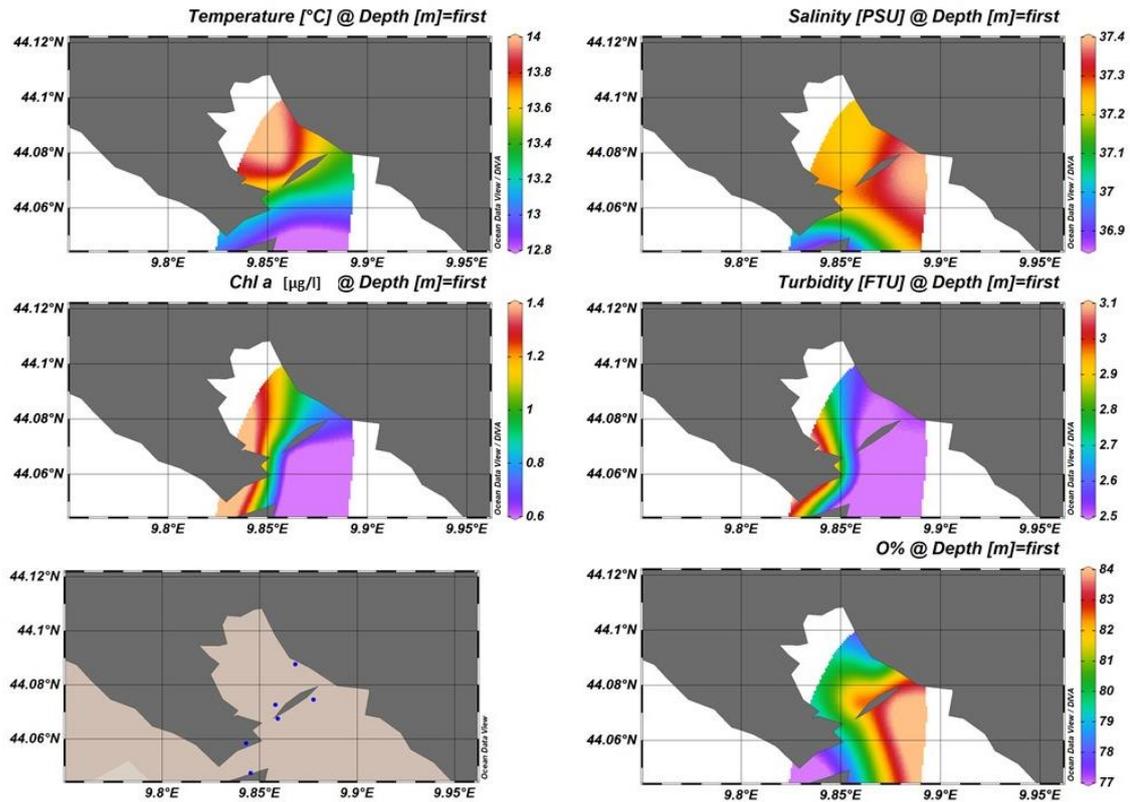


Figura 23 Distribuzione superficiale dei principali parametri ambientali (Marzo 2012).

In una situazione tipicamente primaverile, si può notare il marcato effetto di confinamento generato dalla diga. Il quantitativo di biomassa fitoplanctonica all'interno di quest'ultima è infatti più del doppio dell'esterno, fattore causante un aumento della torbidità superficiale. Il tempo di residenza di circa 3 settimane all'interno del Golfo contribuisce al riscaldamento della massa d'acqua interna alla diga, la cui salinità risente dei naturali contributi di acqua dolce.

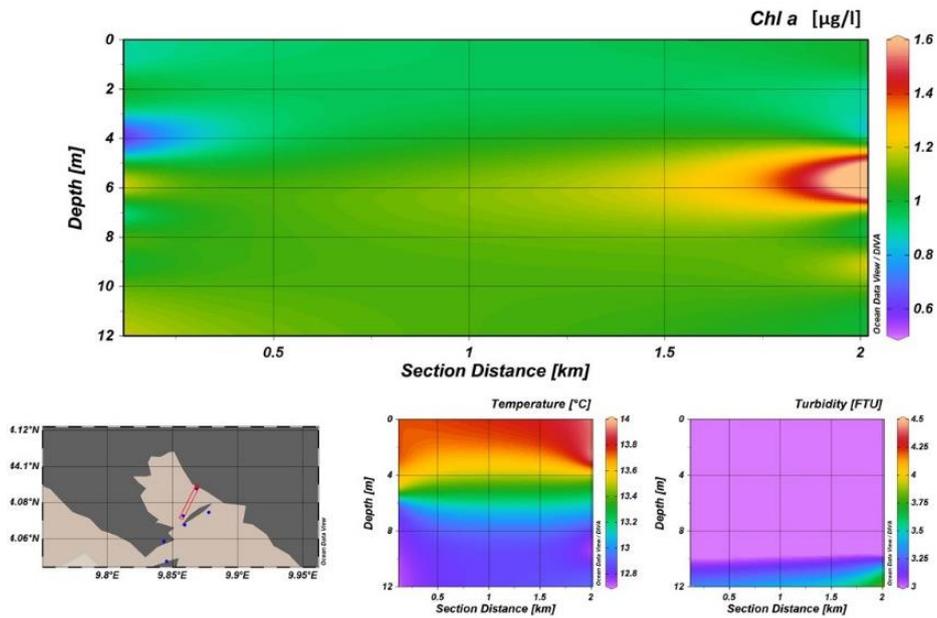


Figura 24 Sezione Entro-Diga (Marzo 2012)

Per quanto riguarda la sezione verticale entro-diga, si può individuare un picco di torbidità sullo strato più profondo della colonna d'acqua non corrispondente al picco di biomassa fitoplanctonica. Comincia a formarsi il termoclino stagionale che si andrà a protrarre per la stagione calda.

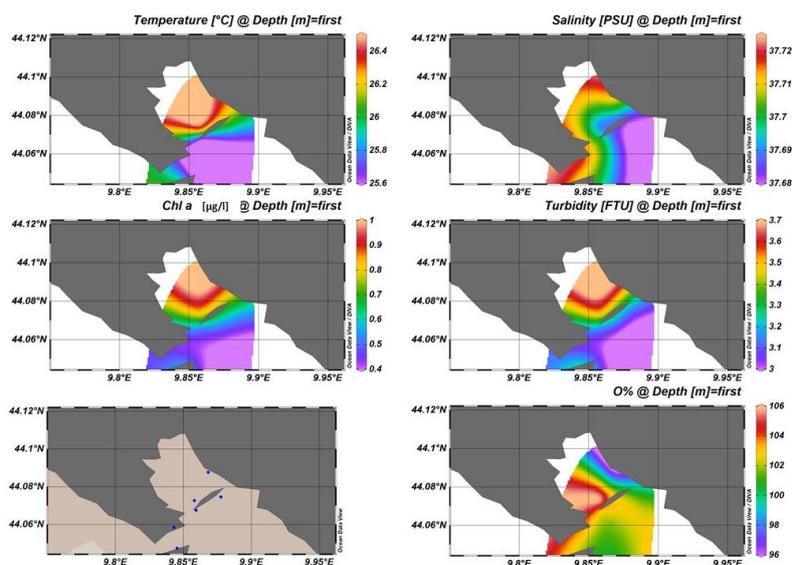


Figura 25 Distribuzione superficiale dei principali parametri ambientali (Luglio 2012).

Con il progredire della stagione calda, la differenza di temperatura superficiale tra interno diga e l'esterno va ad aumentare, raggiungendo quasi 1°C di intervallo, la biomassa fitoplanctonica è confinata all'interno della diga stessa e va a contribuire alla torbidità superficiale delle acque, che risultano quindi essere soprassaturate di ossigeno disciolto. Il termoclino stagionale è stabile e raggiunge un gradiente di circa 0.5°C/m.

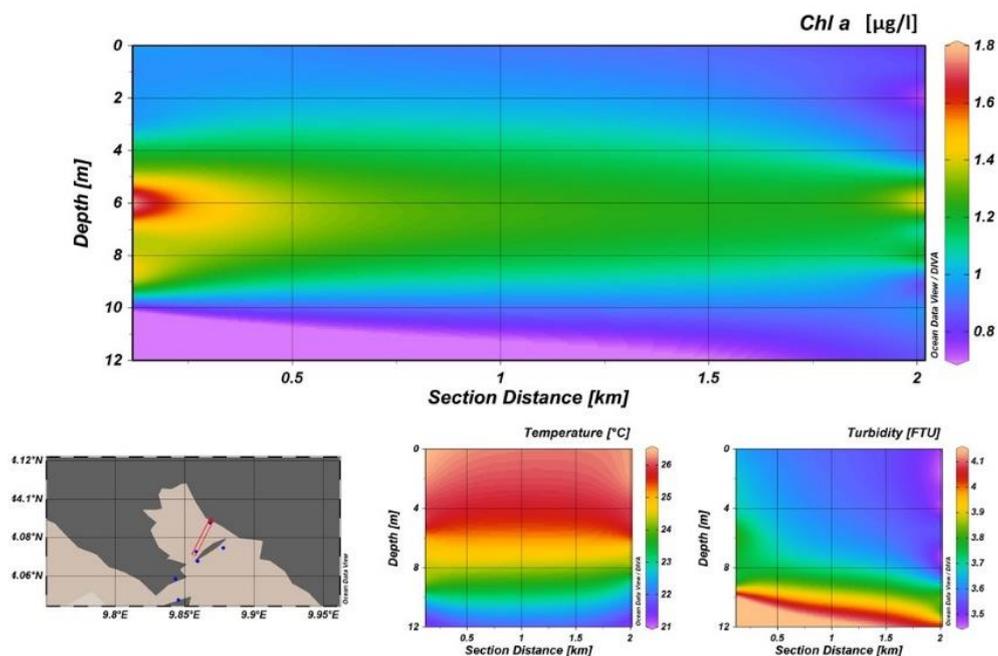


Figura 26 Sezione Entro-Diga (Luglio 2012)

Entro-diga, il quantitativo di biomassa fitoplanctonica diminuisce sensibilmente, soprattutto per quanto riguarda gli strati superiori al termoclino. Si registra un aumento di torbidità negli strati profondi ed una generale diminuzione del trofismo delle acque.

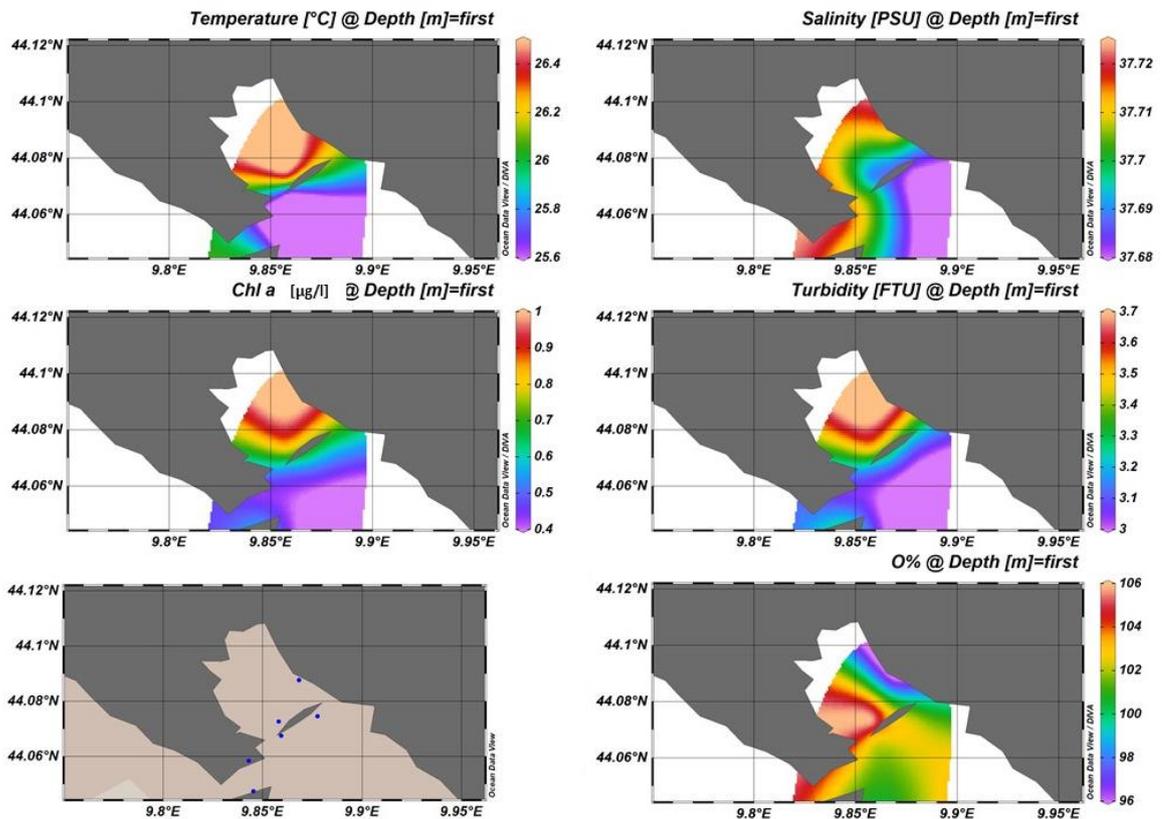


Figura 27 Distribuzione superficiale dei principali parametri ambientali (Agosto 2012).

Ad estate inoltrata si può notare una riduzione del Δ di temperatura sui due versanti della diga, determinato dalla riduzione delle precipitazioni ed un aumento dell'evaporazione superficiale, che causa un aumento dei valori di salinità all'interno della diga. I valori di biomassa fitoplanctonica sono minori di quelli riscontrati durante il resto del monitoraggio, a causa del progressivo esaurirsi della quantità di nutrienti al di sopra del termoclino.

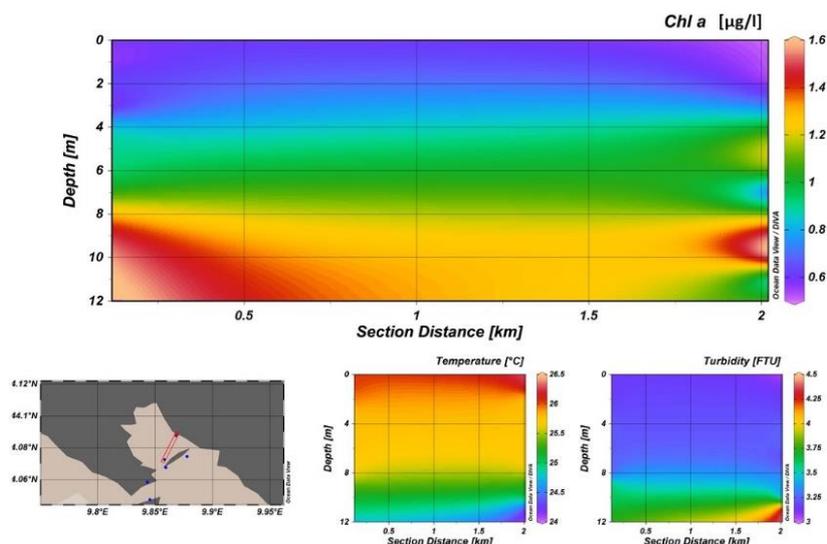


Figura 28 Sezione Entro-Diga (Agosto 2012)

La biomassa fitoplanctonica è segregata dal termocline stagionale, il trofismo diminuisce e va ad aumentare la torbidità degli strati profondi. Tale processo è confermato dall'aumento di temperatura in superficie in concomitanza con valori maggiori di torbidità negli strati profondi. Successivamente, avviene un rimescolamento della colonna d'acqua e dei nutrienti che riporta le acque allo stato autunnale illustrato in precedenza.

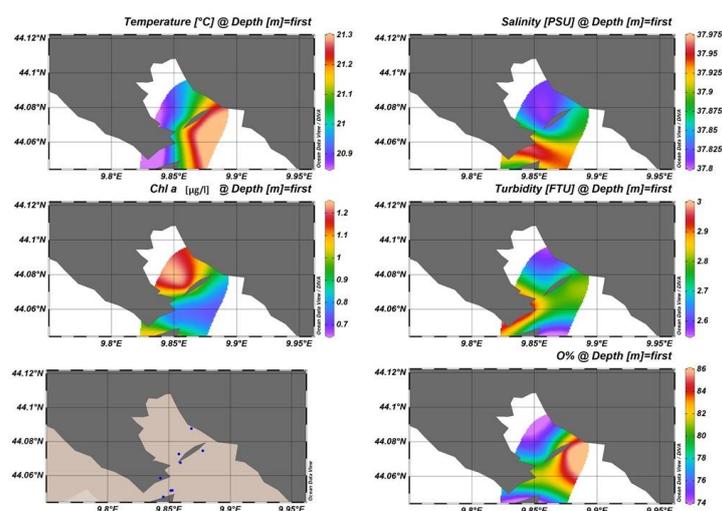


Figura 29 Distribuzione superficiale dei principali parametri ambientali (Ottobre 2011).

Nei primi periodi autunnali si determina un accumulo della biomassa fitoplanctonica all'interno della diga, grazie anche al contributo di precipitazioni ed apporti di acqua dolce stagionali. Salinità e temperatura sono omogeneamente distribuite sull'areale, mentre è evidente una diminuzione dell'ossigeno disciolto.

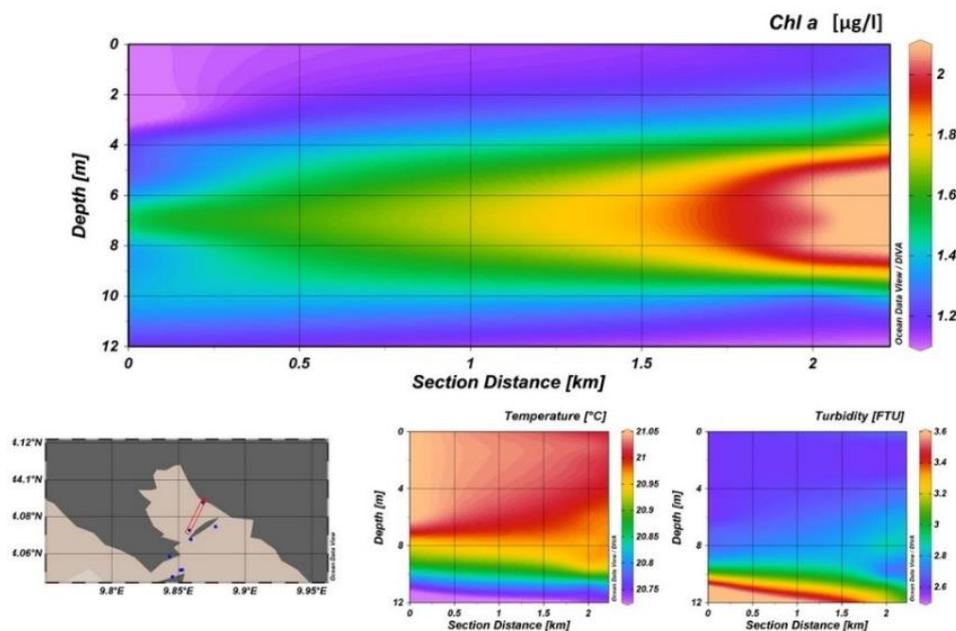


Figura 30 Sezione Entro-Diga (Ottobre 2011).

Per quanto riguarda la sezione rappresentata all'interno della diga, principale sito di allevamento di *Crassostrea gigas*, si può notare una relativa omogeneità verticale della temperatura, con un aumento della torbidità nello strato più profondo (-12m), non coincidente con il picco di biomassa fitoplanctonica, situato intorno ai -7m di profondità.

5.3.2 Parametri ambientali 2016 (Stazione 2)

I risultati del monitoraggio dei parametri ambientali effettuato durante il periodo 18/05/2016 – 03/08/2016 sulla stazione ST2 (44,078807 N; 9,868214 E) sono di seguito riportati.

La salinità (Fig.31) è risultata in media pari a $37,67 \pm 0,62$ PSU con un incremento significativo, passando da 37,00 PSU (Maggio) a 38.30 (Agosto); analogamente è stato evidenziato un progressivo aumento delle temperature (Fig.31) superficiali da 20°C (Maggio) a 25°C (Agosto).

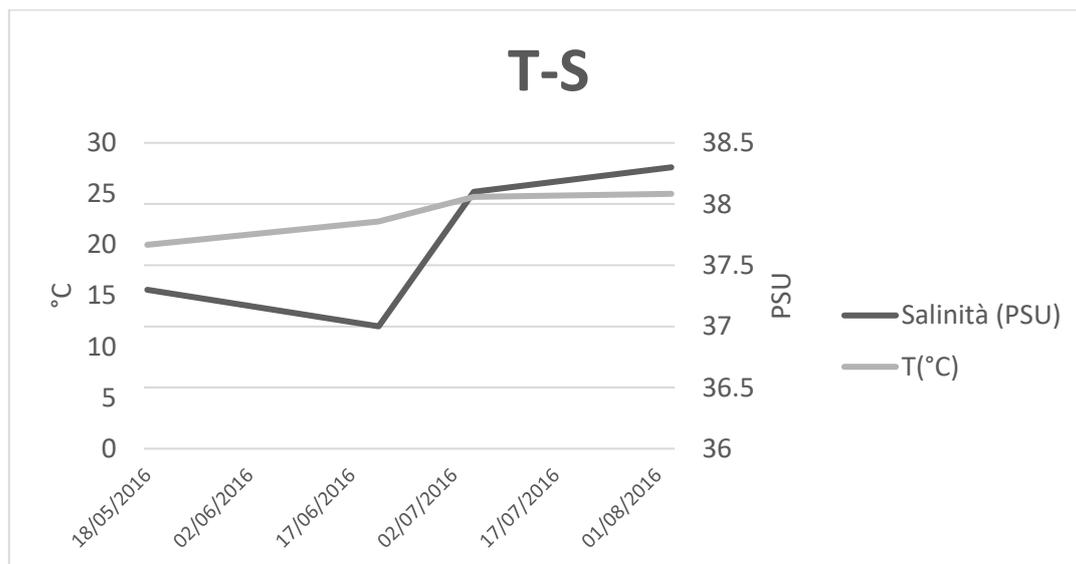


Figura 31 Salinità e temperatura su ST2 nel periodo di rilevamento (Maggio-Agosto 2016).

Il valore medio del pH (Fig.32) è risultato pari a 8.025 ± 0.15 , con range compreso tra 7.9 (Giugno e Luglio) e 8.2 (Agosto).

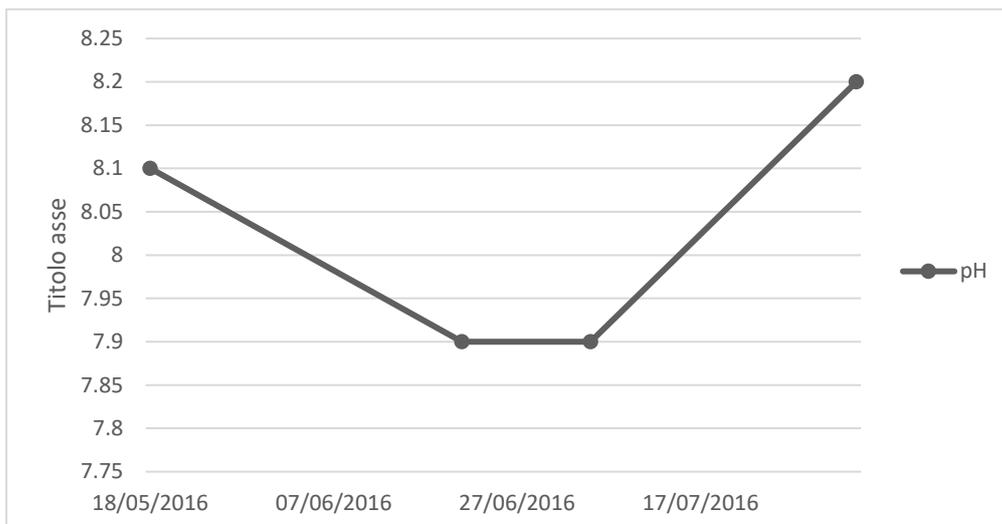


Figura 32 pH su ST2 nel periodo di rilevamento (Maggio-Agosto 2016).

I valori di particolato (Fig.33), dopo un picco relativo al campionamento di maggio (15.16 mg/l), scendono gradualmente con l'avanzare delle stagioni, fino a raggiungere un valore di 7,1 mg/l nel mese di agosto.

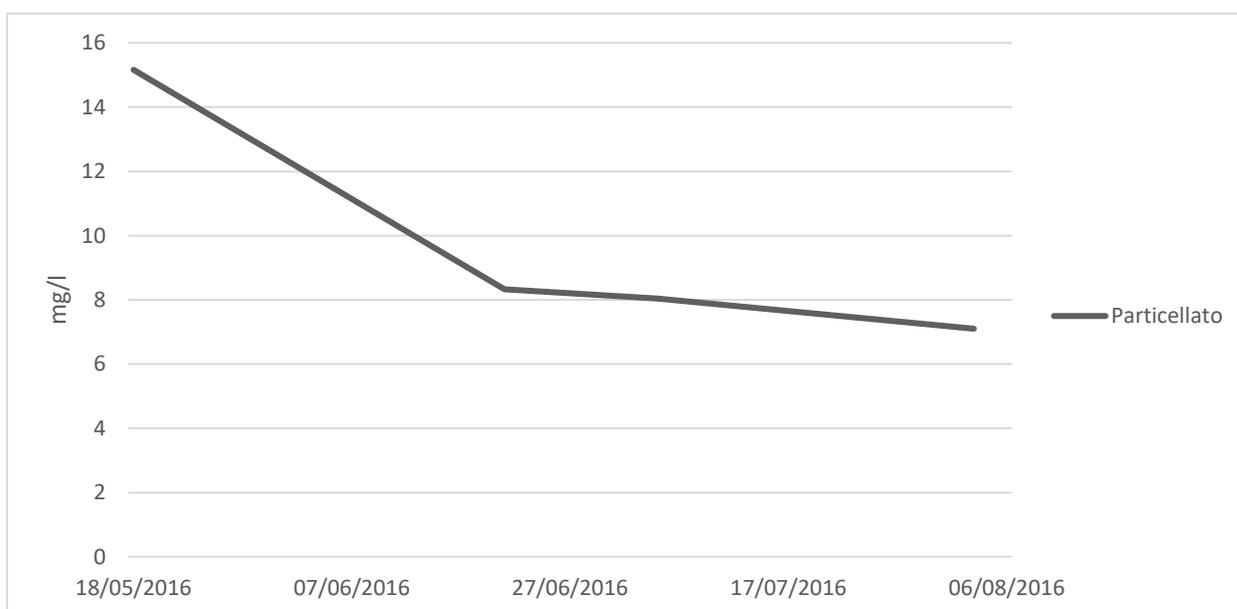


Figura 33 Particellato totale su ST2 nel periodo di rilevamento (Maggio-Agosto 2016).

La misurazione dei pigmenti autotrofi, ha un andamento simile a quello del seston sino al mese di Giugno, quindi , tende ad aumentare con il progredire della stagionalità, raggiungendo un picco in agosto con un valore di 2.1 µg/l (Fig.34).

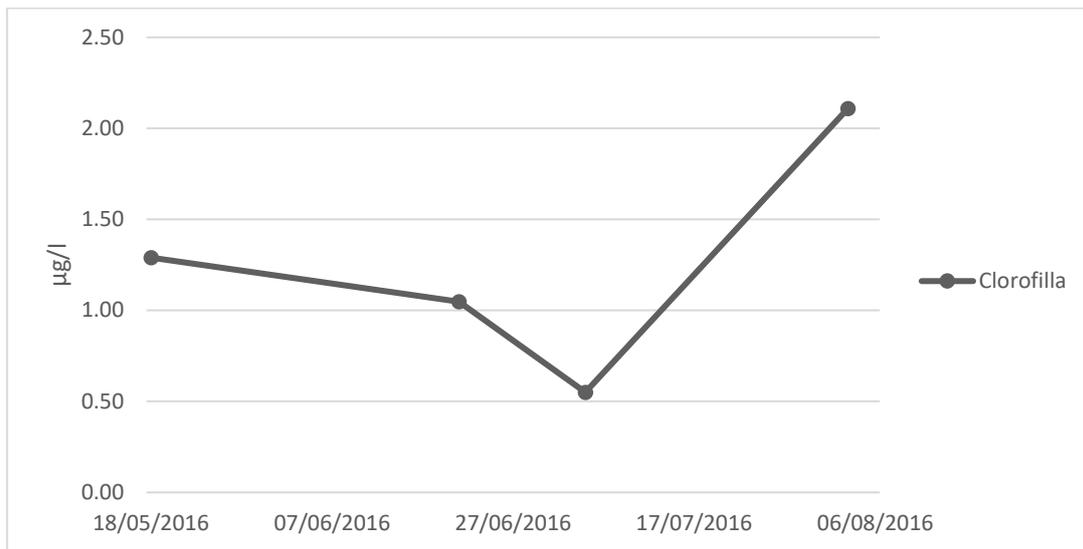


Figura 34 Chl a su ST2 nel periodo di rilevamento (Maggio-Agosto 2016).

Tabella 6 Parametri ambientali misurati (Maggio-Agosto 2016).

Data	Profondità (m)	T (°C)	Salinità (‰)	pH	Chl a (µg/l)	Seston (mg/l)
18/05/2016	3	20,0	37,3	8,10	1,290	15,160
21/06/2016	3	22,3	37,0	7,90	1,046	8,330
05/07/2016	3	24,7	38,1	7,90	0,550	8,040
03/08/2016	3	25,0	38,3	8,20	2,110	8,040

5.3.3 Morfologia degli organi palleali di *Crassostrea gigas*

I dati relativi alle ostriche analizzate sono riportati in tabella (Tab.7). I valori medi di lunghezza e massa degli organismi analizzati sono risultati pari a $9,62 \pm 3,39$ cm e $3,77 \pm 3,84$ g. rispettivamente. Le ampiezze medie delle superfici del mantello ($25,40 \pm 19,56$ cm²), delle branchie ($5,88 \pm 4,37$ cm²) e dei palpi labiali ($0,46 \pm 0,31$ cm²) correlano con le dimensioni degli organismi analizzati (r_s spearman rank 0,88, $p < 0,005$).

Tabella 7 Morfometria degli organismi analizzati.

Ind	Lar (cm)	Lun (cm)	m (g)	Mantello (cm ²)	Branchie (cm ²)	Palpo labiale (cm ²)
1	5,91	13,6	10,9	42,55	11,46	0,63
2	4,33	12,15	3,7	32,77	8,22	0,35
3	5,55	13,41	7,7	53,78	12,36	0,41
4	5,22	11,98	4,6	42,49	8,59	0,44
5	4,6	14,05	9,3	53,05	10,48	1,35
6	1,99	7,57	0,9	12,11	3,68	0,38
7	1,39	7,36	0,8	8,64	2,67	0,35
8	2,48	6,48	1,2	10,20	2,89	0,24
9	2,04	7,7	0,9	10,78	1,45	0,3
10	1,74	6,07	0,7	6,42	1,36	0,32
11	1,8	5,4	0,8	6,59	1,47	0,27
Totale	3,37	9,62	3,77	25,40	5,88	0,46
S.D.	1,75	3,39	3,84	19,56	4,37	0,31

Sulla base di questi risultati sono state effettuate alcune valutazioni morfofisiologiche degli organismi, quali il rapporto tra

la superficie delle branchie e mantello, struttura del muscolo adduttore e relativa composizione percentuale delle componenti liscia e striata, nonché rapporti tra superficie/massa relativi agli organi palleali analizzati. Il muscolo adduttore è risultato composto al $58,17 \pm 5,64\%$ di componente striata, mentre il valore medio del rapporto tra mantello e branchie è risultato $0,24 \pm 0,05$. Il Per quanto riguarda il rapporto branchie/palpi labiali, a causa della variabilità dimensionale degli organismi analizzati, si è ottenuto un valore medio di $12,8 \pm 13,9$. I risultati sono esposti in tabella 8.

Tabella 8 Rapporti ed analisi morfometriche tra organi palleali di *C.gigas*.

Ind	M/B	Muscolo striato (cm ²)	Muscolo liscio (cm ²)	%ms	Bra/PL
1	0,27	1,962	1,701	53,56	18,2
2	0,25	2,171	1,084	66,70	23,5
3	0,23	1,862	1,582	54,07	30,1
4	0,20	1,711	1,174	59,31	19,5
5	0,20	2,234	1,522	59,48	7,8
6	0,30	0,214	0,164	56,61	9,7
7	0,31	0,203	0,156	56,48	7,6
8	0,28	1,055	0,510	67,39	12,1
9	0,13	0,224	0,156	58,97	4,8
10	0,21	0,082	0,085	49,17	4,3
11	0,22	0,075	0,074	50,34	5,4
Total (media?)	0,24	1,07	0,75	58,17	12,8
S.D. ±	0,05	0,93	0,67	5,64	13,9

Il rapporto tra le due componenti del muscolo adduttore, liscio e striato, ha avuto un valore medio percentuale del $58,17 \pm 5,64\%$ in favore del muscolo striato. Le differenze dimensionali tra gli individui analizzati si riflette nella elevata deviazione standard in superficie del muscolo liscio ($1,07 \pm 0,93 \text{ cm}^2$), striato ($0,75 \pm 0,67 \text{ cm}^2$). Il valore medio del rapporto tra mantello e branchie è risultato dello $0,24 \pm 0,05$.

5.3.4 Microplastiche

I dati biometrici degli organismi analizzati ed il relativo contenuto di microplastiche sono illustrate in tabella 9. La variabilità dimensionale più ampia è stata riscontrata in *C. gigas*, con una dimensione variabile tra 0.94 cm e 8.71 cm (8.93g e 0.003 g di massa rispettivamente?); analogamente, per i campioni della campagna MARTE+, è stata individuata una marcata variabilità interspecifica.

Tabella 9 Dimensioni degli organismi analizzati e contenuto di microplastiche.

		Lunghezza (cm)	Massa (g)	Microplastiche (MP/g)
<i>C. gigas</i>	Adulti	8.30 ± 0.45	8.70 ± 1.2	0.11
	Classe 1	4.51 ± 0.41	1.40 ± 0.4	0.12
	Classe 2	3.68 ± 0.19	0.86 ± 0.2	0.17
	Classe 3	2.31 ± 0.30	0.23 ± 0.4	0.00
	Classe 4	1.25 ± 0.16	0.04 ± 0.01	0.00
	<i>M. galloprovincialis</i>	1.24 ± 0.14	0.09 ± 0.02	0.05

Altri	<i>Ascidia spp.</i>	3.38 ± 0.62	2.90 ± 0.52	0.62
	<i>Anomia ephippium</i>	3.25 ± 0.54	0.40 ± 0.08	0.12

Le microplastiche sono state rinvenute, in forma filamentosa o frammentata, in tutte le specie analizzate; nel complesso, il 75% del totale delle microplastiche rinvenute è risultato di forma frammentata, mentre solo un quarto di forma filamentosa.

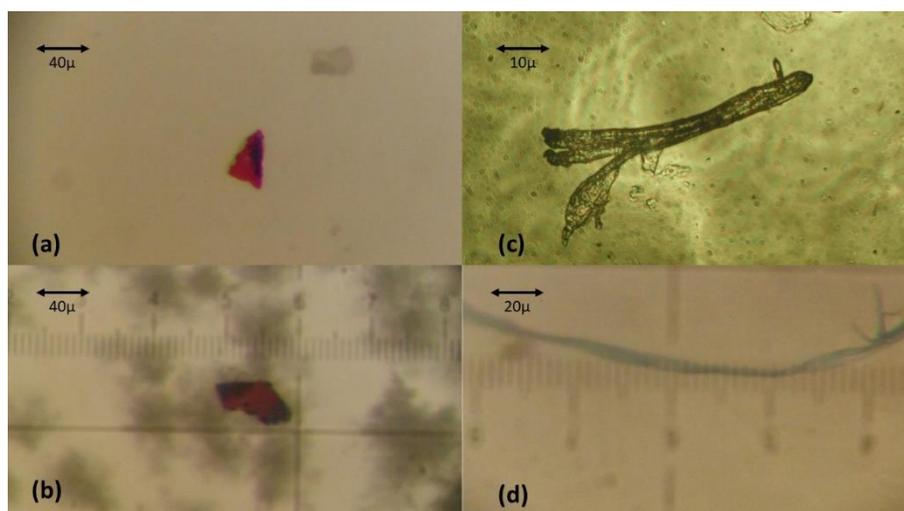


Figura 35 Microplastiche da campioni ambientali.

Per quanto riguarda le microplastiche frammentate, il valore medio della lunghezza è risultato $60.01 \pm 38 \mu\text{m}$ (Fig.36), mentre le microplastiche filamentose hanno avuto un valore medio di $530 \pm 470 \mu\text{m}$ (Fig.37);

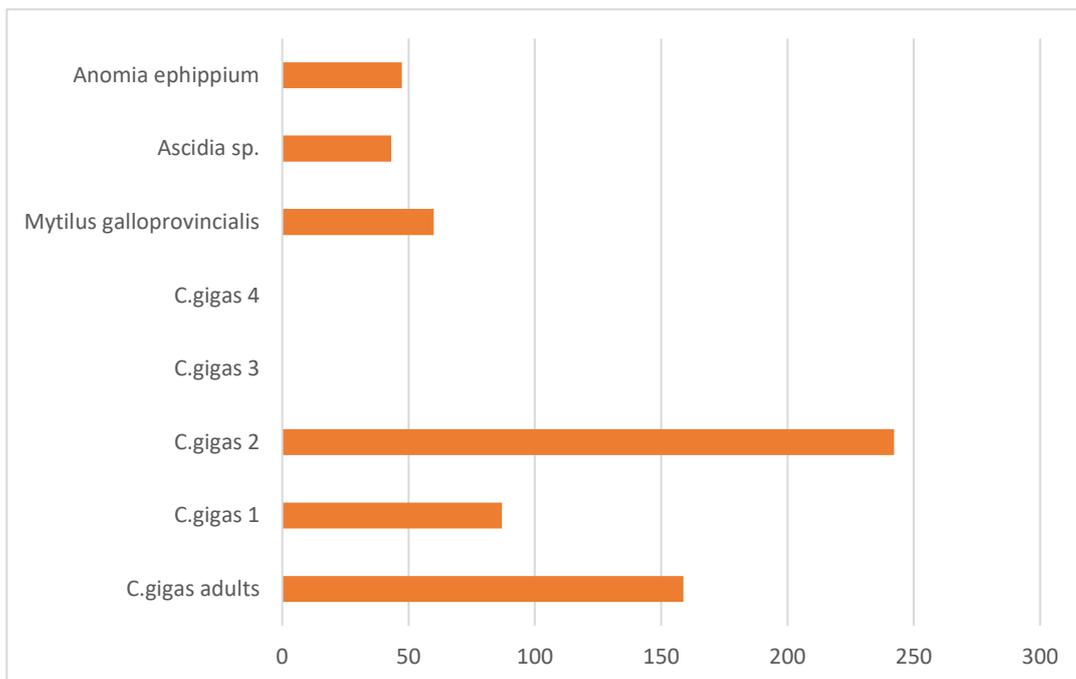


Figura 36 Dimensioni di microplastiche frammentate (µm)

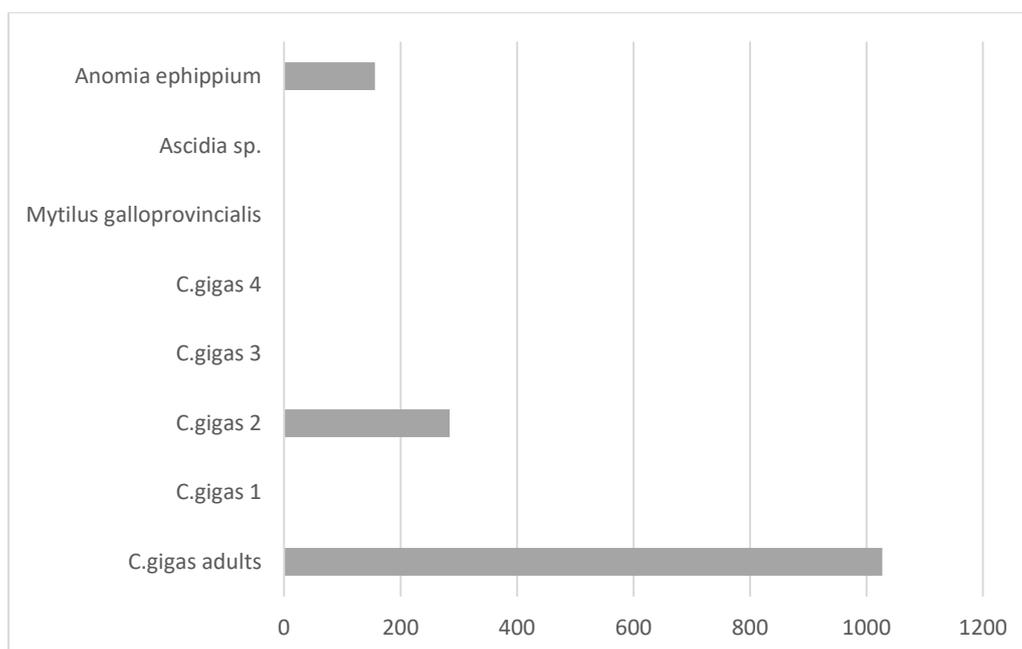


Figura 37 Dimensioni di microplastiche filamentose (µm)

Le concentrazioni più elevate di particelle sono state individuate nei campioni di *Ascidia sp.*, con un picco di 0.62 MP/g, seguito da *Anomia ephippium* (0.12 MP/g) e *Mytilus galloprovincialis* (0.05

MP/g). Per quanto riguarda *Crassostrea gigas*, negli esemplari di minore dimensione (Classe 3 e Classe 4), non sono stati rinvenuti frammenti di materiale plastico, la cui presenza è stata rilevata in organismi di almeno 3.68 ± 0.19 cm. ; nelle restanti tre classi dimensionali di *C.gigas* (Classe 1, Classe 2, Adulti) sono stati ottenuti valori simili, con una media di 0.13 ± 0.03 MP/g. Solamente in esemplari di dimensioni maggiori (adulti e Classe 2) sono state rinvenute microplastiche filamentose, così come in *Anomia ephippium* (figura 37).

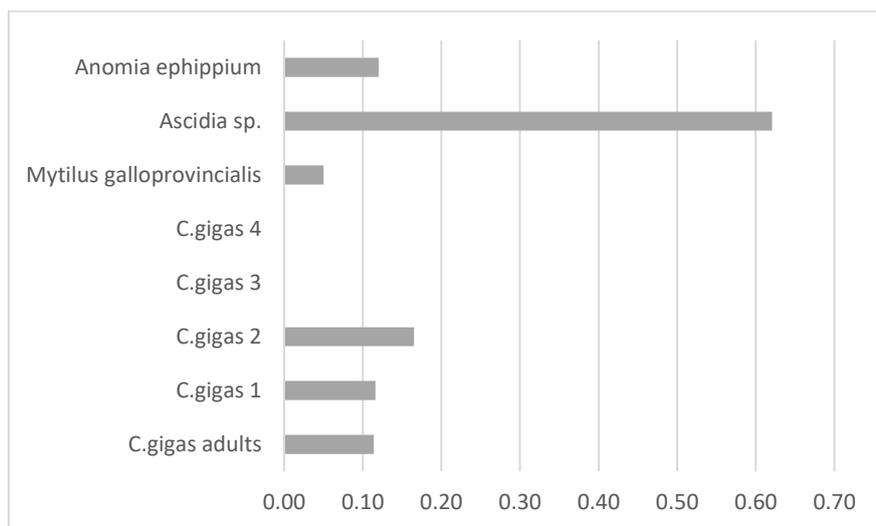


Figura 38 Contenuto di microplastiche per grammo di massa di organismo.

Tabella 10 *Crassostrea gigas* Classe I, dimensioni e contenuto in microplastiche.

Classe I	L (cm)	Media (cm)	Dev.st.	M (g)	M (g) per ostrica	MP (μ m)		
						Frammentate	Filamentose	MP/g
4,3	4,19	4,517	0,412	17,260	1,438			
4,98	4,255					94,8		0,115874117
4,46	5,36					79		
4,17	4,23							
4,22	4,79							
4,22	5,025							

Tabella 11 *Crassostrea gigas* Classe II, dimensioni e contenuto in microplastiche.

Classe II	l(cm)	Media (cm)	m _{tot} (g)	MP (μm)		
3,49	3,98	3,679±0,194	12,104	Frammentate	Filamentose	MP/g
3,74	3,88			242,4	284,4	0,165232039
3,48	3,68					
3,43	3,83					
3,41	3,853					
3,53	3,86					

Tabella 12 *Crassostrea gigas* Classe III, dimensioni e contenuto in microplastiche.

Classe III	l(cm)	Media (cm)	m _{tot} (g)	MP (μm)		
2,51	2,55	2,307±0,3	3,952	Frammentate	Filamentose	MP/g
2,06	2,81			0	0	0
2,07	2,27					
2,62	2,25					
2,21	1,88					
2,19	2,78					
2,125	2,24					
1,93	2					
2,73						

Tabella 13 *Crassostrea gigas* Classe IV, dimensioni e contenuto in microplastiche.

Classe IV	l(cm)	Media (cm)	m _{tot} (g)	MP (μm)			
1,49	1,18	1,4	1,255±0,16	1,26	Frammentate	Filamentose	MP/g
1,19	1,37	1,01			0	0	0
1,25	0,94	1,31					
1,12	1,31	1,605					
1,29	1,31	1,18					
0,95	1,29	1,26					
1,34	1,26	1,32					
1,12	1,3	1,27					
1,44	1,09	1,21					
1,1	1,19	1,54					

Tabella 14 *Crassostrea gigas* Adulti, dimensioni e contenuto in microplastiche.

Adulti	l(cm)	Media (cm)	m _{tot} (g)	MP (μm)		
	8,66	8,307±0,45	26,290	Frammentate	Filamentose	MP/g
	9,42			158	869	0,11
	7,82			0	1185	
	8,71			0	0	
	9,6					
	8,39					

Tabella 15 Altri organismi filtratori, dimensioni e contenuto in microplastiche.

		l (cm)	Media (cm)	m _{tot} (g)	Individui		MP (µm)	
Mitili	1,17	1,18	1,24±0,14	1,72	20	Frammentate (µ)	Filamentose (µ)	MP/g
	1,31	1,065				60		0,05
	1,465	1,26						
Ostriche	3,15	3	3,278±0,454	3,6	7			
	2,91	4,05				0	0	0
	3,28							
Ascidia	3,96	3,83	3,38±0,62	14,5	5			
	3,35	3,38				79	0	0,62069
	2,38			2,9		63,2		
						24,6		
						15,8		
						31,6		
						31,6		
						31,6		
						47,8		
						63,2		
Anomia	4,35	5,23	4,09±0,87	10	25			
	3,78	4,54				47,4	170,6	0,12
	4,25	2,87					141,4	
	5,47	3,65						
	2,84	3,92						

5. Attività di laboratorio

L'attività di laboratorio si riferisce allo studio delle interazioni trofiche tra *Crassostrea gigas*, organismi planctonici e particolato organico, che rappresentano la base della loro alimentazione (Berg & Newell, 1986) e ha riguardato prove di *grazing* in presenza alghe fitoplanctoniche libere ed immobilizzate in matrici naturali quali l'alginato di sodio. L'immobilizzazione di microalghe fitoplanctoniche in alginato di sodio ne aumenta il contenuto energetico, in termini di clorofilla a e contenuto proteico (Pane *et al.*, 1998), senza avere effetti negativi sullo sviluppo della coltura cellulare (Soo *et al.*, 2017).

Reperiti quindi gli organismi sul campo, è stato sviluppato un metodo di alimentazione differenziata per il loro mantenimento in laboratorio, basato sull'immobilizzazione ed il rilascio di nutrienti in una matrice organica costituita da alginato di sodio.

La sperimentazione è stata condotta su una coorte di organismi di giovanili (spat) prelevati negli impianti della Mitilicoltura Spezzina.

6.1 Alginato e applicazioni

L'alginato è un derivato dell'acido alginico, polisaccaride ramificato composto da acido β -D-mannuronico ed il suo epimero C-5 acido α -L-guluronico legati in una struttura monomerica

lineare da legami 1,4. Il copolimero naturale è una componente importante di diverse macroalghe ed è inoltre un esopolisaccaride presente in differenti ceppi batterici, tra cui *Pseudomonas aeruginosa* (Pawar and Edgar, 2012). Per quanto sia possibile estrarre copolimeri naturali di alginato da batteri, la produzione commerciale di questa sostanza è basata quasi unicamente sull'estrazione da alghe. Grazie all'abbondanza di alghe nell'ambiente acquatico è infatti presente in ambiente naturale una grande quantità di alginato, con una produzione industriale stimata intorno alle 30000 tonnellate annuali (Draget, 2009). L'alginato è principalmente estratto da alcune specie di *Phaeophyceae*, tra cui *Laminaria spp.*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* tramite un trattamento con differenti soluzioni alcaline. Per quanto concerne la biosintesi batterica, l'alginato può essere ottenuto sia da *Azotobacter* che da *Pseudomonas*. Tale processo si basa su quattro passaggi fondamentali, sintesi del substrato precursore (I), polimerizzazione e trasferimento dalla membrana citoplasmatica (II), trasferimento e modificazione nel periplasma (III) ed infine il trasporto tramite la membrana esterna (IV) (Remminghorst and Rehm, 2006). La produzione commerciale di alginati è comunque basata per la sua quasi totalità sulle specie algali, reperibili in ambiente in quantità maggiori rispetto ai microrganismi. Li

ritroviamo nella matrice intracellulare delle alghe brune sotto forma di gel contenenti sodio, calcio, magnesio, stronzio e bario, questa variabilità dipende dal continuo scambio ionico che mantiene l'equilibrio con l'acqua di mare. Il processo di estrazione da questa complessa matrice è schematizzato in figura 1.

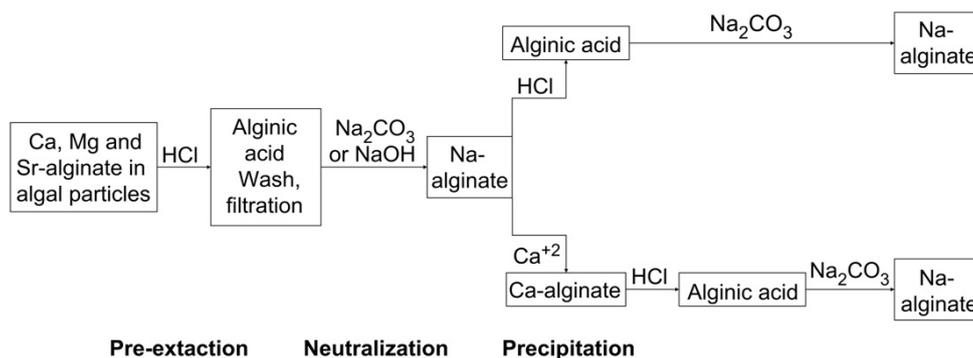


Figura 39 Schema di estrazione dell'Alginato (Pawar and Edgar, 2012)

Un primo passaggio in acido minerale (0.1/0.2 M) rimuove i controioni tramite scambio protonico. Il secondo passaggio consiste in una solubilizzazione dell'acido alginico, così ottenuto, tramite un attacco basico, seguito da una serie di separazioni meccaniche necessarie per la rimozione del particellato (flottazione, filtrazione, precipitazione e centrifugazione). L'alginato di sodio è quindi fatto precipitare direttamente con alcool, cloruro di calcio o acido, prima della finale essiccazione (Clark and Green, 1936; Smidsrod and Skjak-Braek, 1990; Rinaudo, 2008). Eventuali impurità mitogene o citotossiche che renderebbero l'alginato inutilizzabile per applicazioni biomediche

possono essere eliminate tramite elettroforesi di flusso libero (Zimmermann *et al.*, 1992). L'alginato comunemente reperibile in commercio ha un peso molecolare che varia tra i 32 ed i 400 g/mol. La viscosità delle soluzioni di alginato aumenta al diminuire del pH, a causa della protonazione dei gruppi carbossilato presenti nella struttura, che vanno a formare dei legami a idrogeno. Per quanto riguarda l'equazione di Mark-Houwink ($[\eta] = KM_v^a$), che mette in relazione viscosità intrinseca ($[\eta]$) e peso molecolare (M), i parametri dell'alginato di sodio in una soluzione 0.1 M di NaCl a 25°C sono $K=2 \cdot 10^{-3}$ e $a=0.97$. Questo fattore identifica l'alginato come un polimero semiflessibile (Rinaudo, 1992). La solubilità degli alginati in acqua dipende comunque da tre fattori:

pH del Solvente,

forza ionica del medium,

presenza di ioni gelanti nel solvente

La dissoluzione dell'alginato dipende dalla deprotonazione dei gruppi carbossilici della struttura, con il pH al di sopra di un valore critico. La presenza di cationi (Na^+ , K^+ , Mg^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) influenzano la solubilità degli alginati modificando conformazione, estensione delle catene e viscosità della sostanza. Le migliori condizioni operative per la gelazione, in termini di

stabilità, si ottengono quindi lavorando con solventi non acquosi o in cui siano assenti alte concentrazioni degli ioni menzionati. Il fatto che la stabilità del gel sia fortemente dipendente dalla presenza dei menzionati cationi, ne complica l'utilizzo in ambiente marino.

6.2 Immobilizzazione di organismi monocellulari

Una delle applicazioni degli alginati in ambito scientifico riguarda l'immobilizzazione di organismi unicellulari, come batteri e microalghe; in particolare queste ultime hanno trovato differenti applicazioni biotecnologiche, soprattutto in ambito del monitoraggio ambientale e dell'acquacoltura. Per quanto riguarda il primo, si combina principalmente la rapida risposta degli organismi fitoplanctonici esposti a contaminanti ambientali con la porosità dell'alginato stesso, che consente di valutarne la loro crescita. La maggior parte delle applicazioni degli alginati in campo è stata effettuata in acqua dolce; in mare, a causa dell'elevata presenza di specie atomiche in soluzione che ne compromettono la stabilità (Faafeng et al., 1994; Moreira dos Santos et al., 2002; Marques et al., 2011), i dati sono meno numerosi. La presenza di questi ioni causa un'instabilità meccanica dell'alginato, che combinata con la turbolenza dell'acqua va a diminuirne la durata dell'impiego (Dainty et al.,

1986; Smidsrød and Skjåk-Bræk, 1990; Dos Santos et al., 1997; Fraser and Bickerstaff, 1997 ;Moreno-Garrido, 2008); nonostante questo, sono state sviluppate tecniche di monitoraggio ambientale che prevedono l'impiego di colture algali immobilizzate in alginato (Cabrita *et al.*, 2013). L'eventuale inibizione della crescita della coltura microalgale immobilizzata è determinata dalla porosità superficiale dell'alginato, che consente uno scambio di materia bidirezionale con l'ambiente.

Per quanto riguarda l'acquacoltura, molte specie microalgali sono utilizzate in acquacoltura per differenti stadi di sviluppo degli organismi allevati, siano essi pesci, crostacei o molluschi (Lumare, 1988; Villani, 1989; Helm, 1990; Gladue and Maxey, 1994). L'incapsulazione di microalghe in matrici organiche quali l'alginato di sodio consente però di ampliare il range di somministrazione delle sostanze nutrienti contenute in questi microrganismi con la possibilità di associarli ad azioni di *drug delivery* (Joosten *et al.*, 1997). La somministrazione in matrici semi-solidi consente infatti di facilitare dosaggio, accettazione e ritenzione di sostanze e molecole di interesse ai fini dell'allevamento, migliorando gestione e salute degli organismi.

6.3 Materiali e metodi

6.3.1 Colture fitoplanctoniche

Il mantenimento e l'accrescimento di *Crassostrea gigas* in laboratorio è stato seguito somministrando come alimento vivo differenti ceppi algali opportunamente coltivati (Fig.40):

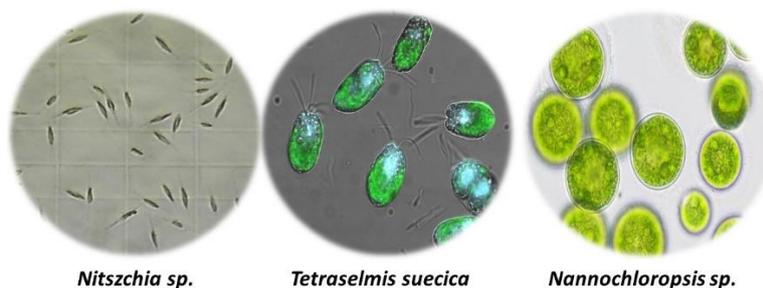


Figura 40 Organismi fitoplanctonici coltivati.

Tabella 16 Inquadramento tassonomico.

Classe	Bacillariophyceae	Prasinophyceae	Eustigmatophyceae
Ordine	Bacillariales	Chlorodendrales	Eustigmatales
Famiglia	Bacillariaceae	Chlorodendraceae	Eustigmataceae
Genere	<i>Nitzschia</i>	<i>Tetraselmis</i>	<i>Nannochloropsis</i>

Le colture (Figura 40) sono state mantenute in condizioni controllate di laboratorio in terreno di Walne (1970); le condizioni di coltura sono state mantenute costanti ($T = 23^{\circ},0 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $S = 31,0 \pm 0,5$ PSU, lux: 2000; Fig.41).

TABLE 6.11
Walne's Medium Composition

Reagents	Per Liter Seawater
Solution A	1.0 ml
Solution C	0.1 ml
Solution D (to add for diatoms)	2.0 ml
Solution A	
FeCl ₃ * 6H ₂ O	1.3 g
MnCl ₂ * 4H ₂ O	0.4 g
H ₃ BO ₃	33.6 g
Na ₂ EDTA	45.0 g
NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	20.0 g
NaNO ₃	100.0 g
Solution B	1 ml
Solution B per 100 ml	
ZnCl ₂	2.1 g
CoCl ₂ * 6H ₂ O	2.0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O	0.9 g
CuSO ₄ * 5H ₂ O	2.0 g
Concentrated HCl	10 ml
Solution C per 200 ml	
Thiamine HCl (Vitamin B ₁)	0.2 g
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	10 mg
Solution D (per liter)	
Na ₂ SiO ₃ * 5H ₂ O	40.0 g



Figura 41 Terreno e condizioni di coltura.

Di ciascuna coltura è stata valutata, come dato preliminare, la curva di crescita secondo le fasi di: *latenza*, *esponenziale*, *stazionaria* e *morte*.

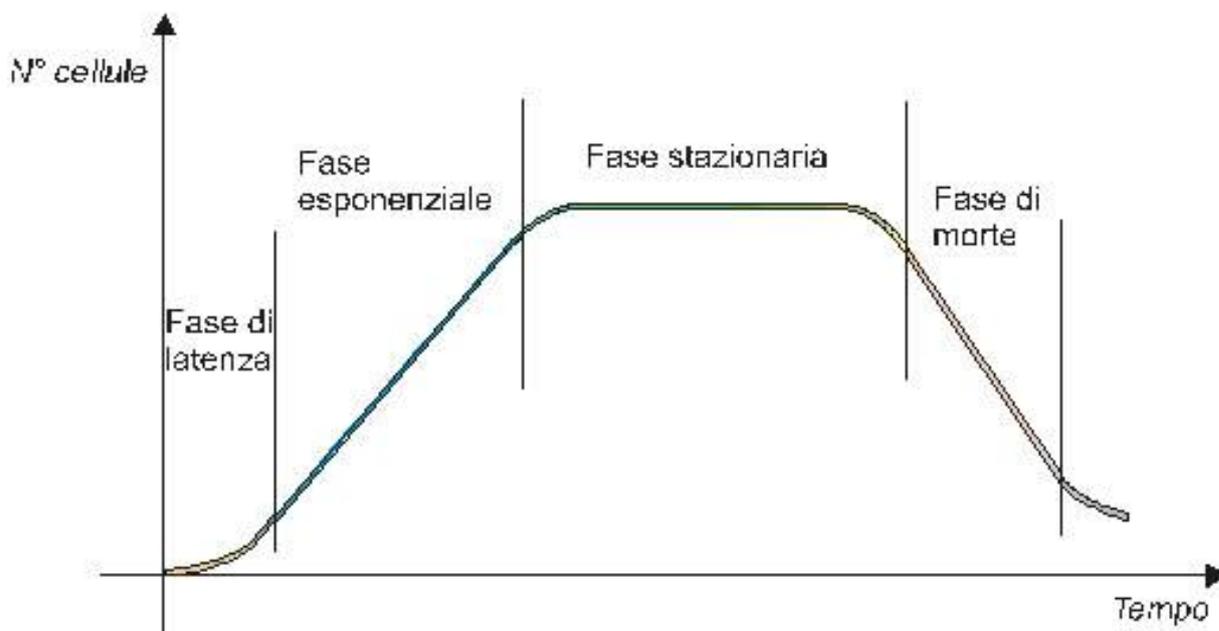


Figura 42 Curva di crescita di coltura fitoplanctonica.

Per il conteggio cellulare è stata utilizzata la camera di Thoma, si tratta di una camera contaglobuli il cui reticolo di conteggio corrisponde al quadrato centrale della camera di Neubauer, in cui la superficie di ogni quadrato è pari ad un'area di $0,0025 \text{ mm}^2$.

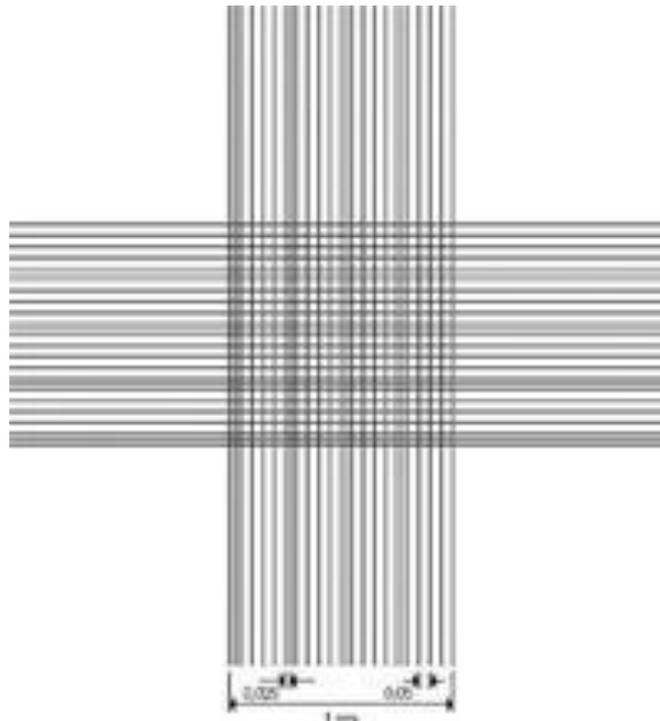


Figura 43 Reticolo di camera di Thoma.

Il calcolo della concentrazione si effettua contando il totale delle cellule comprese nel reticolo centrale e moltiplicandolo per il fattore di conversione ($\cdot 10^4$) della camera. Il risultato è espresso in cellule per millilitro (cell/ml).

6.3.2 Immobilizzazione di organismi fitoplanctonici

La concentrazione della soluzione di partenza è un fattore determinante per fluidità e stabilità del composto, nonché della porosità superficiale del gel. Quest'ultimo fattore determina il

trasporto di sali e nutrienti del terreno di coltura all'interno delle sfere, dove vengono messi a disposizione per la crescita dell'inoculo iniziale. Il procedimento, schematizzato in figura 44, parte dalla preparazione della soluzione madre di alginato; nel presente studio è stata utilizzata una concentrazione del 2%, che si ottiene sciogliendo, a caldo, 2 gr di Na-alginato ad alta densità (Sigma-Aldrich) in 100 ml di acqua distillata, da amalgamarsi fino a completa dissoluzione.

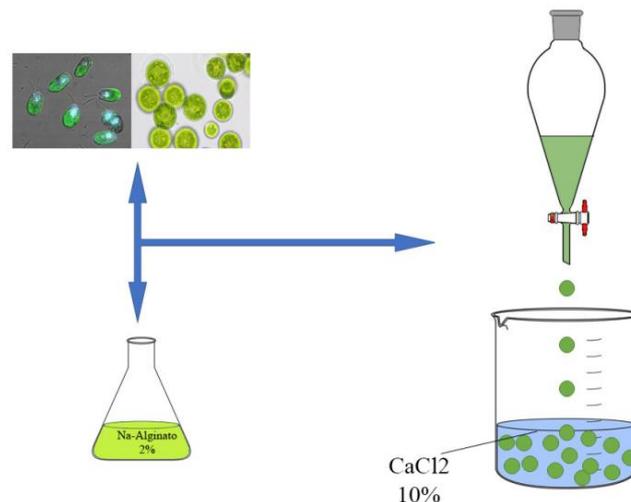


Figura 44 Metodo per produrre sfere di alginato di sodio.

La soluzione deve essere quindi sterilizzata in autoclave per eliminare eventuali microorganismi presenti e conservata in frigorifero a 4°C. La gelificazione della soluzione di alginato viene effettuata per gocciolamento in CaCl₂ al 10% mantenendo il pH di

entrambe le soluzioni attorno alla neutralità (7 ± 0.5) per evitare reazioni di riduzione del sale di acido alginico.

Tra sospensione algale e soluzione di alginato viene mantenuto un rapporto di 1:4 (v:v), per evitare un'eccessiva diluizione che ostacolerebbe la formazione delle sfere; la soluzione viene mantenuta in agitazione (15 minuti) quindi trasferita in imbuto separatore.

Si procede quindi con il gocciolamento lento in CaCl_2 in ghiaccio e le sfere così ottenute vengono rimosse, lavate con cloruro di calcio e trasferite nel terreno di coltura algale.

La curva di crescita fitoplanctonica viene seguita (ogni 48h) sciogliendo 3 sfere di alginato in una soluzione al 5% di $(\text{NaPO}_3)_6$ (esametafosfato di Sodio) e procedendo al conteggio tramite camera di Thoma.

All'interno delle sfere di alginato le alghe crescono raggiungendo la massima densità, in funzione del tempo e della specie algale considerata; raggiunta la capacità portante del sistema, si ha un rilascio graduale di cellule nel mezzo di coltura unitamente a un lento processo di disgregazione superficiale delle sfere stesse. Per valutare la possibilità di un'alimentazione congiunta con diverse specie, è stata effettuata una prova di co-immobilizzazione di differenti ceppi algali verificandone le curve di crescita.

6.3.3 Reperimento di giovanili di *Crassostrea gigas*

Gli organismi (Fig.45), allo stadio di *spat*, sono stati reperiati presso l'impianto di Mitilicoltura Spezzina nel mese di ottobre 2016, all'età di circa 6 mesi dalla semina. Gli esemplari (n = 500) sono stati trasportati in laboratorio in contenitori senza acqua refrigerati (circa 5°C). Successivamente, gli organismi sono stati selezionati per taglia omogenea, misurati ($1,25 \pm 0,27$ cm), pesati ($0,4 \pm 0,15$ g), escludendo gli organismi > 2,5cm e suddivisi in quattro gruppi di 100 individui ciascuno. Un ulteriore gruppo (n=100) è stato messo in congelatore (-20°C) per le successive analisi di laboratorio. All'arrivo in laboratorio, le componenti organica, inorganica e proteica del muscolo delle ostriche sono state analizzate, quest'ultima tramite metodo spettrofotometrico di Lowry (1951).



Figura 45 Spat mantenuto in Laboratorio.

Per il mantenimento e le prove di laboratorio è stato approntato un acquario (fig.46) da 400 litri; la filtrazione è stata effettuata tramite filtro interno meccanico biologico multifase costituito da lana di roccia, canolicchi di ceramica e carbone attivo.



Figura 46 Acquario di mantenimento.

6.3.4 Grazing

Per la valutazione del tasso di filtrazione di microalghe per unità di tempo relativo allo *spat* reperito in impianto è stato utilizzato il metodo di Frost (1972) modificato.

Sei esemplari di *C.gigas* ($1,26 \pm 0,14$ cm; $0,25 \pm 0,06$ g) sono stati suddivisi in sei contenitori di vetro da 250 ml, dei quali 3 trasparenti e 3 opachi. I contenitori sono stati posti in camera

termostata (Thermo Scientific Heraeus) alla temperatura di 25°C, con ciclo luce:buio impostato su 12:12 ed areazione artificiale continua. Le microalghe impiegate nel test sono state prelevate in fase esponenziale, come da protocollo.

Il confronto tra contenitore opaco e trasparente è necessario al fine di considerare, nel calcolo del tasso di filtrazione, l'aumento di cellule dovuto allo sviluppo della popolazione.

È stato quindi calcolato il tasso di filtrazione su *Tetraselmis suecica* ($C_i = 1 \cdot 10^5$ cell/ml) *Nannochloropsis spp.* ($C_i = 1 \cdot 10^6$ cell/ml) allestendo due contenitori con le sole microalghe (trasparente e opaco), utilizzati come bianco; il tasso di filtrazione è stato misurato a 24 e 48h, utilizzando la seguente formula:

$$Gr = \frac{C_t - C_0}{N * t}$$

Ove C_t = concentrazione di microalghe al tempo t;

C_0 = concentrazione di microalghe al tempo 0;

N = numero di organismi;

t = tempo espresso in ore.

Il risultato è quindi espresso in (cell/ml)*ostriche⁻¹*h⁻¹.

6.3.5 Quantificazione delle proteine totali

Il contenuto proteico dei diversi stadi di accrescimento dello spat, è stato effettuato applicando il metodo di Lowry, che combina la reazione di ossidazione dei residui aromatici peptidici con gli ioni rame Cu^+ in condizioni alcaline; la reazione si basa sull'impiego del reagente di Folin-Ciocalteu (miscela di acido fosfotungstidico e acido fosfomolibdico) che produce una colorazione blu-celeste in funzione della concentrazione delle proteine presenti nel campione.

Il metodo prevede la costruzione di una curva di taratura, per la quale sono state utilizzate concentrazioni scalari di albumina bovina (Sigma-Aldrich).

La costruzione della curva di taratura prevede la produzione di 5 soluzioni:

- Sol. A: Na_2CO_3 (0,2%) in NaOH 0,1N;
- Sol. B: Tartrato di Na e K al 2%;
- Sol. C: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ all'1%;
- Sol. D: 100ml A + 1ml B + 1ml C;
- Sol. E: reagente di Folin-Ciocalteu 1:1 in H_2O distillata.

Tabella 17 Standard per la costruzione della curva.

(ml)	B	S1	S2	S3	S4	S5
Standard ml		0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
H ₂ O dist. ml	1	0.98	0.96	0.94	0.92	0.9
Sol.D ml	5	5	5	5	5	5
Sol.E ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

- I campioni vengono portati ad 1 ml con acqua distillata, si aggiunge la soluzione D e si agita;
- si attendono quindi 15 minuti e si unisce la soluzione E;
- dopo 40 minuti/1.5 ore (tempo uguale in tutti i saggi) si misura l'assorbanza a 670 nm.
- Ottenuta la curva di taratura (Fig....) e la relativa retta di regressione, si procede quindi al dosaggio dei campioni.

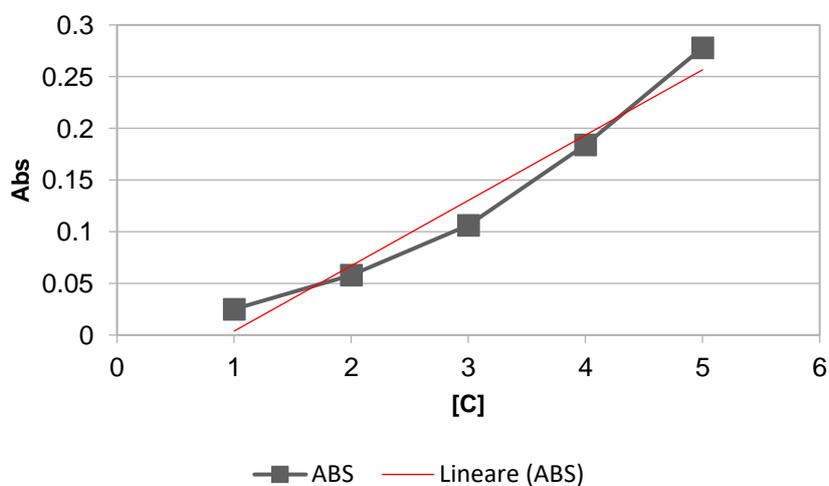


Figura 47 Curva di taratura per il metodo di Lowry.

Dalla curva di taratura è stata ottenuta la seguente equazione:

$$**y = 0,0632x - 0,0594**$$

Successivamente utilizzata per la valutazione dei contenuto proteico dei campioni ambientali ($R^2=0,96$).

6.4 Risultati

Qui di seguito vengono riportati i risultati relativi alle prove di immobilizzazione delle tre specie algali considerate nel presente studio.

6.4.1 *Tetraselmis suecica*

T.suecica, libera nel mezzo (Fig.48), raggiunge il plateau ($12 \pm 0,2 \cdot 10^5$ cell/ml) al quinto giorno di coltura; dopo successive 24 ore si ha il declino della densità algale fino alla senescenza. Relativamente a *Tetraselmis suecica* immobilizzata, si nota un incremento progressivo nel tempo della sua densità, sino fino ad un valore di circa $18 \cdot 10^5$ cell/ml, seguito dalla lenta disgregazione delle sfere dopo il 10 °giorno (Fig.48).

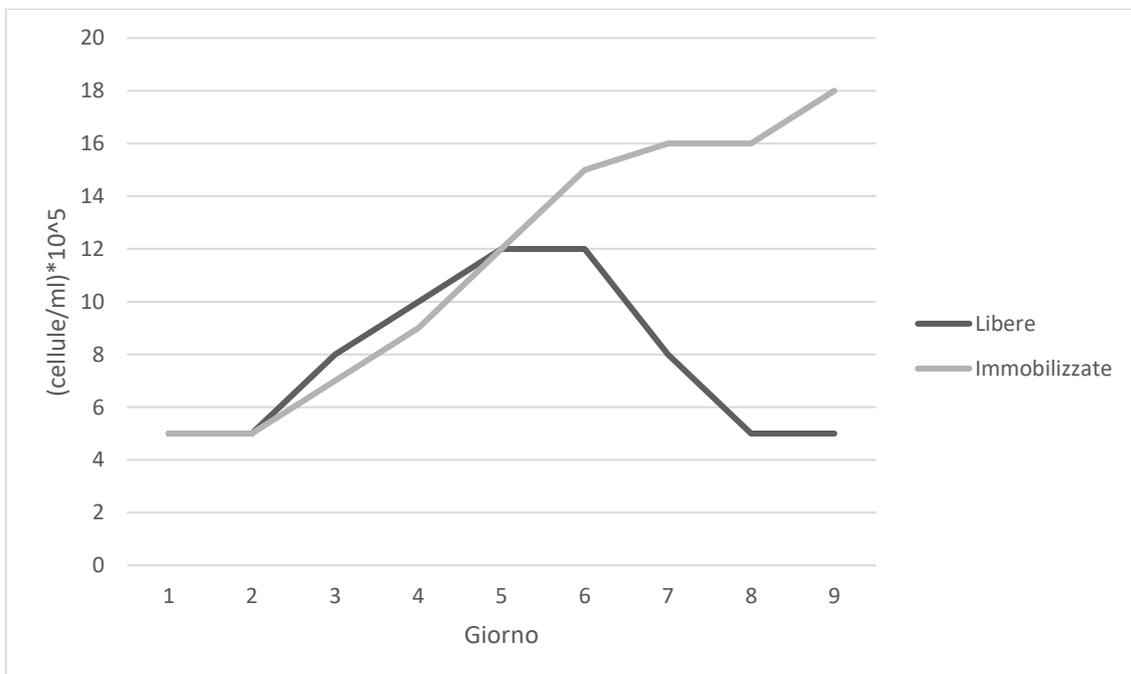


Figura 48 Curva di crescita di *Tetraselmis suecica*.

Tabella 18 Dati accrescimento *Tetraselmis suecica*.

	1	3	5	7	10	13	15	17	18
Libere [*10 ⁵ cell/ml]	5	5	8	10	12	12	8	5	5
Immobilizzate [*10 ⁵ cell/ml]	5	5	7	9	12	15	16	16	18

6.4.2 *Nannochloropsis spp.*

Dai dati ottenuti con l'immobilizzazione di *Nannochloropsis spp.* si è potuto notare un incremento in termini di cellule/ml del 100%, con un valore al plateau di $6 \pm 0,3 \cdot 10^6$ cell/ml in coltura, rispetto alle $3 \pm 0,5 \cdot 10^6$ cell/ml in coltura libera.

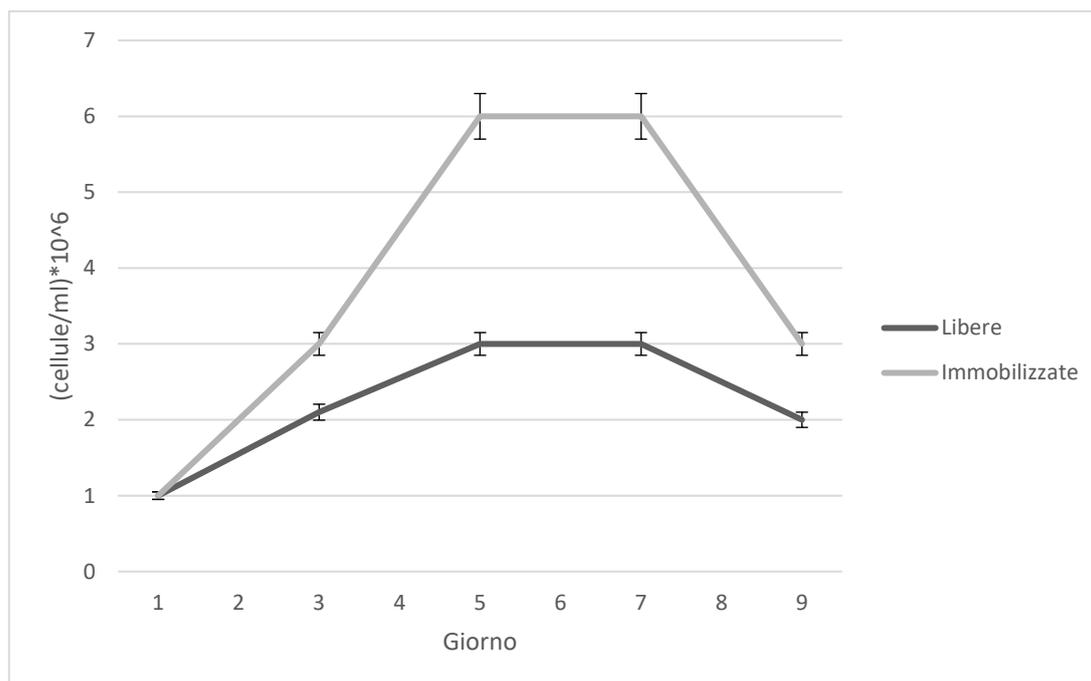


Figura 49 Curva di crescita di *Nannochloropsis spp.*

Tabella 19 Dati di accrescimento *Nannochloropsis spp.*

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Libere [*10 ⁶ cell/ml]	1	1	2,1±0,2	2,1±0,2	3±0,5	3±0,5	3±0,3	3±0,3	2±0,1
Immobilizzate [*10 ⁶ cell/ml]	1	1	3±0,5	3±0,5	6±0,3	6±0,3	6±0,5	6±0,5	3±0,3

6.4.3 *Nitzschia spp.*

Con l'immobilizzazione di *Nitzschia spp.* i valori di densità al plateau hanno raggiunto un valore di $8 \pm 0,2 * 10^6$ cell/ml in coltura, rispetto alle $7,6 \pm 0,5 * 10^6$ cell/ml in coltura libera.

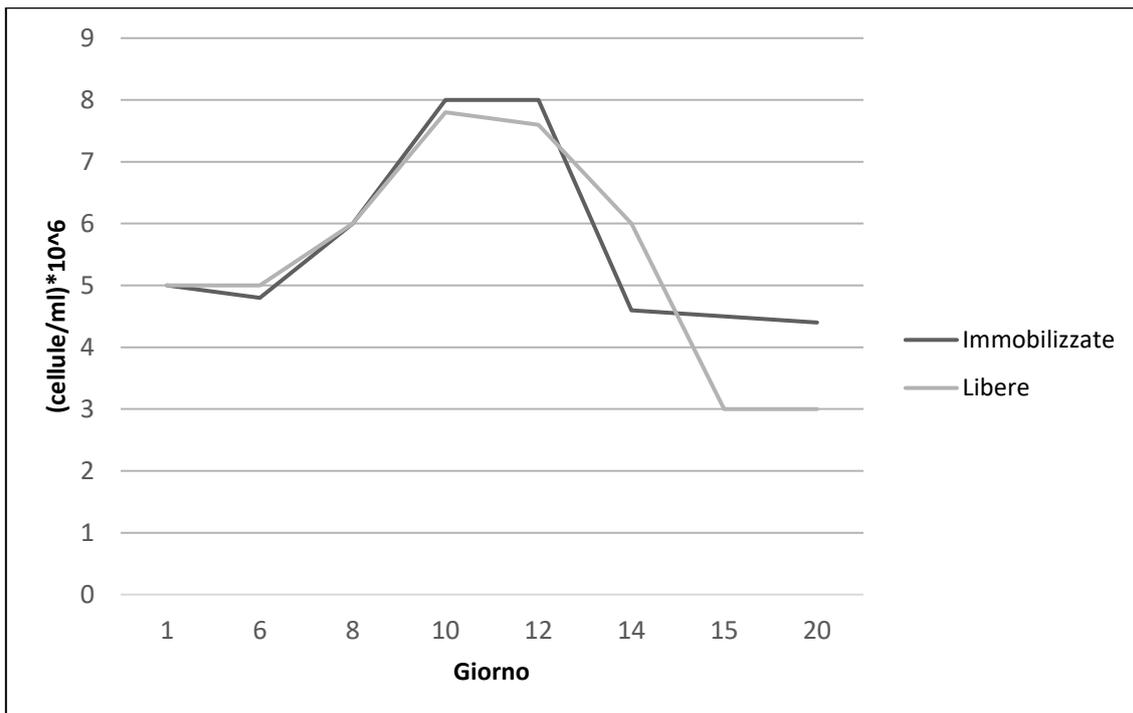


Figura 50 Curva di crescita di *Nitzschia spp.*

Tabella 20 Dati di accrescimento di *Nitzschia spp.*

	1	6	8	10	12	14	15	20
Libere [*10 ⁶ cell/ml]	5	5	6	7,8	7,6	6	3	3
Immobilizzate [*10 ⁶ cell/ml]	5	4,8	6	8	8	4,6	4,5	4,4

Le prove di co-immobilizzazione di differenti ceppi di alghe fitoplanctoniche hanno fornito risultati indicanti uno sviluppo regolare di *Nannochloropsis spp.*, che raggiunge una densità al plateau di $6,5 \pm 0,3$ cell/ml al terzo giorno con un successivo

decremento e senescenza finale all'ottavo giorno; al contrario, la densità di *Tetraselmis suecica*, resta costantemente intorno ai valori dell'inoculo ($1 \cdot 10^5$ cell/ml) durante tutto il periodo considerato.

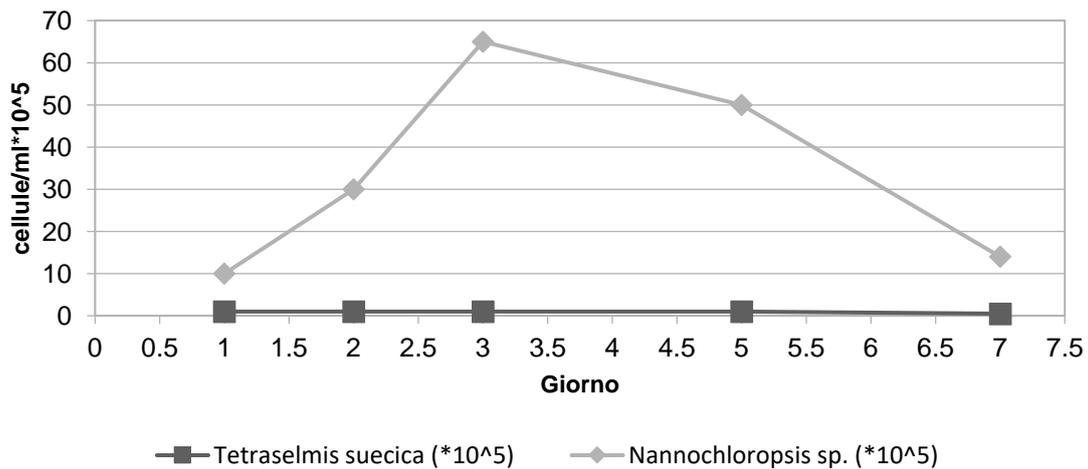


Figura 51 Risultati di co-immobilizzazione di organismi fitoplanctonici.

Tabella 21 Dati di co-immobilizzazione.

	1	2	3	5	7
<i>Tetraselmis suecica</i> [*10 ⁵ cell/ml]	1	1	1	1	0,5
<i>Nannochloropsis sp.</i> [*10 ⁵ cell/ml]	10	30	65	50	14

6.4.4 Grazing

Per quanto riguarda il tasso di grazing, dai risultati ottenuti si può evidenziare che, alle condizioni di temperatura (25°C) e salinità (31 PSU), un'ingestione di cellule di *Nannochloropsis spp.* $1,2 \cdot 10^6$ cell*Ind⁻¹*h⁻¹, per un contenuto proteico totale di circa 2,52 µg Ind⁻¹*h⁻¹. Alle medesime condizioni, *Tetraselmis suecica* è ingerita

per un valore di $1,3 \cdot 10^5 \text{ cell} \cdot \text{Ind}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, per un contenuto proteico totale di $6,7 \mu\text{g} \cdot \text{Ind}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Per la diatomea *Nitzschia spp.* il tasso di filtrazione non è stato valutato in quanto questo organismo è stato impiegato soltanto nel modello sperimentale relativo a seston e microplastiche e non durante l'alimentazione.

6.4.5 Valutazione del contenuto proteico

La valutazione del contenuto proteico è stata effettuata su tre classi dimensionali di *spat* (Tab.22; C1, C2, C3) comprese nel range tra $4.51 \pm 0.41 \text{ cm}$ e $2.31 \pm 0.30 \text{ cm}$ e di massa compresa tra $1.40 \pm 0.4 \text{ g}$ e $0.23 \pm 0.4 \text{ g}$; il dosaggio è stato effettuato omogenando l'intero organismo ad esclusione della conchiglia.

Tabella 22 Dati dimensionali di esemplari di *C.gigas* analizzati.

<i>Classi dimensionali</i>	Lunghezza (cm)	Massa (g)
C1	4.51 ± 0.41	1.40 ± 0.4
C2	3.68 ± 0.19	0.86 ± 0.2
C3	2.31 ± 0.30	0.23 ± 0.4

Dai risultati delle analisi (Tab.23) si può notare una riduzione percentuale del contenuto proteico degli organismi analizzati in relazione all'aumento di taglia; il valore di proteine percentualmente più rilevante (23.84%) si è ottenuto per la classe dimensionale minore (C1), il valore più basso (6.01%) è stato

rilevato nella classe dimensionale maggiore (C3), come illustrato in figura 52.

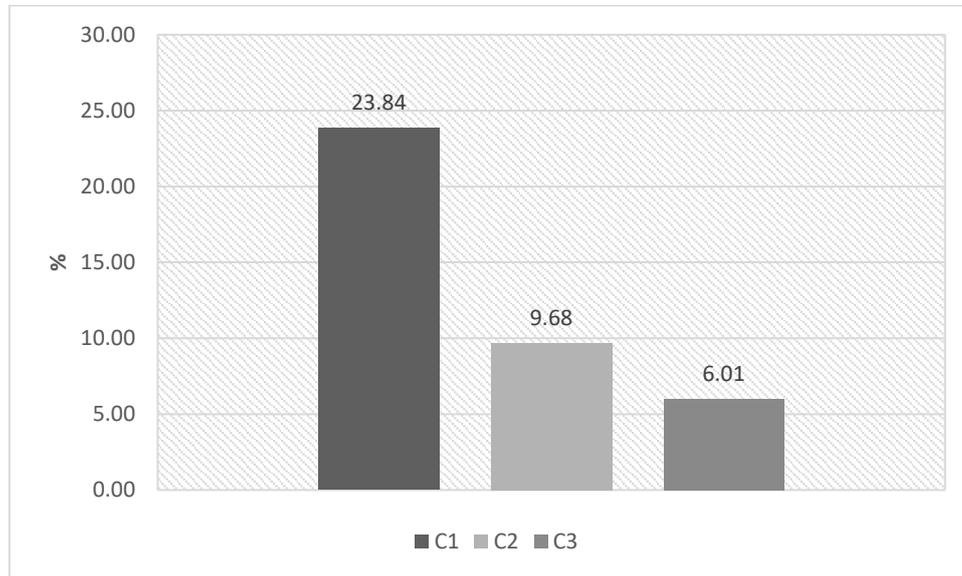


Figura 52 Percentuale di contenuto proteico nei campioni.

Tabella 23 Risultati dosaggio proteico su *Crassostrea gigas*.

	ABS			Media	Proteine (mg/ml)	massa iniziale (g)	g/ml	mg/ml	%
1	0,87	0,656	0,616	0,714	12,24	0,154	0,051	51,33	23,84
2	1,721	1,377	1,699	1,599	26,24	0,81356	0,271	271,19	9,68
3	1,886	1,444	1,377	1,569	25,77	1,28704	0,429	429,01	6,01

6.5 Prove di mantenimento

La differenziazione dei regimi alimentari è stata effettuata inserendo due gruppi di 100 ostriche ciascuno in due cilindri di materiale plastico sospesi nella vasca di mantenimento; i cilindri sono divisi in due sezioni separate da una griglia di materiale plastico che permette il flusso d'acqua.



Figura 53 Contenitore per spat di *Crassostrea gigas*.

Il primo gruppo (G1) è stato alimentato con alghe libere, mentre il secondo (G2) con alghe immobilizzate in alginato di sodio. Ad entrambe le condizioni è stata fornita illuminazione artificiale (2000 lux, luce:buio 12:12).

6.5.1 Alghe libere

L'alimentazione ad alghe libere è stata effettuata inserendo un quantitativo predeterminato, sulla base dei risultati del grazing, equivalente a circa $15 \cdot 10^6$ cell*Ind⁻¹*day⁻¹ di *Nannochloropsis spp.* e *Tetraselmis suecica* corrispondenti ad un apporto proteico di $110 \mu\text{g} \cdot \text{Ind}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$. L'alimentazione veniva effettuata a valle dell'apparato di filtrazione della vasca di mantenimento; in questo modo, il ricircolo dell'acqua causa un effetto di diluizione che consente un arrivo graduale di alimento al cilindro contenente le

ostriche. L'acqua in uscita dal cilindro, viene successivamente condotta nell'apparato filtrante, dove il materiale appositamente compattato impedisce il ricircolo di eventuali microalghe ancora in sospensione. La portata della pompa veniva appositamente rallentata durante l'alimentazione, per aumentare il tempo di contatto tra microalghe ed esemplari di *Crassostrea gigas*.

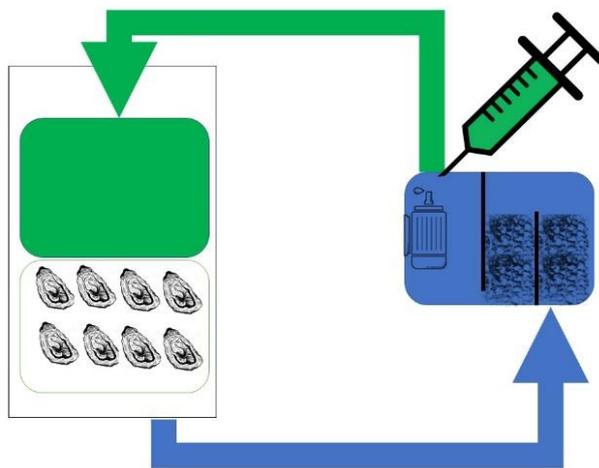


Figura 54 Schema di mantenimento con alghe libere.

6.5.2 Alghe immobilizzate

Per quanto riguarda le alghe immobilizzate, è stato approntato un circuito parallelo, nel quale sfere di alginato ($\varnothing = 0.5\text{cm}$) sono state utilizzate come serbatoio di alghe per l'alimentazione. Il sistema applicato sfrutta il rilascio progressivo di cellule microalgali causato dal raggiungimento delle capacità portante delle sfere, determinato dal valore di plateau della curva di crescita. Nelle sfere sono state co-immobilizzate *Nannochloropsis spp.* e *Tetraselmis suecica*.

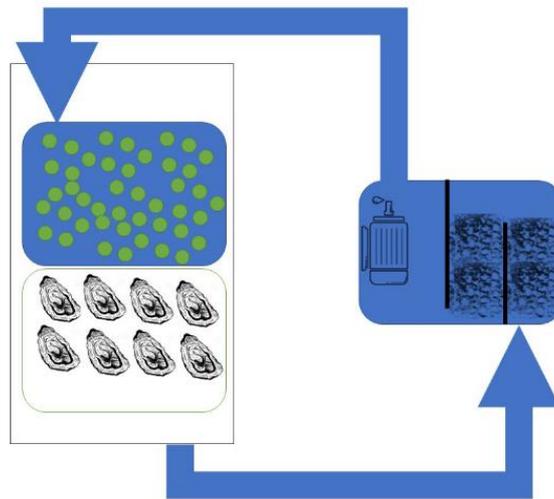


Figura 55 Schema di mantenimento con alghe immobilizzate.

Per il quantitativo necessario di microalghe sono stati preparati 70 ml di alginato ogni 4 giorni equivalenti, una volta raggiunta la fase di plateau, a $12 \cdot 10^6 \text{ cell} \cdot \text{Ind}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$; nel conto del contenuto proteico totale va considerato l'aumento derivante dall'immobilizzazione, quantificato in $119 \mu\text{g} \cdot \text{Ind}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$.

6.6 Risultati

Sono di seguito riportati i risultati (Tabella 24) della biometria effettuata con cadenza mensile su *spat* di *Crassostrea gigas* mantenuto in laboratorio alle condizioni sperimentali precedentemente descritte.

Tabella 24 Risultati delle biometrie di spat di *Crassostrea gigas* espressi in valori medi e Deviazione Standard.

Biometria di spat *Crassostrea gigas*

Parametro Data	Immobilizzate (G1)					Libere (G2)				
	L (cm)	S.D.	M (g)	S.D.	Mortalità %	L (cm)	S.D.	M (g)	S.D.	Mortalità %
22/07/2015	1,27	0,27	0,40	0,15	0,00	1,21	0,19	0,30	0,17	0,00
18/08/2015	1,61	0,27	0,38	0,18	0,00	1,38	0,20	0,33	0,11	0,00
31/08/15	1,53	0,23	0,40	0,15	2,00	1,40	0,20	0,37	0,15	3,00
08/09/15	1,42	0,19	0,39	0,13	3,00	1,40	0,24	0,35	0,15	6,00
01/10/15	1,47	0,16	0,42	0,13	6,00	1,36	0,26	0,35	0,15	11,00

Per il gruppo di organismi mantenuto con alghe immobilizzate in alginato di sodio si ha avuto un incremento della lunghezza della conchiglia (+ 15.7%) e della massa totale (+ 5.0%), come riportato in Figura 56; le dimensioni degli organismi correlano positivamente con l'aumento della massa degli stessi

Analogamente, con il metodo di alimentazione che ha previsto la somministrazione di alghe libere, le dimensioni delle ostriche sono risultate correlate con la loro massa (Fig.57); tuttavia si è rilevato un minore incremento della lunghezza della conchiglia (+12.4%) e un maggior incremento della massa dell'organismo (+16.7%).

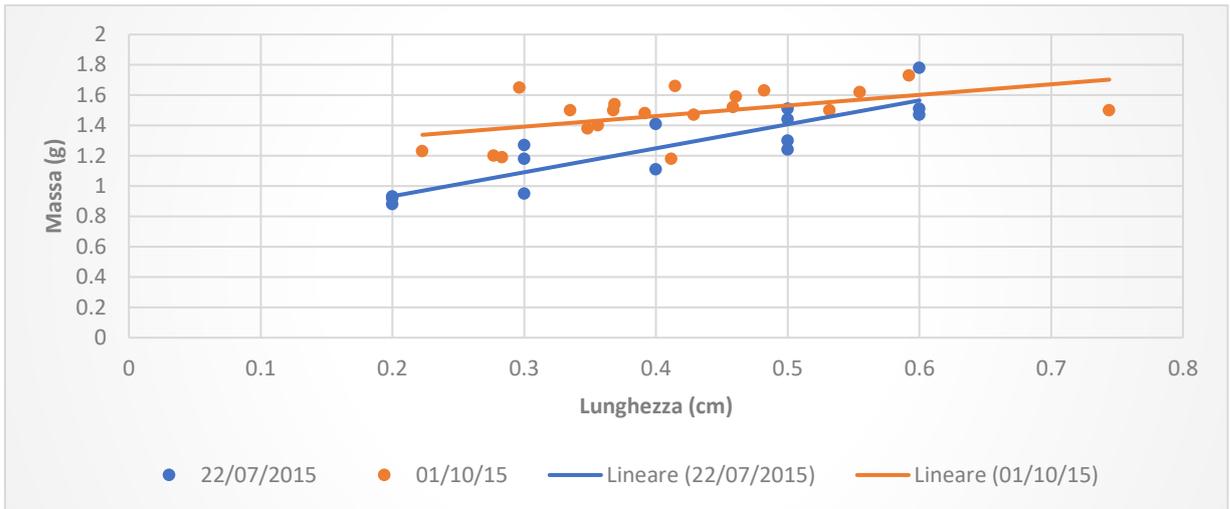


Figura 56 Risultati accrescimento di esemplari di *Crassostrea gigas* nutriti con alghe immobilizzate.

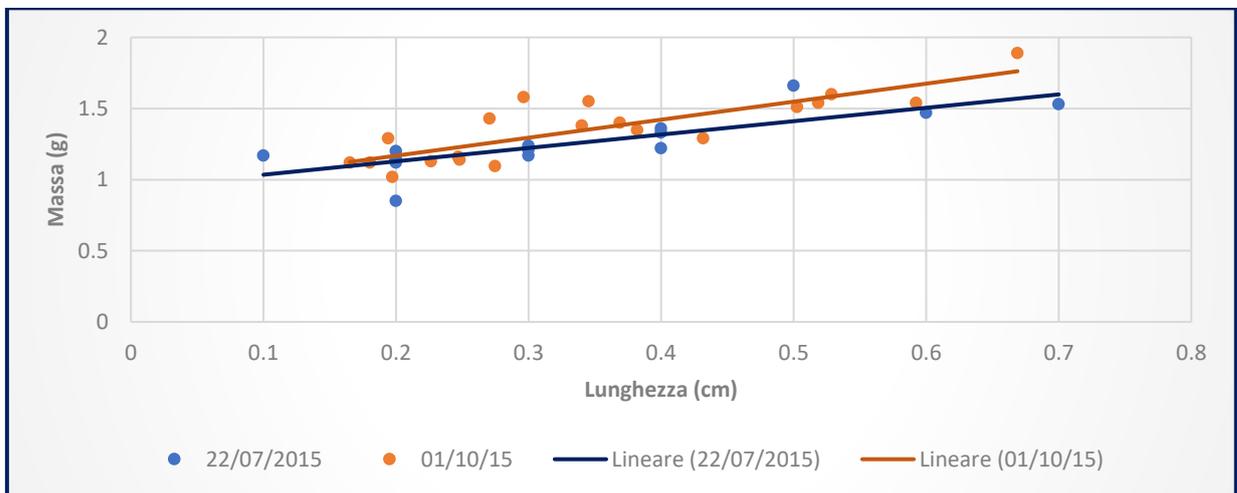


Figura 57 Risultati accrescimento di esemplari di *Crassostrea gigas* nutriti con alghe libere.

Dal confronto dell'andamento dell'incremento di crescita rispetto al tempo, si è potuto notare che le alghe libere sono in grado di garantire una crescita progressiva sino al terzo mese e un successivo decremento della massa; per le ostriche mantenute con microalghe immobilizzate in alginato sono stati ottenuti valori relativamente più uniformi nel tempo con un lieve incremento della massa con il passare del tempo.

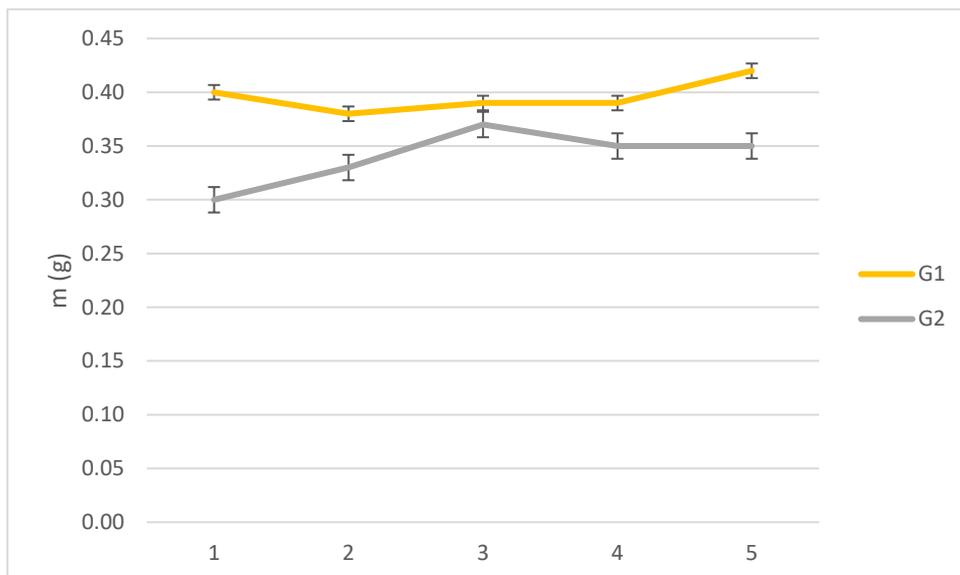


Figura 58 Variazione di massa (g) degli organismi alimentati con i due differenti regimi.

Per quanto riguarda la mortalità complessiva dei due gruppi durante di organismi è risultato evidente una maggiore sopravvivenza delle ostriche mantenute con le alghe immobilizzate. In particolare, al quinto mese di mantenimento in allevamento, la mortalità è risultata pari a 5% e a 11%, per le ostriche mantenute con le alghe in alginato e libere rispettivamente (Fig.59).

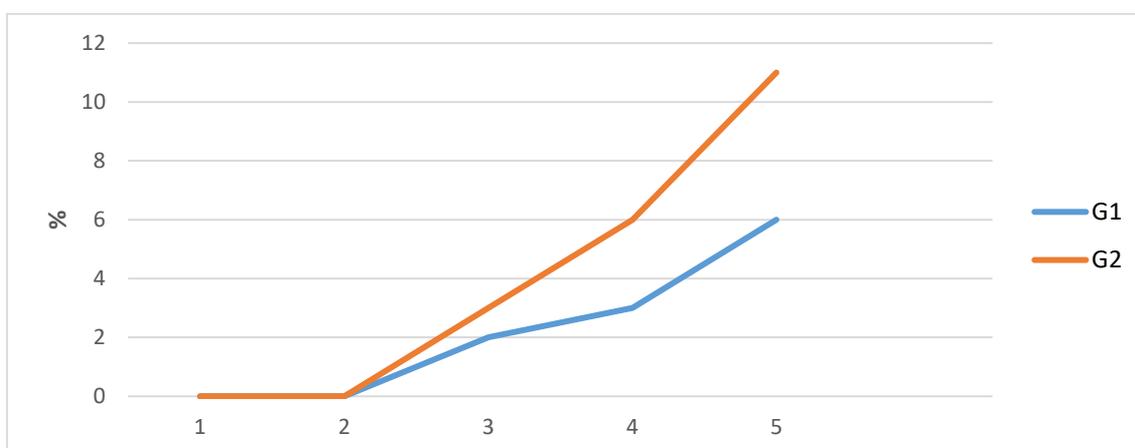


Figura 59 Percentuale di mortalità ai diversi regimi alimentari.

Tabella 25 Dati biometrie 22/07/2016.

G1			G2	
m (g)	L (cm)		m (g)	L (cm)
0,4	1,11		0,1	1,17
0,5	1,51		0,5	1,66
0,5	1,44		0,3	1,17
0,3	1,18		0,3	1,21
0,4	1,41		0,3	1,24
0,5	1,24		0,4	1,33
0,3	1,27		0,2	1,2
0,6	1,47		0,4	1,22
0,6	1,78		0,2	0,85
0,6	1,51		0,2	1,12
0,2	0,92		0,2	1,14
0,2	0,93		0,6	1,47
0,5	1,3		0,2	1,14
0,3	0,95		0,4	1,36
0,2	0,88		0,7	1,53
0,4	1,27	Media	0,3	1,21
0,15	0,27	Dev.std	0,17	0,19

Tabella 26 Dati biometrie 18/08/2016

G1			G2	
m (g)	l(cm)		m (g)	l(cm)
0,79085	1,64		0,50346	1,57
0,39418	1,675		0,29352	1,7
0,566	1,7		0,20597	1,05
0,40514	1,7		0,35265	1,65
0,13176	0,93		0,53119	1,56
0,59118	1,8		0,41069	1,32
0,36862	1,58		0,22897	1,17
0,32285	1,42		0,26438	1,2
0,14401	1,04		0,38786	1,35
0,29377	1,32		0,30657	1,4
0,4	1,61	Media	0,3	1,38
0,18	0,27	Dev.std	0,11	0,20

Tabella 27 Dati biometrie 31/08/2016

G1			G2	
m (g)	l(cm)		m(g)	l(cm)
0,55583	1,77		0,67728	1,93
0,19214	1,24		0,29347	1,67
0,27672	1,2		0,64307	1,55
0,58422	1,87		0,40736	1,52
0,44289	1,61		0,37546	1,37
0,36706	1,27		0,24635	1,33
0,36629	1,53		0,21674	1,17
0,40589	1,79		0,25363	1,19
0,22391	1,14		0,33993	1,45
0,48539	1,74		0,49837	1,5
0,31532	1,42		0,16867	1,17
0,29377	1,66		0,25884	1,2
0,77877	1,7		0,45053	1,4
0,33019	1,47		0,25556	1,32
0,35884	1,53		0,402	1,33
0,398482	1,53	Media	0,3658	1,407
0,15	0,23	Dev.std	0,15	0,21

Tabella 28 Dati biometrie 01/10/2016

G1			G2	
m(g)	l(cm)		m (g)	l(cm)
0,74404	1,5		0,66887	1,89
0,41459	1,66		0,59256	1,54
0,36867	1,54		0,51878	1,54
0,55466	1,62		0,38204	1,35
0,4585	1,52		0,50257	1,51
0,59207	1,73		0,2471	1,16
0,277	1,2		0,2963	1,58
0,41161	1,18		0,34033	1,38
0,28328	1,19		0,52855	1,6
0,22277	1,23		0,22648	1,13
0,29654	1,65		0,27073	1,43
0,36768	1,5		0,36904	1,4
0,3917	1,48		0,19736	1,02
0,42873	1,47		0,24805	1,14
0,34816	1,38		0,43188	1,29
0,33508	1,5		0,18024	1,12
0,46076	1,59		0,16521	1,12

0,35608	1,4		0,19418	1,29
0,48216	1,63		0,27472	1,095
0,53172	1,5		0,34536	1,55
0,41629	1,4735	Media	0,3490175	1,35675
0,1231	0,1647	Dev.std	0,14760643	0,2258567

6. Particellato organico e microplastiche

Come già accennato, nel processo di trasferimento delle microplastiche lungo la colonna d'acqua un ruolo importante è svolto dagli organismi mesozooplanctonici.

In particolare, è stato dimostrato che il materiale plastico venga inglobato ed espulso dagli organismi attraverso i faecal pellets del copepode calanoide *Centropages typicus*, per i quali viene alterato il *sinking rate* (Cole *et al.*, 2016) a seguito di una modificazione della densità.

La maggior parte degli studi sulle microplastiche, pertanto, riguardano i primi strati della colonna d'acqua (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012) ove queste particelle libere vengono ingerite più frequentemente nei processi di filtrazione e/o predazione.

I faecal pellets sono una frazione della componente organica del seston che, unitamente a diversi aggregati organici di origine planctonica, rappresentano uno dei principali motori biologici dell'affondamento del materiale plastico (Long *et al.*, 2015).

Molti filtratori, durante la loro alimentazione, includono il particellato organico (POM) del seston contribuendo alla sua rimozione dall'ambiente e alla sua biotrasformazione (Shpigel and Blaylock, 1991; Shpigel *et al.*, 1997 Dame, 1993; 1996).

I lamellibranchi, in particolare, occupano un ruolo fondamentale all'interno degli ecosistemi marini e, attraverso l'alimentazione, influiscono sulle dinamiche del comparto planctonico (Kautsky & Evans, 1987; Prins *et al.*, 1991; Strayer *et al.*, 1999). Tali effetti sono magnificati in presenza delle alte densità di organismi raggiunte negli impianti di allevamento (Dinet *et al.*, 1990; Dame, 1993; Ruesink *et al.*, 2005; Giles and Pilditch, 2006). Diversi studi hanno dimostrato come le fluttuazioni del carico di seston inducano risposte fisiologiche negli organismi sospensivori, come variazioni dei tassi di clearance e dei volumi di ingestione (Foster-Smith, 1975; Bricelj *et al.*, 1984; Bayne, 1993; Barillè *et al.*, 1997; Bacon *et al.*, 1998; Velasco and Navarro, 2002), nonché aggiustando il livello di selezione delle particelle durante l'ingestione stessa (Foster-Smith-1975; Kiorboe and Mohlenberg, 1981; Newell and Jordan, 1983; Prins *et al.*, 1991; Navarro and Widdows, 1997; Urrutia *et al.*, 1996).

È stata dimostrata, in mesocosmo (Pietros and Rice, 2002), la capacità di incidere su struttura e composizione del popolamento fitoplanctonico riducendone la diversità sino all'induzione di una relativa dominanza monospecifica; questo fatto depone a favore dell'ipotesi relativa a una elevata selettività dei meccanismi di selezione di pre-ingestione di *Crassostrea gigas*. In questo

processo hanno un ruolo determinante le fluttuazioni dei parametri ambientali ed in particolare del carico organico totale, unitamente alle dimensioni e alle caratteristiche del materiale particolato presente (Bayne, 1993; Asmus and Asmus, 1993; Navarro and Iglesias, 1993; Newell and Shumway, 1993; Barillè and Pro, 1993).

L'inglobamento di microplastiche in matrici organiche aumenta quindi l'attrattività di tali particelle verso *Crassostrea gigas*, inducendo un possibile aumento del rischio di ingestione di materiale plastico da parte di tale specie.

Allo scopo di approfondire le conoscenze su tale meccanismo, è stato quindi messo a punto un protocollo sperimentale in cui si è cercato di riprodurre, su scala semplificata, il particolato organico di idonee dimensioni; in particolare, considerato che le ostriche ingeriscono in modo efficiente le particelle di alginato di sodio, sono state preparate microsfeere di tale materiale, all'interno delle quali sono state immobilizzate microalghe e microplastiche fluorescenti.

La dinamica di produzione di "faecal pellets", contenenti microplastiche fluorescenti, è stata studiata impiegando un modello "in vivo" rappresentato dal copepode arpacticoide *Tigriopus fulvus* (Fischer, 1860).

Tigriopus fulvus è un organismo ampiamente utilizzato in diversi ambiti ed in particolare in quello ecotossicologico per la valutazione della tossicità di differenti matrici e contaminanti ambientali (Faraponova *et al.*, 2005; Pane *et al.*, 2006, 2007, 2008a, 2008b, Pane *et al.* 2012, Pane *et al.* 2015).

7.1 Materiali e metodi

7.1.1 Microsfere di Na-alginato

Il metodo di produzione delle microsfere di Na-Alginato sfrutta la lipofobicità di quest'ultimo per consentire l'intrappolamento di piccole particelle (Espinosa Pales *et al.*, 2007). Nel caso specifico, per simulare il particolato organico di interesse per *C.gigas*, sono state incapsulate microalghe fitoplanctoniche e microplastiche.

La metodologia è la seguente:

a 5 ml di una soluzione al 2% (w:v) di alginato di sodio (preventivamente sterilizzato in autoclave a 120°C) in acqua distillata, sono state aggiunte aliquote di colture di microalghe fitoplanctoniche (*Tetraselmis suecica*, *Nitzschia spp.*) opportunamente coltivate e alla densità iniziale di $1 \cdot 10^5$ cell/ml.

Successivamente, sono state aggiunte 1µl (10% w:v), di una soluzione in acqua distillata) di microplastiche, di polietilene

(Spherotech, Lake Forest, Illinois, USA, fluorescent (eccitazione: 520 nm, λ emissione: 560 nm).

Tutte le operazioni sono state condotte sotto cappa a flusso laminare (Jupiter BioAir) al fine di evitare possibili contaminazioni ambientali.

La formazione delle microsfere è stata ottenuta per gocciolamento di 5 ml della soluzione di alginato, tramite siringa ipodermica, in 25 ml di olio di oliva mantenendo il tutto in agitazione (500 rpm) per 15 minuti. Ottenuta l'emulsione, si è proceduto alla gelificazione delle microsfere di alginato, aggiungendo 50ml di CaCl_2 0,3 M tramite lento gocciolamento con siringa ipodermica. Questa fase rappresenta un punto critico del procedimento al fine di evitare la formazione di grossi agglomerati di alginato durante la gelificazione.

Dopo ulteriore agitazione (15 min) le microsfere di alginato così prodotte si rinviengono nella fase acquosa della soluzione bifasica di olio di oliva e CaCl_2 ; sono state quindi raccolte, tramite pipetta Pasteur sterile, in aliquote da 10 ml ciascuna e poste in provetta da centrifuga da 15 ml procedendo al loro lavaggio in 10 ml di CaCl_2 0,3M tramite centrifugazione (2000 rpm per 10 minuti) e filtrate su retino da mesozooplankton (maglie da 200 μm) al fine di ottenere la classe dimensionale corrispondente a quella del

seston (0.45-200 μm). Si è quindi proceduto alla misura del diametro delle particelle tramite stereomicroscopio adeguatamente equipaggiato.

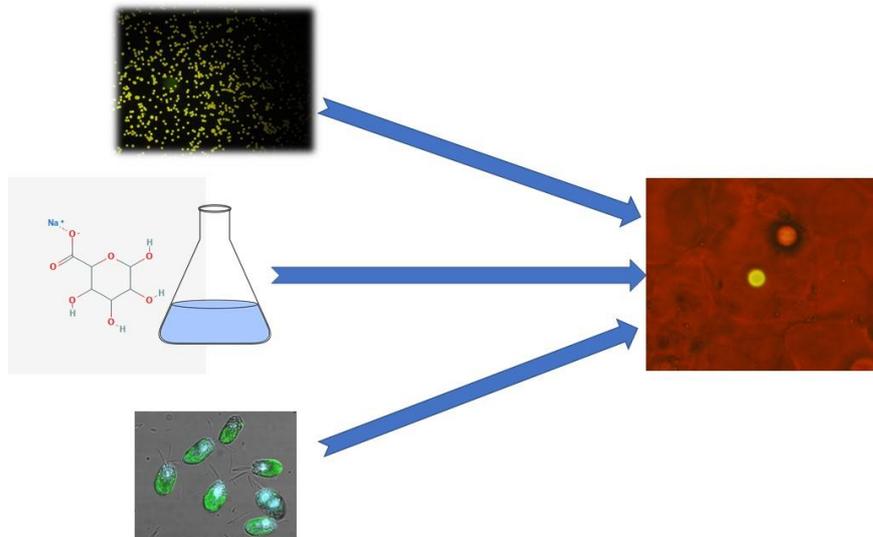


Figura 60 Schema di produzione di microsfele di Alginato di Sodio.

7.2 Esposizione

7.2.1 Tigriopus fulvus

Gli esemplari di *Tigriopus fulvus* sono stati raccolti nelle pozze di scogliera di Genova Nervi (Mar Ligure) e successivamente allevati e mantenuti in condizioni controllate di laboratorio per circa un mese; l'alimentazione era costituita da una miscela di alghe fitoplanctoniche (*Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis spp.* e *Nitzschia spp.*) e lievito commerciale (*Saccharomyces cerevisiae*).

L'esposizione di *Tigriopus fulvus* alle microplastiche fluorescenti ha riguardato 30 esemplari adulti, suddivisi in 3 repliche da 10 individui ciascuna; gli esemplari sono stati mantenuti per 48h in beaker da 50 ml con acqua di mare (25°C; 31‰) filtrata (Whatman GF/A, porosità 0.45 µm), alla quale è stato aggiunto 1µl (10% w:v) di microplastiche e alimentanti con *Tetraselmis suecica* ($1,5 \cdot 10^5$ cell/ml). I faecal pellets prodotti sono stati raccolti e portati all'analisi in epifluorescenza (Microscopio Olympus IX70, 200x). Gli esemplari di *Tigriopus fulvus* sono stati conservati in etanolo al 70% e successivamente analizzati per la valutazione della presenza di microplastiche fluorescenti nelle varie parti del corpo.



Figura 61 Olympus IX70.

7.2.2 Crassostrea gigas

Gli esemplari adulti di *Crassostrea gigas* (n=12, 8.30 ± 0.45 cm, 8.70 ± 1.2 g) utilizzati durante l'esperimento sono stati prelevati dall'impianto di mitilicoltura di La Spezia in data 15/03/2017; dopo un periodo di acclimatazione alle condizioni di laboratorio di 48 ore, sono state esposte alle microsfere di alginato preparate con il metodo precedentemente descritto. Le condizioni sperimentali sono state mantenute costanti per tutta la durata del test: bagno termostato e refrigerato (Intermed Heto, CB60) temperatura di 25°C e salinità 31 PSU, areazione ed illuminazione artificiali (2000 lux). Le ostriche sono state esposte singolarmente in un beaker avente un volume di 400 ml.

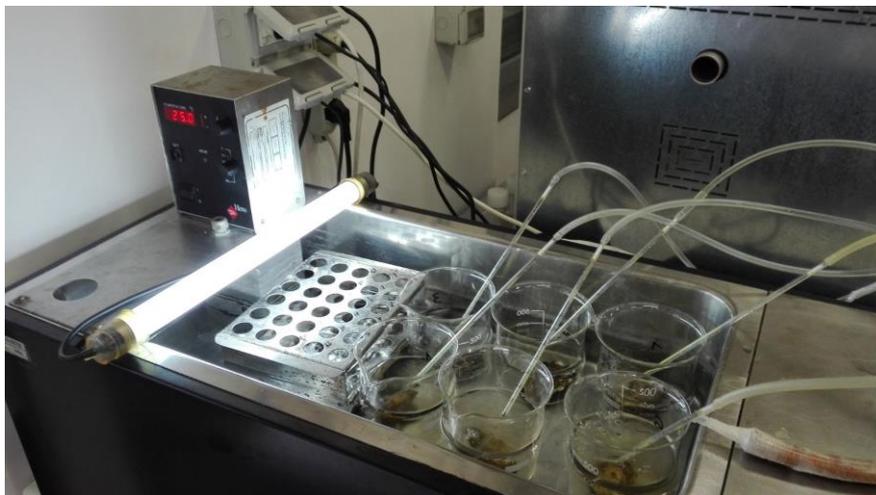


Figura 62 Bagno termostato Intermed Heto CB60 durante l'esposizione.

Le modalità della sperimentazione hanno riguardato l'impiego di sole microsfere di alginato con microplastiche e di microsfere di alginato con microplastiche in presenza di microalghe libere nel

mezzo (Fig.62); ogni condizione è stata testata in triplicato ed il materiale fecale prodotto da ogni singolo organismo è stato raccolto, nei test preliminari, dopo 2,5 e 20h di esposizione. Sono state testate concentrazioni scalari di microplastiche immobilizzate (125 MP/l, 200 MP/l e 250 MP/l).

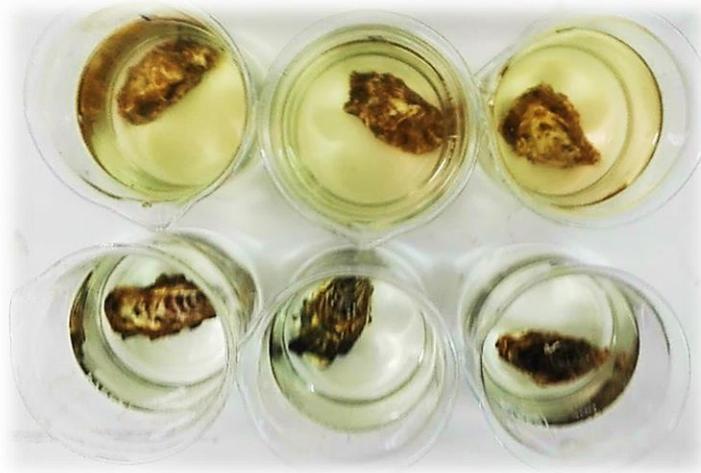


Figura 63 Condizione ad inizio test, in alto le ostriche alimentate con microsfer e microalghe, in basso solo con microsfer di alginato.

Dalla raccolta del materiale fecale sono state escluse, quando presenti, le pseudofeci, in quanto non legate al processo digestivo di *Crassostrea gigas* (Fig.64).

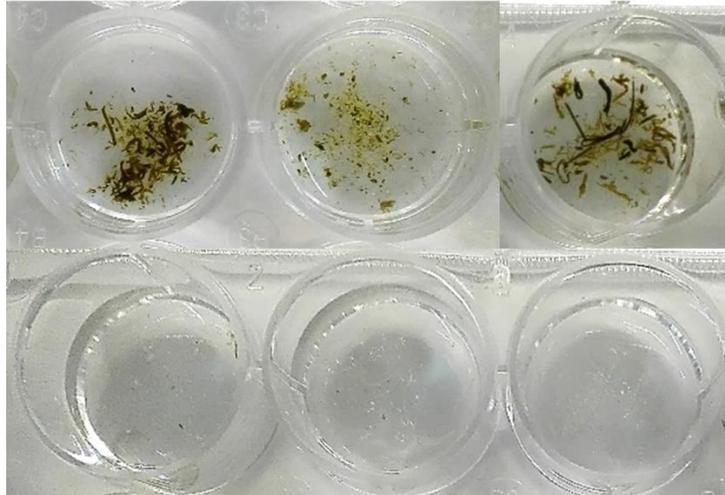


Fig. 64 - Materiale fecale raccolto a 20h e successivamente analizzato.

A seguito dei risultati preliminari, la durata del test è stata prolungata fino a 72 ore, con due esposizioni consecutive a t_0 ed a 48 ore. La seconda esposizione è stata effettuata cambiando la soluzione e mantenendo le stesse condizioni ambientali; durante questa operazione le ostriche sono state sciacquate con acqua distillata al fine di evitare errori nel conteggio dovuti alla presenza, nel beaker, del materiale egesto dagli organismi durante la prima esposizione.

Nel corso della sperimentazione si è provveduto a mantenere le ostriche in un ambiente più stabile possibile evitando movimenti di persone all'interno del laboratorio.

7.2.3 Acetilcolinesterasi

Le colinesterasi sono un gruppo di enzimi altamente polimorfici presenti in diverse specie del regno animale, idrolizzano una

grande varietà di substrati, utilizzando un attacco nucleofilo, che genera un intermediario in forma di acil- o fosforil-enzima e la sua seguente deacilazione o defosforilazione; sono presenti nella fessura sinaptica dove catalizzano l'idrolisi del neurotrasmettitore, l'acetilcolina, ma anche in altre regioni dell'organismo (Massoulié *et al.*, 1993).

L'inibizione della colinesterasi è uno dei principali marker di esposizione utilizzati nel monitoraggio biologico e, relativamente all'ambiente marino, ha trovato applicazione su un gran numero di organismi appartenenti a differenti taxa (Huggett *et al.*, 1992; Fossi and Leonzio, 1994; Fossi, 1994; Goksøyr *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1996; Walker, 1998; Fossi *et al.*, 2001; Agrone *et al.*, 2011; 2012); inoltre, è stato particolarmente impiegato su mitilo ed ostrica, principalmente a causa della loro propensione al bioaccumulo di contaminanti durante l'alimentazione (Galgani & Bocquen, 1990).

Nelle branchie di *Crassostrea gigas* sono state individuate due possibili forme (A e B) di acetilcolinesterasi, una sensibile ed una resistente, con inibizione bifasica. Tali forme hanno mostrato differente peso molecolare (200 e 330 kDa), tipo di glicosilazione, idrofobicità e generale sensibilità agli inibitori. La distribuzione generica di queste due forme è illustrata in tabella 29.

Tabella 29 L'attività è espressa in nmol di AcSCh Idrolizzato/min/mg di proteine totali (Bocquené et al., 1997)

Tessuto	AChE totale	A/B ratio
Branchie	28.1±2.8	4.7
Epatopancreas	25.5±3.6	2.8
Mantello	24.3±2.5	0.2
Palpi Labriali	13.0±1.1	0.2
Muscolo striato	6.9±0.7	2.0
Muscolo liscio	6.2±0.2	1.3

Il possibile effetto di inibizione dell'acetilcolinesterasi derivante dall'ingestione di microplastiche è ancora oggetto di studio, ma un esperimento condotto su *Pomatoschistus microps* (Gobiidae) ha permesso di identificare un effetto di inibizione dell'AChE dato dal solo materiale plastico e sinergico con il pirene, idrocarburo policiclico aromatico (IPA). L'inibizione provocata dalle microplastiche dipende inoltre da un meccanismo differente da quello del contaminante testato in contemporanea, fattore che rende il possibile effetto combinato di queste due sostanze di estrema pericolosità per gli organismi marini (Oliveira et al., 2013).

L'effetto delle microplastiche inglobate in matrice organica è stata valutata in termini di inibizione dell'acetilcolinesterasi negli organi coinvolti nel processo di selezione ed ingestione, ossia branchie, mantello ed apparato digerente.

Dopo l'esposizione alle microplastiche, le ostriche sono state sezionate in diverse parti ognuna delle quali è stata analizzata per la valutazione del contenuto proteico totale.

A tal fine, i campioni sono stati omogenati in Potter di vetro con pestello in teflon e lavati in Triton X-100, la quantificazione del contenuto proteico è stata effettuata con metodo spettrofotometrico (Bio-Rad/Sigma Aldrich).

La valutazione dell'attività di AChE è stata effettuata tramite metodo colorimetrico (Ellman *et al.*, 1961), utilizzando Acetil- β -metil tiocolina ioduro (AcTChI) come substrato e Ditio-bis-nitrobenzonato (DTNB) come reagente. Questo metodo si basa sull'aumento della colorazione gialla prodotta dalla reazione tra tiocolina e DTNB, formate l'anione acido tio-nitrobenzoico (TNB). Il prodotto della reazione assume una colorazione gialla che va letta, allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 412nm. Per l'esecuzione del test sono state preparate le soluzioni riportate in tabella 30.

Tabella 30 Soluzioni preparate per i dosaggi.

<p>Tampone Na-fosfato 0.1M pH 7</p>	<p>39 ml di soluzione A + 61 ml di soluzione B e portare a 200 ml con acqua distillata.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Soluzione A = soluzione 0.2 M di sodio fosfato monobasico (NaH_2PO_4) • Soluzione B = soluzione 0.2 M di sodio fosfato bibasico (Na_2HPO_4)
<p>Tampone Na-fosfato 0.1M pH 8</p>	<p>5.3 ml di soluzione A + 94.7 ml di soluzione B e portare a 200 ml con acqua distillata.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Soluzione A = soluzione 0.2 M di sodio fosfato monobasico (NaH_2PO_4)

	Soluzione B = soluzione 0.2 M di sodio fosfato bibasico (Na ₂ HPO ₄)
DTNB	<ul style="list-style-type: none"> • 8 mg di DTNB in polvere • 3 mg di sodio bicarbonato • Portare a 72 ml con tampone fosfato 0.1 M pH7.
AcTChI	<ul style="list-style-type: none"> • 20 mg di AcTChI in polvere • Portare a 1 ml con tampone fosfato 0.1 M pH 7

Le letture allo spettrofotometro, una volta inserito il campione ed aggiunti 100 µl di acetiltiocolina, procedono ogni minuto per 10 minuti. È previsto l'impiego di due soluzioni di Bianco, preparate come segue:

Tabella 31 Preparati per i dosaggi.

	Bianco 1	Bianco 2	Campione
Acqua distillata (µl)	1000	-	-
TAMPONE Na-fosfato pH 8 (µl)	-	775	775
TAMPONE Na-fosfato pH 7 (µl)	-	125	-
DTNB (µl)	-	100	100
Substrato AcTChI (µl)	-	-	100
Omogenato (µl)	-	-	25

Per il calcolo è stata utilizzata la seguente relazione:

$$R = \left[\frac{\frac{\Delta A}{\text{minuti}}}{\text{proteine totali}} \right] * 5.74 * 10^{-4}$$

Dove:

R = nmoli di substrato idrolizzato al minuto per mg di proteina

$\Delta A/\text{minuti} = (ABS_{MAX} - ABS_{min})/t$

Proteine totali = [C] iniziale di proteine nel campione ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) moltiplicata per la quantità di omogenato (μg) messa in cuvetta.

7.2.4 Particellato inorganico

Al fine di simulare l'effetto particellato non vivente sull'alimentazione dell'ostrica è stata utilizzata una sabbia di diatomite, di origine organica e composta principalmente da teche di diatomee e conchiglie di foraminiferi. La componente silicea della diatomite può rappresentare un elemento importante per la dieta dell'ostrica, che viene appunto integrato con colture di diatomee (i.e. *Chaetoceros gracilis*) per ovviare alla carenza dei silicati necessari allo sviluppo della conchiglia. Le concentrazioni di particellato (0, 10, 20, 40, 80 mg/l) sono basate sull'attività di monitoraggio del 2016. I test sono stati effettuati in triplicato a differenti concentrazioni di diatomite, su un volume di 400 ml di

acqua di mare sintetica Istant Ocean sterile, con tre ostriche per beaker, su due differenti classi di taglia riportate in tabella 32.

Tabella 32 Classi dimensionali degli esemplari di *Crassostrea gigas*.

<i>C.gigas</i>	l (cm)	m (g)
Classe A	2.31 ± 0.30	0.23 ± 0.04
Classe B	4.51 ± 0.41	1.40 ± 0.04

La durata del test è stata di 2,5 ore per prova, durante il test non è stato consentito l'accesso al laboratorio per evitare interferenze durante l'alimentazione dello spat.

Il risultato è espresso in termini di percentuale di pigmenti di clorofilla a rimasti in sospensione alla fine del periodo di analisi sul totale iniziale; per la misura è stato applicato il metodo spettrofotometrico di Strickland and Parsons (1972). È stato mantenuto l'inoculo di *Tetraselmis suecica* alla concentrazione di $1 \cdot 10^5$ cell/ml.

7.3 Risultati

Gli esemplari di *Tigriopus fulvus* esposti alle microplastiche fluorescenti hanno effettivamente ingerito e successivamente espulso il materiale plastico inglobato nei faecal pellets (Fig.65), verificando la validità delle particelle scelte come modello sperimentale.

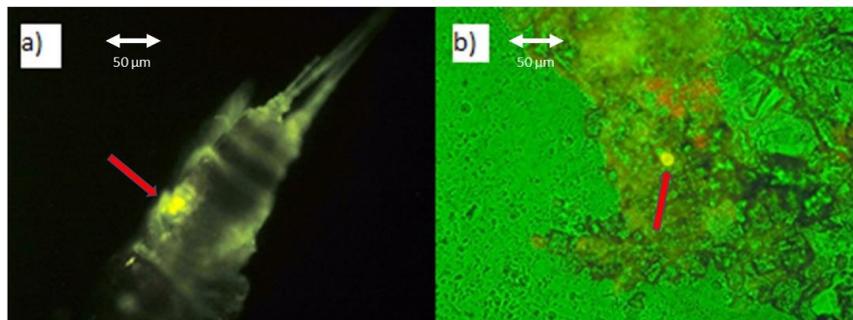


Figura 65 a) *Tigriopus fulvus* con microplastica addominale, b) dettaglio di faecal pellet di *T. fulvus* contenente microplastiche fluorescenti.

Le microsferi di alginato, il cui diametro finale è risultato di $40.2 \pm 24.9 \mu\text{m}$, sono state risospese in acqua di mare filtrata su filtro di acetato di cellulosa di porosità $0.45\mu\text{m}$ (GF/A Whatman) e successivamente somministrate agli esemplari di *Crassostrea gigas*. Le microsferi sono state ingerite e successivamente espulse dagli organismi esposti in tutte le condizioni sperimentali (Fig.66). A seguito delle esposizioni preliminari a 20 ore, infatti, nel materiale fecale raccolto sono state rinvenute le microplastiche ingerite durante il test.

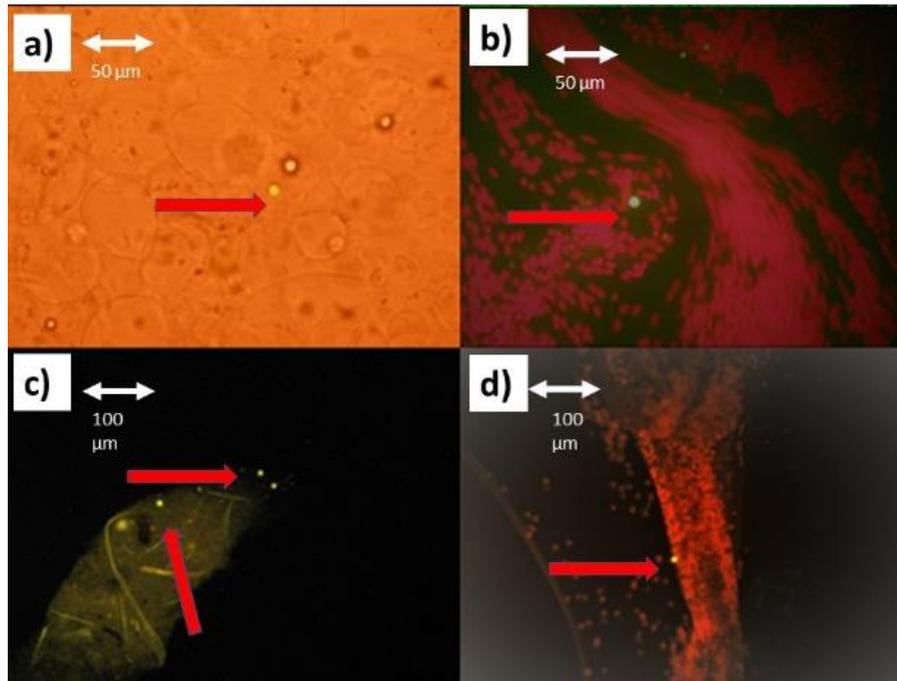


Figura 66 a) microsfele di alginato con microplastiche inglobate; b) microplastiche libere e non considerate nei conteggi; c,d) feci di ostrica contenenti microplastiche.

Per il test preliminare, gli esemplari di *Crassostrea gigas* sono stati esposti ad una concentrazione di 50 MP/l, comparando il tasso di gestione di microplastiche in presenza o assenza di cellule di *Tetraselmis suecica*. Il dato preliminare ha evidenziato una maggiore ingestione quando *C.gigas* è alimentata con sole microsfele (Fig.67-A1). Con quest'ultima condizione, infatti, dopo 2.5 ore di esposizione sono state espulse attraverso le feci 18 ± 3 MP/Ind, mentre a 20 ore il valore è sceso a 15 ± 2 MP/Ind. Al contrario, fornendo un'alternativa all'ingestione delle microsfele, *C.gigas* ha ingerito ed espulso 6 ± 3 MP/Ind (2.5h) e 7 ± 3.6 Mp/Ind (20h) (Fig.67-A2). Ogni condizione è stata testata in triplicato.

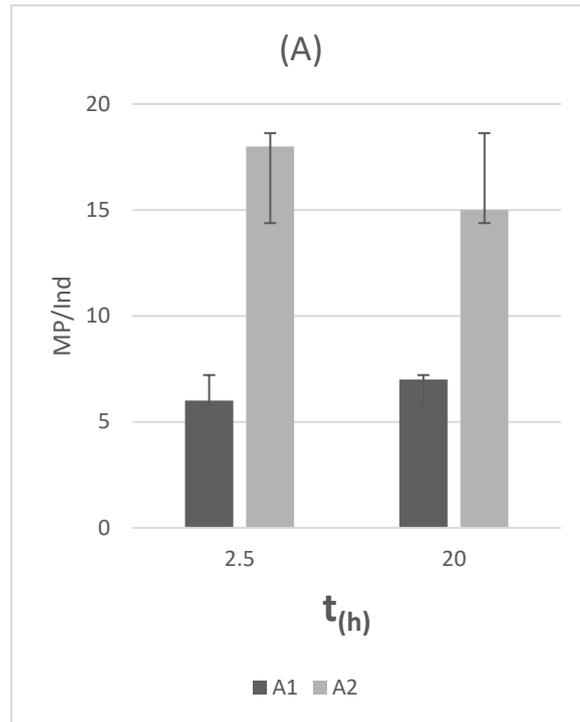


Figura 67 Risultati esposizione a 50 MP/l, con *Tetraselmis suecica* e microsfere (A1) e con sole microsfere (A2).

Tabella 33 Dati esposizione a 50 MP/l.

	t(h)	Microsfere + <i>Tetraselmis suecica</i>			Media
A1	2,5	9	3	6	6
	20	8	10	3	7
		<i>Microsfere</i>			
A2	2,5	20	14	20	18
	20	13	15	17	15

Il secondo test preliminare è stato condotto aggiungendo in soluzione, per entrambe le condizioni testate, 1 μ l (10% w:v) di microplastiche libere, contemporaneamente a microsfere di alginato (Fig.68-B1) e *Tetraselmis suecica* (Fig.68-B2). Viene raggiunto il massimo valore di ingestione per individuo (35 MP/Ind, 2.5h) esponendo gli organismi a microplastiche libere ed immobilizzate. Gli esemplari esposti a microplastiche libere e

Tetraselmis suecica hanno ingerito ed espulso un valore medio massimo di 24 MP/Ind alle 2.5h di esposizione.

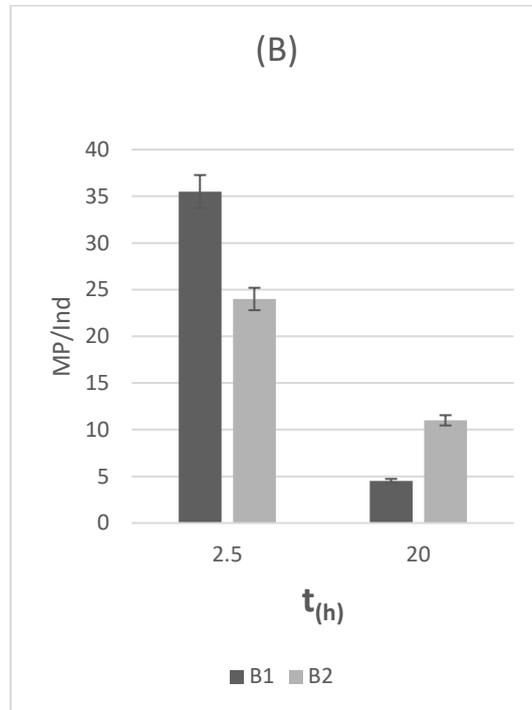


Figura 68 Risultati esposizione a 50 MP/l + MP libere, con *Tetraselmis suecica* (B2) e con sole microsferi (B1).

Tabella 34 Dati esposizione di *C.gigas* con microplastiche libere (MP), immobilizzate (Alg) e *T.suecica* (Ts)

		Alg+MP	Alg+MP	Media
B1	2,5 h	49	22	35
	20 h	9	0	4,5
		MPI+Ts	MPI+Ts	
B2	2,5 h	35	13	24
	20 h	11	11	11

A seguito dei test preliminari è stata variata la concentrazione delle microplastiche immobilizzate nonché ed aggiunta una seconda esposizione alle 48h. I valori massimi ottenuti a 125 MP/l (12 MP/Ind), 200 MP/l (12 MP/Ind) e 250 MP/l (24 MP/Ind) non risultano proporzionali alle quantità di microsferi in sospensione,

quando *Crassostrea gigas* è esposta sia a microsfere che *Tetraselmis suecica*.

A seguito delle seconde esposizioni si evidenzia un aumento del numero delle microplastiche, possibilmente a causa di particelle ancora in transito nell'organismo e ingerite durante la prima esposizione.

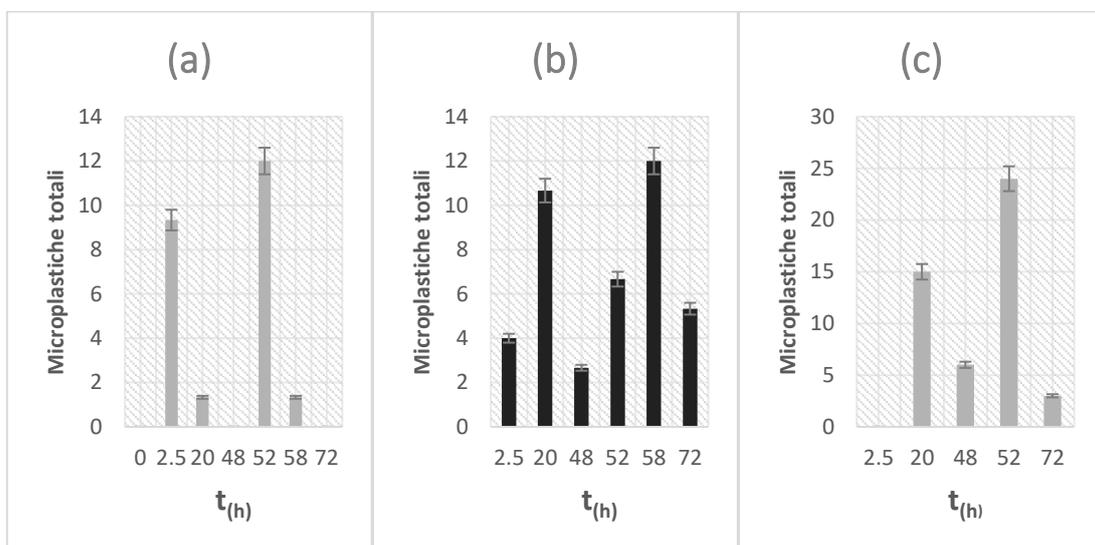


Figura 69 Contenuto di microplastiche in feci di *C. gigas* a seguito di esposizioni sequenziali a 125 MP/l (a), 200 MP/l (b) e 250 MP/l (c) e *Tetraselmis suecica*.

Tabella 35 Dati di esposizione a differenti concentrazioni di MP immobilizzate.

t(h)	2,5	20	48	52	58	72	Media
125 MP/l	0	9	1	0	12	1	4
200 MP/l	4	11	3	7	12	5	7
250 MP/l	0	15	6	24	0	3	8

Alimentando le ostriche con le sole microsfere di alginato di Sodio si ottengono valori di microplastiche mediamente maggiori, come riportato per la concentrazione minore (125 MP/l) in figura 70.

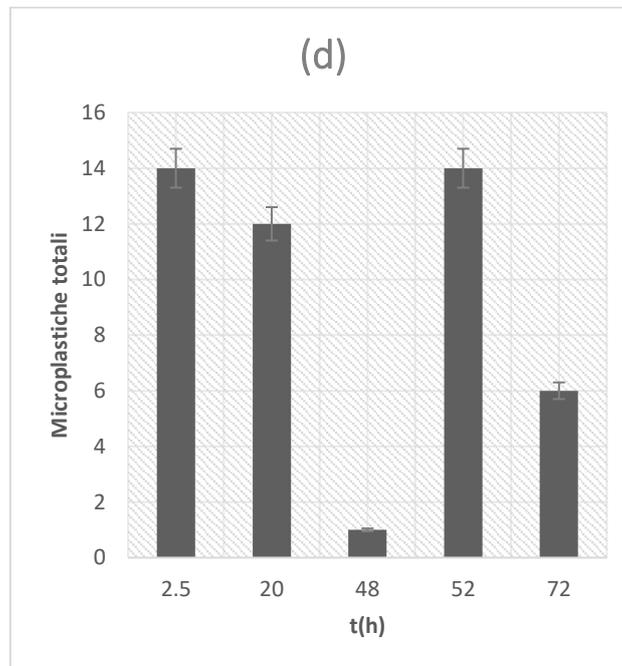


Figura 70 Contenuto di MP in feci di *C.gigas* a seguito di due esposizioni sequenziali (125 MP/l) in assenza di microalghe.

La maggiore ingestione di microplastiche in assenza di fitoplancton è confermata inoltre dal calcolo della cumulata di ingestione delle microplastiche, dove i valori relativi a 125 MP/l senza componente fitoplanctonica sono maggiori di quelli rilevati a tutte le condizioni con presenza di fitoplancton nel mezzo.

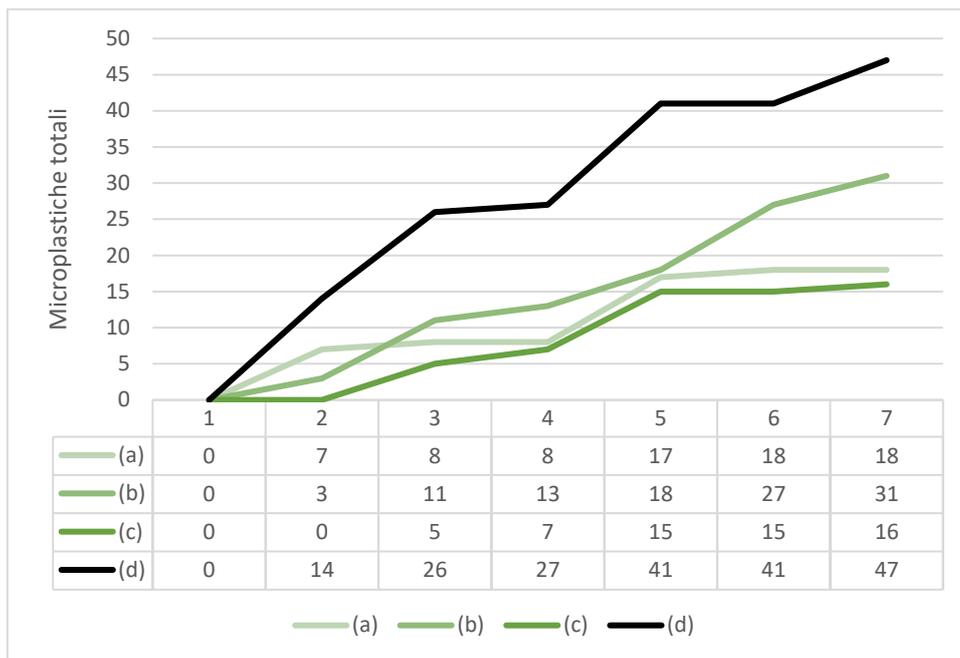


Figura 71 Cumulate dei valori di microplastiche rinvenute in feci di *C.gigas* alle condizioni descritte in figure 69 e 70.

Immobilizzando *Nitzschia sp.*, si può notare un aumento nelle microplastiche egeste a seguito della seconda esposizione, mentre alla prima esposizione è mantenuto il trend evidenziato per *Tetraselmis suecica*, ossia valori di ingestione di microplastiche in assenza di componente fitoplanctonica.

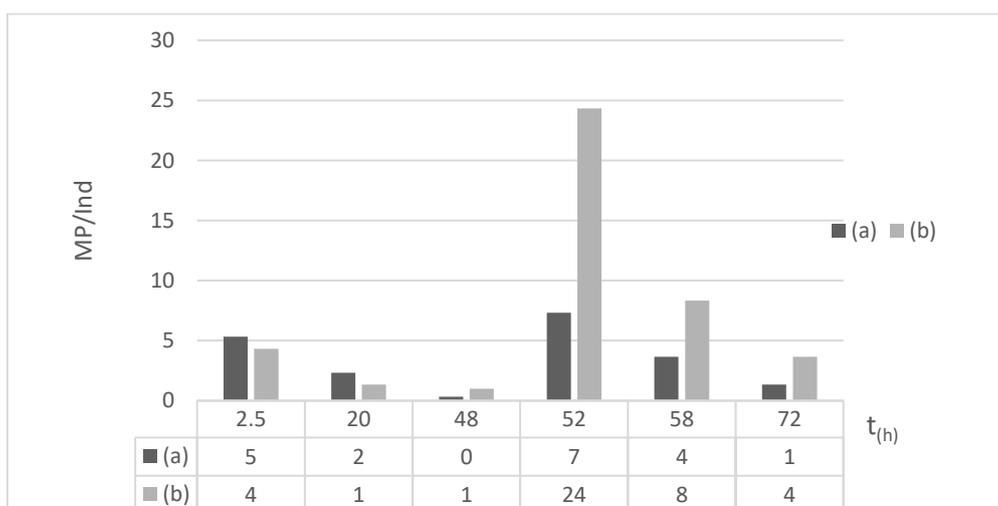


Figura 72 Risultati esposizione a 100 MP/l, con sole microsferi (a) e con *T.suecica* (b).

I valori di ingestione sono generalmente maggiori rispetto a quanto ottenuto con *T.suecica*, ad una concentrazione di 100 MP/l, in presenza di fitoplancton, si raggiunge un valore di particelle egeste di 24 MP/Ind (Fig.72). Analogamente a quanto rilevato per *Tetraselmis suecica*, però, l'aumento della concentrazione di microplastiche non comporta un conseguente aumento di ingestione in presenza di fitoplancton (30 MP/Ind a 200 MP/l). Si può notare invece un aumento dei tassi di ingestione in presenza delle sole microsfere di alginato. (18 e 26 MP/Ind, Fig.73).

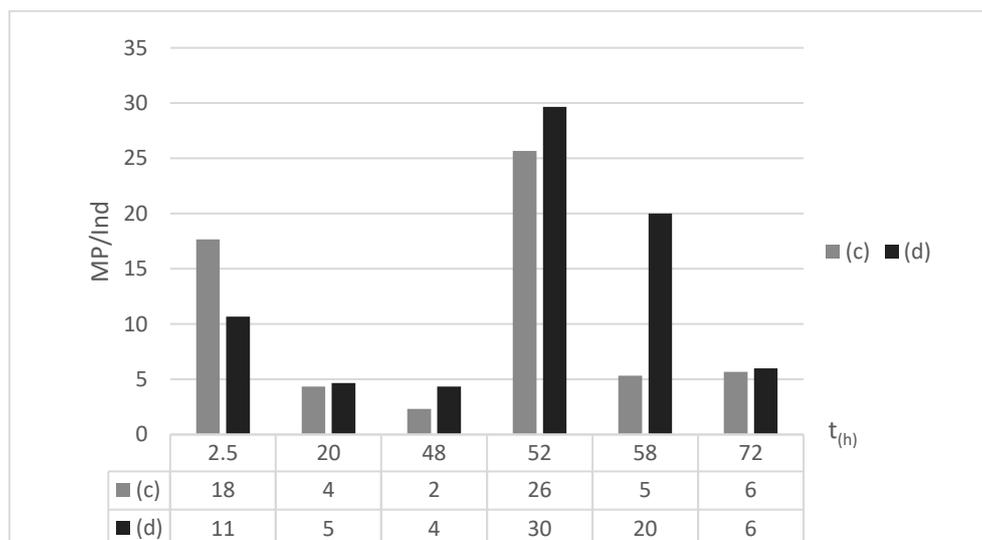


Figura 73 Risultati esposizione a 100 MP/l, con sole microsfere (c) e con *T.suecica* (d).

Complessivamente, la curva cumulativa relativa all'ingestione di *Nitzschia sp.* immobilizzata in microsfere di alginato di Sodio mostra un andamento differente rispetto a quella di *Tetraselmis suecica*. In questo caso, infatti, si rileva un maggior accumulo in

presenza di microalghe in sospensione e, relativamente alla concentrazione, si evidenzia una correlazione positiva tra [MP] ed ingestione.

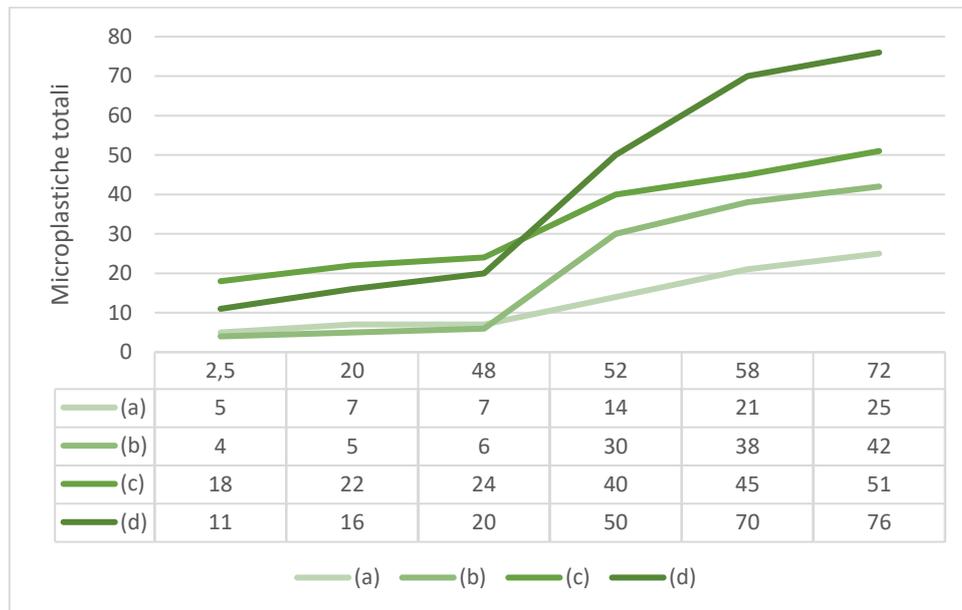


Figura 74 Cumulate dei valori di microplastiche rinvenute in feci di *C.gigas* alle condizioni descritte in figure 72 e 73.

7.3.1 Acetilcolinesterasi

La misurazione dell'attività di AChE relativa ai campioni trattati ha determinato un aumento di attività relativo all'apparato digerente dei campioni trattati con microsfere di alginato, ma in assenza di componente fitoplanctonica. Il picco è raggiunto nell'apparato digerente del trattamento a relativo a 100 MP/l (0.99 $\mu\text{mol/g}$ proteine/min).

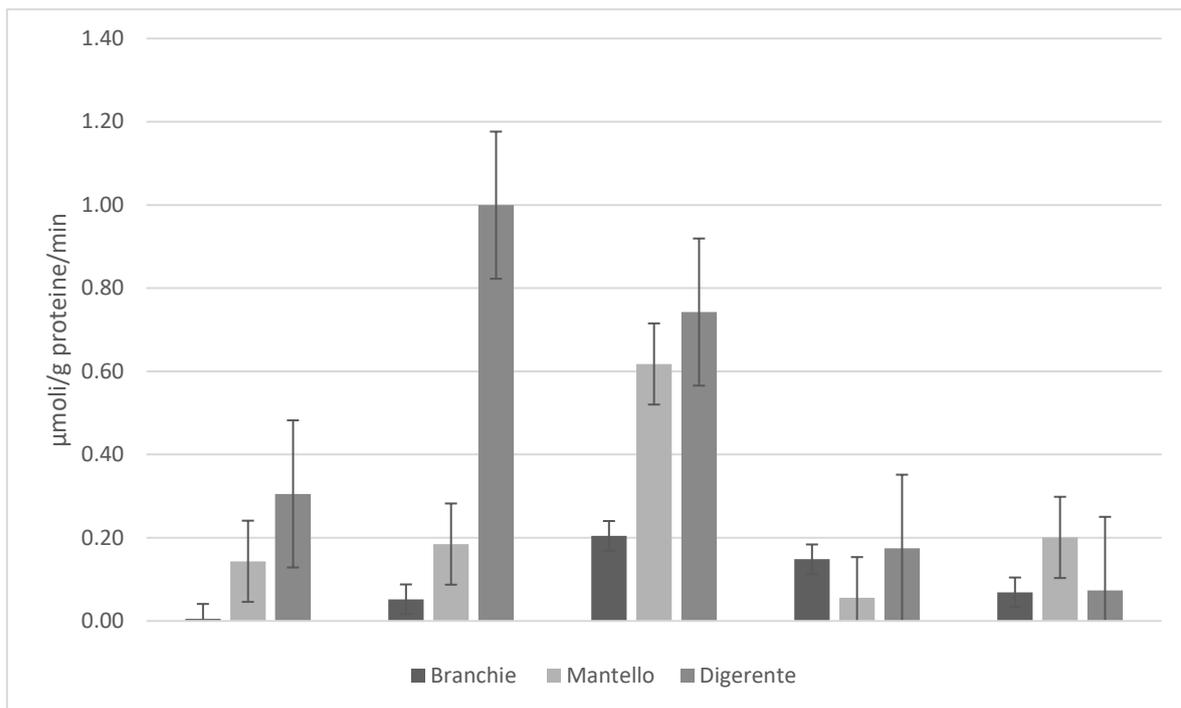


Figura 75 μmol di substrato idrolizzato e AChE sintetizzata per sezione anatomica.

Tabella 36 Letture spettrofotometriche.

T (min)		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Prot Tot	Aliquot a	Ac(MAX-MIN)
1	Mantello	0,303	0,318	0,325	0,33	0,34	0,347	0,353	0,358	0,364	0,369	0,373	2	25	0,010
2	Mantello	0,307	0,312	0,315	0,318	0,321	0,322	0,322	0,324	0,43	0,322	0,327	5	25	0,029
3	Branchie	0,213	0,217	0,218	0,218	0,218	0,219	0,218	0,217	0,218	0,218	0,218	0,74	25	0,002
4	Branchie	0,315	0,325	0,325	0,329	0,336	0,34	0,338	0,349	0,342	0,344	0,345	1,6	25	0,007
5	Branchie	0,284	0,296	0,297	0,297	0,299	0,303	0,305	0,307	0,309	0,311	0,312	1,3	25	0,005
6	Digerente	0,426	0,462	0,488	0,517	0,541	0,564	0,583	0,6	0,611	0,618	0,625	3,5	25	0,029
7	Mantello	0,883	0,896	0,907	0,907	0,91	0,914	0,921	0,924	0,928	0,932	0,939	2,3	25	0,028
8	Branchie	0,399	0,402	0,423	0,427	0,431	0,433	0,433	0,435	0,435	0,437	0,438	2,65	25	0,015
9	Digerente	0,415	0,432	0,446	0,456	0,465	0,472	0,478	0,483	0,489	0,496	0,502	1,4	25	0,009
10	Mantello	0,383	0,393	0,399	0,406	0,405	0,406	0,406	0,406	0,407	0,408	0,408	1,56	25	0,008
11	Branchie	0,304	0,323	0,355	0,344	0,351	0,353	0,357	0,36	0,362	0,364	0,366	2,3	25	0,011
12	Digerente	0,412	0,427	0,434	0,463	0,469	0,488	0,499	0,5	0,52	0,526	0,553	3,67	25	0,027
13	Mantello	1,42	1,432	1,444	1,456	1,456	1,469	1,46	1,481	1,481	1,495	1,495	5,74	25	0,111
14	Digerente	0,345	0,362	0,372	0,379	0,384	0,388	0,393	0,394	0,401	0,406	0,409	0,8	25	0,004
15	Digerente	0,484	0,51	0,527	0,541	0,556	0,553	0,567	0,573	0,578	0,58	0,583	2,15	25	0,016

7.3.2 Particellato inorganico

I risultati relativi all'influenza del particellato inorganico sulla selezione di cellule fitoplanctoniche hanno evidenziato un decremento della selezione di microalghe fino alla densità di 40 mg/l di diatomite in sospensione, corrispondente ad una filtrazione del 94,59 % (Classe A) e del 90,43 % (Classe B) del totale della concentrazione di inoculo.

Tabella 37 Risultati di grazing a differenti concentrazioni di diatomite.

Letture spettrofotometriche							
Classe	750	664	647	630	Chl a (µg/l)	Diatomite (mg/l)	% Filtrato
A	0,003	0,372	0,209	0,098	242,8686	0	97,00
A	0	0,38	0,21	0,094	250,3248	10	96,91
A	0,004	0,123	0,074	0,042	256,7643	20	96,83
A	0	0,333	0,185	0,084	438,5316	40	94,59
B	0,004	0,46	0,256	0,117	600,7776	0	94,49
B	0,004	0,377	0,21	0,097	491,4444	10	93,93
B	0	0,497	0,271	0,122	655,482	20	91,91
B	0,004	0,593	0,333	0,152	775,338	40	90,43
Bianco	0	0,693	0,391	0,175	8102,304	0	

7. Discussioni e conclusioni

L'importanza del ruolo ecologico e commerciale di *Crassostrea gigas*, unitamente al complesso delle relazioni che essa intreccia con i molteplici comparti naturali ed antropici, rappresenta un complesso quadro di interesse ecologico, sanitario, gestionale, microbiologico ed ecotossicologico.

In particolare il suo processo di filtrazione, necessario per la sua alimentazione dipendente dall'influenza di parametri fisici e biologici dell'ambiente costiero e ne determina una possibile contaminazione da sostanze di varia natura quali le microplastiche.

L'attività di monitoraggio, effettuata "a priori", ha permesso di valutare le condizioni ambientali e di costituire una base per la definizione dell'andamento del trofismo del sito di allevamento di questa specie nel Golfo di La Spezia. L'analisi della distribuzione dei parametri fisici (temperatura, salinità, O₂%) e biologici (clorofilla, torbidità) ha infatti confermato il confinamento determinato dalla presenza della diga foranea con conseguente accumulo di biomassa fitoplanctonica utilizzabile dalle ostriche. La diga pertanto influisce significativamente sulla produttività dell'areale prolungando il tempo di residenza delle masse d'acqua all'interno del Golfo fino a circa 3 settimane (Gasparini *et al.*,

2009). In generale, lo sviluppo di biomassa fitoplanctonica è dipendente dalle condizioni di temperatura e salinità della colonna d'acqua. Analisi statistiche sui dati hanno confermato una correlazione inversa significativa (0.30 Spearman Rank Order, $p < 0.05$) tra quantità di biomassa fitoplanctonica e temperatura dell'acqua, dato che conferma l'aumento della produttività dell'areale nei periodi autunnali e primaverili. La rappresentazione grafica di tale relazione è illustrata in figura 76 ;possiamo infatti notare un incremento di pigmenti autotrofi in corrispondenza di temperature comprese tra i 15 ed i 23°C, fattore confermato dalla superficie 3D in figura 76 (Chl a su T(°C), S (PSU), distanza pesata sui minimi quadrati).

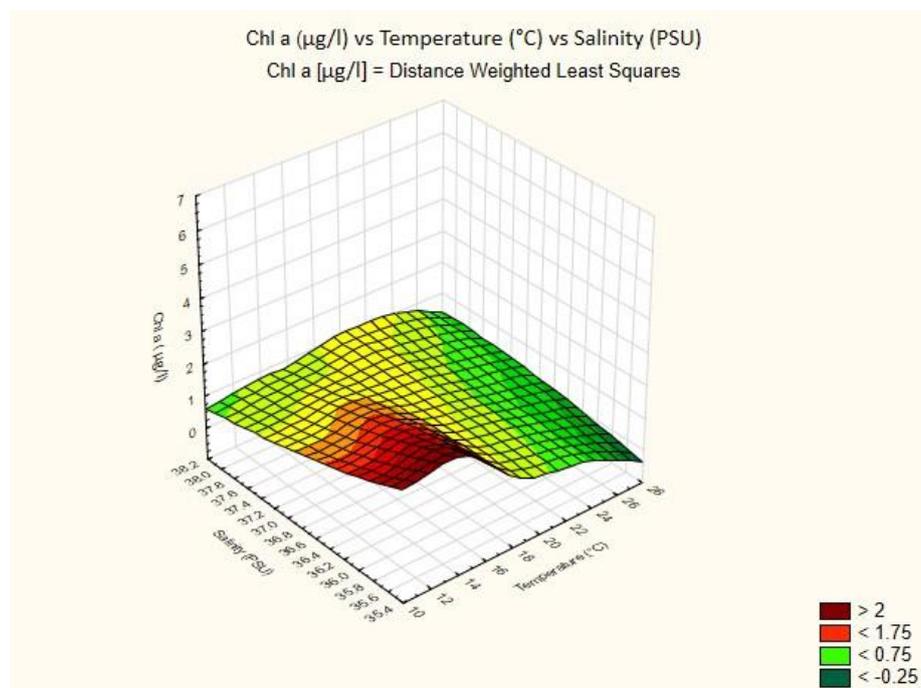


Figura 76 Elaborazione 3D della dipendenza di Chl a alle condizioni di temperatura e salinità ambientali.

L'equilibrio dinamico che va ad instaurarsi consente un ricambio d'acqua relativamente rapido unitamente a condizioni ambientali ottimali per lo sviluppo di popolamenti fitoplanctonici di qualità per lo sviluppo della molluschicoltura quali, come detto, diatomee e alghe verdi (Gasparini *et al.*, 2009) in un ambiente che tendenzialmente sfavorisce fioriture di dinoflagellati possibilmente produttori di tossine nocive per i bivalvi e i consumatori.

Si tratta, in ogni caso, di condizioni relativamente oligotrofiche tipiche dell'alto Tirreno, grazie anche all'influenza della Corrente Ligure, notoriamente caratterizzata da basse concentrazioni di clorofilla ed originante da un'interazione tra la Modified Atlantic Water (MAW) in superficie e la Levantine Intermediate Water (LIW) in profondità (Bèthoux *et al.*, 1988; Goffart *et al.*, 1995; Millot, 1999).

Tali condizioni sono state confermate durante il monitoraggio condotto durante il 2016, relativamente ai parametri monitorati. Nel periodo maggio-agosto, infatti, i valori medi di salinità e temperatura e di pH rilevati (relativamente allo strato superficiale entro-diga, ST2) sono risultati di 37.7 ± 0.6 PSU e 23 ± 2.3 °C e $8,02 \pm 0.15$. I parametri biologici risentono maggiormente della stagionalità dell'areale, rispondendo con una maggiore variabilità.

La valutazione della biomassa fitoplanctonica ha evidenziato una progressiva diminuzione dei valori rilevati (da 1.29 $\mu\text{g/l}$ fino a 0.55 $\mu\text{g/l}$) fino al campionamento di luglio 2016, seguito da un picco nel campionamento di agosto 2016 (2.11 $\mu\text{g/l}$). La valutazione del trofismo e dei principali parametri ambientali dell'areale di studio ha permesso di valutarne le condizioni di accrescimento *in situ*, dipendenti dal complesso delle interazioni intercorrenti tra organismi e colonna d'acqua.

La quantità di *seston* nella colonna d'acqua, in particolare, è determinante nel processo di filtrazione (Bayne et al., 1987; Navarro et al., 1992; Hawkins et al., 1996; Iglesias et al., 1996; Urrutia et al., 1996; Barillé et al., 1997; Navarro and Widdows, 1997), nello sviluppo morfologico (Barille' et al., 1997a; Kobayashi et al., 1997; van der Meer, 2006; Dutertre et al., 2009) e nello sviluppo di *Crassostrea gigas*. Applicando il set di equazioni di Fulford et al. (2007) relativo alla variabilità del Clearance Rate di *Crassostrea spp.* in relazione alle condizioni ambientali, si evidenzia l'effetto del particellato nei confronti di tale parametro (Fig.77).

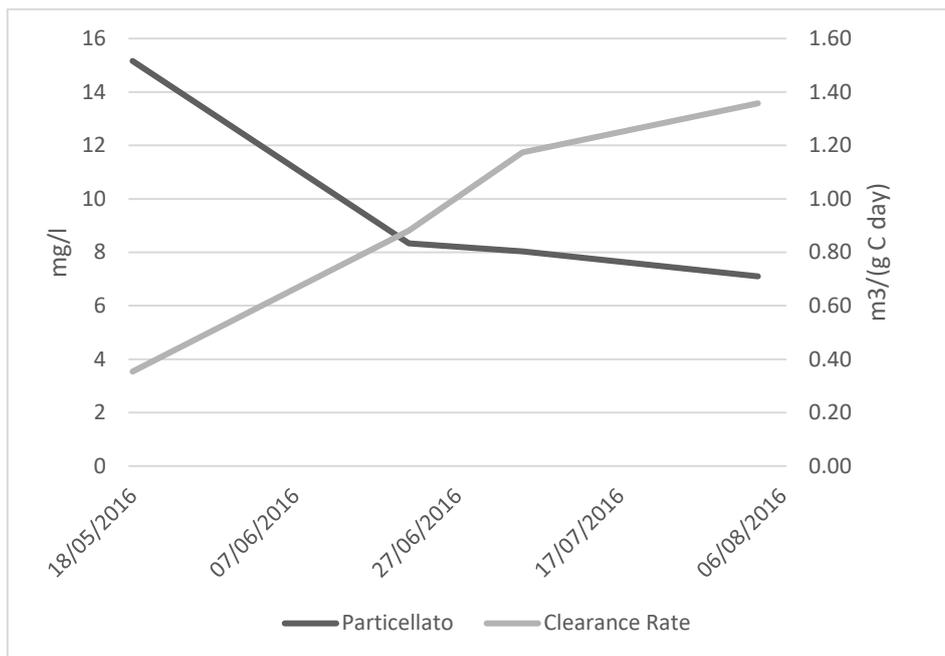


Figura 77 Relazione tra CR, elaborata da Fulford *et al.* (2007) e particellato totale nella colonna d'acqua.

Considerate le assunzioni relative ad ossigeno disciolto (> 50%) e salinità (>12 PSU), il valore del carico di particellato totale presente nella colonna d'acqua rappresenta il principale fattore determinante la capacità di rimozione di cellule fitoplanctoniche da parte dell'ostrica.

Tale correlazione è stata ulteriormente confermata dalle prove di laboratorio condotte su *spat* di ostrica proveniente dal Golfo di La Spezia, riguardanti l'effetto di carichi crescenti di diatomite sulla clearance rate di *C.gigas* (Fig.78).

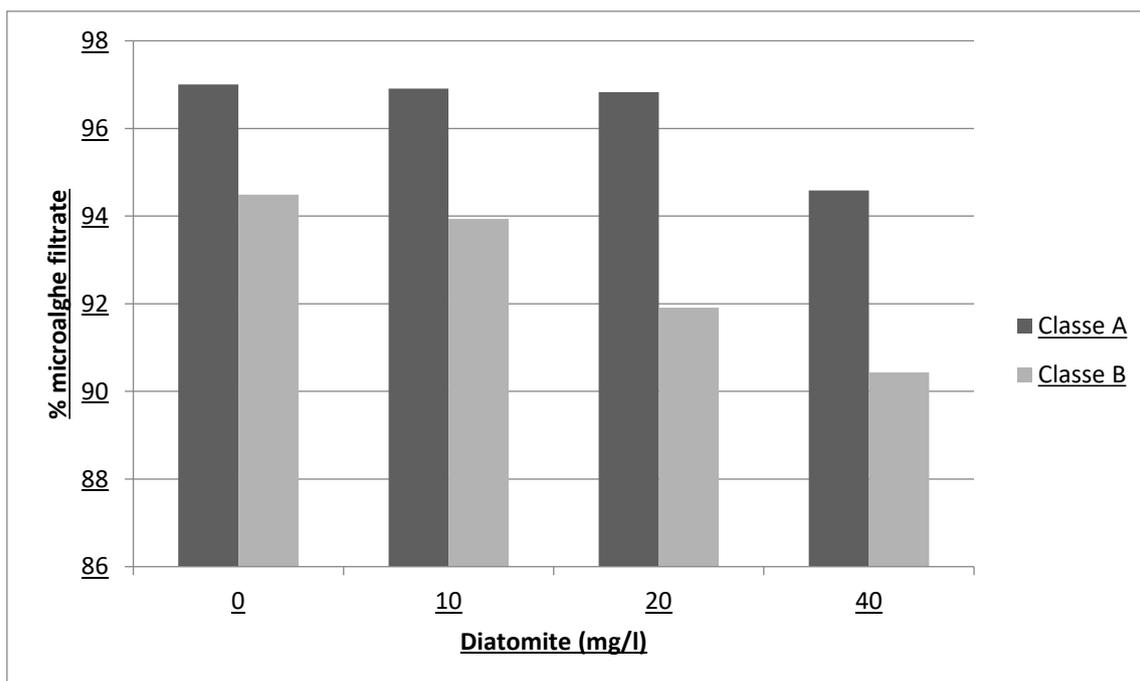


Figura 78 Influenza di concentrazioni crescenti di diatomite sulla capacità di filtrazione di differenti classi dimensionali di *Crassostrea gigas*.

Le capacità di selezione di cellule fitoplanctoniche risultano quindi fortemente dipendenti dai carichi di particolato totale presenti nella colonna d'acqua, che vanno ad influenzarne selezione e ritenzione.

Un ulteriore effetto di questa variabile è determinato dalle variazioni di taglia degli organi interni che *Crassostrea gigas* sviluppa per tollerare concentrazioni di POM superiori alle soglie di filtrazione (192 mg/l) e selezione (150 mg/l). Il rapporto tra la superficie di branchie e palpi labiali, ad esempio, diminuisce all'aumentare della torbidità, soprattutto a causa di variazioni morfologiche dei palpi labiali; analogamente, si può notare un incremento della porzione liscia del muscolo adduttore

all'aumentare delle concentrazioni di particolato sospeso. Tali modificazioni morfologiche sono coinvolte nella capacità di popolazioni selvatiche *Crassostrea gigas* di stabilirsi come specie invasiva in ambienti teoricamente inadatti (Dutertre *et al.*, 2009).

L'analisi del muscolo adduttore degli esemplari provenienti dal Golfo di La Spezia ha evidenziato una prevalenza ($58,17 \pm 5,64$ %) di muscolo striato; il confronto di tale risultato con i dati di bibliografia fa corrispondere tale valore ad areali a bassa torbidità, ad esempio Cape Herbaudière (POM medio annuo 21.0 mg/l), Cape Saint-Gildas (POM medio annuo 24,1 mg/l) e Cobe's Rock (POM medio annuo 24,3 mg/l), situati nell'estuario della Loira (Dutertre *et al.*, 2009).

I valori del rapporto tra superfici di branchie e palpi labiali (B:P) confermano ulteriormente tale condizione, raggiungendo valori di $17,7 \pm 6,50$ (> 5 cm) e $7,31 \pm 3,07$ (< 5 cm); il risultato del rapporto tra superficie dei palpi labiali e massa dell'organismo ($0,12 \text{ cm}^2/\text{g}$) è risultato inferiore ai dati rilevati nell'estuario della Loira, in corrispondenza ai minori valori medi di seston del Golfo di Lerici ($9,6 \text{ mg/l}$ nel periodo di campionamento).

Tali risultati sono confermati dal confronto dei trend di particolato totale e pigmenti autotrofi, dal quale si evidenzia una mancanza di correlazione tra picco di clorofilla \underline{a} e POM (Fig.79).

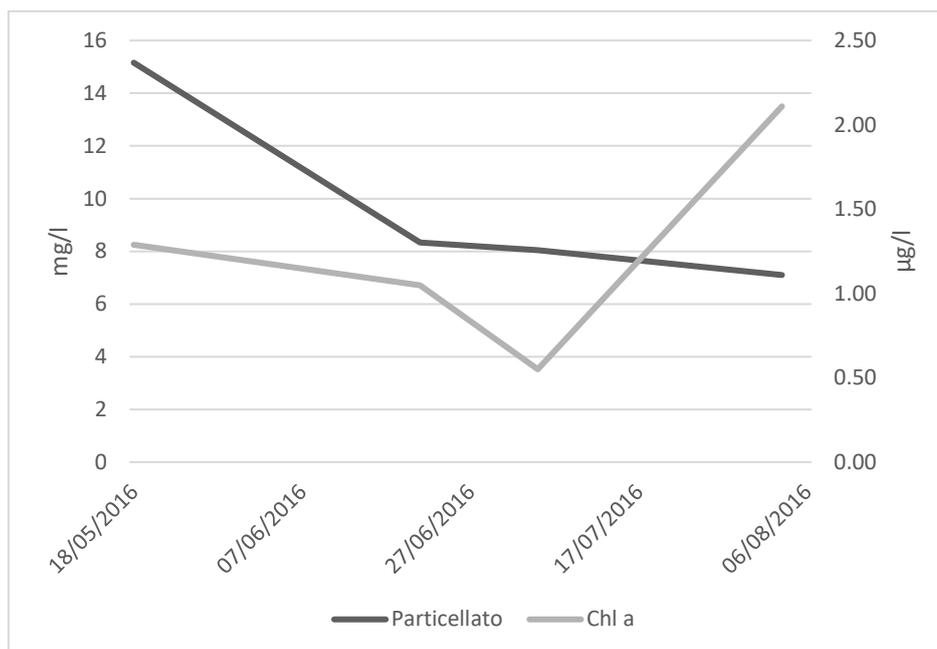


Figura 79 Andamenti di Chl a e particellato totale in ST2 (Maggio-Agosto 2016).

I risultati del monitoraggio ambientale evidenziano una serie di adattamenti morfologici, da parte di *Crassostra gigas*, alle condizioni della colonna d'acqua, tesi ad un'efficace sfruttamento delle risorse fitoplanctoniche in sospensione. I bassi valori di detrito sospeso concomitanti con gli incrementi del popolamento fitoplanctonico evidenziati durante il monitoraggio rappresentano ottimali condizioni di sviluppo per la specie oggetto di studio; la filtrazione è efficiente in termini di consumo metabolico e garantisce buoni tassi di accrescimento (Bonello *et al.*, 2015).

La valutazione del Clearance Rate alla massima temperatura dell'acqua (25°C) rilevata durante il monitoraggio ha fornito un valore massimo di 0,52 m³/g C day, al netto delle variazioni derivanti dai citati parametri ambientali. La cattura delle particelle

è inoltre legata alle dimensioni di quest'ultime, secondo l'equazione citata in precedenza (Barillé *et al.*, 1993).

La capacità di selezione delle specie fitoplanctoniche oggetto di grazing deve essere inoltre in grado di garantire un aumento di variabilità ed efficienza di alimentazione, che sia in grado di supportare le richieste metaboliche necessarie per lo sviluppo da C3 (2.31 ± 0.30 cm, 0.23 ± 0.4 g, 23,84% di proteine sul totale) a C1 (4.51 ± 0.41 cm, 1.40 ± 0.4 g, 6,01% di proteine sul totale).

Per il mantenimento dello *spat* di *Crassostrea gigas* è stata quindi valutata la sua capacità di grazing su *Nannochloropsis spp.* e *Tetraselmis suecica*, due alghe di dimensioni differenti (5-12 µm e 20-40 µm rispettivamente) in condizioni analoghe a quelle ambientali (37 PSU e 25°C). Dai risultati è emerso che l'ostrica sia in grado di acquisire un contenuto proteico maggiore (6,7 µg Ind⁻¹*h⁻¹) da *T.suecica*, pur ingerendone un quantitativo minore (1,3*10⁵ cell*Ind⁻¹*h⁻¹) rispetto a *Nannochloropsis spp.* (2,52 µg Ind⁻¹*h⁻¹ su 1,2*10⁶ cell*Ind⁻¹*h⁻¹).

Da precedenti lavori (Pane *et al.*, 1998) risulta un aumento del contenuto proteico delle colture fitoplanctoniche immobilizzate in alginato di sodio e in quest'ottica è stato sviluppato il metodo di mantenimento e accrescimento di *spat* di *C.gigas* precedentemente illustrato. *Nannochloropsis spp.* e *Tetraselmis*

suecica hanno dimostrato buone capacità di sviluppo in matrice organica, compresa una forma di co-esistenza nel processo di co-immobilizzazione e sono quindi state impiegate nell'alimentazione dello *spat*. Il tentativo di co-immobilizzazione di *Nannochloropsis spp.* e *Tetraselmis suecica* ha però individuato una dominanza di *Nannochloropsis spp.*. L'alga raggiunge infatti concentrazioni simili a quelle dell'immobilizzazione in singola coltura, nonostante la presenza nel mezzo di inoculo di *T.suecica* che non cresce., rimanendo a densità costanti.

Gli esemplari di *C.gigas* sono stati mantenuti in acquario, con successo per 4 mesi circa; in questo lasso di tempo, il gruppo alimentato con microalghe immobilizzate in alginato di sodio (G1) ha evidenziato una mortalità quasi dimezzata (6%) rispetto a quello alimentato con alghe libere (G2, 11%). Al contrario, è stato individuato un incremento di massa maggiore per le ostriche di G2 (+ 16,7%) rispetto a G1 (+5,0%). Nonostante l'incremento di massa relativo di G1 sia di minore entità rispetto a quello di G2, è più costante; il secondo, infatti, manifestava una flessione ed un successivo decremento.

Nel complesso, il metodo di mantenimento ed accrescimento con alghe immobilizzate ha dato buoni risultati in termini di gestione e sopravvivenza dello *spat*, stadio di particolare interesse dal

punto di vista ecologico e di allevamento *in quanto* e uno stadio di sviluppo particolarmente sensibile alle variabili ambientali, nonché ad agenti patogeni e contaminanti (Peeler *et al.*, 2012; Bingham *et al.*, 2013; Paul-Pont *et al.*, 2013a; 2013b; Paul-Pont *et al.*, 2014).

Sia i banchi naturali che le strutture di allevamento di *C.gigas* insistono in ambiente costiero, una porzione dell'ambiente marino particolarmente esposta agli impatti di origine antropico, in particolare per quanto riguarda le problematiche legate al *Marine Litter* ed i rischi ad esso associati. È stato stimato che più di 150 milioni di tonnellate di materiale plastico siano state globalmente accumulate negli oceani, con un ulteriore contributo annuo stimato tra i 4.6 ed i 12.7 milioni di tonnellate. L'origine di circa l'80% del *Marine Litter* è stata riconosciuta come terrestre, pur considerandone una certa regionalità. A questo fenomeno di inquinamento sono legate pesanti ripercussioni economiche con perdite per comunità costiere, turismo, nautica e pesca stimante nell'ordine dei 630 milioni di € all'anno e, considerata la rapidità di accumulo e dispersione, il *Marine Litter* può essere considerato una delle principali minacce alla salute degli oceani. A livello europeo, sono al momento in atto misure cautelative di "riduzione quantitativa di produzione del *Marine Litter*,

supportate da misure specifiche che tengano in considerazione le strategie di gestione dell'ambiente marino stabilite dagli Stati Membri". In particolare, sotto i canoni del *Circular Economy Package*, si mira ad un obiettivo di riduzione di almeno il 30% dei rifiuti da spiaggia e degli attrezzi di pesca entro il 2020. Per il 2017 è attesa la presentazione di una *Strategia per le plastiche* che garantisca un focus relativo alla protezione dell'ambiente nei confronti dell'inquinamento da materiale plastico e microplastiche. La Commissione Europea ha adottato, a novembre 2016, la *Ocean Governance Communication*, che pone queste problematiche in un più ampio contesto di inquinamento marino e nel contesto internazionale, includendo una lista di azioni. A livello europeo, in ogni caso, il principale strumento di tutela ambientale è la *Marine Strategy Framework Directive*, che opera in ambito di monitoraggio, tutela e raggiungimento del *Good Environmental Status (GES)*, includendo in tale ambito anche il monitoraggio dell'inquinamento costiero. La presenza di microplastiche in ambiente marino rappresenta un importante fattore di rischio sia per gli organismi marini che per il consumatore finale, in conseguenza del fatto che tali particelle di materiale plastico sono state trovate a differenti livelli della catena trofica. Gli organismi filtratori sono particolarmente esposti, a causa della loro strategia di alimentazione, tale tipo di

contaminazione. La maggior parte degli studi condotti sull'argomento sono incentrati su specie di interesse commerciale, in quanto vettori di microplastiche verso l'uomo. La presenza di microplastiche in molluschi bivalvi è stata studiata a livello globale in diversi paesi: Germania (*Mytilus edulis*, 0.36 ± 0.07 MP/g, Van Cauwenberghe and Janssen, 2015), Bretagna (*Crassostrea gigas*, 0.47 ± 0.16 MP/g, Van Cauwenberghe and Janssen, 2015), Brasile (Santana et al., 2016), Cina (Li et al., 2015). Tutte le specie esaminate hanno dato confermato la loro capacità di ingestione di microplastiche, che potrebbero conseguentemente essere ingerite dai consumatori.

Crassostrea gigas si colloca in questo contesto sotto diversi aspetti, a cominciare dal suo ruolo nel complesso delle interazioni definite come *Plankton-Benthos Linkage*. Essa è infatti coinvolta nei processi di trasporto verticale della sostanza organica (Haven & Morales-Alamo, 1966; Kusuli, 1981; Mitchell, 2006), arricchimento organico dei sedimenti (Forrest & Creese, 2006), processi idrodinamici (Pearson & Black, 2001), grazing sul comparto planctonico (Shumway et al., 1985; Dupuy et al., 2000; Cloern and Jassby, 2012), controllo della torbidità della colonna d'acqua (Kemp et al., 2005). Le principali problematiche inerenti al ciclo di sviluppo di *Crassostrea gigas* e alla sua interazione con

il comparto planctonico sono legato al fatto che la filtrazione è una strategia alimentare meno selettiva della predazione, in termini di selezione di particelle e nutrienti (Rummel *et al.*, 2016). Nella gestione di eventuali attività di studio e monitoraggio, la corretta scelta delle specie bioindicatrici determina la rilevanza del dato acquisito. Nella scelta delle specie impiegate nel monitoraggio devono essere quindi considerate le caratteristiche generali di un buon bioindicatore, ossia facilità di campionamento, identificazione, gestione e conoscenza della specie (Devriese *et al.*, 2015; Desforges *et al.*, 2015; Hämer *et al.*, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015; Von Moos *et al.*, 2012), nonché caratteri più specifici riguardanti il contaminante specifico, ossia le strategie di selezione durante l'alimentazione (Graham & Thompson, 2009; Rummel *et al.*, 2016).

La totalità delle specie analizzate durante il lavoro di tesi ha mostrato la presenza di microplastiche all'interno degli esemplari analizzati, con un rilevante quantitativo in *Ascidia spp* (0.62 MP/g). Questo valore può essere messo in correlazione al processo di alimentazione di quest'ultima specie. In relazione a questi parametri, *Ascidia spp.* si nutre principalmente di materiale particolato, intrappolando il cibo in una rete di muco prodotta dall'endostilo (Millar, 1971) che viene successivamente

trasportata verso il tratto digestivo, con un meccanismo di selezione delle particelle meno efficiente (Hecht, 1918; MacGinitie, 1939; Goodbody, 1974) se comparato con i meccanismi dei molluschi bivalvi.

Per quanto riguarda *Crassostrea gigas*, la concentrazione di microplastiche risulta direttamente ma non proporzionalmente correlata alle dimensioni della conchiglia. Il miglioramento dell'efficacia della selezione durante l'accrescimento consente di mantenere la qualità del processo all'aumentare dei volumi di acqua filtrata e conseguentemente al rischio di contaminazione. Si evidenzia quindi una relativa variabilità interspecifica nel processo di selezione delle particelle ingerite durante la filtrazione, dipendente dal livello di specializzazione e dai meccanismi stessi. Sulla base di queste considerazioni è necessario quindi valutare la scelta delle specie utilizzate durante il monitoraggio di microplastiche, in quanto la corretta scelta delle specie determina la rilevanza del risultato acquisito. La scelta degli organismi relative al monitoraggio di microplastiche devono quindi essere basate su selettività della nutrizione (Graham & Thompson, 2009; Rummel *et al.*, 2016), facilità di gestione del campionamento, identificazione, gestione e generali conoscenze della specie (Devriese *et al.*, 2015; Desforges *et al.*, 2015; Hämer

et al., 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015; Von Moos *et al.*, 2012). I risultati prodotti dal monitoraggio condotto sugli organismi del Golfo di La Spezia mostrano una relativa omogeneità nel contenuto, in termini di microplastiche per grammo di polpa, relativamente ai molluschi bivalvi, ma una concentrazione circa 5 volte maggiore nei campioni di *Ascidia spp.* *Mytilus galloprovincialis* si nutre sia su microalghe che su materiale sospeso, analogamente ad *Anomia ephippium*, un concorrente naturale di ostriche e mitili negli impianti di allevamento. Il più raffinato meccanismo di selezione di *Crassostrea gigas* consente alla specie un'ingestione estremamente selettiva, come dimostrato sotto condizioni sperimentali (Shumway *et al.*, 1985), che potrebbe consentire una migliore individuazione e successiva espulsione. Quando una particella plastica è, in ogni caso, inglobata in matrici organiche come faecal pellets, aggregati fitoplanctonici o organismi epibiontici (Barnes *et al.*, 2009; Browne *et al.*, 2010; Derraik, 2002; Thompson *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2015), questo processo di selezione potrebbe perdere o ridurre la sua efficacia ed indurre ingestione e successiva ingestione del materiale plastico. Differenti livelli di efficacia di selezione e conseguente successo nell'individuazione, mediano tra condizioni ambientali ed inquinamento da microplastiche nei filtratori bentonici. A causa

quindi dell'ampia distribuzione di materiale plastico nell'ambiente marino, la valutazione del rischio di ingestione e del quantitativo di microplastiche ingerite richiede una precisa standardizzazione sia della gestione dei campioni che nella scelta degli organismi studiati, a seconda del contesto di ricerca.

Considerati quindi i crescenti flussi di materiale plastico e la sua resistenza alla biotrasformazione, si rende necessaria una migliore comprensione dei diversi percorsi a disposizione del materiale plastico per il suo ingresso nella catena trofica.

In quest'ottica vanno considerate le interazioni che questo organismo instaura con il comparto planctonico; *C.gigas*, come altri organismi filtratori, si nutre principalmente di fitoplancton, ma integra la sua dieta con detrito organico e, occasionalmente, alcune specie di organismi zooplanctonici (Fréchette et al., 1989; Navarro et al., 1992; Smaal, 1997; Dupuy et al., 1999; Davenport et al., 2000; Dupuy et al., 2000; Karlsson et al., 2003; Lehane and Davenport, 2004; Troost et al., 2008a). A seguito di ingestione, gli organismi appartenenti al mesozooplancton possono diventare vettori di microplastiche, inglobando queste ultime in materiale fecale o per predazione diretta da parte di *Crassostrea gigas*.

Uno dei principali problemi nell'ambito dei modelli di laboratorio riguardanti il trasferimento verticale delle microplastiche riguarda

la loro comparabilità con le condizioni ambientali (Vandermeersch *et al.*, 2015). Il modello sperimentale basato sulle microsfere di alginato in quest'ottica, cercando di replicare condizioni simili all'ambiente, per quanto riguarda le concentrazioni di microplastiche e la loro biodisponibilità (Collignon *et al.*, 2012; Còzar *et al.*, 2015).

L'ingestione e successiva egestione di particelle fluorescenti da parte del copepode arpacticoide *Tigriopus fulvus* ha consentito di confermare l'effettiva applicabilità delle particelle sintetiche commerciali per lo studio. Il modello di alginato di sodio proposto pone rimedio alle difficoltà di ottenere un numero significativo di microplastiche inglobate in pellet fecali, garantendo replicabilità e continuità operativa negli esperimenti. Il modello ha inoltre ulteriormente confermato le capacità selettive di *Crassostrea gigas* durante l'alimentazione, dove quest'ultima è in grado di escludere o ridurre l'apporto di POM in presenza di organismi fitoplanctonici (Pastoureaud *et al.*, 1995; Ward & Shumway, 2004). Al contempo, alti carichi di materiale organico contribuiscono a rendere tale selezione più difficile, aumentando il rischio di ingestione di contaminanti con l'aumento della torbidità; in periodi di bassa produttività primaria, inoltre, il rischio di contaminazione da microplastiche potrebbe essere

aumentato dal conseguente adattamento della dieta da parte di *Crassostrea gigas*.

L'analisi relativa all'inibizione dell'acetilcolinesterasi inoltre ha identificato un possibile stress a livello digestivo determinato dall'ingestione di microplastiche inglobate in matrice organica. Tale espressione non avviene in presenza di microalghe libere, dove l'ostrica dirige preferenzialmente la sua alimentazione.

In conclusione, va considerato che obiettivo comune nella gestione internazionale dell'ambiente costiero è il miglioramento dello stato ecologico e la riduzione degli impatti ambientali; tuttavia le principali convenzioni internazionali quali la European Water Framework Directive (WFD; Direttiva 2000/60/EC) e la Marine Strategy Framework Directive (MSFD; Direttiva EY 2008/56/EC) sono spesso improntate sulla descrizione separata dei comparti planctonici e bentonici, che raramente vengono combinati nella redazione di report o nelle valutazioni ambientali.

In quest'ottica, l'integrazione dello studio delle interazioni tra questi due comparti dovrebbe essere integrata nella valutazione degli stati trofici e di salute ecosistemica, al fine di realizzare migliori strategie gestionali di un'importante risorsa quale *Crassostrea gigas*.

7. Bibliografia

Agrone C., Aluigi M.G., Fabbri R., Falugi C., Gallo G., Giacco E., Pane L. (2011). Esposition biomarkers to organophosphorous pesticides in *Tigriopus fulvus* Fischer (Copepoda, Harpacticoida). *J Biol Res*, 84(1):14-17.

Agrone C., Aluigi M.G., Mariottini G. L., Giacco E., Somà A., Falugi C., Pane L. (2012). Esposition of marine copepods to organophosphorus xenobiotics: application of acetylcholinesterase biomarkers in the laboratory. In: *Xenobiotics: New Research*, 49-66, Nova Science Publishers Inc., Hauppauge NY

Andrady, A.L. (1994) Assessment of Environmental Biodegradation of Synthetic Polymers. *J Macromol Sci, Polym Rev*, 34:25–76.

Andrady A.L. (2011) Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull*, 62, 1596-1605.

Andrady A.L. (2017) The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1):12-22.

Arthur C., Baker J., Bamford H. (2009) Proceedings of the international research workshop on the occurrence, effects and

fate of microplastic marine debris. In: NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30, p. 49.

Bacon G.S., MacDonald B.A., Ward J.E. (1998) Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles I. Feeding activity and selection. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219:105–125.

Barillè L., Prou J., Heral M., Bourgrier S. (1993) No influence of food quality, but ration-dependent retention efficiencies in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 171(1):91-106.

Barille´ L., Heral, M., Barille´-Boyer A.-L. (1997) Modelisation de l'ecophysiologie de l'huitre *Crassostrea gigas* dans un environnement estuarien. *Aquatic Living Resources*, 10:31–48.

Barillé L., Prou J., Héral M., Razet D. (1997) Effects of high natural seston concentration on the feeding, selection and absorption of the oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 212:149–172.

Barille´ L., Haure J., Cognie B., Leroy A. (2000) Variations in pallial organs and eulatero-frontal cirri in response to high particulate

matter concentrations in the oyster *Crassostrea gigas*. *Can J Fish Aquat Sci*, 57:837– 843.

Barnes D.K.A., Galgani F., Thompson R.C., Barlaz M. (2009) Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos Trans R Soc B*, 364:1985-1998.

Baustian MM, Hansen GJA, de Kluijver A *et al.* (2014) Linking the bottom to the top in aquatic ecosystems: mechanisms and stressors of benthic-pelagic coupling. In: Eco-DAS X Symposium Proceedings (ed Kemp PF), pp. 25–47. Association for the Sciences of Limnology and Oceanography.

Bayne B.L., Hawkins A.J.S., Navarro E. (1987) Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *J Exp Mar Biol Ecol*, 111:1–22.

Bayne B.L. (1993) Feeding physiology of bivalves: time-dependence and compensation for changes in food availability. In: Dame, R.F. (Ed.), *Bivalve filter feeders in estuarine and coastal ecosystem processes*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 1–24.

Berg A.J., Newell R.I.E. (1986) Temporal and spatial variations in the composition of seston available to the suspension feeder

Crassostrea virginica. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 23(3):375-386.

Berger W.H., Smetacek V.S., Wefer G. (eds) (1989) Productivity of the Ocean: Present and Past. Report of the Dahlem Workshop on Productivity of the Ocean: Present and Past, Berlin 1988, Berlin.

Besseling E., Foekema E.M., van Franeker J.A., Leopold M.F., Kühn S., Bravo Rebolledo E.L., Heße E., Mielke L., IJzer J., Kamminga P., Koelmans A.A. (2015) Microplastic in a macro filter feeder: humpback whale *Megaptera novaeangliae*. *Mar Pollut Bull*, 95(1):248-252.

Béthoux J.P., Prieur L. Bong, J.H. (1988) The Ligurian Current off the French Riviera. In Minas, H.J. and Nival, P. (eds), *Océanographie Pélagique Méditerranéenne: aspects interdisciplinaires de l'océanographie Méditerranéenne pélagique*. *Oceanologica Acta*, Paris, 59–67.

Bingham P., Brangenberg N., Williams R., van Andel M. (2013) Marine and freshwater investigation into the first diagnosis of ostreid herpesvirus type 1 in Pacific oysters. *Surveillance (Wellingt)*, 40:20–24.

bivalves. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 41:571–588

Bonello G., Giacco E., Varrella P., Pane L. 2015. Ecologia di *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) negli impianti di mitilicoltura di La Spezia. 88th SIBS National Congress. Genova 11-12 Dicembre 2015.

Bricelj V.M., Bass A.E., Lopez G.R. (1984) Absorption and gut passage time of microalgae in a suspension feeder: an evaluation of the $^{51}\text{Cr}:$ ^{14}C twin tracer technique. *Marine Ecology Progress Series*, 17:57–63.

Browne M.A., Galloway T.S., Thompson R.C. (2007) Microplastic an emerging contaminant of potential concern. *Integr Environ Assess Manage*, 3, 559-566.

Browne M.A., Dissanayake A., Galloway T.S., Lowe D.M., Thompson R.C. (2008) Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ Sci Technol*, 42(13):5026-5031.

Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology*, 23:2388–2392.

Cabrita M.T., Raimundo J., Pereira P., Vale C. (2013) Optimizing alginate beads for the immobilisation of *Phaeodactylum*

tricornutum in estuarine waters. *Marine Environmental Research* 87-88:37-43.

Carlos de Sa L., Luís L.G., Guilhermino L. (2015) Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environ Pollut*, 196:359-362.

Carpenter E.J., Smith K.L. (1972) Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science*, 175:1240—1241.

Carver, C.E., Chisholm, A., Mallet, A.L. (2003) Strategies to mitigate the impact of *Ciona intestinalis* (L.) biofouling on shellfish production. *Journal of Shellfish Research*, 22:621–631.

Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., Janssen, C.R. (2011) Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Mar Pollut Bull*, 62:2199-2204.

Clark D.E., Green H.C. (1936) Alginic acid and process of making same. US Patent. 2036922.

Cloern J.E. (1982) Does the Benthos control phytoplankton biomass in South San Francisco Bay? *Marine Ecology Progress Series*, 9:191-202.

Cloern J.E., Jassby A.D. (2012) Drivers of change in estuarine-coastal ecosystems: Discoveries from four decades of study in San Francisco Bay. *Reviews of Geophysics*, 50.

Cloern J.E., Abreu P.C., Carstensen J. *et al.* (2016) Human activities and climate variability drive fast-paced change across the world's estuarine-coastal ecosystems. *Global Change Biology*, 22:513–529.

Cole M., Lindeque P., Fileman E., Halsband C., Goodhead R., Moger J., Galloway T.S. (2013) Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environmental Science and Technology*, 47(12):6646–6655.

Collignon, A., Hecq, J-H., Galgani, F., Voisin, P., Collard, F., Goffart, A. (2012) Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Mar Poll Bull*, 64(4):861-864.

Costanza R., Kemp M., Boynton W. (1995) Scale and biodiversity in coastal and estuarine ecosystems. In: *Biodiversity Loss: Economic and Ecological Issues* (eds Perrings C., Maler K.-G., Folke C., Holling C.S., Jansson B.-O.), 84–126. Cambridge University Press, Cambridge.

Cózar A., Sanz-Martín M., Martí E., González-Gordillo J.I., Ubeda B., Gálvez J.Á. *et al.* (2015) Plastic Accumulation in the Mediterranean Sea. *PLoS ONE* 10(4):0121762.

Cranford P., Ward E., Shumway S. (2011) Bivalve filter feeding: Variability and limits of the aquaculture biofilter. In: Shumway S., ed. *Shellfish aquaculture and the environment*. Hoboken, NJ: Wiley; 2011:81-124.

Cranford P.J., Grant J. (1990): Particle clearance and absorption of phytoplankton and detritus by the sea callop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 137:105–121.

Crocetta F., Macali A., Furfaro G., Cooke S., Villani G., Valdés A. (2013) Alien molluscan species established along the Italian shores: an update, with discussions on some Mediterranean “alien species” categories. *ZooKeys*, 277:91-108.

Dainty, A.L., Goulding, K.H., Robinson, P.K., Simpkins, I., Trevan, M.D. (1986) Stability of alginate-immobilized algal cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(2):210-216.

Dame R.F. (1993) The role of bivalve filter feeder material fluxes in estuarine ecosystems. In: Dame, R.F. (Ed.), *Bivalve filter feeders*

in estuarine and coastal ecosystem processes. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 245–269.

Dame R.F. (1996) Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach. CRC Press, Boca Raton, 254pp.

Dang H., Li T., Chen M., Huang G. (2008) Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl Environ Microbiol*, 74:52–60.

Dang H., Lovell C.R. (2000) Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol*, 66:467–475.

Davenport J., Smith R. J. J. W., Packer M. (2000): Mussels *Mytilus edulis*: significant consumers and destroyers of mesozooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 198:131–137.

Day R.H., Shaw D.G. (1987) Patterns in the abundance of pelagic plastic and tar in the north Pacific Ocean, 1976–1985. *Marine Pollution Bulletin*, 18:311-316.

Dekiff, J.H., Remy, D., Klasmeier, J., Fries, E., (2014) Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney. *Environ Pollut*, 186:248-256.

Derraik J.G.B. (2002) The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar Pollut Bull*, 44(9):842-852.

Desforges, J.-P.W., Galbraith, M., Ross, P.S. (2015) Ingestion of microplastics by zooplankton in the northeast Pacific Ocean. *Arch Environ Contam Toxicol*, 69(3):320-330.

Deslous-Paoli J.M., Lannou A.M., Geairon P., Bougrier S., Raillard O., Heral, M. (1992) Effects of the Feeding behavior of *Crassostrea gigas* (Bivalve Molluscs) on biosedimentation of natural particulate matter. *Hydrobiologia*, 231(2):85–91.

Devriese, L.I., van der Meulen, M.D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., Frere, L., Robbens, J., Vethaak, A.D. (2015) Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. *Mar Pollut Bull*, 98(1e2):179-187.

Eno N.C., Clark R.A., Sanderson W.G. (1997) Non-native marine species in British waters: a review and directory. Peterborough; *Joint Nature Conservation Committee*, 136 pp.

Dinet A., Sornin J.-M., Sablière A., Delmas D., Feuillet-Girard M. (1990) Influence de la biodéposition de bivalves filtreurs sur les peuplements méiobenthiques d'un marais maritime. *Cahiers de Biologie Marine*, 31:307–322.

Dos Santos, V.A.P.M., Leenen, E.J.T.M., Rippoll, M.M., van der Sluis, C., van Vliet, T., Tramper, J., Wijffels, R.H. (1997) Relevance of rheological properties of gel beads for their mechanical stability in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(5):517-529.

Draget K.I. (2009) Alginates. In: Phillips GO, Williams PA, editors. Handbook of hydrocolloids. 379-395.

Duineveld G.C.A., Tselepides A., Witbaard R. *et al.* (2000) Benthic-pelagic coupling in the oligotrophic Cretan sea. *Progress in Oceanography*, 46:457–480.

Dupuy C. , Le Gall S., Hartmann H.J. , Bréret M. (1999) Retention of ciliates and flagellates by the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. *Marine Ecology Progress Series*, 177:165-175.

Dupuy C., Vaquer A., Lam-Hoai T., Rougier C., Mazouni N., Lautier J *et al.* (2000) Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. *Mar Ecol Prog Ser*, 205:171-184.

Dutertre M., Barillé L., Beninger P.G., Rosa P., Gruet Y. (2009) Variations in the pallial organ sizes of the invasive oyster,

Crassostrea gigas, along an extreme turbidity gradient. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 85:431–436.

Faafeng, B.A., Van Donk, E., Källqvist, S.T. (1994) In situ measurement of algal growth potential in aquatic ecosystems by immobilized algae. *Journal of Applied Phycology*, 6(3):301-308.

Faraponova O., De Pascale D., Onorati F., Finoia M.G. (2005) *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida) as a target species in biological assays. *Meiofauna Marina*, 14:91-95.

Forrest, B.M., Creese, R.G. (2006). Benthic impacts of intertidal oyster culture, with consideration of taxonomic sufficiency. *Environmental Monitoring and Assessment*, 112, 159-176.

Forrest, B.M., Hopkins, G.A., Dodgshun, T.J., Gardner, J.P.A. (2007b) Efficacy of acetic acid treatments in the management of marine biofouling. *Aquaculture*, 262:319–332.

Förstner, U. (1995) Risk assessment and technological options for contaminated sediments — a geochemical perspective. *Marine and Freshwater Research*, 46:113-127.

Fossi M.C. (1994) Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Health Perspective*, 102(12):49–54.

Fossi M.C., Leonzio, C. (1994) Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Lewis Publishers, CRC Press, 345 pp.

Fossi M.C., Minutoli R., Guglielmo L. (2001) Preliminary Results of Biomarker Responses in Zooplankton of Brackish Environments. *Mar Pollut Bull*, 42(9):745-748.

Foster-Smith R.L. (1975) The role of mucus in the mechanism of feeding in three filter-feeding bivalves. *Journal of Molluscan Studies*, 41(6):571-588.

Fraser, J.E., Bickerstaff, G.F. (1997) Entrapment in calcium alginate. In: Bickerstaff, G.F. (Ed.), 1997. *Methods in Biotechnology, Immobilization of Enzymes and Cells*, vol. 1. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 61-66.

Fréchette M., Butman C.A., Geyer W.R. (1989) The importance of boundary-layer flows in supplying phytoplankton to the benthic suspension feeder, *Mytilus edulis* L. *Limnology and Oceanography*, 34:19-36.

Frost B.W. (1972) Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnol Oceanogr*, 17:805-815.

Fujisawa K., Kobashi K., Sato J. (1987) Relationship between growth of oyster *Crassostrea gigas* and environmental factors in Mushiage Bay. *Bulletin of Okayama Prefecture Institute for Fisheries*, 2;44-51.

Galgani F., Bocquené G. (1990) In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bull Environ Contam Toxicol*, 45:243-249.

Galloway, T.S. (2015) Micro- and nano-plastics and human health. In: *Marine Anthropogenic Litter*, pp. 343-366 (Chapter 13).

Gandara e Silva P.P., Nobre C.R., Resaffe P., Pereira C.D.S., Gusmao F. (2016) Leachate from microplastics impairs larval development in brown mussels. *Water Research*, 106:364-370.

Gewert, B., Plassmann, M.M., MacLeod, M. (2015) Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ Sci Process Impacts*, 17:1513–21.

Giles H., Pilditch C.A. (2006) Effect of mussel (*Perna canaliculus*) biodeposit decomposition on benthic respiration and nutrient fluxes. *Marine Biology*, 150:261–271.

Gladue, R.M. and Maxey, J.E. (1994) Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 6:131–141.

Goffart A., Hecq J.H., Prieur, L. (1995) Contrôle du phytoplancton du bassin Ligure par le front liguro-provençal (secteur Corse). *Oceanol Acta*, 18:329–342.

Goksøyr A., Beyer J., Larsen H.E., Andersson T., Förlin, L. (1992) Cytochrome P-450 in seals: monooxygenase activities, immunochemical cross-reactions and response to phenobarbital treatment. *Marine Environmental Research*, 34:113–116.

Goldstein M.C. (2012) Abundance and ecological implications of microplastic debris in the North Pacific Subtropical Gyre. Ph.D. thesis, Scripps Institution of Oceanography, University of California San Diego, La Jolla, CA.

Gosling E. M. (2003): Bivalves molluscs: Biology, Ecology and Culture. Blackwell Publishing, Oxford, 443pp.

Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., & Hodges, G. (2011). A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic. *Environmental Science and Technology*, 45(4):1466–1472.

Graf G., Rosenberg R. (1997) Bioresuspension and biodeposition: a review. *Journal of Marine Systems*, 11, 269–278.

Graf G. (1992) Benthic-pelagic coupling - a benthic view. *Oceanography and Marine Biology*, 30:149–190.

Graham, E.R., Thompson, J.T. (2009) Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *J Exp Mar Biol Ecol*, 368(1):22-29.

Halpern B.S., Walbridge S., Selkoe K.A. *et al.* (2008) A global map of human impact on marine ecosystems. *Science*, 319:948–952.

Hämer, J., Gutow, L., Köhler, A., Saborowski, R. (2014) Fate of microplastics in the marine isopod *Idotea emarginata*. *Environ Sci Technol*, 48(22):13451-13458.

Hammer, J., Kraak, M. H., Parsons, J. R. (2012) Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012(220):1–44.

Hargrave B.T. (1973) Coupling carbon flow through some pelagic and benthic communities. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 30:1317–1326.

Haure J., Baud J.P. Trophic competition between natural beds of mussels (*Mytilus edulis*), Japanese oysters (*Crassostrea gigas*) in the bay of Bourgneuf (Atlantic coasts of France). Implication in its management. In: N. De Pauw and J. Joyce (eds). Aquaculture and the environment. Short communications and abstracts presented at the International Conference Aquaculture Europe 1991, Dublin, Ireland, 10-12 June 1991. EAS special pub. 1991; 14:146.

Haure J., Huvet A., Palvadeau H., Nourry M., Penisson C., Martin J., *et al.* (2003) Feeding and respiratory time activities in the cupped oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. *Aquaculture*, 218(1–4):539–551.

Haven, D.S., Morales-Alamo, R. (1966) Aspects of biodeposition by oysters and other invertebrate filter feeders. *Limnology and Oceanography*, 11, 487–498.

Hawkins A.J.S., Smith R.F.M., Bayne B.L., Héral M. (1996) Novel observations underlying the fast growth of suspending shellfish in turbid environment: *Mytilus edulis* L. *Mar Ecol Prog Ser*, 131:179-190.

Helm, M.M. (1990) Moderna progettazione e gestione di schiuditoi per molluschi bivalve e nuovi sviluppi. In: *Tapes philippinarum*, Ente Sviluppo Agricolo Veneto. Dosson di Casier: Treviso, p. 63.

Hensen C.A.V. (1887) Ueber die Bestimmung des Planktons, oder des im Meere treibenden Materials an Pflanzen und Thieren. Jahresbericht der Kommission zue wissenschaftlichen Untersuchung. *der Deutschen Meere in Kiel*, 5:1-109.

Horton A.A., Walton A., Spurgeon D.J., Lahive E., Svendsen C. (2017) Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the Total Environment*, 586:127–141.

Huggett R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M., Bergman H.L. (1992) Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, 247 pp.

Humphries S. (2013) A physical explanation of the temperature dependence of physiological processes mediated by cilia and flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(36):14693–14698.

Iglesias J.I.P., Urrutia M.B., Navarro E., Alvarez-Jorna P., Larretxea X., Bougrier S., Héral M. (1996) Variability of feeding processes in the cockle *Cerastoderma edule* (L.) in response to changes in seston concentration and composition. *J Exp Mar Biol Ecol*, 197:121–143.

Ito, S., Imai, T. (1955) Ecology of oyster bed I: on the decline of productivity due to repeated cultures. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 5:251–268.

Jambeck J.R., Geyer R., Siegler T.R., Perryman M., Andrady A., Narayan R., Law K.R. (2015) Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223).

Jones P.R., Cottrell M.T., Kirchman D.L., Dexter S.C. (2007) Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol*, 53:153–62.

Joosten, P.H.M., Tiemersma, E., Threels, A., Caumartindhieux, C., Rombout, J. (1997) Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish Shellfish Immunol*, 7:471–485.

Karlsson Ö., Jonsson P.R., Larsson A.I. (2003) Do large seston particles contribute to the diet of the bivalve *Cerastoderma edule*? *Marine Ecology Progress Series*, 261:161-173.

Kautsky N., Evans S. (1987) Role of biodeposition by *Mytilus edulis* in the circulation of matter and nutrients in a Baltic coastal ecosystem. *Marine Ecology Progress Series*, 38:201–212.

Kemp W.M., Boynton W.R., Adolf J.E. *et al.* (2005) Eutrophication of Chesapeake Bay: historical trends and ecological interactions. *Marine Ecology Progress Series*, 303:1–29.

Kiørboe T., Møhlenberg F. (1981) Particle selection in suspension-feeding bivalves. *Mar Ecol Prog Ser*, 5:291–296.

Kobayashi M., Hofmann E.E., Powell E.N., Klinck J.M., Kusaka, K. (1997) A population dynamics model for the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 149:285–321.

Kusuki, Y. (1981) Fundamental studies on the deterioration of oyster growing grounds. *Bulletin of the Hiroshima Fisheries Experimental Station*, 11:1–93.

Langdon C. J., Newell R. I. E. (1990) Utilization of detritus and bacteria as food sources by two bivalve suspension-feeders, the oyster *Crassostrea virginica* and the mussel *Geukensia demissa*. *Marine Ecology Progress Series*, 58:299–310.

Law K.L., Moret-Ferguson S., Maximenko N.A., Proskurowski G., Peacock E.E., Hafner J., Reddy C.M. (2010) Plastic accumulation in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Science*, 329:1185-1188.

Lehane C., Davenport J. (2002) Ingestion of mesozooplankton by three species of bivalve; *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule* and *Aequipecten opercularis*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 82:615–619.

Lehane C., Davenport J. (2004) Ingestion of bivalve larvae by *Mytilus edulis*: experimental and field demonstrations of larviphagy in farmed blue mussels. *Marine Biology*, 145, 101-107.

Levinton J.S., Ward J.E., Thompson R.J. (1996) Biodynamics of particle processing in bivalve molluscs: models, data, and future directions. *Invert Biol*, 115:232–242.

Levinton J.S., Ward J.E., Shumway S.E. (2002) Feeding responses of the bivalves *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* to chemical

composition of fresh and aged kelp detritus. *Mar Biol*, 141:367–376.

Li J., Yang D., Li L., Jabeen K., Shi H. (2014) Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental Pollution*, 207:190-195.

Locke, A., Doe, K.G., Fairchild, W.L., Jackman, P.M., Reese, R.J. (2009) Preliminary evaluation of effects of invasive tunicate management with acetic acid and calcium hydroxide on non-target marine organisms in Prince Edward Island, Canada. *Aquatic Invasions*, 4:221–236.

Loosanoff V.L., 1949. On the food selectivity of oysters. *Science*, 110, 122.

Lotze H.K., Lenihan H.S., Bourque B.J. *et al.* (2006) Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science*, 312:1806–1809.

Lowe A., Galloway A., Yeung J., Dethier M., Duggins D. (2014) Broad sampling and diverse biomarkers allow characterization of nearshore particulate organic matter. *Oikos*, 123(11):1341–1354.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent". *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1): 265–75.

Lumare, F. (1988) *Penaeus japonicus*: biologia e allevamento. In: *Penaeus japonicus* biologia e sperimentazione, Ente Sviluppo Agricolo Veneto. Minaro: Venezia, p. 11.

Lusher, A. (2015). Microplastics in the marine environment: Distribution, interactions and effects. In M. Bergmann, L. Gutow & M. Klages (Eds.), *Marine anthropogenic litter* (pp. 245–312), Berlin: Springer.

MacDonald B.A., Ward J.E. (1994) Variation in food quality and particle selectivity in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia). *Mar Ecol Prog Ser*, 108:251– 264.

Marcus N.H., Boero F. (1998) Minireview: the importance of benthic-pelagic coupling and the forgotten role of life cycles in coastal aquatic systems. *Limnology and Oceanography*, 43:763–768.

Marques, C.R., Pereira, R., Antunes, S.C., Cachada, A., Duarte, A.C., Gonçalves, F. (2011) In situ aquatic bioassessment of pesticides applied on rice fields using a microalga and daphnids. *The Science of the Total Environment* 409 (18):3375-3385.

Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., Vallette F.M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41:31-91.

Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., Kaminuma, T. (2001) Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ Sci Technol*, 35:318–324.

Millot C. (1999) Circulation in the Western Mediterranean Sea. *J Mar Syst*, 20:423–442.

Mitchell, I.M. (2006) In situ biodeposition rates of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) on a marine farm in Southern Tasmania (Australia). *Aquaculture* 257:194–203.

Moore CM. (2008). Synthetic Polymers in the Marine environment: A Rapidly Increasing, Long-Term Threat. *Environmental Research*, 108(2): 131–39.

Moore C.J., Moore S.L., Leecaster M.K., Weisberg S.B. (2001) A comparison of plastic and plankton in the North Pacific central gyre. *Mar Pollut Bull*, 42:1297-1300.

Moreira dos Santos, M., Moreno-Garrido, I., Gonçalves, F., Soares, A.M.V.M., Ribeiro, R. (2002) An in situ bioassay for estuarine

environments using the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(3):567-574.

Moreno-Garrido, I. (2008) Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99(10):3949-3964.

Morrison C.M. (1996) Adductor and mantle musculature. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.E. (Eds.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, USA, pp. 169–183.

Navarro E., Iglesias J.I.P., Ortega M. (1992) Natural sediment as a food source for the cockle *Cerastoderma edule* (L.): effect of variable particle concentration on feeding, digestion and the scope for growth. *J Exp Mar Biol Ecol*, 156:69–87.

Navarro E., Iglesias J.I.P., Ortega M.M. (1992) Natural sediment as a food source for the cockle *Cerastoderma edule* (L.): effect of variable particle concentration on feeding, digestion and the scope for growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 156:69-87.

Navarro E., Widdows J. (1997) Feeding physiology of *Cerastoderma edule* in response to a wide range of seston concentrations. *Mar Ecol Prog Ser*, 152:175–186.

Newell R., Johnson L., Kofoed L. (1977) Adjustment of the components of energy balance in response to temperature change in *Ostrea edulis*. *Oecologia*. 30(2):97-110.

Newell R.I.E., Jordan S.J. (1983) Preferential ingestion of organic material by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Ecol Prog Ser*, 13:47–53.

Newell R.I.E., Ott J.A. (1999) Macrobenthic Communities and Eutrophication In: Malone, TC, NA Smadlaka, A Malej and LW Harding Jr. Ecology and ecosystem function of benthic communities in Chesepeake Bay and the Northern Adriatic Sea In. Land-Use Water quality and fisheries: a comparative ecosystem analysis of the northern Adriatic Sea and the Chesapeake Bay. Coastal and Estuarine comparisons series, American Geophysical Union.

Newell, R.I.E. (2004) Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: a review. *Journal of Shellfish Research*, 23, 51–61.

Newell, R.I.E., Cornwell, J.C., Owens, M.S. (2002) Influence of simulated bivalve biodeposition and microphytobenthos on

sediment nitrogen dynamics: a laboratory study. *Limnology and Oceanography*, 47, 1367–1379.

Newell, R.I.E., Kemp, W.M., Hagy III, J.D., Cerco, C.F., Testa, J.M., Boynton, W.R. (2007) Top-down control of phytoplankton by oysters in Chesapeake Bay, USA: comment on Pomeroy *et al.* (2006), *Marine Ecology Progress Series*, 341:293–298.

Nixon S.W. (1988) Physical energy inputs and the comparative ecology of lake and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 33:1005–1025.

Officer C.B., Smayda T.J., Mann R (1982) Benthic filter feeding: a natural eutrophication control. *Marine Ecology Progress Series*, 9:203-210.

Oliveira M., Ribeiro A., Hylland K., Guilhermino L. (2013) Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators*, 34:641–647.

Ory C.O., Sobral P., Ferreira J.L., Thiel M. (2017) Amberstripe scad *Decapterus muroadsi* (Carangidae) fish ingest blue microplastics resembling their copepod prey along the coast of Rapa Nui (Easter

Island) in the South Pacific subtropical gyre. *Science of the Total Environment*, 586:430–437.

OSPAR, 2007. OSPAR Pilot Project on Monitoring Marine Beach Litter.

Pane L., Agrone C., Giacco E., Somà A., Mariottini G.L. (2012) Utilization of marine crustaceans as study models: a new approach in marine ecotoxicology for european (REACH) regulation. *Ecotoxicology*, Dr. Ghousia Begum (Ed.), InTech..

Pane L., Feletti M., Bertino C., Carli A. (1998) Viability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads. *Aquaculture International*, 6:411–420.

Pane L., Giacco E., Corrà C., Greco G., Mariottini G.L., Varisco F., Faimali M. (2008b) Ecotoxicological Evaluation of Harbour Sediments Using Marine Organisms from Different Trophic Levels. *J Soils Sediments*, 8(2):74–79.

Pane L., Giacco E., Mariottini G.L. (2006). Utilizzo di *Tigriopus fulvus* (Copepoda: Harpacticoida) in ecotossicologia. Saggi con disperdenti e tensioattivi. *Biol Mar Medit*, 13(2):348-349.

Pane L., Giacco E., Mariottini G.L. (2007). Uso di *Tigriopus fulvus* (Copepoda: Harpacticoida) nella valutazione del rischio ecotossicologico in ambiente marino. *Biol Mar Medit*, 14(1), 186-188.

Pane L., Mariottini G.L., Giacco E. (2015) Ecotoxicological assessment of the micelle encapsulator F-500. *Ecotox Environ Safe*, 118:167-176.

Pane L., Mariottini G.L., Lodi A., Giacco E. Effects of heavy metals on laboratory reared *tigriopus fulvus fischer* (Copepoda: Harpacticoida). In book: Heavy Metal Pollution, Nova Science Publishers, Inc., 6:157-165; 2008a.

Pastoureaud A., Heral M., Prou J., Razet D., Russu P. (1995) Particle selection in the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) studied by pigment HPLC analysis under natural food conditions. *Oceanologica Acta*, 19:79-88.

Pastoureaud A., Heral M., Prou J., Razet D., Russu P. (1996) Particle selection in the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) studied by

pigment HPLC analysis under natural food conditions. *Oceanologica Acta*, 19, 79–88.

Paul-Pont I., Dhand N.K., Whittington R.J. (2013a) Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 412:202–214.

Paul-Pont I., Dhand N.K., Whittington R.J. (2013b) Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission. *Dis Aquat Org*, 105:127–138.

Paul-Pont I., Evans O., Dhand N.K., Rubio A., Coad P., Whittington R.J. (2014) Descriptive epidemiology of mass mortality due to Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in commercially farmed Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the Hawkesbury River estuary. *Aquaculture*, 423:146–159.

Pawar S.N., Edgar K.J. (2012) Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33;3279-3305.

Pearson T.H., Black K.D. (2001) The environmental impact of marine fish cage culture. In: Black, K.D. (Ed.), *Environmental Impacts of Aquaculture*. Academic Press, Sheffield, pp. 1–31.

Porter E.T., Cornwell J.C., Sanford L.P. (2004) Effect of oysters *Crassostrea virginica* and bottom shear velocity on benthic-pelagic coupling and estuarine water quality. *Marine Ecology Progress Series*, 271:61–75.

Powell E.N., Hoffmann E.E., Klinck J.N., Ray S.M. (1992) Modeling oyster populations: 1. A commentary on filtration rate. Is faster better? *Journal of Shellfish Research*, 11:387-398.

Prins T.C., Smaal A.C., Pouwer A.J. (1991) Selective ingestion of phytoplankton by the bivalves *Mytilus edulis* L. and *Cerastoderma edule* (L.). *Hydrobiological Bulletin*, 25:93–100.

Prins T.C., Smaal A.C., Dame R.F. (1998) A review of the feedbacks between bivalve grazing and ecosystem processes. *Aquatic Ecology*, 31:349–359.

Raffaelli D., Bell E., Weithoff G. *et al.* (2003) The ups and downs of benthic ecology: considerations of scale, heterogeneity and surveillance for benthic-pelagic coupling. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 285:191–203.

Ramos, J.A., Barletta, M., Costa, M.F. (2012) Ingestion of nylon threads by Gerreidae while using a tropical estuary as foraging grounds. *Aquatic Biology*, 17(1):29-34.

Remminghorst U., Rehm B.H.A. (2006) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett*, 28:1701-1712.

Riisgard H.U., Larsen P.S. (2000b) A comment on experimental techniques for studying particle capture in filter-feeding bivalves. *Limnol Oceanogr*, 45:169– 193.

Riisgard H.U., Larsen P.S., Nielsen N.F. (1996) Particle capture in the mussel *Mytilus edulis*: the role of laterofrontal cirri. *Mar Biol*, 127:259–266.

Rinaudo M. (1992) On the abnormal exponents a_n and a_D in Mark-Houwink type equations for wormlike chain polysaccharides. *Polymers Bulletin*, 27:585–589.

Rinaudo M. (2008) Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym Int*, 57:397-430.

Rochman C. M. (2015). The complex mixture, fate and toxicity of chemicals associated with plastic debris in the marine environment. In M. Bergmann, L. Gutow & M. Klages (Eds.), *Marine anthropogenic litter* (pp. 117–140), Berlin: Springer.

Ruesink J.L., Lenihan H.S., Trimble A.C., Heiman K.W., Micheli F., Byers J.E., Kay M.C. (2005) Introduction of non-native oysters: ecosystem effects and restoration implications. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 36:643–689.

Rummel C.D., Jahnke A., Gorokhova E., Kuhnel D., Schmitt-Jansen M. (2017) Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol Lett*, 4:258–267.

Rummel C.D., Loder M.G.J., Fricke N.F., Lang T., Griebeler E.-M., Janke M., Gerdts G. (2016) Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North sea and Baltic sea. *Mar Pollut Bull*, 102(1):134-141.

Santana M.F.M., Ascer L.G., Custódio M.R., Moreira F.T., Turra A. (2016) Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: Rapid evaluation through bioassessment. *Mar Pollut Bull*, 106(1–2):183–189.

Schindler D.E., Scheuerell M.D. (2002) Habitat coupling in lake ecosystems. *Oikos*, 98:177–189.

Shumway S.E., Cucci T., Newell R.C., Yentsch C.M. (1985) Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. *J Exp Mar Biol Ecol*, 91:77– 92.

Shumway S.E., Davis C., Downey R., Karney R., Kraueter J., Parsons J., Rheault R., Wikfors G. (2003) Shellfish aquaculture — In praise of sustainable economies and environments. *World Aquaculture*, 34(4):15-18.

Singh B., Sharma N. (2008) Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93(3):561-584.

Smaal A.C. (1997) Food supply and demand of bivalve suspension feeders in a tidal system. PhD thesis, University of Groningen, the Netherlands, 237 pp.

Smetacek V.S. (1985) Role of sinking in diatom life-history cycles - ecological, evolutionary and geological significance. *Marine Biology*, 84:239–251.

Smidsrød O., Skjak-Braek G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trend Biotechnol*, 8:71-78.

Smith C.R., Mincks S., DeMaster D.J. (2006) A synthesis of benthopelagic coupling on the Antarctic shelf: Food banks, ecosystem inertia and global climate change. Deep-Sea Research Part II. *Topical Studies in Oceanography*, 53:875–894.

Soo C.-L., Chen C.-A., Bojo O., Hii Y.-S. (2017) Feasibility of Marine Microalgae Immobilization in Alginate Bead for Marine Water

Treatment: Bead Stability, Cell Growth, and Ammonia Removal,” *International Journal of Polymer Science*, vol. 2017, Article ID 6951212, 7 pages.

Strayer D.L., Caraco N.F., Cole J.J., Findlay S., Pace M.L. (1999) Transformation of freshwater ecosystems by bivalves: A case study of zebra mussels in the Hudson River. *BioScience*, 49:19–27.

Stuart V., Field J.G., Newell C.R. (1982) Evidence for Absorption of Kelp Detritus by the Ribbed Mussel *Aulacomya* after Using a New ⁵¹Cr–Labelled Microsphere Technique. *Marine Ecology Progress Series*, 9:263–271.

Su H.M., Lin H.J., Hung J.J. (2004) Effects of tidal flushing on phytoplankton in a eutrophic tropical lagoon in Taiwan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 61:739–750.

Suess E. (1980) Particulate organic-carbon flux in the oceans - surface productivity and oxygen utilization. *Nature*, 288:260–263.

Sun X., Li Q., Zhu M., Liang J., Zheng S., Zhao Y. (2017) Ingestion of microplastics by natural zooplankton groups in the northern South China Sea. *Mar Pollut Bull*, 115:217–224.

Taylor G.T., Zheng D., Lee M, Troy P.J, Gyananath G, Sharma S.K. (1997) Influence of surface properties on accumulation of

conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters. *Biofouling*, 11:31–57.

Ten Winkel E.H., Davids C. (1982) Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Mollusca:Bivalvia). *Freshw Biol*, 12:553– 558.

Teuten E.L., Rowland S.J., Galloway T.S., Thompson R. C. (2007). Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental Science and Technology*, 41:7759–7764.

Teuten E.L., Saquing J.M., Knappe D.R.U., Barlaz M.A., Jonsson S., Björn A., Rowland S. J., Thompson R.C., Galloway T.S., Yamashita R., Ochi D., Watanuki Y., Moore C., Viet P., Tana T. S., Prudente M., Boonyatumanond R., Zakaria M.P., Akkhavong K., Ogata Y., Hirai H., Iwasa S., Mizukawa K., Hagino Y., Imamura A., Saha M., Takada S. (2009a) Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364:2027-2045.

Thompson R.C., Olsen Y., Mitchell R.P., Davis A., Rowland S.J., John A.W.G., McGonigle D., Russell A.E. (2004) Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, 304:838-838.

Troost K., Kamermans P., Wolff W.J. (2008) Larviphagy in native bivalves and an introduced oyster. *Journal of Sea Research*, 60:157-163

Turner J.T. (2002) Zooplankton fecal pellets, marine snow and sinking phytoplankton blooms. *Aquatic Microbial Ecology*, 27(1):57-102.

UNEP, 2005. Marine Litter, an Analytical Overview.

Urrutia M.B., Iglesias J.I.P., Navarro E., Prou J. (1996) Feeding and absorption in *Cerastoderma edule* under environmental conditions in the bay of Marennes-Oléron (Western France). *J Mar Biol Assoc UK*, 76:431–450.

Van Cauwenberghe L., Claessens M., Vandegehuchte M.B., Janssen C.R. (2015a) Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environ Pollut (Barking, Essex: 1987)*, 199:10-17.

Van Cauwenberghe L., Janssen C.R. (2014) Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193:65-70.

Van Cauwenberghe L., Vanreusel A., Mees J., Janssen C.R. (2013b) Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environ Pollut*, 182:495-499.

van der Meer J. (2006) An introduction to Dynamic Energy Budget (DEB) models with special emphasis on parameter estimation. *Journal of Sea Research*, 56:85–102.

van der Veer H., Cardoso J., van der Meer J. (2006) The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *Journal of Sea Research*, 56(2):107–124.

Vandermeersch G., Van Cauwenberghe L., Janssen C.R., Marques A., Granby K., Fait G., Kotterman M.J.J., Diogène J., Bekaert K., Robbens J., Devriese L. (2015). A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*, 143:6–55.

Velasco L.A., Navarro J.M. (2002) Feeding physiology of infaunal (*Mulinia edulis*) and epifaunal (*Mytilus chilensis*) bivalves under a wide range of concentrations and qualities of seston. *Marine Ecology Progress Series*, 240:143–155.

Ventilla R.F. (1984) Recent development in the Japanese oyster culture industry. *Advances in Marine Biology*, 21:1–57.

Vianello A., Boldrin A., Guerriero P., Moschino V., Rella R., Sturaro A., Da Ros L. (2013) Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: first observations on occurrence, spatial patterns and identification. *Estuar Coast Shelf Sci* 130:54-61.

Villani P. (1989) Fitoplancton tecniche di coltura e utilizzazione. ENEA. Quaderni Tecnici di Acquacolture 2, pp. 43.

von Moos N., Burkhardt-Holm P., Kohler A. (2012) Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ Sci Technol*, 46(20):11327-11335.

Walker C. H., Hopkin S. P., Sibly R. M., Peakall, D.B. (1996) Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, London, 321 pp.

Walker, C.H. (1998) Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 106(2):613–620.

Walne P.R. (1970) Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish Invest*, 26:1-62.

Ward J.E. (1996) Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing and fate. *Invertebr Biol*, 115:218– 231.

Ward J.E., Levinton J.S., Shumway S.E., Cucci T. (1998a) Particle sorting in bivalves: in vivo determination of the pallial organs of selection. *Mar Biol*, 131:283–292.

Ward J.E., Sanford L.P., Newell R.I.E., MacDonald B.A. (2000) The utility of in vivo observations for describing particle capture processes in suspension-feeding bivalve molluscs. *Limnol Oceanogr*, 45(5):1203–1210.

Ward J.E., Sanford L.P., Newell R.I.E., MacDonald, B.A. (1998b) A new explanation of particle capture in suspension-feeding bivalve molluscs. *Limnol Oceanogr*, 43(5):741– 752.

Ward J.E., Shumway S.E. (2004) Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 300:83–130.

Wong C.S., Green D.R., Cretney W.J. (1974) Quantitative tar and plastic waste distributions in Pacific Ocean. *Nature*, 247:30-32.

Wright R.T., Coffin R.B., Ersing C.P., Pearson D. (1982) Field and laboratory measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton. *Limnol Oceanogr*, 27:91–98.

Yonge C.M. (1936) The evolution of the swimming habit in the Lamellibranchia. *Memoire du Museum Royal d'Histoire Naturelle de Belgique* 3, 77–100.

Zimmermann U., Klöck G., Federlin K., Hannig K., Kowalski M., Bretzel R.G. *et al.* (1992) Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis*, 13:269-274.