



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE
IN BIOLOGIA MARINA

Microstruttura dei settlement-marks negli otoliti
di triglia di fango *Mullus barbatus*
(Linnaeus, 1758) nel Mare Adriatico

Tesi di laurea in Valutazione delle risorse biologiche e gestione
sostenibile della pesca

Relatore

Prof. Marco Stagioni

Presentata da

Samantha Boero

Sessione Marzo 2024

Anno Accademico 2022/2023

Indice

1. INTRODUZIONE	3
1.1 OTOLITI	3
1.1.1 Descrizione generale	3
1.1.2 Formazione.....	4
1.1.3 Microstruttura.....	6
1.1.4 Applicazioni dello studio dell'età.....	7
1.2 MEDITS	9
1.2.1 Cenni di storia	9
1.2.2 Metodo di campionamento	11
1.3 <i>Mullus barbatus</i>	13
1.3.1 Introduzione alla specie.....	13
1.3.2 Settlement.....	17
1.3.3 Pesca.....	19
1.4 IL MICROSCOPIO A FORZA ATOMICA.....	20
1.4.1 La microscopia a scansione di sonda	20
1.4.2 Il microscopio a forza atomica (AFM).....	22
2. SCOPO DELLA RICERCA	26
3. MATERIALI E METODI	27
3.1 AREA DI STUDIO	27
3.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	29
3.2.1 Scelta dei campioni ed estrazione	29
3.2.2 Lavaggio dei campioni.....	30
3.3 ANALISI ALLOMETRICHE	31
3.3.1 Acquisizione delle immagini.....	31
3.3.2 Elaborazione delle immagini.....	33
3.4 CHECK DEMERSALE	33

3.4.1 Individuazione check demersale sugli otoliti interi.....	33
3.4.2 Sezione e lavorazione degli otoliti	36
3.5 ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI ALL'AFM.....	39
3.5.1 Acquisizione delle immagini.....	39
3.5.2 Calcolo della rugosità.....	41
3.6 ANALISI STATISTICHE	42
3.6.1 Allometria.....	42
3.6.2 Margine degli otoliti.....	43
3.6.4 Check demersale	44
3.6.4 Analisi del check demersale all'AFM	44
4. RISULTATI	44
4.1 MISURE ALLOMETRICHE	44
4.2 ANALISI DEL MARGINE DEGLI OTOLITI.....	47
4.3 CHECK DEMERSALE	49
4.4 ANALISI AL MICROSCOPIO A FORZA ATOMICA	51
5. DISCUSSIONE	54
5.1 MISURE ALLOMETRICHE	54
5.2 CHECK DEMERSALE	55
5.3 ANALISI AL MICROSCOPIO A FORZA ATOMICA	57
6. CONCLUSIONI	59
BIBLIOGRAFIA	60

1.INTRODUZIONE

1.1 OTOLITI

1.1.1 Descrizione generale

Gli otoliti sono degli organi facenti parte dell'apparato sensoriale dei Teleostei; si trovano infatti nell'orecchio interno dei pesci e consistono in tre paia di strutture calcificate incapsulate in vescicole otiche (Green *et al.*, 2009). Nei pesci ossei l'orecchio interno ricopre due funzioni: quella di sistema uditivo in grado di percepire le onde sonore e quella di sistema vestibolare, il quale rileva le accelerazioni lineari e angolari, permettendo così all'animale di mantenere l'equilibrio. L'orecchio interno è costituito da una struttura pari incastonata nel cranio, situata in entrambi i lati della testa in prossimità del mesencefalo (Panfili *et al.*, 2002). Ogni orecchio è formato da canali auricolari, sacchi e dotti nei quali si trova un liquido viscoso, l'endolinfa, in equilibrio con l'ambiente esterno. Nei Teleostei i canali semicircolari sono tre e sono posti ortogonalmente l'uno con l'altro. I suddetti canali si aprono in delle camere interconnesse tra di loro, le vescicole otiche, le quali contengono un epitelio sensoriale, la *macula*; essa permette all'animale la percezione sia delle onde sonore, sia dell'accelerazione lineare (Panfili *et al.*, 2002).

Le tre vescicole otiche all'interno delle quali sono situati gli otoliti prendono il nome di *sacculus*, *utricle* e *lagena*. Al loro interno si trovano rispettivamente gli otoliti *sagitta*, *lapillus* e *asteriscus*. (Figura 1.1).

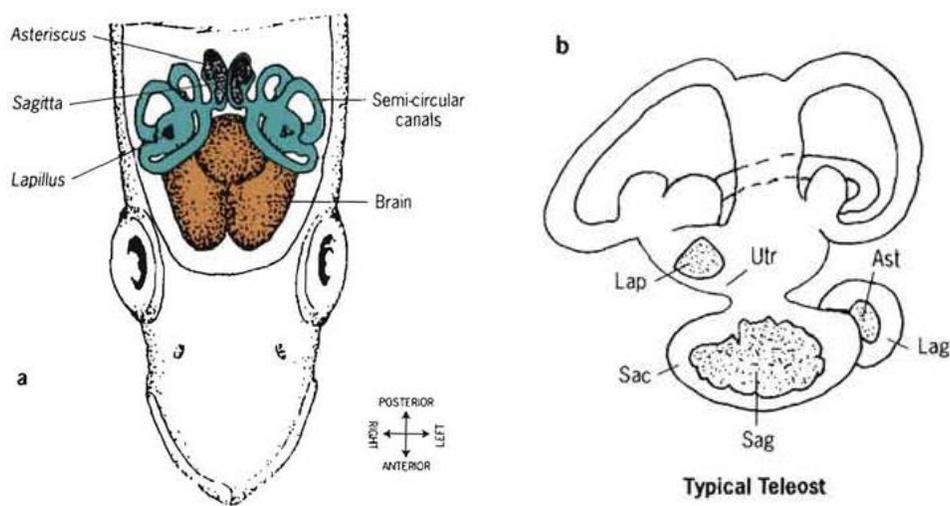


Figura 1.1. *a)* sezione dorsale del cranio e visione dell'orecchio interno con i canali semicircolari e posizione degli otoliti. *b)* rappresentazione vescicole otiche e dei rispettivi otoliti. (Panfili *et al.*, 2002).

Gli otoliti sono compressi lateralmente e si differenziano tra loro per diversa forma e dimensione (Panfili *et al.*, 2002).

Sagittae e lapilli si formano prima durante lo sviluppo rispetto agli asterisci, i quali, invece, in alcune specie non si formano prima della schiusa delle uova o anche dopo. Le sagittae sono gli otoliti maggiormente utilizzati per la stima dell'età e per altre analisi in quanto sono quelli di maggiori dimensioni e di conseguenza anche quelli più facili da estrarre (Green *et al.*, 2009).

I piani di orientamento degli otoliti seguono quelli del pesce: sagittale, frontale e trasversale. La faccia prossimale della sagitta presenta una scanalatura, il *sulcus acusticus*. (Figura 1.2). Quest'ultimo ha un ruolo fondamentale all'interno dell'apparato sensoriale perché permette agli otoliti di agire come meccanorecettori. Essi, infatti, convertono le stimolazioni meccaniche in impulsi elettrici attraverso la stimolazione dell'epitelio sensoriale cigliato del *sacculus*, la *macula*; quest'ultima è in diretta comunicazione proprio con il *sulcus acusticus* che a sua volta è connesso con il nervo acustico che riceve l'impulso (Panfili *et al.*, 2002).

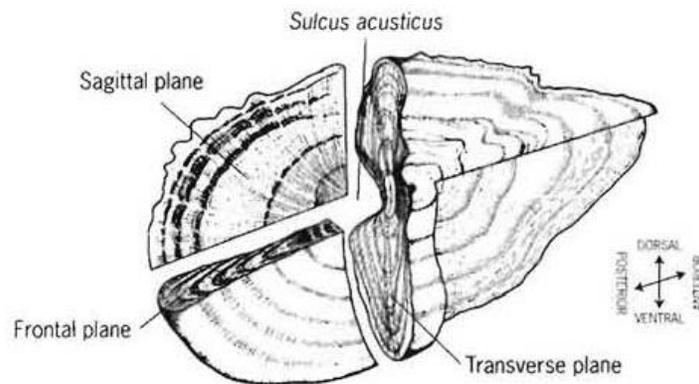


Figura 1.2. Sezioni della sagitta (Panfili *et al.*, 2002)

1.1.2 Formazione

Gli otoliti sono composti prevalentemente (> 90%) da materiale inorganico, ovvero carbonato di calcio (CaCO₃) e per la restante parte (<10%) da materiale organico quali glicoproteine, proteoglicani e collagene (Maldonado-Coyac *et al.*, 2021). Il carbonato di calcio che forma gli otoliti è, nella maggior parte dei casi, sotto forma di aragonite, un polimorfo della calcite instabile

dal punto di vista cristallografico. Tuttavia, i diversi modi in cui cristallizza il carbonato di calcio possono dare origine ad otoliti in cui la parte minerale è formata da altri polimorfi come calcite o vaterite, anche esso instabile rispetto alla calcite. (Maldonado-Coyac *et al.*, 2021).

La formazione avviene tramite precipitazione minerale. Tutti i precursori necessari alla mineralizzazione sono contenuti proprio nell'endolinfa, che viene prodotta dal pesce stesso. Le proteine dell'endolinfa mediano la dimensione, la forma e l'orientamento dei cristalli. Nello specifico i cristalli di aragonite presentano una forma ad ago (aciculare) di lunghezza pari a circa 0,3 μm e sono raggruppati in prismi che possono variare in spessore e che si accrescono dal centro dell'otolite verso la superficie esterna (Green *et al.*, 2009).

La crescita dell'otolite durante il ciclo vitale dell'animale avviene quindi tramite una precipitazione continua ma irregolare di aragonite, mentre la materia organica viene depositata formando un reticolo lasso che si compenetra con i cristalli. Di conseguenza la composizione dell'endolinfa, la quale contiene anche ioni calcio e ioni bicarbonato, risulta essere un fattore determinante per la calcificazione e, non essendoci mediazione cellulare nella formazione o nella crescita dell'otolite, queste ultime si possono ricondurre a fattori fisici. Il fattore principale è proprio il pH dell'endolinfa; un pH acido riduce infatti il tasso di calcificazione; oltre al pH anche la temperatura risulta essere un fattore chiave per la calcificazione, in quanto variazioni di temperatura sia a scala spaziale, sia temporale possono influenzare il pH e di conseguenza la precipitazione (Nazir e Khan, 2021). Tuttavia, i soli fattori ambientali non sono sufficienti per dare una spiegazione alla biomineralizzazione, risulta quindi evidente che, la seppur piccola percentuale di parte proteica gioca un ruolo fondamentale nel processo di calcificazione degli otoliti. (Campana, 1999). È stato visto in particolare come le proteine solubili in acqua presenti nell'endolinfa possano avere un ruolo determinante nella mineralizzazione dell'otolite in quanto di queste fa parte una glicoproteina che potrebbe regolare l'accrescimento esercitando un'azione inibitoria sulla calcificazione (Green *et al.*, 2009).

L'inizio della formazione dell'otolite si verifica con l'aggregazione di particelle formate da matrice organica e parzialmente calcificate (*primordia*) e rilasciate dalle cellule epiteliali per esocitosi nell'endolinfa. I *primordia* formano il *core*, il quale viene definito come la zona calcificata che si trova all'interno del primo incremento depositato. Talvolta i *primordia* non si fondono tra di loro, in questi casi sono quindi osservabili molteplici *core* (Campana e Stevenson, 1992).

1.1.3 Microstruttura

Il processo di precipitazione porta alla deposizione di materiale che risulta visibile nella struttura bipartita a bande alterne concentriche tipica degli otoliti. Le bande si possono distinguere in base alla composizione. Possono essere definite in vari modi, ad esempio Kalish (1995) fa riferimento a queste due bande come zone Le D. La zona L è rappresentata da una banda la cui costituzione è data prevalentemente da parte minerale, essa appare traslucida se esposta a luce trasmessa e in rilievo se visualizzata al SEM; mentre la zona D è una banda ricca di proteine che appare più densa e opaca se esposta a luce trasmessa, se osservata al SEM appare invece come un solco (Green *et al.*, 2009).

La coppia formata da una banda traslucida seguita da una opaca viene definita come incremento di crescita o anello di crescita. Per i pesci che si trovano in acque temperate solitamente la zona opaca si forma durante un periodo durante il quale si ha una rapida crescita dell'animale, quindi in primavera-estate, mentre la zona ialina indica un periodo in cui il tasso di crescita è piuttosto basso come, ad esempio, in autunno-inverno (Aldanondo *et al.*, 2015).

I pattern di crescita che si possono rilevare tramite lo studio degli otoliti sono i seguenti: incrementi primari, incrementi stagionali o annuali e le discontinuità.

Gli incrementi primari sono formati dall'alternanza di bande ialine e opache attorno al *core* dell'otolite. Pannella, (1971-1974) è stato il primo a proporre l'ipotesi di una deposizione giornaliera degli incrementi primari. Diversi studi hanno portato i ricercatori a dedurre una effettiva formazione quotidiana degli incrementi primari. Tuttavia, non in tutte le specie la deposizione degli incrementi primari avviene giornalmente e non sempre questi sono facilmente individuabili. Spesso ci possono essere delle difficoltà nel discernere gli incrementi giornalieri e quelli invece sub-giornalieri. Questi ultimi vengono maggiormente depositati durante i periodi di crescita rapida e si possono distinguere dagli incrementi giornalieri perché tendono ad essere meno definiti.

Gli incrementi stagionali o annuali sono dei pattern visibili anche negli otoliti non ancora trattati, spesso chiamati *annuli*, questi pattern di crescita avvengono durante le stagioni di crescita. Si differenziano dagli incrementi giornalieri per via del loro maggiore spessore, per la differente dimensione dei cristalli di aragonite, per la diversa frequenza di discontinuità strutturali e strati di materiale organico (Panfili *et al.*, 2002).

Analizzando la microstruttura degli otoliti, inoltre, è possibile notare la presenza di discontinuità che vanno ad interrompere i pattern di crescita e che possono influenzare anche la direzione in cui avviene la deposizione dei cristalli. Queste discontinuità strutturali possono essere dovute a varie cause: ad esempio a periodi di stress o di condizioni poco favorevoli per la crescita dell'animale; ma possono anche essere dovute a importanti eventi che avvengono naturalmente durante il ciclo di vita come: la schiusa delle uova, il momento in cui inizia a cibarsi o il settlement, che solitamente corrisponde al passaggio da un ambiente pelagico ad uno demersale (Campana e Nielson, 1985). I settlement marks, altro termine con cui ci si può riferire alle discontinuità appena citate, possono presentarsi in maniera differente nelle varie specie. In alcune specie si possono essere visibili come dei falsi anelli, in altre invece sono identificabili come una zona dove risulta difficile distinguere gli incrementi (Wilson e McCormick, 1999). Queste discontinuità si possono presentare anche come un brusco cambio nell'ampiezza e nell'aspetto delle bande opache e ialine. I settlement marks e altre discontinuità derivanti da fattori fisiologici sono molto utilizzati negli studi di stima dell'età (Raventòs e Macpherson, 2011).

1.1.4 Applicazioni dello studio degli otoliti

Stima dell'età

Gli otoliti sono uno strumento cardinale per gli studi in ambito ecologico e anche per la gestione delle risorse alieutiche.

La crescita di questi è continua per tutto il ciclo vitale dell'animale e una caratteristica fondamentale è data dal fatto che gli otoliti continuano a depositare incrementi anche quando l'animale si trova in condizioni di denutrizione o di salute precarie; sebbene queste possano comportare delle modifiche del pattern di deposizione. Un'altra caratteristica degli otoliti estremamente rilevante e utile al fine degli studi sopra citati è quella di essere strutture che non vengono riassorbite; ciò significa che il materiale minerale una volta depositato non viene riutilizzato dall'organismo nemmeno durante periodi di denutrizione.

Uno degli studi per cui vengono maggiormente utilizzati gli otoliti grazie anche a queste qualità è la stima dell'età dei pesci, basata sul conteggio degli *annuli* così come sugli incrementi giornalieri. Lo studio dell'età permette di ricavare curve di crescita e pone le basi per studi riguardanti le

dinamiche di popolazione, la mortalità, il reclutamento e altri parametri di popolazioni fondamentali per gli studi ecologici e per la gestione delle risorse ittiche. Lo studio della stima dell'età si effettua tramite un'osservazione diretta degli otoliti. Per questa procedura gli otoliti vengono precedentemente preparati. Vi sono diverse metodologie di preparazione degli otoliti in base anche al tipo di osservazione necessaria per lo studio. La preparazione più immediata consiste nel porre gli otoliti in un liquido quale acqua di mare, acqua distillata o soluzione alcolica e illuminare il campione, posto su una superficie scura, dall'alto. In questo modo si possono già visualizzare degli incrementi di crescita, questo soprattutto negli otoliti più sottili e traslucidi.

In altri casi è necessario ricorrere ad una sezione per poter visualizzare al meglio gli incrementi di crescita. Un'ulteriore tecnica di preparazione è la "bruciatura", questa tecnica consiste nel sottoporre ad alte temperature una sezione fino a che diventa bruciata. In questo modo gli incrementi appaiono in maniera più definita, soprattutto la banda traslucida (Rodríguez Mendoza, 2006).

Nello studio dell'età è fondamentale assicurarsi che la stima sia corretta attraverso gli studi di validazione dell'età. Questi studi hanno come fine quello di validare la periodicità con la quale si ha la deposizione degli anelli di crescita. Vi sono vari metodi di validazione e i principali comprendono:

- rilascio di pesci la cui età è nota in natura dopo marcatura, che può essere effettuata o esternamente all'animale con, ad esempio, dei tag o chimica, in cui vengono marcate le strutture ossee utilizzate poi la stima dell'età
- identificazione del primo *annulus*, questa analisi è fondamentale in quanto un errore riguardante il primo incremento di crescita può pregiudicare la stima dell'età e portare ad una sovrastima o sottostima. Negli otoliti dove si ha una struttura ben visibile si possono utilizzare gli incrementi di crescita giornalieri per identificare correttamente il primo anno di crescita
- l'analisi degli incrementi marginali. Quest'ultima analisi si basa sullo stimare l'incremento marginale dell'otolite per classi di età e vedere qual è l'incremento marginale medio. L'incremento viene calcolato quando si ha la formazione di una banda opaca mentre è pari a zero quando si forma una banda traslucida (Campana, 2001).

Identificazione degli stock ittici

In questo campo risulta fondamentale non solo la microstruttura degli otoliti ma anche la composizione chimica. All'interno delle bande traslucide e opache si possono trovare infatti elementi in tracce caratteristici dell'ambiente nel quale si trovano gli animali. L'analisi chimica degli otoliti viene spesso usata per studiare la struttura degli stock e per ricostruire la storia ambientale dei pesci. La chimica degli otoliti ha permesso di identificare i luoghi di origine dell'animale e i pattern di distribuzione di diverse specie sia marine sia di acqua dolce (Nazir e Khan, 2021).

Studi morfometrici

Gli otoliti hanno una determinata forma che spesso è specie-specifica. Per questo spesso tassonomi e biologi fanno affidamento sulla presenza degli otoliti nei contenuti stomacali per riuscire a identificare la specie predate e la composizione della dieta dei predatori. La forma degli otoliti può variare geograficamente all'interno di una stessa specie, anche la forma quindi può essere un criterio di riconoscimento e identificazione di stock diversi di una stessa specie (Rodriguez Mendoza, 2006).

1.2 MEDITS

1.2.1 Cenni di storia

Il Mar Mediterraneo è un sistema biogeografico complesso che comprende una larga varietà di aree specifiche. Le specie bentoniche e demersali vengono spesso sfruttate maggiormente in prossimità della costa, questo a causa della dimensione ridotta della piattaforma continentale. Lo sfruttamento di queste specie è distribuito su diversi livelli: tipo di navi, tecniche di pesca, porti di sbarco, specie catturate, ecc. Di conseguenza risulta complesso avere un quadro globale dello stato di sfruttamento delle risorse ittiche (Bertrand *et al.*, 2001). Inizialmente sono state condotte alcune campagne di studio sulla pesca utilizzando la rete a strascico con divergenti; tuttavia, queste campagne erano limitate a brevi periodi di tempo e ad aree ristrette, inoltre questi studi erano condotti in periodi diversi e con metodologie differenti. Grazie ai fondi donati alla ricerca nel 1984-1985 è stato possibile iniziare un'indagine approfondita sullo stato delle risorse biologiche delle acque italiane del Mediterraneo. Vi erano 15 unità operative ripartite all'interno di tre gruppi:

- gruppo Ligure-Tirreno
- gruppo Adriatico-Ionio
- unità operativa del Canale di Sicilia

(Bertrand e Relini, 1998).

Nel 1994 è stato avviato il MEDITS (Mediterranea International Trawl Survey); una campagna di monitoraggio nel Mediterraneo, finanziata dalla Commissione Europea. Il programma è condotto nell'interno della "Data Collection Framework DCF" (Programma di Raccolta Dati sulla pesca). Lo scopo del progetto è quello di condurre uno studio comune sulle reti a strascico nel Mediterraneo in cui tutti i partecipanti utilizzano lo stesso protocollo di campionamento, la stessa attrezzatura e la stessa metodologia. Il programma MEDITS propone come fine quello di fornire informazioni riguardanti le specie bentoniche e demersali in termini di struttura demografica così come distribuzione di popolazione (Bertrand *et al.*, 2001).

In principio la campagna prevedeva la collaborazione di istituti di ricerca di quattro stati membro dell'Unione Europea, mentre attualmente vi sono 10 stati partecipanti. Dal 2002 è stata presa la decisione, da parte degli stati membro, di svolgere il MEDITS con cadenza annuale.

Attualmente la campagna MEDITS campiona un'area pari a 543000 km² attraverso 1283 stazioni ogni anno (Figura 1.3). Ad oggi i dati raccolti dalla campagna hanno permesso di svolgere studi riguardanti indici di biomassa e abbondanza delle specie demersali, parametri sul ciclo vitale soprattutto in relazione alla mortalità totale e da pesca. Sempre grazie a questi dati sono stati condotti molti studi per valutare l'impatto della pesca sulla struttura di comunità e sull'abbondanza della popolazione. (Spedicato *et al.*, 2019).

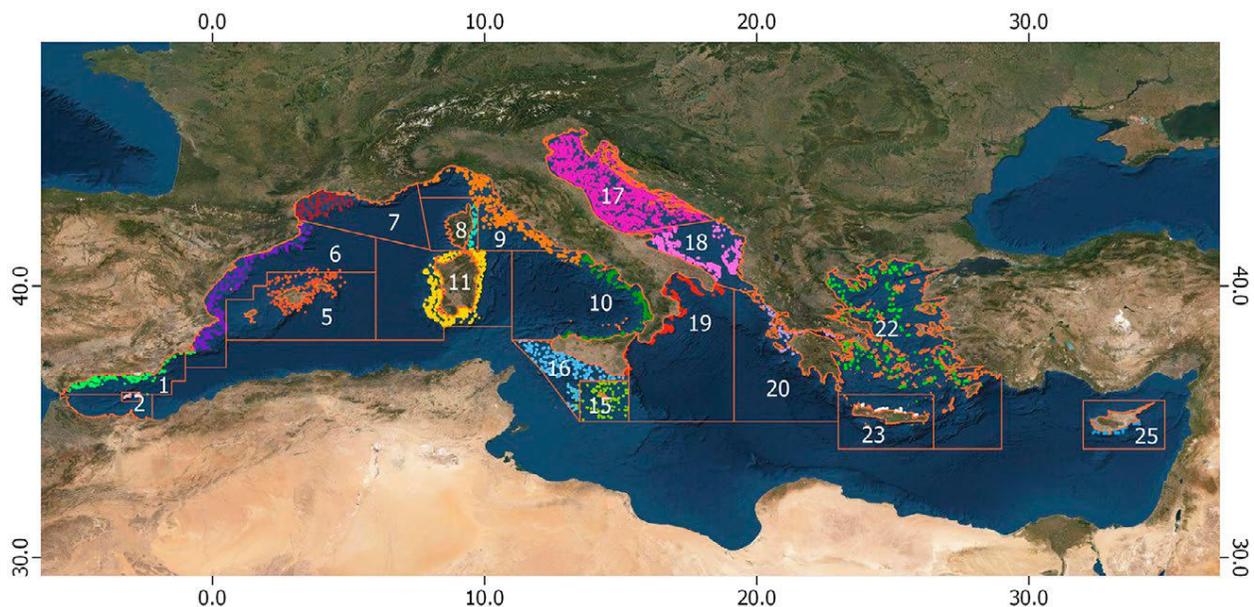


Figura 1.3. Area di azione del programma MEDITS, i punti indicano le cale di campionamento nelle GSA indette dalla General Fisheries Commission for the Mediterranean (Spedicato et al., 2019).

1.2.2 Metodo di campionamento

La rete utilizzata per il campionamento è stata appositamente studiata al fine di aumentare la cattura delle specie demersali, di conseguenza è stata realizzata una rete a strascico con un'apertura verticale pari a 2-3 metri; quindi, leggermente superiore a quelle utilizzate professionalmente nel Mediterraneo.

La rete è una rete a strascico formata da quattro pannelli (Figura 1.4). Le dimensioni della maglia sono pari a 10mm di lato, che corrispondono a 20mm di apertura della maglia. La rete deve soddisfare due specifiche:

- deve essere in grado di operare in tutte le aree e profondità selezionate dal programma MEDITS (10-800 m),
- deve avere una selettività il più bassa possibile, in modo da avere un quadro il più preciso possibile dello stato delle popolazioni campionate.

La richiesta sulla selettività della rete è in contrasto con quella che normalmente viene fatta ai pescatori, ovvero di utilizzare reti che siano per quanto più possibile selettive per dare la possibilità

alle taglie più piccole di sfuggire alla rete; ma nel caso del MEDITS è necessaria questa richiesta per gli scopi della ricerca.

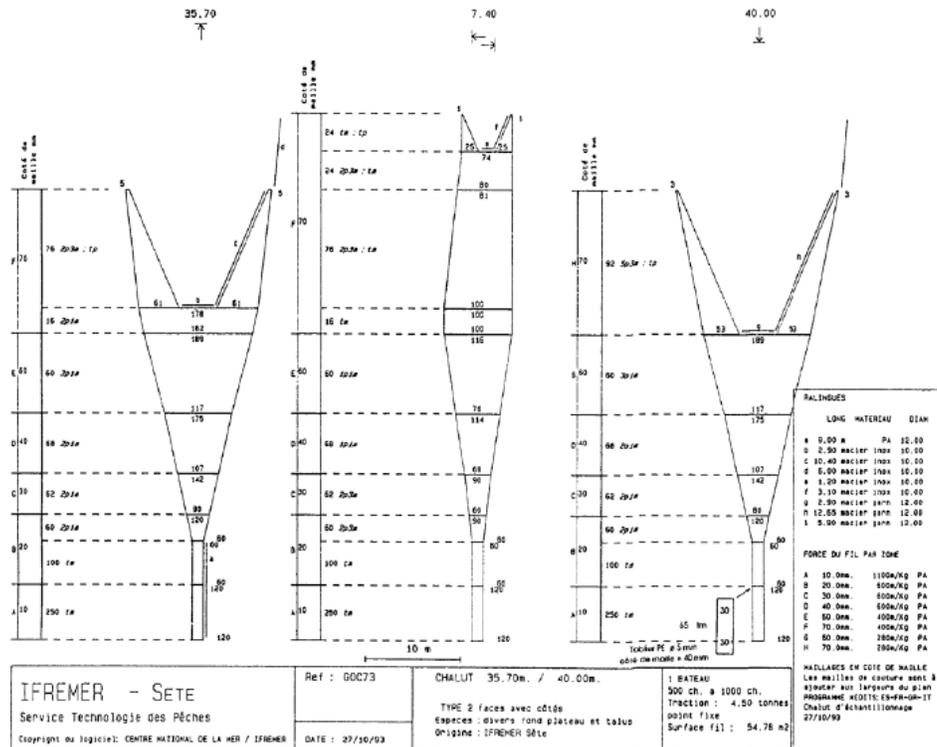


Figura 1.4. Design della rete GOC73 utilizzata per i campionamenti MEDITS (MEDITS Handbook, 2017).

Il periodo di campionamento si estende dal mese di maggio a quello di luglio con un picco delle attività nel mese di giugno. Il campionamento viene eseguito effettuando delle cale secondo uno schema stratificato per batimetria, la posizione dove attuare la cala viene estratta casualmente all'interno di ogni fascia batimetrica; salvo particolari casi le cale vengono effettuate ogni anno nella stessa posizione. Le profondità scelte (10-50 m, 51-100 m, 101-200 m, 201-500 m e 501-800 m), sono le stesse in tutte le aree e corrispondono ai limiti degli strati. Le cale devono essere eseguite solamente durante il giorno, nello specifico durante le ore di luce, il periodo viene definito da 30 minuti dopo l'alba fino a 30 minuti prima del tramonto. La velocità di campionamento è fissata a 3 nodi. La durata delle cale deve essere pari a 30 minuti quando ci si trova a profondità minori di -200 m e di 60 minuti quando la profondità è superiore ai -200 m.

Una volta terminato il campionamento, a bordo della nave le catture vengono identificate attraverso chiavi tassonomiche e suddivise in varie categorie e sottocategorie. Per ogni specie viene riportato il numero di individui e il peso totale e per le specie target, che dal 2012 include 82 specie, vengono riportati il peso totale e anche la lunghezza individuale. In particolare, la lista delle specie target viene suddivisa in due gruppi:

- MEDITS G1 che include 41 specie per le quali vengono presi come parametri il numero totale di individui, il peso totale, la lunghezza individuale e parametri biologici come sesso, maturità sessuale, peso individuale ed età, valutata tramite l'analisi degli otoliti. A questo raggruppamento appartiene la specie *Mullus barbatus*.
- MEDITS G2 che include 42 specie per cui vengono misurati solo il numero totale di individui, peso totale e lunghezza individuale.

Oltre ai parametri biologici dovrebbe essere rilevata anche la temperatura del fondale sia all'inizio della cala sia al termine (MEDITS Handbook, 2017).

1.3 *Mullus barbatus*

1.3.1 *Introduzione alla specie*

La triglia di fango, *Mullus barbatus* (Linnaeus, 1758), è una specie demersale gregaria, molto diffusa nel mar Mediterraneo, appartenente alla famiglia *Mullidae*; quest'ultima comprende generi che si trovano sia in mari temperati sia in mari tropicali. In Mediterraneo sono presenti due generi: *Mullus* e *Upeneus*, il primo è distribuito lungo le coste del bacino orientale; mentre il genere *Mullus* è l'unico presente nei mari italiani. A questo genere appartengono due specie: *M. barbatus* e *Mullus surmuletus*, la triglia di scoglio. Le due specie sono morfologicamente simili tra di loro (Bombace e Lucchetti, 2011) (Figura 1.5).

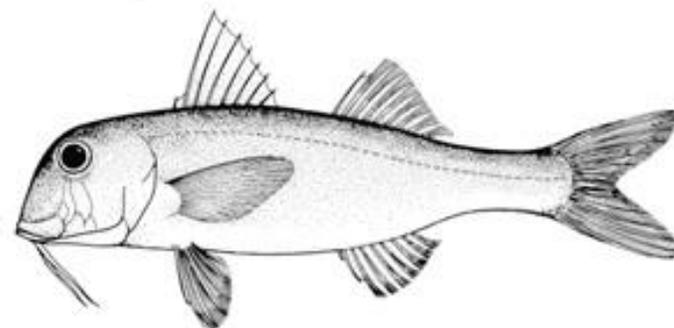


Figura 1.5. *Esemplare di M. barbatus* (<https://www.fao.org>).

Morfologia

La triglia di fango presenta un corpo allungato e leggermente appiattito lateralmente. La testa è piuttosto corta così come il muso, nel quale si può notare un profilo anteriore ripido. Gli occhi sono collocati vicino alla parte superiore del capo e la bocca è piccola e posizionata nella parte ventrale della testa. (Vrgoč *et al.*, 2004). Ventralmente all'apertura della bocca si trovano due barbigli ioidi, i quali compaiono già durante la fase planctonica; essi sono ricoperti da strutture sensoriali che permettono all'animale di riconoscere il fondale e di cercare le prede una volta che il pesce si è insediato nell'ambiente (Aguirre, 1997). La colorazione di un individuo adulto è rosata con il dorso più scuro ed il ventre bianco, mentre in fase giovanile, prima del passaggio all'ambiente bentonico presenta una livrea di colore azzurro-blu (Vrgoč *et al.*, 2004) (Figura 1.6).

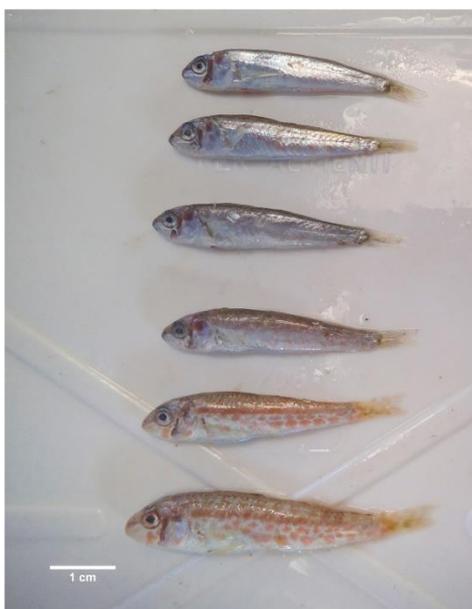


Figura 1.6. *Individui giovani di M. barbatus in cui è visibile il cambio di livrea: blu per gli individui pelagici e rosso per quelli demersali (Carbonara et al., 2019).*

Distribuzione e habitat

L'areale di distribuzione della triglia di fango comprende, oltre al Mediterraneo, l'Atlantico orientale dalla Norvegia occidentale e canale della Manica fino a Dakar, Senegal e Isole Canarie; l'areale comprende anche il Mar Nero (Yildiz e Karakulak, 2016). Nel mar Mediterraneo la specie risulta essere diffusa in maniera uniforme; in particolare nel mar Adriatico risulta essere molto più diffusa rispetto a *M. surmuletus* (Tserpes et al, 2002) (Figura 1.7). *M. barbatus* è una specie demersale che, come habitat, predilige fondali sabbiosi, fangosi o con ghiaia; il range di profondità al quale è presente varia dai 5 ai 250 metri; si trova maggiormente nelle acque poco profonde, ad esempio sopra i 100 m, dell'Adriatico settentrionale e centrale (Vrgoč et al., 2004). Studi effettuati hanno inoltre evidenziato come gli individui di lunghezza inferiore ai 14 cm si trovino in acque con profondità inferiore ai 100 m e come le lunghezze aumentino all'aumentare della profondità, per cui individui di circa 19-20 cm si possano trovare a profondità di 100 m; tuttavia, la biomassa decresce in maniera evidente tra i 150-200 metri di profondità (Çiçek, 2015). I pattern di distribuzione spaziale e le preferenze per il tipo habitat dipendono da fattori abiotici e biotici, *M. barbatus* predilige fondali sabbiosi e aree dove la piattaforma continentale è più ampia in quanto in questo tipo di ambiente la disponibilità di cibo è maggiormente presente (Tserpes et al., 2019).

La specie può compiere delle migrazioni stagionali. In Adriatico è stato osservato che in primavera gli individui solitamente si trovano sui fondali sabbiosi delle coste orientali; mentre in autunno la specie risulta distribuita lungo tutta la piattaforma continentale. Sono state osservate inoltre delle migrazioni (inshore/offshore) nell'Adriatico centrale e settentrionale; ci possono essere due tipi di migrazione: la prima compiuta dagli individui giovani dalle coste verso il mare aperto, la seconda è la migrazione degli adulti riproduttori verso le coste della Croazia fino a profondità tra i 50 e gli 80 metri (Haidar 1970).

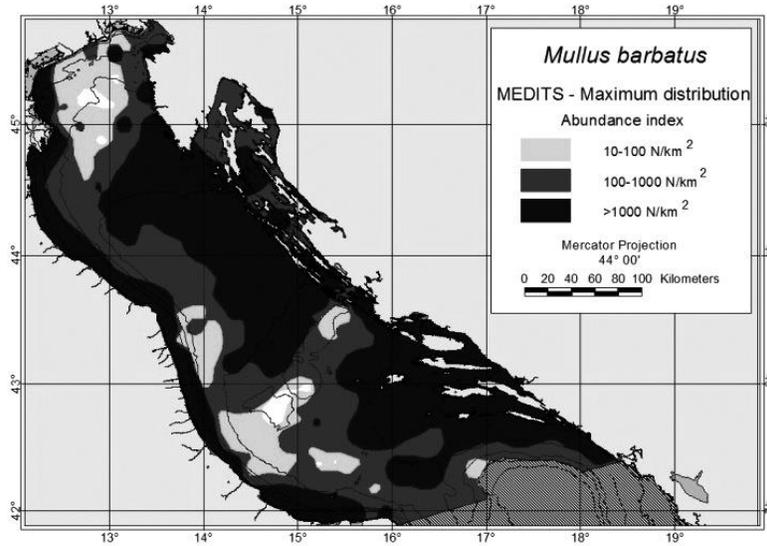


Figura 1.7. Distribuzione di *M. barbatus* secondo indice di abbondanza nelle GSA 17 e 18 (Marini *et al.*, 2017)

Dati biologici

La taglia massima che può raggiungere *M. barbatus* è di circa 30 cm. Solitamente le femmine presentano un corpo di dimensioni maggiori rispetto agli individui di sesso maschile e la crescita avviene più velocemente, per cui gli individui di maggiori dimensioni sono spesso femmine, i maschi arrivano ad una lunghezza totale di circa 20 cm. La relazione lunghezza-peso mette in evidenza come la crescita sia isometrica (Vrgoč *et al.*, 2004).

La triglia di fango è una specie carnivora che agita il substrato per rilevare e cibarsi delle prede. Queste ultime sono costituite da un'ampia varietà di invertebrati bentonici, principalmente policheti ma anche crostacei e molluschi, che si trovano sul sedimento o al suo interno (Onay e Dalgiç, 2019). In Adriatico i gruppi dominanti nella dieta di *M. barbatus* risultano essere i policheti, i quali vengono predati durante tutto l'anno, a seguire un altro gruppo molto presente nei contenuti stomacali sono gli amphipodi (Vrgoč *et al.*, 2004).

Riproduzione

La riproduzione in Adriatico avviene nel periodo tra tarda primavera ed estate (maggio, giugno e luglio). Secondo Haidar (1970) i maschi hanno due diversi cicli riproduttivi: gli individui di dimensioni minori di 14 cm presentano un ciclo riproduttivo annuale dove la finestra riproduttiva

si estende da maggio a luglio; mentre negli individui più grandi si osserva un ciclo riproduttivo biennale con una fase riproduttiva che comprende i mesi da maggio fino a dicembre. Per quanto riguarda le femmine, esse hanno sempre un ciclo annuale e la riproduzione avviene da aprile a maggio. La maturità sessuale viene raggiunta nel primo anno di vita quando gli individui raggiungono una lunghezza tra i 10 ed i 14 cm. La riproduzione avviene per la maggior parte a profondità comprese tra i 60 e 70 metri (Vrgoč *et al.*, 2004). Una volta avvenuta la deposizione delle uova gli stadi larvali si spostano verso acque meno profonde (30-40 m) e verso le coste. Gli stadi larvali, post larvali ed i giovanili fino ai 4-5 cm sono pelagici, quando vengono raggiunti i 5-6 cm di lunghezza gli individui si spostano verso aree costiere con fondali sabbiosi dove avviene il settlement, ovvero il passaggio allo stato demersale. Inizialmente gli individui tendono a concentrarsi in prossimità delle foci dei fiumi, i quali risultano essere le principali zone di nursery, talvolta anche risalendo lungo i fiumi per diversi metri. Successivamente gli individui, di circa 5-6 cm, iniziano la dispersione verso aree con fondali sabbiosi, fangosi o con ghiaia stabilendosi a profondità tra 10-250 metri (Gücü e Bingel, 2021).

1.3.2 *Settlement*

La maggior parte delle specie marine presenta uno stadio pelagico potenzialmente dispersivo (uova o larve). Per queste specie vi sono vari processi che danno forma ai pattern di distribuzione spaziale dei giovanili. In primis i processi di pre-settlement come la dispersione dalle aree di riproduzione determina l'apporto larvale nelle aree abitate dai giovanili e definisce la densità iniziale di individui pelagici disponibile per il settlement. Esso viene definito come il passaggio dall'habitat pelagico a quello demersale/bentico; il suo successo in un determinato luogo e anno per una data specie viene misurato dal numero massimo di individui appena insediati nell'ambiente bentico o demersale. (Cuadros *et al.*, 2016).

La transizione da una fase pelagica ad uno stadio giovanile e adulto bentico o demersale comporta un importante cambiamento delle condizioni ambientali in cui si trova il pesce e questo, di conseguenza, si ripercuote anche sull'organismo. Ci possono essere cambiamenti nella morfologia dell'animale, negli stimoli sensoriali percepiti e nella modalità di alimentazione. Nella specie *M. barbatus* uno dei mutamenti morfologici, oltre al cambio di livrea, è rappresentato dalla perdita dei denti, i quali sono invece presenti sulla mascella superiore dei giovanili. (Aguirre, 1997).

I cambiamenti morfologici e fisiologici a cui è soggetto l'animale vengono “registrati” negli otoliti. Questi sono un importante strumento per poter determinare la durata della fase larvale e il momento in cui è avvenuto il passaggio alla vita demersale. Lo studio del periodo iniziale del ciclo vitale è estremamente importante perché permette di avere maggiori dati per poter creare un modello di dinamica della popolazione e aiuta nella determinazione dello stato dello stock. Bisogna ricordare infatti che nella fase successiva al settlement, il numero di giovanili che sopravvivono determina il numero di reclute che andranno a congiungersi con gli individui adulti. (Cuadros *et al.*, 2016).

Questo tipo di studi, tuttavia, presenta delle insidie per quanto riguarda *M. barbatus*. La determinazione dell'età attraverso gli otoliti e lo studio dei primi anni di vita della specie risultano essere piuttosto difficoltosi a causa della presenza di falsi incrementi di crescita, della presenza di molti anelli sub-giornalieri e delle discrepanze tra i ricercatori sull'identificazione del primo *annulus*. Le incertezze sulla lettura degli otoliti possono portare a sovra o sotto stimare la reale età degli individui e questo rappresenta un punto critico non solo poiché, in una specie vive circa 5-8 anni una stima incorretta dell'età può essere determinante, ma anche per la valutazione dello stato degli stock. (Carbonara *et al.*, 2019).

Diversi studi hanno cercato di definire delle linee guida e dei metodi per semplificare l'individuazione del check demersale, così da rendere via via più accurata la stima della durata del periodo pelagico. Tuttavia, spesso queste linee guida differiscono non solo tra le diverse GSA, ma anche tra i vari istituti di ricerca presenti all'intero di un'unica GSA.

Attraverso diversi workshop sono state proposte delle alternative ai classici metodi diretti (cattura e ricattura, tag, marcatura chimica degli otoliti) in quanto vi è un alto tasso di mortalità della specie in seguito alla cattura. I metodi proposti dunque si basano sull'analisi delle lunghezze, degli incrementi marginali e su analisi morfologiche (ICES 2017).

Uno dei punti che viene maggiormente discusso è la presenza o meno di un anello pelagico prima di quello demersale, constatando così la presenza di due falsi anelli prima dell'*annulus*, invece di uno soltanto. Solitamente nell'identificare gli anelli di crescita da eventuali discontinuità vengono utilizzati i seguenti criteri:

- gli anelli ialini devono essere visibili lungo tutto l'otolite per essere considerati anelli di crescita
- è possibile la presenza di un solo falso anello prima dell'anello di crescita

Può capitare a volte che l'anello di crescita appaia più come un'area traslucida che come una banda e ciò accade quando anello di crescita e check demersale si fondono (Carbonara e Follesa, 2019).

La definizione di una metodologia standardizzata per la validazione dell'età della specie risulta essere un obiettivo chiave da perseguire per la gestione della risorsa e dello stock.

1.3.3 Pesca

Le risorse demersali rappresentano una delle più importanti componenti della pesca nel mar Adriatico sia in termini di quantità di catture, sia in termini di valore commerciale. Dagli studi effettuati sulle specie catturate durante le spedizioni MEDITS in Adriatico è emerso che la densità di popolazione maggiore si ha nelle zone centrali dell'Adriatico e in mare aperto nell'Adriatico settentrionale in prossimità della foce del fiume Po. Questo pattern di distribuzione è dovuto alle abbondanti catture di piccoli pesci pelagici e al fatto che queste aree sono altamente produttive. A riguardo delle specie demersali, la densità maggiore si trova vicino alle coste orientali dell'Adriatico e in quantità minore in mare aperto (Vrgoč *et al.*, 2015).

La popolazione di *M. barbatus* presente in Adriatico può essere definita come un unico stock presente nelle GSA 17 e 18. La triglia di fango viene pescata da tutte le nazioni costiere delle due GSA; il principale attrezzo utilizzato per la pesca è la rete a strascico. La taglia minima di cattura è pari a 11 cm. La pesca a strascico viene proibita per un periodo di 30-45 giorni tra la fine dell'estate e l'inizio dell'autunno.

Dal report effettuato dal Working Group on Stock Assessment of Demersal Species (WGSAD) lo stock di *M. barbatus* nelle GSA 17 e 18 risulta essere attualmente sfruttato in maniera sostenibile.

1.4 IL MICROSCOPIO A FORZA ATOMICA

1.4.1 *La microscopia a scansione di sonda*

L'invenzione della microscopia a scansione di sonda (SPM) nel 1981 da parte di Rohrer, Binnig e Gerber, ha permesso di poter finalmente visualizzare gli atomi presenti sulle superfici solide. La SPM è una tecnica di ricerca, infatti, che rende possibile lo studio della morfologia e delle proprietà dei corpi solidi attraverso un'alta risoluzione spaziale (Bian *et al.*, 2021). L'analisi di una microstruttura superficiale avviene grazie all'utilizzo di un microscopio a scansione di sonda dotato di una speciale sonda appuntita a forma di ago. La parte della sonda che svolge l'analisi è l'apice della punta (Figura 1.8). Esso è di circa 10 nanometri; mentre la distanza tra la punta ed il campione varia tra gli 0.1 e 10 nanometri (Mironov, 2004).

Il primo strumento inventato che si basa sulla microscopia a scansione di sonda è stato il microscopio a effetto tunnel, successivamente da questo si sono sviluppati i microscopi a forza atomica, a forza magnetica, a forza elettrica e microscopia ottica in campo vicino. Queste diverse tipologie di SPM si basano su altrettanti diversi tipi di interazione tra la punta ed il campione. Questa interazione è il principio fisico su cui si incentra la SPM; essendo un'interazione con un carattere di campo vicino essa permette di superare i problemi di risoluzione che possono presentarsi con tecniche che sfruttano un carattere di campo lontano come la microscopia ottica o la microscopia ottica a scansione (SEM). Tuttavia, nella SPM la risoluzione è limitata alla forma geometrica della sonda, di conseguenza la risoluzione spaziale dipende dalla ampiezza verticale delle strutture da analizzare. La punta può essere descritta come un cono con raggio finito al vertice (Meyer *et al.*, 2021).

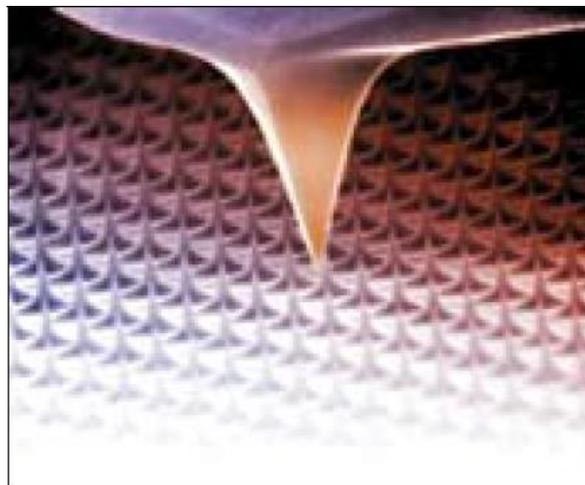


Figura 1.8. Immagine SEM di una punta per SPM (Mironov, 2004)

Funzionamento di base

L'interazione tra punta e campione può essere definita come parametro P , se c'è una dipendenza univoca di questo parametro dalla distanza z tra la punta e la superficie, allora il parametro P può essere usato nel sistema di retroazione (Figura 1.9). Questo sistema rappresenta la capacità di un sistema dinamico di tenere conto dei risultati per modificare il sistema stesso. Permette di controllare e regolare la distanza tra punta e campione, mantenendo il parametro P uguale a P_0 , dove P_0 rappresenta il valore di interazione impostato inizialmente dall'operatore. Nel momento in cui la distanza punta-campione cambia, si modifica anche il parametro P ; questo porta ad un segnale differenziale ($\Delta P = P - P_0$), che viene rilevato dal sistema di retroazione. Quest'ultimo invia il segnale differenziale ad un trasduttore piezoelettrico che controlla la distanza tra la punta ed il campione. Il trasduttore si serve del segnale differenziale per cambiare la distanza e riportarla al valore iniziale. Il sistema di retroazione agisce in tempo reale, di modo che quando la punta si sposta sulla superficie su una posizione x, y , il segnale fornito al trasduttore è proporzionale alla distanza tra la superficie ed il piano ideale $X, Y (Z=0)$. La punta, durante la scansione, si muove lungo una linea, per ogni punto sulla linea il valore del segnale viene registrato nella memoria di un computer (Mironov, 2004).

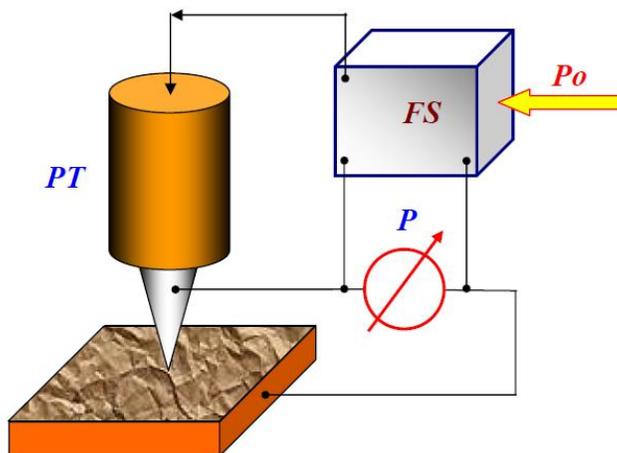


Figura 1.9. Rappresentazione schematica del sistema di retroazione (FS) di un SPM (Mironov, 2004).

Lo scanner

Per poter spostare la punta sopra il campione e per controllare la distanza tra punta e campione vengono utilizzati dei dispositivi di scansione (scanners). Questi dispositivi sono fatti di materiali piezoelettrici, ossia materiali in grado di cambiare la loro conformazione quando sono sottoposti ad un campo elettrico. Utilizzando le proprietà piezoelettriche l'elemento tubulare che compone il trasduttore si può accorciare o allungare nel momento in cui agli elettrodi posti al suo interno viene applicato un voltaggio. Il materiale degli scanner deve essere polarizzato applicando un alto voltaggio per ottenere l'effetto desiderato; tuttavia, la polarizzazione può diminuire dopo un uso prolungato, di conseguenza è importante effettuare frequentemente la calibrazione dello scanner (Meyer *et al.*, 2021). Per ottenere movimenti precisi nelle tre direzioni si utilizza un tripode scanner, formato da 3 elementi tubulari; tuttavia, questa tipologia di scanner è molto complessa da costruire e presenta una forte asimmetria, di conseguenza negli SPM più moderni si utilizza un singolo elemento tubulare come scanner (Mironov, 2004). L'allungamento dell'elemento tubulare permette gli spostamenti in verticale dello scanner mentre il suo piegamento i movimenti in orizzontale. Per permettere questi movimenti vengono utilizzati quattro elettrodi posti all'esterno e uno posto all'interno dello scanner (Meyer *et al.*, 2021).

Acquisizione delle immagini

La punta scansiona la superficie seguendo una linea prima in una direzione e successivamente nella direzione opposta in una scansione orizzontale, spostandosi poi sulla linea successiva. La scansione è pilotata dallo scanner, il quale riceve un segnale prodotto da convertitori analogici- digitali. La rappresentazione delle immagini sul computer è ottenuta tramite programmi di grafica computerizzata e può essere visualizzata come immagine tridimensionale o bidimensionale. Nell'immagine 3D la superficie viene tracciata in vista assonometrica per punti o per linee e vengono utilizzati diversi modi di colorazione dei pixel a seconda della coordinata topografica verticale. Nelle immagini bidimensionali invece ad ogni punto della superficie è assegnato un colore che corrisponde al valore in z in base alla scala di grigi (Mironov, 2004).

1.4.2 Il microscopio a forza atomica (AFM)

Il microscopio a forza atomica è un tipo di SPM che sfrutta le interazioni tra gli atomi per scansionare la superficie dei campioni (Figura 1.10). A differenza del microscopio a scansione di tunnel l'AFM è progettato per scansionare le superfici non conduttrici. Il microscopio a forza atomica condivide diverse caratteristiche comuni alla SPM, ad esempio l'isolamento dalle vibrazioni, il metodo di scansione, l'avvicinamento della punta al campione ed il trattamento della punta. Le principali differenze con altri strumenti SPM risiedono nell'acquisizione del segnale e nel sistema di retroazione (Bian *et al.*, 2021).

Il principio alla base dell'AFM sta nel misurare la forza dell'interazione tra campione e punta considerando, per esempio, le forze di van der Waals. L'energia potenziale tra due atomi, posti ad una distanza r l'uno dall'altro, è descritta dal potenziale di Lennard-Jones.

$$U_{LD}(r) = U_0 \left\{ -2 \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 + \left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} \right\}$$

Il potenziale di Lennard-Jones permette di stimare la forza dell'interazione tra punta e campione. Il primo termine dell'equazione rappresenta la forza attrattiva data dalla polarizzazione dipolo-dipolo; mentre il secondo rappresenta la forza repulsiva dovuta al principio di esclusione di Pauli. La punta AFM viene attratta se è distante dalla superficie del campione, viene invece respinta se si trova in prossimità del campione.

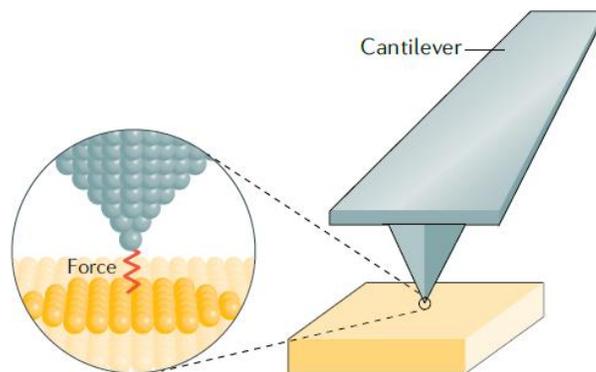


Figura 1.10. Meccanismo di interazione tra l'apice della punta e la superficie del campione (Bian *et al.*, 2021).

La forza dell'interazione tra punta e superficie del campione viene misurata grazie all'utilizzo di particolari sonde costituite da una leva elastica sulla cui estremità libera si trova la punta (Figura 1.11). Le punte sono prodotte tramite fotolitografia ed attacco chimico di strati di silicio.

L'estremità della leva opposta a quella dove si trova la punta è bloccata alla base di silicio. Le leve possono essere di forma rettangolare o triangolare a due bracci.

La forza che viene esercitata sulla punta dalla superficie del campione permette la flessione della leva. Misurando tale flessione si può ricavare la misura dell'interazione. (Mironov, 2004).

L'acquisizione della topografia avviene tramite le flessioni della leva elastica. Queste flessioni sono regolate da un sistema ottico. Questo sistema riflette un raggio laser sul retro della leva, il fascio riflesso colpisce il centro di un sensore ottico formato da un fotodiodo suddiviso in 4 settori. Attraverso questo sistema si rilevano due forze: la prima è la flessione della leva causata dalle forze attrattive o repulsive, la seconda è la torsione data dalla componente laterale dell'interazione tra punta e campione (Mironov, 2004).

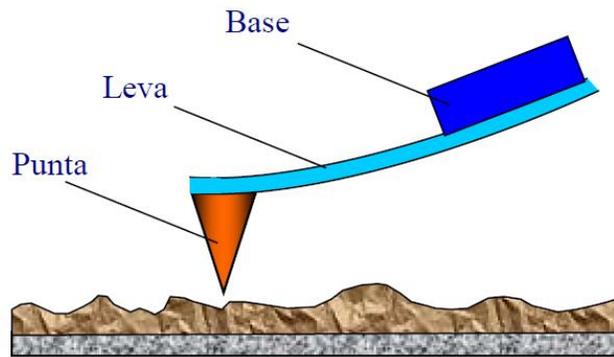


Figura 1.11. Rappresentazione schematica di una sonda AFM (Mironov, 2004).

Contact mode

L'acquisizione delle immagini può avvenire secondo due modalità: *in contatto* e *non contatto*. Nella prima tipologia la punta si trova a contatto diretto con la superficie e la forza che agisce tra gli atomi della punta e del campione viene bilanciata dalla forza elastica data dalla flessione della leva. Per questa modalità vengono utilizzate delle leve con bassa costante elastica, in modo da garantire maggiore sensibilità e ridurre il rischio di una eccessiva interazione tra punta e superficie che potrebbe danneggiare il campione e la punta. Durante questo tipo di scansione il sistema di retroazione attua una flessione costante della leva.

Tapping mode

Nella modalità “non contatto” punta e campione non sono in diretto contatto, di conseguenza per rilevare ampiezza e fase delle oscillazioni sono necessarie una elevata sensibilità ed una stabilità elettronica considerevole. Per questo motivo viene più utilizzata la modalità a “semi-contatto”. Con il tapping mode le oscillazioni della leva vengono eccitate in prossimità della frequenza di risonanza con un’ampiezza che varia dai 10 ai 100 nanometri. La leva in prossimità del campione, durante l’oscillazione inferiore, entra in contatto con il campione, ovvero entra nella zona delle forze repulsive. La forza di interazione in questo caso consiste nelle forze di van der Waals in aggiunta alla forza elastica che si genera durante il contatto (Mironov, 2004).

Applicazioni

La microscopia a scansione di sonda e il microscopio a forza atomica sono dei validi strumenti in molteplici campi di studio, spaziando dalla fisica, dove vengono utilizzati principalmente per lo studio delle superfici per analizzare le proprietà elettroniche dei materiali, alla chimica fino ad arrivare alla biologia. Proprio nella biologia viene utilizzato maggiormente il microscopio a forza atomica, il quale permette di visualizzare strutture come organi, tessuti, cellule ma anche proteine e acidi nucleici (Bian *et al.*, 2021).

L’AFM può rappresentare un valido aiuto nello studio della microstruttura e della chimica degli otoliti. Grazie a questo strumento è possibile visualizzare in maniera estremamente dettagliata la struttura minerale e quella proteica delle bande di accrescimento. Nonostante lo sviluppo delle applicazioni degli otoliti e i molti studi effettuati sulla componente organica e quella minerale, ci sono ancora aspetti della biomineralizzazione che possono essere chiariti (Dauphin e Dufour, 2008). Ci sono spesso incertezze e discrepanze anche negli studi di stima dell’età e nell’interpretazione delle discontinuità strutturali degli otoliti. L’utilizzo del microscopio a forza atomica aiuta a fare luce su tali discrepanze permettendo la visualizzazione delle lamelle di aragonite, della dimensione dei cristalli e del loro orientamento a livello di Årmströng e nanometrico (Gauldie, 1999). Riuscire ad avere un aumento nella precisione della stima dell’età e delle interpretazioni delle discontinuità strutturali è un importante traguardo nell’ambito degli studi sulle dinamiche di popolazione come anche nell’ambito della pesca per quanto riguarda l’identificazione degli stock e la valutazione del loro stato.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Il seguente elaborato ha come scopo quello di analizzare gli otoliti di *M. barbatus* nel mar Adriatico, focalizzandosi sulla loro microstruttura e nello specifico sul check derivante dal settlement. Date le difficoltà che si presentano nell'identificazione e nell'individuazione di tale discontinuità si è cercato di fornire uno studio che potesse inquadrare la tematica utilizzando uno strumento, quale il microscopio a forza atomica, ancora poco utilizzato nello studio degli otoliti.

Si è tentato di valutare se questo strumento possa aiutare nell'identificazione e nell'individuazione del check demersale osservando se le discontinuità rilevate potessero essere effettivamente riconducibili al check demersale e se all'interno di queste fossero presenti dei cambiamenti nella forma e nell'orientamento dei cristalli di aragonite. Per fare questo ci si è avvalsi di un parametro rilevabile dalle immagini acquisite con l'AFM quale la misura di rugosità.

3. MATERIALI E METODI

3.1 AREA DI STUDIO

Il mar Adriatico è un bacino continentale semi-chiuso situato nel Mar Mediterraneo. Si estende per circa 800 km lungo la direzione NW-SE e presenta un'ampiezza pari a 200 km. Data la presenza di evidenti differenze di carattere geo-morfologico lungo gli assi longitudinale e trasversale, il bacino adriatico è stato suddiviso in 3 sottobacini: settentrionale, centrale e meridionale (Campanelli *et al.*, 2011).

La costa nord-occidentale del bacino adriatico presenta un profilo regolare con spiagge ricche di sedimento e l'assenza di isole. Le regioni centrali e meridionali della costa occidentale sono invece rocciose. La parte orientale del bacino segue il profilo della catena montuosa delle Alpi Dinariche, motivo per cui la costa è alta, rocciosa e ricca di piccole e grandi isole (Vrdoljak *et al.*, 2020) (Figura 3.1)

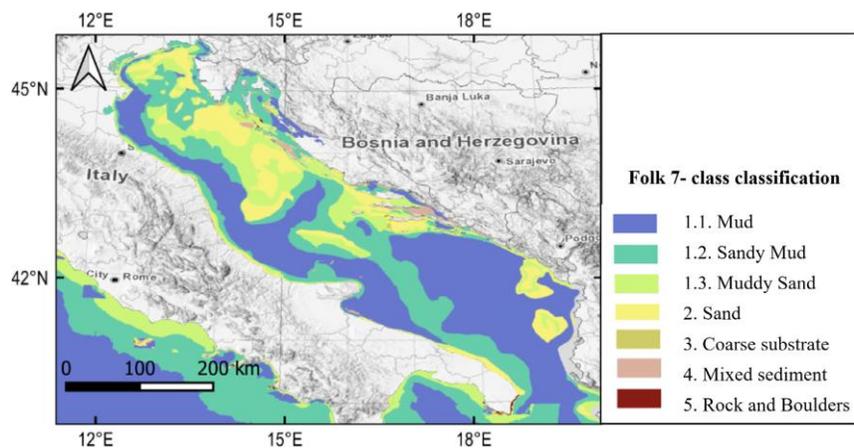


Figura 3.1. Mappa del substrato del fondale del bacino adriatico. (Vrdoljak *et al.*, 2020).

Batimetria

Il mar Adriatico è un mare poco profondo. L'area nord-occidentale del bacino è caratterizzata da fondali poco profondi con una profondità media di circa 35 m. Le acque meno profonde partono da 15 m di profondità lungo la costa occidentale (Venezia-Trieste), aumentando man mano che si procede verso sud-est fino ad arrivare ad una profondità di circa 270 m nella parte centrale del bacino con la Fossa di Pomo/Jabuka. Il lato meridionale di questa depressione segna il confine con

la parte meridionale del bacino adriatico. In questa regione è presente una depressione abissale che raggiunge una profondità di oltre 1200 m e che determina la parte più profonda del bacino (Cushman-Roisin *et al.*, 2013) (Figura 3.2).

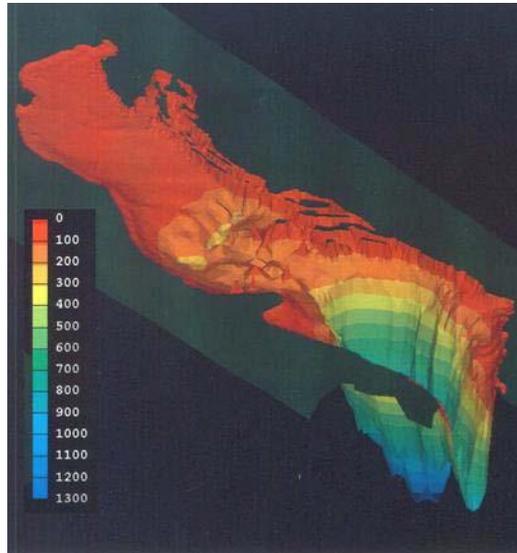


Figura 3.2. *Batimetria del Mare Adriatico (Cushman-Roisin, 2007)*

Idrografia e circolazione

Il bacino è caratterizzato da una circolazione modulata stagionalmente. Durante le stagioni invernali e primaverili, la circolazione mostra un andamento ciclonico con la presenza di due vortici ciclonici, uno settentrionale situato in corrispondenza della Fossa di Pomo ed un altro meridionale attorno alla depressione abissale; mentre l'Eastern Adriatic Current (EAC) scorre lungo le coste della Croazia trasportando acque più calde dalla regione meridionale del bacino verso la parte settentrionale. Vicino alle coste occidentali la Western Adriatic Current (WAC) scorre grazie alla presenza di aree caratterizzate da acque con densità omogenea e dalla presenza di input di acqua dolce proveniente dal fiume Po. La WAC sembra scorrere con maggiore forza durante la stagione autunnale; mentre durante i mesi estivi le correnti superficiali scorrono meno intensamente (Kraus *et al.*, 2018).

La circolazione superficiale è influenzata stagionalmente anche dalla presenza del termoclino, durante i mesi estivi, nella parte settentrionale del mar Adriatico ad una profondità tra i 10 e i 30 metri. L'assenza di termoclino durante i mesi invernali l'assenza del termoclino causa instabilità

lungo la colonna d'acqua nella maggior parte del Nord Adriatico. Questo provoca il mescolamento di flussi di acqua densa e fredda con le acque meridionali, influenzando le correnti profonde. Il mar Adriatico è la maggiore fonte di masse di acqua più densa nell'Est Mediterraneo (McKinney, 2007).

Il fiume Po rappresenta un fattore rilevante per la circolazione del bacino. Il flusso del fiume comporta una compensazione dei gradienti di temperatura e di salinità lungo la direzione est-ovest; inoltre contribuisce alla perdita di calore assieme all'apporto di acqua (Artegiani *et al.*, 1996). L'input derivante dal fiume modella anche la costa conferendo pendenze medio basse. Tra i corsi d'acqua che sfociano nell'Adriatico, il Po è quello che maggiormente contribuisce all'apporto di sedimento (McKinney, 2007).

Temperatura

Nel bacino dell'Adriatico vi è una considerevole variazione stagionale delle temperature, dovuta alla conformazione del bacino, la quale lo rende molto influenzato dalle condizioni meteorologiche. La temperatura media superficiale è pari a 18°C nella parte meridionale e di 25°C a settentrione. Il minimo ed il massimo di temperatura variano tra i 3°C ed i 29°C. Nel complesso il mar Adriatico è un mare tendenzialmente caldo-temperato, le temperature degli strati più profondi comunque non scendono sotto i 10°C. Le variazioni di temperatura durante il corso dell'anno sono solitamente ampie. Nelle aree costiere il picco più alto di temperatura si raggiunge nel mese di agosto; mentre il minimo a febbraio (Cushman-Roisin *et al.* 2013).

3.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

3.2.1 *Scelta dei campioni ed estrazione*

Per il seguente elaborato sono stati utilizzati i campioni provenienti dalle campagne MEDITS degli anni 2013, 2018 e 2023. Per ogni anno sono stati selezionati gli otoliti dei giovanili, ovvero degli individui di taglia compresa tra i 4 ed i 9 cm. Le classi di taglia sono state scelte facendo riferimento alla letteratura che indica la taglia di 4 cm come taglia in cui solitamente avviene il passaggio da ambiente pelagico a demersale e di conseguenza in cui si forma il check dovuto al settlement (Carbonara *et al.*, 2019). Sono stati selezionati 32 campioni per il 2013, 61 per il 2018 e 12 per il 2023, per un totale di 195 otoliti.

I campioni del 2023 sono stati estratti in laboratorio; mentre quelli del 2013 e 2018 erano già stati estratti e sono stati selezionati facendo riferimento ai fogli contenenti i dati biologici che vengono compilati nel momento delle analisi dei campioni MEDITS. Ogni coppia di otoliti, una volta estratta viene posta nelle provette, viene contrassegnata con un numero progressivo che viene poi inserito nei fogli biologici e nei fogli riguardanti gli otoliti, dove vi è la divisione in classe di taglia. Gli esemplari di *M. barbatus* che sono stati prelevati nel 2023 provenivano tutti da un'unica cala e le dimensioni di ogni esemplare erano di circa 9 cm. Gli otoliti prelevati da questi esemplari sono stati estratti tramite sezione trasversale del cranio; il taglio viene effettuato sul lato dorsale della testa in corrispondenza del preopercolo (Figura 3.3). Una volta aperto il cranio gli otoliti vengono estratti con delle pinzette e riposti nelle Eppendorf. Questa tecnica viene spesso utilizzata per l'estrazione degli otoliti di *M. barbatus* (Carbonara e Follesa, 2019).

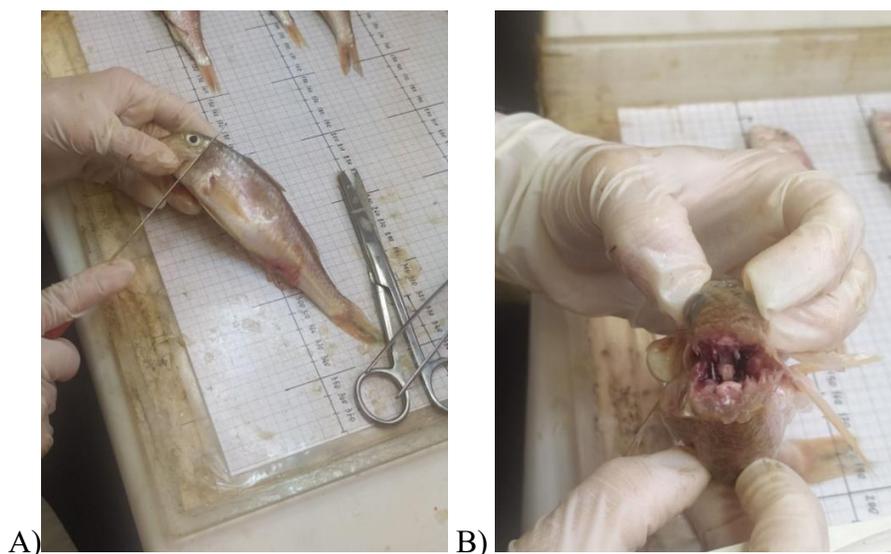


Figura 3.3. **A)** Punto in cui è stata effettuata l'incisione per la sezione trasversale del cranio. **B)** Visione degli otoliti nella porzione dorsale della testa.

3.2.2 Lavaggio dei campioni

Il primo passo per effettuare lo studio sugli otoliti consisteva nel loro lavaggio. È importante infatti rimuovere ogni residuo organico al fine di poterli poi maneggiare al meglio per le analisi che si intendono effettuare (Stevenson e Campana, 1992). Il lavaggio è stato eseguito utilizzando ipoclorito di sodio (NaClO) diluito al 6%, acqua distillata filtrata a $0.45\mu\text{m}$ e sonicatore. In ciascuna

provetta Eppendorf contenente la coppia di otoliti è stato immesso NaClO fino a raggiungere la conicità della provetta e lasciato agire per 15 minuti, durante i 15 minuti le Eppendorf erano inserite su un supporto in polistirolo dentro il sonicatore (Figura 3.4). Dopo questo primo lavaggio le provette sono state drenate e sono state riempite di acqua distillata sempre fino alla conicità. Il lavaggio al sonicatore con acqua distillata è di 5 minuti e viene ripetuto per tre volte, al termine delle quali le provette vengono nuovamente drenate. Questa modalità di pulizia è stata utilizzata per i campioni degli anni 2013 e 2018 in quanto, non essendo otoliti appena estratti la parte organica risultava piuttosto incrostata e più difficile da dissolvere. Per i campioni del 2023, essendo stati estratti sul momento, il tempo in NaClO è rimasto di 15 minuti, così come i 3 lavaggi in acqua distillata, ma il tempo nel sonicatore è stato ridotto ad 1 minuto. Una volta completato il ciclo di lavaggio, le provette sono state inserite in una stufa ad una temperatura di 35°C per assicurare un'asciugatura rapida e totale degli otoliti.



Figura 3.4. *Sonicatore con all'interno il supporto in polistirolo e le provette contenenti le coppie di otoliti.*

3.3 ANALISI ALLOMETRICHE

3.3.1 *Acquisizione delle immagini*

Di tutti i campioni sono state prese le immagini utilizzando il microscopio ottico ed una telecamera per microscopi collegata al computer. Gli otoliti sono stati fotografati sia da asciutti, sia idratati. Le foto dei campioni asciutti sono state effettuate ponendo l'otolite su un supporto di colore nero

e con il *sulcus acusticus* rivolto verso l'alto. Successivamente sono state prese le immagini degli otoliti idratati al fine di identificare con maggiore chiarezza l'anello demersale e di distinguere più agilmente se il margine degli otoliti fosse ialino oppure opaco. In questo caso i campioni sono stati posti in un piccolo contenitore di plexiglass riempito con acqua distillata filtrata a $0,45\ \mu\text{m}$ e lasciati a bagno per circa 3 minuti e subito dopo fotografati con la stessa modalità descritta in precedenza; in questo caso il lato dove non era presente il solco acustico, al fine di consentire una visualizzazione più chiara dell'eventuale anello demersale.

Tutti i campioni sono stati fotografati da asciutti, quindi in totale sono state prese 195 immagini. Mentre le immagini degli otoliti idratati sono state fatte solo per alcuni campioni per ogni anno, i campioni sono stati scelti casualmente. Sono state prese le immagini di 35 otoliti interi per il 2013, 35 per il 2018 e 22 per il 2023.

3.3.2 *Elaborazione delle immagini*

Le immagini degli otoliti non idratati sono state elaborate con il software ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). Il programma Image J permette di eseguire le principali misure allometriche degli otoliti quali Area, Perimetro, Circolarità, Feret (lunghezza dell'otolite), MinFeret, AR (rapporto tra asse maggiore e asse minore). Le misure vengono prese sulle immagini degli otoliti, per fare ciò è stato utilizzato un plugin precedentemente settato. Questo ha permesso al programma di creare una “maschera” di ciascun otolite, andando a tracciare il contorno di ciascun otolite (Figura 3.5). Prima di procedere con le misure è importante effettuare la calibrazione in modo da poter convertire i valori espressi in pixel nei corretti valori corrispettivi in micrometri. Per fare ciò è stato fotografato anche un calibro da 1.5 micrometri allo stesso ingrandimento usato per fotografare gli otoliti ed è stato misurato il diametro di tale calibro, sempre utilizzando ImageJ. Dato che per creare la “maschera” il programma evidenzia il contorno dell'otolite, è stato importante eliminare dall'immagine di partenza ogni elemento che potesse sporgere dal contorno, come ad esempio dei piccoli frammenti di otolite o residui organici che, se identificati dal programma come parte dell'otolite, avrebbero sfalsato le misure. Di conseguenza attraverso il programma Paint sono stati eliminati tutti i “disturbi” a contatto con il perimetro dell'otolite e sono state anche colorate le parti più trasparenti dell'otolite. Quest'ultima procedura è stata effettuata poiché in alcune “maschere”

le zone più ialine venivano interpretate come cavità. Dopo questo lavoro di rifinitura delle immagini sono state prese le misure allometriche e il file CSV ottenuto è stato trasferito in Excel.

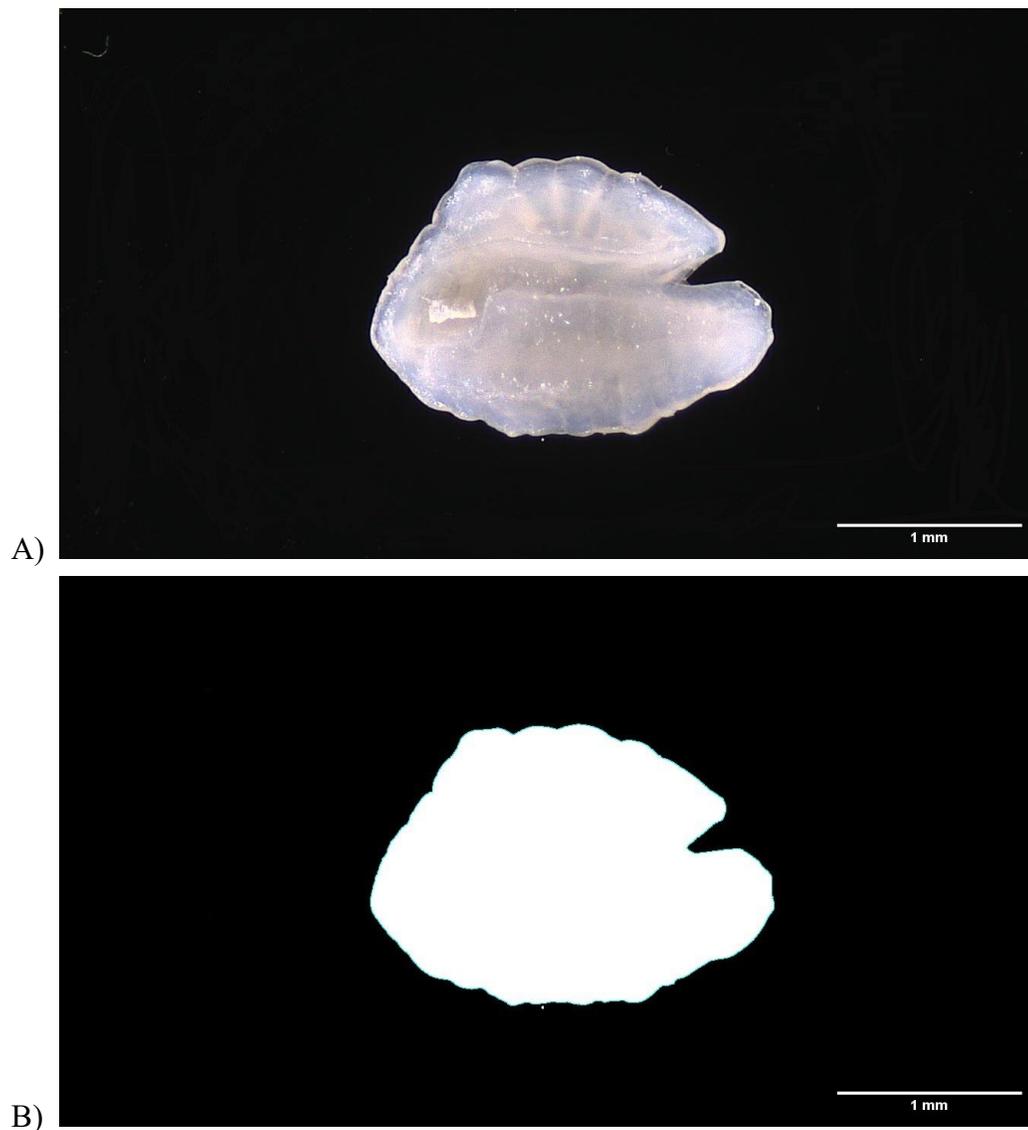


Figura 3.5. *A) immagine dell'otolite sinistro acquisita con fotocamera. B) maschera dell'immagine eseguita da ImageJ.*

3.4 CHECK DEMERSALE

3.4.1 Individuazione check demersale sugli otoliti interi

L'individuazione del check demersale si è svolta in diversi passaggi. Il primo ha utilizzato le immagini degli otoliti immersi nell'acqua distillata, essendo idratati è più facile poter distinguere

anelli di crescita e discontinuità. Anche per l'elaborazione di queste immagini è stato utilizzato il programma ImageJ. Attraverso questo sistema si è cercato di andare ad individuare sull'otolite intero un check che potesse corrispondere al check demersale; come riferimento per l'analisi è stato preso in considerazione uno studio recente eseguito da Carbonara in cui viene evidenziato come l'anello demersale si potrebbe trovare tra i 600 ed i 700 μm di distanza dal core (Carbonara *et al.*, 2019).

Le misure rilevate con ImageJ sono state il radius e la posizione del check demersale. Lungo la direttrice del radius è stato individuato il demersal check ed è stata rilevata la distanza dal core (Figura 3.6).

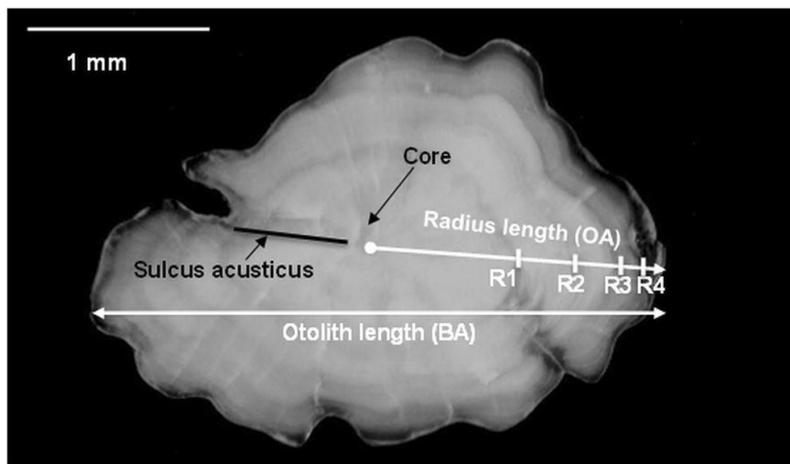
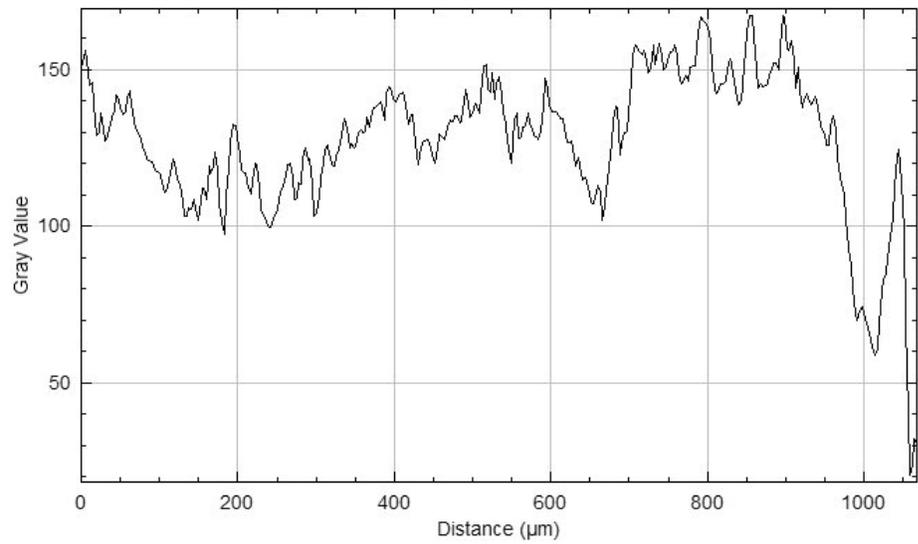


Figura 3.6. Immagine in cui sono visibili le misurazioni degli otoliti di *M. barbatus*. (Carbonara *et al.*, 2019).

Il processo di individuazione del check demersale ha presentato diverse criticità, non in tutte le immagini era di facile identificazione, per questo motivo è stato necessario ricorrere a dei tool presenti nel programma che permettevano di aumentare il contrasto tra le zone opache e quelle ialine ed è stato anche utilizzato il comando “profile plot”. Questo comando fa riferimento ai livelli di grigio dell'immagine e permette di creare un profilo dell'area lungo la direttrice tracciata dall'operatore, in questo profilo i picchi rappresentano le zone più chiare (opache), mentre gli avvallamenti indicano le zone più scure (ialine), di conseguenza si è osservato che tipo di plot si presentava intorno alla distanza target. (Figura 3.7). Questo, unito alle modifiche dell'immagine, ha fornito un ulteriore aiuto nell'individuazione del check demersale. Le misure effettuate sono state poi raccolte in una cartella di lavoro in Excel.



C)

Figura 3.7. A) immagine di otolite destro in cui vengono indicati il radius e la posizione del check demersale. B) immagine dello stesso otolite a cui è stato applicato un filtro per aumentare il contrasto tra la zona opaca e quella ialina. C) plot profile del radius.

3.4.2 Sezione e lavorazione degli otoliti

Lo studio della microstruttura degli otoliti ha richiesto una sezione degli otoliti. Per le sezioni e la lavorazione sono stati presi 21 esemplari per il 2013, 20 esemplari per il 2018 e 3 per il 2023; per un totale di 68 otoliti lavorati. Per effettuare le sezioni sagittali si è scelto di lavorare a mano gli otoliti; la scelta è stata dettata dal fatto che gli otoliti utilizzati sono di piccole dimensioni ed usare una troncitrice per effettuare la sezione avrebbe asportato troppo materiale compromettendo il *core* e la regione vicina in cui sono registrate le discontinuità del periodo iniziale del ciclo vitale, rendendo così inutilizzabile il campione per lo scopo della ricerca. La procedura si compone di vari passaggi: l'inglobamento dell'otolite nella resina (*embedding*), la levigazione dell'otolite (*grinding* e *polishing*) e il trattamento dell'otolite (*etching*) al fine di rendere più evidenti le differenze a livello microstrutturale (Stevenson e Campana, 1992).

Embedding

Il processo di *embedding* consiste nel porre l'otolite all'interno di una goccia di resina su un vetrino (Stevenson e Campana, 1992). Questo permette di fissare l'otolite su un supporto. Per fare questo al centro del vetrino viene poggiato l'otolite, il *sulcus acusticus*, viene rivolto verso l'alto e viene versata una goccia di resina epossidica trasparente, monocomponente. Il complesso vetrino-otolite veniva poi inserito sotto una lampada UV per 5 minuti, per permettere alla resina di solidificarsi. Successivamente il vetrino veniva contrassegnato con numero progressivo dell'otolite, L o R per indicare se l'otolite era rispettivamente sinistro o destro ed infine l'anno di appartenenza del campione (Figura 3.8).

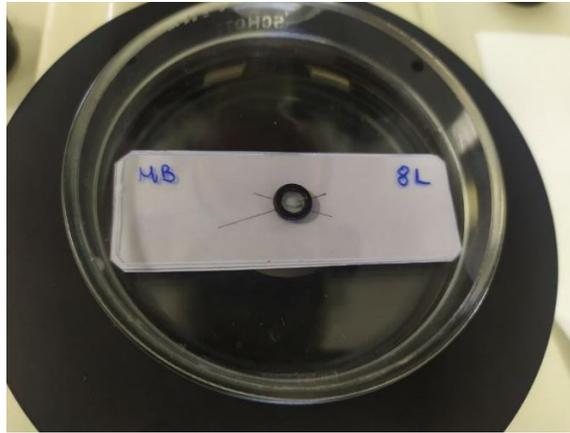


Figura 3.8. Otolite montato sul vetrino e contrassegnato con numero progressivo, se destro o sinistro.

Grinding e polishing

La levigazione degli otoliti è una pratica necessaria per ottenere un piano dell'otolite. I vetrini preparati sono stati levigati utilizzando carte abrasive di diversa granulometria. La levigazione è stata eseguita partendo dalla carta con granulometria più grossolana, $9\mu\text{m}$ o $5\mu\text{m}$, per poi arrivare alla fase di lucidatura con carte di $0,5$ e $0,3\mu\text{m}$. (Figura 3.9). Le carte prima di essere utilizzate venivano inumidite con acqua e sapone al fine di ridurre i graffi sulla superficie dell'otolite causati da residui di granuli della carta o da frammenti di otolite che si potevano distaccare con la lavorazione. Durante tutto il processo il vetrino veniva immerso qualche secondo nel sonicatore per rimuovere i granuli più grandi e veniva spesso osservato al microscopio a luce trasmessa. Quest'ultima operazione veniva effettuata per capire a quale piano si fosse arrivati in modo da capire quando ci si trovava in prossimità del core. Una volta levigati e lucidati i campioni sono stati passati sciacquati sotto acqua corrente, tenuti nel sonicatore per circa 20 secondi e lavati con acqua distillata e infine fatti asciugare.

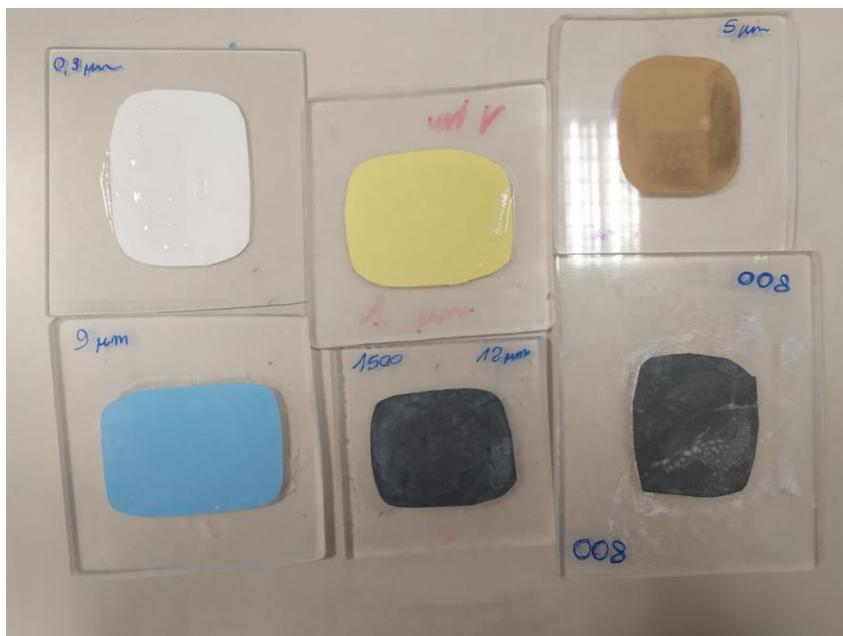


Figura 3.9. Carte abrasive utilizzate per la levigazione degli otoliti. Sono state usate maggiormente quelle da 9 μ m, 5 μ m, 1 μ m e 0,3 μ m.

Etching

Al fine di poter osservare al meglio la microstruttura al microscopio a forza atomica è stato necessario accentuare la differenza tra le zone opache e quelle ialine. La punta dell'AFM, infatti, su un piano liscio non riuscirebbe a fornire l'immagine della microstruttura in quanto l'interazione con la superficie sarebbe sempre uguale. Per accentuare le differenze tra le diverse composizioni dell'otolite si utilizzano delle sostanze, di solito decalcificanti, che interagiscono con il carbonato di calcio "scavando" la zona in cui è presente ed aumentando il dislivello con la parte proteica. Questo processo è risultato essere il punto critico del lavoro. Non è stato semplice decidere quale sostanza fosse più adatta a questo scopo e soprattutto per quanto tempo lasciarla agire, purtroppo per questo passaggio non esiste un metodo definitivo che può essere applicato su diversi campioni, spesso vengono effettuati dei tentativi preliminari per valutare quali possono essere le sostanze ed i tempi di azione più adeguati. In questo lavoro sono stati utilizzati 3 tipi diversi di etching:

- acido etilenediaminetetraacetico (EDTA) diluito all'1% per 60 secondi
- acido acetico diluito al 0.5% per 20 secondi
- decalcificante Sutter diluito al 40% per 15 secondi

L'EDTA funziona come chelante del carbonato di calcio, l'acido acetico interagisce con il CaCO_3 producendo e rilasciando ioni CO_2 , questo può portare alla creazione di bolle sulla superficie del campione che possono poi compromettere l'immagine all'AFM; sulla parte proteica invece agisce da fissativo. Il decalcificante Sutter si è rivelato agire nel modo migliore e più uniforme rispetto ai due precedenti. La composizione è data da acido formico e acido solfamminico con anche l'aggiunta di surfattante; in questo modo si abbassa la tensione superficiale delle molecole e anche se sul campione si crea una goccia questa si espande meglio sulla superficie dell'otolite.

Tutti i composti sono stati applicati con una pipetta da 10 μL e dopo averli lasciati agire il tempo necessario sono stati sciacquati con acqua distillata. I campioni sono poi stati lasciati asciugare in stufa.

A seguito di etching si è visto che rimangono nella struttura dell'otolite molte proteine e lipidi; questi componenti possono essere le cause che portano l'etching a non agire in modo uniforme. Per questo motivo, ad un campione, prima dell'etching con Sutter, è stato somministrato dell'alcool etilico, utilizzando sempre una pipetta da 10 μL . L'alcool è servito per cercare di asportare il film lipidico in modo da fare risaltare la struttura cristallina, permettendo all'etching di lavorare in maniera più uniforme. L'alcool è stato messo 3 volte per 60 secondo ciascuna volta e poi il campione è stato sciacquato con acqua distillata. Una volta asciutto è stato sottoposto a etching.

Infine, sono stati eseguiti dei vetrini con sopra polvere di otolite. Questo esperimento è stato effettuato per vedere come sono orientati i cristalli senza alcun tipo di trattamento, in modo da confrontarli con quelli osservati dopo etching. Per ottenere la polvere sono stati estratti degli otoliti da esemplari di triglia di fango, sono stati lavati e asciugati nella stufa. Una volta asciutti sono stati pestati fino ad ottenere una polvere. La polvere ottenuta è stata dispersa nell'acqua distillata utilizzando una pipetta in modo da eliminare le particelle di dimensioni maggiori. La componente più fine è stata inserita in una provetta con all'interno acqua distillata e passata al sonificatore per 15 minuti e al vortex in modo da far andare in sospensione la polvere. Sono stati preparati 6 vetrini: 3 con la polvere direttamente posta sul vetrino e 3 con la polvere posta su un foglio di muscovite, a sua volta legato al vetrino tramite resina epossidica.

3.5 ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI ALL'AFM

3.5.1 *Acquisizione delle immagini*

Le osservazioni al microscopio a forza atomica sono state effettuate dopo l'etching dei campioni. Sono stati osservati 4 campioni, 2 trattati con Sutter, di cui trattato con alcool prima dell'etching con decalcificante, uno con EDTA e uno con acido acetico. Tutte le immagini sono state prese in *tapping mode* con uno strumento Veeco Dimension 3100, controller Nanoscan III e punta Brucker NCHV (frequenza nominale 320KHz 4 N/m di forza elastica). Prima dell'osservazione all'AFM, sono state osservate le immagini precedentemente acquisite dei campioni una volta effettuato l'etching, ed è stata tracciata la direttrice lungo il radius per visualizzare la possibile posizione del check demersale, in modo da effettuare un'analisi mirata con l'AFM. Per gli otoliti trattati con Sutter, il quale ha dato un etching più uniforme, sono state seguite due direttrici, una lungo il radius ed una dal core fino al bordo ventrale, direttrice dorso-ventrale (Figura 3.10). La motivazione di questa scelta è dovuta al fatto che spesso lungo la direttrice del radius, la parte più esterna dell'otolite si trovava ancora immersa nella resina, di conseguenza non sarebbe stato possibile prendere l'immagine. Per ogni campione le immagini sono state prese partendo dal core e poi sono state prese diverse immagini a diverse distanze dal core seguendo le due direttrici. Nei campioni trattati con EDTA e acido acetico oltre al core, sono state acquisite immagini a circa 200 μm , 400 μm e 600 μm dal core, lungo la distanza dorso -ventrale; mentre nei campioni trattati con Sutter, lavorando quest'ultimo in maniera più uniforme, le immagini sono state prese ad una distanza tra loro di circa 50 μm , sempre partendo dal core. La dimensione di ciascun'immagine era di 256x256 pixel corrispondenti a 50 x 50 μm ; quando vi era la presenza di un check o in zone dove l'etching aveva lavorato in maniera più omogenea sono stati presi dei dettagli dell'area acquisendo immagini pari a 10 x 10 μm di dimensione.



Figura 3.10. Immagine in cui vengono indicati i margini dorsale e ventrale dell'otolite e la direttrice dorso-ventrale.

3.5.2 Calcolo della rugosità

Le immagini acquisite con AFM sono state elaborate con il programma Gwyddion 2.65 (Nečas e Klapetek, 2012). Gwyddion è un programma open-source nato per l'elaborazione delle immagini prese con SPM. Al suo interno sono presenti diversi tools, tra cui quello di "rugosità" utilizzato per osservare se al check individuato sull'otolite corrispondesse un cambiamento nella microstruttura.

La rugosità rappresenta una componente della trama di superficie del campione. I valori che vengono calcolati si basano sull'analisi delle altezze dei punti presenti sulla superficie. Un valore più alto significa che la superficie è più ruvida. I due parametri principali attraverso cui viene valutata la rugosità sono la rugosità aritmetica (R_a) e la rugosità radice quadratica media (R_q). La prima indica la media aritmetica la media delle altezze calcolata sull'intera area misurata. Tuttavia, questo tipo di valori non fornisce ulteriori informazioni riguardo il tipo di rugosità. Per questo motivo si sono introdotti altri valori come la rugosità a radice quadratica media (RMS), che rappresenta la radice quadrata della distribuzione dei punti più alti presenti sulla superficie. Questa misura risulta essere più sensibile, rispetto alla rugosità aritmetica, agli scostamenti della media dal piano o dalla linea di riferimento (Kumar e Rao, 2012). La rugosità quadratica media viene calcolata come la media delle deviazioni dell'altezza prese all'interno della lunghezza del profilo tracciato sull'immagine e misurate dalla linea media; si può quindi definire come l'equivalente della deviazione standard delle altezze lungo il profilo tracciato.

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N r_j^2}$$

Per valutare la rugosità dell'immagine sono state scelte le immagini dove i diversi tipi di etching avevano meglio lavorato sul campione, ovvero dove erano visibili con maggiore chiarezza i cristalli di aragonite. Il tool di misura della rugosità presente nel programma permette di tracciare un profilo su cui vengono misurati i parametri della rugosità. Per ogni immagine sono stati tracciati in totale 9 profili, 3 in direzione orizzontale, 3 verticale e 3 in diagonale (Figura 3.11). Nelle immagini in cui era presente in check queste 9 misure sono state prese per le porzioni di immagine a monte o a

valle di un check. La lunghezza del profilo da tracciare era pari a 20 μm mentre lo spessore di tali profili è stato fissato a 25 pixel in modo da coprire almeno 1/10 delle immagini, ($50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$).

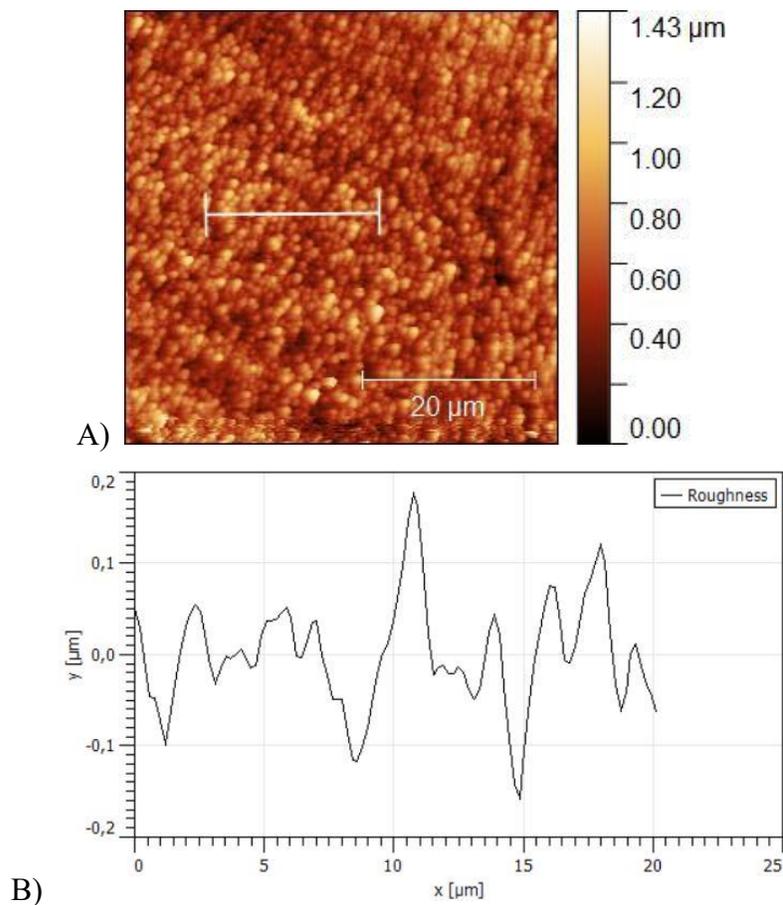


Figura 3.11. A) immagine AFM $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ raffigurante la microstruttura di otolite sinistro trattato con alcool e decalcificante Sutter. Viene rappresentato il tracciato del profilo di 20 μm . B) grafico di rugosità del profilo tracciato sull'immagine.

3.6 ANALISI STATISTICHE

Tutti i dati raccolti sono stati inseriti in dataset su Excel e le analisi sono state svolte sul programma Past (Hammer,2001).

3.6.1 Allometria

Le prime analisi svolte sono state quelle allometriche. I parametri presi in considerazione sono stati Feret, Area, Perimetro, Aspect Ratio (AR), MinFeret e Circolarità. Questi sono stati messi in relazione con la lunghezza totale del pesce (LT) fornita dai dataset raccolti durante le spedizioni MEDITS ed è stata svolta un'analisi del modello lineare. Sono stati calcolati i coefficienti del

modello lineare: coefficiente di determinazione (R^2), l'indice di correlazione di Pearson al fine di valutare la relazione che intercorre tra le due variabili prese in considerazione e l'intensità della relazione stessa. Per testare la significatività del valore ottenuto è stato eseguito il calcolo del *p-value* con un valore soglia fissato a $\alpha=0,05$.

Le analisi sono state svolte per ciascun anno separando gli otoliti di sinistra (L) da quelli di destra (R).

La relazione tra lunghezza e Feret dell'otolite è stata sottoposta anche ad un'analisi della covarianza (ANCOVA) tra le due componenti. La covarianza è stata analizzata confrontando il rapporto lunghezza totale- Feret tra gli otoliti di destra e tra gli otoliti di sinistra in uno stesso anno e confrontando anche i tre diversi anni di campionamento. La presenza di covarianza tra le variabili costituisce un'ulteriore prova di linearità tra le variabili e permette di valutare la simmetria degli otoliti. Se la lunghezza del pesce e quella dell'otolite mostrano linearità, si può dedurre che il check demersale sia situato ad una distanza fissa dal core in quanto proporzionale alla lunghezza dell'otolite.

3.6.2 *Margine degli otoliti*

L'analisi dei margini degli otoliti consiste nel determinare la presenza di un margine opaco o ialino. Il criterio con cui si è svolta l'analisi si basa su Carbonara 2019, per cui per essere il bordo doveva risultare per almeno il 50% della sua lunghezza ialino o opaco. Dai dati è stata effettuata una distribuzione di frequenza per vedere differenze nei tre anni di studio, soprattutto tenendo presente i diversi mesi in cui sono stati effettuati i campionamenti MEDITS. I campioni del 2013 infatti, sono stati prelevati nel mese di giugno, mentre quelli del 2018 e 2023 sono stati raccolti ad agosto. La frequenza percentuale permette di valutare quale sia la tipologia di margine che più ricorre nei tre periodi di campionamento. È stato eseguito un t-test a due campioni con varianze diverse per verificare che non ci fossero differenze significative tra le lunghezze medie dei campioni dell'anno 2018 e quelle dei campioni dell'anno 2023. In seguito, è stato eseguito un test del chi quadrato per l'equidistribuzione (goodness of fit) per determinare differenze significative nella distribuzione della tipologia di bordo per ogni anno. Un test del chi quadrato di indipendenza è stato utilizzato per verificare, invece, la presenza di differenze significative tra le frequenze dei margini nei 3 anni di campionamento. Infine, è stato svolto un ulteriore test del chi-quadrato per indipendenza anche

per ranghi accoppiando gli anni 2013-2018, 2013-2023, 2018-2023. La significatività dei test è stata valutata tramite il calcolo del *p-value* con soglia $\alpha=0,05$.

3.6.3 *Chek demersale*

Le analisi riguardanti il check demersale hanno visto due diverse analisi. I dati di radius e distanza del check dal core che sono stati ricavati tramite il software ImageJ sono stati trasferiti su un foglio di lavoro Excel. In primis è stata verificata l'interazione tra radius e lunghezza del pesce, come è stata svolta per i parametri allometrici, con un'analisi dei coefficienti del modello lineare. Anche in questo caso l'analisi è stata fatta per tutti i 3 anni e divisa per gli otoliti di sinistra e quelli di destra.

Il valore di distanza del check demersale è stato invece analizzato tramite una distribuzione di frequenza per vedere la distanza media a cui era presente il check demersale. Le distanze dal core sono state suddivise in range di distanza; in tutto sono stati identificati cinque range di distanza dal core di 100 μm sulla base delle misure effettuate:

- 400-500 μm
- 501-600 μm
- 601-700 μm
- 701-800 μm
- 801-900 μm

Successivamente è stata effettuato un test del chi quadro (χ^2) per verificare l'indipendenza delle variabili. La significatività dei risultati è stata testata tramite calcolo del *p-value* con soglia impostata a $\alpha=0,05$.

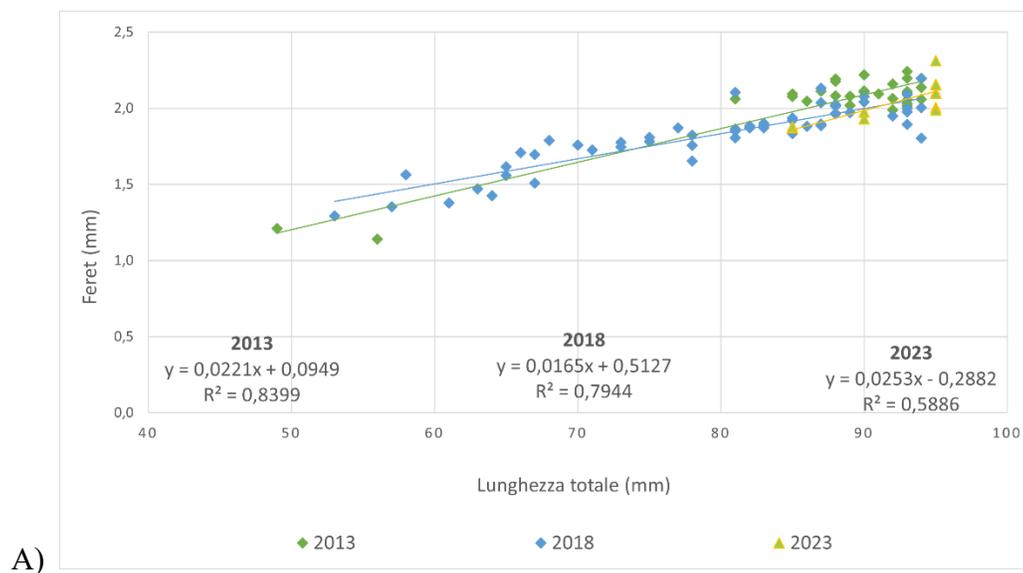
3.6.4 *Analisi del check demersale all'AFM*

I valori di rugosità (R_q) ottenuti sono stati importati in un file Excel. Per ogni immagine è stata calcolata la media dei 9 profili tracciati e nei campioni in cui era presente un check è stato eseguito un t-test a due campioni con varianze diverse per verificare se ci fossero differenze significative tra le misure prese a monte e a valle del check individuato. La significatività del test è stata testata tramite calcolo del *p-value* con soglia impostata a $\alpha=0,05$.

4. RISULTATI

4.1 Misure allometriche

I risultati delle misure di allometria hanno mostrato la presenza di linearità tra lunghezza totale del pesce (LT) e parametri degli otoliti. Si è scelto di riportare graficamente le relazioni che hanno mostrato un coefficiente di determinazione maggiore; tali relazioni includono LT - Feret, LT - Area e LT - MinFeret. I grafici riportati sono suddivisi tra otoliti sinistri e destri nei tre anni di campionamento (Figure 4.1, 4.2, 4.3). Le statistiche di tutte le relazioni analizzate vengono riportate in appendice.



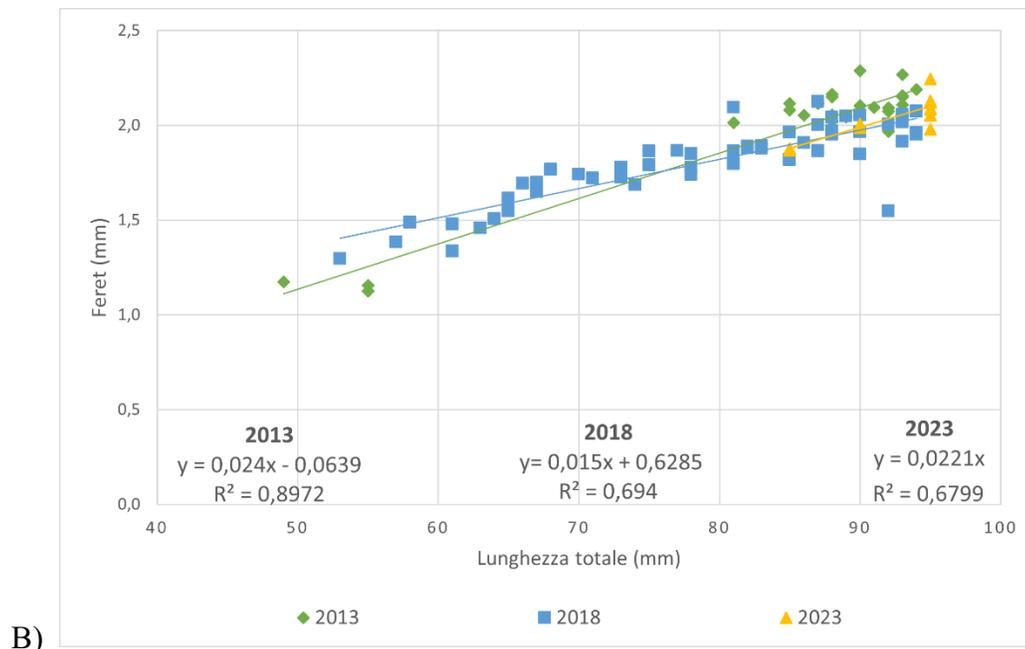
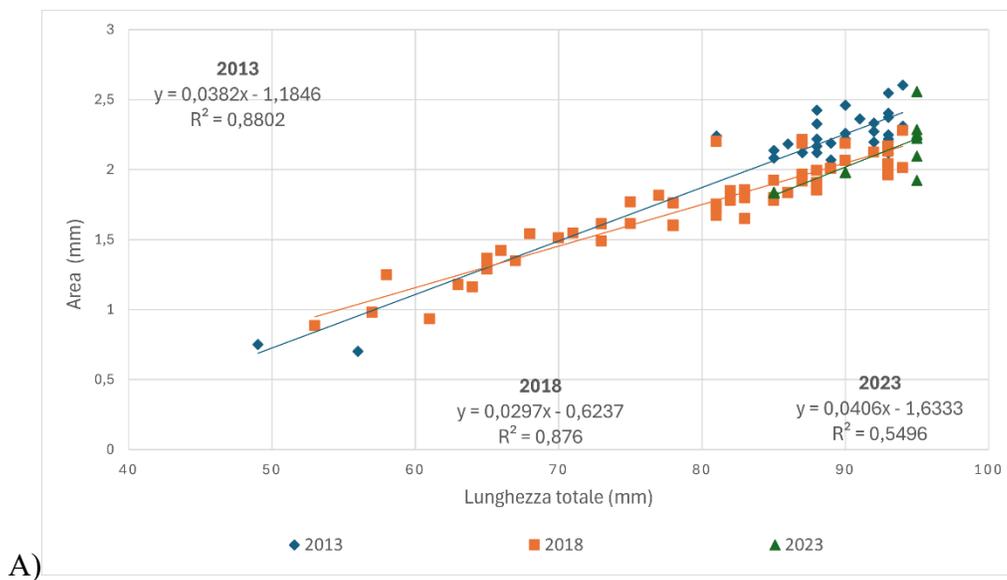


Figura 4.1 Grafico a dispersione che mostra la relazione tra lunghezza totale degli esemplari e Feret degli otoliti sinistri (A) e destri (B) nei tre anni di campionamento (2013, 2018 e 2023) con relative rette di regressione. Vengono riportati l'equazione della retta e il coefficiente di determinazione R^2



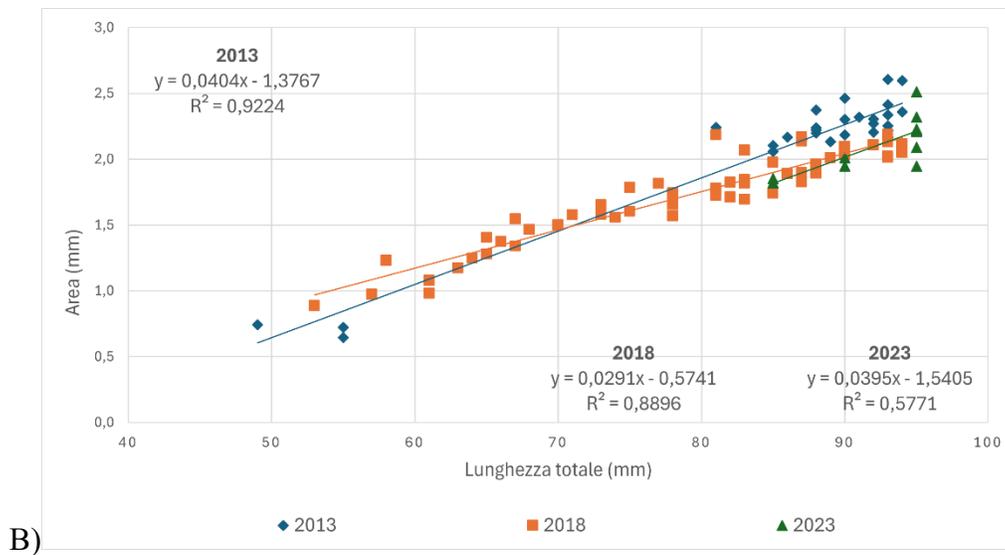
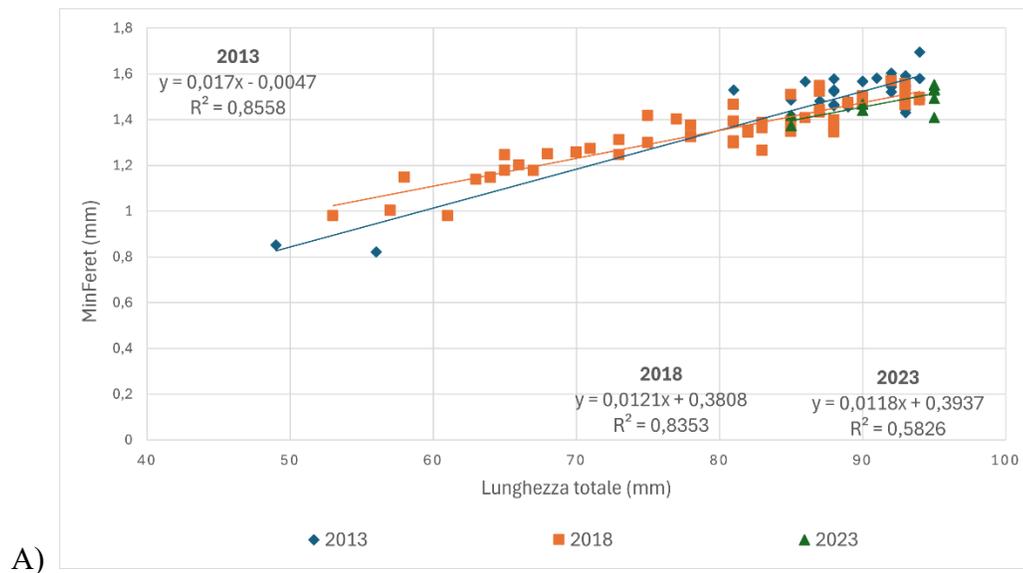


Figura 4.2 Grafici a dispersione che mostra la relazione tra lunghezza totale degli esemplari e Area degli otoliti sinistri (A) e destri (B) nei tre anni di campionamento (2013, 2018 e 2023) con relative rette di regressione. Vengono riportati l'equazione della retta e il coefficiente di determinazione R^2



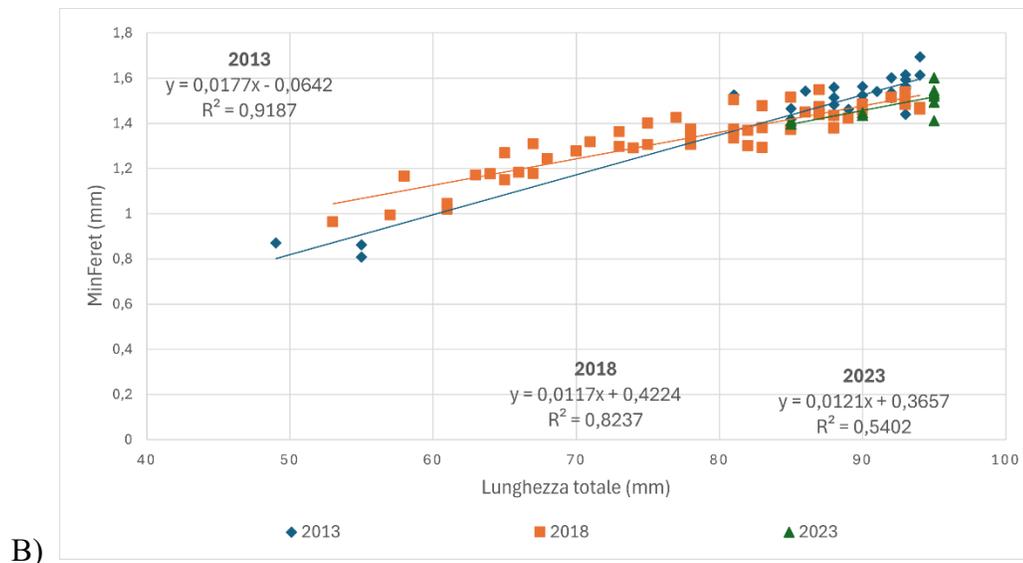


Figura 4.3 Grafici a dispersione che mostra la relazione tra lunghezza totale degli esemplari e MinFeret degli otoliti sinistri (A) e destri (B) nei tre anni di campionamento (2013, 2018 e 2023) con relative rette di regressione. Vengono riportati l'equazione della retta e i coefficienti di determinazione R^2

L'analisi della covarianza effettuata tra le misure del Feret degli otoliti nei 3 anni e tra otoliti sinistri e destri all'interno di uno stesso anno ha dato come risultato un p -value non significativo (p -value $> 0,05$) per quanto riguarda le differenze tra otoliti nella parte sinistra e nella parte destra del cranio, mentre sono risultate delle differenze significative nell'analisi riferita ai tre anni di campionamento per entrambe le parti (p -value $< 0,05$) (Tabella 4.1).

Tabella 4.1. Tabella indicante i valori della statistica F e di significatività del p -value per le analisi di covarianza effettuate. In giallo vengono evidenziati i valori risultati significativi.

	F	p-value
FERET L-R 2013	0,0389	0,84
FERET L-R 2018	0,3922	0,53
FERET L-R 2023	0,0605	0,80
FERET L 3 ANNI	3,495	0,03
FERET R 3 ANNI	3,761	0,02

4.2 Analisi del margine degli otoliti

L'analisi di frequenza dei bordi degli otoliti ha dato come risultato una prevalenza di bordo ialino negli anni 2013 e 2023. In questi due anni i campionamenti si sono svolti rispettivamente nei mesi di giugno e di agosto. Nel 2018 invece è emersa una maggioranza di bordo opaco, anche se i campionamenti si sono svolti nel mese di agosto (Figura 4.4). Dal t-test a due code effettuato è emerso che esistono differenze significative tra le medie delle lunghezze dell'anno 2018 e quelle del 2023 (Statistica $t = -7,88433$, t critico = 1,9900, p -value = 1,36E-11). Il test del chi quadrato (χ^2) per l'equidistribuzione è risultato significativo solo per l'anno 2023 ($\chi^2 = 2,918$, $df = 1$, p -value = 0,03). Mentre il test del chi quadrato effettuato per valutare l'indipendenza delle frequenze delle due tipologie di margini nei tre anni di campionamento non è risultato significativo ($\chi^2 = 5,284$, $df = 2$, p -value = 0,07). Per quanto riguarda il test del chi quadrato di indipendenza eseguito sulle coppie di anni, si è osservato un valore significativo per il rango 2018-2023 ($\chi^2 = 5,255$, $df = 1$, p -value = 0,02).

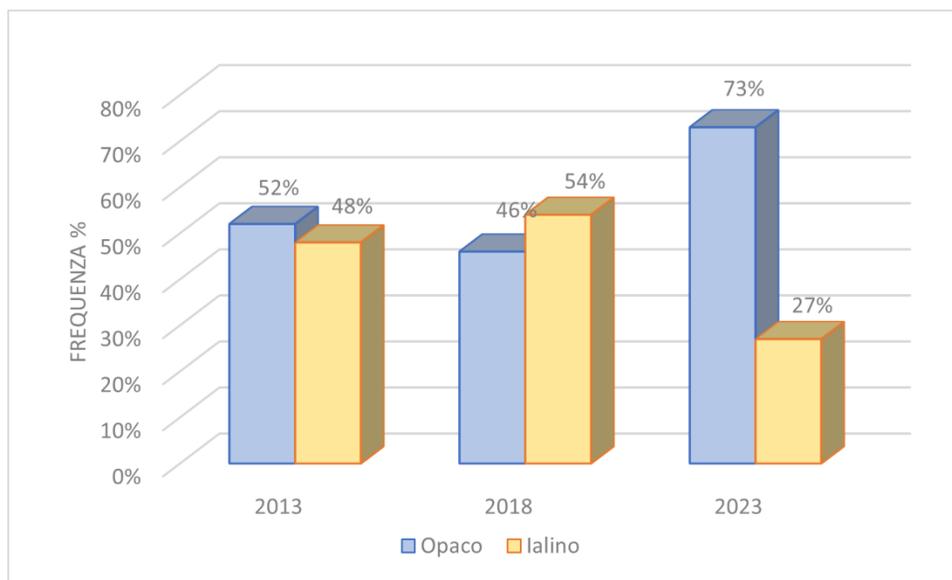


Figura 4.4. Grafico rappresentante la frequenza percentuale del margine degli otoliti nei tre anni di campionamento.

4.3 Check demersale

Lo studio del check demersale ha visto come prima analisi il rapporto tra il radius calcolato tramite ImageJ e la lunghezza degli individui. In tutti i 3 anni i coefficienti del modello lineare hanno

indicato un rapporto di linearità tra lunghezza totale del pesce e radius dell'otolite (Figure 4.5, 4.6, 4.7) con un *p-value* significativo (*p-value* < 0,05).

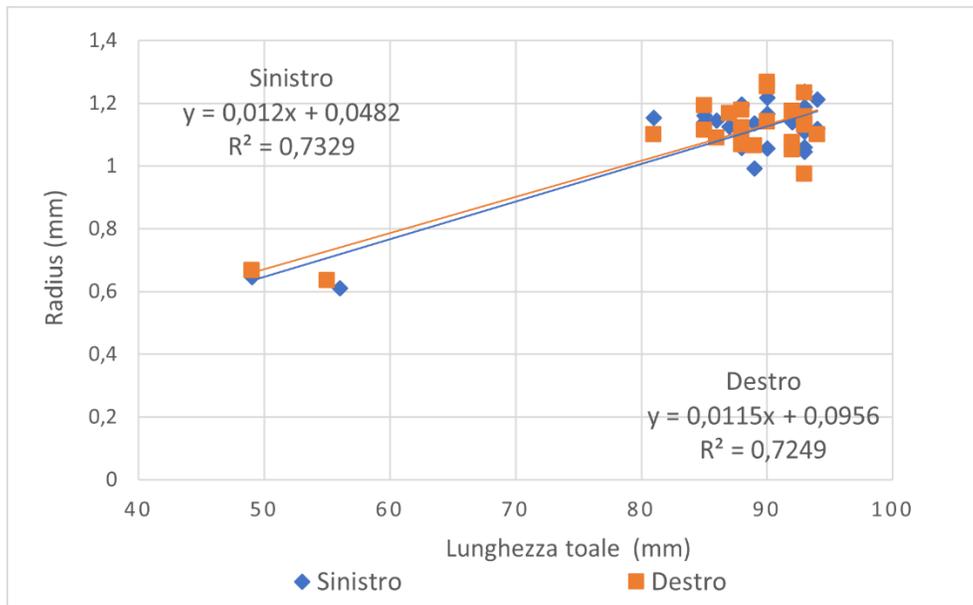


Figura 4.5. Grafico rappresentante la retta di regressione tra radius e lunghezza totale degli individui nell'anno 2013 per gli otoliti di sinistra e quelli di destra. Sul grafico vengono riportati l'equazione della retta ed il coefficiente di determinazione (R^2).

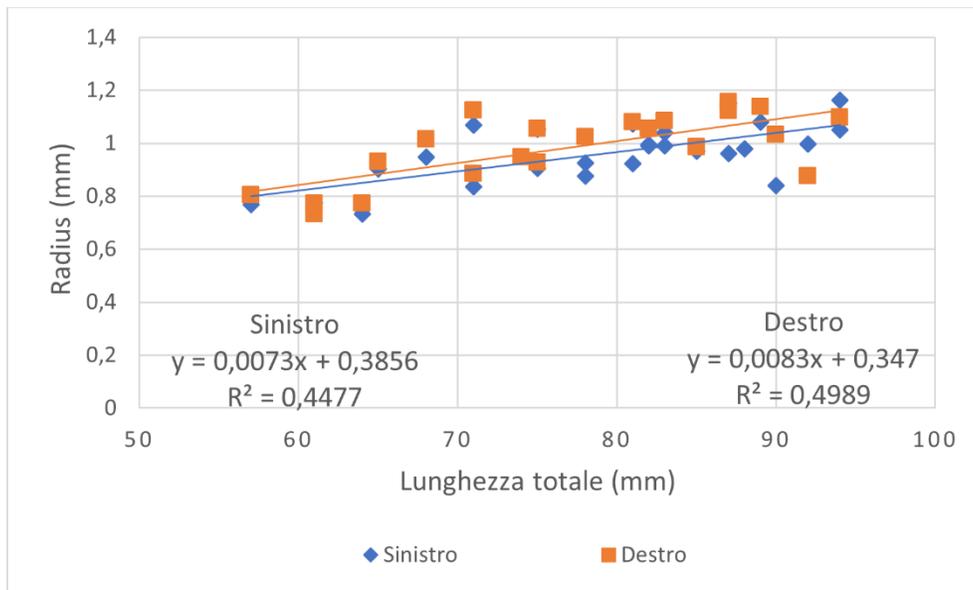


Figura 4.6. Grafico rappresentante la retta di regressione tra radius e lunghezza totale degli individui nell'anno 2018 per gli otoliti di sinistra e quelli di destra. Sul grafico vengono riportati l'equazione della retta ed il coefficiente di determinazione (R^2).

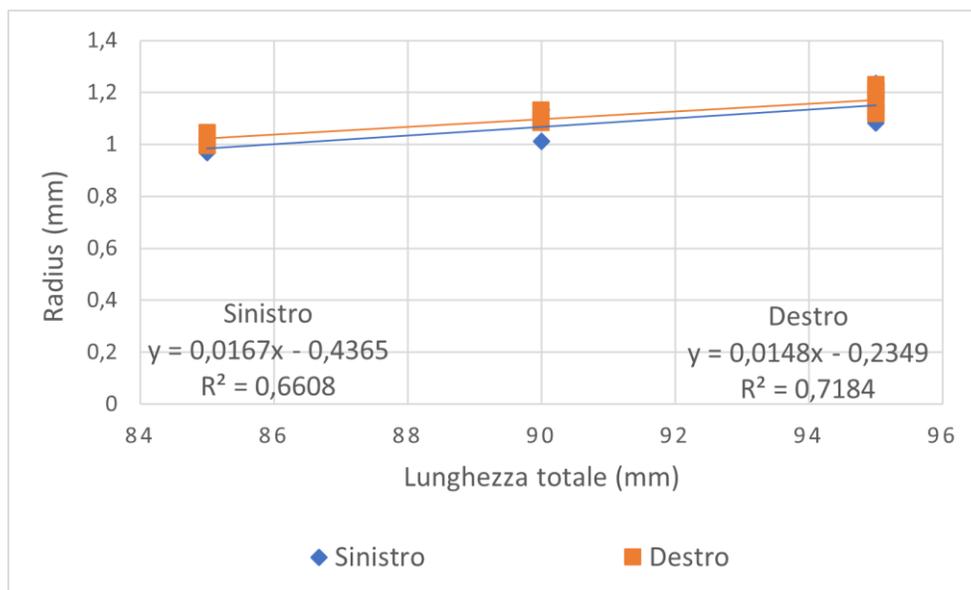


Figura 4.7. Grafico rappresentante la retta di regressione tra radius e lunghezza totale degli individui nell'anno 2023 per gli otoliti di sinistra e quelli di destra. Sul grafico vengono riportati l'equazione della retta ed il coefficiente di determinazione (R^2).

L'analisi della presenza del check demersale ha evidenziato come in quasi tutti i campioni fosse presente una zona ialina, quindi di accrescimento più lento, che potesse essere riconducibile all'anello demersale. Dei 68 otoliti lavorati per l'analisi del check demersale 11 (16%) sono risultati particolarmente difficili da "leggere" in quanto nonostante l'utilizzo dei filtri e del profile plot non è stato possibile identificare una zona che potesse corrispondere all'anello demersale. Questi campioni sono stati classificati come "non determinabile".

L'analisi di distribuzione di frequenza del check demersale ha mostrato come nella maggior parte dei campioni la distanza del check demersale dal core ricada all'interno del range compreso tra i 600 μm e i 700 μm di distanza dal core. (Figura 4.8).

Il test del chi quadrato effettuato per valutare l'indipendenza tra le variabili è risultato non significativo ($\chi^2 = 6,7396$, $df = 8$, $p\text{-value} = 0,56$).

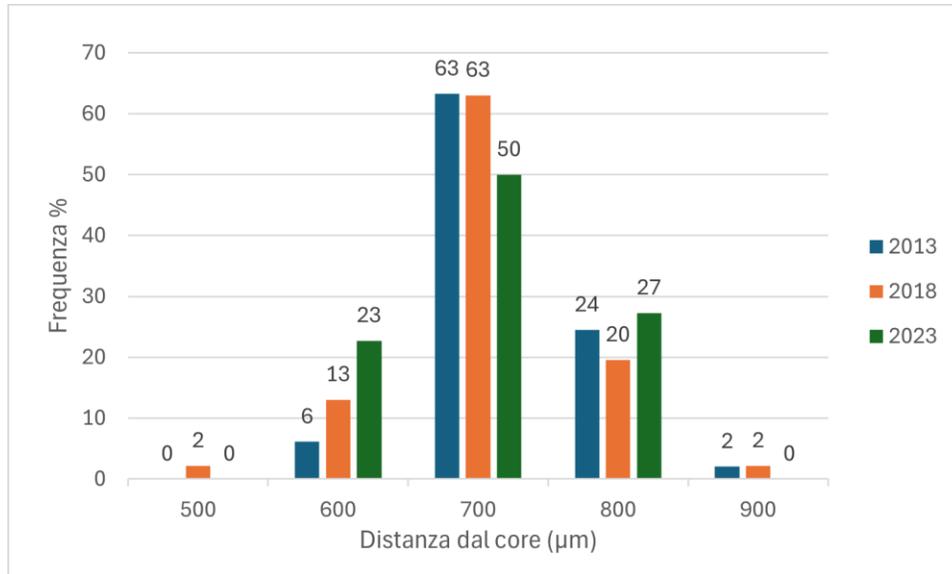


Figura 4.8 Grafico rappresentante la distribuzione di frequenza della distanza del check demersale dal core.

4.4 Analisi al microscopio a forza atomica

I valori medi della rugosità quadratica media calcolati per i 4 diversi campioni osservati al microscopio a forza atomica vengono riportati nella tabella sottostante (Tabella 4.2).

Tabella 4.2. Nella tabella vengono riportati i valori medi di rugosità e l'errore standard per ogni immagine è stata analizzata. I valori di rugosità sono espressi in nanometri. I campioni sono nominati in base alla distanza dal core alla quale sono state prese le immagini.

RUGOSITÀ QUADRATICA MEDIA							
134 L -2018	Rq ±ES	137 L- 2018	Rq ± ES	100 L-2018	Rq ± ES	302 L-2018	Rq ± ES
450u.001	43,5 ± 2,63	Core 50x50	21,4 ± 1,17	Core	33,9 ± 1,90	Core	43,8 ± 7,68
450u.004	21,9 ± 1,08	Core10x10	26,7 ± 2,18	50µm radius	41,8 ± 4,01	100µm	38,9 ± 1,65
		Check 50x50	22,0 ± 1,93	50µm	36,6 ± 1,61	200µm	49,6 ± 3,06
		Check 10x10	35,6 ± 3,75	150µm	53,3 ± 4,16	300µm	65,0 ± 4,29
		450µm	20,0 ± 1,88	200µm	45,4 ± 2,38	500µm	51,9 ± 6,28
				450µm	54,5 ± 5,02	550µm	62,2 ± 3,90
				500µm	59,7 ± 4,21	600µm	59,9 ± 4,99
				550µm	79,2 ± 6,84		

Nelle immagini in cui era presente un check sono stati eseguiti dei test-t per valutare differenze significative tra la rugosità media a monte o valle del check. Tra le 22 immagini di cui è stata

calcolata la rugosità quadratica media (Rq), 12 (54,5 %) presentavano dei check. I risultati dei t-test vengono riportati nella tabella 4.3.

Tabella 4.3 Nella tabella vengono riportati il valore della statistica *t* e del *p-value* per le immagini in cui era presente un check. In giallo vengono evidenziate le analisi che sono risultate significative.

	137 L -2018			100 L- 2018			302 L -2018	
	Statistica T	<i>p-value</i>		Statistica T	<i>p-value</i>		Statistica T	<i>p-value</i>
Check 50x50	1,962	0,078	Core	-0,261	0,801	100µm	0,237	0,816
Check 10x10	3,274	0,010	50µm	-0,719	0,482	550µm	-0,458	0,653
			150µm	1,373	0,191	600µm	-1,064	0,304
			200µm	-0,927	0,369			
			450µm	0,446	0,662			
			500µm	-0,491	0,630			
			550µm	-2,140	0,049			

Tra le 22 immagini analizzate, in una era visibile un diverso orientamento dei cristalli di aragonite: a 550 µm nel campione 100 L (Figura 4.9).

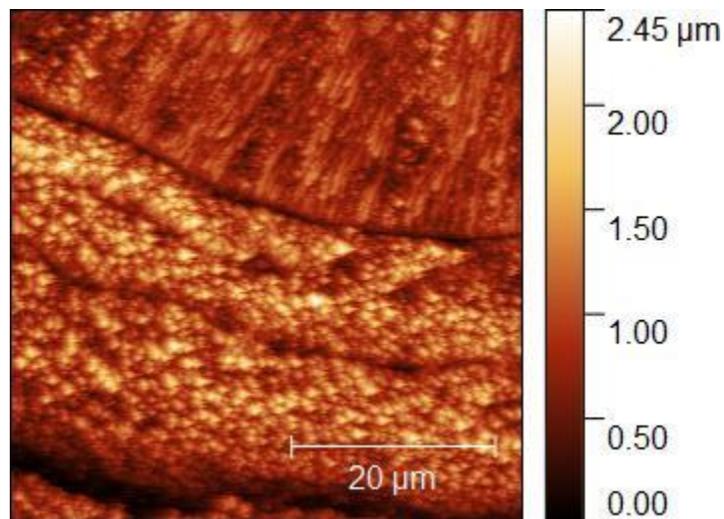


Figura 4.9. Immagine AFM raffigurante il cambiamento di orientamento dei cristalli di aragonite nel campione 100 L (2018).

5. DISCUSSIONE

5.1 MISURE ALLOMETRICHE

Dai risultati ottenuti dalle misure di allometria si evince la presenza di una relazione lineare positiva tra la lunghezza totale degli individui e i parametri degli otoliti sia per gli otoliti sinistri sia per quelli destri e nei tre anni di campionamento; i risultati sono in linea con i diversi studi effettuati sulle misure allometriche della specie *M. barbatus* (Milošević *et al.*, 2021; Aguirre e Lombarte, 2005). L'analisi dell'allometria è stata di supporto per l'analisi del check demersale; il fatto che la lunghezza degli otoliti e quella del pesce varino assieme e che tra le due ci sia una relazione lineare lascia intendere che la posizione del check demersale sia proporzionale alla lunghezza del pesce e di conseguenza che possa trovarsi ad una distanza fissa dal core.

L'analisi della covarianza tra la lunghezza totale del pesce e la lunghezza degli otoliti (Ferret) è stata svolta per gli otoliti di destra e sinistra all'interno di uno stesso anno e per i tre anni di campionamento. (Tabella 4.2). L'ANCOVA effettuata nel primo caso è risultata non significativa in tutti i 3 anni di campionamento, di conseguenza non si riscontrano differenze tra i valori del Ferret degli otoliti di sinistra e quelli di destra. Questo risultato mette in evidenza come sia presente simmetria tra l'otolite sinistro e destro. Mentre l'analisi della covarianza eseguita nei tre anni ha dato un *p-value* significativo. In questo studio, la diversa dimensione dei campioni può spiegare in parte la significatività ottenuta; in quanto gli individui provenienti dall'anno 2023 risultano appartenere ad una classe di taglia maggiore rispetto a quelli degli anni 2013 e 2018, portando quindi ad avere un campione non bilanciato.

L'analisi dei margini degli otoliti costituisce un ulteriore strumento per valutare le crescita degli individui; la natura opaca o ialina del bordo è infatti collegata al periodo di crescita in cui si trova l'animale. Un margine opaco è un margine ricco di materiale organico che è indice di una crescita rapida e solitamente si forma nel periodo primaverile-estivo, o comunque di maggiore fitness; al contrario il margine ialino corrisponde ad una zona dove si ha un tasso di deposizione inferiore, corrispondente ad una crescita più lenta dell'animale e la sua formazione avviene dunque nel periodo invernale dove si ha una minore disponibilità di risorse che influenza la crescita dell'animale. (Aldanondo *et al.*, 2015). In questo studio il pattern di deposizione osservato risulta essere in linea con lo schema sopraccitato per quanto riguarda i campioni degli anni 2013 e 2023 i quali sono stati pescati nei mesi estivi, rispettivamente giugno e agosto e presentano una frequenza

maggiore di margine opaco (Figura 4.4). Nei campioni dell'anno 2018 invece prevale il bordo ialino. Uno studio recente tuttavia (Carbonara *et al.*, 2019) evidenzia come nei giovanili (lunghezza totale dai 4 cm ai 9 cm), il margine degli otoliti sia prevalentemente ialino in estate (mesi di luglio e agosto) e da settembre il pattern di deposizione possa essere comparato con quello degli adulti in cui il bordo ialino si forma nei mesi invernali. Il t-test per valutare la presenza di differenze significative tra le lunghezze medie degli esemplari tra gli anni 2018 e 2023 è risultato significativo ($p\text{-value} < 0,05$). Le lunghezze risultano essere piuttosto diverse tra i due anni in quanto nel 2018 si hanno lunghezze comprese tra i 4 ed i 9 cm, mentre nel 2023 le lunghezze sono tutte di circa 9 cm; in più nel 2018 è presente un numero nettamente maggiore di campioni rispetto al 2023 ($n_{2018} = 60$; $n_{2023} = 22$).

Al fine di valutare differenze significative nella distribuzione dei due margini è stato effettuato un test del chi quadrato per equidistribuzione, il quale ha dato un $p\text{-value} < 0,05$ significativo solo per l'anno 2023, dove prevale il margine opaco (73 %) e non si riscontra equipartizione dei margini opachi o ialini tra i campioni. Il test eseguito per osservare l'indipendenza delle variabili nei 3 anni di campionamento è risultato non significativo; tuttavia, anche in questo caso è da tenere in considerazione la differenza tra il numero di campioni degli anni 2013 e 2018 e quello del 2023. Questa discrepanza può aver influenzato il risultato del test, il quale risulta al limite della significatività, rendendo necessario il confronto per ranghi, al fine di determinare con maggior precisione l'indipendenza delle variabili. Il confronto è risultato, non significativo tra gli anni 2013 e 2018, i due anni infatti non presentano grandi disparità tra le frequenze dei margini ed anche il numero di campioni per anno è simile; il confronto tra 2018 e 2023 è risultato significativo mentre quello tra 2013 e 2023 è risultato al limite della significatività ($p\text{-value} = 0,07$). Alla luce di questi risultati si può ipotizzare un'influenza della taglia e del diverso periodo di campionamento sulla presenza di bordo opaco o ialino. Uno spunto per uno studio futuro potrebbe essere quindi quello di potenziare l'analisi dei margini per verificare la diversa deposizione che vi può essere tra individui giovanili e adulti in questa specie, utilizzando un disegno di campionamento più idoneo e mirato per tale finalità.

5.2 CHECK DEMERSALE

L'analisi di regressione lineare tra la lunghezza del radius e quella totale del pesce (Figure 4.5, 4.6, 4.7) ha dato come risultato la presenza di linearità tra le due misure, risultando quindi in linea con

le misure allometriche degli otoliti e la lunghezza totale degli individui. Nell'anno 2018 si osserva un valore di R^2 piuttosto basso; uno dei motivi che può aver influito su questo risultato è dato dalla misura del radius effettuata, in alcuni campioni del 2018 è stato difficoltoso individuare correttamente il core in quanto l'otolite si presentava piuttosto opaco, di conseguenza ci possono essere state delle misurazioni sfalsate che hanno portato a degli outlier che abbassano il valore del coefficiente di determinazione. La presenza di più materiale nella zona del core può essere spiegata dal mese in cui sono stati prelevati i campioni, nel 2018 infatti i campioni sono stati prelevati nel mese di agosto mentre, ad esempio, quelli del 2013 a giugno, di conseguenza i parametri ambientali che regolano la fitness possono essere stati differenti e aver portato ad un maggiore tasso di deposizione nel 2018.

Il processo di individuazione del check demersale sulle immagini è risultato come previsto piuttosto complesso, non in tutti i campioni era ben distinguibile una discontinuità che potesse effettivamente ricondurre ad un falso anello derivante dal processo di settlement. Il check demersale individuato sui campioni era prevalentemente visibile come un falso anello, in molti casi non era presente lungo tutto il perimetro dell'otolite ma era più visibile come una zona ialina. Questa problematica si può ricondurre ad un limite nell'analisi derivante dalla lavorazione lungo il piano sagittale. Le procedure di grinding e polishing su questa direttrice infatti, sebbene portino ad un raggiungimento del piano del core più velocemente e permettano di localizzare con maggiore precisione il core, possono causare diverse difficoltà ad individuare non solo la presenza o meno di un check demersale, ma anche l'*annulus* che "gira" lungo tutto l'otolite. Nonostante ciò il risultato complessivo dell'analisi è in linea con lo studio di riferimento (Carbonara *et al.*; 2019); per cui si è visto che nella maggior parte dei campioni il check demersale era presente ad una distanza dal core compresa tra i 600 ed i 700 μm (Figura 4.8). Al fine di ridurre le difficoltà legate all'individuazione del check demersale, può essere utile per eventuali studi futuri indagare anche gli altri tipi di sezione come per esempio quella trasversale, dove, se da una parte è più complesso individuare il piano del core, dall'altra permette di avere una visuale più completa degli anelli di accrescimento e delle eventuali discontinuità presenti, tenendo anche conto del fatto che una sezione in cui l'area da studiare è più piccola, risulta più facile da analizzare al microscopio a forza atomica; avendo un campo di dimensioni minori da scansionare può essere utilizzata una risoluzione maggiore.

Negli otoliti degli esemplari che avevano una lunghezza totale di circa 4 cm, il check demersale corrispondeva al bordo dell'otolite, che risultava infatti ialino, anche questo sembra in linea con lo studio di riferimento (Carbonara *et al.*, 2019) che ha esaminato, tramite back calculation, come la formazione del check demersale avvenga quando l'animale ha una lunghezza totale di circa 4 cm, corrispondente alla dimensione alla quale avviene il settlement; essendo questa la lunghezza coincidente al momento in cui le triglie di fango giungono sul fondale, è anche la lunghezza alla quale si ha il reclutamento all'attrezzo, in questo caso la rete MEDITS. Il test di indipendenza del chi-quadrato effettuato per valutare differenze tra i valori delle distanze dal core è risultato non significativo, di conseguenza le diverse distanze sono indipendenti tra di loro e non mostrano differenze significative in relazione all'anno di campionamento.

In generale l'individuazione del check demersale è un tema ancora piuttosto dibattuto, ad esempio la distanza di circa 700 μm dal core in questo elaborato e in quello di Carbonara viene indicata come possibile posizione più frequente del check demersale o comunque del primo anello che si riesce ad identificare (Matić-Skoko *et al.*, 2015), in altri studi invece si evidenziano non uno, ma due check prima dell'annulus, uno pelagico e uno demersale (Vrantzas *et al.*, 1992; Sieli *et al.*, 2011). È importante sottolineare però che alcuni di questi studi sono stati condotti su esemplari provenienti da aree geografiche differenti del Mediterraneo, il che potrebbe spiegare le diverse "letture" degli otoliti di *M. barbatus*. Il processo del settlement infatti implica un cambiamento non solo di alimentazione ma anche dei fattori ambientali a cui viene sottoposto l'animale, in particolare temperatura, salinità e pressione. Questi parametri, che vengono registrati negli otoliti, variano a seconda delle zone del Mediterraneo e del Mare Adriatico stesso, di conseguenza questa variabilità si può ripercuotere sugli otoliti stessi rendendo più o meno evidente la presenza di discontinuità come il check demersale.

5.3 ANALISI AL MICROSCOPIO A FORZA ATOMICA

I check che sono stati individuati nelle immagini prese all'AFM nella maggior parte dei casi non corrispondevano al check demersale individuato sulle immagini prese al microscopio ottico. Innanzi tutto le distanze dal core analizzate all'AFM in cui era presente una discontinuità spesso non corrispondevano alla distanza a cui era stata individuata sulle immagini dell'otolite. Un'ulteriore causa potrebbe essere dovuta alla scelta di operare sulla direttrice dorso-ventrale che risulta essere maggiormente consumata dalle procedure di grinding e polishing.

Dalle analisi svolte sulla rugosità dei campioni sono emerse delle interessanti valutazioni riguardo il tipo di etching applicato sui campioni. I campioni trattati con decalcificante Sutter (100 L e 302 L), risultano avere dei valori di rugosità media quadratica maggiori rispetto ai campioni trattati con EDTA (134 L) e acido acetico (137 L) (Tabella 4.4). Il motivo per cui si ha questa differenza potrebbe essere dovuto appunto al diverso modo di agire dei tre etching e può confermare come il decalcificante Sutter lavori in una maniera maggiormente omogenea, rendendo i cristalli più visibili poiché asporta meno materiale rispetto a EDTA e acido acetico.

I t-test effettuati per le immagini in cui erano presenti dei check hanno dato quasi tutti un valore del *p-value* maggiore di 0,05, constatando quindi la non significatività del test statistico; di conseguenza non si rigetta l'ipotesi nulla H_0 che afferma l'indipendenza delle variabili. Si deduce quindi che non ci sono delle differenze significative tra i valori di rugosità quadratica media tra le zone a monte e a valle di un check. L'unico t-test risultato significativo è stato quello effettuato su un'immagine del campione 137 L in cui era presente un check. (Tabella 4.5). L'immagine aveva dimensione di $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, essa è un dettaglio dell'immagine di dimensione più grande ($50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$). Questo risultato può essere dovuto al fatto che le misure provengono da un dettaglio di un'immagine di dimensioni maggiori e di conseguenze eventuali differenze nella rugosità possono essere accentuate dalla miglior risoluzione; inoltre anche la tipologia di etching utilizzato, in questo caso acido acetico, potrebbe aver influenzato il risultato ottenuto.

L'analisi al microscopio a forza atomica ha inoltre permesso di valutare se al check demersale individuato sull'otolite corrispondeva anche un cambio nell'orientamento o nella forma dei cristalli di aragonite. Su 22 immagini analizzate, in uno era visibile un diverso orientamento dei cristalli di aragonite: a $550\ \mu\text{m}$ nel campione 100. Il t-test effettuato tra i valori di R_q a monte e valle del check è risultato significativo (*p-value* = 0,049); pertanto si può accettare l'ipotesi alternativa (H_1) la quale prevede una differenza significativa tra la rugosità quadratica media delle due aree separate dal check. Lungo il radius l'anello demersale risulta posizionato a $558\ \mu\text{m}$, trasferendo quindi la posizione rilevata lungo la direzione dorso-ventrale sulla direttrice del radius il check incontrato potrebbe essere riconducibile quello demersale. Tuttavia, la distanza di $550\ \mu\text{m}$ in direzione dorso-ventrale indica una posizione in prossimità del bordo dell'otolite, il quale non è del tutto in piano, ma presenta una curvatura proprio in prossimità del bordo. Anche negli otoliti lavorati questa è ancora presente in quanto l'estremità del margine si presentava ancora coperta di

resina, quindi il campione nel complesso non era tutto in piano. Di conseguenza il diverso orientamento è probabile che sia dovuto alla geometria dell'otolite, il quale sta cristallizzando in corrispondenza del margine e quindi con un diverso raggio di curvatura.

Sarebbe opportuno in lavori futuri aumentare il numero di campioni da osservare all'AFM in modo da avere un maggiore riscontro se le discontinuità osservate siano derivanti dal settlement oppure da altri fattori fisiologici.

6. CONCLUSIONI

In conclusione lo studio evidenzia come sia presente nella maggior parte dei casi una discontinuità ad una distanza dal core che corrisponde a quella vista nello studio di riferimento.

Inoltre, si è visto come il microscopio a forza atomica possa costituire uno strumento determinante per l'analisi della microstruttura degli otoliti e anche come possa essere un aiuto nella stima dell'età degli individui andando ad analizzare nel dettaglio gli anelli annuali, così come le discontinuità che possono essere presenti.

Sono state osservate diverse criticità che possono costituire un valido spunto per progetti futuri sullo studio non solo del check demersale ma anche riguardanti la determinazione dell'età di *M. barbatus*. L'individuazione del check è risultata complessa in primis per via della sezione scelta, si consiglia quindi di esplorare anche la sezione frontale e soprattutto quella trasversale, la quale permetterebbe una più accurata visualizzazione a livello microscopio delle discontinuità e della struttura dell'otolite. Per la visualizzazione all'AFM un ruolo importante è stato giocato dalla tipologia di etching utilizzata, potrebbe essere utile lavorare o sui tempi di azione dei tre composti utilizzati in questo studio o sperimentare altri composti che già vengono adoperati per l'analisi al microscopio elettronico a scansione. In aggiunta, per ridurre i tempi di preparazione, ottenendo la stessa precisione nello studio dell'età e del processo di settlement, si potrebbero anche lavorare i lapilli oltre alle sagittae. Questi ultimi infatti essendo di piccole dimensioni richiedono un minor tempo di lavorazione, anche se proprio per via delle dimensioni risultano più difficili da estrarre e necessitano di maggiori accorgimenti durante la lavorazione.

Risulta di fondamentale importanza incrementare le metodologie per gli studi di validazione dell'età di *M. barbatus* e per l'individuazione del check demersale al fine di tracciare al meglio le

dinamiche della popolazione e gli stock presenti, anche in considerazione degli importanti cambiamenti climatici e ambientali che possono influire sugli avvenimenti fisiologici dell'animale; e come si possano introdurre sistemi come il microscopio a forza atomica nella validazione e nelle procedure di studio dell'età non solo per la specie in oggetto ma anche per altre specie.

BIBLIOGRAFIA

Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ Biophotonics International 11:36-42.

Aldanondo N, Cotano U, Alvarez P, Uriarte A (2015) Validation of the first annual increment deposition in the otoliths of European anchovy in the Bay of Biscay based on otolith microstructure analysis, Marine and Freshwater Research, 67:943-950 <http://dx.doi.org/10.1071/MF15083>

Aguirre H (1997) Presence of dentition in the premaxilla of juvenile *Mullus barbatus* and *M. surmuletus*, Journal of fish biology, 51:1186-1191 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01135.x>

Artegiani A, Bregant D, Paschini E, Pinardi N, Raicich F, Russo A (1997) The Adriatic Sea General Circulation. Part II: Baroclinic Circulation Structure, Journal of Physical Oceanography 27:1515-1532 [http://dx.doi.org/10.1175/1520-0485\(1997\)027%3C1515:TASGCP%3E2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1175/1520-0485(1997)027%3C1515:TASGCP%3E2.0.CO;2)

Bertrand JA, Relini G, (2000) Demersal resources in the Mediterranean, Proceedings of the symposium held in Pisa 18-21 March 1998 Actes de Colloques Ifremer Plouzané 26: 238 p.

Bertrand JA, Gil de Sola L, Papaconstantinou C, Relini G, Souplet A (2002) The general specifications of MEDITS surveys, *Scientia Marina* 66:9-17

<https://doi.org/10.3989/scimar.2002.66s29>

Bian K, Gerber C, Heinrich A J, Müller DJ, Scheuring S, Jiang Y (2021) Scanning probe microscopy, *Nature Reviews Methods Primers* 1:36 <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00033-2>

Bombace G, Lucchetti A (2011) *Elementi di biologia della pesca*. Edagricole, Milano (MI).

Campana S, Neilson J (1985) Microstructure of fish otoliths, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42:1014-1032 <https://doi.org/10.1139/f85-127>

Campana S (1999) Chemistry and composition of fish otoliths: Pathways, mechanisms and applications *Marine Ecology-Progress Series*, 188:263-297 <http://dx.doi.org/10.3354/meps188263>

Campana S (2001) Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods, *Journal of Fish Biology*, 59:197 – 242 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00127.x>

Campanelli A, Grilli F, Paschini E, Marini M (2011) The influence of an exceptional Po River flood on the physical and chemical oceanographic properties of the Adriatic Sea, *Dynamics of Atmospheres and Oceans*, 52:284-297 <http://dx.doi.org/10.1016/j.dynatmoce.2011.05.004>

Carbonara P, Intini S, Kolutari J, Joksimović A, Milone N, Lembo G, Casciaro L, Bitetto I, Zupa W, Spedicato MT, Sion L (2019) A holistic approach to the age validation of *Mullus barbatus* L.,

1758 in the Southern Adriatic Sea (Central Mediterranean), Scientific Reports 8:13219
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30872-1>

Carbonara P, Follesa MC (2019) Handbook on fish age determination: a Mediterranean experience Studies and Reviews. No. 98. Rome, FAO 192 pp.

Çiçek E (2015) Age, growth and mortality parameters of *Mullus barbatus* Linnaeus, 1758 (Perciformes: Mullidae) in Iskenderun Bay, northeastern Mediterranean, Iranian Journal of Ichthyology, 2:262-269 <https://doi.org/10.22034/iji.v2i4.83>

Cuadros A, Moranta J, Cardona L, Thiriet P, Pastor J, Arroyo N, Cheminée A (2016) Seascape attributes, at different spatial scales, determine settlement and post-settlement of juvenile fish, Estuarine Coastal and Shelf Science, 185: 120-129 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2016.12.014>

Cushman-Roisin B, Gacic M, Poulain PM, Artegiani A (2013) Physical oceanography of the Adriatic Sea: past, present and future (1st ed), Springer Science & Business Media, Dordrecht.

Dauphin Y, Dufour E (2008) Nanostructures of the aragonitic otolith of cod (*Gadus morhua*), Micron, 39: 891-896 <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2007.11.007>

Gauldie R W (1999) Ultrastructure of lamellae, mineral and matrix components of fish otolith twinned aragonite crystals: implications for estimating age in fish, Tissue and Cell, 31:138-153
<https://doi.org/10.1054/tice.1999.0030>

Green BS, Mapstone B, Carlos G, Begg GA (2009) Tropical fish otoliths: information for assessment, management and ecology Springer, New York (NY).

Gücü AC, Bingel F (2022) Identification of critical demersal fish habitats in the Northeast Mediterranean-with an emphasis on *Mullus barbatus*, Acta Biologica Turcica, 35:1-1.

Haidar Z (1970) L' ecologie du rouget (*M. barbatus* L.) en Adriatique orientale, Acta adriatica, 14: 1-94.

Hammer O, Harper D, Ryan P (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, Palaeontologia Electronica, 4: 1-9.

Kalish JM, Beamish RJ, Brothers EB, Casselman JM, Francis RICC, Mosegaard H, Panfili J, Prince E, Thresher RE, Wilson CA, Wright P (1995) Glossary for otolith studies Glossary. In Recent developments in fish otolith research (Secor DH, Dean JM, Campana SE ed.) pp. 723-729. Columbia (USA: University of South Carolina Press.

Kraus R, Grilli F, Supić N, Janeković I, Brailo M, Cara M, Škalic D (2019) Oceanographic characteristics of the Adriatic Sea—support to secondary HAOP spread through natural dispersal, Marine pollution bulletin, 147:59-85 <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.062>

Kumar B, Rajesh RT (2012) AFM studies on surface morphology, topography and texture of nanostructured zinc aluminum oxide thin films, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 7:1881-1889.

ICES (2017) Workshop on Ageing Validation methodology of *Mullus* species (WKVALMU), 15-19 May 2017, Conversano, Italy. ICES CM 2017/ SSGIEOM:31. 74 pp <https://doi.org/10.17895/ices.pub.8697>

Maldonado Coyac J, Sánchez-Cárdenas R, Ramírez-Pérez JS, Salcido-Guevara L, Valdez-Núñez K, Pérez-Centeno A, Maldonado M, (2021) Otoliths morphology and age-record in *Bagre panamensis* (Siluriformes: Ariidae) inhabiting at the southeast of Gulf of California, Latin American Journal of Aquatic Research, 49:404-417 <http://dx.doi.org/10.3856/vol49-issue3-fulltext-2654>

Masnadi F, Carbonara P, Cardinale M, Scarcella G, Milone N, Arneri E, Dragičević, B, Scanu M, Ceriola L, Hernandez P, Sharma R, Falsone F (2021) Working Group on Stock Assessment of Demersal Species (WGSAD) - Benchmark session for the assessment of common sole in GSA 17.

Matić-Skoko S, Ferri J, Stagličić N, Dragičević B, Dulčić J, Tutman P and Brajčić Jurica D (2015) Age determination and validation on otoliths for two sympatric species, *Mullus barbatus* (Linnaeus, 1758) and *Mullus surmuletus* (Linnaeus, 1758), in the Adriatic Sea, Frontiers in Marine Sciences, Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology. <http://dx.doi.org/10.3389/conf.FMARS.2015.03.00174>

McKinney FK (2007) The Northern Adriatic ecosystem - Deep time in a shallow sea (1st ed) Columbia University Press, New York.

MEDITS-Handbook. Version n. 9, 2017, MEDITS Working Group: 106 pp.

Meyer E, Hug HJ, Bennewitz R (2021) Scanning probe microscopy (2nd ed) Springer, New York

Milošević D, Pesic A, Ikica Z, Mitrović T, Paskaš (2021) Biometry of the sagittal otoliths for three demersal fish species from the Eastern Adriatic Sea (Montenegro), *Acta Adriatica* 62: 171-182. <https://doi.org/10.32582/aa.62.2.5>

Mironov VL, (2004) Fondamenti di microscopia a scansione di sonda, Accademia russa delle scienze, Istituto per la fisica delle microstrutture.

Nazir A, Khan MA (2021) Using otoliths for fish stock discrimination: status and challenges, *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 51: 199-218 <https://doi.org/10.3897/aiep.51.64166>

Nečas D, Klapetek P (2012) Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis, *Central European Journal of Physics*, 10: 81-188 <http://dx.doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2>

Onay H, Dalgiç G (2019) Seasonal changes in the food spectrum and day-time rhythm of feeding in red mullet *Mullus barbatus* (Linnaeus, 1758) in the southeast black sea, *Fresenius Environmental Bulletin*, 28:2671-2678.

Panfili J, De Pontual H, Troadec H, Wright PJ (2002) *Manual of Fish Sclerochronology* (1st ed) Ifremer-IRD, Brest, France.

Pannella G (1971) Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns, *Science* 173:1124-1127 <https://doi.org/10.1126/science.173.4002.1124>

Pannella G (1974) Otoliths growth patterns: an aid in age determination in temperate and tropical fishes. In *The ageing of fish* (Bagenal TB, ed.) Unwin Brother's Limited, London, UK.

Raventós N, Macpherson E (2001) Planktonic larval duration and settlement marks on the otoliths of Mediterranean littoral fishes, *Marine Biology*, 138:1115–1120.
<http://dx.doi.org/10.1007/s002270000535>

Rodriguez-Mendoza R (2006) Otoliths and their applications in fishery science, *Croatian Journal of Fisheries*, 64: 89-102 <https://doi.org/10.3390/books978-3-0365-6613-9>

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nature Methods*, 9:676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Sieli G, Badalucco C, Di Stefano G, Rizzo P, D’Anna G, Fiorentino F (2011) Biology of red mullet, *Mullus barbatus* (L. 1758), in the Gulf of Castellammare (NW Sicily, Mediterranean Sea) subject to a trawling ban, *Journal of Applied Ichthyology*, 27:1218-1225 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01784.x>

Spedicato MT, Massutí E, Mérigot B, Tserpes G, Jadaud A, Relini G (2019) The MEDITS trawl survey specifications in an ecosystem approach to fishery management. *Scientia Marina* 83: 9-20.
<https://doi.org/10.3989/scimar.04915.11X>

Stevenson DK, Campana SE (1992) Otolith microstructure examination and analysis, *Canadian Special Publication of Fisheries Aquatic Sciences*, 117: 126.
<http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.22258.61127>

Tserpes G, Fiorentino F, Levi D, Cau A, Murenu M, Zamboni A, Papaconstantinou C (2002) Distribution of *Mullus barbatus* and *M. surmuletus* (Osteichthyes: Perciformes) in the Mediterranean continental shelf: Implications for management, *Scientia Marina*, 66: 39-54. <http://dx.doi.org/10.3989/scimar.2002.66s239>

Tserpes G, Massutí E, Fiorentino F, Facchini MT, Viva C, Jadaud A, Joksimovic A, Pesci P, Piccinetti C, Sion L, Thasitis I, Vrgoc N (2019) Distribution and spatio-temporal biomass trends of red mullets across the Mediterranean, *Scientia Marina*, 83:43-55. <http://dx.doi.org/10.3989/scimar.04888.21A>

Vrantzas N, Kalagia M, Karlou C (1992) Age, growth and state of stock of red mullet (*Mullus barbatus* L. 1758) in the Saronikos Gulf of Greece, *FAO Fisheries Report* 477: 51–67.

Vrdoljak L, Režić M, Petričević I (2021) Bathymetric and geological properties of the Adriatic Sea, *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*, 36: 93-107 <https://doi.org/10.17794/rgn.2021.2.9>

Vrgoč N, Arneri E, Juki-Peladic S, Krstulovic Šifner S, Mannini P, Marceta B, Osmani K, Piccinetti, C, Ungaro N (2004) Review of current knowledge on shared demersal stocks of the Adriatic Sea, *FAO-MiPAF Scientific Cooperation to Support Responsible Fisheries in the Adriatic Sea*, *AdriaMed Technical Documents*, 12: 91.

Wilson D, McCormick M (1999) Microstructure of settlement-marks in the otoliths of tropical reef fishes, *Marine Biology*, 134:29-41 <http://dx.doi.org/10.1007/s002270050522>

Yildiz T, Karakulak F (2016) An investigation of age, growth and mortality of the red mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758) in the western Black Sea, *Cahiers de Biologie Marine*, 57:415-425.

Appendice

In appendice vengono riportate le tabelle contenenti i valori dei coefficienti del modello lineare delle misure allometriche. **A)** Coefficiente di Pearson (r) e p -value delle relazioni di cui sono riportati i grafici nel testo. **B)** Vengono riportati i valori del coefficiente di determinazione (R^2), coefficiente di Pearson (r) e p -value delle altre relazioni analizzate. In giallo vengono evidenziati i valori risultati significativi.

	r	p -value
LT-Feret sinistro 2013	0,91	4,65E-10
LT-Feret destro 2013	0,94	7,36E-12
LT-Feret sinistro 2018	0,90	5,92E-17
LT-Feret destro 2018	0,93	8,38E-22
LT-Feret sinistro 2023	0,77	0,01
LT-Feret destro 2023	0,86	0,001
LT-Area sinistro 2013	0,93	6,78E-13
LT-Area destro 2013	0,96	1,64E-13
LT-Area sinistro 2018	0,92	3,51E-21
LT-Area destro 2018	0,94	4,54E-24
LT-Area sinistro 2023	0,74	0,01
LT-Area destro 2023	0,76	0,01
LT- MinFerret sinistro 2013	0,92	1,47E-12
LT- MinFerret destro 2013	0,95	3,61E-14
LT- MinFerret sinistro 2018	0,90	1,37E-17
LT- MinFerret destro 2018	0,91	1,67E-20
LT- MinFerret sinistro 2023	0,76	0,01
LT- MinFerret destro 2023	0,76	0,01

A)

	R^2	r	p -value
LT-Perimetro sinistro 2013	0,84	0,91	3,32E-10
LT-Perimetro destro 2013	0,90	0,95	1,55E-12
LT-Perimetro sinistro 2018	0,80	0,90	8,24E-19
LT-Perimetro destro 2018	0,84	0,91	3,40E-20
LT-Perimetro sinistro 2023	0,49	0,70	0,02
LT-Perimetro destro 2023	0,59	0,77	0,01
LT-Circolarità sinistro 2013	0,20	0,45	0,01
LT-Circolarità destro 2013	0,33	0,58	0,001
LT-Circolarità sinistro 2018	0,05	-0,21	0,12
LT-Circolarità destro 2018	0,09	-0,30	0,02
LT-Circolarità sinistro 2023	0,05	-0,23	0,50
LT-Circolarità destro 2023	0,24	-0,49	0,13
LT- AR sinistro 2013	0,13	0,36	0,44
LT- AR destro 2013	0,10	0,33	0,79
LT- AR sinistro 2018	0,11	0,10	0,44
LT- AR destro 2018	0,10	0,10	0,44
LT- AR sinistro 2023	0,57	0,76	0,66
LT- AR destro 2023	0,43	0,65	0,27

B)