



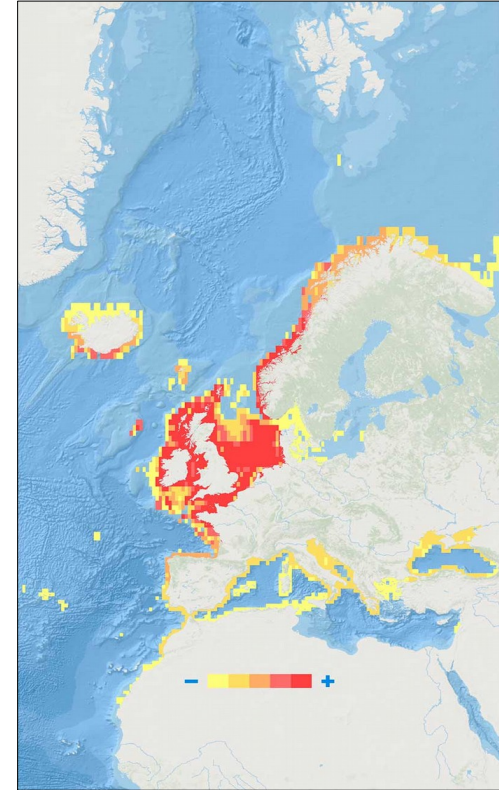
# Elevated $p\text{CO}_2$ Affects Feeding Behavior and Acute Physiological Response of the Brown Crab *Cancer pagurus*

Youji Wang <sup>1,2,3,4</sup> , Menghong Hu <sup>1,2,3 \*</sup> , Fangli Wu <sup>1,2</sup> , Daniela Storch <sup>3</sup> and Hans-Otto Pörtner <sup>3</sup>

*Cancer pagurus*

*C. pagurus* o granchio marrone è distribuito lungo la costa Atlantica Nord-Orientale: dalla Norvegia all'Africa ed è presente anche nel Mar Mediterraneo.

Vive in un range di temperatura che va dai 4°C ai 16°C a seconda della stagione e dell'area geografica.

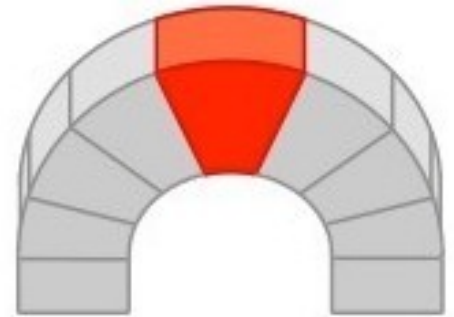


Ha due chele forti in grado di rompere i duri gusci dei molluschi.

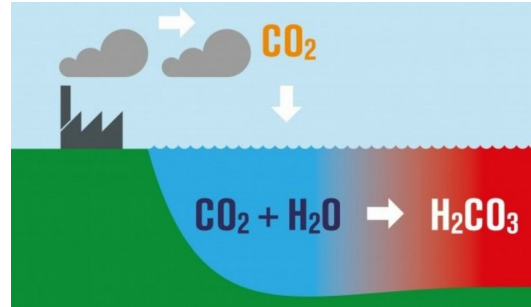
Il granchio marrone è un **predatore** di altri crostacei e organismi filtratori, ma è specializzato nelle prede col guscio rigido (mitili).

Ha specifici habitat di alimentazione: lungo la costa o nelle acque superficiali.

La predazione ha un ruolo ecologico importante (keystone), infatti influenza significativamente la struttura e la composizione delle comunità nelle aree in cui vive.



In Europa ha un'importanza ecologica ed economica, per questo in vista di cambiamenti ambientali sono state indagate le risposte fisiologiche in funzione di alcuni stress ambientali, come **acidificazione dei mari** a causa dell'aumento di  $\text{CO}_2$ .



Effetti conosciuti di elevata  $\text{pCO}_2$  nei mari sugli animali, fra cui i crostacei:

- Costo per mantenere l'equilibrio acido-base
- Compromissione crescita, sviluppo, nuoto, risposta immunologica
- Aumento di  $\text{CO}_2$  nei compartimenti extracellulari e negli spazi intracellulari
- Un aumento di  $\text{H}^+$  (acidosi): rischio danni ai processi chiave del metabolismo (respirazione, circolazione sanguigna, sintesi proteine, regolazione ionica, funzionamento nervi e cervello).

Per far fronte a questi stress la spesa energetica è elevata e quindi risulta minore l'energia disponibile per altri processi, fra cui **alimentazione** e digestione, che richiedono un'ulteriore energia.



Causa la Specific Dynamic Action (SDA o stimolazione post-prandiale) che è rappresentata dalla domanda energetica per la digestione del cibo e da un aumento dell'attività cardiaca.

Determinare come una  $p\text{CO}_2$  influenzi il comportamento di alimentazione e caccia associato al metabolismo sembra essere essenziale per capire i cambiamenti nelle performance della specie e capire l'impatto di questi cambiamenti su tutta la catena alimentare e sulla struttura delle comunità.

---

---

# OBIETTIVO

Identificare come un aumento di  $\text{CO}_2$  influisca direttamente sui comportamenti di alimentazione.

Nell'articolo è stato esaminato l'impatto di un progressivo aumento di  $\text{pCO}_2$  sul tasso di consumo di ossigeno per:

- Metabolismo basale;
- SDA (Specific Dynamic Action);
- Comportamento di alimentazione;
- Comportamento di caccia.



---

# **MATERIALI E METODI**

---

## Cattura:

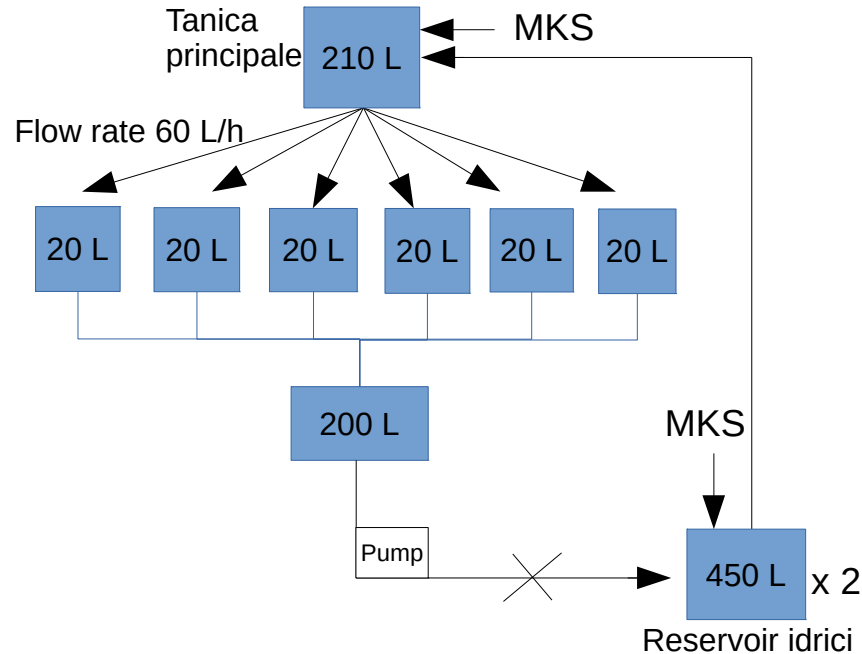
- Helgoland (Germania)
- 12 individui adulti dalla zona subtidale:
  - 6 Maschi e 6 Femmine
  - Body mass =  $190 \pm 11$  g
  - Carapace =  $10,5 \pm 0,7$  cm
- Stesso stadio di crescita dell'endoscheletro: no bias
- Trasporto in taniche costantemente rifornite con acqua di mare del Mare del Nord



## Mantenimento in acquario:

- Temperatura di  $8^{\circ}\text{C}$  in acqua di mare a 32‰ di salinità
- Alimentati con 2 molluschi al giorno: *Mytilus edulis* (circa 6 g)
- Acqua cambiata periodicamente 2 volte a settimana
- La concentrazione di ammoniaca mantenuta a  $\text{NH}_3 < 0,02$  mg/L



SISTEMA SPERIMENTALE (x 2)Sistema di incubazione con CO<sub>2</sub>:

- stanza con temperatura controllata a 10°C
- Luce a LED mantenuta costante e tenue
- 2 Sistemi Sperimentali Indipendenti:
  - In ogni tanica (20L) 1 granchio;
  - Ogni tanica coperta con un film trasparente per minimizzare il disturbo esterno;
- Regolatore di flusso (MKS): miscela di air-CO<sub>2</sub> che gorgoglia per raggiungere le [CO<sub>2</sub>] sperimentali.
- 2 volte a settimana acqua cambiata (X)
- Il pH gradualmente cambiato nell'arco di 12 h.

## PARAMETRI GENERALI:

pCO<sub>2</sub> misurata 1 volta a settimana in tutte le taniche con “carbon dioxide probe” e “carbon dioxide meter”.

Phmetro: Misura il **pH**.

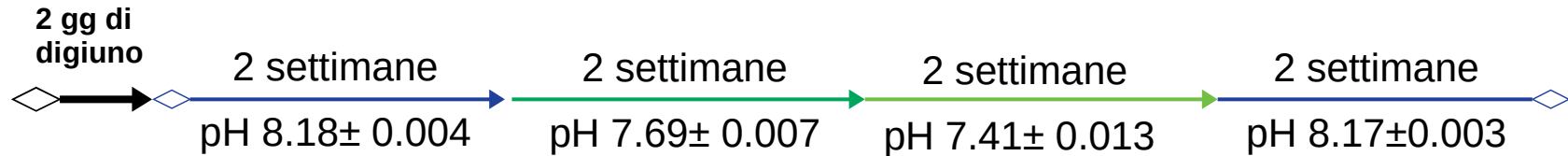
Salinometro: misura **temperatura** e **salinità**.

- Granchi puliti e liberati da epibionti.
- Esposti a 10°C a 32‰ di salinità in una stanza a temperatura controllata.
- Separati casualmente in 12 taniche da 20 L, pulite giornalmente.
- Per 54 giorni sotto pH controllato di **8.18±0.004** per assicurarsi acclimatazione e condizioni fisiologiche stabili durante il periodo.
- Alimentati con 2 molluschi al giorno (senza guscio): *Mytilus edulis* (circa 6 g).



2 gg di digiuno prima dell'esposizione per assicurarsi:

- × no cibo nell'intestino;
- × no effetti di digiuno a lungo termine.

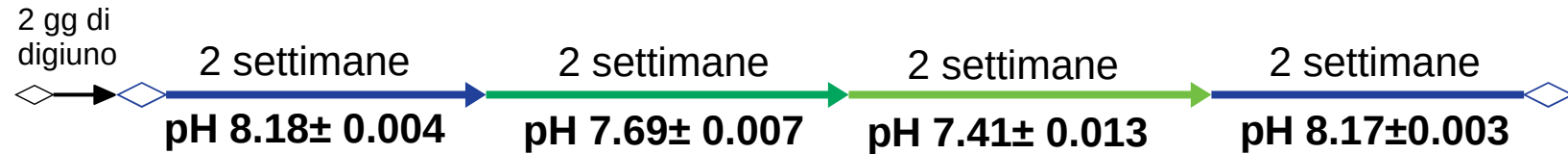


2 settimane a pH  $8.18 \pm 0.004$  → Controllo

2 settimane a pH  $7.69 \pm 0.007$  ( $1232 \mu\text{atm CO}_2$ ) → Esposizione

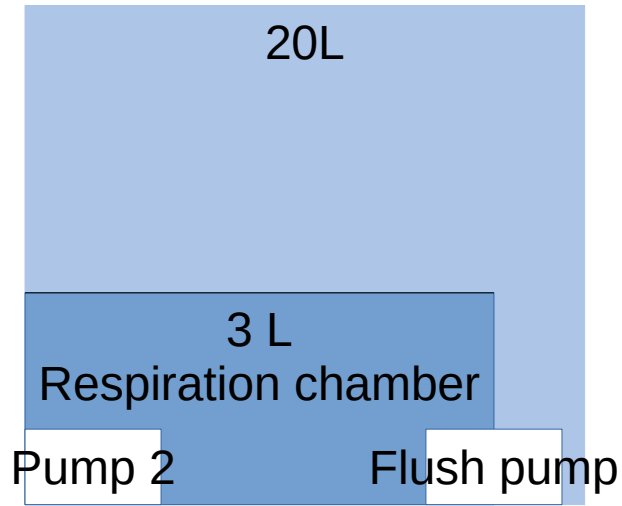
2 settimane a pH  $7.41 \pm 0.013$  ( $2317 \mu\text{atm CO}_2$ ) → Esposizione

2 settimane a pH  $8.17 \pm 0.003$  → per rilevare un potenziale Recupero



Per ogni 2 settimane (14 giorni) vengono testate le attività metaboliche e il comportamento di alimentazione:

- 7° giorno tasso consumo di ossigeno
- 8° giorno risposta SDA (Specific Dynamic Action)
- 10° giorno selezione taglia preda
- 12° giorno tasso di alimentazione
- 14° giorno comportamento di caccia



MO<sub>2</sub> o tasso di consumo di ossigeno (nmol O<sub>2</sub>/min·g):

- Camera di respirazione (CO<sub>2</sub> in eq. con la tanica di 20 L):
  - Flush pump spinge acqua all'interno della camera, quando è aperta
  - Respirometro misura il MO<sub>2</sub> per 45 minuti
  - La 2<sup>a</sup> pompa fa ricircolare l'acqua nella camera (no gradienti di O<sub>2</sub>)

% di O<sub>2</sub> misurata ogni 30 s da un misuratore ottico

SMR o standard metabolic rate (kJ) viene stabilito in 24h nel pre-esperimento. È il 10% dei tassi metabolici più bassi stabili per 40 minuti.

Specific Dynamic Action (Termogenesi indotta dalla dieta o Azione dinamico specifica o Stimolazione post-prendiale): il processo metabolico legato alla spesa energetica che avviene dopo l'ingestione di cibo.

Viene calcolato in 24h dopo la misura del SMR:

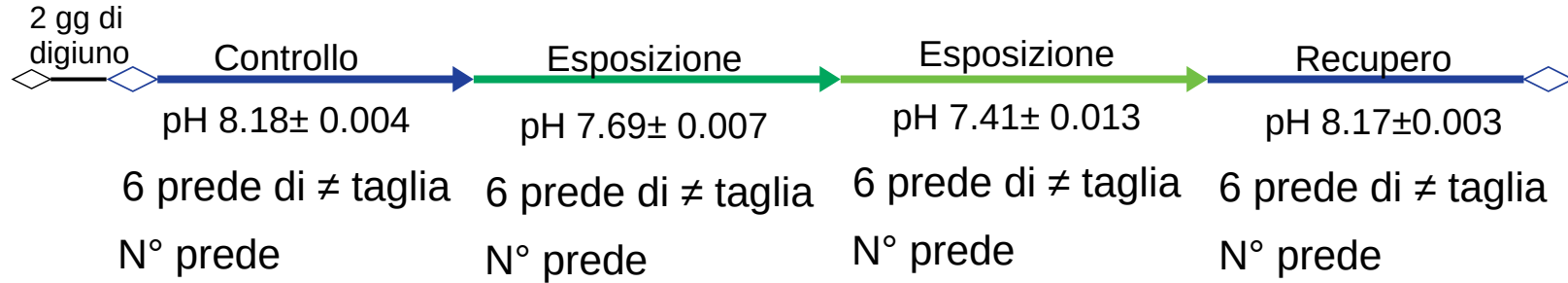
$$\rightarrow \text{SDA (kJ)} = \text{MO}_2 - \text{SMR}$$

Calcolati:

- Peak  $\text{MO}_2$
- Tempo per raggiungere il peak  $\text{MO}_2$
- La durata della risposta di SDA
- Scope di SDA (peak  $\text{MO}_2/\text{SMR}$ )
- SDA co-efficient: esprime la proporzione dell'energia di digestione usata per il processo digestivo (kJ)



Peak  $\text{MO}_2$  (nmol  $\text{O}_2/\text{min}\cdot\text{g}$ ): picco metabolico cioè il massimo consumo di ossigeno dopo l'alimentazione (il 10% dei tassi metabolici più alti dopo l'alimentazione).



I granchi vengono cibati con *Mytilus edulis* (con guscio):

- 6 prede contemporaneamente per granchio
- **6 dimensioni diverse** di guscio: 10–20, 21–30, 31–40, 41–50, 51–60, 61–70 mm
- Il consumo della preda viene registrato in 24h
- In ogni trattamento veniva posta la taglia preferita secondo il controllo (41-50 mm)

TASSO DI ALIMENTAZIONE: calcolato come il numero di molluschi mangiati al giorno.

Video camera (a 1,2 m) che registra h24 i movimenti dei granchi sul fondo:

- Searching time (**St**): dall'introduzione del mollusco nella tanica a quando il granchio lo afferra con le chele;
- Breaking time (**Bt**): dal primo contatto con la preda, rottura del guscio, al primo morso del tessuto esposto;
- Eating time (**Et**): dal primo morso, estrazione del mitilo, all'abbandono del guscio aperto;
- Handling time (**Ht**) = Bt + Et : tempo di manipolazione della preda.

PREY PROFITABILITY (redditività) = peso della preda / Ht (mg/s)

---

Software SPSS 17.0: analisi distribuzione normale (Shapiro-Wilk's test) e omogeneità della varianza (Levene's test)

ANOVA: comparare le diverse risposte fisiologiche e comportamentali a diversi livelli di CO<sub>2</sub> rispetto al controllo, esposizione e recupero.

Analisi di regressione lineare fra SMR, SDA, peak MO<sub>2</sub>, alimentazione e caccia.

PCA studiata con XLSTAT 2014 per trovare le principali cause che inducono le risposte fisiologiche e le relazioni fra parametri.

Biplot dei parametri : mean  $\pm$  standard error

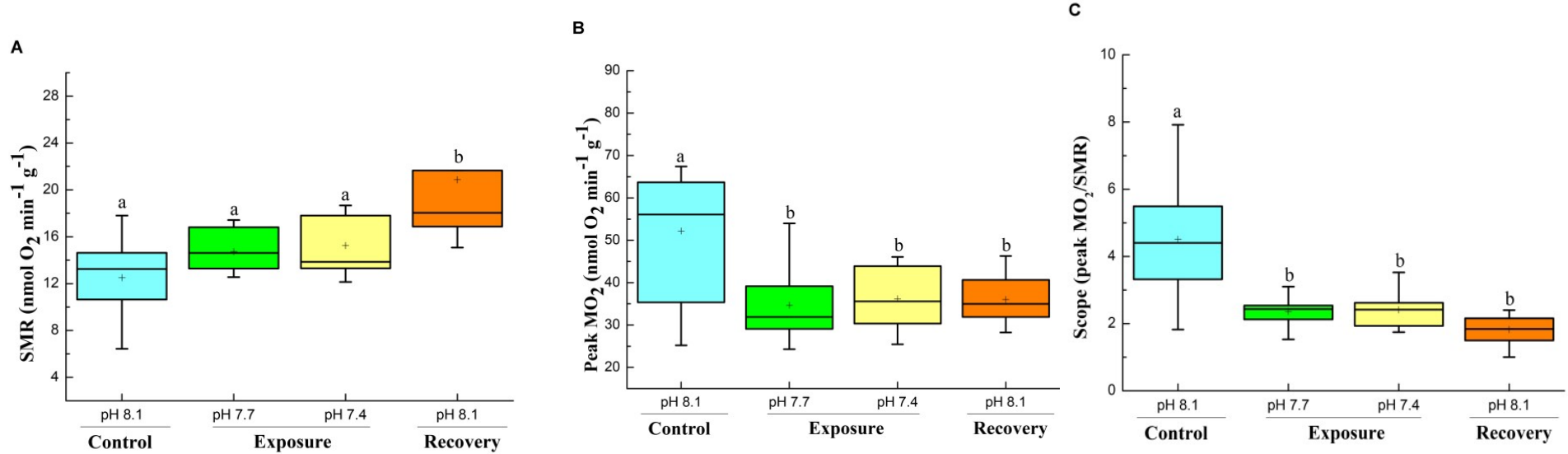
---



---

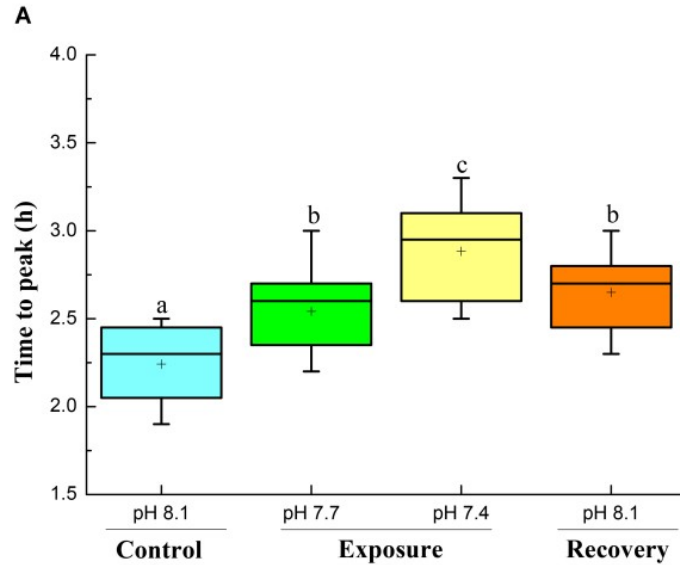
# **RISULTATI**

---

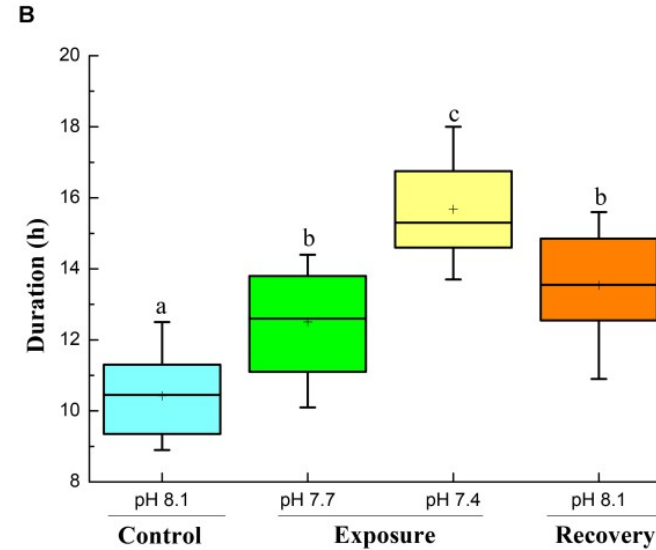


SMR aumenta significativamente quando i granchi sono esposti a basso pH e non ritorna ai valori di controllo.

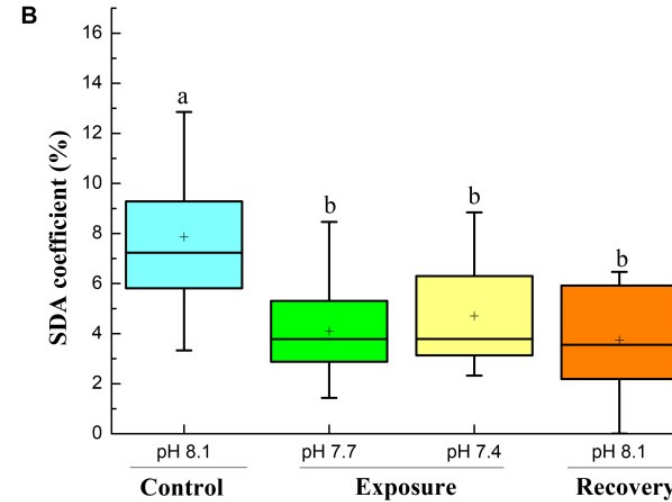
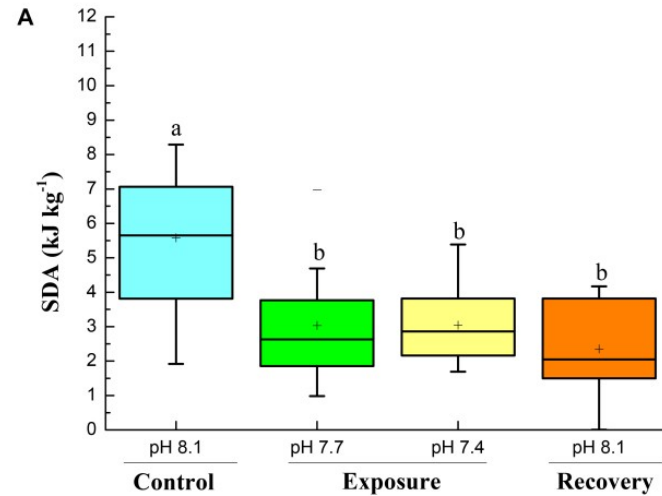
Il peak  $\text{MO}_2$  e Scope decrescono significativamente quando i granchi sono esposti a basso pH e non recuperano quando tornano al pH di recupero.



Il tempo per raggiungere il peak  $MO_2$  aumenta significativamente con l'abbassamento del pH, il max valore lo raggiunge a pH di 7.4. Dopo le settimane di recupero il tempo per il peak  $MO_2$  diminuisce ma i valori restano significativamente maggiori rispetto alle condizioni iniziali di controllo.



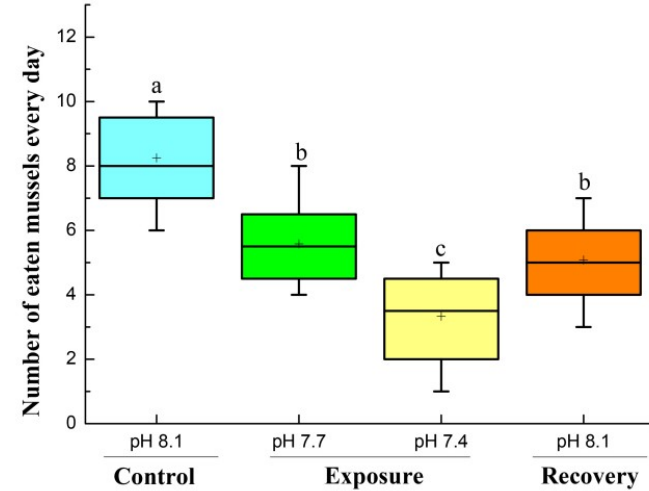
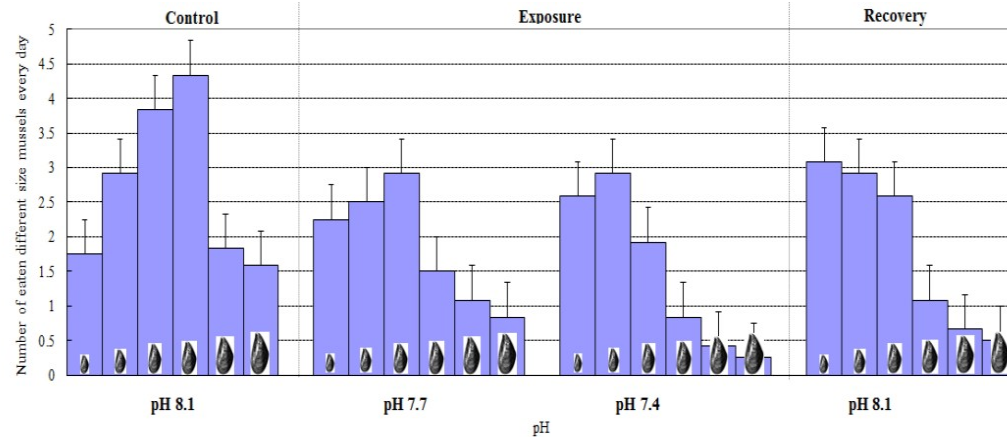
L' SDA ha una durata significativamente maggiore al diminuire del pH, con una massima durata a pH di 7.4. Nelle settimane di recupero non ritorna ai livelli iniziali.



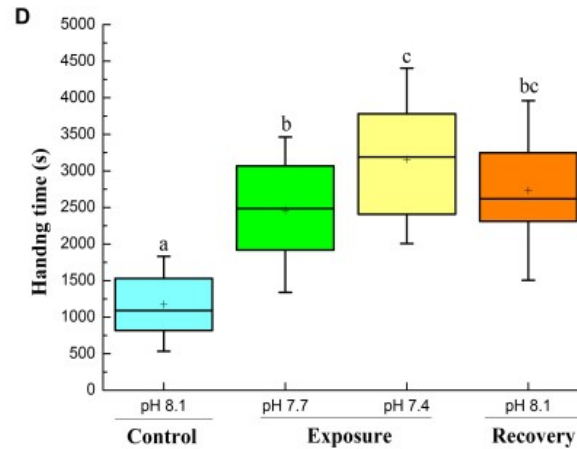
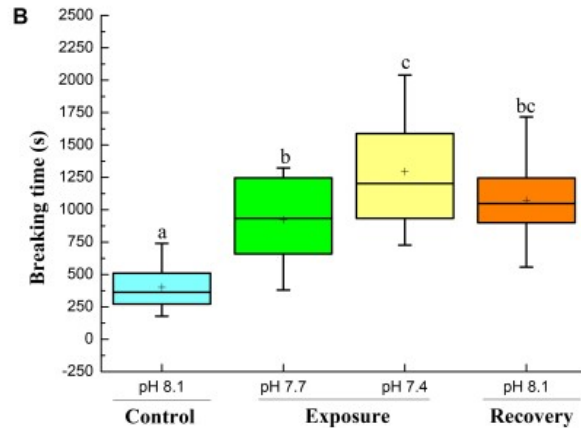
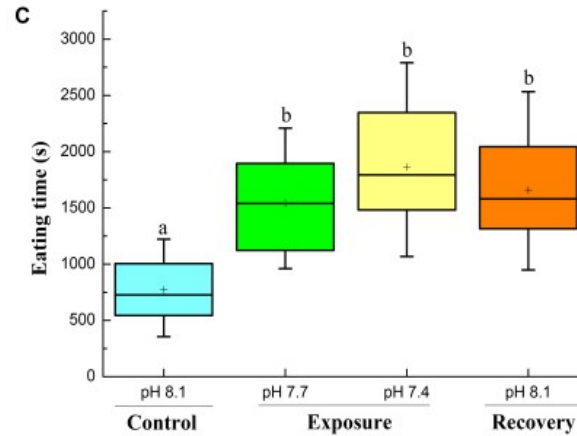
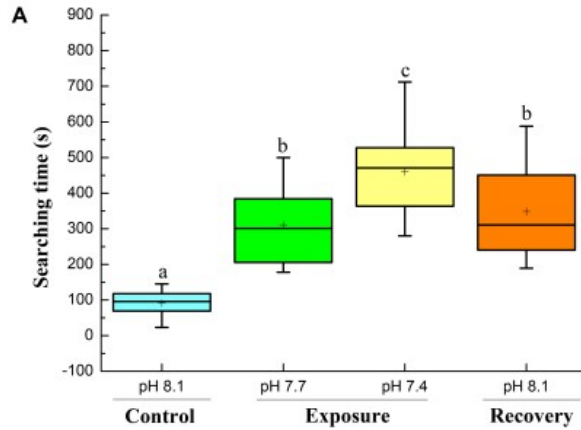
L'esposizione a un basso pH riduce significativamente la risposta di SDA e il coefficiente di SDA (proporzione dell'energia di digestione usata per il processo digestivo). Una conseguente acclimatazione a breve termine in condizioni di controllo (nel recupero) non porta i granchi a recuperare il loro stato iniziale.

Selezione della taglia della preda:

- In condizioni di controllo → taglia media (30-50 mm)
- A pH di 7.7 → piccola taglia (10-30 mm)
- A pH di 7.4 → piccola taglia (10-20 mm)
- Recupero → piccola taglia



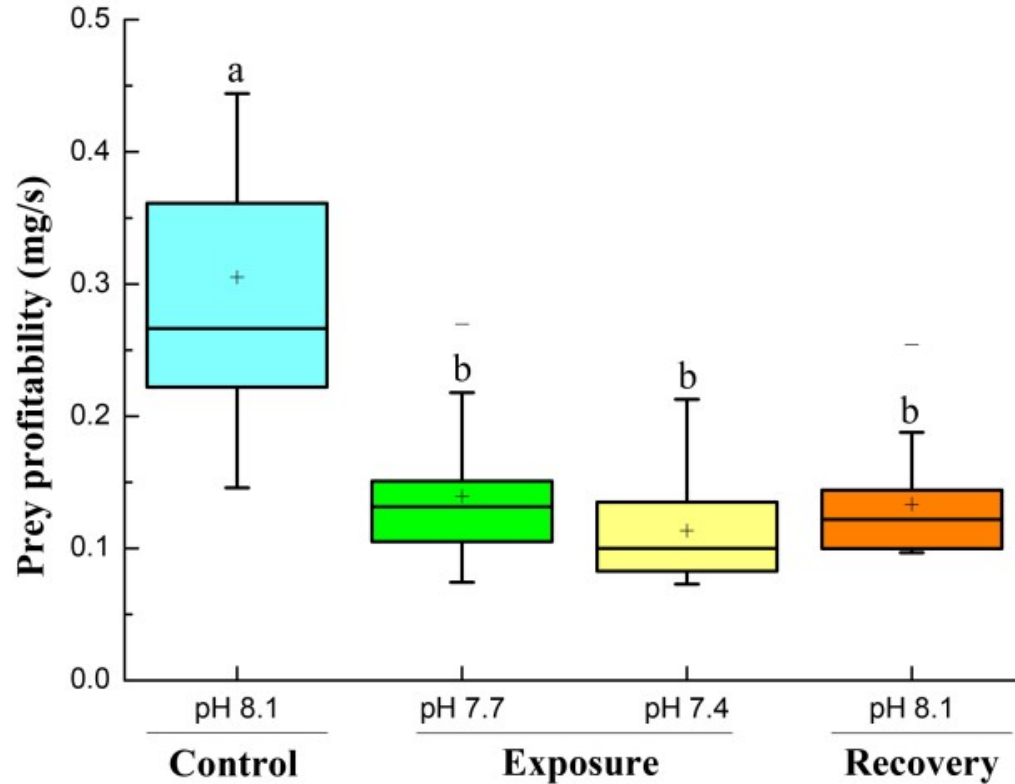
Il tasso di alimentazione diminuisce significativamente a esposizioni di pH di 7.7 con un minimo a pH di 7.4. Nelle condizioni di recupero il tasso di alimentazione aumenta ma rimane significativamente inferiore rispetto alle condizioni iniziali.



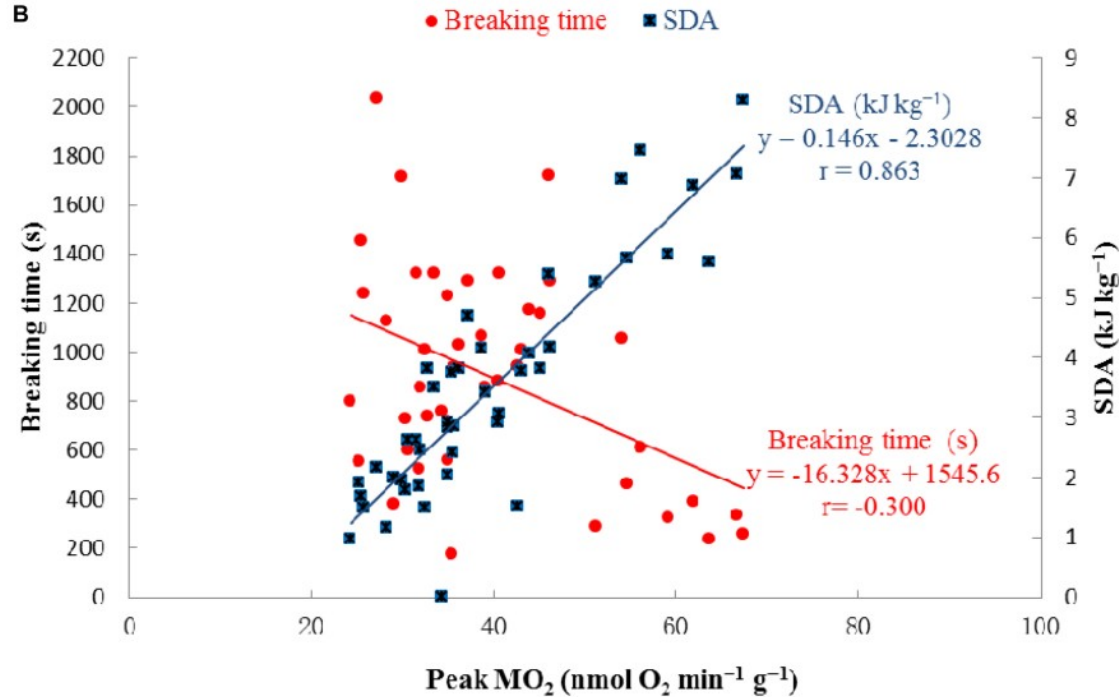
Il comportamento di caccia è stato suddiviso in 4 tempi: searching, breaking, eating e handling.

Tutti e 4 hanno lo stesso andamento durante l'esperimento: i tempi aumentano significativamente a pH di 7.7 e ulteriormente a pH di 7.4 (breaking time 3 volte).

Ritornando alle condizioni normali (recupero) i tempi diminuiscono per tutti i comportamenti, ma rimangono sempre significativamente più lunghi rispetto ai tempi iniziali nel controllo.



La redditività della preda decresce significativamente quando i granchi sono esposti a pH di 7.7 e 7.4. Ritornando alle condizioni iniziali la rendita della preda rimane significativamente minore rispetto alle condizioni iniziali.



Breaking time non è ben correlato con il peak  $\text{MO}_2$ .

Mentre la risposta SDA è ben correlata con il peak  $\text{MO}_2$  ( $r=0.863$ )



---

# **DISCUSSIONE**

---

Nello studio in condizioni di elevata  $p\text{CO}_2$  si osserva:

- Aumento del tasso metabolico, che indica:
  - un'abilità di compensare in parte l'aumento del costo energetico dell'acidosi (aumento idrogenioni).
  - impatto negativo sui granchi per minore apporto energetico disponibile per il foraggiamento, l'alimentazione e la digestione, infatti la risposta SDA è danneggiata e il tasso di alimentazione è ridotto.
- SMR è più elevato (elevata domanda energetica), che indica:
  - un aumento di  $[\text{CO}_2]$  nel sangue (ipercapnia).
- FORSE c'è uno shift energetico verso la regolazione ionica e concomitante riduzione di biosintesi di proteine.

La correlazione fra SMR e il tempo di foraggiamento/alimentazione indica che gli effetti fisiologici modificano il comportamento dei granchi.

---

L' SDA riflette l'energia impiegata nell'alimentazione, rottura meccanica di cibo, digestione intra- e extracellulare e seguente sintesi di proteine e lipidi.

Effetto dello stress su *C. pagurus* dato da un basso pH è osservato come:

- Decremento del peak  $MO_2$ , ma Aumento della durata del peak  $MO_2$ .
- Decremento di SDA, aumento durata risposta di SDA:
  - molta energia è impiegata nella regolazione acido-base.
  - mancanza di risorse da destinare alla digestione per questo riduzione del consumo di ossigeno (SDA).
- Decremento scope di SDA:
  - l'animale è vicino al limite massimo di regolazione acido-base e non è in grado di aumentare il tasso metabolico in base alla taglia della preda.
  - suggerisce un danneggiamento del meccanismo associato all'alimentazione e alla digestione.

### Nel controllo:

*C. pagurus* consuma più *M. edulis* di media taglia che di piccola o grande. La caccia ai grandi mitili richiede tempi di manipolazione più lunghi, ma la maggiore domanda energetica è compensata da una maggiore assunzione di energia → quindi consumo di prede più grandi.

### Esposizione a elevata $p\text{CO}_2$ :

Nello studio i fattori che determinano la selezione della taglia sono gli stessi per tutti i granchi, stesso grado di sazietà e numero di prede, l'unica variabile è la  $[\text{CO}_2]$ . Il granchio sceglie i molluschi più piccoli perché più facili da rompere e quindi la domanda energetica è minore. Questa preferenza forse è dovuta ad una riduzione della forza nelle chele e un aumento del tempo di manipolazione della preda, riducendo la capacità di rompere il guscio → quindi shift verso prede più piccole.

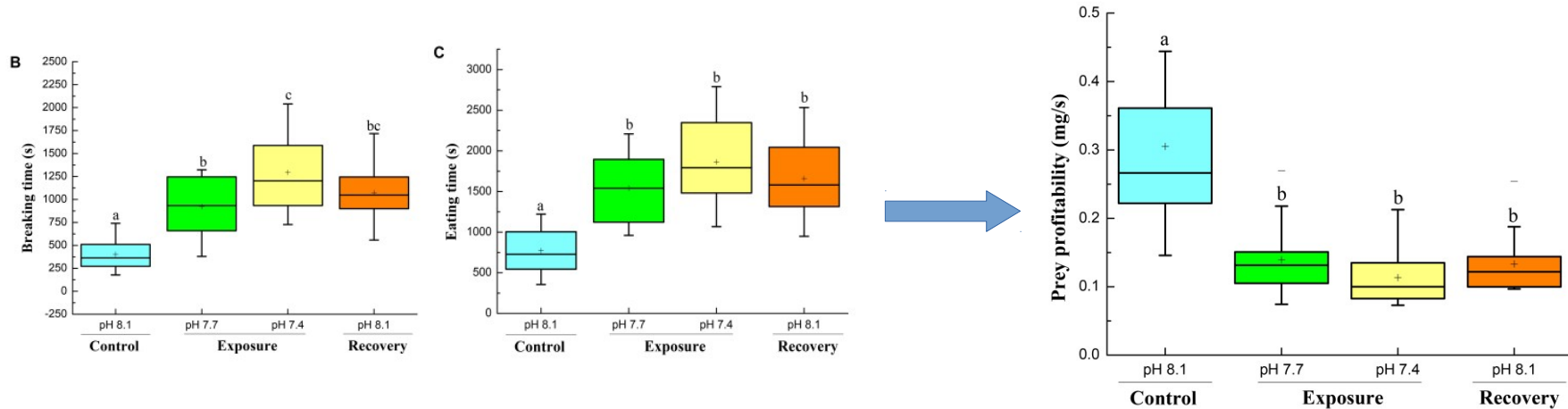
### Nel recupero:

Il granchio continua a scegliere piccoli molluschi quindi non ha recuperato. SMR estremamente elevato rispetto a tutti gli altri trattamenti. Pertanto, meno energia disponibile per l'alimentazione e la digestione (bassa portata del peak  $\text{MO}_2$  e SDA).

---

In condizioni ottimali la preferenza della preda è un compromesso fra la domanda energetica per la gestione della preda e il guadagno energetico ottenuto dalla consumazione della preda: un predatore sceglie la sua dieta per massimizzare l'ingresso di energia netta per unità di “handling time”.

Nello studio la REDDITIVITÀ media di *M. edulis* diminuiva all'aumentare della  $p\text{CO}_2$ , principalmente perché aumentava il tempo di “breaking” e “eating”.



Per elevati livelli di  $\text{pCO}_2$  si osserva per tutti i granchi, *C. pagurus*:

- I tempi di ricerca, rottura (x3), cibazione e manipolazione aumentano per tutti i granchi.
- Una riduzione del tasso di alimentazione → l'attività di foraggiamento è danneggiata/alterata per un disturbo dei sensi olfattivi.
- Cambiamenti comportamentali:
  - 1) possono avvenire per interruzione di canali di informazione:
    - la chemio-recezione rileva i segnali chimici per ottenere informazioni dell'ambiente, qualsiasi cambiamento chimico dell'acqua marina può interferire con la rilevazione e il riconoscimento di questi segnali;
  - 2) compromessa l'abilità di mantenere l'equilibrio acido-base che provoca degli effetti sul comportamento e sulle performance motorie (minore forza nelle chele).

Una riduzione di pH provoca una riduzione dell'attività motoria e forse causa danno agli organi di senso. In più è probabile che gli stress fisico-chimici incidano sulle attività energeticamente dispendiose, come alimentazione.

---

---

# CONCLUSIONI

Ai livelli testati di  $p\text{CO}_2$ , la diminuzione di pH ha degli effetti negativi sul foraggiamento e l'energia metabolica di *C. pagurus*:

- La performance di alimentazione e SDA sono fortemente ridotte all'aumentare della  $p\text{CO}_2$ ;
  - Conseguente **shift nella selezione** di prede sempre più piccole;
  - Efficienza del foraggiamento è compromessa e concomitante **aumento della domanda** energetica del granchio sotto alti livelli di  $p\text{CO}_2$  **per il mantenimento** → lascia **meno energia per la digestione**.
  - Nel “recovery time” non si osserva un recupero completo, forse è necessario un periodo più esteso per verificare un pieno recupero.
- Possibili conseguenze negative su tutte le performance come riproduzione e sopravvivenza, che influenzano la dinamica di un'intera popolazione.

Lo studio indica che *C. pagurus* nel Mare del Nord può essere negativamente impattato dagli elevati livelli di  $p\text{CO}_2$ . Potremmo aspettarci che la pressione predatoria dei granchi sui molluschi diminuisca. Siccome questo granchio è tra i predatori più importanti, controllando la distribuzione e l'abbondanza dei filtratori, ci potrebbero essere **considerevoli conseguenze all'ecosistema nel futuro**.

---