



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in

Biologia Marina

**“Microtomografia: un approccio tridimensionale per lo studio dei
macroperforatori”**

**“Microtomography: a tridimensional approach to characterize
macroborers”**

Tesi di Laurea Magistrale di Federico Andreoli

Relatore

Barbara Calcinai

Correlatore

Torcuato Pulido Mantas

Sessione Straordinaria Febbraio

Anno Accademico 2020/2021

Sommario

1. Introduzione

1.1 Caratteristiche generali della bioerosione

1.2 Effetti della bioerosione

1.3 Microperforatori

1.4 Macroperforatori endolitici

1.4.1 Poriferi

1.4.2 Molluschi

1.4.3 Policheti

1.4.4 Crostacei Cirripedi

1.5 Macroperforatori epilitici

2. Scopo della Tesi

3. Microtomografia a raggi X

3.1 Caratteristiche generali micro-CT

3.2 La sorgente a raggi x

3.3 Il sistema di rotazione dei campioni

3.4 Il rivelatore

3.5 Applicazione della micro-CT nella morfologia

4. Materiali e metodi

4.1 Caso studio 1: attività bioerosiva del polichete *Polydora ciliata*

specie complex

4.2 Caso studio 2: attività bioerosiva effettuata da Clionaidi

4.3 Caso studio 3: attività bioerosiva di crostacei Cirripedi

5. Risultati

5.1 Caso studio 1: attività bioerosiva del polichete *Polydora ciliata*

specie complex

5.2 Caso studio 2: attività bioerosiva effettuata da Clionaidi

5.3 Caso studio 3: attività bioerosiva di crostacei Cirripedi

6. Discussione

7. Bibliografia

1. Introduzione

1.1 Caratteristiche generali della bioerosione

Il termine “Bioerosione” è stato coniato da Neumann nel 1966 per definire il fenomeno attuato dagli organismi marini che comporta la distruzione del substrato, sia attraverso meccanismi biologici come lo scavo, la perforazione, l’abrasione, sia da processi chimici come la corrosione. La bioerosione si verifica in diversi ecosistemi marini, da quelli presenti nelle aree temperate (Cerrano et al., 2001a; Wisshak et al., 2005, 2011; Schönberg et al., 2014), alle regioni tropicali (Heins e Risk, 1975; Hutchings et al., 1992, 2002, 2008, 2013; Pari et al., 2002; Tribollet et al., 2002) e persino polari (Cerrano et al., 2001b). L’erosione è effettuata da una vasta gamma di organismi che possono essere distinti, in base alla loro taglia e alle dimensioni delle cavità prodotte in due gruppi:

- **Microperforatori** che comprendono alghe, funghi e batteri;
- **Macroperforatori** che comprendono molluschi, ricci, pesci, poriferi e policheti.

I macroperforatori producono cavità e tunnel di dimensioni variabili da 1 mm fino ad alcuni centimetri di diametro, mentre i microperforatori producono fori di diametro inferiore ai 100 micrometri. Inoltre gli organismi perforatori

possono essere ulteriormente distinti in base a come esercitano la loro azione demolitiva; essa infatti può essere:

- Esterna, attuata da “grazers”, cioè organismi erbivori come pesci e ricci, che pascolano sul substrato rimuovendo buona parte di esso, senza penetrare all'interno; - Interna, attuata da organismi perforatori endolitici che scavano il substrato, costruendo gallerie o cavità in cui vivono.

1.2 Effetti della Bioerosione

La bioerosione determina importanti conseguenze nell'ecosistema marino: attraverso la loro attività, gli organismi erosori, sono infatti coinvolti per esempio nella produzione di sedimenti fini e nel ciclo dei carbonati, inoltre aumentano la complessità dell'habitat offrendo riparo e rifugio a diversi taxa, e influenzano i servizi ecosistemici (Davidson et al., 2018). Le comunità di organismi perforatori mediterranei modificano e strutturano le aree costiere, come ad esempio i caratteristici assemblaggi di alghe rosse coralline che sono per lo più modellate da organismi erbivori come ricci. Diverse comunità di organismi perforano coralli mediterranei che vivono a elevate profondità e sono a crescita lenta; essi possono infestarli in misura elevata (20-75%), e causare un rischio maggiore di frammentazione rimuovendo fino al 70% dello scheletro (Corriero et al., 2004). Ciascuna delle diverse specie di organismi microperforatori, presenta specifiche caratteristiche che comportano la perforazione e l'erosione del substrato. In quelli fotosintetici (alghe e cianobatteri), l'erosione riguarda solo le porzioni superficiali raggiunte dalla luce. L'erosione attuata dai cianobatteri, avviene mediante dissoluzione biochimica (Tudhope e Risk, 1985) ad opera di sostanze acide o chelanti liberate dalle cellule apicali dei filamenti (Le Campion Alsumard, 1975; Golubic et al., 1984). Dissolvendo il carbonato di calcio, i microperforatori,

così come molti altri macroperforatori, rilasciano ioni Ca^{2+} e carbonati che vengono utilizzati dagli organismi calcificanti per la loro crescita e calcificazione. Attraverso la loro attività questi perforatori possono infliggere danni ai loro ospiti o fornire loro dei vantaggi: essi possono preparare substrati per i macroperforatori, attirando organismi invertebrati adibiti allo scavo e vertebrati erbivori in un'attività combinata di bioerosione. Una buona parte del sedimento prodotto dalla bioerosione, contribuisce alla formazione di aree sabbiose nel fondo marino; una parte del sedimento prodotto verrà utilizzata per consolidare la barriera corallina mentre il resto sarà trasportato in mare aperto (Perry, 2000). In questo modo si producono sedimenti fini che alterano la granulometria del sedimento (Kobluk e Risk, 1977; Hutchings, 1986; Bruggemann et al., 1996; Chazottes et al. 1995; Benthis et al., 2000; Perry, 2000; Fine e Loya, 2002; Tribollet et al., 2002; Tribollet e Golubic, 2005; Chacón et al. 2006; Tribollet et al., 2006). Le gallerie vuote, inoltre, prodotte dalla bioerosione, sono molto importanti perché al loro interno si insediano molti animali marini, come cnidari, crostacei, briozoi, molluschi, policheti ecc.; in questo modo gli organismi perforatori aumentano la complessità dell'habitat amplificando la biodiversità di un'area (Bagur et al., 2019).

1.3 Microperforatori

I Microperforatori comprendono cianobatteri, alghe e funghi (Bornet e Flahault, 1889; Lukas, 1974; Le Campion-Alsumard, 1979). Molti di essi sono importanti produttori primari, e sono fonte di cibo per numerosi organismi invertebrati ed erbivori. I microperforatori si spingono in profondità, attraverso le microcavità e la discontinuità presenti nel materiale.

In funzione di questo possono essere suddivisi in:

- **casmoendolitici** che possono colonizzare crepe, fessure o pori presenti sulla superficie;
- **criptoendolitici** che colonizzano pori o fessure all'interno del substrato formando in profondità strati paralleli alla superficie;
- **euendolitici** che penetrano attivamente all'interno del substrato formando nuove cavità e modificando l'assetto strutturale del materiale (Golubic, 1981).

Gli organismi euendolitici sono ubiquitari: possono vivere sia nelle acque dolci (Schneider et al., 1983; Anagnostidis e Pantazidou, 1988) che in quelle marine, sia in ambienti tropicali che in acque fredde (Le Campion-Alsumard, 1979; Alsumard et al., 1995a; Radtke et al., 1997a; Perry, 1998; Ghirardelli, 2002; Wisshak et al., 2005; Los Rios et al., 2005; Tribollet, 2008); possono colonizzare substrati calcarei sia vivi che morti sebbene la colonizzazione sia

più intensa su quelli morti (Le Campion-Alsumard et al., 1995b; Radtke et al., 1997b; Perry, 1998; Tribollet e Payri, 2001; Tribollet, 2008). In generale, la colonizzazione di questi organismi è una strategia che permette loro la sopravvivenza, soprattutto quando la superficie è soggetta a variazioni ambientali sfavorevoli. Questo tipo di microhabitat offre protezione dalle intense radiazioni solari e dall'essiccamento, garantendo allo stesso tempo nutrienti minerali e una superficie idonea per la crescita.

1.4 Macroperforatori endolitici

Tra i macroperforatori che scavano gallerie di dimensioni maggiori, troviamo invece le spugne, molluschi, policheti e balani. Ciascuno presenta tipiche modalità e proprietà nell'erosione del substrato.

1.4.1 Poriferi

Le spugne sono organismi appartenenti al phylum dei Poriferi; alcune specie presentano la capacità di erodere i substrati carbonatici e minerali presenti nell'ambiente marino. Le spugne perforatrici appartengono principalmente all'ordine Clionaida (Morrow e Cárdenas, 2015) e all'ordine Haplosclerida (Morrow e Cárdenas, 2015; Soest e Hooper, 2002) della classe delle Demospongiae. L'azione delle spugne perforanti, inizia quando la larva si insedia sul substrato e grazie alla emissione di secrezioni acide e/o di enzimi come anidrasi carbonica e fosfatasi acida inizia l'attività di perforazione; questa fase di tipo chimico è affiancata da un'azione di tipo meccanico attraverso filopodi prodotti da specifiche cellule amebocitiche derivate dagli archeociti; le estremità di queste cellule specializzate si appiattiscono sul substrato calcareo ed estendono questi prolungamenti (Pomponi, 1977). Questa azione combinata produce la liberazione di carbonato di calcio disciolto e di materiale particellato sotto forma di frammenti microscopici, lenticolari, detti pits (Fig. 1).

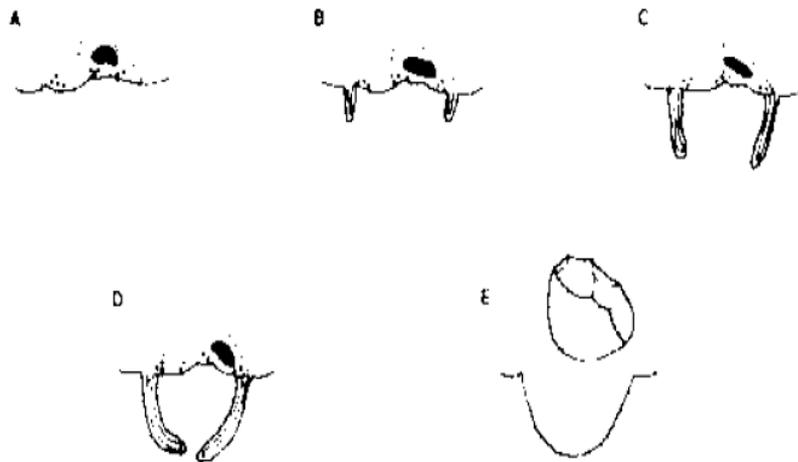


Fig. 1. Schema del processo di perforazione da parte delle spugne. (A) cellule adibite alla perforazione prendono contatto con il substrato (B) Penetrazione iniziale da parte delle cellule mediante perforazione chimica sul substrato (C, D) continua il processo di dissoluzione del substrato (E) frammento rimosso dal substrato (Pomponi, 1980).

Le spugne perforanti, tuttavia, non sempre trascorrono tutta la loro vita all'interno del substrato, perché il loro ciclo vitale può articolarsi in tre fasi principali:

- forma alfa (Fig. 2a): è la fase in cui la spugna vive completamente all'interno del substrato, da cui emergono solo papille inalanti ed esalanti, che provvedono ai necessari scambi con l'ambiente e all'eliminazione dei residui calcarei disgregati dall'azione del porifero; a seconda delle specie e delle situazioni, questa fase può durare sino alla morte dello animale oppure essere solo giovanile e temporanea.

- forma beta (Fig. 2b): se la spugna non riesce più a trovare lo spazio per aprire nuove gallerie all'interno del substrato, essa prosegue la sua crescita all'esterno, sviluppandosi in forma incrostante.
- forma gamma (Fig. 2c): infine, se il porifero continua a crescere, può arrivare a disgregare completamente il substrato, per cui rimane completamente esposto all'ambiente e si sviluppa in forma libera e massiva (perlopiù a cuscinetto).

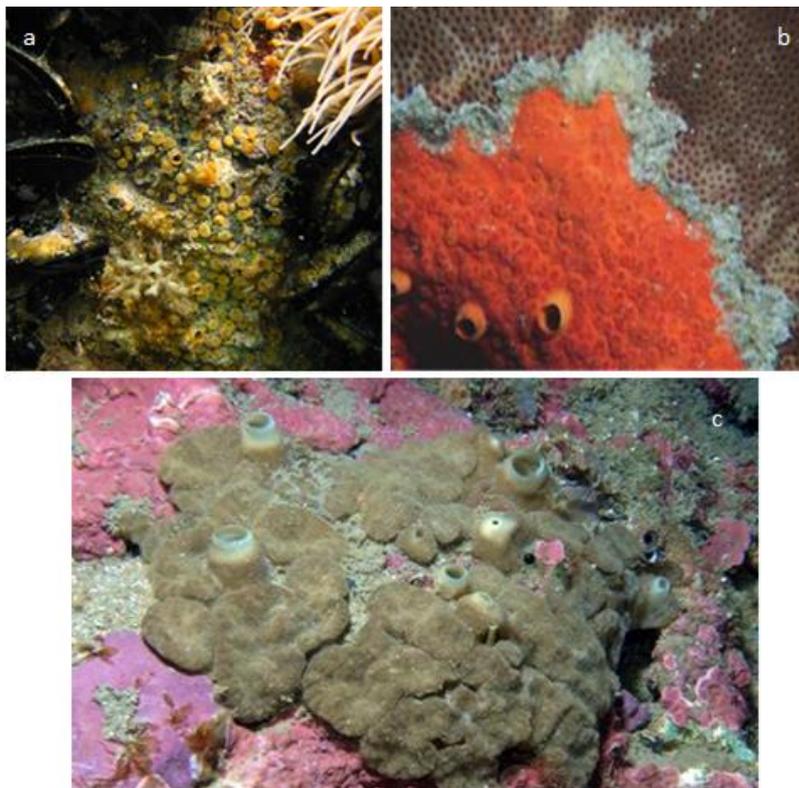


Fig. 2. Forme di crescita in spugne perforanti. a. *Cliona adriatica*, b. *Cliona lampa* forma beta, c. *Cliona viridis* forma gamma; (Fig. b, c Giuseppe Mazza, 2013).

La loro struttura corporea comprende un sistema di canali e camere attraverso i quali scorre l'acqua. Le camere interne sono costituite da cellule flagellate (coanociti) che provvedono a creare correnti d'acqua all'interno del corpo e a filtrare le particelle alimentari. Lo scheletro delle spugne perforanti è formato da elementi inorganici, le spicole. Le spicole silicee con dimensioni e forme che variano a seconda delle specie; sono quindi fondamentali per il riconoscimento in ambito della sistematica.

La famiglia più importante coinvolta nella perforazione è quella dei Clionaidi, molto diffusa è infatti l'escavazione di carbonato di calcio da parte di queste spugne nel Mediterraneo. L'erosione determina la produzione di grandi quantità di sedimento carbonatico che andrà a costituire le spiagge coralline carbonatiche (Schönberg et al., 2017); i dati pubblicati sulla bioerosione totale stimata delle spugne, mostrano un'enorme variazione con tassi che vanno da $0.3 \text{ kg m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ a $29.5 \text{ kg m}^{-2} \text{ y}^{-1}$. L'erosione determina inoltre la produzione di grandi quantità di ioni carbonato; alcuni esperimenti hanno dimostrato che per ogni quantità di chips che *Pione* cfr. *vastifica* produce durante la sua attività di bioerosione, essa dissolve chimicamente fino a tre volte tanto il substrato (Zundelovich et al., 2007). In contrapposizione a questi studi, secondo altri autori (Didier M. de Bakker et al., 2018) le spugne perforano tramite bioerosione meccanica fino al 98% del totale eroso.

1.4.2 Molluschi

I Molluschi sono organismi invertebrati caratterizzati da corpo molle non segmentato e spesso da una conchiglia di natura calcarea con funzioni protettive; essi hanno avuto un grande successo evolutivo, abitano infatti mari e oceani, fiumi e laghi e anche la terra ferma. Alcuni sono endolitici e vivono all'interno di gallerie da essi create e sono presenti in particolar modo nei substrati duri (naturali ed artificiali). Questa capacità di perforazione del substrato può essere di natura meccanica o chimica. Tra i molluschi Bivalvi, i più comuni sono *Lithophaga lithophaga* (Linnaeus, 1758), la cui azione perforante è il risultato soprattutto di una combinazione di emissioni ghiandolari di specifici acidi e movimenti meccanici della conchiglia; *Roccellaria dubia* (Pennant, 1777), in grado di secernere sottili strati di aragonite che proteggono l'uscita dei sifoni dal substrato; *Pholas dactylus* Linnaeus, 1758 in grado di perforare sedimenti argillosi compatti, mediante le valve con un movimento di rotazione. Altri molluschi, come le patelle e i chitoni sono invece perforatori epilitici.

1.4.3 Policheti

I Policheti sono organismi animali appartenenti al phylum degli Anellidi che possiamo trovare in diversi ambienti, dai fanghi, ai fondi duri. Questi organismi possono erodere il substrato secernendo delle sostanze acide e utilizzando anche strutture resistenti come chete o spine. I policheti sono considerati tra i primi organismi che erodono nuovi substrati sommersi e sono considerati tra i principali bioerosori assieme a spugne e molluschi (Hutchings, 1992; 2011). Tuttavia, gli studi sui tassi di bioerosione dei policheti non sono numerosi e riguardano principalmente studi effettuati in ambiente tropicale (coral reefs). Diverse famiglie di policheti sono coinvolte nei processi di bioerosione, come Eunicidae, Cirratulidae, Sabellidae e Spionidae. I Sabellidi, ad esempio, hanno sviluppato aree ghiandolari lungo la parte ventrale del corpo; penetrano in profondità nel substrato, mantenendo un'apertura che gli consente di espandere la corona branchiale, importante per la filtrazione e respirazione. I Sabellidi inoltre non presentano strutture rigide che gli consentono di erodere il substrato e, si suppone, che il processo di erosione avvenga tramite la secrezione di sostanze acide; presentano infatti ghiandole ben sviluppate alla base della corona branchiale, ma la natura di queste sostanze secrete non è stata ancora identificata. In alcune specie di *Polydora* (Spionidae) è stato osservato come la perforazione sia assistita dalla

modificazione delle setole, in prossimità del quinto segmento, ma anche dall'epitelio ventrale e dalle ghiandole mucipare segmentali che producono acidi mucopolisaccaridi. *Polydora* in particolare è uno dei taxa di organismi perforatori più studiati e ciò è dovuto principalmente ai gravi danni che questi policheti determinano su ostriche e conchiglie negli impianti di acquacoltura (Sato-Okoshi et al., 2008; Walker, 2011). Questi policheti sono facilmente riconoscibili sul substrato per le loro tipiche tracce a forma di 8, dovute alle due aperture che essi producono, divise da un sottile strato mucoso. Ogni traccia a forma di 8 corrisponde a un singolo individuo erosore. Altro gruppo di Policheti perforatori sono gli Eunicidi con diverse specie coinvolte. Presentano delle mascelle complesse e ben sviluppate che gli permettono di erodere.

1.4.4 Crostacei Cirripedi

I Cirripedi comprendono una grande diversità di crostacei sessili; secondo Martin e Davis (2001), i Cirripedi costituiscono un sottogruppo assieme ai Facetoteca e Ascothoracica all'interno dei Thecostraca. I gruppi di cirripedi che contengono specie perforanti sono: Thoracica (Darwin, 1854) e gli Acrothoracica (Gruvel, 1905), mentre i Rhizocephala (Müller, 1862) sono parassiti. Le specie perforanti in genere producono piccole cavità cilindriche generalmente all'interno di coralli o alghe. I Thoracica sono un gruppo specializzato di sospensivori che include anche, i comuni balani o “denti di cane”. Il loro scheletro esterno è formato da un sistema di piastre mineralizzate; queste placche sono parti mineralizzate della cuticola e aumentano gradualmente sia in spessore che di area (Anderson, 1994; Blomsterberg et al., 2004). I Thoracica comprendono cirripedi pedunculati, il cui corpo è costituito da un peduncolo flessibile e da un capitulum, formate da piastre mineralizzate (Anderson, 1994) e i cirripedi sessili (senza peduncolo). A differenza degli Acrothoracica, il palpo mandibolare è separato dalla mandibola stessa. Le specie perforanti del genere *Lithotrya* (Sowerby, 1822) appartenente ai Thoracica, formano delle cavità ovali lunghe 2-10 cm. Le cavità si formano attraverso abrasione meccanica e anche dissoluzione chimica; l'animale, infatti, perfora per mezzo di scaglie calcaree e chitinose

situate in prossimità del peduncolo che si rinnovano ad ogni muta. Durante la perforazione, una serie di piastre calcaree discoidali sovrapposte vengono posizionate su una parete laterale del foro creato per il fissaggio. Gli Acrothoracica sono cirripedi perforanti ogni tipologia di substrato calcareo (rocce, conchiglie, coralli, briozoi e alghe coralline); alcune specie sono in grado di perforare i tessuti viventi di coralli del genere *Leptastrea* e *Psammocora*. Nella maggior parte dei casi producono cavità sacciformi con un'apertura che si restringe verso l'esterno. All'estremità anteriore in alcune forme si verifica un'estensione a forma di fessura che dà all'apertura la forma di una virgola. Tuttavia, aperture simili ad una virgola si trovano anche in alcuni fori prodotti da Briozoi (Hancock, 1849). Normalmente le specie perforanti di questo gruppo sono prive di placche calcaree, ad eccezione di una singola piastra basale di attacco trovata in alcune specie di Lithoglyptida (Newman, 1971; 1974; Grygier e Newman, 1985; Kolbasov, 2009). Gli Acrothoracici possiedono un paio di cirri nella bocca e dei cirri terminali separati; l'apparato di perforazione è costituito da squame ctenoidi con papille e spine. Sono dioici. Con femmine grandi e maschi piccoli attaccati alla superficie del mantello delle femmine (Darwin, 1854; Kolbasov, 2009).

1.5 Macroperforatori epilitici

Questo gruppo di organismi erosori comprende molte specie di Echinodermi Echinoidei, Pesci Scaridi, Acanturidi e Tetradontidi e molluschi Gasteropodi come Patelle e Poliplacofori come Chitoni. I ricci di mare sono tipici brucatori che utilizzano la così detta Lanterna di Aristotele per nutrirsi; durante il pascolo il film algale che riveste il substrato è rimosso dai denti della Lanterna insieme a microscopici frammenti del substrato, spesso costituito da alghe coralline. In Mediterraneo, il riccio *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) forma anche piccole cavità che utilizza come “home sites”. Una delle famiglie più importanti è quella degli Echinometridae, dei perforatori attivi specialmente nelle barriere coralline e nei substrati rocciosi. Le specie di pesci maggiormente coinvolte appartengono alla famiglia degli Scaridi, detti anche Pesci Pappagallo. La loro caratteristica, alla quale devono il nome, è la peculiare dentizione. In questi animali, infatti, i denti sono fusi insieme a formare un robusto becco che ricorda quello di un pappagallo e che è di fondamentale importanza per l'alimentazione. Essi sono erbivori e prediligono le alghe che crescono sulla superficie di rocce e coralli. Grazie al loro becco, riescono a raschiare efficientemente le alghe dalla superficie del reef, asportando anche il substrato sottostante. Spesso il morso non si limita solo alla superficie, bensì interessa anche più profondamente lo scheletro del

corallo, lasciando evidenti cicatrici. Molluschi Gasteropodi come le Patelle o Poliplacofori come i Chitoni, producono delle incisioni sul substrato durante la loro attività di pascolo e perforazioni più ampie dette “home sites” dove si rifugiano e ritornano dopo l’attività di alimentazione; questo processo erosivo è attuato attraverso la radula.

2. Scopo della tesi

Il lavoro di tesi che ho svolto presso il Laboratorio di Zoologia dell'Università Politecnica delle Marche, ha avuto come obiettivo quello di approfondire il fenomeno della bioerosione attraverso la microtomografia computerizzata a raggi X (micro-CT). La maggior parte dei metodi utilizzati per la quantificazione della bioerosione sono distruttivi e di solito consentono solo una analisi bidimensionale. Recentemente, accanto ai metodi tradizionali, è diventata sempre più utilizzata la microtomografia. Questa tecnica non distruttiva, ad alta risoluzione, permette di analizzare le cavità prodotte dai bioerosori senza dover distruggere o sezionare il campione. Essa fornisce numerose informazioni sulla morfologia delle cavità erose e permette di valutarne l'estensione e il volume rimosso. Sulla base delle ricostruzioni 3D delle cavità prodotte dai diversi organismi marini erosori, è possibile non solo visualizzarne lo sviluppo, ma anche caratterizzare le diverse specie di perforatori sulla base della morfologia dei diversi canali e gallerie da essi prodotti, studiare e confrontare tra le diverse specie la percentuale di substrato eroso, e misurare specifici parametri inerenti alla modalità di scavo degli organismi bioerosori. Nel presente studio le sezioni trasversali, ottenute dalla scansione, sono state elaborate con un software che produce immagini e animazioni tridimensionali e, inoltre, la ricostruzione tridimensionale può

essere digitalmente sezionata per rivelare le strutture interne e permettere di effettuare diverse misurazioni. Lo scopo di questa tesi è pertanto presentare un nuovo approccio che permetta di visualizzare e quantificare la bioerosione utilizzando procedure basate su algoritmi; in questo modo è possibile fornire informazioni sulle differenti tracce di macroerosione che creano i diversi organismi perforatori, valutando i tassi di bioerosione e lo sviluppo delle perforazioni prodotte dalle diverse specie.

3. Microtomografia a raggi X

3.1 Caratteristiche generali micro-CT

Il primo tomografo fu costruito dall'ingegnere Premio Nobel inglese G. Hounsfield tra il 1967 e il 1971, presso i laboratori di ricerca della Thorn EMI. Nei primi anni '80, invece, venne messo a punto il primo sistema microtomografico a raggi X da Elliott e Dover (1982) e ha alla base gli stessi principi fisici della tradizionale Tomografia Assiale Computerizzata. Il sistema è costituito da un tubo a raggi X, un porta-campione su cui viene posizionato l'oggetto e un sistema di rivelazione per l'acquisizione dell'immagine. La Cone Beam Computed Tomography (CBCT) è una tecnica di tomografia in cui viene impiegata una sorgente a raggi-X che compie un unico giro completo di 360° gradi (o di 180° in talune apparecchiature) intorno all'oggetto da esaminare, emettendo un fascio di forma conica o piramidale (da qui il nome "cone beam"). A differenza della CT medica, nella micro-CT, il sistema sorgente-rivelatore è fisso, mentre le immagini sono acquisite con il campione posto su un piatto rotante. La risoluzione spaziale risulta strettamente legata alle dimensioni dell'oggetto in esame; attualmente sono disponibili sistemi con risoluzione spaziale dell'ordine di pochi μm e anche nm. La microtomografia a raggi X crea sezioni trasversali di un oggetto per poi ricreare un modello virtuale (modello 3D) senza

distruggere l'oggetto originale. Il prefisso micro- (simbolo μ) viene utilizzato per indicare che le dimensioni dei pixel delle sezioni trasversali sono nel range del micrometro.

Gli elementi principali che compongono un sistema microtomografico (Fig. 3) sono:

- La sorgente di raggi X;
- Il sistema di rotazione dei campioni;
- Il rivelatore;

3.2 La sorgente a raggi X

Le modalità di produzione di raggi X sono molteplici e si caratterizzano in base alle energie di lavoro:

- Tubi a raggi X
- Luce di sincrotrone

I moderni sincrotroni rappresentano la miglior sorgente di raggi X, in quanto forniscono fasci monocromatici e flussi elevati, consentono di ottenere immagini a elevata risoluzione e un rapporto segnale-rumore alto. In alternativa ai sincrotroni, che ricordiamo presentano lo svantaggio di essere molto costosi e non facilmente accessibili, sono utilizzati tubi a raggi X.

3.3 Il sistema di rotazione dei campioni

Nei sistemi sperimentali e in campo industriale, il campione ruota mentre la sorgente e il rivelatore non compiono alcun movimento. Un sistema di movimentazione è composto da una base rotativa su cui verrà poggiato il campione ed eventualmente può essere presente un secondo asse meccanico di traslazione, che consente movimenti verticali. L'asse rotativo è indispensabile per poter acquisire il set di radiografie per la ricostruzione tomografica, mentre la traslazione non sempre è necessaria, ma può rivelarsi utile per posizionare con precisione l'oggetto davanti al rivelatore.

3.4 Il rivelatore

La funzione di un rivelatore è quella di misurare l'intensità dei raggi X trasmessi dopo che questi hanno interagito col campione in esame. Attualmente esiste una vasta gamma di sistemi con proprietà anche molto differenti fra loro; la prima distinzione si ha sul metodo di rivelazione che può essere diretta o indiretta. Nel caso di rivelazione diretta, la radiazione X crea direttamente in un opportuno materiale un segnale elettrico proporzionale all'intensità del fascio incidente.

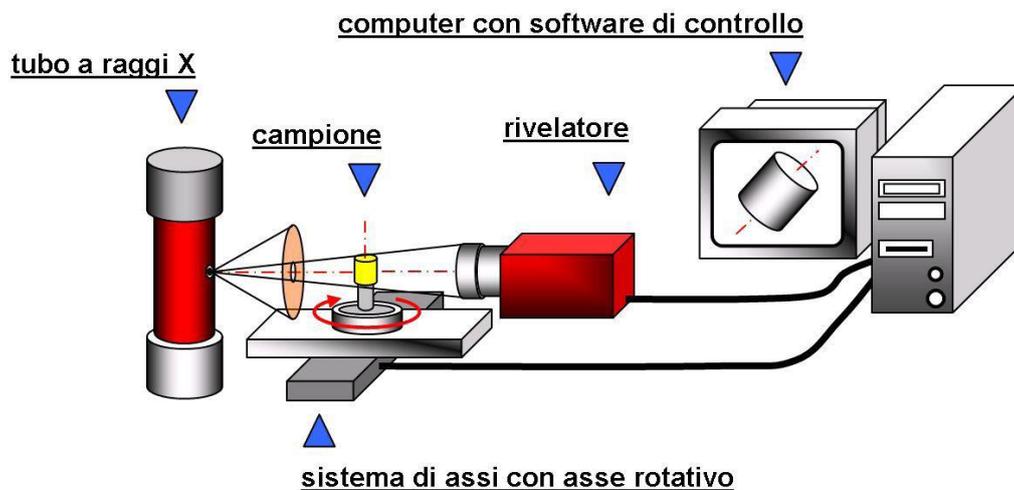


Fig. 3. Schema generale di un sistema tomografico (La Tomografia Computerizzata tridimensionale con raggi X: un nuovo strumento diagnostico per il patrimonio artistico e culturale, Maria Pia Morigi, Franco Casale et al., 2010).

3.5 Applicazione della micro-CT nella morfologia

La microtomografia computerizzata è stata applicata per studiare le caratteristiche anatomiche interne ed esterne di diversi taxa come, ad esempio, i coralli (Morales Pinzón et al., 2014); (Enochs et al., 2016), spugne (Heim e Nickel, 2010) o policheti (Faulwetter et al., 2013).

Nel caso dei coralli, l'obiettivo era comprendere l'organizzazione interna dei canali degli ottocoralli, valutare il tasso di crescita delle colonie e infine valutare come i cambiamenti climatici e i vari fattori ambientali come l'acidificazione degli oceani potessero influenzare questa specie, basandosi sull'acquisizione e l'elaborazione di immagini tridimensionali ad alta risoluzione. Gli studi sui poriferi perforatori si sono principalmente basati su

metodi distruttivi, in modo da poter valutare la biomassa endolitica e quindi la quantità di substrato eroso (Schönberg e Shields, 2008); negli ultimi anni invece la microtomografia computerizzata (micro-CT) ha iniziato ad essere utilizzata per analizzare, descrivere e quantificare l'erosione delle spugne evitando la distruzione del campione (Beuck et al., 2007; Färber et al., 2007; Schönberg e Shields, 2008; Färber et al. al., 2016). Le camere prodotte dalla spugna sono ben visualizzate attraverso questa tecnica, ma a seconda del potere di risoluzione dello scanner CT, i piccoli dettagli come i filamenti pionieri prodotti dalla spugna per avanzare nel substrato, o i pits non sono ben visibili (Schönberg e Shields, 2008). Altri studi hanno applicato la micro-CT, per analizzare e confrontare la morfologia dello scheletro in diverse specie di spugne (*Tethya leysae*, del Pacifico nordorientale canadese, con *T. californiana*, *T. actinia* e *T. minuta*) e ricostruirlo virtualmente in 3D, consentendone la visualizzazione delle spicole (Heim e Nickel, 2010). Anche le tracce di erosione prodotte da micro e macroperforatori sono state studiate utilizzando questa tecnica ma non ancora su vasta scala (Crook et al., 2013; DeCarlo et al., 2015; Silbiger et al., 2014, 2016). Färber et al., 2016 hanno condotto una serie di esperimenti di lunga durata lungo la costa dell'isola di Rodi, in Grecia, al fine di monitorare il ritmo con cui la bioerosione si manifesta sul substrato e la sequenza di colonizzazione da parte degli

organismi perforatori. La macrobioerosione interna è stata osservata e quantificata attraverso la microtomografia a raggi X; grazie ad essa è stato possibile rilevare le tracce create dall'attività di bioerosione e risalire a una dominanza di spugne perforatrici. Esse, infatti, producono differenti tipi di tracce fossili sul substrato che prendono il nome di *Entobia*. Queste sono state ricondotte poi a cinque diverse specie di spugne clionaidi grazie all'identificazione delle spicole. Per quanto riguarda gli anellidi, la micro-CT è stata implementata per visualizzare, da una prospettiva tridimensionale, la bioturbazione nei policheti (Pennafirme et al., 2019) e il pattern di perforazione prodotto dal verme Siboglinide *Osedax* (Higgs et al., 2011).

4. Materiali e metodi

Tutti i campioni nei tre differenti casi di studio sono stati sottoposti a scansione micro-CT presso il Centro di Ricerca e Servizio di Microscopia delle Nanostrutture (CISMiN) dell'Università Politecnica delle Marche, utilizzando uno Skyscan 1174 (Fig. 4). Il campione è stato ruotato con un incremento angolare di $0,20^\circ$ fino a raggiungere una rotazione totale di 180° ; l'acquisizione di una radiografia a raggi X è stata registrata digitalmente ad ogni fase di rotazione. La sorgente a raggi X è stata impostata a 50 kV e 800 μ A. Un filtro di Alluminio è stato posizionato tra il campione e la telecamera per massimizzare la trasmissione di energia attraverso il campione. Le scansioni sono state eseguite con una dimensione massima dei pixel di 25,25 μ m. L'elaborazione iniziale delle immagini di proiezione è stata eseguita con il software di ricostruzione a fascio conico (Nrecon v.1.7.3.1., Skyscan), ottenendo una serie di sezioni trasversali assiali. La post-elaborazione delle sezioni trasversali è stata condotta utilizzando il software Amira del Zuse Institute Berlin, ZIBAmira 5 version 2019.1 (Stalling et al., 2005). In primo luogo, è stato applicato il Gaussian smoothing filter e il Median filter che utilizzano un kernel $3 \times 3 \times 3$ voxel per ridurre il rumore dell'immagine, in modo da avere immagini più nitide e più chiare durante l'analisi del campione. Le cavità derivanti dalla bioerosione, sono stati differenziate

mediante il seguente modulo di lavoro (Fig. 5): i) le sezioni trasversali sono state binarizzate attraverso il modulo “interactive thresholding” in modo da stimare visivamente l'intervallo di valori che rappresentano il substrato solido nelle immagini in sezione trasversale; ii) in seguito, è stato applicato il modulo “ambient occlusion” alle sezioni trasversali binarizzate per permettere la visualizzazione interna del campione, osservando canali e gallerie derivanti dall'erosione, e ottenere una sorta di ‘casts’ digitali; iii) infine il modulo “interactive thresholding” è stato applicato nuovamente, in modo da permettere il calcolo dei volumi dei canali erosi. Le misure morfometriche (diametro camere e papille, lunghezza canali) sono state ottenute grazie all'ausilio delle sezioni assiali con il modulo “Ortho slice” che permette di ottenere sezioni interne del campione (slices) e del modulo “Measurement”. Una volta individuate le singole cavità, sulle ricostruzioni 3D sono stati calcolati i volumi del campione al fine di stimare lo scheletro totale del corallo e quello eroso dalle diverse specie di spugne attraverso il modulo “Global analysis” selezionando una volta il volume esterno e una volta il volume interno del campione ricostruito in 3D. Gli stessi procedimenti per la misurazione dei canali o camere, sono stati utilizzati anche per valutare la bioerosione da parte delle altre due specie in esame, vale a dire *Polydora ciliata* specie complex e i crostacei cirripedi. Anche quando una singola

specie è presente nel campione l'attività erosiva veniva attribuita a tale specie; quando non è stato possibile individuare le tracce di erosione, la misura è stata espressa come volume di campione eroso.

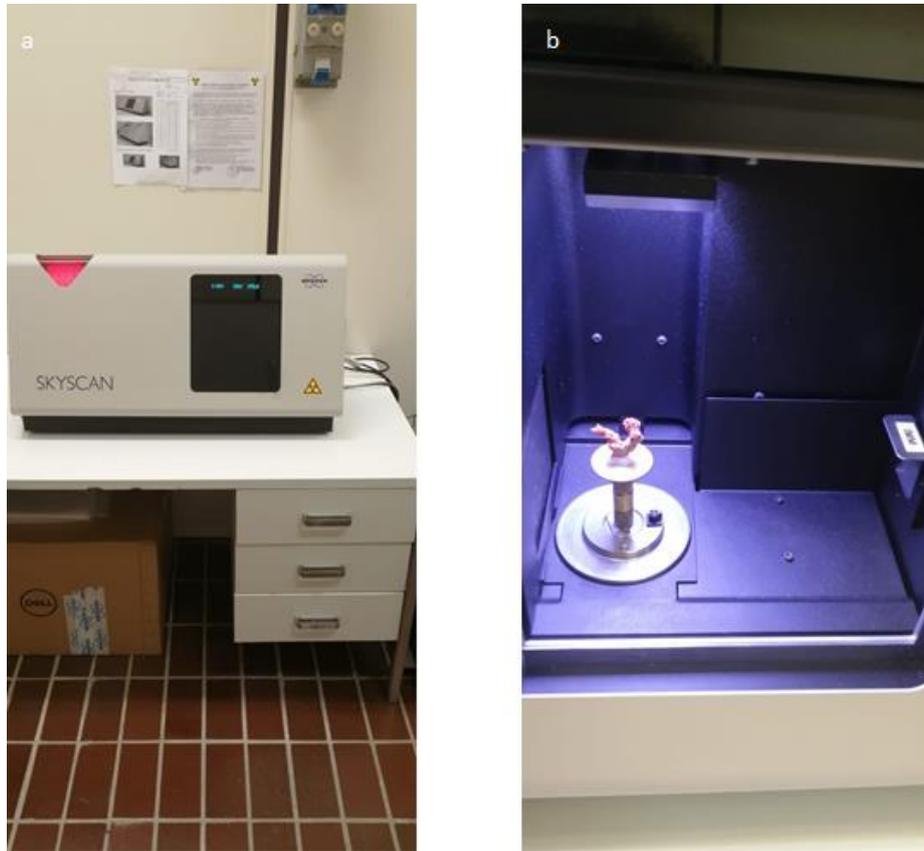


Fig. 4. a. micro-CT presso il Centro di Ricerca e Servizio di Microscopia delle Nanostrutture (CISMiN) dell'Università Politecnica delle Marche, Skyscan 1174, b. Campione di corallo sul sistema di rotazione, all'interno dello Skyscan 1174.

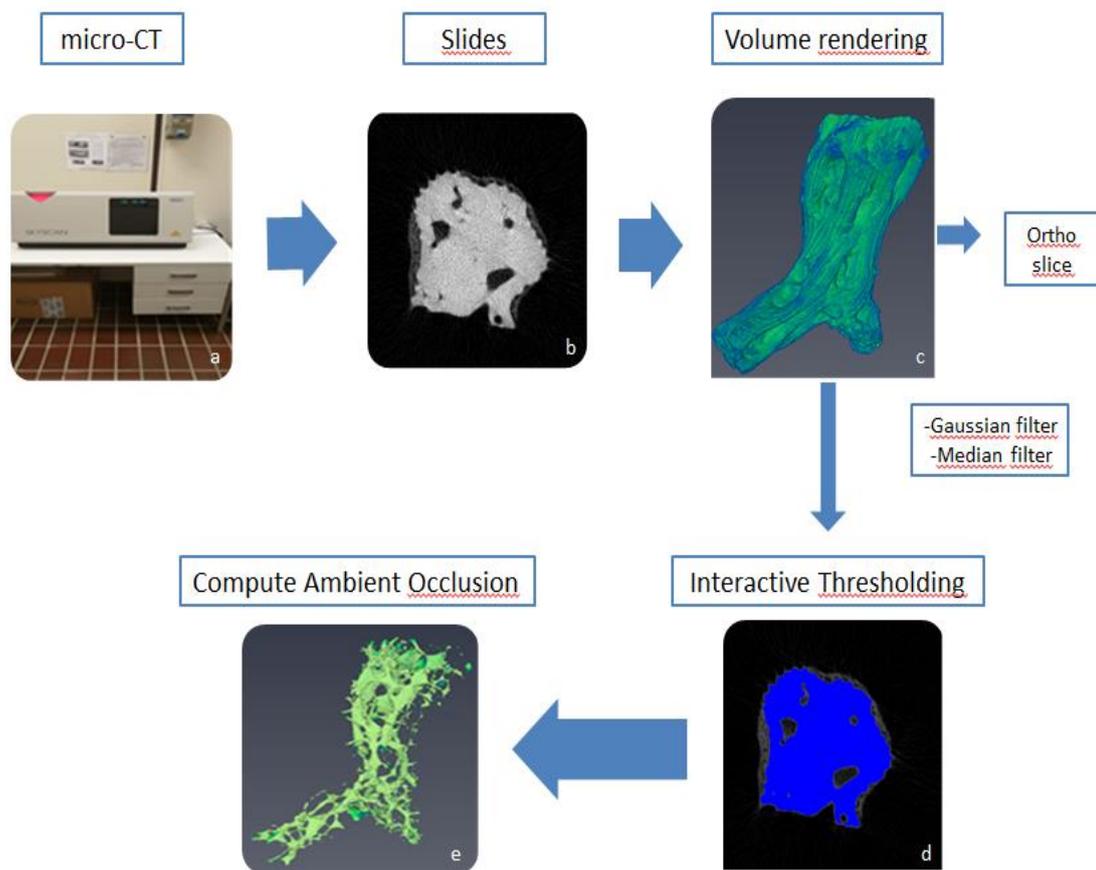


Fig. 5. Illustrazioni delle fasi di acquisizione ed elaborazione. a. Microtomografo, b. Slides del campione, c. Rappresentazione 3D del campione sottoposto al microtomografo, d. Applicazione del modulo interactive thresholding, e. Ricostruzione 3D del campione.

4.1 Caso studio 1: attività bioerosiva del polichete *Polydora ciliata* specie *complex*

Le cavità prodotte dal polichete *Polydora ciliata*, e analizzate tramite micro-CT, erano presenti all'interno di substrati artificiali posizionati nel porto turistico Marina Dorica in Ancona (43°36',65 N; 13°28',91 E). Questi blocchi calcarei erano di dimensioni 10 x 10 x 2 cm e realizzati in Pietra Leccese (Margiotta, 2006). Una roccia sedimentaria a matrice calcarea finissima che contiene resti di origine organica. I blocchi sono stati utilizzati nel corso di un precedente esperimento con lo scopo di studiare la modalità e il tasso di erosione del polichete *P. ciliata*. Per l'analisi tramite micro-CT sono stati utilizzati 2 sub-campioni prelevati da un blocco lasciato in esposizione per 6 mesi (gennaio 2018) e un sub-campione proveniente da un blocco di 12 mesi (Luglio 2018). Per ogni canale, è stata misurata la relativa lunghezza e il diametro della apertura. Attraverso la micro-CT, si sono potute osservare le varie caratteristiche morfologiche dei canali prodotti da questi policheti. L'analisi al SEM ha messo in evidenza il quinto paio di chete, che vengono utilizzate per lo scavo (Fig. 6). Gli studi SEM sono stati effettuati utilizzando un Philips XL 20 SEM.

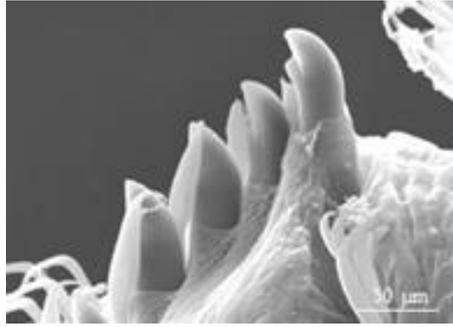


Fig. 6. Immagine al SEM di *Polydora ciliata* complex che mostra i principali caratteri morfologici, chete robuste e modificate in prossimità del quinto segmento con un tipico sperone.

4.2 Caso studio 2: attività bioerosiva effettuata da Clionaidi

Sono state analizzate diverse porzioni di colonie di *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758) di Capo Verde. Il materiale è stato gentilmente fornito dal Museo Civico di Storia Naturale di Genova (Italia). Il materiale è stato conservato nel Museo e non sono disponibili dati sull'esatta posizione, profondità o data di campionamento. Il *C. rubrum* è un ottocorallo dallo scheletro duro, e per nulla elastico, costituito da carbonato di calcio. Le colonie hanno forma cespugliosa e ramificata, con pochi rami spessi che si sviluppano in direzioni diverse, a partire da un piccolo tronco. Lo scheletro del *C. rubrum*, comunemente noto come corallo rosso, è spesso infestato da spugne che producono all'interno dell'asse del corallo, gallerie di diversa forma. Per la prima volta, queste cavità sono state studiate mediante la microtomografia computerizzata (micro-CT) che consente di descrivere e localizzare meglio l'erosione delle spugne all'interno dell'asse del corallo. Quattro specie di spugne sono state identificate nelle colonie di *Corallium rubrum* raccolte a Capo Verde: *Alectona millari* (Carter, 1879), *Alectona* sp., *Dotona* cf. *pulchella* (Carter, 1880) e *Thoosa armata* (Topsent, 1888). Il genere *Alectona* è caratterizzato dalla presenza di spicole diattinali (talvolta poliattinali) e di anfiastri fusiformi e dalla mancanza di tilostili (Rützler, 2002); la sua attività bioerosiva produce dei pitting pattern caratterizzati da

solchi concentrici sovrapposti da segni radianti (Calcinai et al., 2004; Vacelet, 1999). Le specie del genere *Dotona*, invece, sono caratterizzate da stili o strongili come spicole principali, e da microstrongili e diplaster come microsclere (Rützler, 2002). Nel caso del genere *Thoosa* possono essere presenti tilostili o oxee come megasclere (mancanti in alcune specie), e anfiaster e oxiaster come tipiche microsclere; il pitting pattern prodotto da questo genere è costituito da linee di erosione profonde e concentriche (Calcinai et al., 2004). Attraverso il SEM è stata analizzata la morfologia delle cicatrici (pits) prodotte dalle spugne perforanti durante l'attività di erosione. Le dimensioni dei pits (diametro massimo, n = 15) sono state misurate attraverso le immagini ottenute col SEM, utilizzando ImageJ 1.37; gli studi SEM sono stati effettuati utilizzando un Philips XL 20 SEM. La scansione dei campioni di corallo rosso è stata eseguita mediante Skyscan 1174 del Centro di Ricerca e Servizio di Microscopia delle Nanostrutture (CISMiN) dell'Università Politecnica delle Marche, Italia.

4.3 Caso studio 3: attività bioerosiva di crostacei Cirripedi

Sono stati analizzati 3 campioni di Stilasteridi appartenenti a tre distinte specie: *Inferiolabiata labiata* (Moseley, 1879), campione GRC 02-223, *Errina laterorifa* (Eguchi, 1964) campione GRC-02-082 ed *Errina fissurata* (Gray, 1872) campione GRC-08-022. Questi campioni sono stati raccolti nei mesi di gennaio e febbraio 2017 nel Mare di Ross (75°S - 175°W Antartide), tra 432 e 1022 m di profondità, a bordo della R/V Italia. La raccolta è avvenuta durante la XXXII campagna antartica, nell'ambito della ricerca PNRA, programma GRACEFUL (PNRA16_00069). *Inferiolabiata labiata* ed *Errina laterorifa* sono state raccolte a 670 m di profondità ad Iselin Bank; *Errina fissurata* a 750 m a Cape Hallett Canyon. Gli stilasteridi sono idrozoi (phylum Cnidaria) che a causa del loro scheletro calcareo sono inclusi tra i coralli duri; sono coloniali, fragili, solitamente piccoli, da uniplanari a leggermente arborescenti (Cairns, 2011). La famiglia Stylasteridae comprende in particolare organismi sessili bentonici che necessitano di un substrato duro per svilupparsi e stabilirsi (Cairns e Samimi Namin, 2015). Questi tre campioni presentavano numerose cavità prodotte dalla bioerosione da parte di balani che erano presenti ancora all'interno del corallo (Fig. 7a). Queste cavità sono state studiate mediante la microtomografia computerizzata (micro-CT) che consente di descrivere e localizzare meglio l'erosione attuata

dai balani all'interno dell'asse dello stilasteride. In questo modo è stato possibile misurare e osservare le tracce di bioerosione create dai balani al suo interno. In particolare, è stata misurata l'altezza e larghezza delle camere, il loro volume, e l'apertura esterna. Inoltre sono stati calcolati i volumi e superficie dello scheletro dei tre campioni di idrocoralli, questo ci ha permesso di ricavare le densità dei balani presenti in ogni campione espressa sia come numero di balani/cm³, sia come numero di balani/cm² di superficie di corallo (Hooper et al., 2016; Scrosati e Freeman, 2019; Botha et al., 2020). Ulteriori dettagli relativi alle caratteristiche e alle tracce di erosione lasciate dai balani sono stati osservati al SEM. Tutti i campioni analizzati erano perforati da un'unica specie probabilmente appartenente alla specie *Australophialus tomlinsoni* (Newman e Ross, 1971) (Fig. 7b).

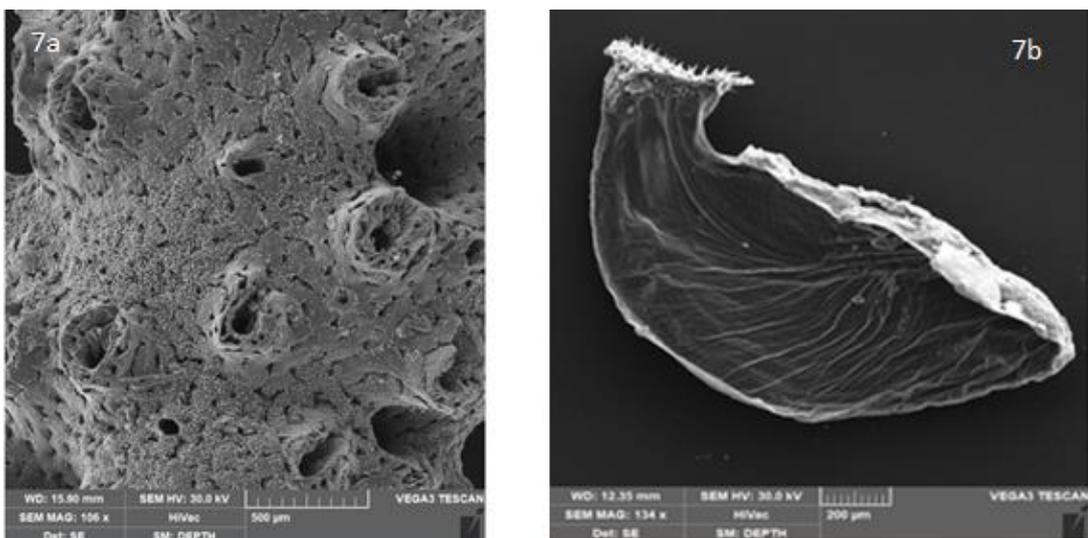


Fig. 7. a. Rappresentazione al SEM del campione perforato di *Inferiolabiata labiata* (GRC 02-223), b. Balano *Australophialus tomlinsoni* che era presente all'interno.

5. Risultati

5.1 Caso studio 1: attività bioerosiva del polichete Polydora ciliata specie complex

La micro-CT è stata applicata in due sub-campioni provenienti da un campione lasciato in immersione per 6 mesi (Gennaio 2018) e un sub-campione esposto per 12 mesi (Luglio 2018); nel materiale di gennaio, erano presenti 3 canali, con un diametro medio di $0,706 \pm 0,093$ mm e una lunghezza di $8,319 \pm 3,076$ mm; nel campione di luglio 2018 erano presenti 3 canali, con un diametro medio di $0,778 \pm 0,14$ mm e una lunghezza media di $9,388 \pm 3,286$ mm. Le ricostruzioni 3D (Fig. 8) ottenute dalla scansione hanno permesso anche di calcolare il volume per ciascuna cavità, ottenendo volumi erosi medi di $7,52 \pm 4,73$ mm³ per gennaio 2018 e $8,51 \pm 5,52$ mm³ per luglio 2018.

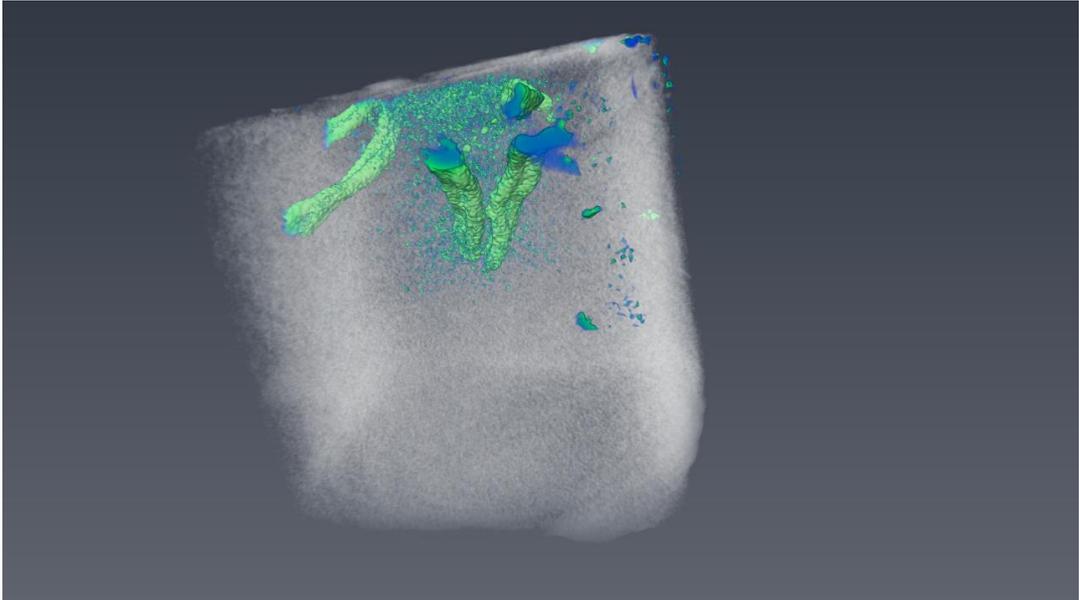


Fig. 8. Rappresentazione 3D di un campione perforato da *Polydora ciliata* complex.

L'analisi micro-CT inoltre ha fornito una chiara visione tridimensionale dei canali erosi da *Polydora* e ha confermato come a partire dai due fori superficiali "a forma di 8" si sviluppino due canali paralleli, di uguale dimensione, che mantengono inalterato il diametro per tutta la loro lunghezza. Essi, infatti, sono facilmente riconoscibili sul substrato per i loro tipici fori a forma di 8, che corrisponde a un singolo individuo (Fig. 9).

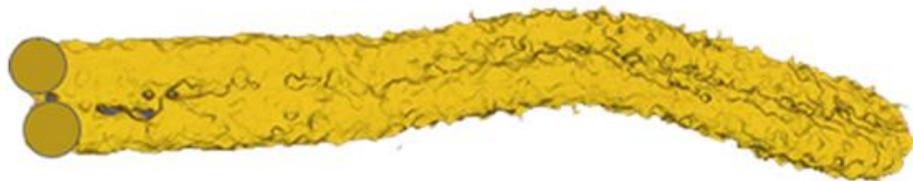


Fig. 9. Ricostruzione 3D delle cavità di *Polydora ciliata* ottenuta attraverso la micro-CT.

5.2 Caso studio 2: attività bioerosiva effettuata da Clionaidi

Per questo studio sono stati analizzati 5 frammenti di *Corallium rubrum*, provenienti dall'Arcipelago di Capo Verde, che presentavano chiari segni di erosione da parte di spugne. I frammenti ricostruiti tramite micro-CT sono illustrati in Fig. 10. Le specie perforanti presenti nei campioni analizzati erano *Alectona* sp., *Alectona millari* Carter 1879, *Thoosa armata* Topsent 1888 e *Dotona* cf. *pulchella* Carter, 1880. Queste spugne perforanti hanno eroso con differenti modalità e intensità: i) il campione CT2 (Fig. 10a), presentava solo tracce di erosione di *Dotona* cf. *pulchella*; l'attività erosiva di questa specie ha determinato una rimozione di substrato pari al 7,79 % del volume iniziale; ii) nel campione CT3 (Fig. 10c), sono state identificate *Dotona* cf. *pulchella* e *Alectona millari* ed è stato calcolato un volume eroso complessivo (considerando entrambe le specie) pari al 40,15%; iii) i campioni CT5 (Fig. 10b) e CT6 (Fig. 10d) erano perforati unicamente da *Thoosa armata*, che ha eroso un volume di corallo rispettivamente pari al 20,08% e 13,48 % del volume iniziale; iii) mentre nel campione CTX (Fig. 10e) sono state identificate 3 specie differenti che perforano lo scheletro del corallo, *Alectona millari*, *Dotona* cf. *pulchella* e *Alectona* sp. per un 30,40 % di volume eroso totale, considerando tutte e tre le specie presenti.

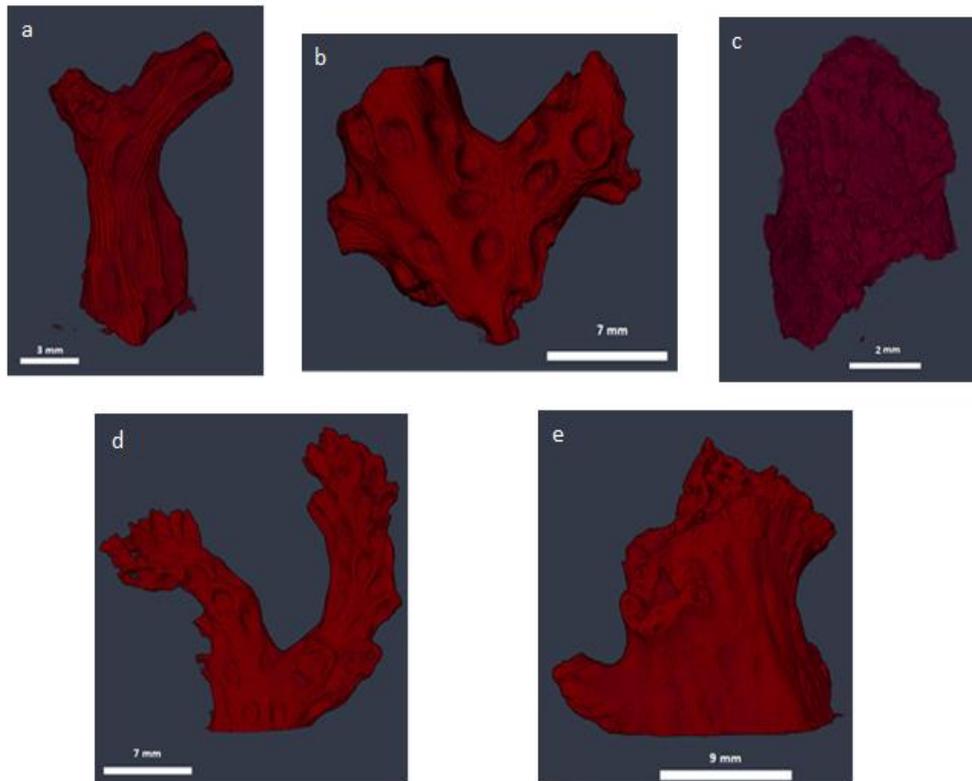


Fig. 10. Rappresentazione 3D dei campioni di corallo rosso sottoposti a micro-CT: a. Campione CT2, b. Campione CT5, c. Campione CT3, d. Campione CT6, e. Campione CTX.

Order Astrophorida Sollas, 1887
Family Thoosidae Cockerell, 1925

Genus *Alectona* Carter, 1879

Alectona sp.

Materiale

Questa specie occupava, insieme ad *Alectona millari* e *Dotona* cf. *pulchella*, una parte consistente del frammento di *Corallium rubrum* (CTX) che era circa 8 cm di altezza e 5 cm in diametro (Fig. 10e). Le camere corrispondenti ad *Alectona* sp. (Fig. 11a, b) contenevano ancora tessuto di spugna.

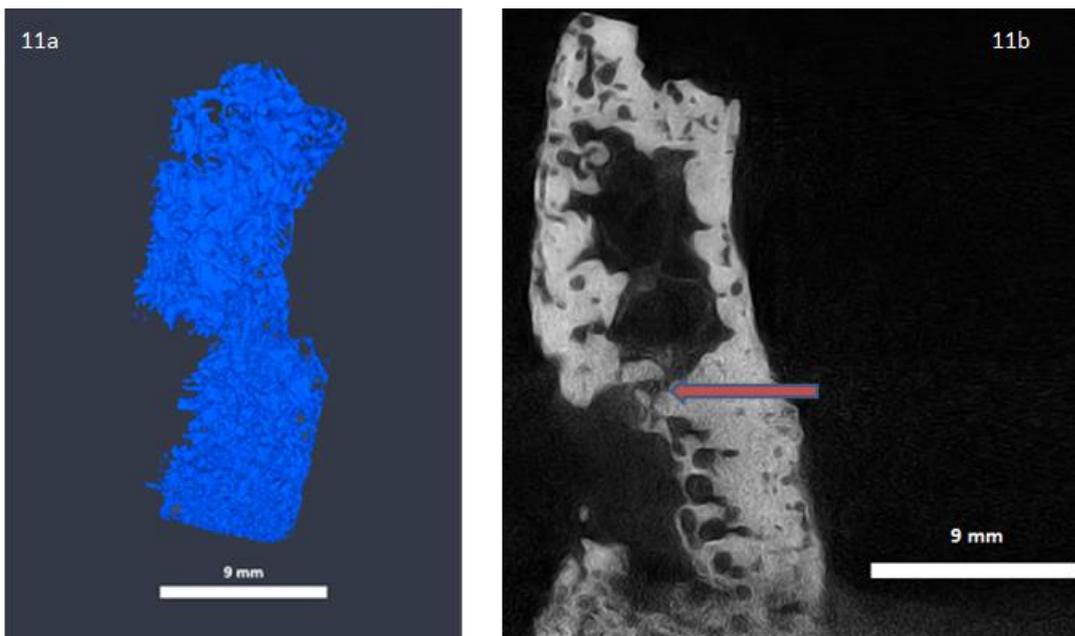


Fig. 11. a. Rappresentazione 3D delle camere di erosione di *Alectona* sp. ottenuta eliminando le camere prodotte dalle altre specie presenti nel campione CTX (illustrato nella figura 10e). b. Sezione longitudinale interna del campione CTX che illustra le due camere prodotte, nella freccia è indicato il canale intercamerale.

Pattern di erosione

Questa specie era principalmente presente nella sezione centrale dell'asse corallino, dove ha scavato 2 cavità ampie e irregolari con diametri di 4,89 x 14,08 mm e 5,29 x 13,02 mm (Fig. 11) separate tra loro da un canale intercamerale relativamente corto di 2,01 mm di lunghezza. Le papille hanno un diametro compreso tra 0,123 e 0,30 mm e le dimensioni del canale papillare erano comprese tra 0,131 e 0,761 mm. L'osservazione al SEM delle camere ha evidenziato la presenza dei tipici segni di incisione (pits) caratterizzati da incisioni radiali sovrapposte (Fig. 12a, b). I diametri dei pits sono in media (\pm SD) $53,3 \pm 8,6 \mu\text{m}$.

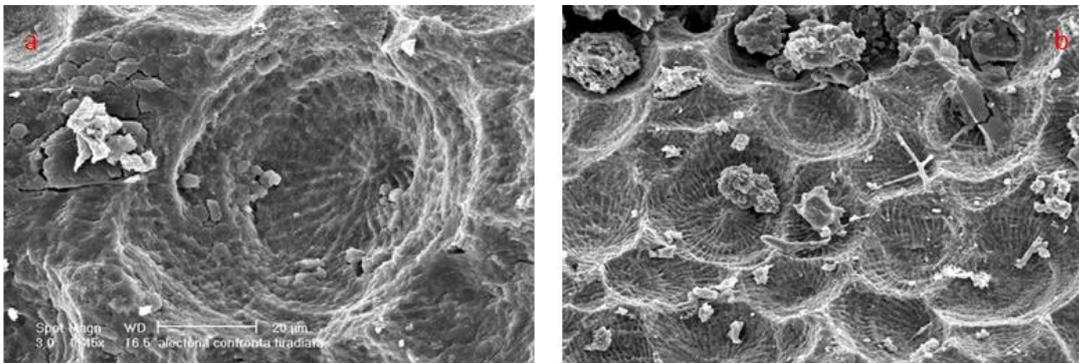


Fig. 12. a. Immagine al SEM del pits prodotto da *Alectona* sp., b. Immagine al SEM di una serie di pits prodotti da *Alectona* sp.

Alectona millari Carter, 1879

Materiale

Questa spugna era presente in due campioni di corallo rosso, il primo (CT3) era un campione di circa 1,7 cm di altezza e 0,8 cm di diametro (Fig. 10c) perforato contestualmente anche da *Dotona* cf. *pulchella*, mentre il secondo (CTX) era un campione ramificato più grande di *Corallium rubrum* di circa 8,0 cm di altezza e 5 cm di diametro (Fig. 10e), in cui erano presenti anche le specie *Dotona* cf. *pulchella* e *Alectona* sp. (Fig. 13).

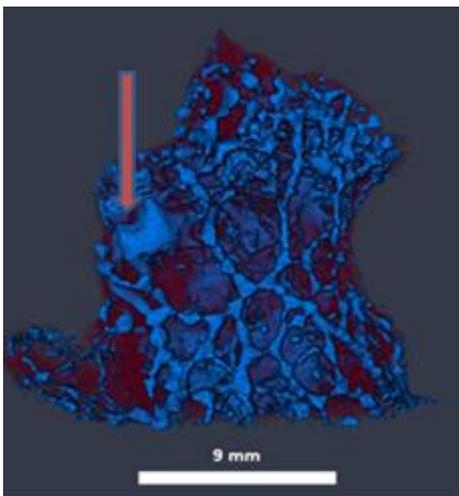


Fig. 13. Rappresentazione 3D della camera di erosione prodotta da *A. millari* (freccia) campione CTX.

Pattern di erosione

L'attività erosiva di *A. millari* si è sviluppata principalmente nella sezione centrale dell'asse corallino, scavando ampie camere sub-circolari. Nel primo campione (CT3), la camera ha un diametro di 5,19 x 11,13 mm (Fig. 14a). Mentre nel campione CTX, perforato contestualmente da *Dotona cf. pulchella* e *Alectona sp.*, la spugna ha prodotto una camera più piccola con diametro di 1,38 mm x 2,89 mm. Le papille sono state riscontrate solo nel secondo campione, dove è stato possibile misurare queste strutture caratteristiche, che presentavano diametri compresi tra 0,149 e 0,30 mm; i canali papillari che connettono le papille alle camere hanno dimensioni comprese tra 0,19 a 1,02 mm. Osservando i campioni al SEM, le pareti delle camere di erosione mostrano pits con linee concentriche e radiali. I diametri dei pits sono in media (\pm SD) $71 \pm 11,6 \mu\text{m}$ (Fig. 14b).

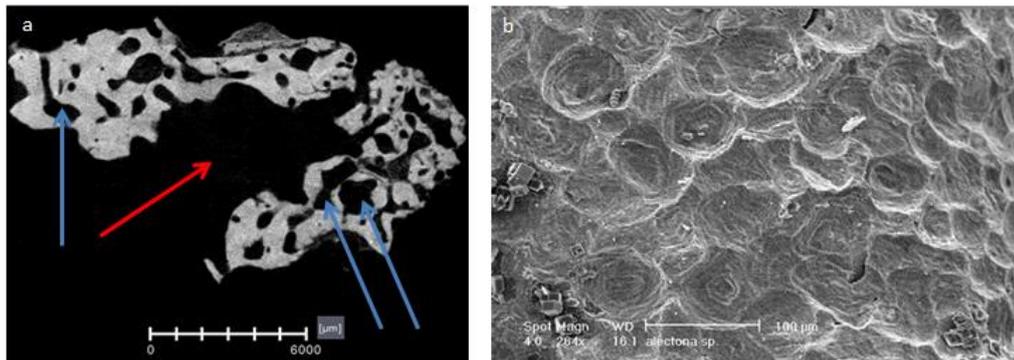


Fig. 14. a. Sezione trasversale del campione CT3 perforato da *Alectona millari* (presente al centro del campione (freccia rossa) e circondata dalle piccole camere di *Dotona cf. pulchella* (freccie blu)), b. Immagine al SEM dei pits prodotti da *Alectona millari*.

Osservazioni

Alectona millari ha prodotto due camere di erosione di diversa dimensione. La ridotta dimensione della camera nel campione CTX è probabilmente dovuta alla contemporanea presenza delle altre due specie perforanti (*Dotona* cf. *pulchella* e *Alectona* sp.); è stato infatti precedentemente osservato (Bromley e D'Alessandro, 1984, 1989; Färber et al., 2016) come la ridotta disponibilità di substrato, dovuto alla presenza di altre spugne perforanti e quindi alla competizione per il substrato che ne deriva, possa modificare il caratteristico pattern erosivo. La morfologia delle cavità di *A. millari*, ricostruite mediante osservazioni con micro-CT, corrispondono a quanto descritto da Beuck, Freiwald, 2005; questi autori infatti descrivono per questa specie grandi camere da cui si estendono numerosi canali esplorativi.

Genus *Thoosa* Hancock, 1849

Thoosa armata Topsent, 1888

Materiale

Due piccoli campioni di *Corallium rubrum*, uno (CT5) di circa 2,1 cm di altezza e 0,5 cm di diametro (Fig. 10b) e l'altro (CT6) di 1,6 cm di altezza e 0,8 cm di diametro (Fig. 10d), presentavano l'infestazione di questa specie.

Pattern erosivo

L'attività erosiva di *Thoosa armata* si è sviluppata principalmente nella sezione centrale dell'asse del corallo, producendo grandi camere irregolari, da forma ellissoidale a ovoidale, con diametri che vanno da 1,83 a 3,90 mm x 0,6 a 1,88 mm (Fig. 15a, b). Sono state osservate numerose papille attraverso le ricostruzioni con micro-CT, esse presentano diametri con un range che va da 0,076 a 0,25 mm; i canali papillari erano compresi tra 0,57 e 1,58 mm. Al SEM, le pareti delle camere mostravano pits ovoidali di diametro medio di $60 \pm 9 \mu\text{m}$ ($\pm\text{SD}$), con la superficie incisa da segni concentrici e incisioni radiali sovrapposte (Fig. 16).

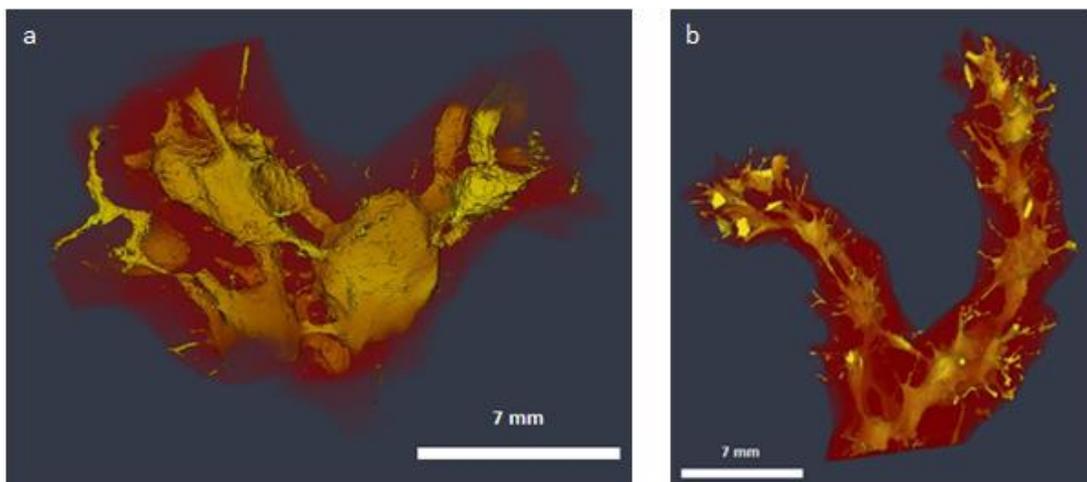


Fig. 15. a. Rappresentazione 3D delle camere di erosione di *Thoosa armata* nel campione CT5, b. Rappresentazione 3D delle camere di erosione di *Thoosa armata* nel campione CT6.

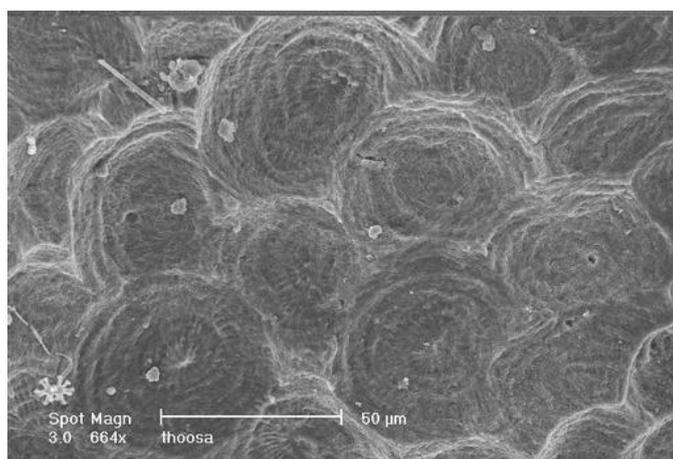


Fig. 16. Immagine al SEM dei pits prodotti da *Thoosa armata*.

Osservazioni

I modelli morfometrici ed erosivi ottenuti da *Thoosa* sono stati confrontati con quelli degli ichnotaxa precedentemente descritti da Bromley e D'Alessandro (1984); tra questi, *Entobia geometrica* Bromley e D'Alessandro, 1984 sembra corrispondere a *Thoosa armata*. *Entobia geometrica* (Fig. 17), infatti, è un icnotaxon caratterizzato da ampie camere collegate da numerosi e brevi canali intercamerali, spesso fusi tra loro. La morfologia può variare da ovale-subsférica nelle fasi giovanili ad una più sub-rettangolare, nelle fasi adulte (Bromley e D'Alessandro, 1984). Sulla base delle fasi erosive, entrambi i campioni analizzati sembrano corrispondere principalmente alle fasi B e C di crescita, fasi caratterizzate da una camera di forma da ovale a subsferica (\emptyset da 1,0 a 3,7 mm) e collegate da 2 a 3 canali intercamerali (Fig. 18a), spesso fusi insieme (Fig. 18b) e con numerosi canali esplorativi.

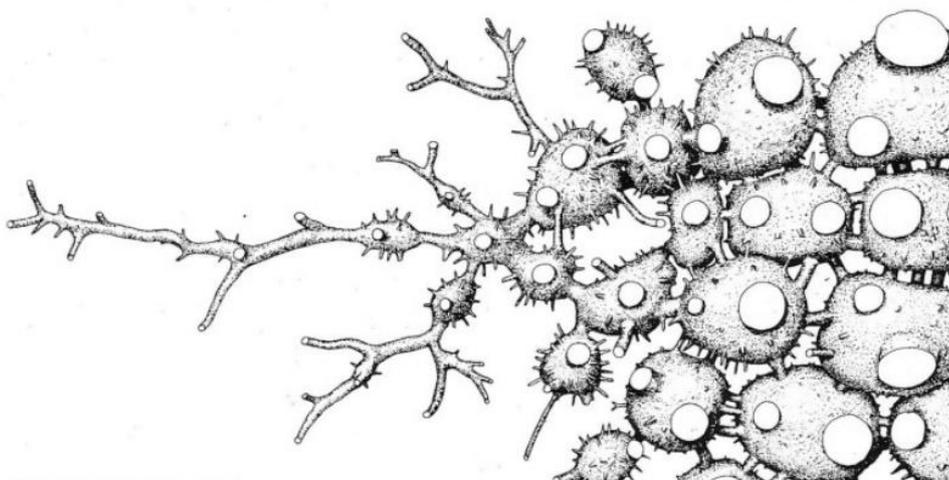


Fig. 17. Struttura di *Entobia geometrica* (Bromley e D'Alessandro, 1984).

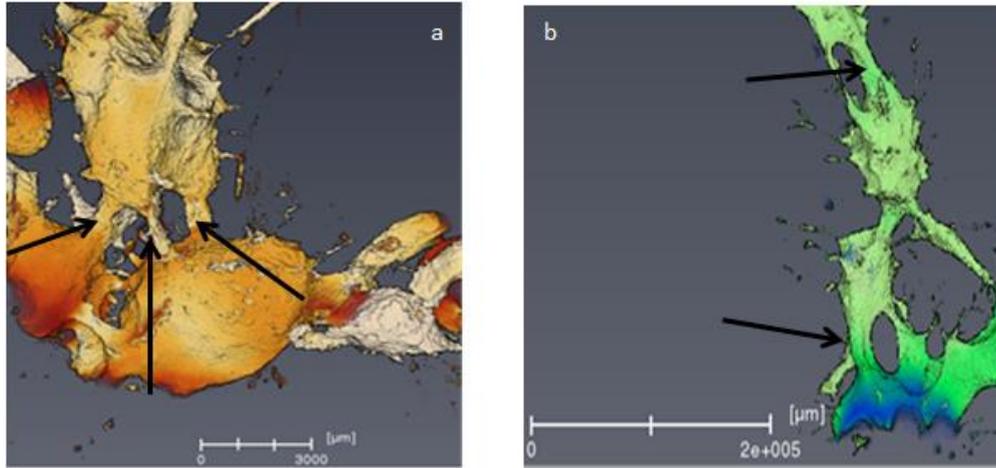


Fig. 18. a. Rappresentazione 3D delle grandi camere di *Thoosa* collegate tra loro con più canali (freccie), b. Canali intercamerali che tendono a fondersi tra loro (freccie).

Order Clionaida Morrow & Cárdenas, 2015

Family Clionaidae d'Orbigny, 1851

Genus *Dotona* Carter, 1880

Dotona cf. *pulchella* Carter, 1880

Materiale

Tre diversi campioni di *Corallium rubrum* presentavano un'infestazione da parte di questa specie. Uno di questi campioni (CT2) (Fig. 10a), di 1,5 cm di altezza e 0,6 cm di Ø basale, presentava unicamente questa specie perforatrice; nel secondo campione di corallo (CTX) (Fig. 10e) di circa 4 cm di altezza e 1 cm di Ø alla base, *Dotona* cf. *pulchella* era perforato insieme ad *Alectona millari* e *Alectona* sp. (CTX). Il terzo campione (CT3) di 1.7 cm di altezza e 0.8 cm di diametro era perforato anche da *Alectona millari*.

Pattern erosivo

In tutti e tre i campioni, l'erosione da parte di *Dotona* cf. *pulchella* si è sviluppata principalmente nella parte esterna dello scheletro del corallo; questa specie presenta uno schema di perforazione di tipo “moniliforme” caratterizzato da numerose camere cilindriche disposte a stringhe, collegate da costrizioni nelle fasi avanzate di erosione, e da lunghi e sottili canali intra camerati negli stadi iniziali; le camere spesso assumono una forma di T, L o X (Fig. 19a). Questa specie ha prodotto camere con un diametro che va da

0,60 a 0,88 mm x 0,95 mm a 1,47 mm. Le papille non sono state osservate né mediante micro-CT né attraverso l'analisi allo stereo-microscopio. Grazie all'analisi delle immagini SEM, i pits sono stati localizzati e misurati ottenendo un diametro medio (\pm SD) di $29,20 \pm 2,80 \mu\text{m}$ (Fig. 19b).

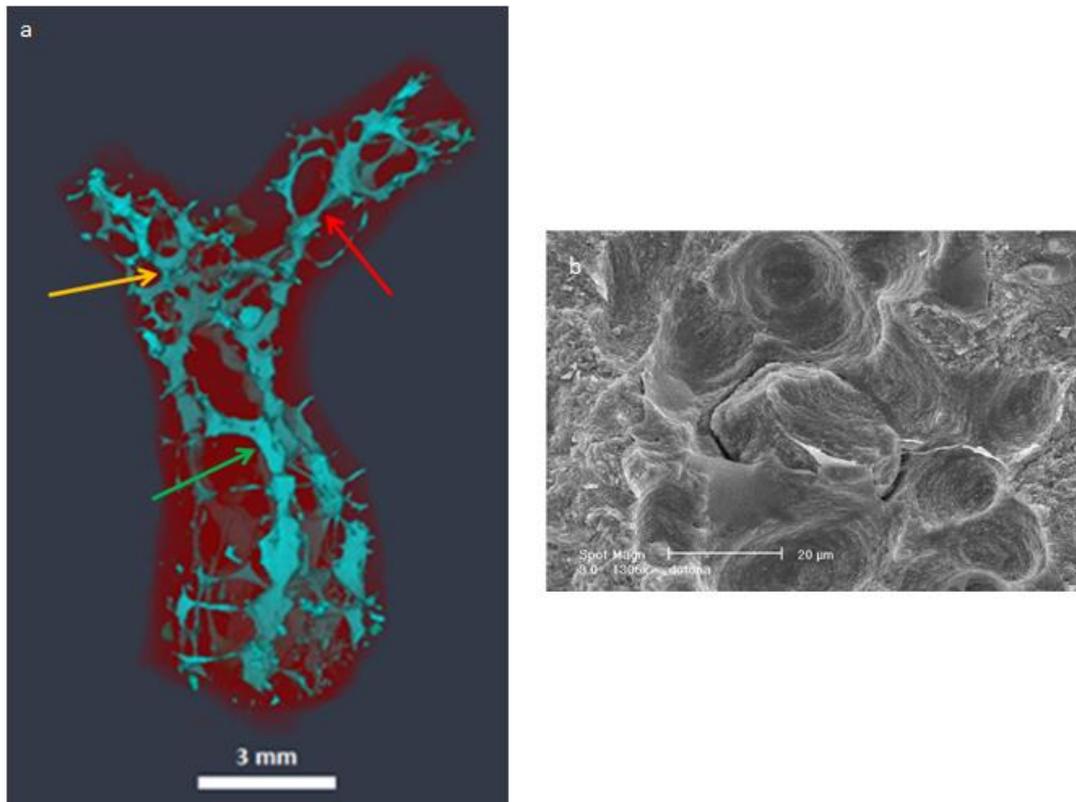


Fig. 19. a. Rappresentazione 3D delle camere di *Dotona cf. pulchella* caratterizzati dalla tipica forma a T (freccia rossa), L (freccia verde), X (freccia gialla) del campione CT2, b. Immagine al SEM dei pits prodotti da *Dotona cf. pulchella*.

Osservazioni

Confrontando i modelli di erosione e le caratteristiche morfometriche di questa specie con gli icnotaxa descritti, è emersa una notevole somiglianza con *Entobia cateniformis* Bromley e D'Alessandro, 1984 (Fig. 20); le camere di erosione di questo ichnotaxon sono state descritte come un sistema di camere cilindriche, allungate e collegate da costrizioni e disposte in file con intersezioni a forma di L, T e X (Bromley e D'Alessandro, 1984). Nel sistema di erosione di *Dotona* cf. *pulchella*, sono state identificate tutte le fasi di crescita (A-D) di *E. cateniformis*, dai sottili fili esplorativi caratteristici della fase A, alla rete di catene intrecciate della fase D, passando per le fasi intermedie definite dallo sviluppo di catene cilindriche e dalla creazione di intersezioni (T-, L-, X-) per anastomosi e dicotomia.

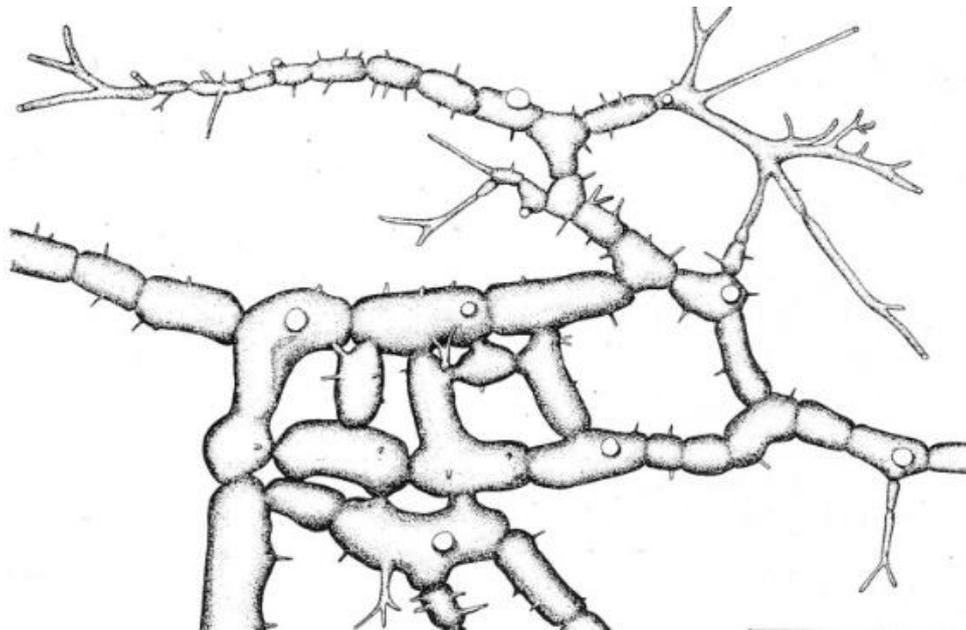


Fig. 20. Struttura di *Entobia cateniformis* (Bromley e D'Alessandro, 1984).

5.3 Caso studio 3: attività bioerosiva di crostacei Cirripedi

La micro-CT è stata applicata su tre campioni di Stylasteridae perforati da *Australophialus tomlinsoni* (Newman e Ross, 1971); questo balano ha prodotto camere di perforazione sacciformi (Fig. 21) caratterizzate da un'apertura a forma di 8 che si collega alla camera attraverso un corto canale. Nel primo campione (GRC 02-223), appartenente alla specie *Inferiolabiata labiata* (Fig. 22a) l'altezza e la larghezza delle camere prodotte dal balano erano in media 1,37 mm x 0,41 - 0,99 mm; il diametro dell'apertura esterna era in media 0,29 mm; il volume delle camere era compreso tra 0,7 mm³ e 0,87 mm³. Nel secondo campione (GRC08-022), colonia di *Errina fissurata* (Fig. 22b), l'altezza e la larghezza delle camere prodotte dal balano erano in media 2,16 mm x 0,9 mm - 1,29 mm; le camere avevano un volume compreso tra 0,75 mm³ e 1,94 mm³ ed erano collegate tramite un corto canale a una apertura di diametro di 0,6 mm in media. Nel terzo campione (GRC 02-082) *Errina laterorifa* (Fig. 22c) non è stato possibile misurare le cavità prodotte dai balani perché troppo addensate e collegate tra loro.

I valori di densità dei balani perforanti sono stati calcolati considerando il volume e la superficie dello scheletro di corallo; il primo campione (GRC 02-223), appartenente alla specie *Inferiolabiata labiata*, presenta un volume di 1216,32 mm³ e una densità di balani di 0,037 camere/mm³; il secondo

campione (GRC08-022) di volume 1955,63 mm³, corrispondente alla specie *Errina fissurata*, la densità di 0,036 camere/mm³; infine il terzo campione (GRC 02-082) di *Errina laterorifa* di volume 89,94 mm³, la densità è di 0,37 camere/mm³.

I valori di densità dei balani calcolata come n di balani/cm² di substrato erano rispettivamente per *Inferiolabiata labiata*, *Errina fissurata* e *E. laterorifa* di 2.63 balani/cm², 3.29 balani/cm², e 1.63 balani/cm². Nel campione di *E. laterorifa* è stato anche osservato un alto numero di cavità nella sezione basale dello scheletro; qui erano anche presenti piccole camere isolate, più numerose nella parte superiore della colonia, e molto simili alle camere di perforazione del balano; attraverso l'osservazione delle slides e della ricostruzione 3D è stato possibile identificarle come ampulle (Fig. 23a, b) cioè strutture riproduttive tipiche degli Stilasteridi. Le ampulle vengono descritte o come rigonfiamenti emisferici vicino alle punte dei rami del corallo, o come cavità interne, senza rilievo superficiale, all'interno delle quali si sviluppano i gonofori. Le ampulle femminili hanno un diametro medio che va da 0,9 mm a 1 mm e quelle maschili hanno un diametro in media di 0,8 mm. Quelle femminili sono solitamente più grandi di quelle maschili e sono molto spesso strettamente raggruppate e sparse lungo tutta la colonia o localizzate preferenzialmente in una porzione di essa. I gameti sono

rilasciati da pori delle ampulle esterne o da un dotto efferente in quelle interne (Pica, 2012). Nei campioni, il volume di queste ampulle era compreso tra 0,53 mm³ e 1,1 mm³ e il loro diametro era compreso tra 0,7 mm e 1 mm. Queste strutture riproduttive sono state rilevate esclusivamente nella specie *E. laterorifa*.

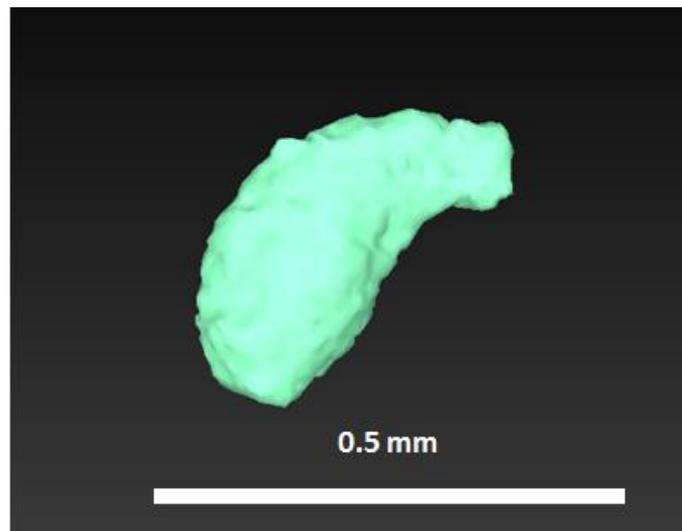


Fig. 21. Rappresentazione 3D della camera sacciforme prodotta dal balano.

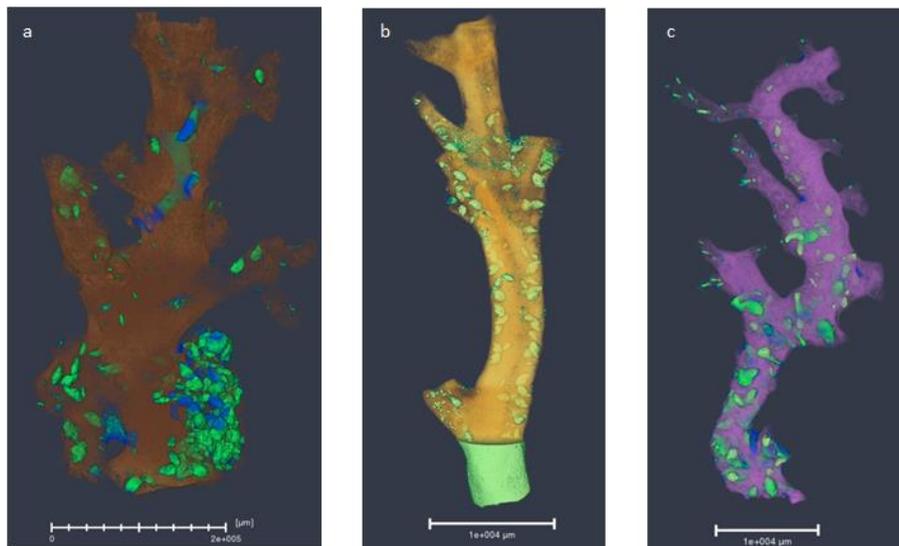


Fig. 22. Rappresentazione 3D dei campioni di Stilasteridi analizzati e delle cavità prodotte dal balano (in verde). a. Campione (GRC 02-223)

Inferiolabiata labiata, b. Campione (GRC08-022) *Errina fissurata*, c.
Campione (GRC 02-082) *Errina laterorifa*.

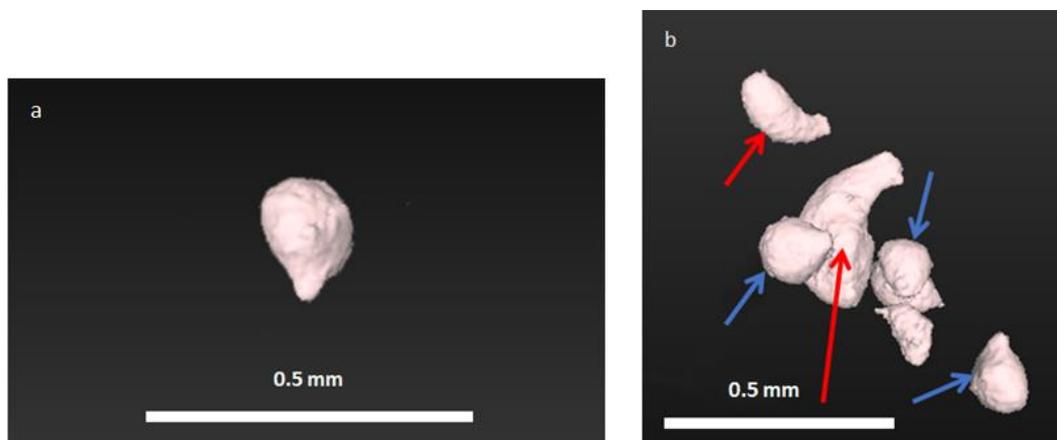


Fig. 23. a. Rappresentazione 3D dell'ampulla isolate presente nel campione *Errina laterorifa*, b. Rappresentazione 3D delle ampulle (freccia blu) insieme alle camere prodotte dai balani (freccia rossa) nel campione *Errina laterorifa*.

6. Discussioni

La micro-CT è stata applicata in questo lavoro per la prima volta per studiare diversi aspetti inerenti alla bioerosione attuata dai policheti, spugne e cirripedi.

Per valutare l'attività erosiva dei policheti perforatori, sono sempre stati applicati metodi distruttivi come la rottura del substrato (Simon e Sato-Okoshi, 2015; Radashevsky et al., 2017); qui, per la prima volta, è stato misurato il volume eroso dai policheti utilizzando le ricostruzioni tridimensionali ottenute con la micro-CT. La tomografia non solo ha permesso di estrarre i dati morfometrici (dimensione delle cavità e volume eroso), ma anche di osservare la posizione e l'orientamento delle cavità nel substrato, nonché di esplorare il pattern di bioerosione nel suo insieme. Grazie a questo approccio, si è ottenuta, infatti, una chiara visione tridimensionale del modello di erosione prodotto da *Polydora ciliata* specie complex, impossibile da ottenere con approcci tradizionali. In fig. 8, per esempio, è possibile notare come i due individui di *Polydora* sembrano evitare di mettere in contatto i rispettivi canali; la forma tipica quasi rettilinea dei tubi è infatti modificata per evitare il contatto durante la attività di erosione.

Nel caso delle spugne le tecniche tradizionalmente più utilizzate per valutare i diversi aspetti della bioerosione prevedono l'uso di calchi in resina, la

quantificazione indiretta del tessuto endolitico utilizzando la superficie del tessuto esposto (papille), e metodi invasivi che necessitano di sciogliere o spaccare il substrato (Fang et al., 2013); la micro-CT, è invece ancora poco utilizzata per studiare la bioerosione dei poriferi. In questo lavoro, per la prima volta, la tecnica della micro-CT è stata applicata nello studio delle spugne perforanti che attaccano il prezioso corallo rosso Mediterraneo; è stato così possibile quantificare il volume eroso e comprendere meglio lo sviluppo dei sistemi di camere prodotte dalle spugne all'interno del corallo; questa tecnica non invasiva offre una prospettiva tridimensionale unica sui modelli erosivi prodotti dalle spugne all'interno dello sclerasse. Nel corso dello studio sono però emersi diversi limiti della tecnica, soprattutto legati alla capacità risolutiva dello strumento utilizzato; è stato quindi necessario avvalersi anche di approcci più tradizionali in modo da riconoscere in modo accurato le strutture restituite dalla scansione e descriverne correttamente le caratteristiche. Per esempio, è stato necessario utilizzare lo stereo microscopio per potere verificare l'esatta corrispondenza di strutture quali papille e canali papillari, ricostruite con la scansione, con quelle osservabili direttamente sul campione. La micro-CT in alcuni casi non è stata utile per poter individuare e descrivere microscopici caratteri morfologici al di sotto del potere di risoluzione dello strumento; questo è il caso dei pits, caratterizzati spesso da

incisioni superficiali con valore diagnostico, non riproducibili dalla scansione; in questo caso si è quindi dovuti ricorrere al SEM, che permette una analisi accurata. Ulteriori limitazioni sono emerse durante il processo di segmentazione, quando nello stesso campione erano presenti più specie di spugna; come nel caso del campione CT3 (*Dotona* cf. *pulchella* e *Alectona millari*) o nel campione CTX (*Dotona* cf. *pulchella*, *Alectona millari* e *Alectona* sp.). Nel campione CT3 era evidente una fusione tra diversi sistemi di cavità prodotte dalle diverse specie di spugna. È noto però come le spugne perforatrici tendano ad evitare di entrare in contatto all'interno dello stesso substrato (Bromley e Tendal, 1973). Molto probabilmente i canali di erosione non sono in realtà fusi, ma separati da uno strato sottile di substrato non rilevabile dallo strumento; è anche possibile però che ci sia stata una effettiva compenetrazione tra le cavità e quindi tra le due specie, ma che questa sia avvenuta solo successivamente alla morte di *Alectona millari*. Inoltre, in questo campione, così come nel campione CTX (perforato da tre specie) non è stato possibile calcolare la quantità di materiale eroso da parte di ogni singola specie, ma si è potuto solamente calcolare il volume totale eroso rispetto al volume iniziale. Nei campioni dove invece era presente una singola specie perforante, la micro-CT si è dimostrata un metodo molto valido e

preciso per valutare la quantità di materiale eroso dal bioperforatore senza ricorrere a metodi invasivi che determinino la rottura del substrato.

Confrontando le percentuali di materiale eroso dalle diverse specie, è emerso che *Dotona cf. pulchella* rimuove una percentuale inferiore di substrato (7,79 %) rispetto a *Thoosa armata* (20,08 % e 13,48 % due campioni). Recentemente anche Schönberg e Shields (2008), hanno calcolato la percentuale di materiale eroso da parte delle spugne *Cliona celata* e *Cliona orientalis* attraverso micro-CT ottenendo percentuali di substrato rimosso più elevate (*C. celata* ha rimosso il 9.3% del substrato nella parte centrale contro il 20.9% nella parte marginale, *C. orientalis* ha rimosso 48.4% contro il 42.3%). Tali differenze potrebbero essere spiegate considerando che i dati di Schönberg e Shields (2008) si riferiscono a specie perforanti tropicali, che come è noto, producono tassi di bioerosione maggiori di quelli prodotti da specie di ambienti temperati o freddi (Wisshak, 2006). Anche la differente composizione e tipologia di substrato potrebbe, inoltre, spiegare i diversi valori di erosione. Le specie analizzate evidenziano anche una modalità di erosione molto diversa; mentre *Dotona cf. pulchella* produce una densa rete di piccole camere ovoidali verso la parte periferica dell'asse del corallo, *Thoosa armata* e *Alectona* spp. producono delle camere molto più ampie, che si sviluppano verso la parte centrale dello sclerasse. *Thoosa armata* e *Alectona*

spp. presentano una maggiore capacità di erosione rispetto a *Dotona* cf. *pulchella*. Questo aspetto e anche la distribuzione centrale delle loro grandi camere di erosione suggeriscono come queste specie possano compromettere l'integrità strutturale del corallo. Anche in ambiente temperato, così come avviene in ambiente tropicale (Tunncliffe, 1982), è possibile che le spugne perforanti possano rappresentare un agente importante nel promuovere la frammentazione e quindi la riproduzione vegetativa del corallo rosso; la frammentazione e il distacco di parti di scheletri di corallo che può essere causato da agenti fisici (tempeste, uragani) è infatti accelerata dalla bioerosione che indebolisce lo scheletro e promuove il distacco di parti di colonia; questa rottura e la seguente dispersione di frammenti di corallo può diffondere copie non solo del corallo ma anche delle spugne che vivono all'interno dello scheletro del corallo (Tunncliffe 1981, 1982; Schönberg e Wilkinson 2001; Zilberberg et al., 2006). Le ricostruzioni in 3D delle camere di perforazione e i dati morfometrici estratti da queste ricostruzioni hanno permesso di confrontare i nostri risultati con i pattern erosivi prodotti da *Entobia* spp. *Entobia* è un icnogenere, cioè un genere basato sulle tracce (anche fossili) prodotte da spugne. Molte icnospecie sono attribuibili a specie attuali di *Cliona* sulla base delle caratteristiche morfologiche delle cavità (Bromley e D'Alessandro, 1984). Assegnare un morfotipo specifico (una

icnospecie) a una specie attuale è un compito impegnativo a causa dell'elevata variabilità inter e intraspecifica, alla diversa morfologia che le cavità possono assumere in funzione delle fasi di crescita, delle interazioni con altre specie perforanti e in funzione del substrato disponibile (Bromley e D'Alessandro, 1984). Inoltre la stessa icnospecie, sulla base delle caratteristiche morfologiche delle cavità di erosione, può essere anche assegnata a diverse specie attuali; per esempio *E. cateniformis* Bromley e D'Alessandro, 1984 è stata attribuita a *Cliona vermifera* Hancock, 1867 da Bromley e D'Alessandro (1989) mentre Färber et al., 2016 hanno assegnato l'icnospecie *E. cateniformis* a *Pione caesia* (Schönberg, 2000) e a *Cliona schmidtii* (Ridley, 1881). I nostri risultati, invece, suggeriscono *Dotona* cf. *pulchella* come specie riconducibile a *E. cateniformis* sia da un punto di vista morfologico, sia in base al riconoscimento nei nostri campioni, di tutte le fasi di crescita caratteristiche (A-D) descritte da Bromley e D'Alessandro (1984) in *E. cateniformis*. Anche per *Thoosa armata* l'attribuzione all'icnospecie *Entobia geometrica* Bromley e D'Alessandro, 1984, avvenuta sia su base morfologica, sia attraverso il riconoscimento nei nostri esemplari di alcune fasi di crescita caratteristiche (B-C) descritte in *E. geometrica*, risulta però in disaccordo con Bromley e D'Alessandro (1989) che assegnano questo icnotaxon a *Cliona celata*, Grant 1977. I patterns erosivi di *Thoosa armata* e *Dotona* cf. *pulchella*

si mantengono omogenei nei diversi campioni, non evidenziando variazioni intraspecifiche; nel caso invece di *Alectona millari* sono stati osservati due differenti pattern erosivi nei campioni CTX e CT3, probabilmente dovuti dalla differente disponibilità del substrato (occupato da altre specie) o come conseguenza della competizione tra le diverse specie di spugne presenti sul corallo. Questo diverso comportamento di perforazione da parte della stessa specie di spugna è stato definito da Bromley e D'Alessandro, 1984 come un modello stenomorfo di perforazione, che si verifica quando una spugna è limitata dalle restrizioni fisiche del substrato, o dalla presenza di altri perforatori.

Tramite l'utilizzo della micro-CT è stato possibile, per la prima volta, quantificare le dimensioni delle camere prodotte, e quindi la quantità di substrato rimosso e la densità del balano perforante *Australophialus tomlinoni*; è stato però necessario affiancare la micro-CT a metodi tradizionali, come la microscopia elettronica e ottica, per studiare e valutare dettagli che con la sola micro-CT non erano apprezzabili; le ampulle, per esempio, in un primo momento identificate come camere più piccole prodotte dai balani, sono state riconosciute come tali soltanto a seguito dell'osservazione e confronto tramite lo stereo microscopio. I valori di densità dei balani calcolati nei diversi substrati erano compresi tra 1,63 balani/cm² in

Errina laterorifa e $3,29$ balani/cm² in *E. fissurata*. Questi dati sono in linea con quanto riscontrato in letteratura; per esempio Hooper et al. 2016 riporta valori pari a $3,07 \pm 0,66$ balani/cm², mentre altri autori come Bothar et al., 2020 e Scrosati e Freeman, 2019 calcolano valori di densità superiori, pari a rispettivamente 7 balani/cm² e $12,16 \pm 10,96$ balani/cm². La comparazione di questi valori ha però una valenza limitata in quanto questi studi riguardano specie diverse, ambienti diversi (acque temperate e non polari), e profondità inferiori (substrati rocciosi dell'intertidale). Saranno necessari ulteriori studi riguardanti la bioerosione dei balani su biocostruzioni calcaree per poter confrontare correttamente i nostri risultati.

Concludendo, indipendentemente dal fatto che si sia dimostrata un approccio versatile e non distruttivo per caratterizzare i modelli bioerosivi, la micro-CT ha però evidenziato alcuni limiti applicativi: mentre i substrati a bassa densità o molto porosi possono essere scansionati facilmente a basso voltaggio restituendo scansioni con una buona risoluzione, questo non vale per i materiali troppo densi. L'elevata densità del materiale, infatti, causa una bassa penetrazione dei raggi X con conseguente produzione di rumore e artefatti nell'output finale; una soluzione a questo problema consiste nel ridurre i volumi dei campioni in esame, aumentando però i tempi di elaborazione, e nel contempo riducendo, però, l'estensione del campione, o di parte del

campione, da osservare e ricostruire. Inoltre, i costi operativi per un numero elevato di campioni possono essere considerevoli e quindi non sempre affrontabili. Sarebbe interessante e molto utile poter creare una libreria che raccolga tutti i calchi digitali studiati con le relative misure, in modo da poter effettuare comparazioni future e poter identificare con maggiore facilità la specie. Tuttavia, la micro-CT a raggi X, appare come uno strumento molto promettente che non ha ancora raggiunto il suo pieno potenziale nelle scienze non riguardanti il settore medico.

7. Bibliografia

1. Anagnostidis, K., & Pantazidou, A. (1988). *Hyella kalligrammos* sp. nov., *Hyella maxima* (Geitl.) comb. nov., and other freshwater morphotypes of the genus *Hyella* Born. et Flah.(Chroococcales, Cyanophyceae). *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 227-247.
2. Anderson, D. T. (1994). *Barnacle structure, function, development and evolution*.-Chapman and Hall, London, England. Pp. 1-357.
3. Barbe, S., Boller, E., Fáber, R., Thom, V., & Scheper, T. (2007). The use of X-ray microtomography for the characterization of macroporous membranes. *Proceeding of Journée Annuelle de la Société Française de Métallurgie et de Matériaux, St-Etienne, France*.
4. Bagur, M., Gutiérrez, J. L., Arribas, L. P., & Palomo, M. G. (2019). Vacant bivalve boreholes increase invertebrate species richness in a physically harsh, low intertidal platform. *Diversity*, 11(3), 39.
5. Bents, C. J., Kaufman, L., & Golubic, S. (2000). Endolithic fungi in reef-building corals (Order: Scleractinia) are common, cosmopolitan, and potentially pathogenic. *The Biological Bulletin*, 198(2), 254-260.

6. Beuck, L., & Freiwald, A. (2005). Bioerosion patterns in a deep-water *Lophelia pertusa* (Scleractinia) thicket (Propeller Mound, northern Porcupine Seabight). In *Cold-water corals and ecosystems* (pp. 915-936). Springer, Berlin, Heidelberg.
7. Beuck, L., Vertino, A., Stepina, E., Karolczak, M., & Pfannkuche, O. (2007). Skeletal response of *Lophelia pertusa* (Scleractinia) to bioeroding sponge infestation visualised with micro-computed tomography. *Facies*, 53(2), 157-176.
8. Blomsterberg, M., Glenner, H., & Høeg, J. T. (2004). Growth and molting in epizoic pedunculate barnacles genus *Octolasmis* (Crustacea: Thecostraca: Cirripedia: Thoracica). *Journal of Morphology*, 260(2), 154-164.
9. Bornet, M. E., & Flahault, C. (1889). Sur quelques plantes vivant dans le test calcaire des mollusques. *Bulletin de la Société botanique de France*, 36(10), CXLVII-CLXXVI.
10. Botha, T. P., Griffiths, C. L., & Maneveldt, G. W. (2020). Coralline red algae—a new host taxon for burrowing barnacles (Cirripedia, Acrothoracica). *Marine Biodiversity*, 50(1), 1-5.

11. Bromley, R. G., & Tendal, O. S. (1973). Example of substrate competition and phototropism between two clionid sponges. *Journal of Zoology*, 169(2), 151-155.
12. Bromley, R. G., & D'Alessandro, A. (1984). The ichnogenus *Entobia* from the Miocene, Pliocene and Pleistocene of southern Italy. *Rivista Italiana di Paleontologia e Stratigrafia*, 90(2).
13. Bromley, R. G., & D'Alessandro, A. (1989). Ichnological study of shallow marine endolithic sponges from the Italian coast. *Rivista Italiana di Paleontologia e Stratigrafia*, 95(3).
14. Bruggemann, J. H., Van Kessel, A. M., Van Rooij, J. M., & Breeman, A. M. (1996). Bioerosion and sediment ingestion by the Caribbean parrotfish *Scarus vetula* and *Sparisoma viride*: implications of fish size, feeding mode and habitat use. *Marine Ecology Progress Series*, 134, 59-71.
15. Cairns, S. D. (2011). Global diversity of the stylasteridae (Cnidaria: Hydrozoa: Athecatae). *PloS one*, 6(7), e21670.

16. Cairns, S. D., & Samimi-Namin, K. (2015). A new species of Stylaster (Cnidaria: Hydrozoa: Stylasteridae) from the Arabian Sea, off Oman. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 128(4), 209-215.
17. Calcinai, B., Bavestrello, G., & Cerrano, C. (2004). Bioerosion micro-patterns as diagnostic characteristics in boring sponges. *Bollettino dei Musei e Degli Istituti Biologici dell'Università di Genova*, 68, 229–238.
18. Carboni, Michele & Boniotti, L & Romano, Simone. (2017). Applicazione della micro-tomografia computerizzata a raggi X alla verifica della qualità di manufatti ottenuti per Additive Manufacturing.
19. Cerrano, C., Bavestrello, G., Bianchi, C. N., Calcinai, B., Cattaneo-Vietti, R., Morri, C., & Sarà, M. (2001a). The role of sponge bioerosion in Mediterranean coralligenous accretion. In *Mediterranean Ecosystems* (pp. 235-240). Springer, Milano.
20. Cerrano, C., Bavestrello, G., Calcinai, B., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Guidetti, M., & Sarà, A. (2001b). Bioerosive processes in Antarctic seas. *Polar Biology*, 24(10), 790-792.

21. Chacón, E., Berrendero, E., & Pichel, F. G. (2006). Biogeological signatures of microboring cyanobacterial communities in marine carbonates from Cabo Rojo, Puerto Rico. *Sedimentary Geology*, *185*(3-4), 215-228.
22. Chazottes, V., Le Campion-Alsumard, T., & Peyrot-Clausade, M. (1995). Bioerosion rates on coral reefs: interactions between macroborers, microborers and grazers (Moorea, French Polynesia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *113*(2-4), 189-198.
23. Corriero, G., Gherardi, M., Giangrande, A., Longo, C., Mercurio, M., Musco, L., & Marzano, C. N. (2004). Inventory and distribution of hard bottom fauna from the marine protected area of Porto Cesareo (Ionian Sea): Porifera and Polychaeta. *Italian Journal of Zoology*, *71*(3), 237-245.
24. Crook, E. D., Cohen, A. L., Rebolledo-Vieyra, M., Hernandez, L., & Paytan, A. (2013). Reduced calcification and lack of acclimatization by coral colonies growing in areas of persistent natural acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(27), 11044-11049.

25. Darwin, C. (1854). *A monograph on the sub-class Cirripedia: with figures of all the species* (Vol. 2). Ray Society. pp. 684.
26. Davidson, T. M., Altieri, A. H., Ruiz, G. M., & Torchin, M. E. (2018). Bioerosion in a changing world: a conceptual framework. *Ecology letters*, *21*(3), 422-438.
27. de Bakker, D. M., Webb, A. E., van den Bogaart, L. A., van Heuven, S. M., Meesters, E. H., & van Duyl, F. C. (2018). Quantification of chemical and mechanical bioerosion rates of six Caribbean excavating sponge species found on the coral reefs of Curaçao. *PloS one*, *13*(5), e0197824.
28. DeCarlo, T. M., Cohen, A. L., Barkley, H. C., Cobban, Q., Young, C., Shamberger, K. E., & Golbuu, Y. (2015). Coral macrobioerosion is accelerated by ocean acidification and nutrients. *Geology*, *43*(1), 7-10.
29. De Los Rios, A., Wierzchos, J., Sancho, L. G., Green, T. A., & Ascaso, C. (2005). Ecology of endolithic lichens colonizing granite in continental Antarctica. *The Lichenologist*, *37*(5), 383-395.
30. Elliott, J. C., & Dover, S. D. (1982). X-ray microtomography. *Journal of microscopy*, *126*(2), 211-213.

31. Enochs, I. C., Manzello, D. P., Wirshing, H. H., Carlton, R., & Serafy, J. (2016). Micro-CT analysis of the Caribbean octocoral *Eunicea flexuosa* subjected to elevated p CO₂. *ICES Journal of Marine Science*, 73(3), 910-919.
32. Fang, J. K., Schönberg, C. H., Kline, D. I., Hoegh-Guldberg, O., & Dove, S. (2013). Methods to quantify components of the excavating sponge *Cliona orientalis* Thiele, 1900. *Marine Ecology*, 34(2), 193-206.
33. Färber, C., Titschack, J., Schönberg, C. H. L., Ehrig, K., Boos, K., Baum, D., ... & Wisshak, M. (2016). Long-term macrobioerosion in the Mediterranean Sea assessed by micro-computed tomography. *Biogeosciences*, 13(11), 3461-3474.
34. Faulwetter, S., Vasileiadou, A., Kouratoras, M., Dailianis, T., & Arvanitidis, C. (2013). Micro-computed tomography: Introducing new dimensions to taxonomy. *ZooKeys*, (263), 1.
35. Festa A., 2017. Controlli di qualità e rappresentazione 3D delle microtomografie a raggi X applicate allo studio dei modelli murini per la progeria, *Università di Bologna*.

36. Fine, M., & Loya, Y. (2002). Endolithic algae: an alternative source of photoassimilates during coral bleaching. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1497), 1205-1210.
37. Ghirardelli, L. A. (2002). Endolithic microorganisms in live and dead thalli of coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta) in the northern Adriatic Sea. *Acta Geologica Hispanica*, 37(1), 53-60.
38. Golubic, S., Perkins, R. D., & Lukas, K. J. (1975). Boring microorganisms and microborings in carbonate substrates. In *The study of trace fossils* (pp. 229-259). Springer, Berlin, Heidelberg.
39. Golubic, S., Friedmann, E. I., & Schneider, J. (1981). The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *Journal of Sedimentary Research*, 51(2), 475-478.
40. Golubic, S., Campbell, S. E., Drobne, K., Cameron, B., Balsam, W. L., Cimerman, F., & Dubois, L. (1984). Microbial endoliths: a benthic overprint in the sedimentary record, and a paleobathymetric cross-reference with foraminifera. *Journal of Paleontology*, 351-361.

41. Grygier MJ, Newman WA. 1985. Motility and calcareous parts in extant and fossil Acrothoracica (Crustacea: Cirripedia), based primarily upon new species burrowing in the deep-sea coral *Enallopsammia*. *Transactions of the San Diego Society for Natural History* 21: 1–22.
42. Hancock A. 1849. Notice of the occurrence on the British coast of a burrowing barnacle belonging to a new order of the class Cirripedia. *Annals and Magazine of Natural History* 4: 305–314.
43. Heim, I., & Nickel, M. (2010). Description and molecular phylogeny of *Tethya leysae* sp. nov. (Porifera, Demospongiae, Hadromerida) from the Canadian Northeast Pacific with remarks on the use of microtomography in sponge taxonomy. *Zootaxa*, 2422(1), 1-21.
44. Hein, F. J., & Risk, M. J. (1975). Bioerosion of coral heads: inner patch reefs, Florida reef tract. *Bulletin of Marine Science*, 25(1), 133-138.
45. Higgs, N. D., Glover, A. G., Dahlgren, T. G., & Little, C. T. (2011). Bone-boring worms: characterizing the morphology, rate, and method of bioerosion by *Osedax mucofloris* (Annelida, Siboglinidae). *The Biological Bulletin*, 221(3), 307-316.

46. Hooper, J. N., & Van Soest, R. W. (2002). *Systema Porifera*. A guide to the classification of sponges. In *Systema Porifera* (pp. 1-7). Springer, Boston, MA.
47. Hooper, R. C., & Eichhorn, M. P. (2016). Too close for comfort: spatial patterns in acorn barnacle populations. *Population Ecology*, 58(2), 231-239.
48. Hutchings, P. A. (1986). Biological destruction of coral reefs. *Coral reefs*, 4(4), 239-252.
49. Hutchings, P. (2008). Role of polychaetes in bioerosion of coral substrates. In *Current developments in bioerosion* (pp. 249-264). Springer, Berlin, Heidelberg.
50. Hutchings, P. A. (2011). Bioerosion. *Encyclopedia of modern coral reefs-structure, form and processes*, 139-156.
51. Hutchings PA, Kiene WE, Cunningham RB, Donnelly C (1992) Experimental investigation of bioerosion at Lizard Island, Great Barrier Reef. Part 1. Patterns in the distribution and extent of non-colonial, boring communities. *Coral Reefs* 11:23-31.

52. Hutchings, P. A., & Peyrot-Clausade, M. (2002). The distribution and abundance of boring species of polychaetes and sipunculans in coral substrates in French Polynesia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269(1), 101-121.
53. Hutchings, P., Peyrot-Clausade, M., & Stuken, A. (2013). Internal macrobioerosion on five species of *Acropora* following the 1998 bleaching event: Implications for the long-term impact of bleaching on the Great Barrier Reef. *Pacific Conservation Biology*, 19(4), 409-417.
54. Kobluk, D. R., & Risk, M. J. (1977). Micritization and carbonate-grain binding by endolithic algae. *AAPG Bulletin*, 61(7), 1069-1082.
55. Kolbasov GA. 2009. *Acrothoracica, burrowing Crustaceans*. Moscow: KMK Scientific Press.
56. Le Campion-Alsumard Th., (1979).—Les cyanophycées endolithes marines. Systématique, ultrastructure, écologie et biodestruction. *Oceanologia Acta*, 2 (2): 143–156.
57. Le Campion-Alsumard, T., Golubic, S., & Hutchings, P. (1995a). Microbial endoliths in skeletons of live and dead corals: *Porites lobata* (Moorea, French Polynesia). *Marine Ecology Progress Series*, 149-157.

58. Le Campion-Alsumard, T., Golubic, S., & Priess, K. (1995b). Fungi in corals: symbiosis or disease? Interaction between polyps and fungi causes pearl-like skeleton biomineralization. *Marine Ecology Progress Series*, 137-147.
59. Lukas, K. J. (1974). Two Species of the Chlorophyte Genus *Ostreobium* from Skeletons of Atlantic and Caribbean Reef Corals 1, 2. *Journal of Phycology*, 10(3), 331-335.
60. Martin, J. W., & Davis, G. E. (2001). *An updated classification of the recent Crustacea* (Vol. 39, p. 129). Los Angeles: Natural History Museum of Los Angeles County.
61. Morales Pinzón, A., Orkisz, M., Rodríguez Useche, C. M., Torres González, J. S., Teillaud, S., Sánchez, J. A., & Hernández Hoyos, M. (2014). A semi-automatic method to extract canal pathways in 3D micro-CT images of octocorals. *PloS one*, 9(1), e85557.
62. Morrow, C., & Cárdenas, P. (2015). Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). *Frontiers in Zoology*, 12(1), 1-27.
63. Newman WA. (1971). A deep-sea burrowing barnacle (Cirripedia: Acrothoracica) from Bermuda. *Journal of Zoology* 165: 423–429.

64. Newman, W. A., & Ross, A. (1971). *Antarctic Cirripedia: Monographic Account Based on Specimens Collected Chiefly Under the United States Antarctic Research Program, 1962-1965* (Vol. 14). American geophysical union, 1-257.
65. Newman, W. A. (1974). Two new deep-sea Cirripedia (Ascothoracica and Acrothoracica) from the Atlantic. *Journal of the marine Biological Association of the United Kingdom*, 54(2), 437-456.
66. Pari, N., Peyrot-Clausade, M., & Hutchings, P. A. (2002). Bioerosion of experimental substrates on high islands and atoll lagoons (French Polynesia) during 5 years of exposure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 276(1-2), 109-127.
67. Pennafirme, S., Machado, A. S., Machado, A. C., Lopes, R. T., Lima, I. C., & Crapez, M. A. (2019). Monitoring bioturbation by a small marine polychaete using microcomputed tomography. *Micron*, 121, 77-83.
68. Pica, D., Bertolino, M., Calcinai, B., Puce, S., & Bavestrello, G. (2012). Boring and cryptic sponges in stylasterids (Cnidaria: Hydrozoa). *Italian Journal of Zoology*, 79(2), 266-272.

69. Perry, C. T. (1998). Grain susceptibility to the effects of microboring: implications for the preservation of skeletal carbonates. *Sedimentology*, 45(1), 39-51.
70. Perry, C. T., & Bertling, M. (2000). Spatial and temporal patterns of macroboring within Mesozoic and Cenozoic coral reef systems. *Geological Society, London, Special Publications*, 178(1), 33-50.
71. Pomponi, S. A. (1977). Excavation Of Calcium Carbonate Substrates By Boring Sponges: Ultrastructure And Cytochemistry. University of Miami.
72. Pomponi, S. A. (1979). Ultrastructure of cells associated with excavation of calcium carbonate substrates by boring sponges. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59(3), 777-790.
73. Pomponi, S. A. (1980). Cytological mechanisms of calcium carbonate excavation by boring sponges. In *International review of Cytology* (Vol. 65, pp. 301-319). Academic Press.

74. Radashevsky, V. I., & Migotto, A. E. (2017). First report of the polychaete *Polydora hoplura* (Annelida: Spionidae) from North and South America and Asian Pacific. *Marine Biodiversity*, 47(3), 859-868.
75. Radtke, G., Le Campion-Alsumard, T., & Golubic, S. (1997a). Microbial assemblages involved in tropical coastal bioerosion: an Atlantic-Pacific comparison. In *Proceedings of the 8th international coral reef symposium* (Vol. 2, pp. 1825-1830).
76. Radtke, G., Hofmann, K., & Golubic, S. (1997b). A bibliographic overview of micro-and macroscopic bioerosion. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, 201, 307-340.
77. Rützler, K. (2002). Family Clionaidae D'Orbigny, 1851. In *Systema Porifera* (pp. 173-185). Springer, Boston, MA.
78. Sato-Okoshi, W., Okoshi, K., & Shaw, J. (2008). Polydorid species (Polychaeta: Spionidae) in south-western Australian waters with special reference to *Polydora uncinata* and *Boccardia knoxi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(3), 491-501.
79. Schneider, J., Schröder, H. G., & Le Campion-Alsumard, T. (1983). Algal micro-reefs—coated grains from freshwater environments. In *Coated grains* (pp. 284-298). Springer, Berlin, Heidelberg.

80. Schönberg CHL, Wilkinson CR (2001) Induced colonization of corals by a clionid bioeroding sponge. *Coral Reefs* 20: 69–76.
81. Schönberg, C. H., & Shields, G. (2008). Micro-computed tomography for studies on *Entobia*: transparent substrate versus modern technology. In *Current Developments in Bioerosion* (pp. 147-164). Springer, Berlin, Heidelberg.
82. Schönberg, C. H., & Wisshak, M. (2014). Marine bioerosion. In *The Mediterranean Sea* (pp. 449-461). Springer, Dordrecht.
83. Schönberg, C. H., Fang, J. K. H., & Carballo, J. L. (2017). Bioeroding sponges and the future of coral reefs. In *Climate change, ocean acidification and sponges* (pp. 179-372). Springer, Cham.
84. Scrosati, R. A., & Freeman, M. J. (2019). Density of intertidal barnacles along their full elevational range of distribution conforms to the abundant-centre hypothesis. *PeerJ*, 7, e6719.
85. Silbiger, N. J., Guadayol, Ò., Thomas, F. I., & Donahue, M. J. (2014). Reefs shift from net accretion to net erosion along a natural environmental gradient. *Marine Ecology Progress Series*, 515, 33-44.
86. Silbiger, N. J., Guadayol, O., Thomas, F. I., & Donahue, M. J. (2016). A novel μ CT analysis reveals different responses of bioerosion and

- secondary accretion to environmental variability. *PloS one*, *11*(4), e0153058.
87. Simon, C. A., & Sato-Okoshi, W. (2015). *Polydoridae* polychaetes on farmed molluscs: distribution, spread and factors contributing to their success. *Aquaculture Environment Interactions*, *7*(2), 147-166.
88. Tribollet, A. (2008). Dissolution of dead corals by euendolithic microorganisms across the northern Great Barrier Reef (Australia). *Microbial Ecology*, *55*(4), 569-580.
89. Tribollet, A., & Payri, C. (2001). Bioerosion of the coralline alga *Hydrolithon onkodes* by microborers in the coral reefs of Moorea, French Polynesia. *Oceanologica acta*, *24*(4), 329-342.
90. Tribollet, A., & Golubic, S. (2005). Cross-shelf differences in the pattern and pace of bioerosion of experimental carbonate substrates exposed for 3 years on the northern Great Barrier Reef, Australia. *Coral reefs*, *24*(3), 422-434.
91. Tribollet, A., Decherf, G., Hutchings, P., & Peyrot-Clausade, M. (2002). Large-scale spatial variability in bioerosion of experimental coral substrates on the Great Barrier Reef (Australia): importance of microborers. *Coral reefs*, *21*(4), 424-432.

92. Tudhope, A. W., & Risk, M. J. (1985). Rate of dissolution of carbonate sediments by microboring organisms, Davies Reef, Australia. *Journal of Sedimentary Research*, 55(3), 440-447.
93. Tunnicliffe, V. (1981). Breakage and propagation of the stony coral *Acropora cervicornis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(4), 2427-2431.
94. Tunnicliffe, V., 1982. The role of boring sponges in coral fracture. *Coll. International C.N.R.S.* 291:309-315.
95. Vacelet, J. (1999). Sponges (Porifera) in submarine caves (pp. 1-9).
96. Walker, L. M. (2011). A review of the current status of the *Polydora*-complex (Polychaeta: Spionidae) in Australia and a checklist of recorded species. *Zootaxa*, 2751(1), 40-62.
97. Wisshak, M. (2006). *High-latitude bioerosion: the Kosterfjord experiment* (Vol. 109). Springer.
98. Wisshak, M., & Tapanila, L. (Eds.). (2008). *Current developments in bioerosion*. Springer Science & Business Media.
99. Wisshak, M., Gektidis, M., Freiwald, A., & Lundälv, T. (2005). Bioerosion along a bathymetric gradient in a cold-temperate setting

- (Kosterfjord, SW Sweden): an experimental study. *Facies*, 51(1-4), 93-117.
100. Wisshak, M., Tribollet, A., Golubic, S., Jakobsen, J., & Freiwald, A. (2011). Temperate bioerosion: ichnodiversity and biodiversity from intertidal to bathyal depths (Azores). *Geobiology*, 9(6), 492-520.
101. Zilberberg C., M Maldonado, AM Sole'-Cava Assessment of the relative contribution of asexual propagation in a population of the coral-excavating sponge *Cliona delitrix* from the Bahamas. *Coral Reefs* (2006) 25: 297–301.
102. Zundevich, A., Lazar, B., & Ilan, M. (2007). Chemical versus mechanical bioerosion of coral reefs by boring sponges-lessons from *Pione cf. vastifica*. *Journal of experimental biology*, 210(1), 91-96.
103. <http://www.biologiamarina.eu/Spugne%20perforanti.html>
104. <http://www.prionace.it/lespugneperforanti.htm> : Le spugne perforanti di Marco Angelozzi.
105. <https://scoiattolorampante.files.wordpress.com/2011/09/11-porifera-parte-sistematica.pdf> Dott. Giuseppe Mazza.