

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Tecniche innovative microbiome-based per il recupero  
della vongola comune nelle aree ad alta mortalità nell'area  
FLAG dell'Emilia-Romagna**

Tesi di Laurea Magistrale in Microbiologia

Relatore

Prof. Marco Candela



Correlatore

Dott.ssa Giulia Trapella

Presentata da

Claudia Mininni

Sessione Unica Anno Accademico  
2021-2022

## RIASSUNTO

Negli ultimi decenni sono state registrate preoccupanti fenomeni di mortalità della vongola *Chamelea gallina*, in particolare nell'area costiera emiliano-romagnola di cui non sono ancora state chiarite le cause. Il presente studio si è occupato di caratterizzare la comunità microbica associata alla vongola nella ghiandola digestiva, utilizzando il sequenziamento della regione ipervariabile V3-V4 del gene rRNA 16S, al fine di individuare fenomeni di disbiosi in aree ad elevata mortalità. Sono state quindi esplorate le variazioni stagionali (da luglio a novembre) nella struttura del microbiota della vongola e nell'ecosistema microbico dell'acqua di mare circostante, in quattro siti scelti ad hoc, secondo un gradiente di incidenza storica di mortalità, da nord a sud, tra le aree di Ravenna e Rimini. Lo stato di salute della vongola e del suo microbiota associato sono stati esplorati tramite, rispettivamente, l'indice di condizione e lo studio mediante NGS della composizione dell'ecosistema microbico intestinale. I nostri dati, sebbene preliminari, dimostrano come tra le aree nord e sud ci sia un comportamento differente e reciproco relativamente all'andamento stagionale dei valori di diversità interna (alfa) al microbiota della vongola, che si riduce dall'estate all'autunno nelle aree Nord (Ravenna e Lido di Savio), mentre aumenta nelle aree Sud (Rimini e Cesenatico). A conferma dei dati di alfa diversità, l'analisi mediante PCoA della variazione del microbiota della vongola tra i quattro siti di indagine stratificate per stagione, dimostrano profonde differenze tra i due estremi nord-sud. In particolare, l'analisi integrata dei dati storici di produttività, indice di condizione e dinamica del microbiota della ghiandola digestiva ci ha consentito di discriminare le famiglie *Pseudomonadaceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lactobacillaceae* come protettive e promotrici della crescita dell'animale, poiché associate ad un picco di indice di condizione che si registra nelle aree a bassa mortalità, nel mese di settembre.

# Sommario

Sommario .....	3
1 Introduzione .....	4
1.1 Il microbiota dei bivalvi nel contesto dei cambiamenti climatici globali.....	4
1.2 Cause di mortalità di <i>Chamelea gallina</i> .....	6
1.2.1 Biologia di <i>Chamelea gallina</i> .....	6
1.2.2 Fattori antropici e climate change che hanno un effetto sulla mortalità di <i>Chamelea gallina</i> .....	7
1.2.3 Mortalità di massa ed impatto sulla pesca.....	8
1.3 Scopo dello studio .....	11
2 Materiali e metodi .....	13
2.1 Siti di campionamento e raccolta campioni.....	13
2.2 Parametri morfometrici .....	14
2.3 Analisi della composizione del microbiota .....	14
2.3.1 Estrazione del DNA.....	15
2.3.2 Quantificazione DNA, PCR e controllo elettroforesi .....	15
2.3.3 Purificazione DNA.....	16
2.3.4 Preparazione Library e sequenziamento.....	16
2.4 Analisi bioinformatiche .....	17
2.5 Analisi statistiche .....	17
3 Risultati .....	19
3.1 Parametri biotici e abiotici .....	19
3.2 Composizione del microbiota di <i>Chamelea gallina</i> .....	21
3.3 Variazione del microbiota della vongola in risposta alla stagionalità nei siti.....	26
3.4 Sito specificità del microbiota della vongola stratificata per stagioni.....	34
4 Discussione .....	41
5 Conclusioni.....	44
Bibliografia.....	45
Sitografia .....	50

# 1 Introduzione

## 1.1 Il microbiota dei bivalvi nel contesto dei cambiamenti climatici globali

Le attività umane e i loro effetti sul clima e sull'ambiente causano estinzioni animali e vegetali senza precedenti. Negli ultimi decenni è aumentata sensibilmente l'attenzione verso fenomeni periodici di morie di massa degli animali marini (Carpenter, 1990; Diaz & Rosenberg, 2011; Milan et al., 2023). Per anni l'obiettivo della comunità scientifica e delle istituzioni è stato quello di individuare con precisione quali siano le cause scatenanti di questi eventi in forte crescita. Gli effetti dei cambiamenti climatici e l'impatto antropico sono sicuramente la principale causa delle modifiche all'ambiente marino (Giorgi & Lionello, 2008; Mohanty et al., 2010). Il riscaldamento degli oceani colpisce gli organismi marini a più livelli trofici, i forti stress dovuti alle variazioni climatiche hanno implicazioni sulla distribuzione ed abbondanza delle popolazioni e rendono gli organismi più suscettibili a parassiti e malattie infettive (Milan et al., 2019; Poulin, 2006).

Partendo dallo studio della comunità microbica associata ad un organismo, è possibile comprendere come gli organismi possano rispondere ai fenomeni legati ai cambiamenti climatici antropogenici. Il microbiota è l'insieme di batteri, virus e funghi che vivono all'interno di un organismo ospite, nel quale svolgono importanti funzioni metaboliche (Blaser, 2014). Queste comunità microbiche associate all'ospite vivono sulle superfici di diversi tessuti e possono risiedere sia a livello intercellulare sia intracellulare (Kostic et al., 2013). Le comunità microbiche associate all'ospite sono dinamiche, cambiano durante la vita dell'ospite, non sono attori passivi, ma si impegnano attivamente nello sviluppo, nel metabolismo, nell'immunità e nella salute dell'ospite (Deines & Bosch, 2016). La comunità microbica associata all'apparato digerente è responsabile dell'efficienza digestiva di fonti alimentari complesse (Rowland et al., 2017) e nella produzione di nuovi enzimi, che l'organismo ospite non è in grado di produrre (Pierce & Ward, 2018).

Studiare come rispondo gli organismi in un ecosistema soggetto a mutamenti repentini, ci permette di valutare e prevedere il loro stato di salute, sia per quanto riguarda gli organismi selvatici, sia quelli di allevamento (Matozzo et al., 2012). Poiché quasi tutti gli organismi vivono come un metaorganismo olobionte, la comprensione delle associazioni tra organismo ospite e le comunità ad esso associate, attraverso le moderne tecniche di

indagini basate sul sequenziamento molecolare, stanno diventando la nuova frontiera della zoologia (Bosch & McFall-Ngai, 2011).

Grazie a queste tecnologie di indagine, basate sul sequenziamento molecolare, ora è possibile poter studiare il microbiota associato agli olobionti, come componente fondamentale, per la comprensione delle dinamiche che coesistono all'interno degli organismi e l'ambiente con il quale interagiscono (Gootenberg & Turnbaugh, 2011; McFall-Ngai et al., 2013).

Numerosi studi scientifici si sono occupati di studiare il microbioma dei bivalvi, destinati al consumo umano, in relazione ad un potenziale rischio per la nostra salute (Lattos et al., 2021), mentre risultano ancora poco conosciuti i fenomeni d'interazione tra il microbioma e l'ospite.

I molluschi bivalvi, componenti importanti degli ecosistemi marini costieri, sono a rischio poiché fanno parte di ambienti soggetti ad ampie variazioni di salinità e temperatura, aggravate dagli effetti dei cambiamenti climatici e dall'impatto antropico causati da inquinamento e pesca (Matozzo et al., 2012).

La composizione del microbiota all'interno dell'organismo differisce in base al tessuto e all'organo che lo ospita; il microbiota dei bivalvi appartenente a branchie ed intestino (tessuti più esposti all'ambiente esterno) risultano essere maggiormente influenzati dalle variazioni dell'habitat (Meisterhans et al., 2015). Le influenze ambientali nei bivalvi potrebbero includere fattori come salinità, temperatura, DOM (materiale organico disciolto) e tipo di sedimento. I fattori di stress antropogenico possono includere metalli pesanti, nutrienti in eccesso dall'agricoltura, antibiotici e microplastiche (Pierce & Ward, 2018). Infatti, i bivalvi, grazie alla loro efficiente attività di filtrazione dell'acqua, vengono spesso utilizzati come bioindicatori di qualità dell'acqua e dei sedimenti, nei quali vivono (Mathai et al., 2020).

## 1.2 Cause di mortalità di *Chamelea gallina*

### 1.2.1 Biologia di *Chamelea gallina*

Il mollusco filtratore *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758), un bivalve della famiglia Veneridae (Bivalvia: Lamellibranchiata: Veneridae), di grande interesse dal punto di vista commerciale, la cui distribuzione comprende tutto il Mediterraneo e il Mar Nero (Moschino & Marin, 2006), abita fondali sabbiosi della zona infralitorale e circalitorale (Frogia, 1987) fino a profondità di circa 15 m (Morello et al., 2005). In Italia questa specie la possiamo trovare nell'Adriatico a partire dal litorale di Trieste fino a Barletta-Molfetta, oltre che in alcune aree del Tirreno, limitate nelle coste laziali e campane (Piano di Gestione Nazionale Rigetti per la risorsa Vongola *Chamelea gallina* ART. 15 EU REG. 1380/2013). Si tratta di un tipico esempio di filtratore infunale microfago. Questa vongola occupa una nicchia ecologica ben definita nel Mare Adriatico, determinata da precise condizioni chimico-fisiche sia dell'acqua che del sedimento (es. granulometria, contenuto di ossigeno e potenziale redox).

Un ruolo fondamentale nella distribuzione di *Chamelea gallina* è legato all'andamento delle correnti, che influenzano lo spostamento delle larve planctoniche, oltre alla presenza di fondali sabbiosi e fango-sabbiosi che ne determinano la possibilità di insediamento e crescita delle larve. Questa specie predilige habitat soggetti a limitate variazioni dei parametri ambientali ed ecologici (temperatura, salinità, ossigeno disciolto, idrologia, natura del substrato, trofismo, competizione inter ed intraspecifica, etc) (Barillari et al., 1979, Brooks et al., 1991). Il ciclo biologico è sensibilmente influenzato dalle condizioni ambientali, in particolare dalla temperatura per cui si possono registrare ampie differenze nel periodo di deposizione nelle diverse aree geografiche (Barillari et al., 1979, Frogia, 1975)

La vongola *Chamelea gallina* ha un tipo di alimentazione che la rende molto sensibile agli effetti dei sedimenti in sospensione. Infatti, le branchie che oltre ad avere funzione respiratoria, fungono anche da filtro per la cattura delle particelle organiche nutritive in sospensione (Grazioli et al., 2022). Le particelle di sedimento, assunte con la dieta, si accumulano nella regione posteriore e vengono poi espulse per contrazione dei muscoli adduttori sotto forma di pseudofeci. Queste particelle inorganiche possono avere un effetto dannoso, in quanto sono responsabili dell'abrasione meccanica delle branchie e

rendono l'organismo più suscettibile allo stress e alle malattie, con conseguente perdita di crescita dovuta a cambiamenti nella dieta (Grazioli et al., 2022).

### 1.2.2 Fattori antropici e climate change che hanno un effetto sulla mortalità di *Chamelea gallina*

La vongola *Chamelea gallina* risulta essere più sensibile e meno tollerante alle variazioni ambientali rispetto ad altri bivalvi, tuttavia, vive in ambienti di transizione fortemente dinamici e complessi. Il suo habitat, come tutti gli ambienti di transizione sono caratterizzati da gradienti di salinità e nutrienti che dipendono da apporti fluviali, condizioni meteorologiche ed antropizzazione delle coste. Nel Mar Mediterraneo, i cambiamenti climatici hanno provocato una generale meridionalizzazione del clima e mutamenti ambientali, riguardanti salinità ed ossigenazione, provocando variazioni significative del bilancio idrologico e modificazioni profonde degli habitat costieri (Tagliapietra et al., 2014).

Gli equilibri delicati di questi ambienti sono ulteriormente compromessi dall'uso intensivo del territorio determinato dall'estesa urbanizzazione, dalla presenza di opere costiere (moli e barriere), dallo sviluppo intensivo dell'agricoltura, ma anche, dalla diminuzione dell'apporto di sedimento da parte dei fiumi e l'aumento dei tassi di subsidenza. Questi fattori hanno fortemente accentuato la vulnerabilità della costa emiliano-romagnola determinando un aumento dei processi erosivi (Caratteristiche Della Costa — Arpae Emilia-Romagna).

Molteplici fattori sono coinvolti nella mortalità di massa delle vongole sia di natura direttamente antropica, sia dovuti ai cambiamenti climatici.

Le alterazioni della temperatura dell'acqua e della salinità (Ezgeta-Balić et al., 2011; Matozzo et al., 2012; Monari et al., 2011 ), l'incremento delle fioriture di fitoplancton estive (Romanelli et al., 2009) che riducono la concentrazione di ossigeno disciolto e nel fondo causano stress anossici (Matozzo et al., 2012) l' aumento della concentrazione dei patogeni in mare che causano l'insorgenza di malattie infettive in mare (Beaz Hidalgo et al., 2008; Milan, Matozzo, et al., 2016; Milan, Palazzo, et al., 2016) sono tutti disturbi attribuibili ai CC che causano forti stress alla vongola *Chamelea gallina* e possono contribuire ai fenomeni di mortalità crescenti. Gli eventi anossici, nei bivalvi, sono estremamente deleteri. Nel caso della vongola *C. gallina*, questi influiscono sul sistema immunitario inducendo

una riduzione della risposta degli emociti, i quali sono coinvolti nella riparazione delle ferite e del guscio, la digestione e il trasporto dei nutrienti (Matozzo et al., 2012). Inoltre, qualora questi eventi dovessero verificarsi durante il periodo riproduttivo, la deposizione delle uova può essere indotta come risposta rapida e generale alla rinnovata disponibilità di ossigeno nell'acqua di fondo, aggiungendo così un forte stress endogeno allo stress esogeno precedentemente sperimentato. In queste condizioni, le risposte immunitarie sono ulteriormente ridotte, aumentando la suscettibilità degli animali ai patogeni (Monari et al., 2005).

Le elevate emissioni di CO<sub>2</sub> prodotte dall'attività antropica sono responsabili dell'acidificazione delle acque che esercita un effetto negativo sulla crescita di *C. gallina* ed è, a sua volta, responsabile della riduzione dello spessore della conchiglia (Bressan et al., 2014).

Le alterazioni del pattern termico comportano in *C. gallina* un avvio anticipato della gametogenesi in autunno, causando un ulteriore investimento di energie prima di aver recuperato le condizioni di stress pregresso legate allo sforzo riproduttivo e alle elevate temperature del periodo estivo. Questo causa una minor quantità e qualità dei gameti ed una compromissione della sopravvivenza degli adulti (Rizzo et al., 2011).

I fattori antropici che possono contribuire all'aumento dei fenomeni di mortalità di *C. gallina* sono l'inquinamento (Visciano et al., 2015), il danneggiamento delle conchiglie causate dalle draghe idrauliche impiegate nella pesca dei mitili (Moschino et al., 2003), l'overfishing (Romanelli et al., 2009) la presenza di xenobiotici (Monari et al., 2011).

Tutti questi aspetti e il pesante sforzo di pesca subito da questa specie di vongole a partire dagli anni '80 devono essere presi in considerazione per spiegare la drammatica diminuzione della densità di popolazione e gli eventi di mortalità ripetutamente verificatisi a partire dagli anni '90 (Ministero delle Politiche Agricole, 1998). La variabilità spaziale e temporale (generalmente dalla fine dell'estate all'autunno) osservata nell'epidemia di mortalità indica complesse interazioni di fattori ambientali (salinità, pH, temperatura, ossigenazione ed acidificazione dell'acqua) ed endogeni (accrescimento della conchiglia, produzione di gameti, attività metaboliche).

### 1.2.3 Mortalità di massa ed impatto sulla pesca

Negli ultimi 20 anni il settore della pesca dei molluschi ha subito una crisi estrema causata da fenomeni locali di mortalità, anche massiva, sia cronica che occasionale (Grazioli et al.,

2022). In Italia è stata la prima attività di pesca ad essere controllata attraverso licenze, il cui numero era stato fissato a livello nazionale per mantenere pressoché invariata la flotta e lo sforzo di pesca, ma il numero di pescherecci autorizzati è addirittura aumentato nel corso degli anni '80 e miglioramenti tecnici degli attrezzi da pesca hanno permesso alle barche di spazzare aree di mare più grandi per unità di tempo. Questo spiega perché siano state ricercate varie misure per ridurre la pressione di pesca sui banchi di vongole come il ritiro dei pescherecci, l'imposizione di periodi di chiusura, maggiori spazi aperti nei setacci. Una riduzione limitata della flotta è stata perseguita alla fine degli anni '90 dopo la grande mortalità. Questi eventi sono stati registrati tra la fine dell'estate e l'inizio dell'autunno del 1996(Romanelli et al., 2009).

Non è raro riscontrare per questa specie *C. gallina* importanti fenomeni di moria che in diverse occasioni hanno determinato periodi di crisi per il settore ittico coinvolto, spesso causati da modificazioni repentine dell'habitat costiero in cui vivono: repentine variazioni di temperatura, salinità, pH e di ossigeno disciolto; nonché la presenza di inquinamenti persistenti e non (Qualità ambientale delle acque marine in Emilia-Romagna Rapporto annuale 2018)

In Emilia-Romagna l'andamento annuale degli sbarcati (quantità di pescato) totali, registrato dal Ministero delle politiche agricole alimentari, forestali e del turismo, mostra un aumento a partire dal 2016 ed un successivo assestamento intorno ai 25,000 quintali (Figura 1). L'aumento si è registrato soprattutto nel compartimento di Rimini. Mentre il compartimento di Ravenna non ha mostrato aumenti significativi negli ultimi anni.

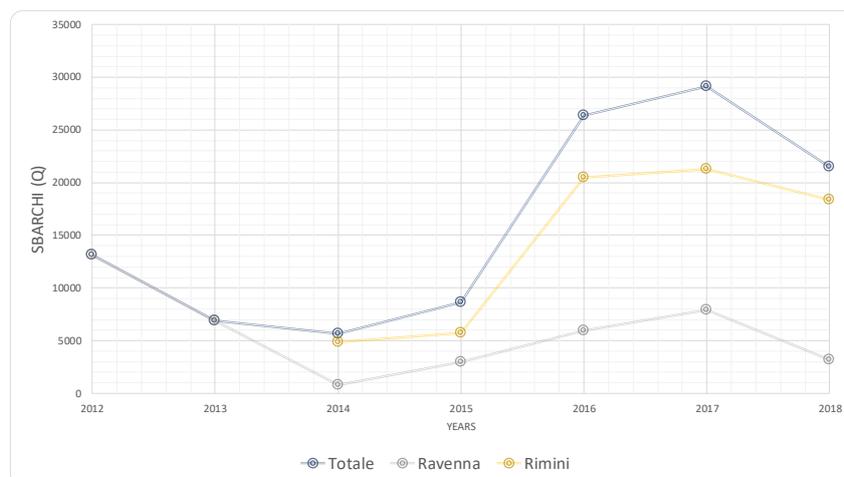


Figura 1 - Produzione annuale (q) dei Consorzi romagnoli tra il 2012 e il 2018. Fonte immagine Masaf - Piano Di Gestione Nazionale per Le Attività Di Pesca Con Il Sistema Draghe Idrauliche e Rastrelli Da Natante., 2019

Il decremento osservato nel 2018 è principalmente imputabile al forte evento di moria verificatosi nel settembre 2018.

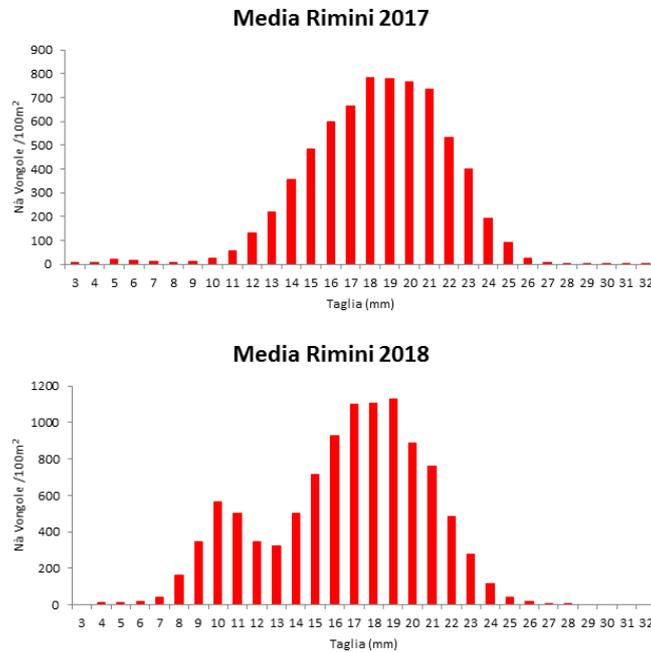


Figura 2 - Distribuzioni di frequenza standardizzate (N° individui/100m<sup>2</sup>) degli individui catturati con il retino campionario nel Compartimento di Ravenna nel 2017 e 2018. Fonte immagine Masaf - Piano Di Gestione Nazionale per Le Attività Di Pesca Con Il Sistema Draghe Idrauliche e Rastrelli Da Natante., 2019

Negli ultimi anni è stata osservata una netta diminuzione in termini di densità di popolamenti, associata ad una riduzione del numero di vongole di lunghezza superiore a 25 mm sebbene la lunghezza massima registrata per questa specie sia di circa 50 mm (Froglià, 1989).

Nel caso del compartimento di Rimini i dati sulla composizione per taglia, ottenuti con il retino campionario, sono riportati nelle Figura 2.

Risulta evidente come le vongole di taglia commerciale rappresentino una frazione modesta della popolazione e come per l'accrescimento mensile di 1-2 mm vi è una parte consistente della popolazione che raggiungerà la taglia commerciale nel corso dell'anno. I dati per il compartimento di Ravenna sulla composizione media per taglia della popolazione a mare, ottenuti con il retino campionario, sono riportati nella Figura 3.

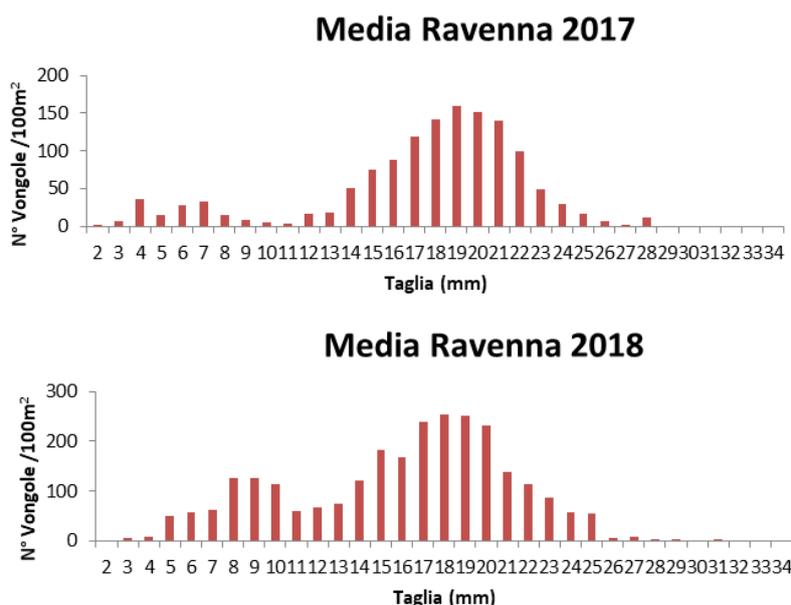


Figura 3 - Distribuzioni di frequenza standardizzate (N° individui/100m2) degli individui catturati con il retino campionario nel Compartimento di Rimini nel 2017 e 2018. Fonte immagine Masaf - Piano Di Gestione Nazionale per Le Attività Di Pesca Con Il Sistema Draghe Idrauliche e Rastrelli Da Natante., 2019

Le distribuzioni di taglia tra i due survey non mostrano differenze significative, tranne per il fatto che nel 2018 le densità sono risultate essere superiori rispetto al 2017. Inoltre, è evidente come le classi dimensionali superiori ai 25 mm siano quasi completamente assenti in entrambi gli anni. (Masaf - Piano Di Gestione Nazionale per Le Attività Di Pesca Con Il Sistema Draghe Idrauliche e Rastrelli Da Natante., 2019)

### 1.3 Scopo dello studio

La zona di studio è situata all'interno del bacino settentrionale dell'Adriatico, nella costa emiliano-romagnola a sud del delta del Po ed è caratterizzata prevalentemente da una spiaggia bassa e sabbiosa, quasi continua. Questo studio si è sviluppato all'interno del progetto "Diversificazione dei prodotti ittici e delle attività della pesca" FLAG dell'Emilia-Romagna. L'area dedicata a questo progetto comprende tutta la fascia costiera della Regione Emilia-Romagna, per complessivi 130 km (da Goro a Cattolica), dove la pesca e l'allevamento ittico lagunare hanno una tradizione secolare. Le tecniche di pesca maggiormente praticate sono la pesca a strascico, con volante, draga idraulica e con attrezzi da posta. L'attività dell'acquacoltura e della maricoltura sono rilevanti, con due attività prevalenti: l'allevamento su fondali lagunari di vongola verace e l'allevamento in sospensione in mare di mitili (Caratteristiche Della Costa — Arpae Emilia-Romagna).

Negli ultimi anni, la produzione di vongola comune (*Chamelea gallina*) in area FLAG è minacciata da frequenti eventi di mortalità. Ad oggi non sono note le cause di questo fenomeno e non esistono soluzioni. In questo contesto, il progetto si pone come obiettivo quello di analizzare le dinamiche degli ecosistemi microbici (microbioti) nell'interazione tra vongola, acqua e sedimento, per sviluppare un approccio innovativo per risolvere le cause della attuale mortalità, arrivando all'identificazione di nuove strategie di gestione e produzione, al fine di tutelare la specie autoctona recuperando gli standard di produttività. I microbioti dei mitili e la loro interazione con gli ecosistemi microbici di acqua e sedimento sono attori chiave coinvolti in diversi aspetti legati alla produttività.

Alterazioni disbiotiche di queste dinamiche di interazione possono infatti contribuire all'insorgenza di patologie, compromettendo crescita e produzione. In questo contesto, l'ipotesi di questo studio è che i fenomeni di mortalità della vongola comune possano essere dovuti proprio a tali alterazioni disbiotiche che, arrivando a coinvolgere il microbiota della vongola, ne comprometterebbero lo stato di salute. Studiando le dinamiche che portano ad alterazioni disbiotiche del microbiota della vongola e gli elementi da cui derivano e quindi possibile scoprire non solo le cause organiche alla base del fenomeno di mortalità, ma anche identificare i fattori biotici e abiotici scatenanti, definendo linee guida per il controllo precoce del rischio di mortalità e nuovi processi che basati su strategie di intervento con biopromotori consentano il mantenimento di un assetto promotore della salute del microbiota della vongola.

## 2 Materiali e metodi

Lo stato di salute di *Chamelea gallina* e la sua produttività lungo la costa emiliano romagnola è stato indagato attraverso un approccio integrato di analisi della composizione del microbiota e analisi morfologiche nel contesto delle diverse variabili ambientali biotiche ed abiotiche che caratterizzano i diversi siti. In particolare, per l'analisi del microbiota, è stato estratto il DNA microbico totale. Sono stati misurati parametri morfometrici quali: peso totale, peso dei tessuti duri (conchiglia), lunghezza e larghezza della conchiglia, per poter calcolare l'indice di condizione. I metadati ambientali di pH, temperatura e salinità, sono stati acquisiti dal sito dell'ARPA.

### 2.1 Siti di campionamento e raccolta campioni

I siti per la raccolta dei campioni sono stati identificati in quattro siti produttivi, ad alta, intermedia e bassa mortalità, basati sui dati di produttività nell'area FLAG nel periodo 2019/2020. I siti scelti si trovano in prossimità delle località di Ravenna, Lido di Savio, Cesenatico e Rimini. Per ciascun sito di campionamento sono state prelevate 50 vongole, sedimenti (50mL) e acqua (2L) nei tre punti temporali (luglio, settembre, novembre) nel corso della stagione di pesca (iniziale, intermedia e tardiva) (Tabella 1). Il campionamento è stato effettuato a bordo del moto peschereccio Asterix. Le vongole sono state prelevate tramite draghe idrauliche, mentre i sedimenti e l'acqua sono stati prelevati rispettivamente tramite benna e Niskin bottle.

Disegno di campionamento			Ravenna	Lido di Savio	Cesenatico	Rimini
Tipologia di campione	Vongola	Luglio	50 (14)	50 (14)	50 (14)	50 (14)
		Settembre	50 (14)	50 (14)	50 (14)	50 (14)
		Novembre	54 (18)	54 (18)	54 (18)	54 (18)
	Acqua	Luglio	2L (1)	2L (1)	2L (1)	2L (1)
		Settembre	2L (1)	2L (1)	2L (1)	2L (1)
		Novembre	2L (1)	2L (1)	2L (1)	2L (1)
	Sedimenti	Luglio	50 mL(1)	50 mL(1)	50 mL(1)	50 mL(1)
		Settembre	50 mL(1)	50 mL(1)	50 mL(1)	50 mL(1)
		Novembre	50 mL(1)	50 mL(1)	50 mL(1)	50 mL(1)

Tabella 1 - In questa tabella sono stati riassunti il quantitativo di campioni raccolti per ciascun tipo (vongole, acqua e sedimenti) in ciascun evento di campionamento incrociando il fattore siti (Ravenna, Lido di Savio,

*Cesenatico, Rimini) ed il fattore mesi (luglio, settembre, novembre). I numeri riportati tra parentesi sono il numero di repliche previste per ciascun trattamento.*

## 2.2 Parametri morfometrici

I dati morfologici di lunghezza, larghezza della conchiglia sono stati raccolti per 20 vongole per i quattro siti e per i tre periodi di raccolta. La taglia dei campioni è stata misurata mediante un calibro (sensibilità di  $\pm 0.05$  mm). Le vongole sono state sezionate avendo cura di preservare i tessuti molli e quelli duri, e facendo fuoriuscire l'acqua intrappolata nelle valve. La vongola comprensiva di entrambi i tessuti (molli e duri) e la conchiglia sono state pesate separatamente utilizzando una bilancia di precisione (SAUTER Re 2012 Precision Electronic Weighing Scales, METTLER TOLEDO Instruments). Per valutare lo stato di benessere delle specie all'interno della popolazione è stato utilizzato l'indice di condizione di Mann & Glomb (1978) che tiene conto del peso del tessuto molle fresco e del peso della conchiglia.

$$CI = \frac{\text{soft tissue fresh weight (g)}}{\text{shell dry weight (g)}} \times 100$$

Questo indicatore permette di avere un'indicazione su tasso di accrescimento secondo l'interazione con l'ambiente in cui vivono i bivalvi.

L'indice di condizione calcolato sui 20 campioni di vongole per ciascun evento di campionamento sono stati messi a confronto. L'omogeneità delle varianze è stata testata tramite il test di Levene, mentre la varianza è stata analizzata con il test ANOVA con un valore di significatività p-value <0,05. Il test di Tukey è stato impiegato per valutare la significatività delle differenze tra i siti.

## 2.3 Analisi della composizione del microbiota

I campioni sono stati trasportati in laboratorio in vasche refrigerate, dove è stata prelevata la ghiandola digestiva utile per l'estrazione di DNA microbico rappresentativo del microbiota associato all'organismo. Al fine di ottenere un quantitativo sufficiente di

DNA da analizzare, a seguito delle prime analisi, si è ritenuto opportuno unire in un'unica replica tre ghiandole provenienti dello stesso evento di campionamento, per un totale di 14-18 repliche per ciascun campionamento. I campioni di acqua, 2L per ciascun campionamento, sono stati filtrati tramite pompa a vuoto per l'analisi del DNA ambientale. I campioni di acqua di mare (2 L) sono stati filtrati su filtri a membrana di nitrato di cellulosa da 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius,  $\varnothing$  47 mm) e conservati a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino al trattamento; l'intera membrana filtrante è stata utilizzata per l'estrazione del DNA.

### 2.3.1 Estrazione del DNA

Il DNA totale presente all'interno dei campioni di vongole e all'interno dei sedimenti è stato estratto tramite il kit DNeasy PowerSoil (Qiagen, Hilden, Germania), in accordo con precedenti studi condotti sulla stessa tipologia di campioni (Musella et al., 2020; Palladino et al., 2022). I campioni sono stati omogeneizzati utilizzando lo strumento FastPrep (MP Biomedicals, Irvine, CA) ed eseguendo il 5.5 movimenti al secondo per un ciclo di 60 secondi per 3 volte.

La fase di eluizione è stata preceduta da un'incubazione delle colonne per 5 minuti a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  prima della centrifugazione. I campioni di DNA sono stati conservati a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per la successiva elaborazione. Il DNA totale dei campioni di acqua (dai filtri di nitrato cellulosa) è stato estratto dai filtri a membrana utilizzando il kit DNeasy PowerWater (Qiagen, Hilden, Germania) secondo il protocollo del produttore.

### 2.3.2 Quantificazione DNA, PCR e controllo elettroforesi

I campioni di DNA estratti sono stati quantificati con NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) e conservati a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mediante l'analisi spettrofotometrica si è determinato, a livello qualitativo, come è avvenuta l'estrazione in modo tale da poter definire la concentrazione di DNA presente in ogni campione. Il rapporto tra i valori di assorbanza a 260 e 280 ha permesso di valutare il grado di contaminazione del DNA da parte delle componenti proteiche, poiché il grado di assorbanza degli amminoacidi è 280 nm. Gli acidi nucleici di buona qualità producono un rapporto di 260/280 con un livello di purezza compreso tra 1,80 e 2. Infine, oltre a valutare il grado di purezza, questa indagine è stata utile per poter effettuare le opportune diluizioni del DNA per ottenere una concentrazione di DNA di  $5\text{ ng}/\mu\text{L}$  che verranno amplificate tramite PCR.

Il rapporto 260/230 invece ha permesso di identificare il grado di contaminazione del campione con ioni fenolato e altri composti organici: il rapporto delle assorbanze a 260/230 deve essere compreso tra 2 e 2,2.

La regione ipervariabile V3-V4 del gene rRNA 16S è stata amplificata mediante PCR utilizzando i primer 341F e 785R che presentano specifiche sequenze di sporgenza dell'adattatore Illumina, come precedentemente descritto da Barone et al., 2019. Il programma PCR utilizzato è il seguente: 95 °C per 3 min per denaturazione iniziale, quindi 30 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 s, annealing 55 °C per 30 s e allungamento a 72 °C per 30 s, e 5 min a 72 °C per l'allungamento finale.

Per valutare a livello qualitativo i risultati dell'amplificazione tramite PCR è stata effettuata l'elettroforesi su gel di agarosio 1%.

### 2.3.3 Purificazione DNA

Attraverso il kit commerciale Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA) sono state purificate le reazioni PCR, che impiega particelle magnetiche che agiscono come fase solida attorno alla quale si lega l'acido nucleico. In seguito, si è utilizzata una piastra magnetica che attira e trattiene le biglie caricate con il DNA sul fondo della colonna. Questo passaggio permette un'agevole aspirazione del surnatante contenente i contaminanti da scartare. Le biglie sono state sottoposte a vari lavaggi rapidi per eliminare ulteriori contaminanti e sali. Infine, il magnete è stato allontanato e l'acido nucleico è stato eluito con acqua e soluzioni tamponate (tris-EDTA), per essere purificato e separato dalle sfere che restano all'interno della colonnina.

### 2.3.4 Preparazione Library e sequenziamento

Le librerie indicizzate sono state preparate mediante PCR a ciclo limitato, utilizzando la tecnologia Nextera (Illumina, San Diego, CA).

Le librerie sono state quindi quantificate utilizzando un fluorimetro Qubit 3.0 (Invitrogen, Waltham, MA, Stati Uniti), normalizzate a 4 nM e raggruppate. Il pool di campioni è stato denaturato con NaOH (0,2 N) e diluito a una concentrazione finale di 6pM con un PhiX al 20%. Il sequenziamento è stato eseguito su una piattaforma Illumina MiSeq utilizzando un protocollo paired-end 2 × 250 bp, secondo le istruzioni del produttore (Illumina, San Diego, CA, USA) in accordo con il protocollo effettuato da (Palladino et al., 2021).

Il sequenziamento dei campioni dei sedimenti non ha prodotto dati sufficienti per l'analisi, a causa di un numero di sequenze insufficienti in 9 campioni su 12 totali.

## 2.4 Analisi bioinformatiche

Gli output di sequenziamento grezzo per un totale di 163 campioni sono stati elaborati con una pipeline che combina PANDAseq (Masella et al., 2012) e QIIME 2 (Bolyen et al., 2019). La funzione "filtro fastq" dell'algoritmo Usearch11 (Edgar & Bateman, 2010) è stata applicata per mantenere letture di alta qualità (lunghezza min/max = 350/550 bp). In particolare, sulla base delle probabilità del punteggio phred Q, le letture con un errore atteso per base  $E = 0,03$  o superiore (cioè tre errori attesi ogni 100 basi) sono state scartate.

Le letture conservate sono state quindi raggruppate in varianti di sequenza di ampliconi (ASV) utilizzando DADA2 tramite il quale sono state scartate eventuali chimere (Callahan et al., 2016). È stata eseguita un'assegnazione tassonomica utilizzando l'algoritmo VSEARCH (Rognes et al., 2016) e il database SILVA (versione di dicembre 2017) (Quast et al., 2013). Tutte le sequenze assegnate agli eucarioti, ai mitocondri e cloroplasti, o non assegnate sono state scartate. Attraverso questa procedura sono stati scartati 3 campioni arrivando ad un totale di 160 campioni:

- 145 campioni del microbiota delle vongole appartenenti ai periodi;
  - o 45 in luglio (12 Ravenna+8 Lido di Savio+9 Cesenatico+16 Rimini)
  - o 31 in settembre (9 Ravenna+6 Lido di Savio+6 Cesenatico+10 Rimini)
  - o 69 novembre (16 Ravenna+18 Lido di Savio+17 Cesenatico+18 Rimini)
- 3 campioni di sedimenti per il mese di novembre;
- 12 campioni di acqua (2 Ravenna+ 2 Lido di Savio+ 2 Cesenatico+2 Rimini)

## 2.5 Analisi statistiche

I dati prodotti sono stati trattati con approcci di statistica multidimensionale e modellizzazione al fine di identificare caratteristiche e dinamiche del microbiota di vongola, acqua e sedimento nei diversi siti, nonché i nessi causali ed i meccanismi coinvolti nelle alterazioni disbiotiche associate a bassa produttività. Le specifiche configurazioni dei microbioti nelle varie condizioni di studio sono state determinate sia con approcci di clustering gerarchico e analisi delle componenti principali, che mediante

la costruzione di networks di co-abbondanza. Successivamente, per la determinazione delle associazioni tra variabili dell'ospite, metadati ambientali, produttività e particolari configurazioni dei microbioti sono stati utilizzati approcci di regressione multidimensionale e machine learning.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software R (R Core Team v.4.1.2), ed il pacchetto "vegan". Per analizzare i phylum e le famiglie batteriche le sequenze sono state filtrate secondo un'abbondanza relativa, rispettivamente dello 0,5% e del 2% in almeno il 10% dei campioni.

La diversità alfa è stata calcolata tramite tre indici diversi: la diversità filogenetica di Faith, la diversità a livello di OTU, e la diversità di Shannon per la ricchezza microbica.

Per l'analisi della diversità alfa sono stati impiegati tre indici di diversità: ASV osservate, indice Faith (indice filogenetico, basato sulle OTU), indice di Shannon. Il test della somma dei ranghi di Wilcoxon è stato utilizzato per valutare differenze significative nella diversità alfa e nell'abbondanza relativa del taxon tra i gruppi.

La diversità beta è stata stimata calcolando le distanze UniFrac ponderate e non ponderate. La separazione dei dati nell'analisi delle coordinate principali (PCoA) è stata testata utilizzando un test di permutazione con rapporti pseudo-F (funzione "adonis" nel pacchetto "vegan") per evidenziare una significativa concordanza tra le diverse metriche di beta-diversità.

### 3 Risultati

Nel presente lavoro di tesi è stata indagata la diversità del pattern microbico associato alla specie *Chamelea gallina* in un periodo di tempo lungo 5 mesi lungo la costa emiliano-romagnola. I campionamenti sono stati effettuati in 3 punti temporali, (nei mesi di luglio, settembre e novembre) ed in 4 siti da nord a sud (Ravenna, Lido di Savio, Cesenatico e Rimini), per un totale di 12 eventi di campionamento. In ciascun evento sono stati raccolti un totale di 70 individui di *C. gallina*, 2L di acqua, 50mL di sedimenti. Le vongole campionate sono servite per effettuare analisi di caratterizzazione microbiologica (50 individui per evento di campionamento) e per lo studio delle condizioni di crescita (20 individui per evento di campionamento).

Per la caratterizzazione del microbioma della vongola attraverso l'estrazione del DNA del tessuto della ghiandola gastrica, durante l'elaborazione dei campioni si è ritenuto necessario fare un pool di 3 ghiandole per ciascuna replica. L'amplificazione, tramite PCR, ed il sequenziamento hanno prodotto un totale di: 145 campioni provenienti dal tessuto gastrico della vongola *Chamelea gallina* (il numero di repliche per sito e mese è riportato nella Tabella 2); 12 campioni di acqua (1 replica); i campioni dei sedimenti che sono stati esclusi perché non sufficienti per rappresentare e confrontare le diverse condizioni (stagione e sito).

<b>Repliche</b>	<b>Ravenna</b>	<b>Lido di Savio</b>	<b>Cesenatico</b>	<b>Rimini</b>
<b>Luglio</b>	12	8	6	10
<b>Settembre</b>	9	6	6	10
<b>Novembre</b>	16	18	17	18

Tabella 2 – Nella tabella sono stati riportati il numero di repliche ottenute alla fine del processo di elaborazione dei campioni.

#### 3.1 Parametri biotici e abiotici

Dai dati forniti dal bollettino mare pubblicato dall'ARPA (Tabella 3) nei periodi (28-29 luglio, 12-14 settembre, 08-09 novembre) coincidenti con i giorni dei campionamenti, si nota una leggera variazione di temperatura, salinità, pH e ossigeno disciolto tra Ravenna e Rimini. In particolare, la differenza più marcata la si può notare nella salinità, tra la zona

di Ravenna e quella di Rimini, la salinità varia di +0,52 psu a luglio, +0,84 psu a settembre e +1,23 novembre. Queste piccole variazioni possono essere giustificate per l'afflusso di acqua dolce proveniente dal fiume Po ed antri fiumi minori in prossimità del sito di Ravenna.

	Ravenna - Lido di Savio			Cesenatico - Rimini		
	Luglio	Settembre	Novembre	Luglio	Settembre	Novembre
<b>Temperatura °C</b>	28,44	25,63	17,43	28,63	25,58	17,32
<b>Salinità psu</b>	37,49	36,44	34,83	38,01	37,28	36,06
<b>pH</b>	8,15	8,34	8,43	8,08	8,28	8,4
<b>O.D. fondo mg/L</b>	5,78	5,75	6,57	5,99	5,91	7,11

Tabella 3 - Nella tabella sono stati riportati i dati ambientali di temperatura, salinità, pH e ossigeno disciolto sul fondo, raccolti dal database dell'ARPA.

La taglia dei campioni totali presenta una distribuzione normale con un minimo di 18,35 mm, massimo di 37,25 mm ed una media di 23 mm. I risultati delle medie dell'indice di condizione, considerando 20 campioni di vongole per ciascun punto di campionamento nei 4 siti (Ravenna, Lido di Savio, Cesenatico, Rimini) e nei periodi (luglio, settembre, novembre), sono stati messi a confronto in figura 5.

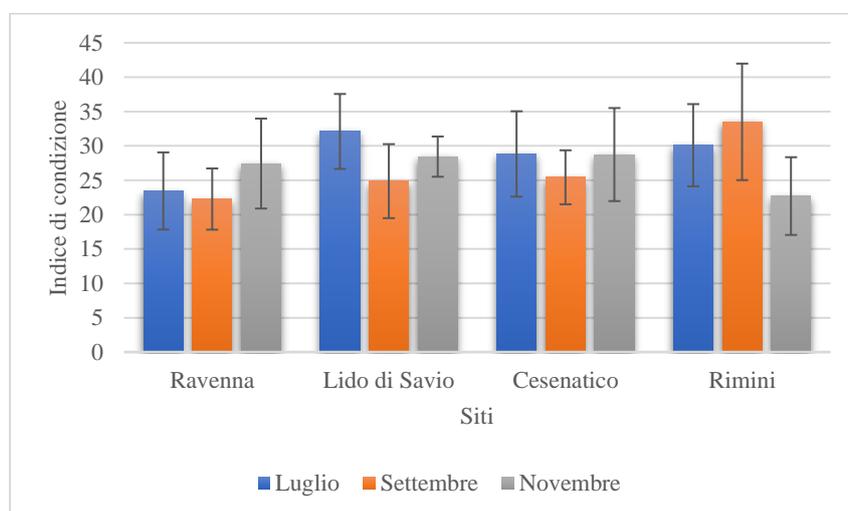


Figura 4 - Nell'istogramma sono messi a confronto i valori medi dell'indice di condizione basato sul peso fresco del tessuto molle e peso secco della conchiglia, nei 4 siti (Ravenna, Lido di Savio, Cesenatico, Rimini) e 3 periodi (luglio, settembre, novembre).

L'omogeneità delle varianze è stata testata tramite il test di Levene, il p-value è risultato >0.05 (il rifiuto dell'ipotesi nulla: le varianze sono uguali). Il test della varianza nei diversi siti è stato effettuato tramite test ANOVA con un valore di significatività <0,05 p-value. Il

test di Tukey è stato utilizzato per i confronti multipli: risultano differenze significative nel mese tra Ravenna e gli altri 3 siti nel mese di luglio, e tra Rimini e gli altri 3 siti sia nel mese di settembre sia novembre. I risultati sembrano indicare un miglioramento delle condizioni della vongola da nord a sud nei mesi di settembre.

### 3.2 Composizione del microbiota di *Chamelea gallina*

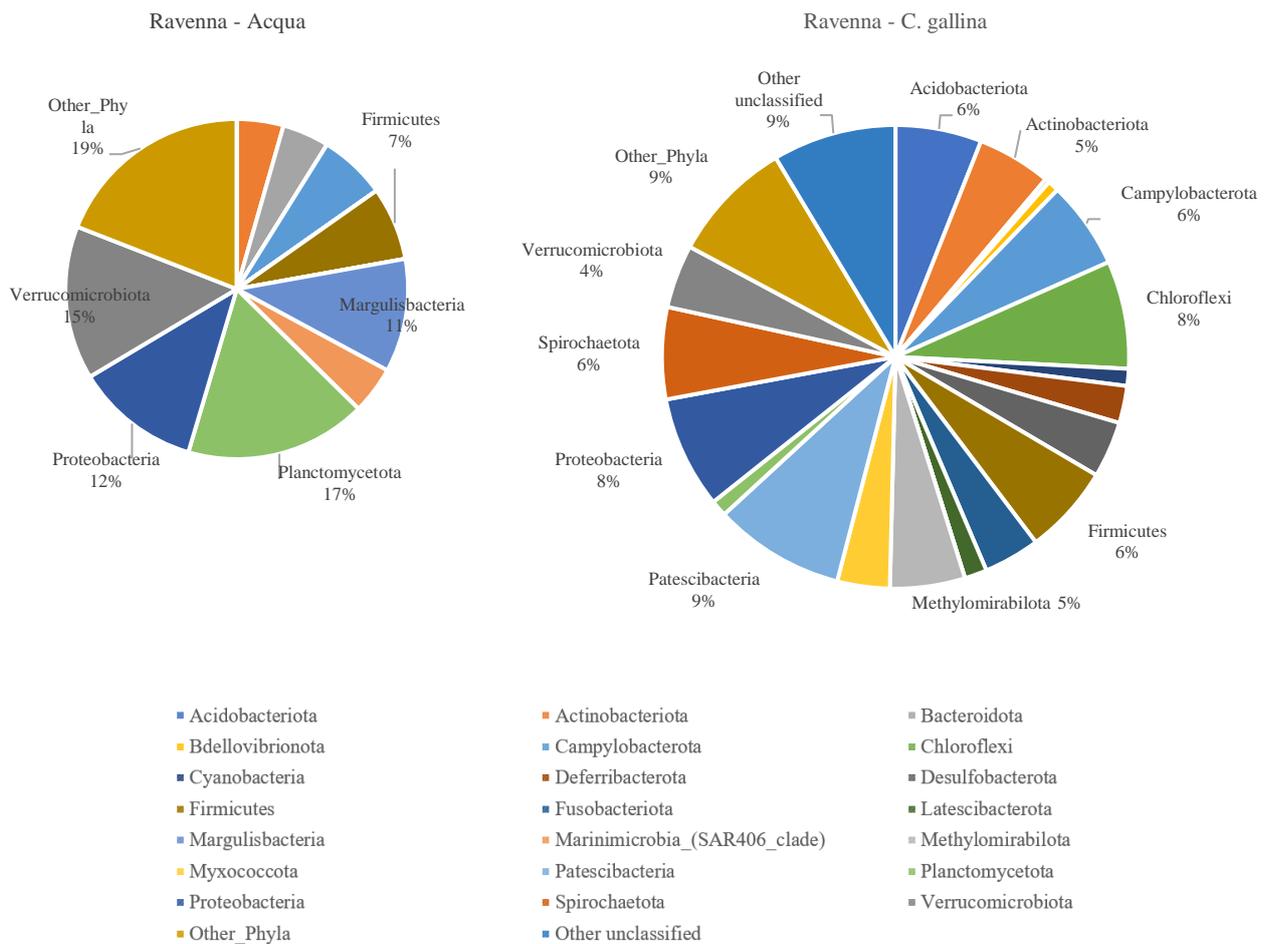
Il sequenziamento della regione ipervariabile V3-V4 del gene 16S rRNA dal DNA microbico totale di 160 campioni, ha portato all'ottenimento di 1.685.768 letture totali di alta qualità e una media di  $10.342 \pm 6.000$  (media  $\pm$  DS) letture per campione. Le letture di alta qualità sono state successivamente normalizzate al numero più basso di letture per campione (1136), determinando la rimozione nel dataset di tre campioni, i quali presentavano un numero di letture inferiore, per un totale di 4199 ASV.

Dai risultati ottenuti è stata esplorata la composizione microbica nei campioni di vongole ed acqua raggruppando le ASV a livello di phylum (Figura 6) e successivamente a livello di famiglia.

Sono stati classificati come "dominanti" i phyla che presentano una maggiore dominanza relativa per un valore percentuale  $\geq 7\%$  e "sub-dominanti" quelli con un valore percentuale compreso tra  $7\% > 4\%$ .

Nel sito di Ravenna sono stati identificati 21 phylum microbici (Figura 5), tra questi risultano dominanti nel microbiota di *C. gallina* i batteri appartenenti ai phylum Patescibacteria (9,1%), Proteobacteria (7,8%), Chloroflexi (7,5%); e come phylum sub-dominanti Spirochaetota (6,4%) Firmicutes (6,2%), Campylobacterota (6,1%), Acidobacteriota (6%), Methylophilum (5,2%), Actinobacteriota (5,1%), Verrucomicrobiota (4,4%). Diversamente, nei campioni d'acqua le abbondanze relative sono completamente diverse, i phylum dominanti sono Planctomycetota (17,1%), Verrucomicrobiota (14,6%), Proteobacteria (11,8%), Margulisbacteria (10,8%).

Figura 5 – Nei grafici a torta è stata rappresentata a livello di phylum l'abbondanza microbica (ASVs) dei



campioni di acqua e ghiandola gastrica della vongola *C. gallina* nel sito di **Ravenna**. Ogni phylum batterico presenta un'abbondanza relativa > 0,5%.

Nel sito di Lido di Savio sono stati identificati 24 phylum batterici nel microbiota di *C. gallina* (Figura 6), tra questi risultano dominanti i batteri appartenenti ai phylum Deinococcota (10,4%), Proteobacteria (9,6%), Firmicutes (8,8%), Gemmatimonadota (8,7%); e come phylum sub-dominanti Bdellovibrionota (6,6%), Cyanobacteria (6,6%), Actinobacteriota, Planctomycetota (6,4%), Nitrospirota (5,2%), Verrucomicrobiota (4,4%), Myxococcota (4%). Diversamente, nei campioni d'acqua i phylum dominanti sono Myxococcota, Patescibacteria (13,5%), Marinimicrobia\_(SAR406\_clade) (12,6%), Actinobacteriota (11,9%), Firmicutes (11,2%), Verrucomicrobiota (14,6%), Planctomycetota, Margulisbacteria (10,3%), Proteobacteria (8,8%).

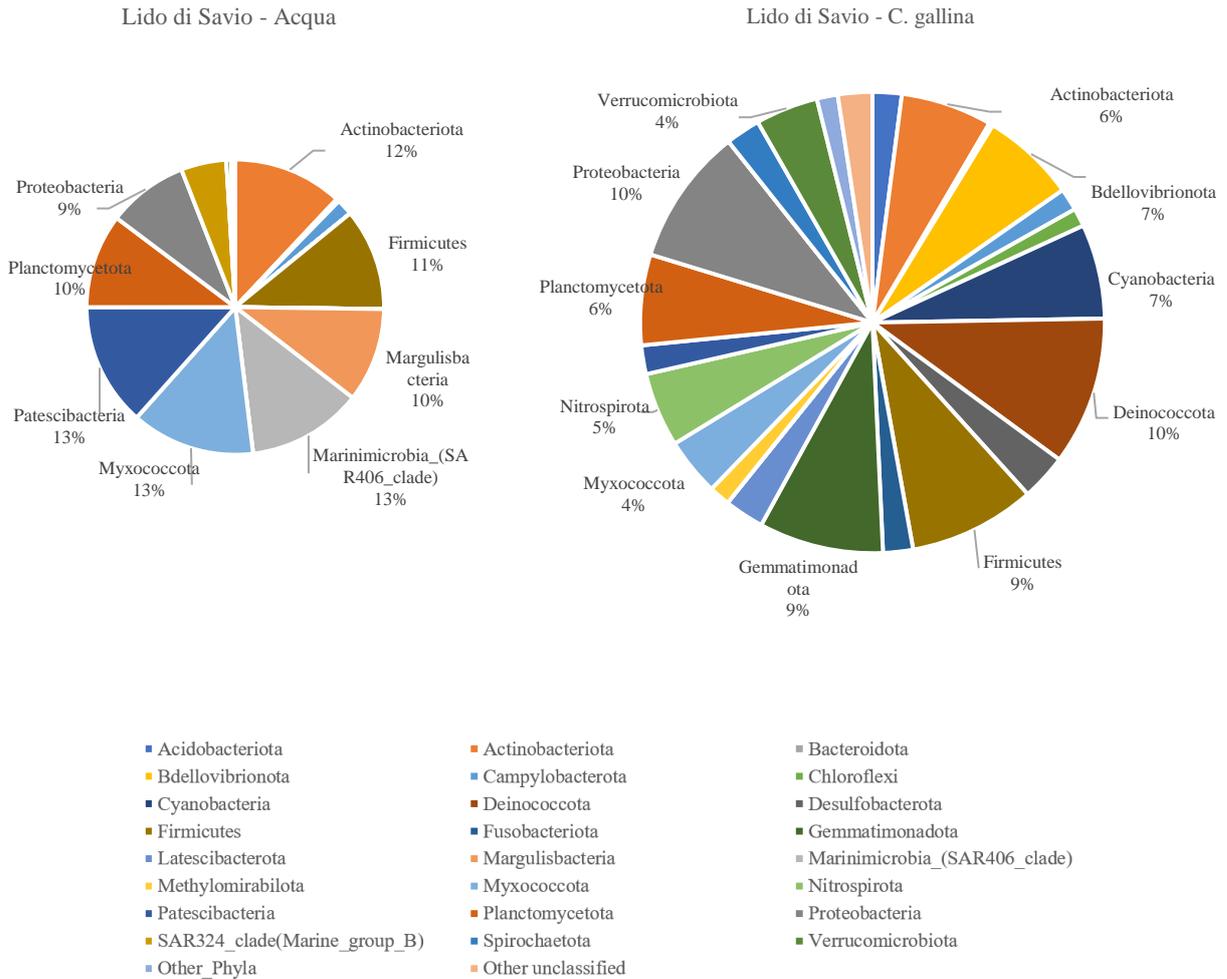


Figura 6 - Nei grafici a torta è stata rappresentata a livello di phylum l'abbondanza microbica (ASVs) dei campioni di acqua e ghiandola gastrica della vongola *C. gallina* nel sito di **Lido di Savio**. Ogni phylum batterico presenta un'abbondanza relativa > 0,5%.

Nel sito di Cesenatico sono stati identificati 20 phylum microbici (Figure 7), tra questi risultano dominanti nel microbiota di *C. gallina* i batteri appartenenti ai phylum Chloroflexi (7,7%), Proteobacteria (7,2%), Verrucomicrobiota (7,2%), Gemmatimonadota (7%); e come phylum sub-dominanti Actinobacteriota (6,8%), Cyanobacteria (6,6%), Firmicutes (5,7%), Campylobacterota (5,5%), Planctomycetota (5,3%), Myxococcota, Fusobacteriota (5%).

Diversamente, nei campioni d'acqua i phylum dominanti sono Bdellovibrionota (13,6%) Actinobacteriota (13,6%), Gemmatimonadota (12,1%), Verrucomicrobiota (9%).

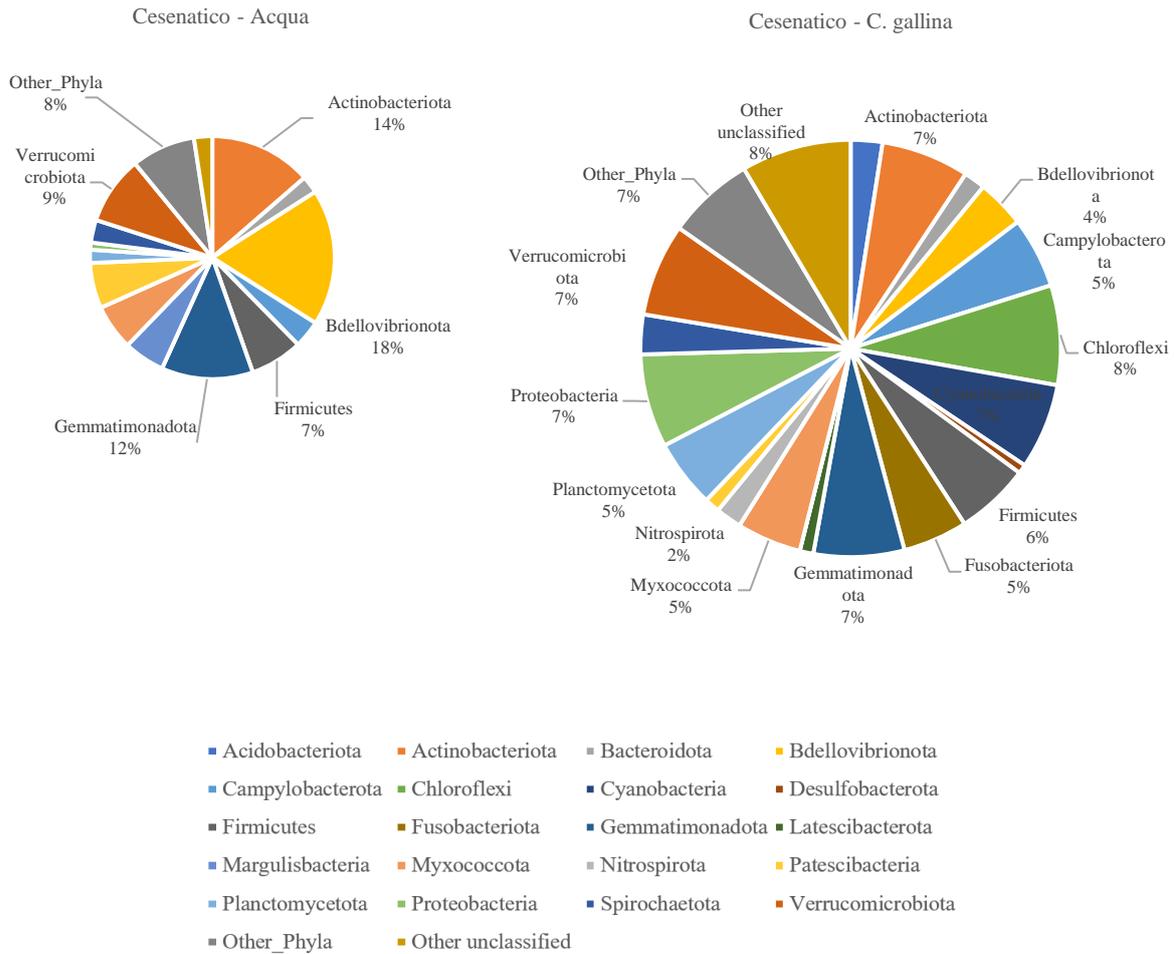


Figura 7 - Nei grafici a torta è stata rappresentata a livello di phylum l'abbondanza microbica (ASVs) dei campioni di acqua e ghiandola gastrica della vongola *C. gallina* nel sito di **Cesenatico**. Ogni phylum batterico presenta un'abbondanza relativa > 0,5%.

Nel sito di Rimini sono stati identificati 24 phylum microbici (Figura 8), tra questi risultano dominanti nel microbiota di *C. gallina* i batteri appartenenti ai phylum Planctomycetota (10,8%), Myxococcota (8,1%) e come phylum sub-dominanti Desulfobacterota (6,8%), Methyloirabilota (6,5%), Verrucomicrobiota (5,7%), Bacteroidota (5,4%), Firmicutes (5%), Gemmatimonadota (4,6%), SAR324\_clade (Marine\_group\_B) (4,4%), Bdellovibrionota (4,4%).

Nei campioni d'acqua i phylum dominanti sono Bdellovibrionota (16%), Desulfobacterota, Acidobacteriota, Margulisbacteria, Spirochaetota (9,4%), Marinimicrobia\_(SAR406\_clade) (8,9%).

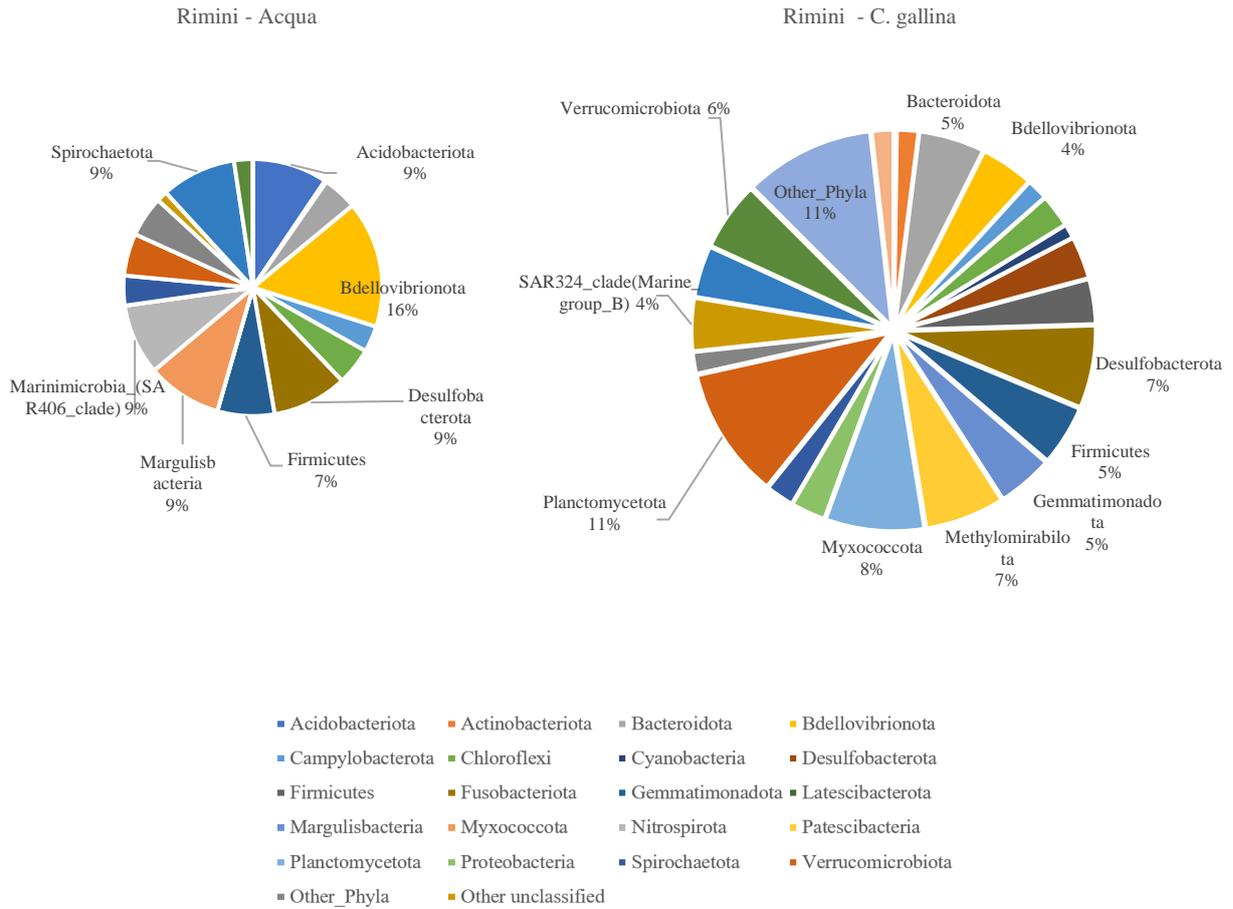


Figura 8 - Nei grafici a torta è stata rappresentata a livello di phylum l'abbondanza microbica (ASVs) dei campioni di acqua e ghiandola gastrica della vongola *C. gallina* nel sito di **Rimini**. Ogni phylum batterico presenta un'abbondanza relativa > 0,5%.

### 3.3 Variazione del microbiota della vongola in risposta alla stagionalità nei siti

Lo studio della variazione della diversità del microbiota della vongola in risposta alle variazioni stagionali nei quattro siti di indagine è stato fatto mediante analisi della diversità alfa e beta.

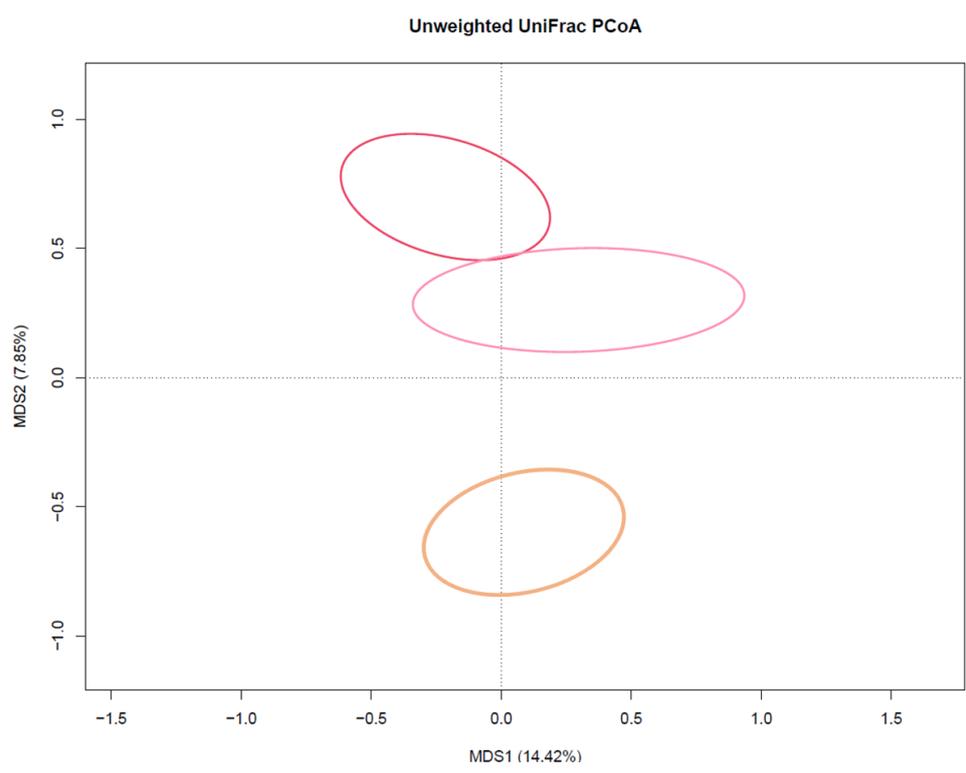
L'analisi della beta diversità, basata sulle distanze UniFrac (a livello di famiglia microbica), è stata valutata tramite indagine statistica PCoA, con lo scopo di comprendere quali siano i pattern di distribuzione all'interno di ciascun sito dei campioni dei diversi time-point in termini di diversità batterica. Attraverso questo tipo di indagine è possibile capire se ci siano delle separazioni o sovrapposizioni apprezzabili nei diversi pattern che caratterizzano la stagione, evidenziando, quelle che sono le differenze tra i diversi siti. Inoltre, risulta utile per nell'individuazione dei driver microbici che portano alla separazione dei diversi gruppi.

L'alfa diversità calcolata con tre indici di diversità filogenetica di Faith "faith\_PD", di diversità a livello di ASV osservate "Observer\_ASV" e di diversità di Shannon per la ricchezza microbica "Shannon" ha lo scopo di valutare la variazione della diversità nello stesso sito ma in periodi diversi (luglio, settembre, novembre).

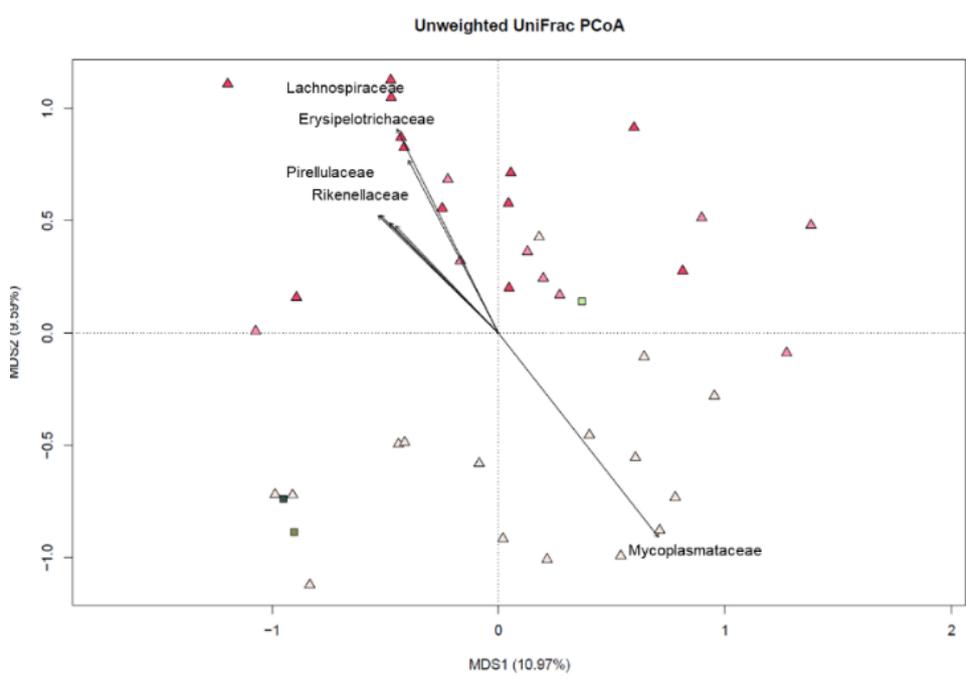
Nel sito di Ravenna è possibile notare come la distribuzione dei campioni sia molto sparsa ma, nonostante ciò, si registra una separazione stagionale tra i campioni (Figura 9A). A novembre la separazione dei campioni di *C. gallina* è guidata dalla famiglia delle *Mycoplasmataceae*, mentre i campioni di luglio e settembre sono più ravvicinati e le famiglie che caratterizzano la separazione sono *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Pirellulaceae*, *Rikenellaceae* (Figura 9B).

Nello studio dell'alfa diversità di Ravenna (Figura 9.C), il confronto tra i campioni di luglio e novembre per l'indice di Shannon risultano significativamente differenti ( $p\text{-value} < 0,5$ ). In generale è comunque possibile notare un trend di variazione in termini di diversità nel sito. Notiamo che il microbiota dell'acqua e quello della vongola hanno andamenti opposti al variare del tempo: il microbiota di *C. gallina*, con il passare del tempo, tendono ad un impoverimento della diversità microbica al contrario dell'acqua (diversità minore a luglio e maggiore a novembre).

A



B



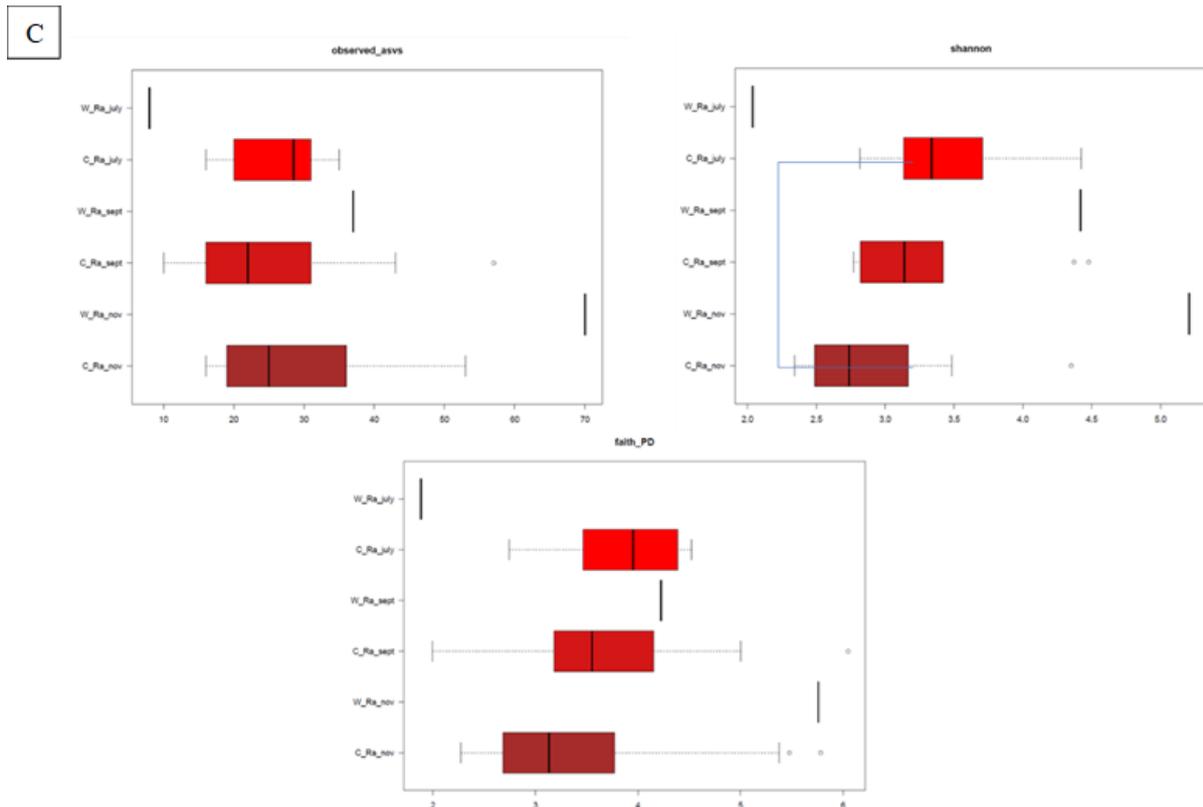


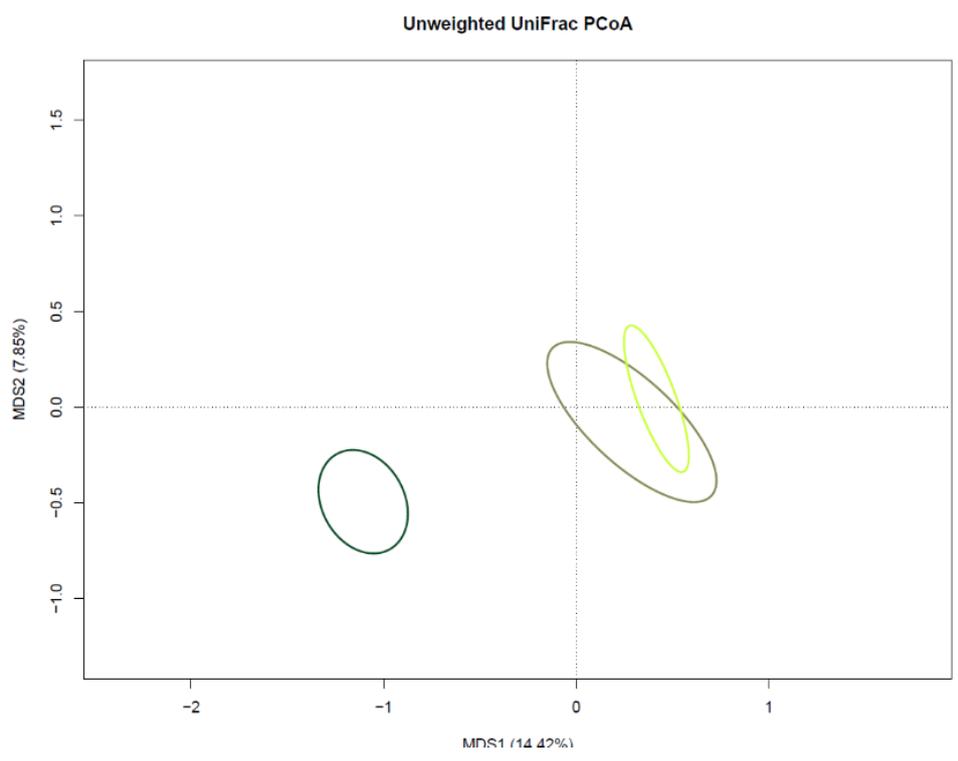
Figura 9 – I grafici rappresentano la beta e l'alfa diversità dei campioni di acqua e ghiandola digestiva della vongola *C. gallina* per il sito di **Ravenna**. (A, B) Analisi PCoA non pesata basata sulla distanza metrica UniFrac tra i singoli campioni batterici. I campioni sono significativamente separati (permutazioni con test pseudo-F,  $P$ -value < 0,05). (A) Ellissi costruiti sui raggruppamenti dei campioni. (B) Analisi PCoA con EnvFit  $p < 0,001$ . (C) Alfa diversità calcolata attraverso la diversità filogenetica di Faith (faith\_PD), la diversità a livello di OTU (Observed\_ASV), e diversità di Shannon per la ricchezza microbica (shannon).

Nel sito di Lido di Savio (Figura 10) vediamo una separazione più netta tra il mese di novembre e luglio-settembre. In questo caso vediamo che il driver di separazione dei mesi di luglio-settembre rispetto a novembre (Figura 10A) è rappresentato dalla famiglia delle *Mycoplasmataceae*, mentre i campioni di novembre sembrano guidati da più famiglie microbiche (*Sphingomonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Bacillaceae*, *Gemmataceae*) (Figura 10B). I campioni di acqua di luglio e settembre sono distanti a livello spaziale dal resto dei campioni e sono guidati dalla famiglia delle *Halieaceae*.

Nello studio dell'alfa diversità (Figura 10C) sono risultati significativi a livello statistico ( $p$ -value < 0,5) il confronto tra il mese di luglio contro i mesi di settembre e novembre. Qui vediamo sempre una riduzione molto marcata in termini di diversità microbica e nel passaggio da luglio a novembre (diversità maggiore a luglio e minore a novembre).

A

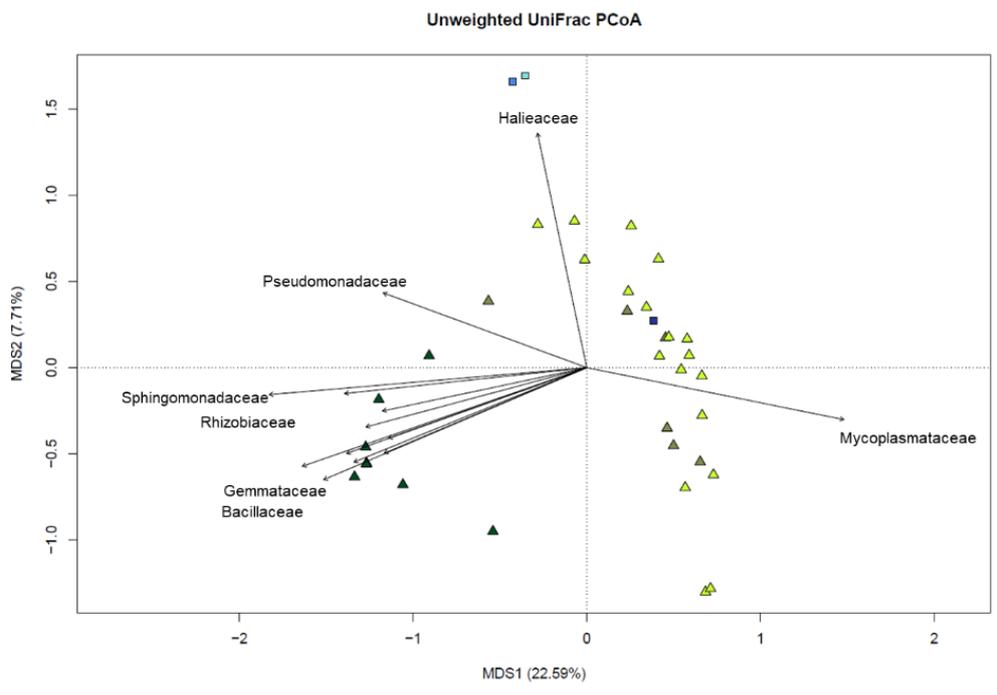
Vongole  
● luglio  
● settembre  
● novembre



B

Vongole  
▲ luglio  
▲ settembre  
▲ novembre

Acqua  
■ luglio  
■ settembre  
■ novembre



C

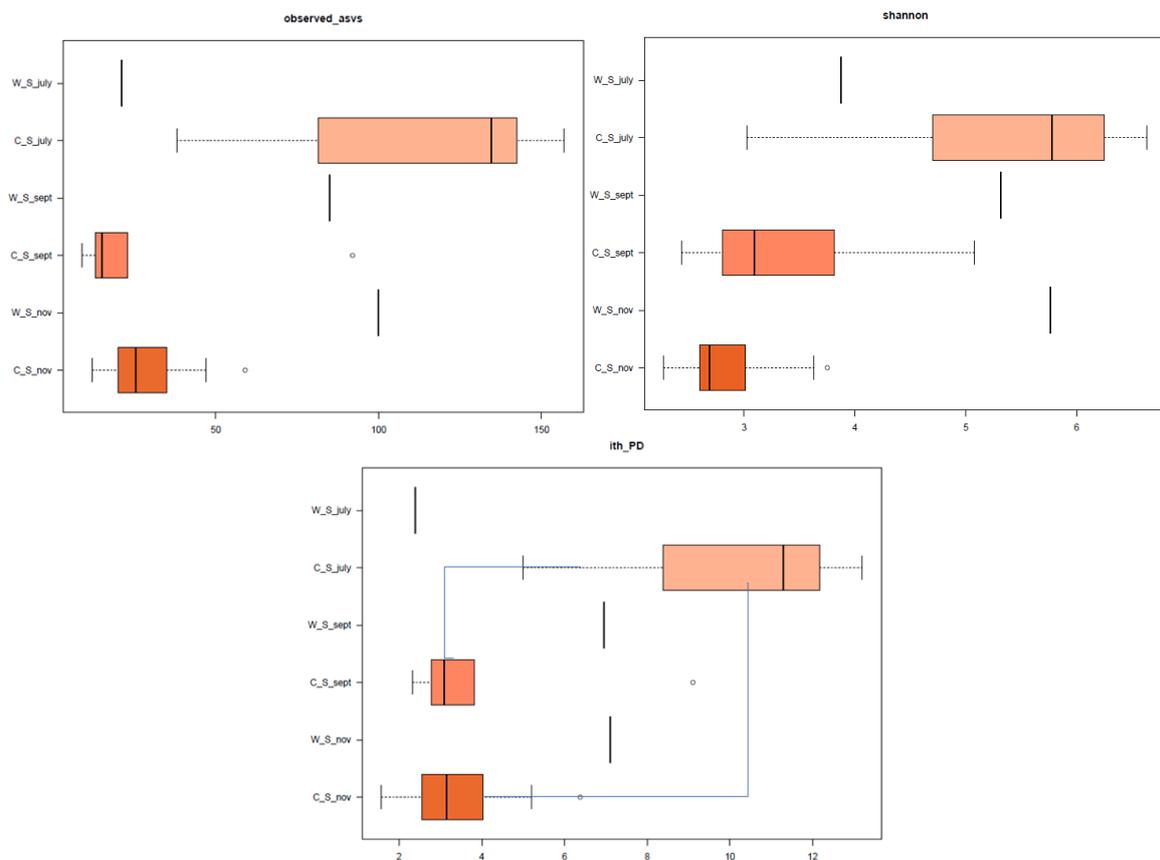
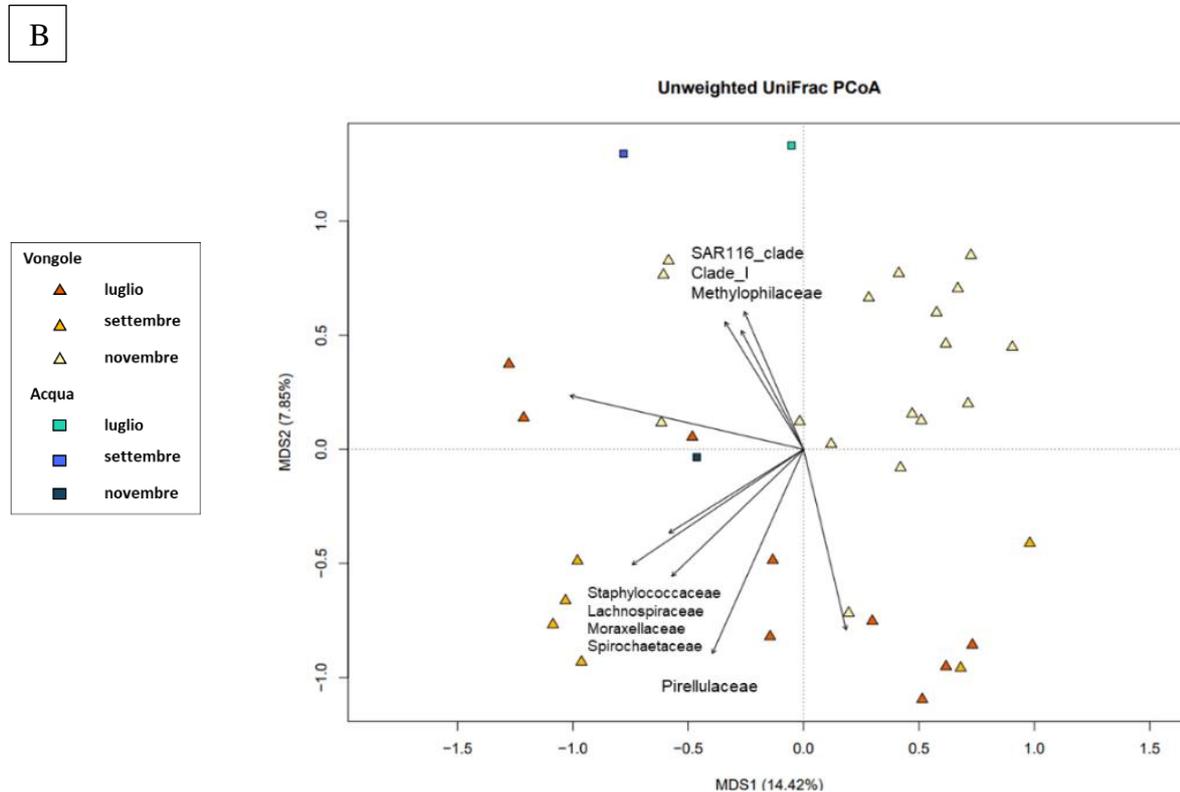
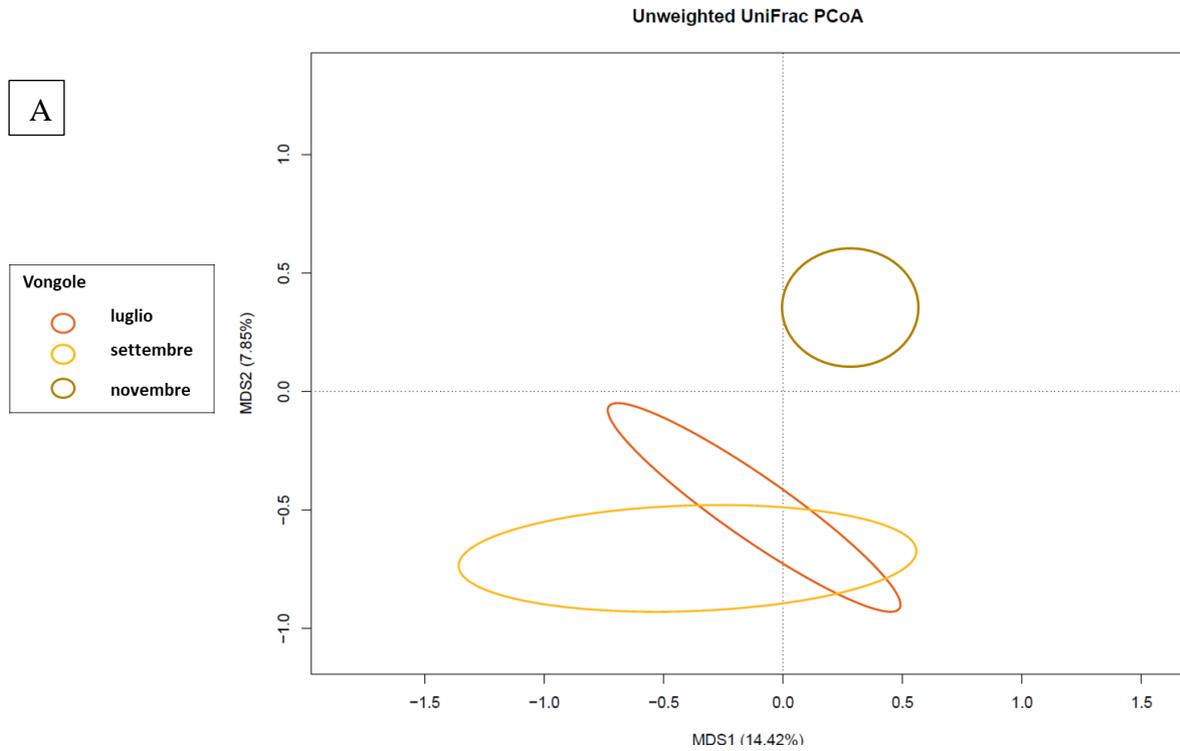


Figura 10 - I grafici rappresentano la beta e l'alfa diversità dei campioni di acqua e ghiandola digestiva della vongola *C. gallina* per il sito di **Lido di Savio**. (A, B) Analisi PCoA non pesata basata sulla distanza metrica UniFrac tra i singoli campioni batterici. I campioni sono significativamente separati (test di permutazioni con rapporti pseudo-F,  $P\text{-value} < 0,05$ ). (A) Ellissi costruiti sui raggruppamenti dei campioni. (B) Analisi PCoA con EnvFit  $p < 0,001$ . (C) Alfa diversità calcolata attraverso la diversità filogenetica di Faith (*faith\_PD*), la diversità a livello di OTU (*Observed\_ASV*), e diversità di Shannon per la ricchezza microbica (*shannon*).

Nel sito di Cesenatico (Figura 11 A, B) vediamo una sovrapposizione maggiore dei campioni per i siti di luglio e settembre, con Staphylococcaceae, Lachnospiraceae, Moraxellaceae, Spirochaetaceae come driver di separazione, mentre ritroviamo i campioni del mese di novembre sempre ben distanziati.

Nello studio dell'alfa diversità di Cesenatico (Figura 11C) sono risultati significativi a livello statistico ( $p\text{-value} < 0,5$ ): il confronto tra il mese di luglio e novembre per l'indice basato sulle conte delle OTU (*Observed\_asvs*); mentre, l'indice di Shannon mostra un'alfa diversità significativa tra i campioni del mese di novembre contro i campioni di settembre e luglio.

Nella figura 11.C non è visibile un trend di variazione della diversità, ma notiamo un ampio range di diversità nel mese di settembre, e in generale, una più alta diversità rispetto a luglio e novembre.



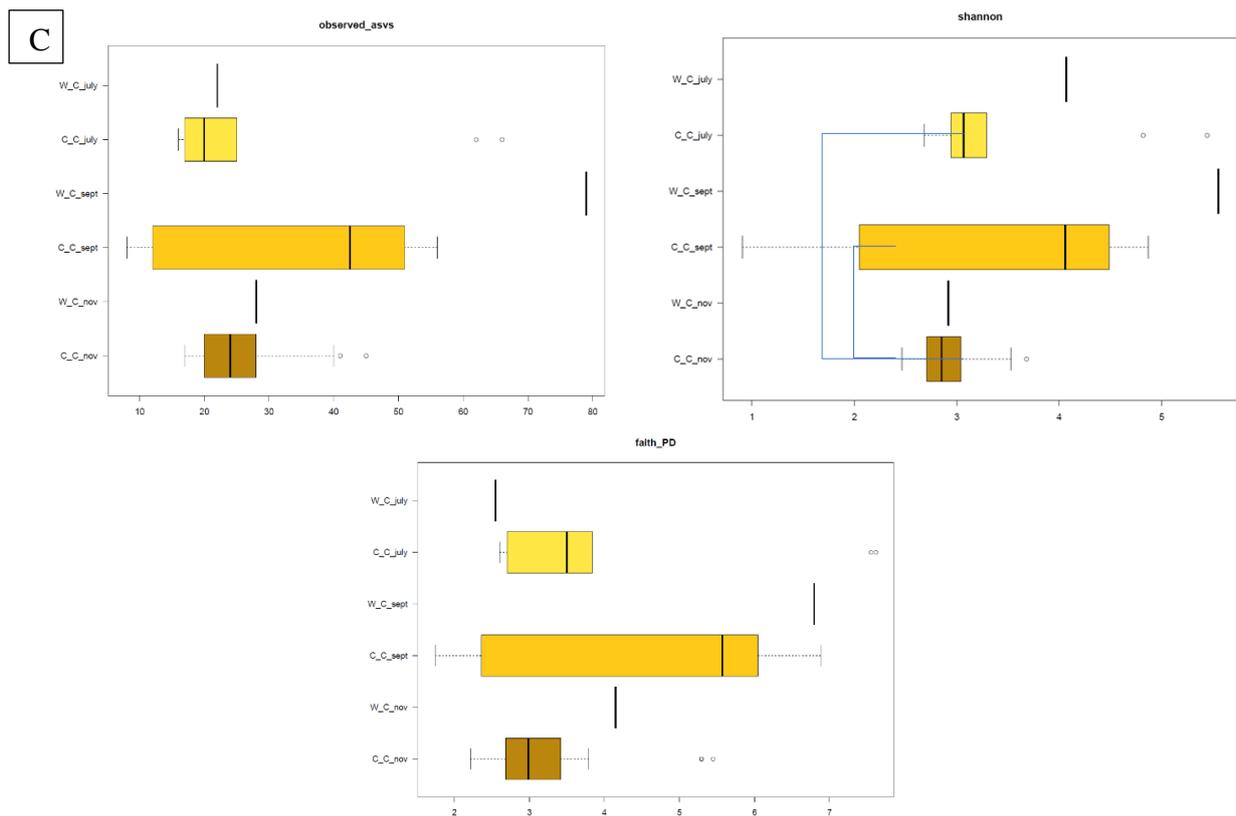


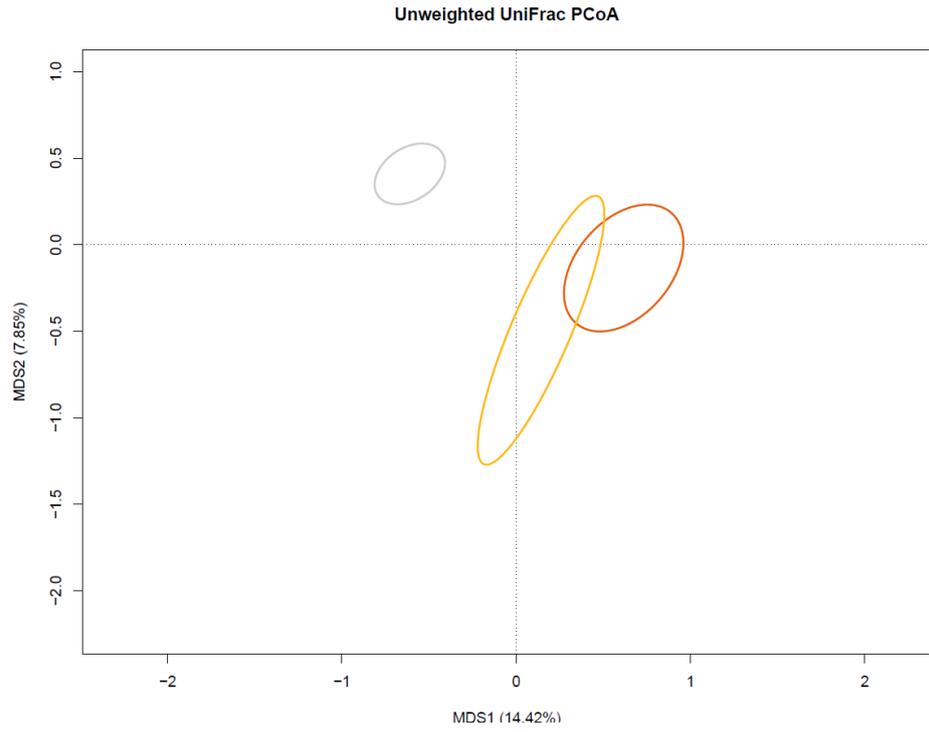
Figura 11 - I grafici rappresentano la beta e l'alfa diversità dei campioni di acqua e ghiandola digestiva della vongola *C. gallina* per il sito di **Cesenatico**. (A, B) Analisi PCoA non pesata basata sulla distanza metrica UniFrac tra i singoli campioni batterici. I campioni sono significativamente separati (test di permutazioni con rapporti pseudo-F,  $P$ -value=0,053). (A) Ellissi costruiti sui raggruppamenti dei campioni. (B) Analisi PCoA con EnvFit  $p < 0,001$ . (C) Alfa diversità calcolata attraverso la diversità filogenetica di Faith (*faith\_PD*), la diversità a livello di OTU (*Observed\_ASV*), e diversità di Shannon per la ricchezza microbica (*shannon*).

Anche per il sito di Rimini (Figura 12.A) vediamo una separazione tra i campioni del mese di novembre e quelli luglio-settembre, che anche in questo caso sembrano sovrapporsi. Come driver principali di separazione ritroviamo la famiglia delle *Mycoplasmataceae* per i campioni di novembre, accompagnate da *Rubritaleaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*. In questo sito vediamo anche la famiglia delle *Cyanobiaceae* come forzanti di separazione dei campioni di luglio da quelli di settembre.

I confronti dell'alfa diversità (Figura 12.C) per il sito di Rimini risultano quasi tutti significativi ( $p$ -value < 0,5) per i tre indici (*Observed\_asvs*, *faith\_PD*, *Shannon*). Nel sito di Rimini il trend di variazione di diversità microbica sembrerebbe aumentare con il passare del tempo (diversità minore a luglio e maggiore a novembre), in questo caso però i campioni di acqua non sembrano seguire lo stesso andamento.

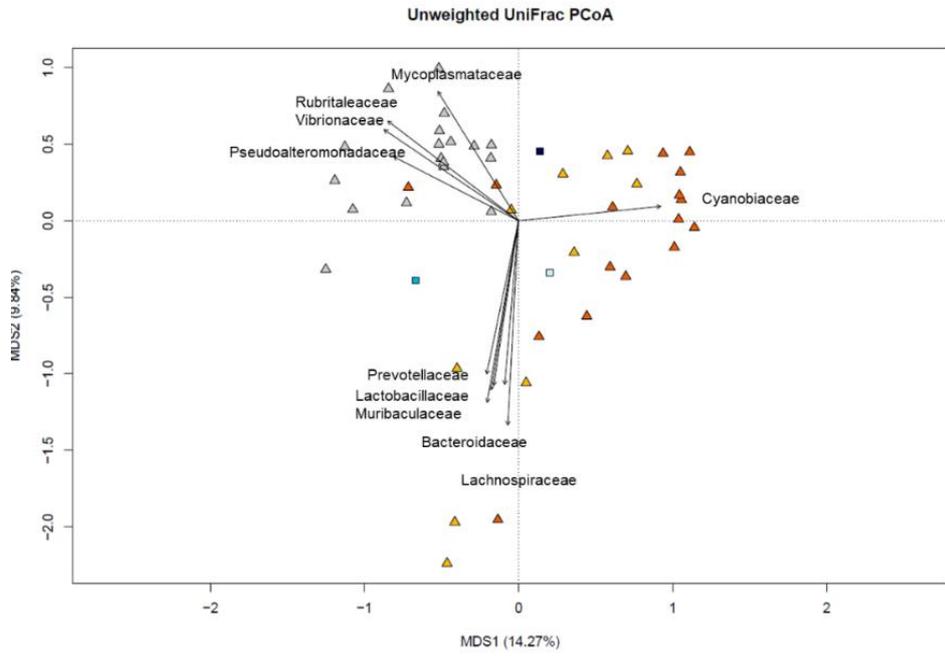
A

Vongole  
○ luglio  
○ settembre  
○ novembre  
P value 0,471



B

Vongole  
▲ Luglio  
▲ Settembre  
▲ Novembre  
Acqua  
□ Luglio  
■ Settembre  
■ Novembre



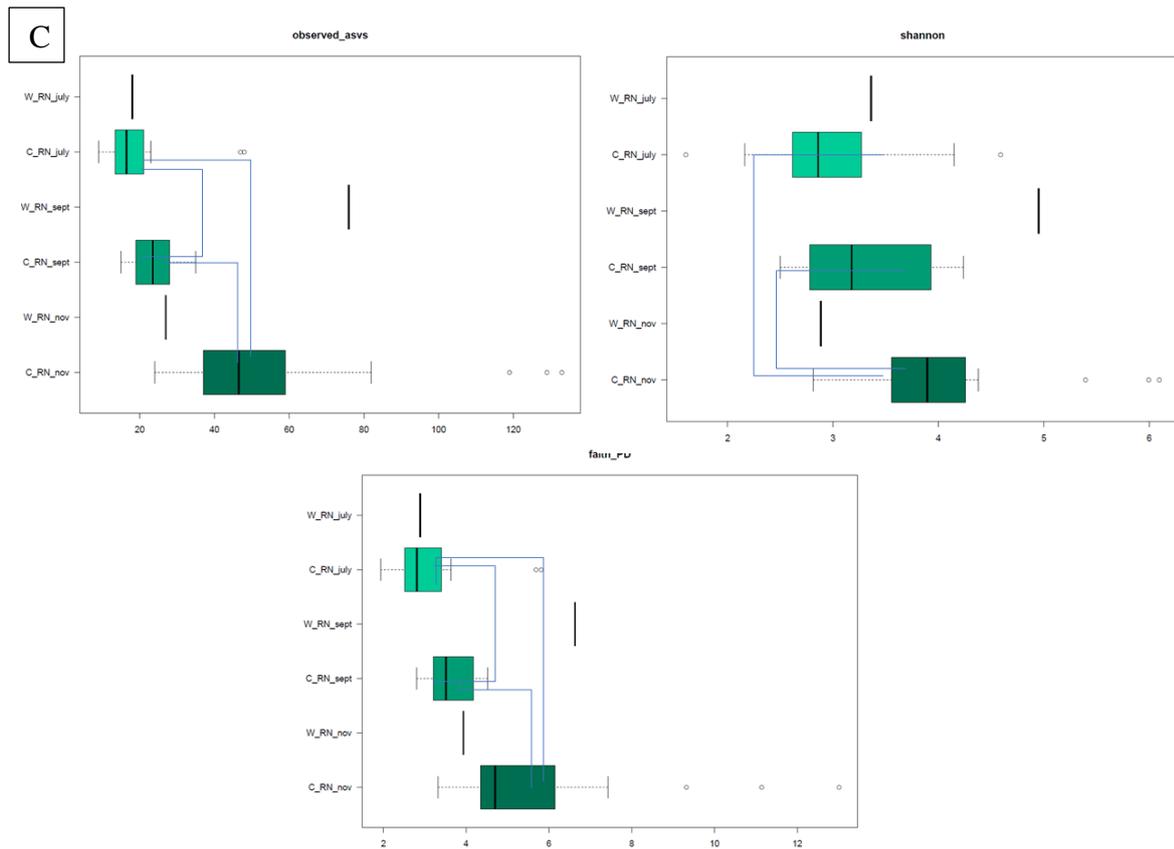


Figura 12 - I grafici rappresentano la beta e l'alfa diversità dei campioni di acqua e ghiandola digestiva della vongola *C. gallina* per il sito di **Rimini**. (A, B) Analisi PCoA non pesata basata sulla distanza metrica UniFrac tra i singoli campioni batterici. I campioni sono significativamente separati (test di permutazioni con rapporti pseudo-F,  $P$ -value  $<0.05$ ). (A) Ellissi costruiti sui raggruppamenti dei campioni. (B) Analisi PCoA con EnvFit  $p > 0,001$ . (C) Alfa diversità calcolata attraverso la diversità filogenetica di Faith (faith\_PD), la diversità a livello di OTU (Observed\_ASV), e diversità di Shannon per la ricchezza microbica (shannon).

### 3.4 Sito specificità del microbiota della vongola stratificata per stagioni

La specificità del microbiota della vongola *C. gallina* nei siti Di Ravenna, Lido di Savio, Cesenatico e Rimini stratificata per stagioni (nei mesi di luglio, settembre e novembre) è stata studiata attraverso lo studio della diversità alfa (calcolata sui tre indici precedentemente descritti) e beta diversità (PCoA sulle distanze UniFrac).

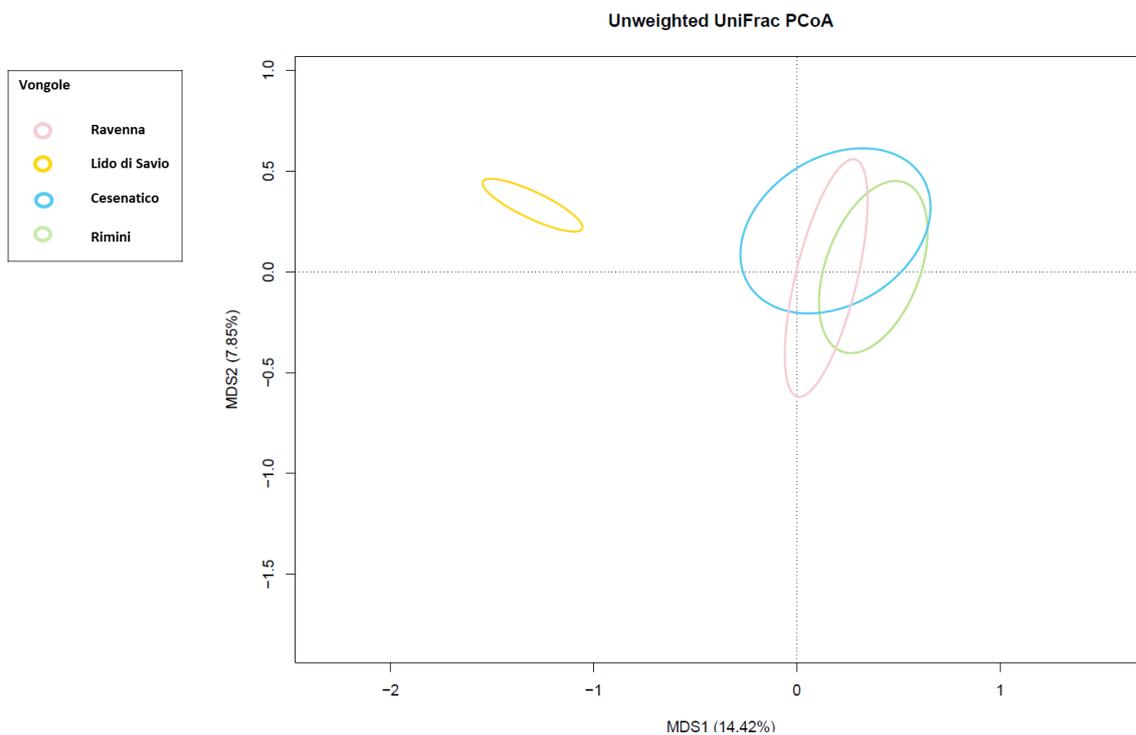
Lo scopo è stato quello di comprendere quali siano le distribuzioni dei campioni nei diversi siti all'interno di ciascun time-point in termini di diversità batterica. Con questo tipo di indagine è possibile capire se ci siano delle separazioni o sovrapposizioni nella diversità che caratterizzano la stagione, evidenziando, quelle che sono le differenze tra i diversi siti.

Inoltre, risulta utile per nell'individuazione dei driver microbici che portano alla separazione dei diversi gruppi.

Nel mese di luglio i campioni (Figura 13.A) dei diversi siti si sovrappongono parzialmente ad eccezione dei campioni provenienti dal sito Lido di Savio. Le famiglie microbiche che risultano avere una maggiore influenza in termini di separazione dei campioni di Lido di Savio sono *Nocardioideae*, *Xanthobacteraceae*, *Paenibacillaceae*, mentre per Cesenatico, Ravenna e Rimini sono le *Cyanobiaceae*. I tre campioni di acqua sono separati dagli altri per la presenza delle famiglie *Muribaculaceae* e *Lachnospiraceae* (Figura 13.B).

Il grafico della diversità alfa (Figura 13.C) evidenzia una bassa diversità per i campioni di Lido di Savio rispetto ai campioni degli altri tre siti, che presentano una diversità maggiore per tutti e tre gli indici considerati. La diversità dei siti risulta statisticamente significativa soprattutto nel confronto tra i campioni di Lido di Savio contro i restanti tre siti, e tra i campioni di Ravenna contro quelli di Rimini.

A



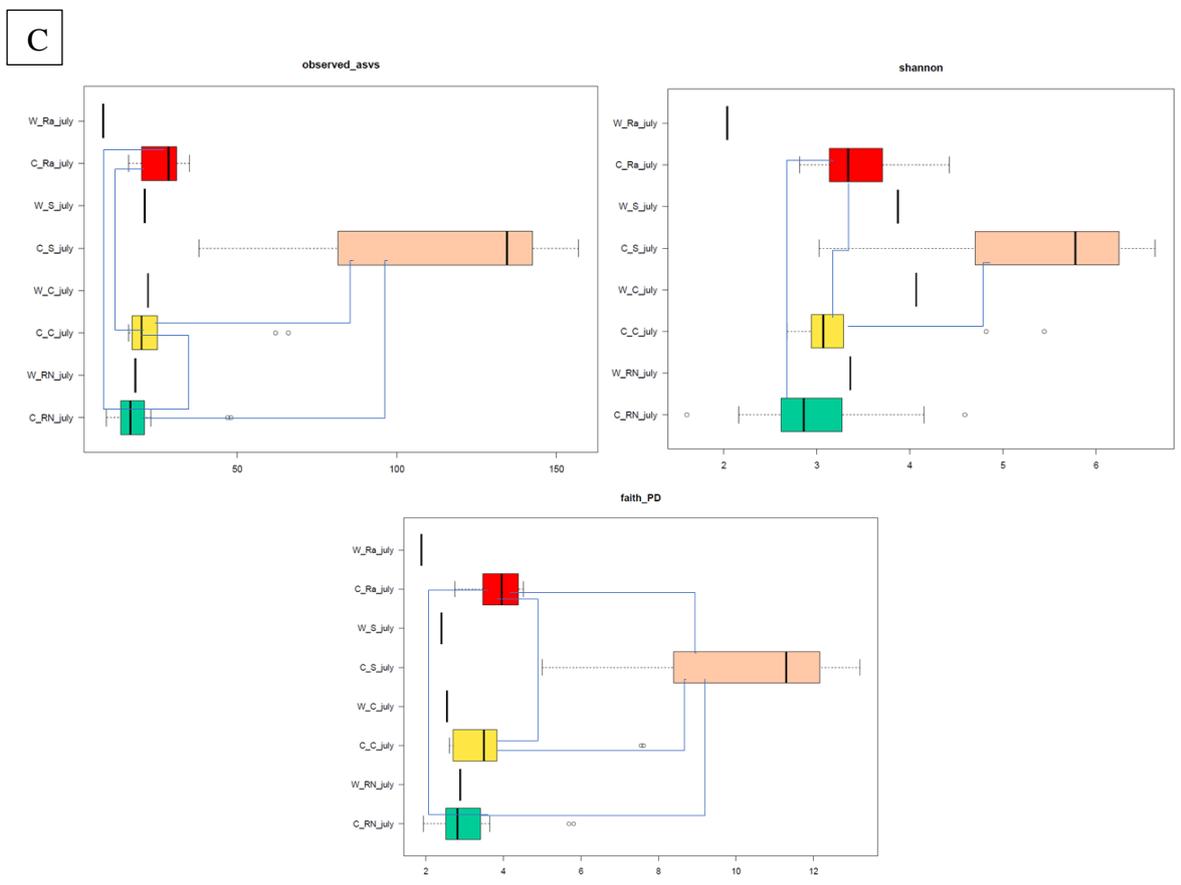
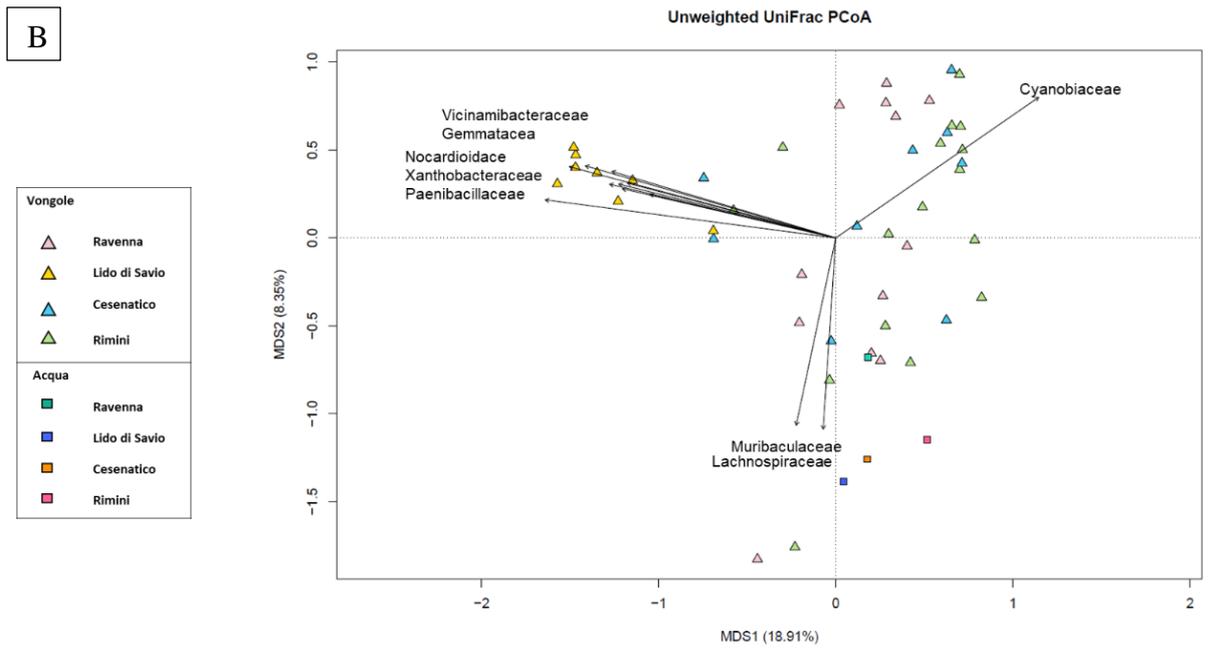
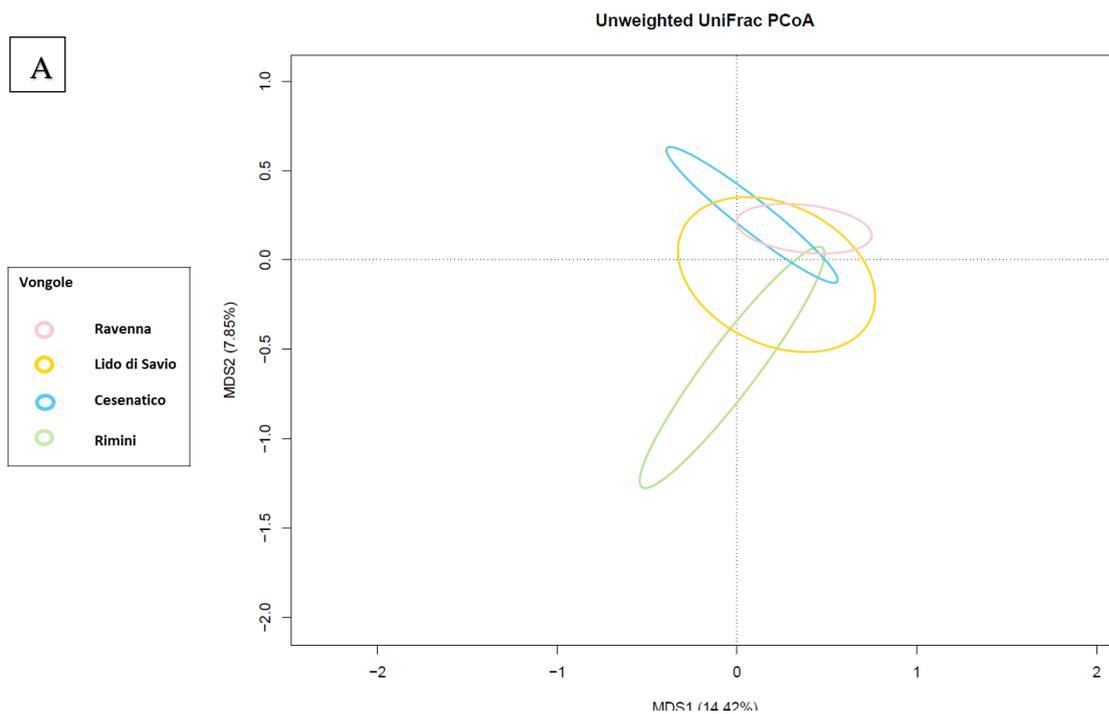


Figura 13 - I grafici rappresentano la beta e l'alfa diversità dei campioni di acqua e ghiandola digestiva della vongola *C. gallina* per il mese di luglio nei 4 siti. (A, B) Analisi PCoA non pesata basata sulla distanza metrica UniFrac tra i singoli campioni batterici. I campioni sono significativamente separati (test di permutazioni con rapporti pseudo-F,  $P$ -value < 0,05). (A) Ellissi costruite sui raggruppamenti dei campioni. (B) Analisi PCoA con

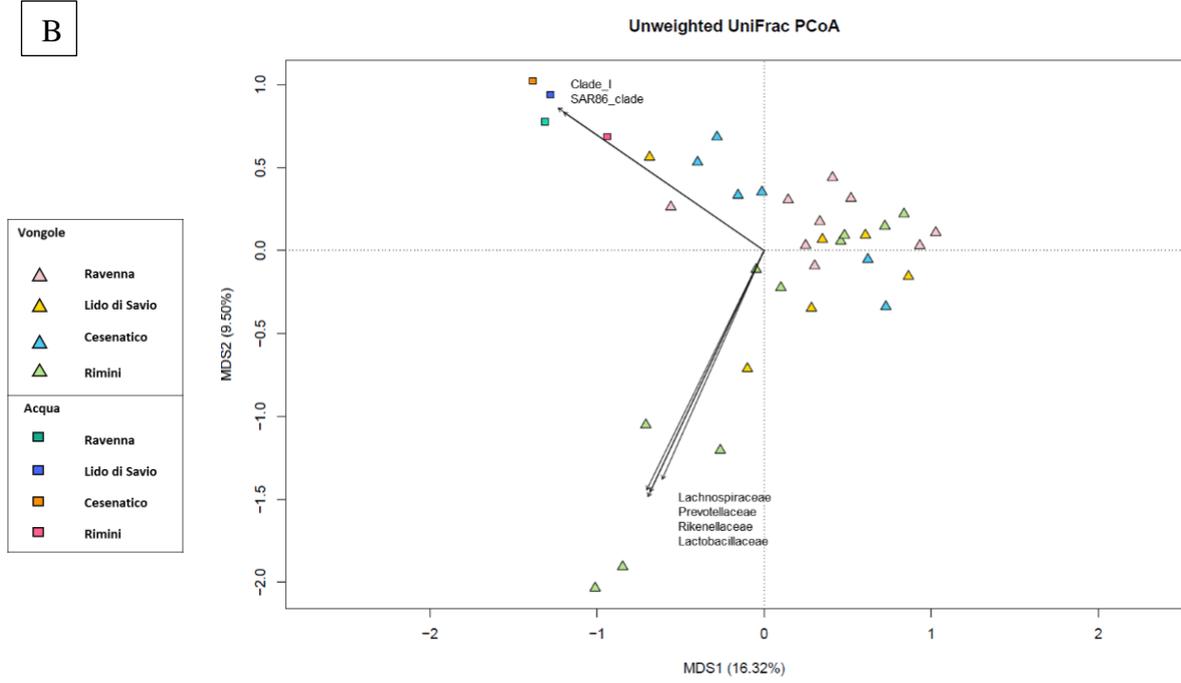
EnvFit  $p < 0,001$ . (C) Alfa diversità calcolata attraverso la diversità filogenetica di Faith (faith\_PD), la diversità a livello di OTU (Observed\_ASV), e diversità di Shannon per la ricchezza microbica (shannon).

Nel mese di settembre i campioni di *C. gallina* si trovano maggiormente sovrapposti graficamente rispetto alle altre condizioni sopracitate (Figura 14.A). I campioni di Rimini tendono a separarsi maggiormente dagli altri con le famiglie microbiche *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lactobacillaceae* come driver. I tre campioni di acqua risultano anche in questo caso fortemente diversi con Clade I e SAR86\_clade come drivers (Figura 14. B).

Il grafico della diversità alfa conferma la similarità dei campioni nei diversi siti, con un livello di diversità maggiore per il microbiota delle vongole provenienti da Cesenatico (Figura 14.C).



B



C

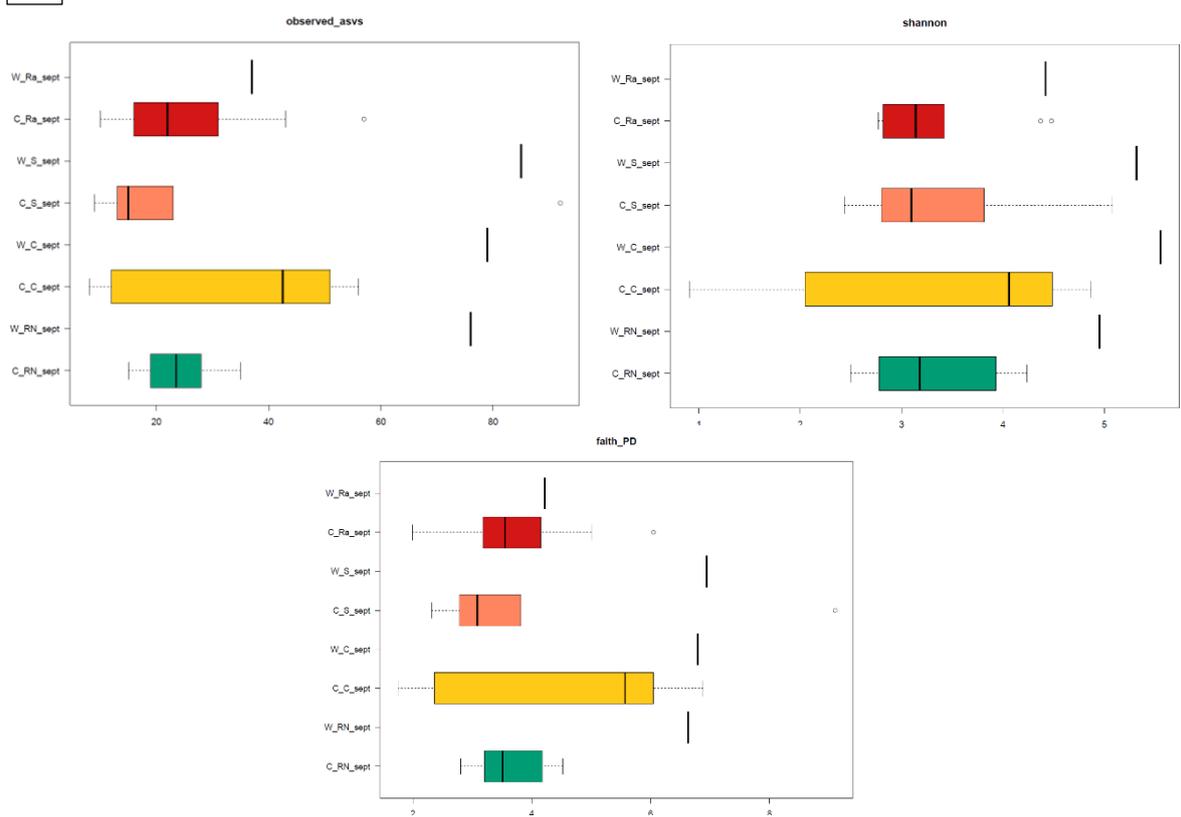
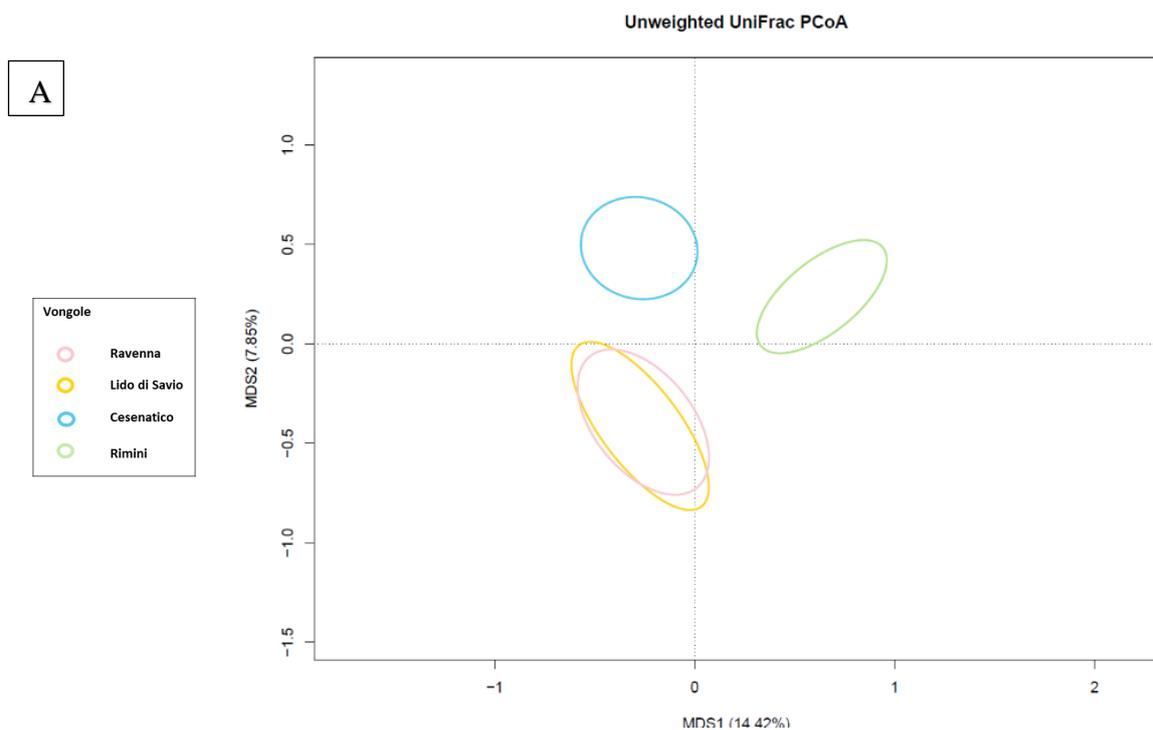


Figura 14 - I grafici rappresentano la beta e l'alfa diversità dei campioni di acqua e ghiandola digestiva della vongola *C. gallina* per il mese di **settembre** nei 4 siti. (A, B) Analisi PCoA non pesata basata sulla distanza metrica UniFrac tra i singoli campioni batterici. I campioni sono significativamente separati (test di permutazioni con rapporti pseudo-F,  $P\text{-value} < 0,05$ ). (A) Ellissi costruiti sui raggruppamenti dei campioni. (B) Analisi PCoA con

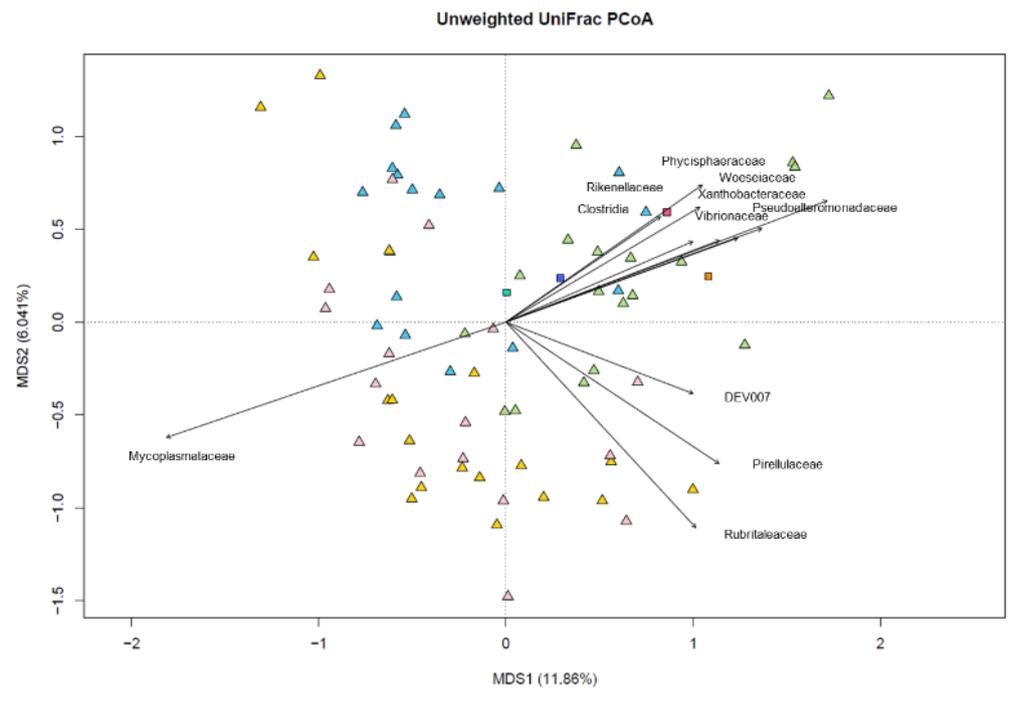
EnvFit  $p < 0,001$ . (C) Alfa diversità calcolata attraverso la diversità filogenetica di Faith (faith\_PD), la diversità a livello di OTU (Observed\_ASV), e diversità di Shannon per la ricchezza microbica (shannon).

Nel mese di novembre i campioni di *C. gallina* nei diversi siti sono ben differenziati (Figura 15.A). I campioni del microbiota della vongola di Lido di Savio e Ravenna nel grafico risultano sovrapposti e guidati nella separazione dalle famiglie microbiche *Mycoplasmataceae* e *Rubritaleaceae* (Figura 15.B). I campioni di Rimini e Cesenatico risultano nettamente diversi dagli altri due siti, seppure separati tra loro (Figura 15.A). Cesenatico presenta come driver di separazione *Phycisphaeraceae*, *Rikenellaceae* *Pseudoalteromonadaceae* *Clostridia*, *Xanthobacteraceae* e *Phycisphaeraceae* (Figura 15B).

Il grafico della diversità alfa conferma differenze significative per tutti e tre gli indici nel confronto tra Rimini e gli altri tre siti, che presenta una diversità maggiore.



B



C

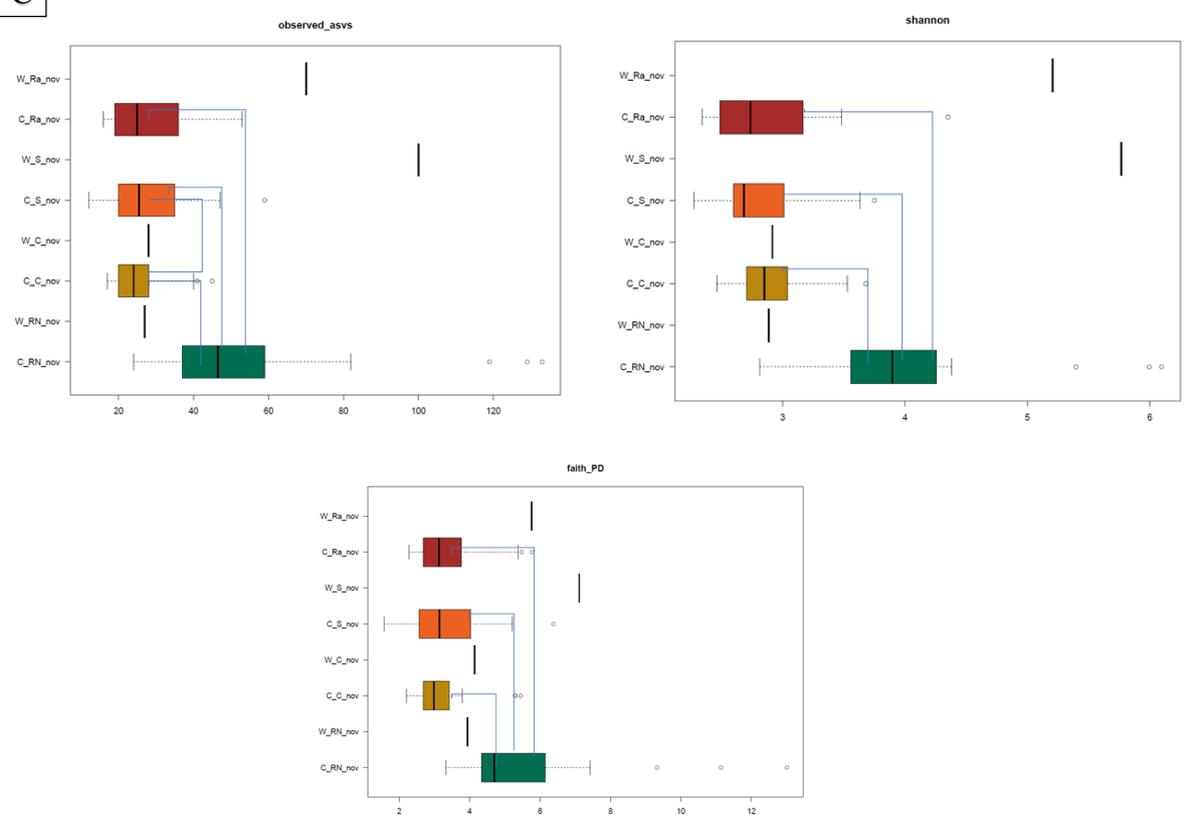


Figura 15 - I grafici rappresentano la beta e l'alfa diversità dei campioni di acqua e ghiandola digestiva della vongola *C. gallina* per il mese di **novembre** nei 4 siti. (A, B) Analisi PCoA non pesata basata sulla distanza metrica UniFrac tra i singoli campioni batterici. I campioni sono significativamente separati (test di permutazioni con

rapporti pseudo-F,  $P\text{-value} < 0,05$ ). (A) Ellissi costruiti sui raggruppamenti dei campioni. (B) Analisi PCoA con EnvFit  $p < 0,001$ . (C) Alfa diversità calcolata attraverso la diversità filogenetica di Faith (faith\_PD), la diversità a livello di OTU (Observed\_ASV), e diversità di Shannon per la ricchezza microbica (shannon).

In generale, nel mese di luglio il sito di Lido di Savio si separa nettamente dagli altri con *Nocardioideae*, *Xanthobacteraceae*, *Paenibacillaceae*, mentre per Cesenatico, Ravenna e Rimini sono le *Cyanobiaceae*.

Il mese di settembre Ravenna, Lido di Savio e Cesenatico si sovrappongono maggiormente, mentre Rimini si separa con *Lachnospiraceae*, *Rikenellaceae*, *Lactobacillaceae*, *Prevotellaceae* come driver.

Nel mese di novembre ritroviamo una maggiore separazione, Ravenna e Lido di Savio sono sovrapposti e guidati dalla famiglia delle *Mycoplasmataceae* e *Rubritaleaceae*; Rimini si separa nettamente da tutti, così come Cesenatico con *Phycisphaeraceae*, *Rikenellaceae* *Pseudoalteromonadaceae* *Clostridia*, *Xanthobacteraceae* e *Phycisphaeraceae* come driver.

## 4 Discussione

Nel presente studio è stato caratterizzato il microbiota presente nella ghiandola digestiva della vongola comune *Chamelea gallina* nell'area FLAG della costa emiliano-romagnola, scelta per la presenza di questo mollusco bivalve di forte interesse commerciale e protagonista di frequenti eventi di moria non ancora completamente chiariti. Finora la ricerca si è concentrata maggiormente sui patogeni presenti nei molluschi d'interesse commerciale come potenziale rischio per la salute umana, ma in questo campo sarebbe utile conoscere quali siano i patogeni potenzialmente dannosi per la sopravvivenza degli organismi stessi.

Sono state esplorate le variazioni stagionali nella struttura del microbiota della vongola e nell'ecosistema microbico dell'acqua di mare circostante in quattro siti scelti ad hoc secondo un gradiente di produttività, minore a Ravenna e maggiore a Rimini.

A giudicare dai dati abiotici di temperatura, salinità, pH e ossigeno disciolto raccolti, tra la zona Nord (Ravenna – Lido di Savio) e la zona sud (Cesenatico- Rimini) non sembrano esserci variazioni significative utili a spiegare la differenze di condizione dello stock (indice di condizione) e di diversità microbica associata alla vongola.

Il microbiota della vongola risulta ben differenziato da quello dell'acqua di mare, infatti, molti dei phylum batterici dominanti nell'acqua sono quasi del tutto assenti nel microbiota della vongola (Bacteroidota, Margulisbacteria, Bdellovibrionota), con una variazione specifica per ciascun sito. Questo conferma il fatto che gli animali, compresi i filtratori acquatici, sviluppano un proprio microbiota con una specifica funzione e la loro distribuzione non è casuale. Sia a livello di phylum, sia di famiglie, il microbiota di *C. gallina* è molto diversificato nei diversi siti tanto da non phylum batterici dominanti in comune nei quattro siti che presenti.

Considerando lo studio di condizione (indice di condizione) delle vongole, si nota come il sito di Rimini sembra rispondere meglio da un punto di vista prettamente morfologico, in quanto i valori dell'indice di condizione risultano generalmente più alti rispetto agli altri siti. Nel mese di settembre è possibile notare un trend positivo secondo il gradiente Nord-Sud, con un picco di condizione per il sito di Rimini.

Dallo studio della variazione della ricchezza microbica (alfa diversità) è emersa un importante separazione. Nell'area Nord, comprensiva dei siti Ravenna-Lido di Savio, si ha un riduzione della diversità (concorde per i tre indici); contrariamente all'area Sud, Cesenatico-Rimini, i quali presentano trend contrari ed opposti, ovvero la diversità microbica aumenta al passare del tempo. Esiste una correlazione diretta tra produttività e diversità microbica, poiché i cambiamenti nei microbiomi batterici sono implicati nelle prestazioni degli animali nello sviluppo di malattie, sia di origine batterica che virale, e nelle disbiosi innescate da fattori di stress ambientali (Infante-Villamil et al., 2021).

Le variazioni di diversità alfa che vedono una riduzione nel tempo (nei siti di Ravenna e Lido di Savio), sono sicuramente indice di stress dato che normalmente la diversità microbica, in individui in salute, dovrebbe aumentare nel tempo.

Una caratteristica interessante riscontrata in tutti i siti, attraverso lo studio della beta disvestita, è una netta separazione stagionale tra i campioni di luglio-settembre e i campioni di novembre.

Il sito di Rimini tende a separarsi in termini di distribuzione e diversità microbica (beta diversità) rispetto agli altri siti. Inoltre, questo stesso sito presenta il più alto indice di condizione ed una maggiore diversità microbica caratterizzata dall'abbondanza di cinque

famiglie batteriche (*Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lactobacillaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*); le quali potrebbero avere una funzione di promozione della crescita (Growth Promoting Bacteria). Le famiglie *Lachnospiraceae* e *Prevotellaceae* sono particolarmente importanti per la salute del sistema digerente, in quanto fortemente coinvolte nel metabolismo e di carboidrati complessi per la produzione di SCFA (acidi grassi a catena corta) (Zhang et al., 2018).

La famiglia delle *Rikenellaceae* è costituita da un gran numero di batteri coinvolti nel metabolismo dei lipidi con la produzione acidi grassi (come acetato, propionato, butirato e valerato) (Zhang et al., 2018).

La famiglia delle *Lactobacillaceae*, oltre ad avere un ruolo metabolico, tra cui la fermentazione dello zucchero (glucosio) in acido lattico, sono in grado di agire come stimolanti del sistema immunitario (Nagasaka et al., 2022). Anche le *Pseudoalteromonadaceae* potrebbero svolgere un ruolo benefico, poiché questa famiglia batterica sembrerebbe responsabile della produzione, oltre che di metaboliti primari, anche di composti bromurati con proprietà antibatteriche e antivirali (Ivanova et al., 2013). Si ipotizza, quindi, che la bassa mortalità ed il buono stato dello stock sia dovuto, almeno in parte, alla presenza dei GPB (Growth Promoting Bacteria).

In questo lavoro di tesi non sono presenti i dati del microbiota associato ai sedimenti, ma si pensa che questa informazione possa fornire nuove indicazioni su quali possano essere i driver batterici di separazione tra i diversi siti e stagioni. In futuro, si prevede di caratterizzare il microbiota associato ai sedimenti in cui vive *Chamelea gallina* come possibile source di GPB, tramite esperimenti condotti in ambiente controllato.

Indagare la diversità e la composizione della comunità microbica di *Chamelea gallina* e quella dell'ambiente in cui questo bivalve vive, durante il susseguirsi di variazioni climatiche, è fondamentale per comprendere il significato fisiologico dell'associazione tra il microbiota dell'organismo ospite e l'ambiente circostante, in modo da contribuire alla spiegazione delle concause che portano ad eventi di mortalità di massa.

## 5 Conclusioni

Il fine ultimo di questo progetto FLAG per il recupero della vongola comune *Chamelea gallina* è quello di sviluppare un approccio innovativo per risolvere le cause dell'attuale mortalità, arrivando all'identificazione di nuove strategie di gestione e produzione, al fine di tutelare le specie autoctone recuperando gli standard di produttività.

Nell'ambito dell'acquacoltura vengono ad oggi impiegati una serie di potenziali probiotici, inclusi batteri, batteriofagi, funghi e lieviti (Hai et al., 2015; Newaj-Fyzul & Austin, 2015; Verschuere et al., 2000), utili a mitigare gli effetti di malattie e stress esogeni negli organismi.

La formulazione dei probiotici nel caso delle vongole verrebbe basata su quelle famiglie batteriche GPB selezionate da questo lavoro.

Questi probiotici in acquacoltura vengono somministrati all'ospite o al suo ambiente mediante la dieta artificiale o tramite cibo vivo (precedentemente trattato), o eventualmente, aggiunti all'acqua di coltura. Queste stesse metodologie sarebbero di difficile impiego in un ambiente aperto, dove non è possibile la somministrazione tramite dieta o attraverso l'acqua a causa del fenomeno di diluizione. Per questo si pensa che un approccio innovativo possa essere la somministrazione di probiotici scelti ad hoc sulla base del monitoraggio del microbiota dell'organismo, attraverso tecniche di inoculo di batteri benefici per l'ospite, direttamente nei sedimenti. Tecniche simili vengono già impiegate in ambiente terrestre attraverso l'utilizzo di bioinoculanti PGRP (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) i quali promuovono direttamente o indirettamente la crescita e lo sviluppo delle piante attraverso la produzione di segnali regolatori, antibiotici e nutrienti partendo sul suolo in cui vivono (Chaudhary et al., 2020).

## Bibliografia

- Barillari, A., A. Boldrin, C. Mozzi, S. Rabitti. 1979. Alcune relazioni tra natura dei sedimenti e presenza della vongola *Chamelea (Venus) gallina* (L.) in Alto Adriatico presso Venezia (Note on sediments hosting *Chamelea (Venus) gallina* L. in areas of the North-ern Adriatic off Venice). *Atti Ist. Veneto Sci. Lett. Arti Classi Sci. Mat. Nat.*, 137: 19-34.
- Barone, M., Turrone, S., Rampelli, S., Soverini, M., D'Amico, F., Biagi, E., Brigidi, P., Troiani, E., & Candela, M. (2019). Gut microbiome response to a modern Paleolithic diet in a Western lifestyle context. *PLoS ONE*, 14(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0220619>
- Beaz Hidalgo, R., Cleenwerck, I., Balboa, S., de Wachter, M., Thompson, F. L., Swings, J., de Vos, P., & Romalde, J. L. (2008). Diversity of *Vibrios* associated with reared clams in Galicia (NW Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 31(3), 215–222. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2008.04.001>
- Blaser, M. J. (2014). The microbiome revolution. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4162–4165. <https://doi.org/10.1172/JCI178366>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 2019 37:8, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bosch, T. C. G., & McFall-Ngai, M. J. (2011). Metaorganisms as the new frontier. *Zoology*, 114(4), 185–190. <https://doi.org/10.1016/J.ZOOL.2011.04.001>
- Brooks, S. P. J., de Zwaan, A., van den Thillart, G., Cattani, O., Cortesi, P., & Storey, K. B. (1991). Differential survival of *Venus gallina* and *Scapharca inaequalis* during anoxic stress: Covalent modification of phosphofructokinase and glycogen phosphorylase during anoxia. *Journal of Comparative ~o~... SyStemic, and Environ-Physiology B ~~ Physiology*, 161, 207–212.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 2016 13:7, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carpenter, R. C. (1990). Mass mortality of *Diadema antillarum* - I. Long-term effects on sea urchin population-dynamics and coral reef algal communities. *Marine Biology*, 104(1), 67–77. <https://doi.org/10.1007/BF01313159/METRICS>
- Chaudhary, T., Dixit, M., Gera, R., Shukla, A. K., Prakash, A., Gupta, G., & Shukla, P. (2020). Techniques for improving formulations of bioinoculants. *3 Biotech*, 10(5), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S13205-020-02182-9/TABLES/2>
- Deines, P., & Bosch, T. C. G. (2016). Transitioning from microbiome composition to microbial community interactions: The potential of the metaorganism hydra as an experimental

- model. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1610.  
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01610/BIBTEX>
- Diaz, R. J., & Rosenberg, R. (2011). *Overview of Anthropogenically-Induced Hypoxic Effects on Marine Benthic Fauna*. 129–145. <https://doi.org/10.1029/CE058P0129>
- Edgar, R. C., & Bateman, A. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461.  
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ461>
- Ezgeta-Balić, D., Rinaldi, A., Peharda, M., Prusina, I., Montalto, V., Niceta, N., & Sarà, G. (2011). An energy budget for the subtidal bivalve *Modiolus barbatus* (Mollusca) at different temperatures. *Marine Environmental Research*, 71(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.10.005>
- Froggia, C., & Bolognini, S. (1987). Clam fishery with hydraulic dredges in the Adriatic Sea. Studies and Reviews-General Fisheries Council for the Mediterranean (FAO).
- Giorgi, F., & Lionello, P. (2008). Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change*, 63(2–3), 90–104.  
<https://doi.org/10.1016/J.GLOPLACHA.2007.09.005>
- Gootenberg, D. B., & Turnbaugh, P. J. (2011). COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Humanized animal models of the microbiome. *Journal of Animal Science*, 89(5), 1531–1537. <https://doi.org/10.2527/JAS.2010-3371>
- Grazioli, E., Guerranti, C., Pastorino, P., Esposito, G., Bianco, E., Simonetti, E., Rainis, S., Renzi, M., & Terlizzi, A. (2022). Review of the Scientific Literature on Biology, Ecology, and Aspects Related to the Fishing Sector of the Striped Venus (*Chamelea gallina*) in Northern Adriatic Sea. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(9), 1328.  
<https://doi.org/10.3390/JMSE10091328/S1>
- Hai, N. v, Ngo, C., & Hai, V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917–935. <https://doi.org/10.1111/JAM.12886>
- Infante-Villamil, S., Huerlimann, R., & Jerry, D. R. (2021). Microbiome diversity and dysbiosis in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 1077–1096.  
<https://doi.org/10.1111/RAQ.12513>
- Ivanova, E. P., Ng, H. J., & Webb, H. K. (2013). The family pseudoalteromonadaceae. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*, 575–582. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1\\_229/COVER](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_229/COVER)
- Kostic, A. D., Howitt, M. R., & Garrett, W. S. (2013). Exploring host–microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development*, 27(7), 701–718.  
<https://doi.org/10.1101/GAD.212522.112>
- Lattos, A., Chaligiannis, I., Papadopoulos, D., Giantsis, I. A., Petridou, E. I., Vafeas, G., Staikou, A., & Michaelidis, B. (2021). How Safe to Eat Are Raw Bivalves? Host Pathogenic and Public Health Concern Microbes within Mussels, Oysters, and Clams in Greek Markets. *Foods 2021, Vol. 10, Page 2793*, 10(11), 2793. <https://doi.org/10.3390/FOODS10112793>

- Mann, R., & Glomb, S. J. (1978). The effect of temperature on growth and ammonia excretion of the Manila clam *Tapes japonica*. *Estuarine and coastal marine science*, 6(3), 335-339.
- Masella, A. P., Bartram, A. K., Truszkowski, J. M., Brown, D. G., & Neufeld, J. D. (2012). PANDAseq: Paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-31/FIGURES/4>
- Mathai, P. P., Magnone, P., Dunn, H. M., & Sadowsky, M. J. (2020). Water and sediment act as reservoirs for microbial taxa associated with invasive dreissenid mussels. *Science of The Total Environment*, 703, 134915. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.134915>
- Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Finos, L., Bressan, M., & Marin, M. G. (2012). First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033820>
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. v., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A. H., Kremer, N., Mazmanian, S. K., Metcalf, J. L., Nealon, K., Pierce, N. E., ... Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3229–3236. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1218525110/SUPPL\\_FILE/PNAS.201218525SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1218525110/SUPPL_FILE/PNAS.201218525SI.PDF)
- Meisterhans, G., Raymond, N., Girault, E., Lambert, C., Bourrasseau, L., de Montaudouin, X., Garabetian, F., & Jude-Lemeilleur, F. (n.d.). *INVERTEBRATE MICROBIOLOGY*. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0662-z>
- Milan, M., Bernardini, I., Bertolini, C., Dalla Rovere, G., Manuzzi, A., Pastres, R., Peruzza, L., Smits, M., Fabrello, J., Breggion, C., Sambo, A., Boffo, L., Gallochio, L., Carrer, C., Sorrentino, F., Bettiol, C., Lodigiulia, C., Semenzin, E., Varagnolo, M., ... Patarnello, T. (2023). Multidisciplinary long-term survey of Manila clam grown in farming sites subjected to different environmental conditions. *Science of The Total Environment*, 863, 160796. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.160796>
- Milan, M., Matozzo, V., Pauletto, M., di Camillo, B., Giacomazzo, M., Boffo, L., Binato, G., Marin, M. G., Patarnello, T., & Bargelloni, L. (2016). Can ecological history influence response to pollutants? Transcriptomic analysis of Manila clam collected in different Venice lagoon areas and exposed to heavy metal. *Aquatic Toxicology*, 174, 123–133. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2016.02.024>
- Milan, M., Palazzo, F., Chiara Papetti, ·, Grotta, L., Marchetti, S., Patarnello, T., Luca Bargelloni, ·, & Martino, G. (2016). Transcriptomic profiling of *Chamelea gallina* from sites along the Abruzzo coast (Italy), subject to periodic localized mortality events. *Marine Biology*, 163. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2971-2>
- Milan, M., Smits, M., Dalla Rovere, G., Iori, S., Zampieri, A., Carraro, L., Martino, C., Papetti, C., Ianni, A., Ferri, N., Iannaccone, M., Patarnello, T., Brunetta, R., Ciofi, C., Grotta, L., Arcangeli, G., Bargelloni, L., Cardazzo, B., & Martino, G. (2019). *Host-microbiota interactions shed light on mortality events in the striped venus clam Chamelea gallina*. <https://doi.org/10.1111/mec.15227>

- Mohanty, B., Mohanty, S., Sahoo, J., Sharma, A., Mohanty, B., Mohanty, S., Sahoo, J., & Sharma, A. (2010). Climate Change: Impacts on Fisheries and Aquaculture. *Climate Change and Variability*. <https://doi.org/10.5772/9805>
- Monari, M., Foschi, J., Rosmini, R., Marin, M. G., & Serrazanetti, G. P. (2011). Heat shock protein 70 response to physical and chemical stress in *Chamelea gallina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 397(2). <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.11.016>
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Marin, M. G., & Cattani, O. (2005). Exposure to anoxia of the clam, *Chamelea gallina* II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 325(2), 175–188. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2005.05.001>
- Morello, E. B., Frogli, C., Atkinson, R. J. A., & Moore, P. G. (2005). Hydraulic dredge discards of the clam (*Chamelea gallina*) fishery in the western Adriatic Sea, Italy. *Fisheries Research*, 76(3), 430–444. <https://doi.org/10.1016/J.FISHRES.2005.07.002>
- Moschino, V., Deppieri, M., & Marin, M. G. (2003). Evaluation of shell damage to the clam *Chamelea gallina* captured by hydraulic dredging in the Northern Adriatic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 60(2). [https://doi.org/10.1016/S1054-3139\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S1054-3139(03)00014-6)
- Moschino, V., & Marin, M. G. (2006). Seasonal changes in physiological responses and evaluation of “well-being” in the Venus clam *Chamelea gallina* from the Northern Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(4), 433–440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.021>
- Musella, M., Wathsala, R., Tavella, T., Rampelli, S., Barone, M., Palladino, G., Biagi, E., Brigidi, P., Turroni, S., Franzellitti, S., & Candela, M. (2020). Tissue-scale microbiota of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and its relationship with the environment. *Science of the Total Environment*, 717. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.137209>
- Nagasaka, M., Al-Share, B., Shao, Y. F., Sexton, R., al Hallak, M. N., Azmi, A. S., & Sukari, A. (2022). The Gut Microbiome and Cancer: A Comprehensive Review of Melanoma, Lung, Head and Neck and Gastrointestinal Tumors. *Comprehensive Gut Microbiota*, 339–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819265-8.00047-4>
- Newaj-Fyzul, A., & Austin, B. (2015). Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *Journal of Fish Diseases*, 38(11), 937–955. <https://doi.org/10.1111/JFD.12313>
- Palladino, G., Rampelli, S., Galià-Camps, C., Scicchitano, D., Trapella, G., Nanetti, E., Angelini, V., Cleo, D., Turroni, S., Corinaldesi, C., & Candela, M. (2022). Plasticity of the *Anemonia viridis* microbiota in response to different levels of combined anthropogenic and environmental stresses. *Frontiers in Marine Science*, 9, 1871. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2022.956899/BIBTEX>

- Palladino, G., Rampelli, S., Scicchitano, D., Musella, M., Quero, G. M., Prada, F., Mancuso, A., Seyfarth, A. M., Turroni, S., Candela, M., & Biagi, E. (2021). Impact of Marine Aquaculture on the Microbiome Associated with Nearby Holobionts: The Case of *Patella caerulea* Living in Proximity of Sea Bream Aquaculture Cages. *MICROORGANISMS*, 9(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9020455>
- Frogliola, C. (1975) -Quad. Lab. Tecnol., & 1975. Osservazioni sull'accrescimento di *Chamelea gallina* (L.) ed *Ensis minor* (Chenu) nel medio Adriatico. *Researchgate.Net*. Retrieved January 5, 2023, from [https://www.researchgate.net/profile/Carlo-Frogliola/publication/321875050\\_Osservazioni\\_sull'accrescimento\\_di\\_Chamelea\\_gallina\\_L\\_ed\\_Ensis\\_minor\\_Chenu\\_nel\\_medio\\_Adriatico/links/5a3786fc45851532e832c11a/Osservazioni-sullaccrescimento-di-Chamelea-gallina-L-ed-Ensis-minor-Chenu-nel-medio-Adriatico.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Carlo-Frogliola/publication/321875050_Osservazioni_sull'accrescimento_di_Chamelea_gallina_L_ed_Ensis_minor_Chenu_nel_medio_Adriatico/links/5a3786fc45851532e832c11a/Osservazioni-sullaccrescimento-di-Chamelea-gallina-L-ed-Ensis-minor-Chenu-nel-medio-Adriatico.pdf)
- Pierce, M. L., & Ward, J. E. (2018). Microbial Ecology of the Bivalvia, with an Emphasis on the Family Ostreidae. *Https://Doi.Org/10.2983/035.037.0410*, 37(4), 793–806. <https://doi.org/10.2983/035.037.0410>
- Poulin, R. (2006). Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*, 132(1), 143–151. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008693>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219>
- Rizzo, G., Cernigoi, F., Marčeta, T., Bressan, M., & Marin, M. G. (2011). Aspetti fisiologici e riproduttivi in *chamelea gallina* come contributo alla gestione della risorsa nel nord adriatico *Biol. Mar. Mediterr*, 18(1), 324–325.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016(10), e2584. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.2584/FIG-7>
- Romanelli, M., Angela CORDISCO, C., & Giovanardi, O. (2009). *The long-term decline of the Chamelea gallina L. (Bivalvia: Veneridae) clam fishery in the Adriatic Sea: is a synthesis possible?* 50(2), 171–205.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2017). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition* 2017 57:1, 57(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/S00394-017-1445-8>
- Tagliapietra, D., Magni, P., Basset, A., & Viaroli, P. (n.d.). *Ecosistemi costieri di transizione: trasformazioni recenti, pressioni antropiche dirette e possibili impatti del cambiamento climatico* §
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,

64(4), 655–671. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000/ASSET/005E0DD9-2B21-4FF3-B95E-5C0F039AFF18/ASSETS/GRAPHIC/MR0400025001.JPEG>

VISCIANO, P., SCORTICHINI, G., SUZZI, G., DILETTI, G., SCHIRONE, M., & MARTINO, G. (2015). Concentrations of Contaminants with Regulatory Limits in Samples of Clam (*Chamelea gallina*) Collected along the Abruzzi Region Coast in Central Italy. *Journal of Food Protection*, 78(9), 1719–1728. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-082>

Zhang, L., Wu, W., Lee, Y. K., Xie, J., & Zhang, H. (2018). Spatial heterogeneity and co-occurrence of mucosal and luminal microbiome across swine intestinal tract. *Frontiers in Microbiology*, 9(JAN), 48. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00048/BIBTEX>

## Sitografia

*Caratteristiche della costa — Arpae Emilia-Romagna*. (n.d.). Retrieved December 27, 2022, from <https://www.arpae.it/it/temi-ambientali/balneazione/scopri-di-piu/caratteristiche-della-costa>

*Masaf - Piano di Gestione Nazionale per le attività di pesca con il sistema draghe idrauliche e rastrelli da natante*. (n.d.). Retrieved January 7, 2023, from <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/13760>