



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI
FARMACIA E BIOTECNOLOGIE

“Tecniche innovative microbiome-based per il recupero della vongola comune nelle aree ad alta mortalità nell’area flag dell’Emilia-Romagna (T.Micro.V)”

**Beneficiario: Alma Mater Studiorum-Università di Bologna
Gruppo di lavoro: Università di Bologna-FABIT**

**Progetto finanziato nell’ambito Piano di azione FLAG Costa Emilia-Romagna
PO FEAMP 2014 2020 Priorità 4
Azione 3.A. Diversificazione dei prodotti ittici e della pesca – Intervento 3.A.2 Azioni a
finalità collettive, progetti pilota
Regolamenti (UE) 1303/2013 e 508/2014**



Sommario

1 Introduzione	3
2 Identificazione dei siti di campionamento nell'area FLAG tra Ravenna e Rimini e raccolta dei campioni.	4
2.2 Parametri abiotici:.....	5
3 Caratterizzazione dei microbioti di vongola, sedimenti e acqua nei siti selezionati e dello stato di salute e performance di crescita.	6
3.1 Analisi del Microbiota:	6
3.1.1 Preparazione dei campioni per le analisi microbiologiche:.....	6
3.1.2 Estrazione del DNA microbico:	6
3.1.3 Amplificazione del gene 16S del rRNA microbico e preparazione delle librerie NGS per il sequenziamento del gene del 16S del rRNA batterico:	6
4 Caratterizzazione dell'assetto del microbiota della vongola in relazione allo stato di salute, produttività e variabili ambientali nei siti selezionati	9
4.1 Data set:	9
4.2 Analisi del microbiota di C. gallina:	9
4.2.1 Composizione del microbiota di Chamelea gallina:	9
4.3 Valutazione dello stato fisiologico di C.gallina:.....	27
4.3.1 Estrazione RNA, preparazione cDNA e qPCR.....	28
4.3.2 Analisi statistiche	28
4.3.3 Risultati	29
5 Creazione di linee guida per il monitoraggio dello stato della dinamica del microbiota della vongola nel ciclo produttivo come indicatore di salute e produttività.	32
6 Sviluppo di approcci basati su biopromotori per il controllo e la modulazione del microbiota della vongola per favorirne una configurazione probiotica.	32
6.1 Sperimentazione in acquario:	32
7 Bibliografia:	36

1 Introduzione

La vongola adriatica (*Chamelea gallina*), oggetto di questo progetto, è una specie tipicamente mediterranea, ma può essere ritrovata anche nel Mar Nero, nel Mar Caspio e lungo le coste europee dell'Atlantico, dalla Norvegia al Marocco. In Adriatico occidentale è presente lungo la fascia costiera, dall'intertidale fino a profondità di 12-15 metri. I popolamenti più abbondanti si ritrovano solitamente tra i 3 ed i 6 metri di profondità (Pellizzato e Penzo, 2011). In questa zona, la vongola adriatica ha un elevato interesse commerciale, al punto che la sua abbondanza è diminuita a causa del sovrasfruttamento dello stock negli ultimi 50 anni, nonostante varie misure adottate per limitare lo sforzo di pesca (taglia minima di cattura, creazione di consorzi di pesca locali). Ultimamente, il declino della biomassa è stato aggravato dal verificarsi di numerosi eventi irregolari di mortalità, di cui non si conoscono le cause (Papetti et al., 2018; Pellizzato e Penzo 2011). In questo contesto, il progetto T.Micro.V si pone come obiettivo quello di analizzare le dinamiche degli ecosistemi microbici nell'interazione tra vongola, acqua e sedimento nell'area FLAG (denominazione del gruppo di azione locale attivo nel settore pesca per l'intero territorio della Regione Emilia-Romagna), con l'obiettivo di sviluppare un approccio innovativo che possa risolvere le cause della attuale mortalità. Lo stato di salute di *Chamelea gallina* e la sua produttività lungo la costa emiliano romagnola sono state indagate attraverso analisi del microbiota, analisi molecolari ed analisi morfologiche, nel contesto delle diverse variabili ambientali biotiche ed abiotiche, che caratterizzano i diversi siti. Per valutare la capacità dei sedimenti di agire come biopromotori per il recupero delle condizioni di produttività nei siti a elevata mortalità si è proceduto all'allestimento di test all'interno di un sistema controllato.

2 Identificazione dei siti di campionamento nell'area FLAG tra Ravenna e Rimini e raccolta dei campioni.

I siti di campionamento sono stati selezionati sulla base dell'identificazione delle zone ad alta, intermedia e bassa produttività di *C. gallina* nell'area FLAG, a seguito dell'analisi dei dati di produttività e grazie al riscontro di Manuel Guidotti, presidente del "Cogemo Ravenna", consorzio per la gestione della pesca dei molluschi bivalvi. In particolare, sono stati individuati 4 siti di campionamento - Ravenna, Lido di Savio, Cesenatico e Rimini – di cui i primi due ad alto impatto di mortalità e gli ultimi due a medio e basso impatto. Sono stati effettuati tre diversi campionamenti nel corso della stagione di pesca (iniziale, intermedia e tardiva): a luglio (25/07/2022), settembre (23/09/2022) e novembre (10/11/2022). Per ciascun sito di campionamento sono state prelevate 50 vongole, 50 mL di sedimenti e 2L di acqua. Le vongole sono state prelevate tramite draghe idrauliche, mentre i sedimenti e l'acqua sono stati prelevati rispettivamente tramite benna e Niskin bottle (Tabella 1). Il campionamento è stato effettuato a bordo del moto peschereccio Asterix dai due borsisti, il dott. Nicolò Cinti e dalla dott.ssa Giulia Trapella. A seguito della raccolta i campioni sono stati stoccati a +4° C per il trasporto in laboratorio. Qui, i campioni di vongola adriatica sono stati immediatamente processati in condizioni sterili per il prelievo delle ghiandole digestive, che sono state successivamente congelate e conservate a -80°C fino al momento delle analisi. Inoltre, sono state effettuate le misurazioni biometriche. Sono stati valutati peso della conchiglia e del tessuto fresco utilizzando una bilancia di precisione (SAUTER Re 2012 Precision Electronic Weighing Scales, METTLER TOLEDO Instruments) e lunghezza e larghezza della conchiglia mediante calibro (sensibilità ± 0.05 mm). È stato calcolato il fattore di condizione (Zeng, Y., & Yang, H. 2021), ovvero una metrica di produzione ampiamente utilizzata per valutare lo stato di salute, la crescita, lo stato riproduttivo, la resa della carne e gli effetti degli stress ambientali negli animali. In questo caso, l'indice di condizione è stato calcolato tenendo conto del rapporto tra il peso del tessuto molle ed il peso totale dell'animale (Zeng e Yang, 2021).

L'intera area oggetto di studio viene regolarmente monitorata dall'Agenzia Regionale per la Prevenzione, l'Ambiente e l'Energia dell'Emilia-Romagna, Italia (ARPAE) che misura i parametri dell'acqua di mare, la biomassa algale e la presenza di tossine algali (<https://www.arpae.it>). I metadati ambientali sono stati estrapolati per i tre periodi di campionamento.

Disegno di campionamento			Ravenna	Lido di Savio	Cesenatico	Rimini
Tipologia di campione	Vongola	Luglio	50	50	50	50
		Settembre	50	50	50	50
		Novembre	50	50	50	50
	Acqua	Luglio	2L	2L	2L	2L
		Settembre	2L	2L	2L	2L
		Novembre	2L	2L	2L	2L
	Sedimenti	Luglio	300 mg	300 mg	300 mg	300 mg
		Settembre	300 mg	300 mg	300 mg	300 mg
		Novembre	300 mg	300 mg	300 mg	300 mg

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 nei 4 siti (Ravenna, Lido di Savio, Cesenatico, Rimini) e nei 3 periodi (luglio, settembre, novembre).

2.2 Parametri abiotici:

Dai dati forniti dal bollettino mare pubblicato dall'ARPA (Tabella 2) 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, che varia di +0,52 psu a luglio, +0,84 psu a settembre e +1,23 novembre. Queste variazioni possono essere giustificate dall'afflusso di acqua dolce proveniente dal fiume Po ed altri fiumi minori in prossimità del sito di Ravenna.

	Ravenna-Lido di Savio			Cesenatico-Rimini		
	Luglio	Settembre	Novembre	Luglio	Settembre	Novembre
Temperatura °C	28.44	25.63	17.43	28.58	25.58	17.32
Salinità psu	37.49	36.44	34.83	37.28	37.28	36.06
pH	8.15	8.34	8.43	8.28	8.28	8.4
O.D. fondo mg/L	5.58	5.75	6.75	5.91	5.91	7.11

Tabella 2 – Nella tabella sono stati riportati i dati ambientali di temperatura, salinità, pH e ossigeno disciolto sul fondo, raccolti dal database dell'ARPAE.

3 Caratterizzazione dei microbioti di vongola, sedimenti e acqua nei siti selezionati e dello stato di salute e performance di crescita.

3.1 Analisi del Microbiota:

3.1.1 Preparazione dei campioni per le analisi microbiologiche:

Per ogni sito le ghiandole digestive sono state raggruppate in base 3 nella stessa provetta da 1,5 ml per ottenere un pool di 14 - 18 campioni, utile a massimizzare il risultato in fase di estrazione del DNA microbico totale. L'acqua è stata filtrata tramite una pompa a vuoto e sono state utilizzate membrane filtrati (MF-Millipore) di cellulosa con pori di 0,22 µm e un diametro di 47 mm per raccogliere il materiale biologico.

3.1.2 Estrazione del DNA microbico:

Per l'estrazione del DNA microbico totale dalla ghiandola digestiva e dai sedimenti è stato utilizzato DNeasy PowerSoil kit pro della Qiagen (Musella et al., 2020). Il DNA microbico dei campioni di acqua, presente sulla membrana di cellulosa, è stato processato tramite il DNeasy PowerWater kit (Qiagen) (Palladino et al., 2022). Tutto il DNA microbico estratto è stato quantificato tramite NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, United States) e i campioni di DNA sono stati conservati a -20 °C.

3.1.3 Amplificazione del gene 16S del rRNA microbico e preparazione delle librerie NGS per il sequenziamento del gene del 16S del rRNA batterico:

Le regioni ipervariabili V3-V4 del gene 16S del rRNA batterico, di tutti i campioni, sono state amplificate tramite reazione a catena delle polimerasi (PCR) utilizzando i primer forward 314 e reverse 785. Per la PCR sono stati effettuati 30 cicli di amplificazione con il seguente termociclo: 3 minuti a 95 °C, poi 30 cicli di 30 secondi a 95 °C, 30 secondi a 55°C e 30 secondi a 72°C sempre uno step finale di elongazione a 72°C per 5 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati purificati tramite biglie magnetiche (Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, CA, United States)). Le librerie NGS indicizzate sono state preparate mediante PCR a ciclo limitato con tecnologia Nextera e nuovamente purificate con biglie magnetiche. Le librerie sono state poi quantificate tramite Qubit 3.0 fluorimeter (Invitrogen, Waltham, MA, United States), normalizzate a 4 nM e raggruppate in un pool rappresentativo di tutte le sequenze genomiche.

3.1.4 Analisi bioinformatica:

Le sequenze di output per un totale di 171 campioni (sequenze di output dei campioni di: vongole, acqua e sedimenti) sono state processate tramite la combinazione delle pipeline PANDAseq e QIIME2. La funzione “fastq filter” dell’algoritmo Usearch (Edgar, 2010) è stata applicata per mantenere sequenze di alta qualità (lunghezza min/max = 350/550 bp). In particolare, sulla base delle probabilità del punteggio phred Q, le sequenze che presentano un errore atteso per base $E = 0,03$ (ovvero tre errori attesi ogni 100 basi) o superiore sono state scartate. Le sequenze conservate sono state quindi raggruppate in varianti di sequenza di ampliconi (ASV) utilizzando DADA2 (Callahan et al., 2016). È stata eseguita l’assegnazione tassonomica utilizzando l’algoritmo VSEARCH (Rognes et al., 2016) e il database SILVA (versione del 2022) (Quast et al., 2012). Tutte le sequenze assegnate agli eucarioti o non assegnate sono state scartate.

Attraverso questa procedura sono stati scartati 3 campioni arrivando ad un totale di 168 campioni:

- 145 campioni del microbiota delle vongole appartenenti ai periodi:
 - 45 in luglio (12 Ravenna, 8 Lido di Savio, 9 Cesenatico, 16 Rimini)
 - 32 in settembre (9 Ravenna, 6 Lido di Savio, 7 Cesenatico, 10 Rimini)
 - 69 novembre (16 Ravenna, 18 Lido di Savio, 17 Cesenatico, 18 Rimini)
- 11 campioni di sedimenti appartenenti ai periodi luglio, settembre e novembre (3 Ravenna, 3 Lido di Savio, 3 Cesenatico, 2 Rimini)
- 12 campioni di acqua appartenenti ai periodi luglio, settembre e novembre (3 Ravenna, 3 Lido di Savio, 3 Cesenatico, 3 Rimini)

3.1.5 Analisi statistiche:

Le analisi statistiche sui dati bioinformatici sono state eseguite per identificare le caratteristiche e le dinamiche del microbiota della vongola, e dell'ambiente in cui vive (acqua e sedimenti), in modo da comprendere i meccanismi coinvolti nelle alterazioni disbiotiche associate a bassa produttività. Queste analisi statistiche sono state eseguite tramite R software (R Core Team; www.r-project.org - last access: March 2021), v. 4.1.2, utilizzando il pacchetto "vegan" (<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>).

Per facilità di rappresentazione i phyla e le famiglie batteriche con abbondanze relative inferiori al 3% sono stati filtrati. L'alfa diversità è stata calcolata tramite la diversità di Shannon per la ricchezza microbica. Il test della somma dei ranghi di Wilcoxon è stato utilizzato per valutare le differenze significative tra le mediane dei diversi boxplot prodotti.

La beta diversità è stata calcolata utilizzando le distanze UniFrac 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.

4 Caratterizzazione dell'assetto del microbiota della vongola in relazione allo stato di salute, produttività e variabili ambientali nei siti selezionati

4.1 Data set:

L'amplificazione, tramite PCR, ed il sequenziamento hanno prodotto un totale di: 145 campioni provenienti dalla ghiandola gastrica di *Chamelea gallina*, 12 campioni di acqua e 23 campioni di sedimenti (il numero di repliche per sito e mese è riportato nella Tabella 3).

Sito stagione	Ravenna			Lido di Savio			Cesenatico			Rimini		
	clam	water	sediment	clam	water	sediment	clam	water	sediment	clam	water	sediment
Luglio	12	1	1	8	1	1	9	1	1	16	1	1
Settembre	9	1	1	6	1	1	7	1	1	10	1	1
Novembre	16	1	1	18	1	1	17	1	1	18	1	

Tabella 3: Nella tabella sono stati riportati il numero di repliche ottenute alla fine del processo di estrazione.

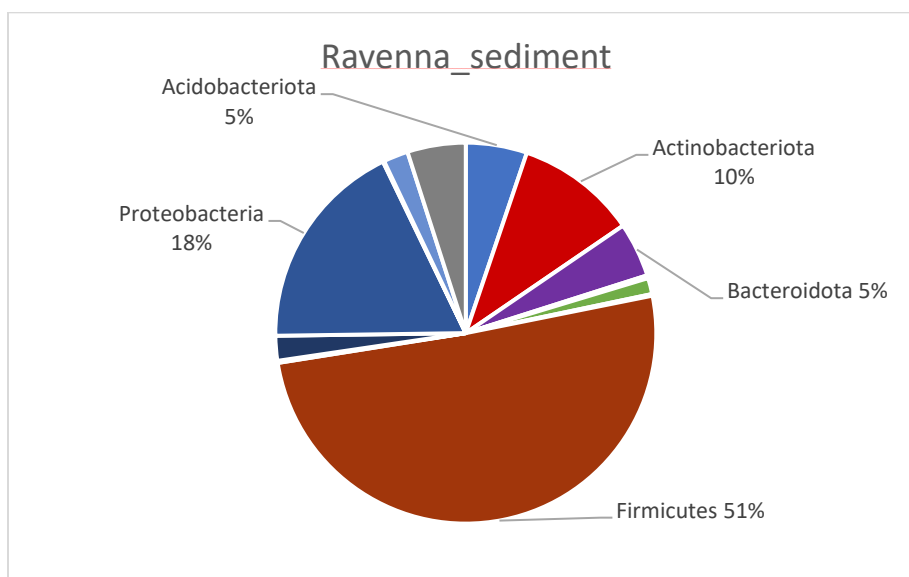
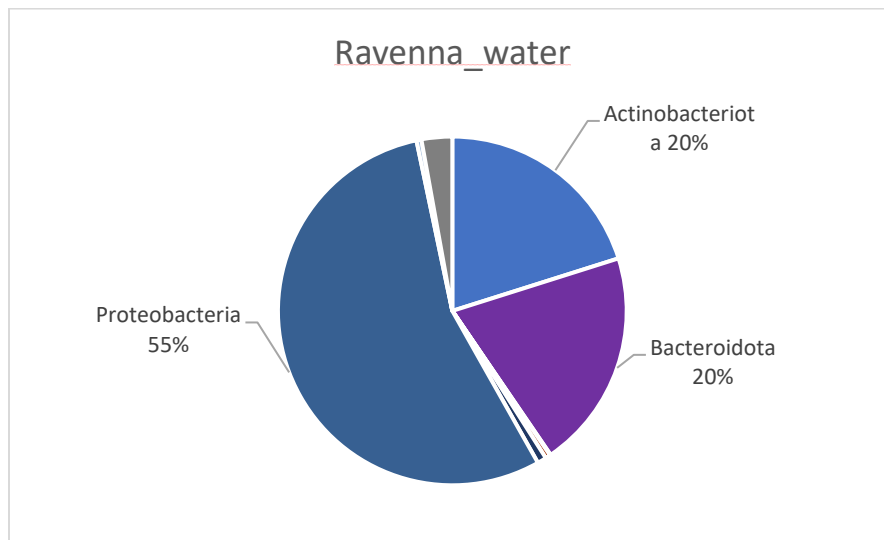
4.2 Analisi del microbiota di *C. gallina*:

4.2.1 Composizione del microbiota di *Chamelea gallina*:

Il sequenziamento della regione ipervariabile V3-V4 del gene 16S rRNA dal DNA microbico totale di 171 campioni, ha portato all'ottenimento di 1721046 sequenze totali di alta qualità e una media di $10064,596 \pm 5995,609$ (media \pm DS) letture per campione. Le sequenze di alta qualità sono state successivamente normalizzate a 949, sulla base delle curve di rarefazione sono stati eliminati dal dataset tre campioni, i quali presentavano un numero di letture inferiore, per un totale di 4562 ASV. Dai risultati ottenuti è stata esplorata la composizione microbica nei campioni di vongole, acqua e sedimenti a livello di phylum e, successivamente, a livello di famiglia.

In tutti i siti sono stati identificati 13 phyla microbici; sono stati classificati come “dominanti” i phyla che presentano una percentuale di abbondanza relativa maggiore del 7%, mentre sono classificati come “sub-dominanti” i phyla che presentano una percentuale minore o uguale a 6%.

A Ravenna i phyla microbici dominanti nel microbiota della ghiandola digestiva di *C. gallina* sono batteri appartenenti ai seguenti phyla (Figura 1): Firmicutes (57%), Cyanobacteria (11%), Planctomycetota (10%), Proteobacteria (7%); i sub-dominanti sono: Spirochaetota (6%), Verrucomicrobiota (4%), Bacteroidota (3%). Nei sedimenti i phyla dominanti sono (Figura 2): Firmicutes (51%), Proteobacteria (17%), Actinobacteriota (10%), mentre i sub-dominanti sono: Acidobacteriota (5%), Bacteroidota (5%). Nei campioni di acqua i phyla microbici dominanti sono: Proteobacteria (55%), Actinobacteriota (20%), Bacteroidota (20%). In questi campioni non sono presenti phyla sub-dominanti.



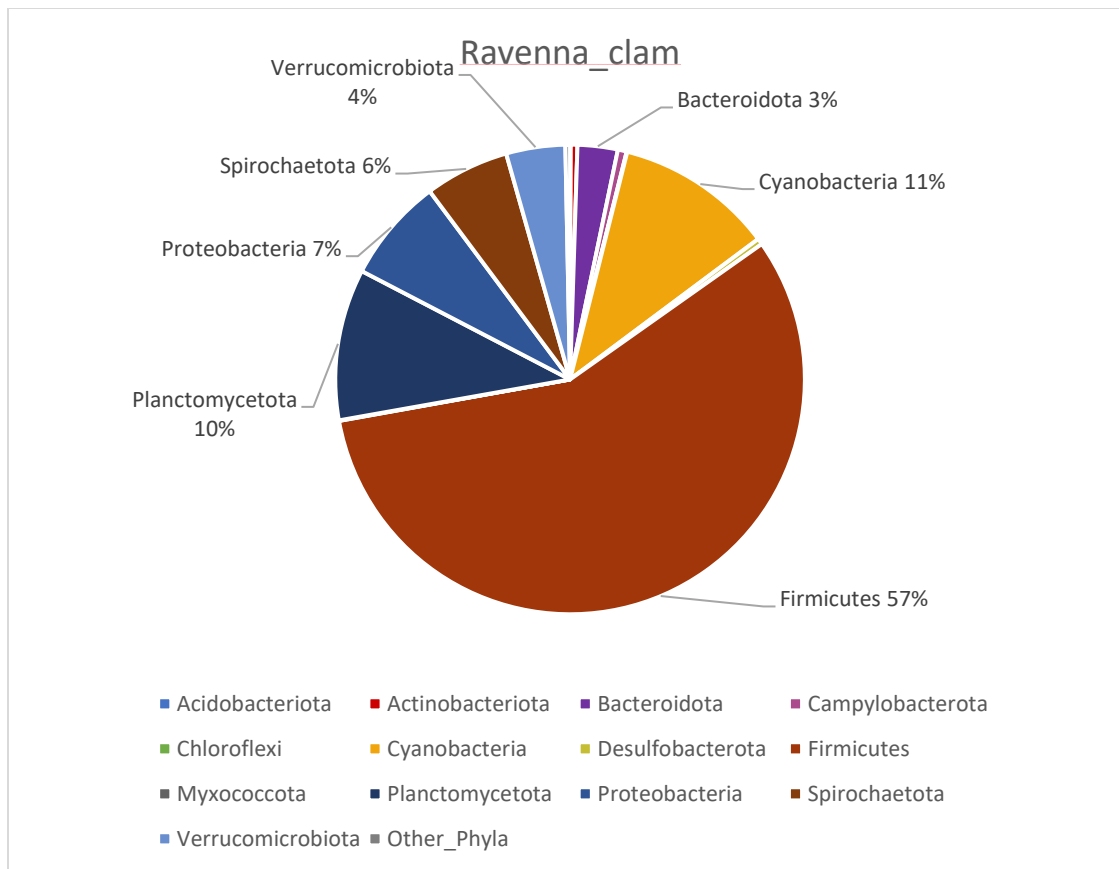
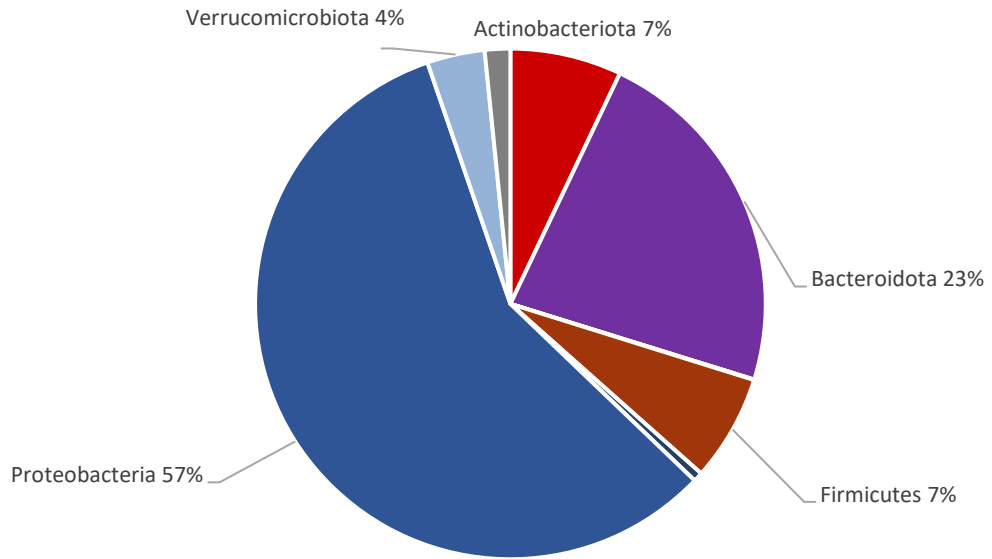


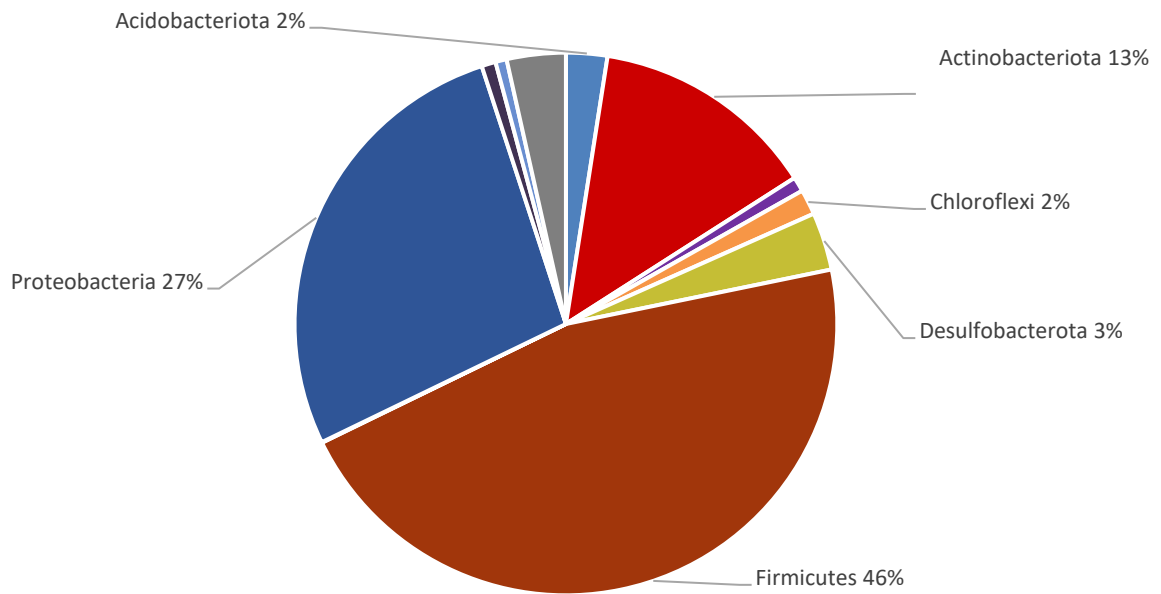
Figura 1: Rappresentazione delle abbondanze relative dei batteri presenti nei campioni di acqua, sedimento e nella ghiandola digestiva di *C. gallina*, che sono stati raccolti nel sito di Ravenna.

Nei campioni raccolti a Lido di Savio i phyla dominanti associati alla ghiandola gastrica (Figura 2) sono: Firmicutes (70%), Proteobacteria (7%), Actinobacteriota (5%), Planctomycetota (5%). I sub-dominanti sono: Verrucomicrobiota (4%), Acidobacteriota (2%) e Bacteroidota (2%). I phyla dominanti nei sedimenti sono: Firmicutes (46%), Proteobacteria (27%), Actinobacteriota (13%), mentre i sub-dominanti sono: Desulfobacterota (3%), Acidobacteriota (2%), Chloroflexi (2%). Nei campioni di acqua come phyla dominanti sono stati identificati: Proteobacteria (57%), Bacteroidota (23%), Actinobacteriota (7%), Firmicutes (7%). L'unicorappresentate dei sub-dominanti è rappresentato dal phylum Verrucomicrobiota (4%).

Lido di Savio_water



Lido di Savio_sediment



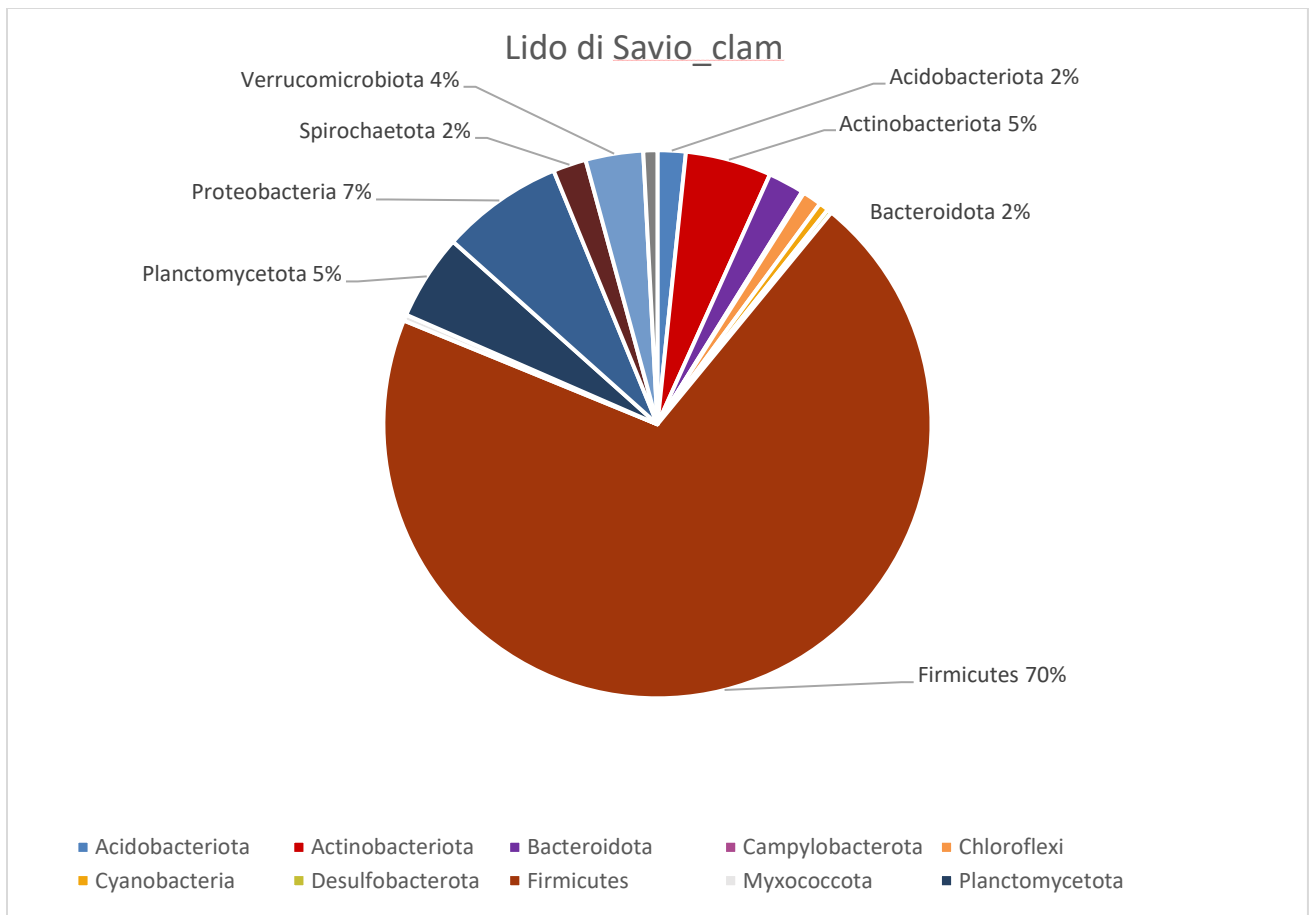
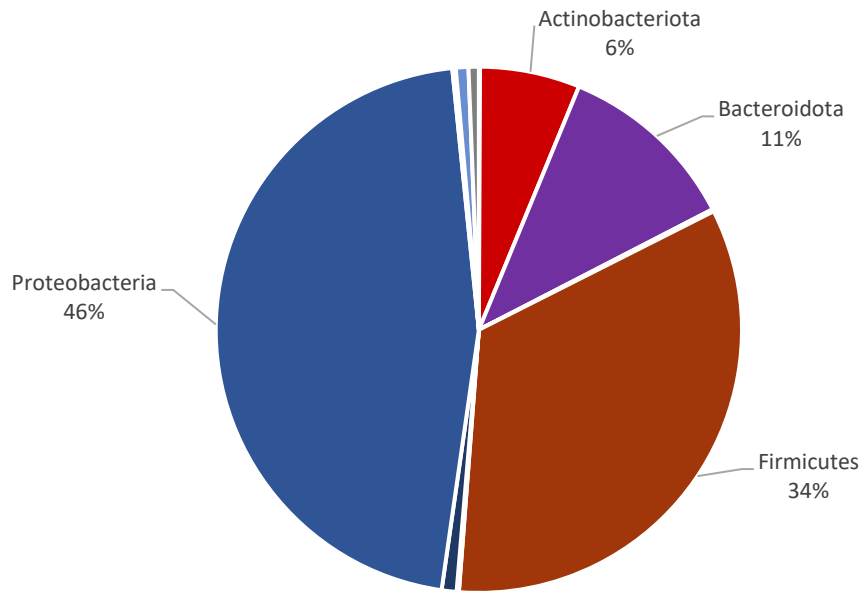


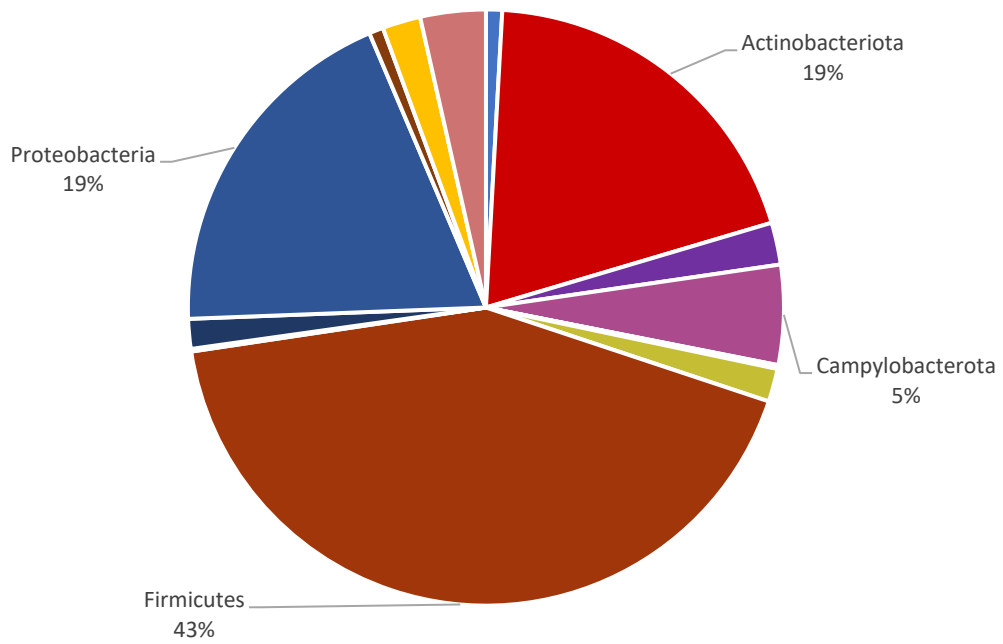
Figura 2: Rappresentazione delle abbondanze relative dei batteri presenti nell'acqua, nei sedimenti e nella ghiandola digestiva di *C. gallina*, raccolti a Lido di Savio.

A Cesenatico i phyla dominanti associati alla ghiandola gastrica di *Chamelea gallina* sono (Figura 3): Firmicutes (63%), Proteobacteria (8%), Verrucomicrobiota (8%), Cyanobacteria (7%). I sub-dominanti sono: Planctomycetota (6%) e Spirochaetota (3%). I sedimenti di Cesenatico presentano una composizione microbica formata da: Firmicutes (34%), Actinobacteriota (19%), Proteobacteria (19%), che sono i dominanti. Il phylum sub-dominante è formato da Campylobacterota che costituisce il 5%. I phyla dominanti presenti nei campioni di acqua sono: Proteobacteria (46%), Firmicutes (34%), Bacteroidota (11%). Il phylum sub-dominante è formato da Actinobacteriota (6%).

Cesenatico_water



Cesenatico_sediment



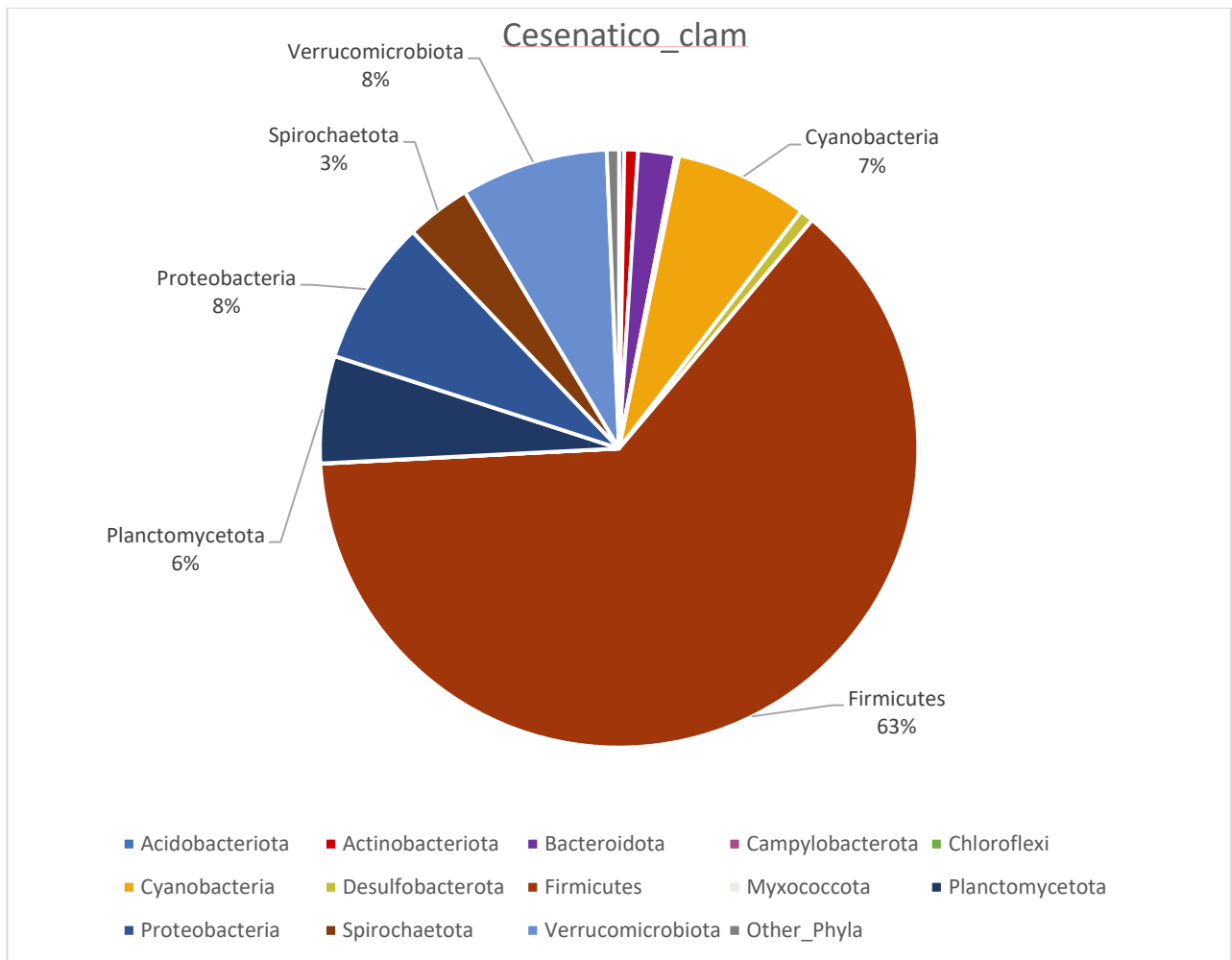
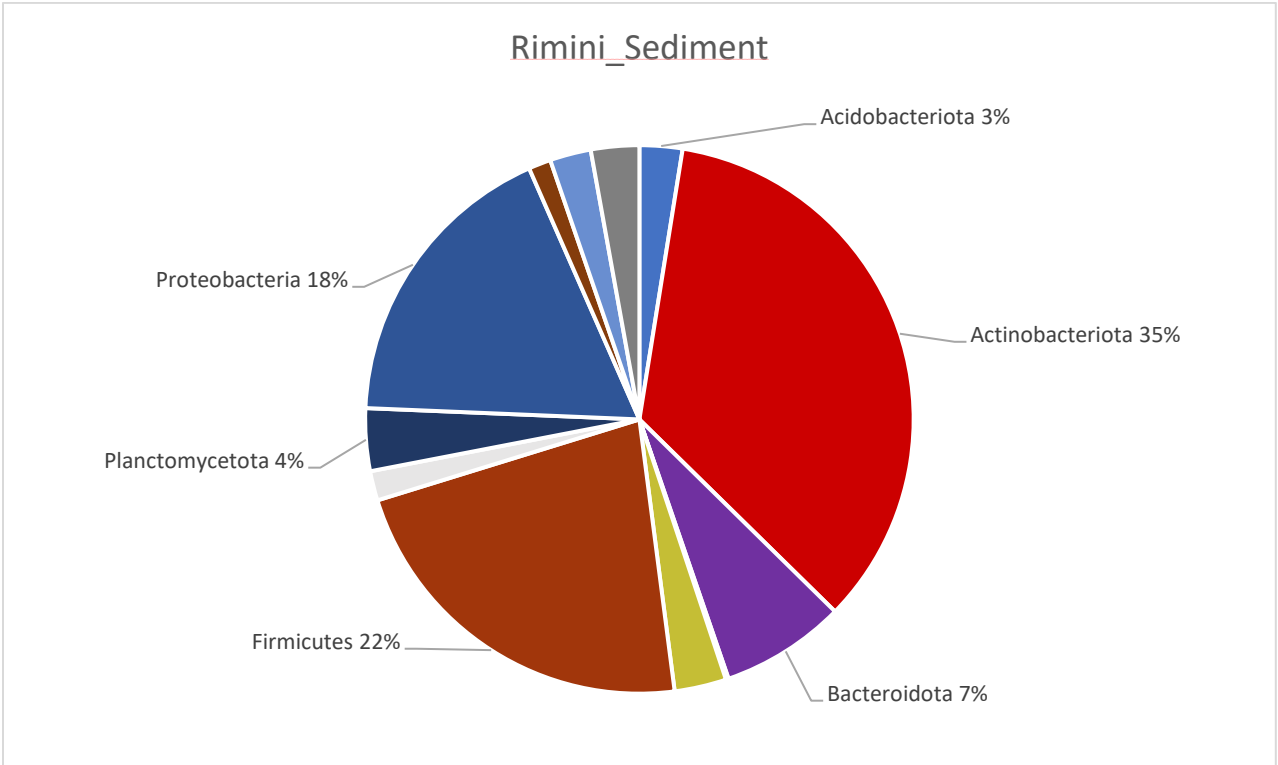
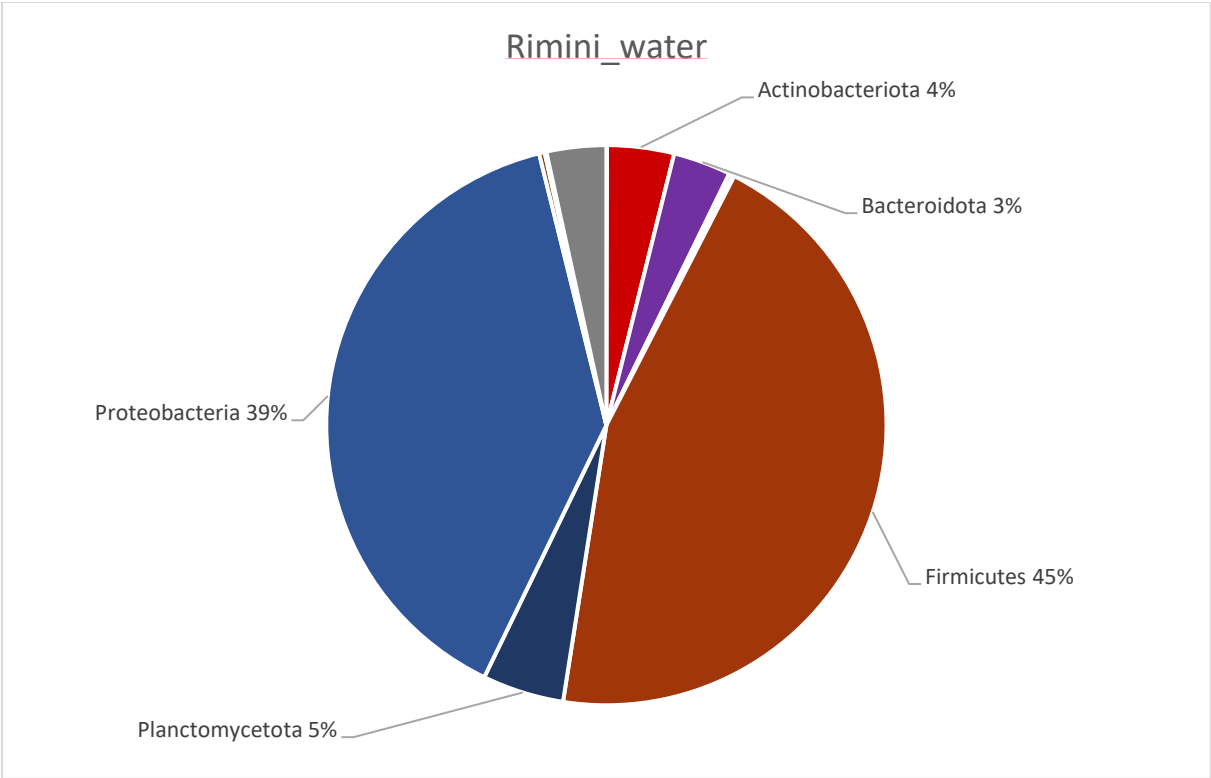


Figura 3: Rappresentazione delle abbondanze relative dei batteri presenti nei campioni di acqua, sedimento e nella ghiandola digestiva di *C. gallina*, raccolte a Cesenatico.

A Rimini i phyla dominanti associati alla ghiandola digestiva di *Chamelea gallina* (Figura 4) sono: Firmicutes (45%), Proteobacteria (17%), Cyanobacteria (11%). I sub-dominanti sono: Planctomycetota (10%), Bacteroidota (5%), Verrucomicrobiota (5%), Spirochaetota (4%). Nei sedimenti sono stati identificati come phyla dominanti: Firmicutes (22%), Actinobacteriota (35%), Proteobacteria (18%), Bacteroidota (7%) e come phyla sub-dominanti: Planctomycetota (4%), Acidobacteriota (3%). Nei campioni di acqua i phyla dominanti sono: Firmicutes (45%), Proteobacteria (39%), mentre i sub-dominanti sono: Planctomycetota (5%), Actinobacteriota (4%), Bacteroidota (3%).



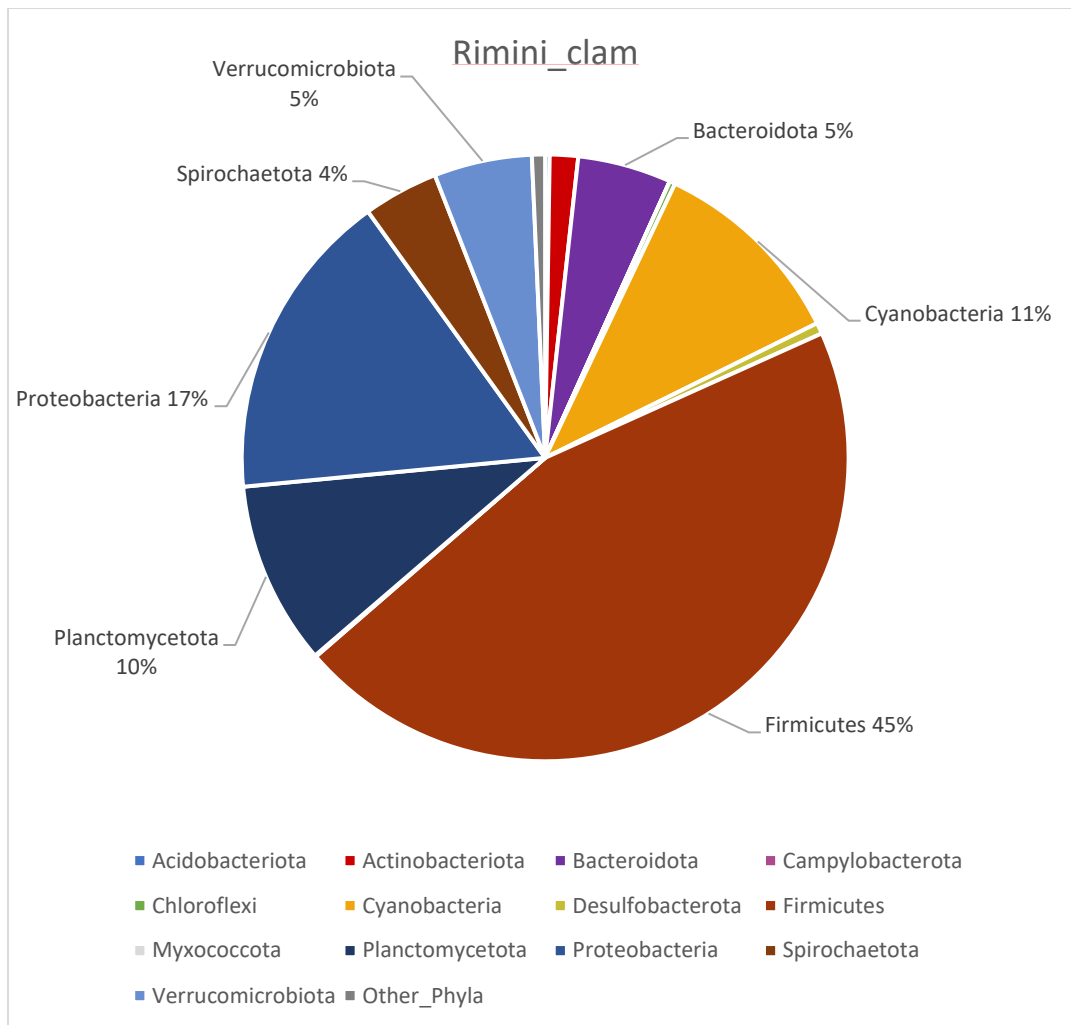
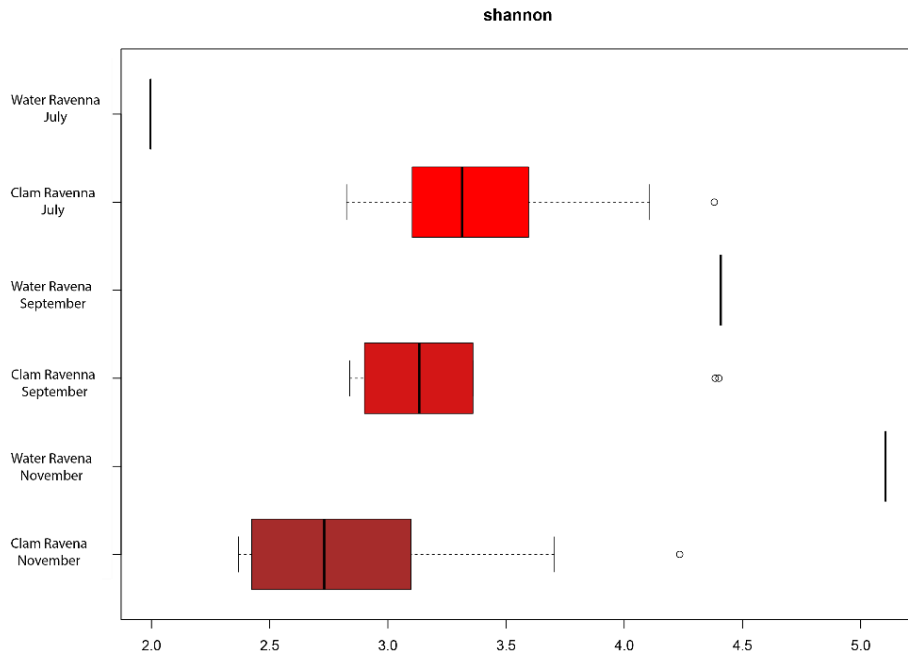


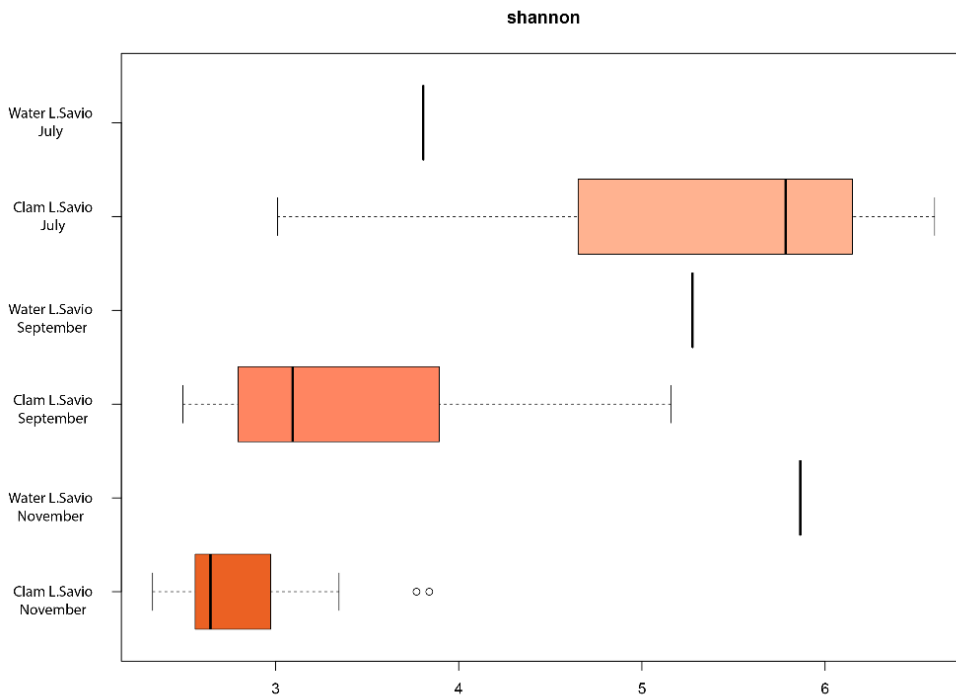
Figura 4: Rappresentazione delle abbondanze relative dei batteri presenti nel microbiota dei campioni di acqua, sedimento e nella ghiandola digestiva di *C.gallina* raccolti a Rimini.

I dati ottenuti tramite l'analisi dell'alfa diversità dimostrano come tra le aree nord e sud ci sia un comportamento differente del microbiota della vongola in base all'andamento stagionale. Infatti, la diversità interna si riduce dall'estate all'autunno nelle aree nord (Ravenna e Lido di Savio), mentre aumenta – nello stesso periodo di tempo – nelle aree sud (Rimini e Cesenatico) (Figura 5).

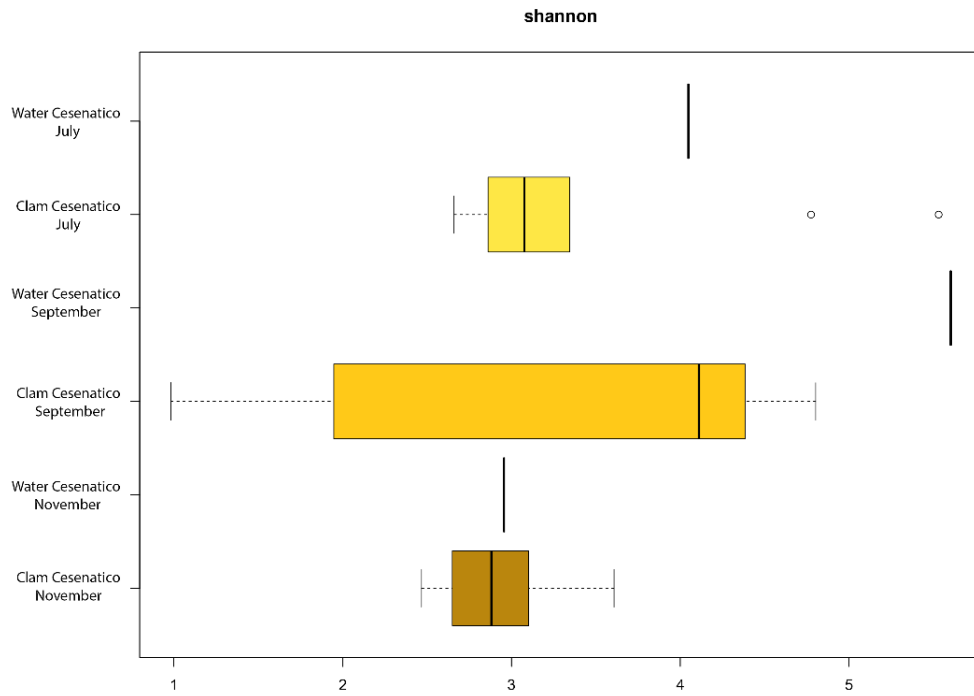
A



B



C



D

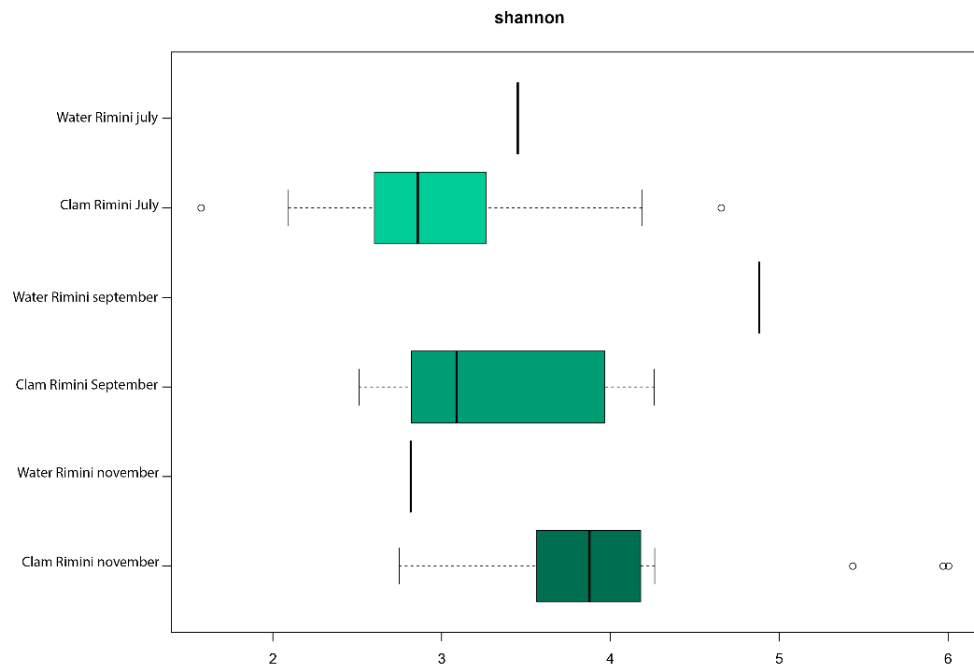
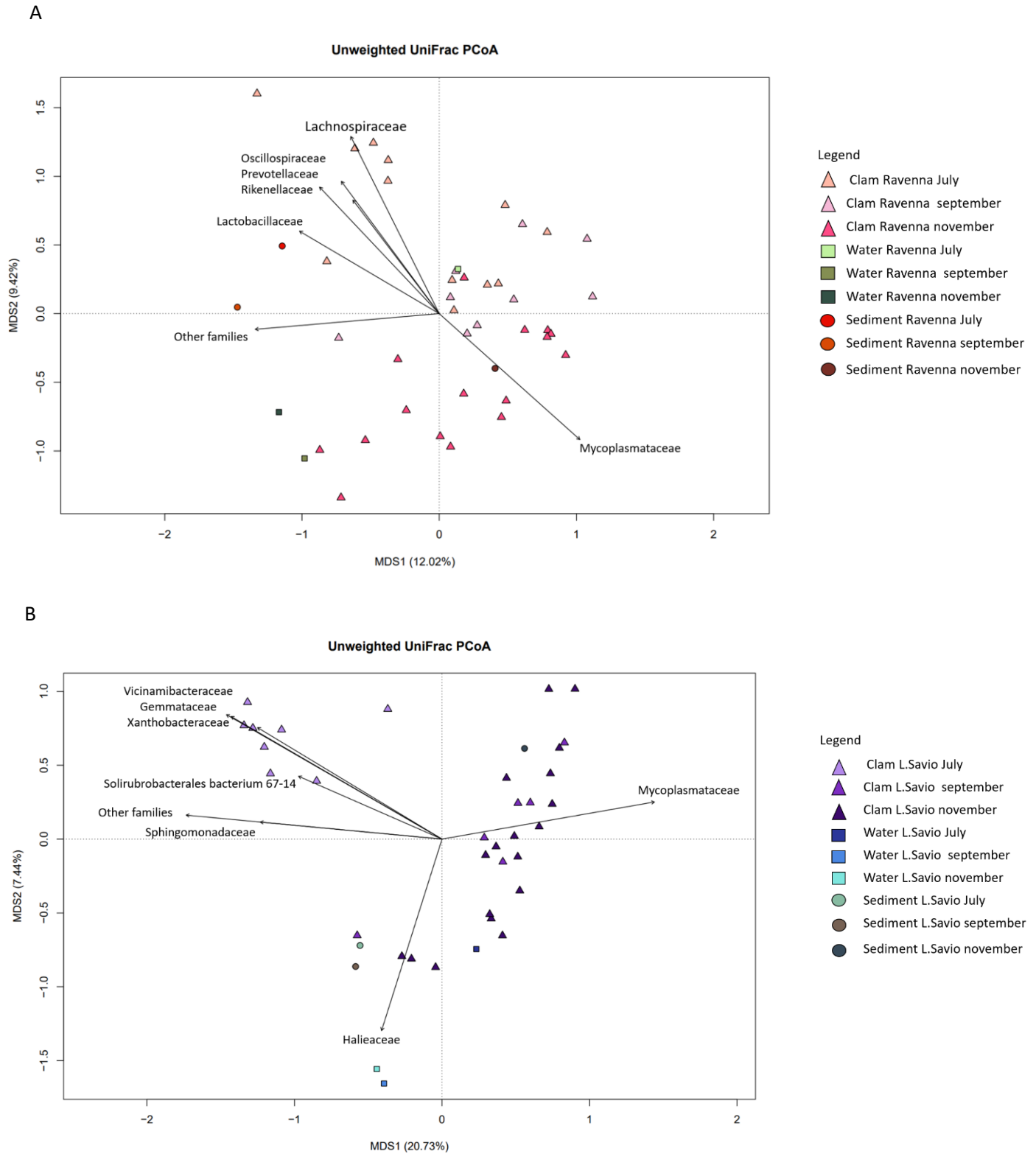


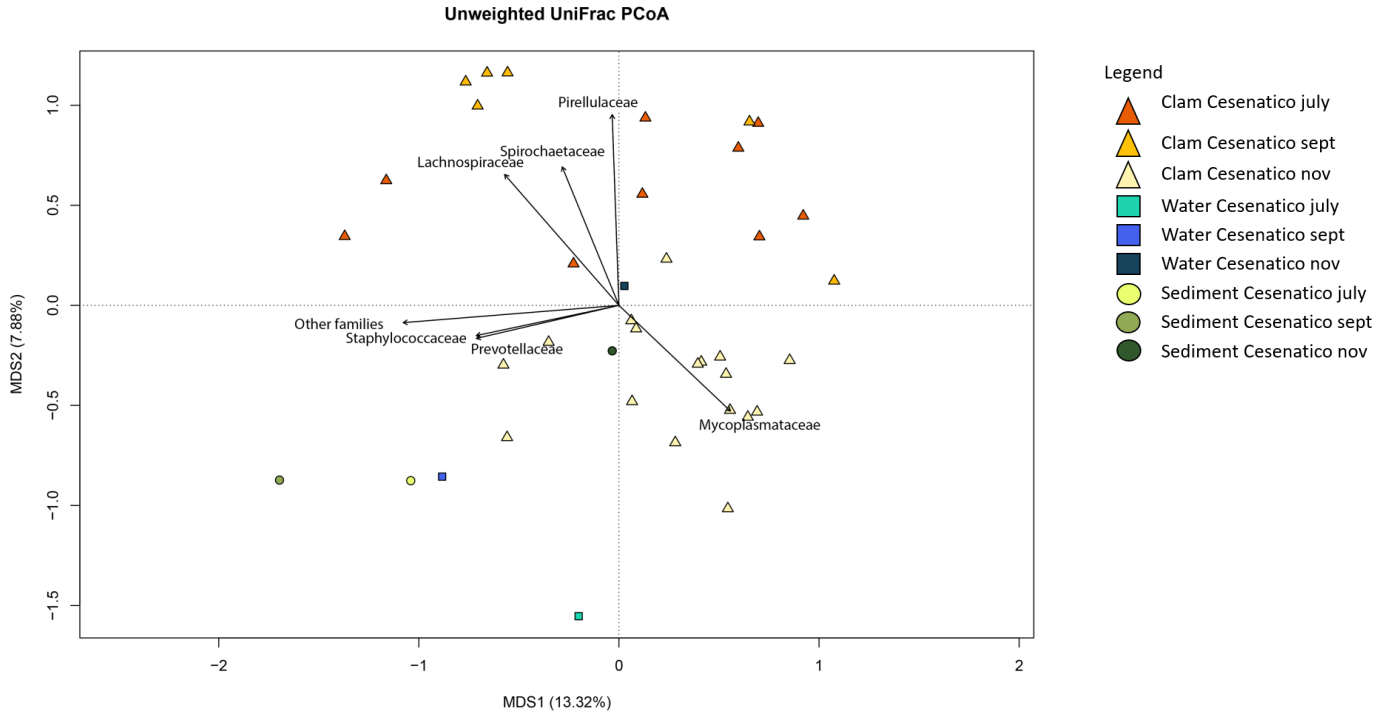
Figura 5: i grafici rappresentano l'alfa diversità dei campioni di acqua e di ghiandola digestiva della vongola *C. gallina* per i siti di Ravenna (A), L.Savio (B), Cesenatico (C) e Rimini (D)

L'analisi mediante PcoA delle variazioni del microbiota della vongola tra i quattro siti di indagine, stratificate per stagione, confermano l'esistenza di profonde differenze tra i due estremi nord-sud. Infatti, per tutti i siti si registra una separazione

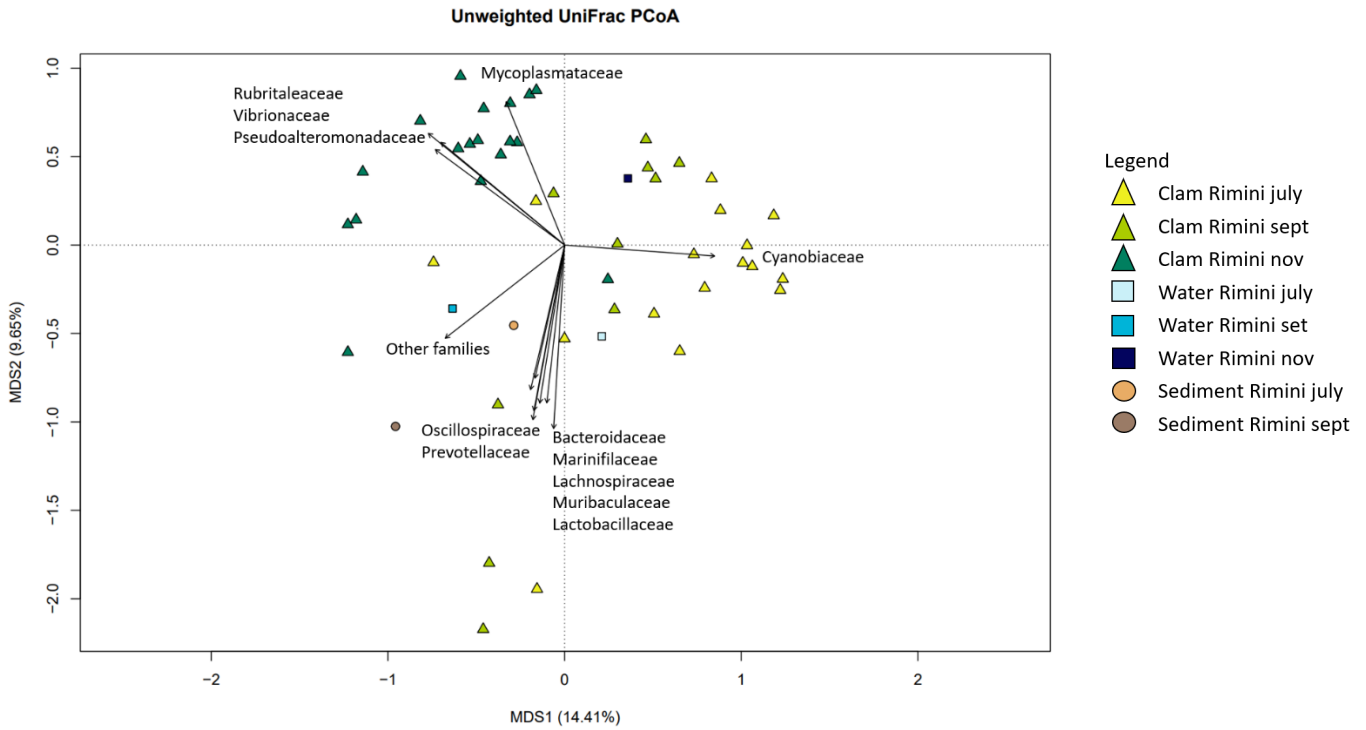
tra le famiglie batteriche che colonizzano la ghiandola gastrica di *C. gallina* nei mesi di luglio- settembre rispetto a quelle che caratterizzano il microbiota a novembre (Figura 6).



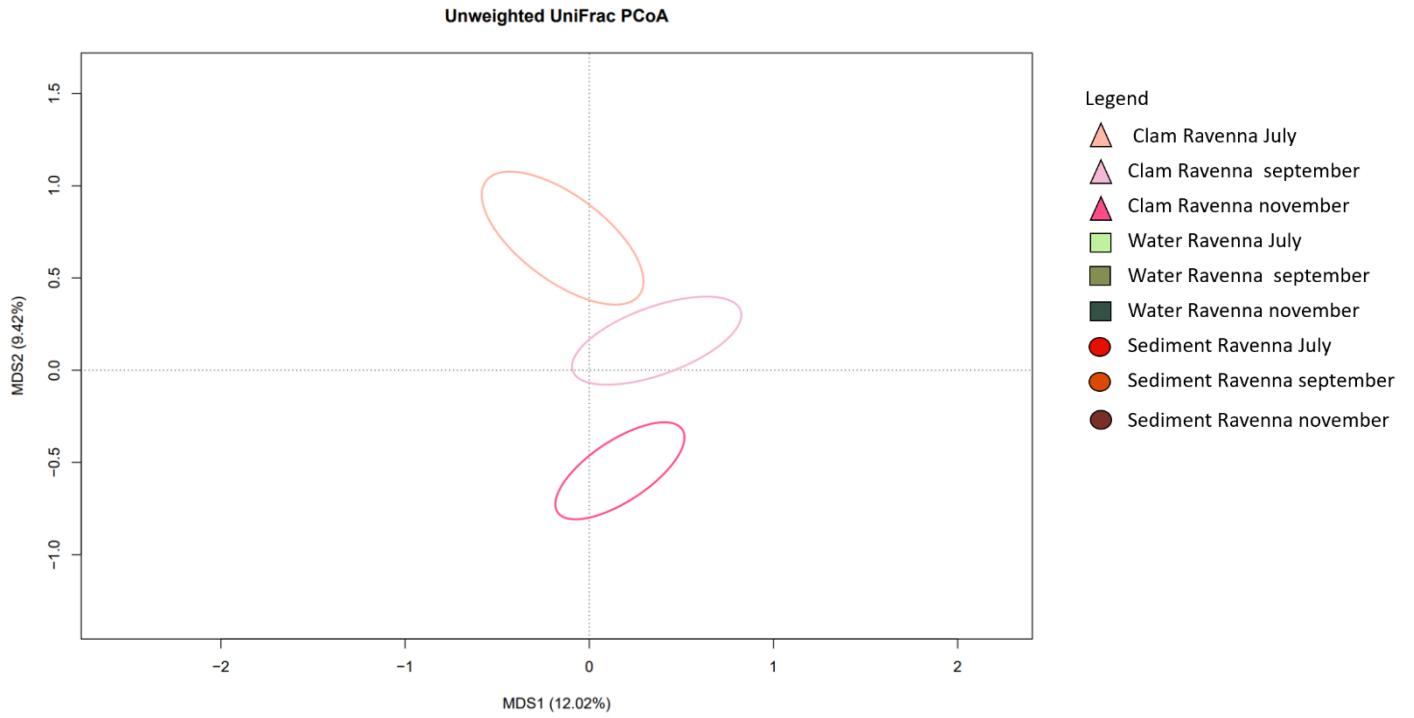
C



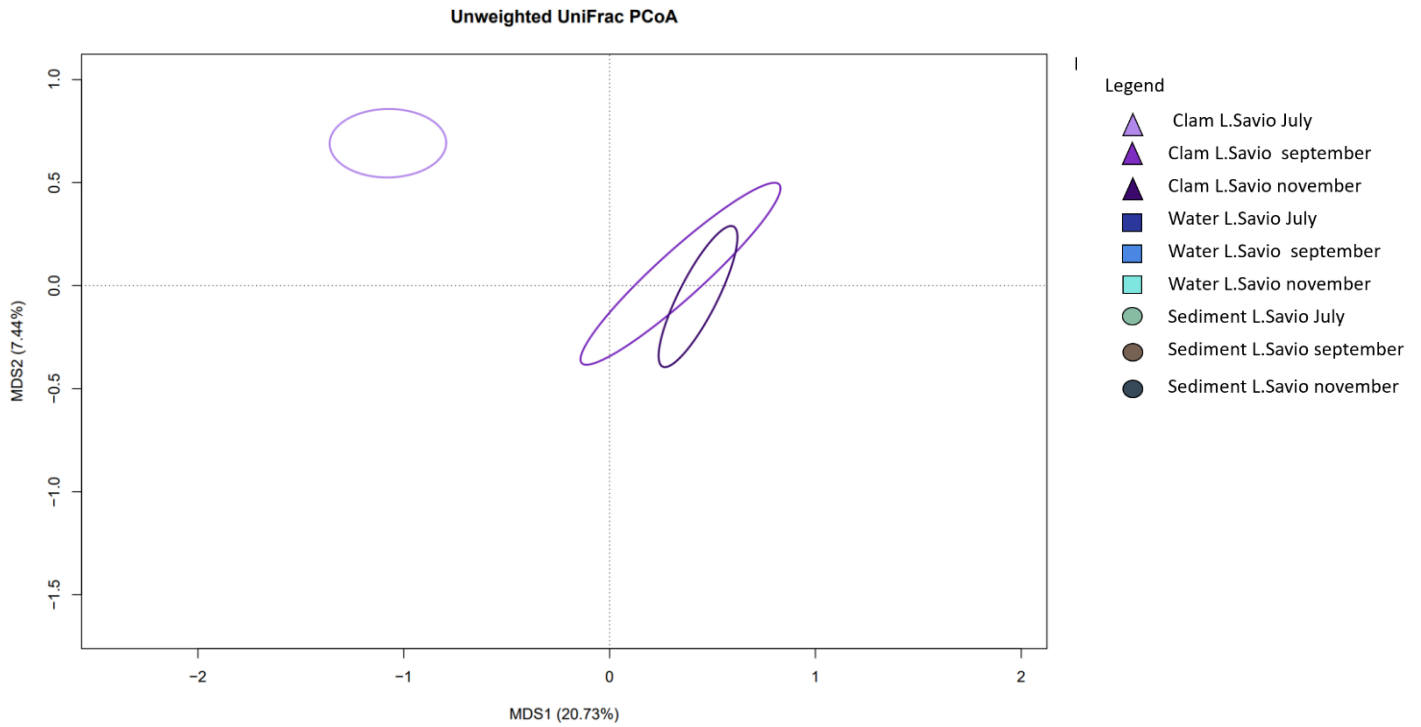
D



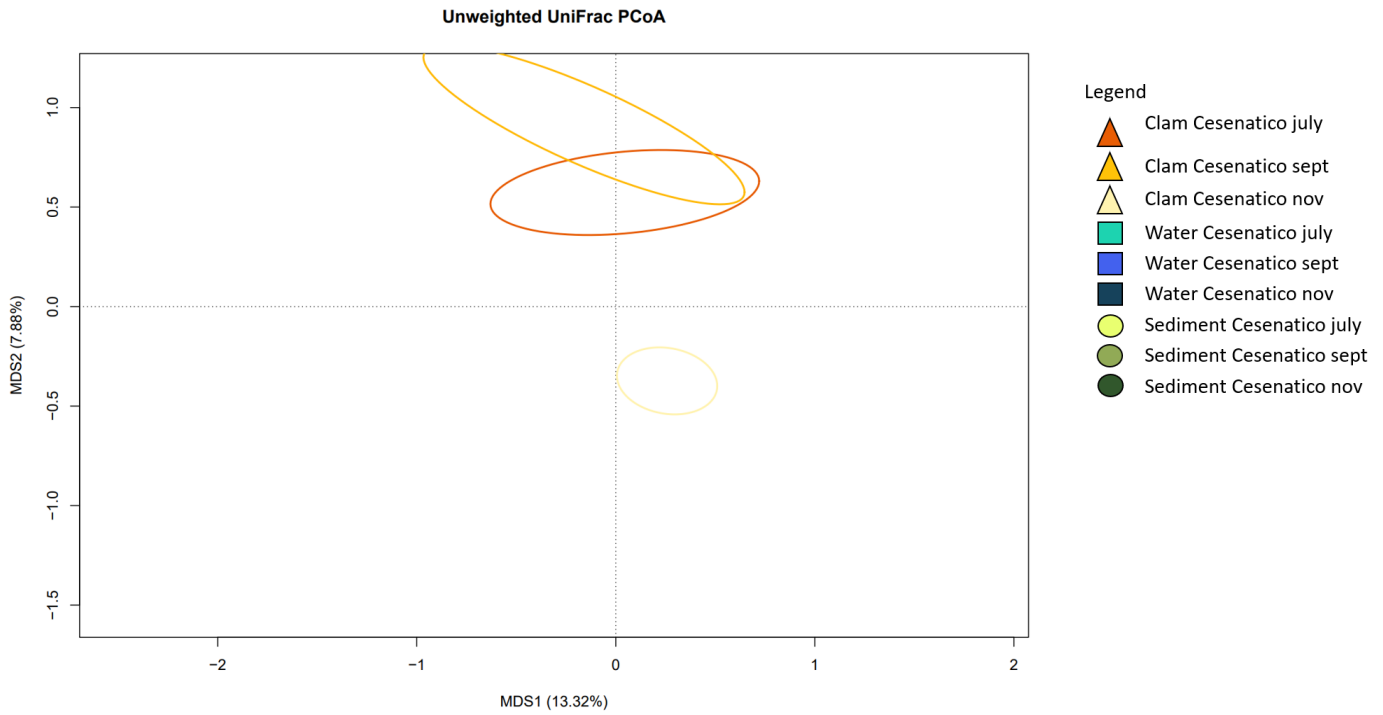
E



F



G



H

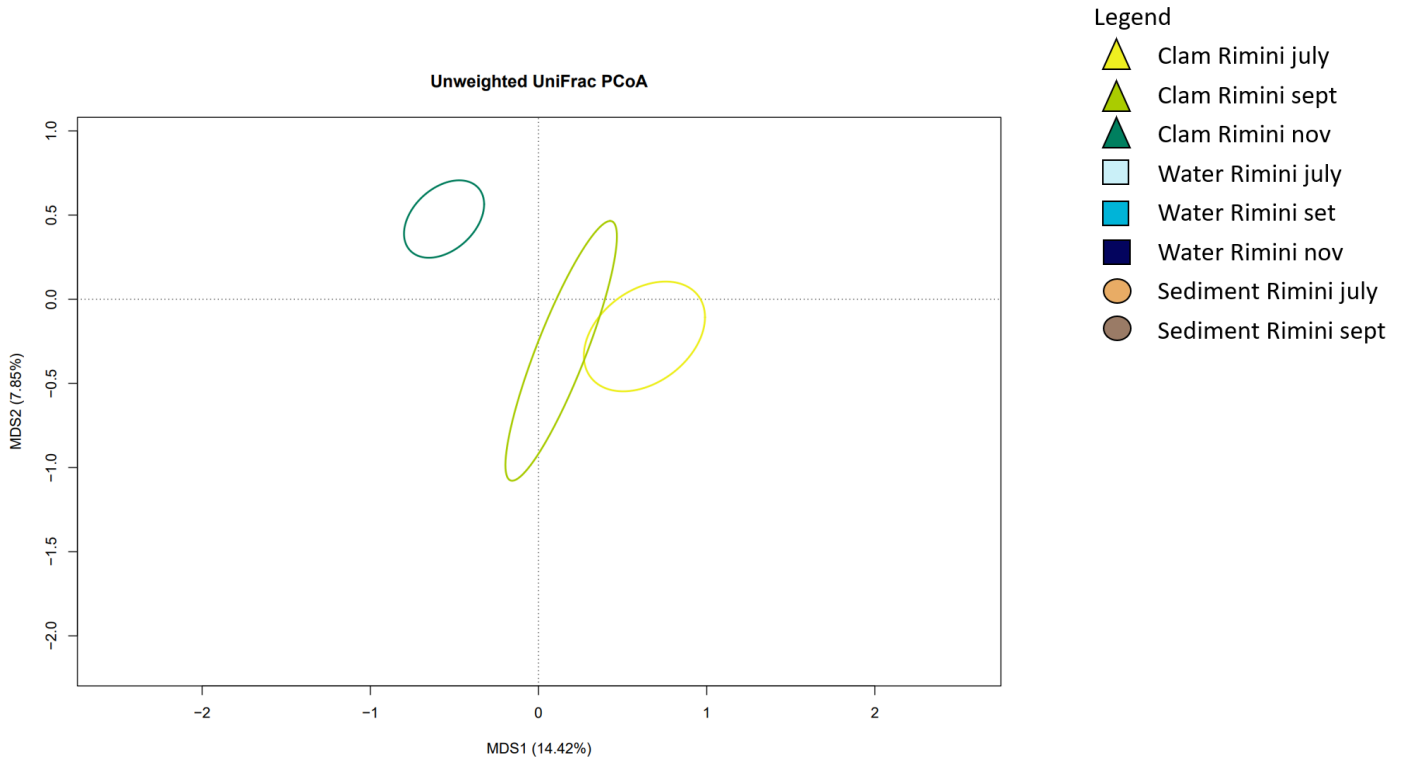
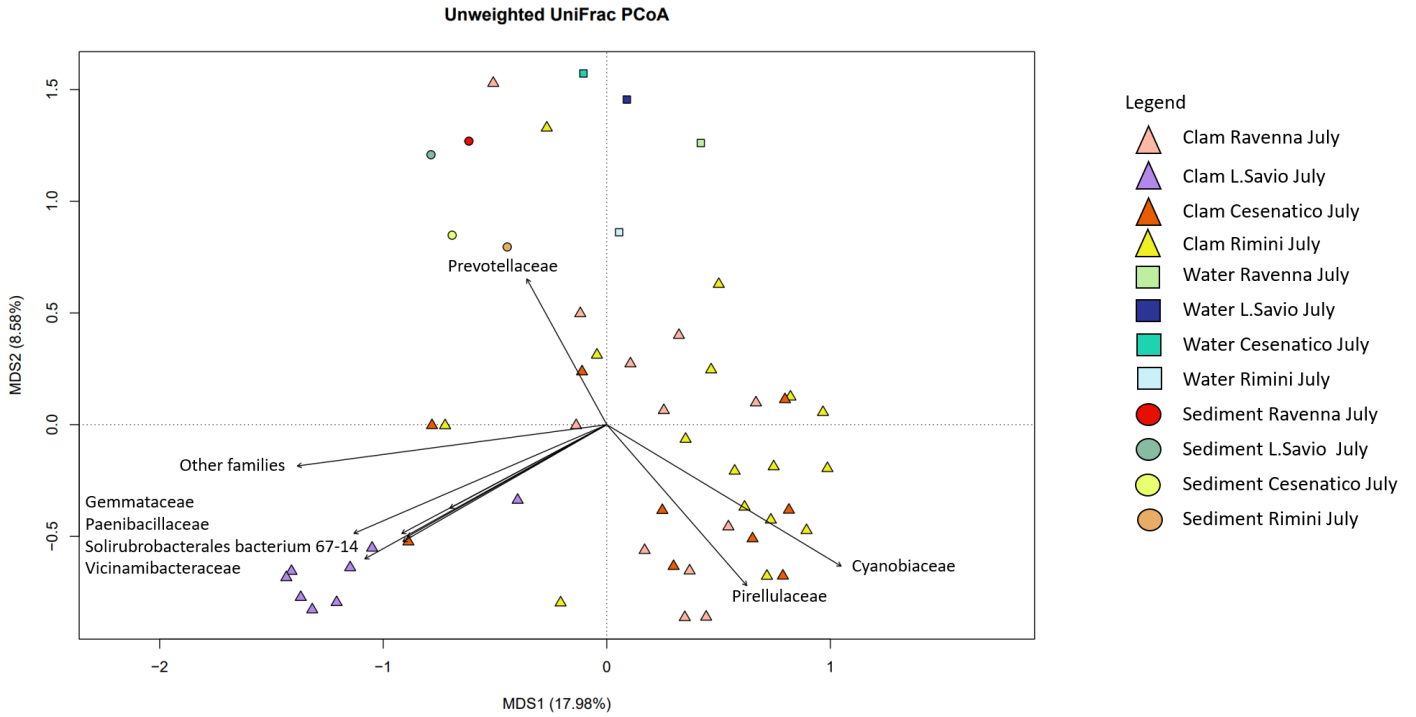
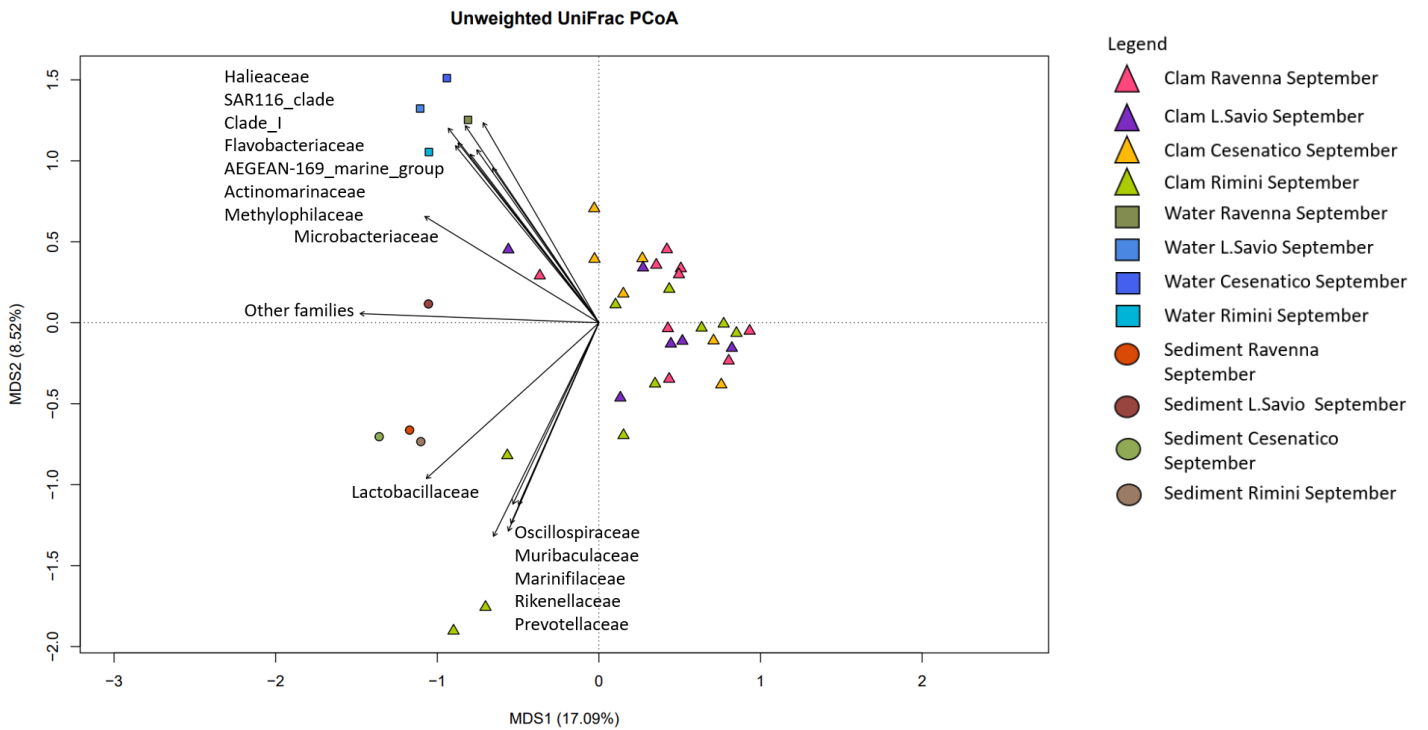


Figura 6: Rappresentazione grafica della dinamica stagionale per sito. Analisi PcoA non pesata basata sulla distanza metrica UniFrac tra i singoli campioni batterici. I campioni sono significativamente separati (test di permutazioni con rapporti pseudo-F, P -value < 0,05). (E-H) Ellissi costruiti sui raggruppamenti dei campioni (A-B). Analisi PcoA con EnvFit $p < 0,001$.

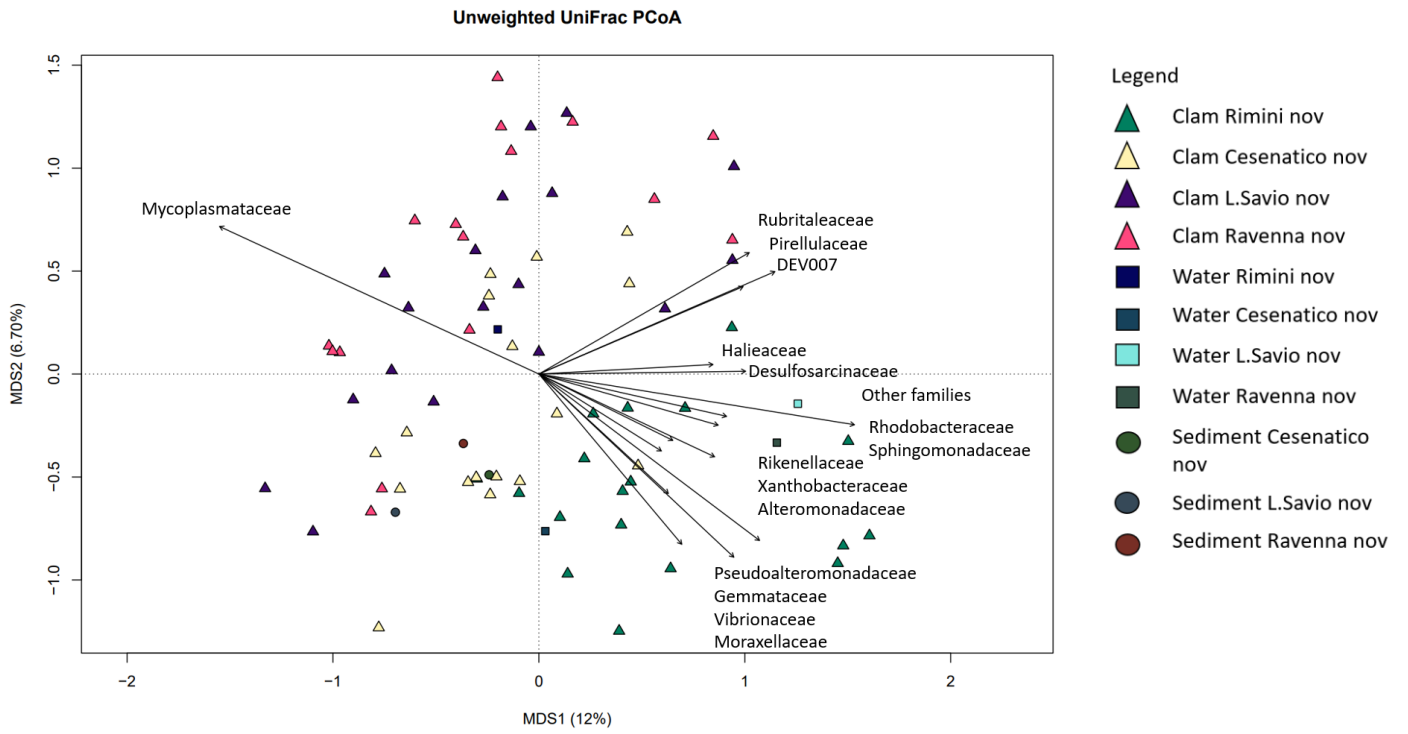
A



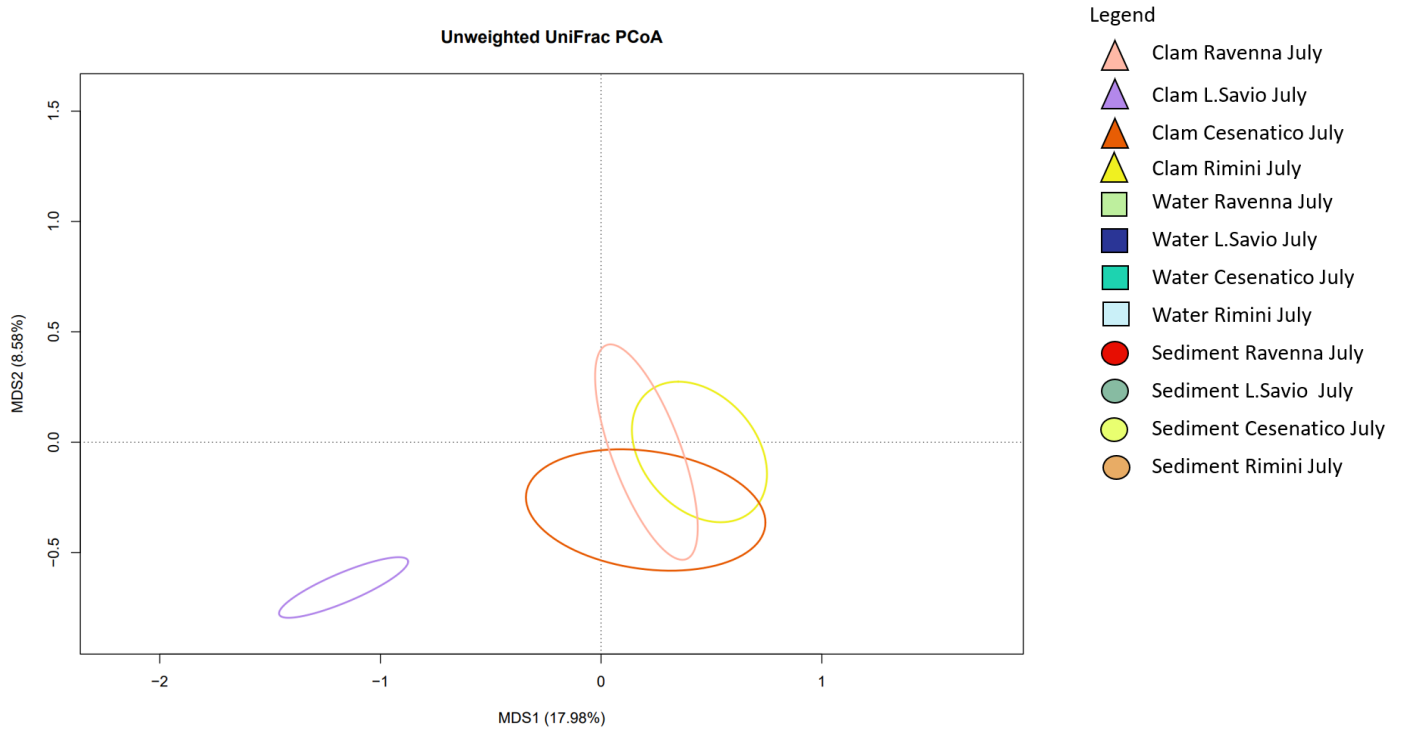
B



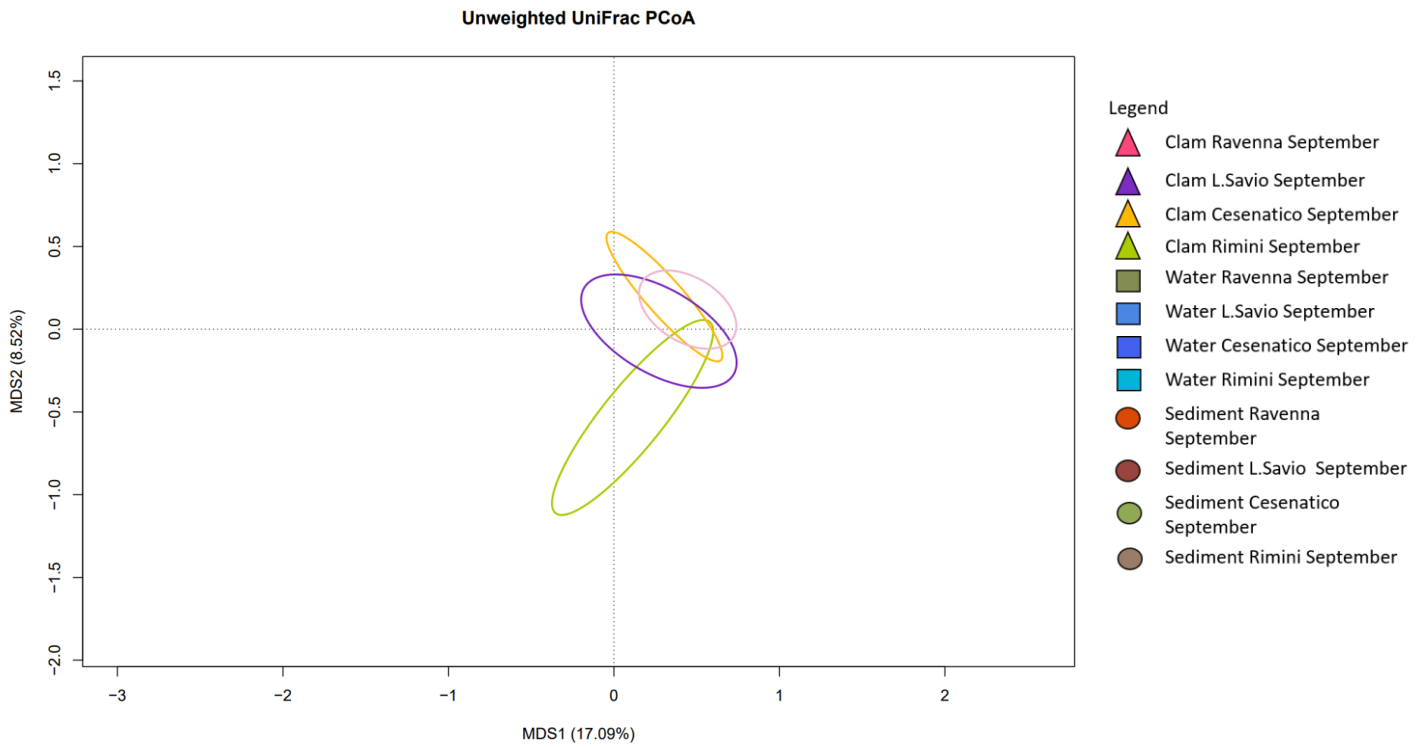
C



D



E



F

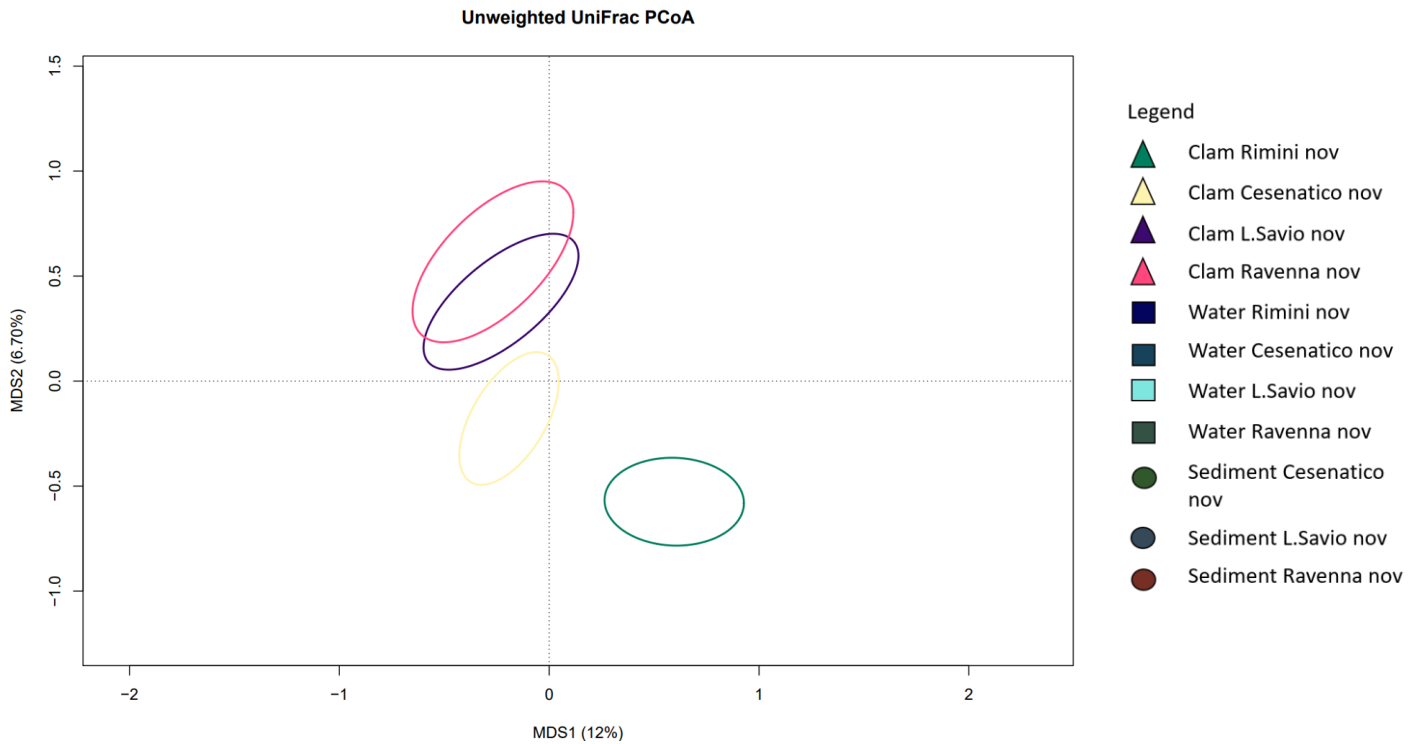


Figura 7: Rappresentazione grafica della differenza tra i siti nel corso dei 3 mesi (giugno, settembre, novembre) . Analisi PcoA non pesata basata sulla distanza metrica UniFrac tra i singoli campioni batterici. I campioni sono significativamente separati (test di permutazioni con rapporti pseudo-F, P-value<0,05). (E-F) Ellissi costruiti sui raggruppamenti dei campioni (A-B). Analisi PcoA con EnvFit p<0,001.

L'envFit plottato sulle PCoA ha permesso di identificare quali famiglie batteriche sono significativamente responsabili (P-value <0,05) della diversa separazione dei gruppi di campioni nello spazio bidimensionale.

In particolare, l'analisi integrata dei dati storici di produttività, l'indice di condizione e la dinamica del microbiota della ghiandola digestiva ci ha consentito di discriminare le famiglie *Pseudoalteromonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Pirellulaceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lactobacillaceae*, *Xanthobacteraceae*

come protettive e promotrici della crescita dell'animale (Lee et al., 2005; Ivanova et al., 2013; Zhang et al., 2018; Nagasaka et al., 2022) poiché sono associate ad un picco di indice di condizione che si registra a Rimini (sito a bassa mortalità) nel mese di settembre.

4.3 Valutazione dello stato fisiologico di C.gallina:

Lo stato fisiologico delle vongole è stato valutato mediante l'indice di condizione, che una misura il rapporto tra il peso del tessuto molle ed il peso totale dell'animale e rende conto di eventuali differenze nello stato nutrizionale dei bivalvi, in risposta a stimoli endogeni ed esogeni (Walne, 1976, Zeng e Yang, 2021), e l'analisi dei livelli di espressione di proteine da stress, nello specifico le heat shock proteins (HSP70).

Le HSP70 sono considerate dei validi biomarkers di stress generali perché sono una componente dei meccanismi fisiologici alla base della risposta alle variazioni ambientali dei molluschi bivalvi (Franzellitti & Fabbri, 2005). Le HSP70, infatti, intervengono favoriscono il corretto ripiegamento ed assemblaggio delle proteine durante la sintesi proteica, e in condizioni di stress proteggono le proteine da molteplici fattori di denaturazione, ne ripristinano la corretta conformazione a seguito della denaturazione ed intervengono nel trasporto e nella degradazione delle proteine irreversibilmente danneggiate (Morris et al., 2013). La loro espressione è attivata fattori di stress, come variazioni di temperatura, stress ossidativo o osmotico, presenza di inquinanti, che possono influenzare la struttura ed il corretto funzionamento delle proteine cellulari (Franzellitti & Fabbri, 2005).

4.3.1 Estrazione RNA, preparazione cDNA e qPCR

Per ogni animale l'intera ghiandola digestiva è stata omogeneizzata in un volume appropriato di TripleExtractor (Grisp, Porto, Portogallo) e l'RNA è stato successivamente estratto mediante il kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, Freiburg, Germania) secondo le istruzioni del produttore. Quantità e qualità del RNA sono state valutate tramite spettrofotometro ed elettroforesi su gel di agarosio al 1.2%. Il cDNA è stato poi sintetizzato a partire da 1µg di RNA, utilizzando il reagente iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad Laboratories, Milano, Italia) seguendo le istruzioni del produttore. Il profilo di espressione delle HSP70 è stato ottenuto tramite PCR quantitativa utilizzando i primers mostrati in Tabella 4 e la master mix iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad Laboratories, Milano, Italia). 18S e 28S sono stati utilizzati come geni di riferimento per la normalizzazione dei dati. I valori di espressione relativa degli mRNA target sono stati dedotti con il metodo CT comparativo (Schmittgen & Livak, 2008) utilizzando i software StepOne e DataAssist (Thermo Fisher, Milano, Italia). I dati sono stati riportati come espressione relativa (fold change) rispetto ad un campione di riferimento (Rimini luglio).

Tabella 4. Primer utilizzati per RT-PCR

Gene	Primers	Reference
<i>HSP70</i>	5'-CAACCGCAGGGGACACTCATC-3' 5'-GTCATTGCTCGTCCCCCTCA-3'	Franzellitti and Fabbri, 2005
<i>18S</i>	5'- TCGATGGTACGTGATATGCC -3' 5'- CGTTTCTCATGCTCCCTCTC -3'	Dondero et al., 2005
<i>28S</i>	5'- AGCCACTGCTTGCAAGTTCTC -3' 5'- ACTCGCGCACATGTTAGACTC -3'	Ciocan et al., 2011

4.3.2 Analisi statistiche

I dati ottenuti dalla qPCR sono stati analizzati mediante statistica non parametrica, in particolare è stata eseguita un'ANOVA per ranghi (ArtANOVA) a due vie utilizzando il pacchetto ArtTool (Wobbrock et al., 2011) in R (R Development Core Team, 2018). In seguito, sono stati effettuati confronti a coppie tramite test ART-C, contenuto nel medesimo pacchetto (Elkin et al., 2021). La visualizzazione dei dati e la grafica sono state ottenute con il pacchetto ggplot2 in R.

4.3.3 Risultati

4.3.3.1 Indice di condizione:

I dati dell'indice di condizione sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie, seguita dal test HSD di Tuckey ($P < 0,05$) per i confronti multipli, dopo che le assunzioni per l'ANOVA sono stati verificate: il test di Shapiro-Wilk è stato utilizzato per la normalità (Shapiro e Wilk, 1965), il test di Bartlett è stato utilizzato per l'omogeneità delle varianze (Bartlett, 1937).

Gli indici di condizione per gli individui di *C. gallina* tra i diversi siti e i diversi mesi di campionamento sono mostrati in Figura 16. I risultati dell'ANOVA a due vie evidenziano che i singoli fattori "Sito" e "Stagione" hanno un effetto significativo sul dataset, inoltre risulta significativa anche l'interazione tra i due fattori (Tabella 5).

In generale, si può osservare una differenza significativa nell'indice di condizione tra il sito di Ravenna rispetto agli altri siti, per cui il sito di Ravenna sembra avere una condizione peggiore. La fluttuazione dell'indice di condizione nei mesi di campionamento segue diversi andamenti nei diversi siti. Queste variazioni possono essere imputate a diversi fattori, come stato riproduttivo, disponibilità di cibo e condizioni ambientali.

Tabella 5 Risultati ANOVA sull'indice di condizione. I valori significativi sono contrassegnati dagli asterischi.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Site	3	0.1224	0.04079	10.726	1.27e-06 ***
Month	2	0.0286	0.01428	3.754	0.0249 *
Site:Month	6	0.2856	0.0476	12.515	3.47e-12 ***
Residuals	228	0.8671	0.0038		

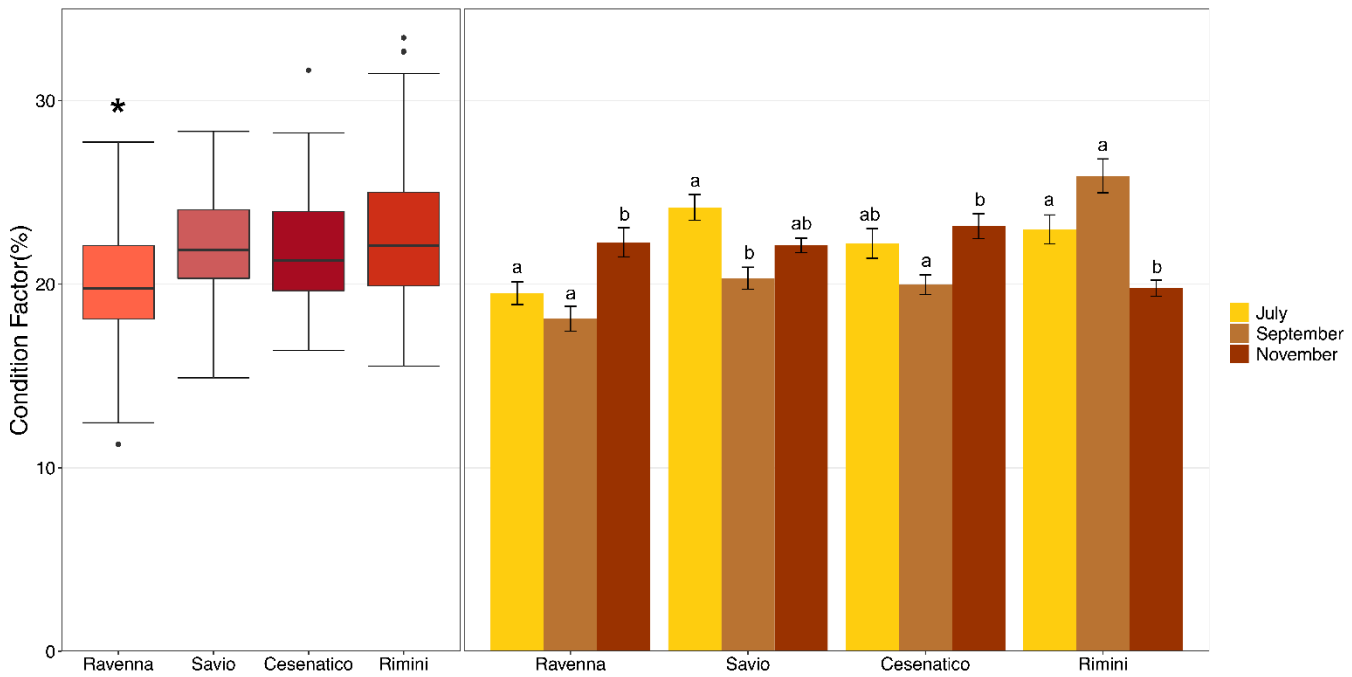


Figura 6 Indice di condizione di *Chamelea gallina* campionata in quattro siti a diversa produttività. Nei box plot: indice di condizione complessivo per i quattro siti. Gli asterischi indicano le differenze significative ($P < 0.05$) tra i diversi siti. Nei bar plot: Indice di condizione nei quattro siti e nei tre periodi di campionamento. Le lettere indicano differenze significative ($P < 0.05$) tra le diverse stagioni all'interno del sito.

4.3.3.2 Profili trascrizionali delle HSP70:

Le variazioni dei profili trascrizionali tra i diversi siti e i diversi mesi di campionamento sono mostrate in Figura 15. I risultati dell'ArtANOVA evidenziano che i singoli fattori "Sito" e "Stagione" hanno un effetto significativo sul dataset, mentre non viene evidenziata una significativa interazione tra i fattori (Tabella 6).

Tabella 6 Risultati ArtAnova sui profili di trascrizione. I valori significativi sono contrassegnati dagli asterischi.

Source	Df	F value	Pr(>F)
Site	3	4.8232	0.0063493**
Month	2	15.9732	1.0826e-05***
SitexMonth	6	1.9236	0.1035033

Si nota lo stesso pattern di espressione delle HSP70 durante i mesi di campionamento in tutti i siti. Infatti, i livelli di espressione sono sempre significativamente più alti nel mese di luglio rispetto ai mesi di settembre e novembre.

Nei mesi di settembre e novembre vengono messe in evidenza differenze di espressione tra i vari siti. Nel mese di settembre il sito di Ravenna si distingue in maniera significativa da Savio e Cesenatico, così come i livelli di espressione dei

campioni di Rimini sono significativamente più bassi rispetto a Savio. Nel mese di novembre è sempre il sito di Ravenna a mostrare livelli di espressione significativamente più bassi rispetto a Savio e Rimini.

In generale, quindi, i campioni estivi presentano sempre una maggiore richiesta di presenza delle proteine HSP70 rispetto alle vongole campionate a settembre e novembre. Nonostante che l'indice di condizione non mostri conseguenze significative sullo stato nutrizionale degli animali, la maggior espressione di HSP70 a Ravenna e Savio a luglio indica la possibile attivazione dei meccanismi di risposta a fattori di stress ambientale diversi dalle elevate temperature estive, che avevano valori comparabili tra i siti (media mensile della temperatura superficiale registrata: 28°C per Ravenna – Savio e 29°C per Cesenatico-Rimini).

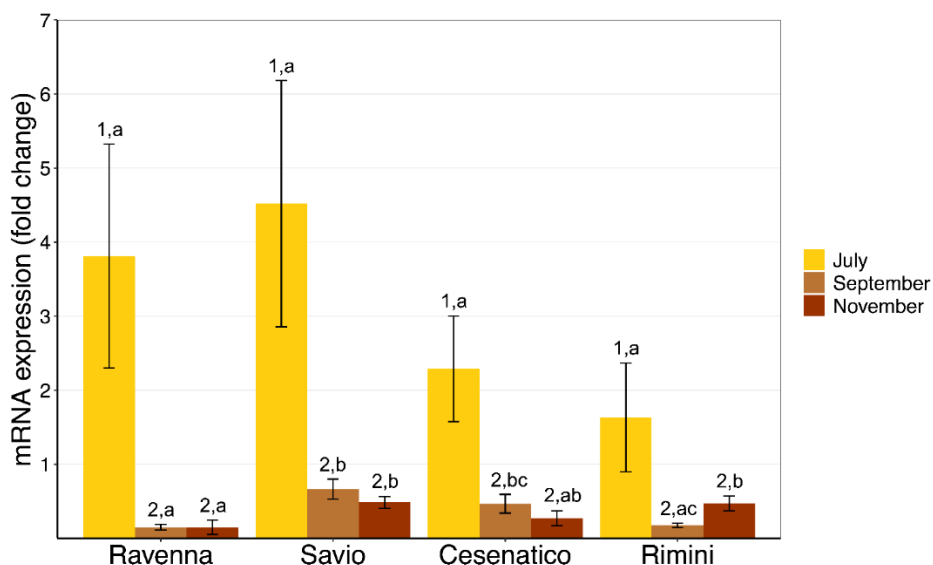


Figura 15 Profili di espressione di HSP70 nelle ghiandole digestive di *C. gallina* nei diversi siti e mesi di campionamento. Numeri differenti indicano le differenze significative ($P < 0.05$) tra i mesi di campionamento all'interno di ogni sito. Lettere diverse indicano le differenze significative ($P < 0.05$) tra i diversi siti nella stessa stagione.

5 Creazione di linee guida per il monitoraggio dello stato della dinamica del microbiota della vongola nel ciclo produttivo come indicatore di salute e produttività.

Per monitorare il microbiota di *C. gallina* durante il ciclo produttivo è necessario campionare almeno 50 individui per sito e stagione. Dopo il sezionamento della ghiandola digestiva e dopo aver costituito un pool rappresentativo, si procede con l'estrazione del DNA microbico tramite Dneasy PowerSoil kit pro della Qiagen.

Per caratterizzare il microbiota è d'uopo amplificare le regioni ipervariabili V3-V4 del gene 16S del rRNA batterico ed effettuare il sequenziamento NGS tramite piattaforma Illumina MiSeq.

Le vongole per essere considerate sane devono avere un microbiota simile alle vongole che sono state campionate a Rimini nel mese di settembre, poiché associate ad un più alto indice di condizione. Quindi nella loro composizione microbica devono essere presenti le seguenti famiglie: *Pseudoalteromonadaceae*, *Pirellulaceae*, *Lactobacillaceae*.

Inoltre, queste famiglie batteriche devono avere un range di abbondanza relativa rispettivamente del:

- *Pseudoalteromonadaceae* range di abbondanza relativa compreso tra 1 e il 2%
- *Pirellulaceae* range di abbondanza relativa compresa tra 8 e il 9%
- *Lactobacillaceae* range di abbondanza relativa compresa tra 1 e il 2%

6 Sviluppo di approcci basati su biopromotori per il controllo e la modulazione del microbiota della vongola per favorirne una configurazione probiotica.

6.1 Sperimentazione in acquario:

Per la sperimentazione in acquario sono stati allestiti 4 acquari da 70 L ciascuno con uno strato di sedimento sabbioso alto circa 10cm. Sono state pescate 240 vongole e sedimenti dai due siti con la più elevata e la più bassa mortalità, ossia, rispettivamente, Ravenna e Rimini. In 2 acquari sono state mimate le condizioni che si verificano in ambiente naturale; infatti, 60 vongole di Ravenna sono state stabulate in acquario con il sedimento di Ravenna (acquario 1) e 60 vongole di Rimini sono state stabulate in sedimenti di Rimini (acquario 4). Per valutare l'efficacia dei sedimenti di Rimini come

biopromotori sono stati allestiti altri due acquari: in uno di questi, 60 vongole di Ravenna sono state stabulate su sedimenti di Rimini (acquario 2), nell'altro 60 vongole di Rimini sono state stabulate su sedimenti di Ravenna (acquario 3, controllo negativo) (Figura 9).

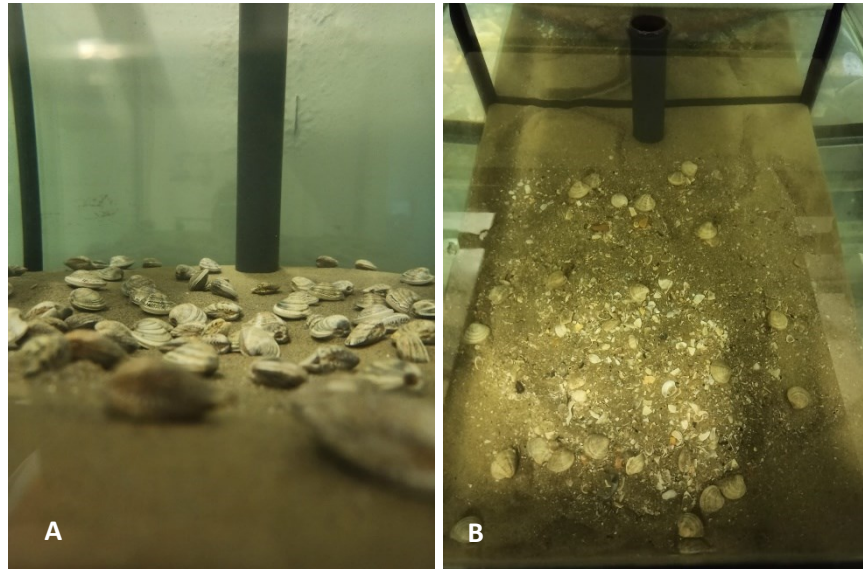


Figura 9 A-B: Vongole stabulate su sedimento in acquario.

I 4 trattamenti sono risultati omogenei dal punto di vista di peso massa. In seguito a un periodo di acclimatazione, sono state avviate le tre settimane di sperimentazione. La temperatura in acquario è stata mantenuta costante a 20°C attraverso l'uso di refrigeratori e scambiatori di calore. Tutti i bivalvi sono stati alimentati giornalmente con la coltura algale viva della microalga *Isochrysis galbana*, con una razione di mantenimento pari al 3% del peso secco medio degli animali. Ogni giorno sono stati registrati i possibili morti per ciascun acquario al fine di calcolare il tasso di mortalità. Sono stati presi in considerazione 3 time point, inizio della sperimentazione (T0), dopo una settimana (T1) e dopo 3 settimane (T2). Per ogni tempo di campionamento sono stati valutati i parametri morfo-biometrici e sono stati effettuati analisi per la caratterizzazione del microbiota e dei marcatori fisiologici di stress. Sono stati esaminati i seguenti parametri morfo-biometrici per 6 vongole per trattamento: lunghezza delle valve con l'uso di un calibro (sensibilità di ± 0.05 mm), peso

totale dell'animale, dopodiché si è proceduto all'apertura delle vongole e la separazione del corpo molle dalle valve per procedere con il peso dei tessuti molli e della conchiglia separatamente (Figura 10).



Figura 10: Vongola sacrificata per la misurazione del peso del corpo molle

Da questi dati è stato possibile calcolare: il fattore di condizione inteso come il rapporto tra il peso totale e la lunghezza³ *100 (Kopecka et al, 2006); la resa in polpa che è anche un indice di qualità del prodotto commerciale, inteso come il rapporto del peso del corpo molle su peso totale dell'animale *100 (Galvao et al., 2015). I dati di questi parametri sono stati analizzati mediante un'analisi statistica della varianza a due vie (ANOVA) e il test post-hoc di Tukey è stato eseguito in caso di significatività ($P < 0,05$). Dai risultati non è stata evidenziata nessuna differenza significativa tra i 4 acquari tra l'inizio e la fine della sperimentazione (Tabella 5). È possibile dedurre che gli animali seppur provenienti dai diversi siti, ad alta e bassa mortalità, ed esposti a sedimenti differenti, hanno mostrato le stesse performance biometriche. Quindi il potenziale biopromotore del sedimento di Rimini potrebbe aver agito sulle vongole proveniente da Ravenna, evitandone lo stato di stress e diminuzione in peso, condizioni che si verificano invece in ambiente naturale non controllato.

		Lunghezza	Peso totale	Peso corpo molle	Fattore di condizione	Resa in polpa
T0	ACQ 1-3	2,33	3,71	0,68	29,48	18,20
	ACQ 2-4	2,38	3,76	0,64	28,05	17,14
T2	ACQ 1	2,31	3,64	0,67	29,61	18,28
	ACQ 2	2,41	4,05	0,66	28,93	16,15
	ACQ 3	2,40	3,99	0,67	28,93	16,83
	ACQ 4	2,36	3,89	0,64	29,37	16,57

Tabella 5: Nella tabella sono stati riportati I valori medi dei parametri morfo-biometrici dei quattro acquari dell’inizio e fine prova sperimentale.

Riguardo proprio al tasso di mortalità, è stato riscontrato che nei vari trattamenti, in termini assoluti, c’è stata una diversa percentuale di vongole morte (Figura 15). Come previsto, in conformità con gli eventi di mortalità verificatisi in natura nell’acqua di Ravenna, anche durante la prova sperimentale in acquari, l’interazione delle vongole di Ravenna con i sedimenti dello stesso sito appunto, ha mostrato un tasso assoluto di mortalità superiore a tutte le altre condizioni testate, pari al 10%. In opposizione, si trovano invece dati relativi al trattamento in acquario 2, dove le vongole di Ravenna hanno interagito con il sedimento di Rimini. Difatti, è stata registrata una mortalità pari al 0% (Acq2 Ra-Ri), confermando l’attività biopromotrice del sedimento sullo stato fisiologico degli animali, evitandone la morte.

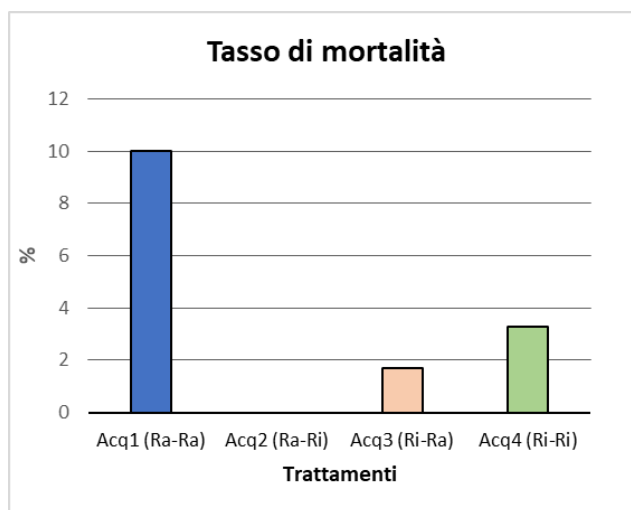


Figura 15: Nel grafico sono stati riportati I tassi di mortalità in percentuale per ciascun acquario.

7 Bibliografia:

- 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>
- Ciocan, C. M., Cubero-Leon, E., Minier, C., & Rotchell, J. M. (2011). Identification of Reproduction-Specific Genes Associated with Maturation and Estrogen Exposure in a Marine Bivalve *Mytilus edulis*. *PLoS ONE*, 6(7), e22326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022326>
- Dondero, F., Piacentini, L., Banni, M., Rebelo, M., Burlando, B., & Viarengo, A. (2005). Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*, 345(2), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.11.031>
- Elkin, L. A., Kay, M., Higgins, J. J., & Wobbrock, J. O. (2021). An Aligned Rank Transform Procedure for Multifactor Contrast Tests. *The 34th Annual ACM Symposium on User Interface Software and Technology*, 754–768. <https://doi.org/10.1145/3472749.3474784>
- Franzellitti, S., & Fabbri, E. (2005). Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(4), 1157–1163. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.244>
- Galvao, P., Longo, R., Paulo, J., Torres, M., Malm, O. (2015). Estimating the potential production of the brown mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) reared in three tropical bays by different methods of condition indices, *J. Mar. Biol.* 2015, 1–11, <https://doi.org/10.1155/2015/948053>
- 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
- J. Kopecka, J., Lehtonen, K.K., Baršiene, J., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Gercken, J., Pempkowiak J. (2006). Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic), *Mar. Pollut. Bull.* 53, 406–421, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.008>
- Lee, K. B., Liu, C. T., Anzai, Y., Kim, H., Aono, T., & Oyaizu, H. (2005). The hierarchical system of the 'Alphaproteobacteria': description of Hyphomonadaceae fam. nov., Xanthobacteraceae fam. nov. and

- Erythrobacteraceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1907-1919.
- 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), 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.11.016>
- Morris, J. P., Thatje, S., & Hauton, C. (2013). The use of stress-70 proteins in physiology: A re-appraisal. *Molecular Ecology*, 22(6), 1494–1502. <https://doi.org/10.1111/mec.12216>
- Musella, M., Wathsala, R., Tavella, T., Rampelli, S., Barone, M., Palladino, G., Biagi, E., Brigidi, P., Turrone, 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>
- Palladino, G., Rampelli, S., Scicchitano, D., Musella, M., Quero, G. M., Prada, F., Mancuso, A., Seyfarth, A. M., Turrone, 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>
- 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>
- 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>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Walne, P. R. (1976). Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture*, 8(4), 371-381.

- Wobbrock, J. O., Findlater, L., Gergle, D., & Higgins, J. J. (2011). The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. *Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems*, 143–146. <https://doi.org/10.1145/1978942.1978963>
- Zeng, Y., & Yang, H. (2021). Review of molluscan bivalve condition index calculations and application in Northern Quahogs *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture Research*, 52(1), 23-36.
- Zhang, L., Wu, W., Lee, Y. K., Xie, J., & Zhang, H. (2018). Spatial heterogeneity and cooccurrence of mucosal and luminal microbiome across swine intestinal tract. *Frontiers in Microbiology*, 9(JAN), 48. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00048/BIBTEX>