



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

BIOLOGIA MARINA

**MICROBIOMI ASSOCIATI A FANEROGAME MARINE NEI
MARI EUROPEI**

SEAGRASS MICROBIOMES IN EUROPEAN SEAS

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Martino Ilacqua

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa

Cinzia Corinaldesi

Correlatore:

Dott. Eugenio Rastelli

Sessione Estiva (Luglio)

Anno Accademico 2019/2020

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Il Progetto europeo Merces.....	5
1.2 Le fanerogame marine nei mari europei.....	7
1.3 Biodiversità microbica in sistemi bentonici a fanerogame marine	12
2. OBIETTIVI	19
3. MATERIALI E METODI	22
3.1 Aree di studio e campionamento	22
3.2 Quantità e qualità della materia organica nei sedimenti marini.....	27
3.2.1 Feopigmenti	27
3.2.2 Proteine totali	28
3.2.3 Carboidrati totali.....	30
3.2.4 Lipidi totali.....	31
3.3 Abbondanza procariotica nei sedimenti marini	34
3.4 Estrazione del DNA microbico dai sedimenti marini e dalle radici e foglie di fanerogame marine	36
3.5 Amplificazione tramite PCR e sequenziamento dei geni ribosomiali 16S e 18S.....	38
3.6 Analisi statistiche	40

4. RISULTATI	42
4.1 Variabili ambientali degli habitat a Zostera, Cymodocea e Posidonia analizzati	42
4.1.1 Materia Organica nei sedimenti marini dei diversi siti	44
4.1.2 Abbondanze procariotiche nei sedimenti marini dei diversi siti	54
4.2 Diversità di batteri, archaea e microeucarioti tramite sequenziamento dei geni 16s e 18s ribosomiali nei sedimenti marini e diverse parti delle fanerogame marine analizzate	59
4.2.1 Analisi a livello di Classe o Divisione della composizione tassonomica delle comunità di procarioti e microeucarioti	60
4.2.2 Analisi della diversità dei procarioti e microeucarioti a livello di amplicon sequence variants (ASVs)	66
4.2.3 Indici di diversità delle comunità procariotiche e di microeucarioti	69
4.2.4 Composizione tassonomica delle comunità di procarioti e microeucarioti a livello di amplicon sequence variants (ASVs)	73
4.2.5 Differenze nella composizione tassonomica delle comunità di procarioti fra i diversi gruppi di campioni	80
4.2.6 Differenze nella composizione tassonomica delle comunità di microeucarioti fra i diversi gruppi di campioni	87
5. DISCUSSIONE	93
6. CONCLUSIONI	102

7. RINGRAZIAMENTI..... 104

8. BIBLIOGRAFIA..... 105

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Progetto europeo Mercedes



Marine Ecosystem Restoration
in Changing European Seas

Figura 1 Logo progetto Mercedes (www.merces.eu)

Il progetto MERCES (Marine Ecosystem Restoration in Changing European Seas) si concentra sul ripristino di diversi habitat marini degradati, con l'obiettivo di: 1) valutare il potenziale di diverse tecnologie e approcci; 2) quantificare i rendimenti in termini di servizi ecosistemici e il loro impatto socioeconomico; 3) la definizione dei quadri normativi necessari per ottimizzare l'efficacia dei diversi approcci di ripristino. Tra gli obiettivi specifici figurano: a) il miglioramento e lo sviluppo di nuove azioni di ripristino di habitat marini degradati; b) aumentare l'adattamento degli habitat marini

degradati europei ai cambiamenti globali; c) migliorare la resilienza e i servizi dell'ecosistema marino; d) condurre analisi costi-benefici per le misure di ripristino marittimo; e) creare nuovi obiettivi, una rete di dialogo e opportunità all'interno della sfera industriale.

Il progetto promuove il censimento degli habitat marini degradati dell'UE per poi condurre esperimenti di ripristino, valutare gli effetti sui servizi ecosistemici e determinare il ritorno in termini socioeconomici.

MERCES è un consorzio multidisciplinare composto da 28 Partner, coordinato dal politecnico delle Marche, che riunisce competenze in ecologia marina, legge, politica, socioeconomia e comunicazione, dai mondi delle imprese (6 PMI di 4 paesi dell'UE), università (11 partner di 10 paesi dell'UE), centri di ricerca (8 partner di cui 7 provenienti da paesi dell'UE e 1 dalla Norvegia) e associazioni ambientaliste (3 partner di cui 2 da paesi dell'UE e 1 dalla Turchia) (MERCES project, www.merces.eu).

L'università Politecnica delle Marche contribuisce al progetto anche conducendo programmi di studio e restauro sulle fanerogame marine in ambiente costiero.

1.2 Le fanerogame marine nei mari europei

Le praterie a fanerogame marine sono costituite da angiosperme (piante superiori) che, adattandosi alla vita marina, sono riuscite a colonizzare habitat a fondi mobili lungo le coste, le baie e gli estuari (talvolta anche substrati duri come *Phyllospadix* spp, *Amphibolis* spp e *Posidonia* spp.).

Le praterie di macrofite si sviluppano principalmente nel subtidale, da 0 fino a circa 40 m di profondità (in acque a bassa torbidità possono arrivare fino a 60 m di profondità). I fattori che maggiormente ne influenzano la distribuzione sono la torbidità (che limita la luminosità), la salinità, l'esposizione all'aria e all'idro dinamismo, la quantità di nutrienti disponibili e la concentrazione di inquinanti (sono molto sensibili a idrocarburi e metalli pesanti) (Buia, Gambi e Dappiano, 2004).

Esistono 58 specie di fanerogame marine, appartenenti a 13 generi; dei 13 generi esistenti, sei (*Amphibolis*, *Heterozostera*, *Phyllospadix*, *Posidonia*, *Pseudalthenia* e *Zostera*) sono principalmente ristretti ai mari temperati, mentre gli altri sette (*Cymodocea*, *Enhalus*, *Halodule*, *Halophila*, *Syringodium*, *Thalassia* e *Thalassodendron*) sono presenti soprattutto nei mari tropicali. Le regioni temperate includono il Nord Atlantico, Nord Pacifico, il Mediterraneo, e gli Oceani temperati del Sud (Australia, Africa e Sud America), mentre quelle

tropicali comprendono l'Atlantico tropicale e l'Indo-Pacifico (Short *et al.*, 2007).

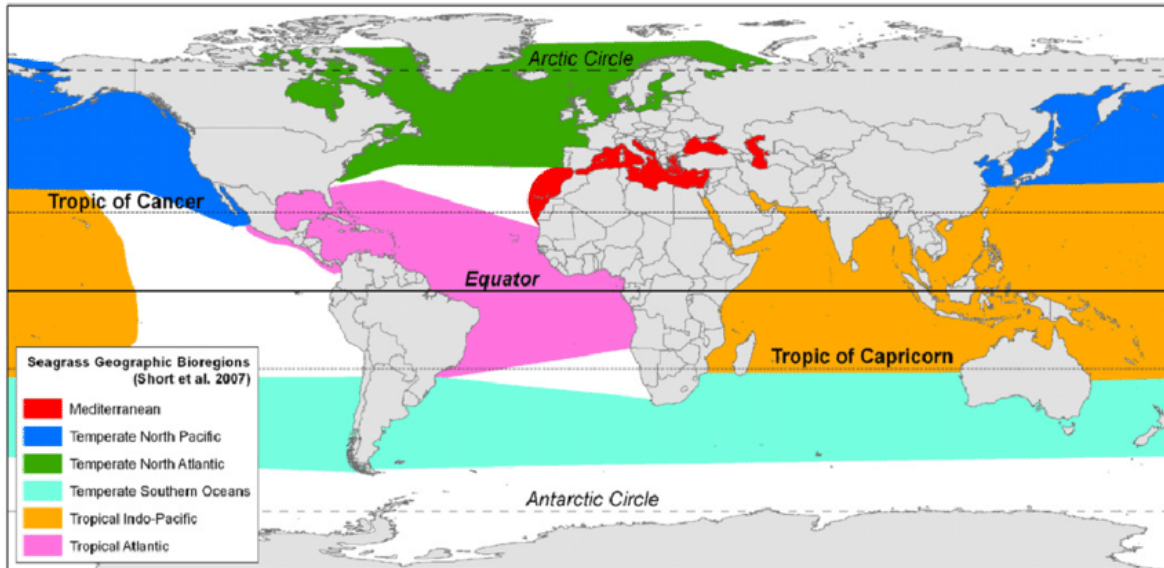


Figura 2 Mappa delle aree di distribuzione delle fanerogame marine (Short *et al.*, 2007)

Nel bacino del Mediterraneo sono presenti cinque specie di fanerogame marine:

1. *Posidonia oceanica*,
2. *Cymodocea nodosa*,
3. *Zostera marina*,
4. *Zostera noltii*,
5. *Halophila stipulacea*.

Tutte le fanerogame marine sono suddivise in radici, fusto (che prende il nome di rizoma), foglie (Hemminga e Duarte, 2000):

1. si sono adattate a vivere in un ambiente salato,
2. sono in grado di vivere completamente immerse,
3. hanno un vero sistema di ancoraggio al sedimento,
4. hanno un sistema di impollinazione idrofilo (svolgono il loro intero ciclo vitale in mare),
5. sono in grado di competere con successo con gli altri produttori primari marini, in particolare con le alghe.

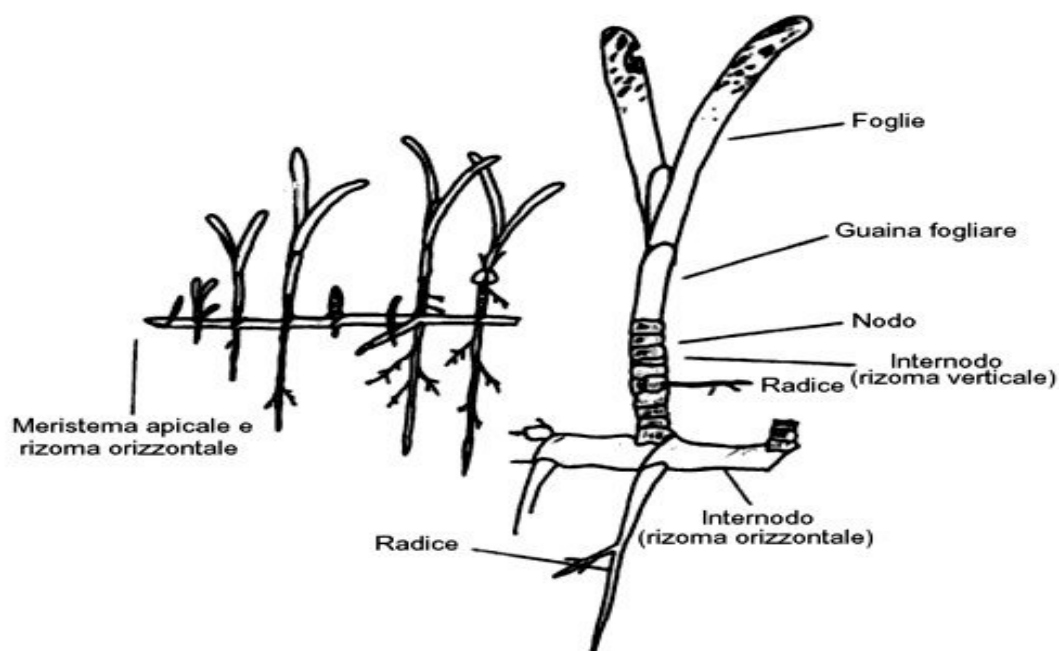


Figura 3 Struttura fanerogama marina (www.biologiamarina.eu)

Come le foreste di macroalghe, anche le praterie sono altamente produttive e supportano un'alta biomassa vegetale. Si tratta di hotspot di produzione primaria che raggiunge valori fino a 10 volte più elevata rispetto alle aree circostanti prive di praterie (intrappolano circa il 10% del carbonio totale immagazzinato negli ecosistemi marini (Schile *et al.*, 2017)). Poiché i tassi di erbivoria sono bassi nella maggior parte delle praterie di fanerogame (causa foglie con elevata concentrazione di tannini), la maggior parte della produzione

primaria è immagazzinata nei sedimenti o esportata agli ecosistemi circostanti, sostenendo un elevato tasso microbico (Valentine e Duffy, 2006).

Le praterie, inoltre, svolgono anche diverse funzioni ecologiche importanti:

1. forniscono cibo, habitat e zone di nursery per molte specie marine;
2. supportano una ricca biodiversità (le comunità associate sono costituite principalmente da molluschi, gasteropodi, insetti, pesci e altri organismi vegetali;
3. mostrano un'elevata produzione primaria e esportano carbonio, azoto e fosforo alle reti alimentari costiere;
4. stabilizzano sedimento sul fondale, rallentando l'idro dinamismo, e possono incrementare la qualità dell'acqua e diminuire l'erosione delle zone costiere.

Grazie all'importantissimo ruolo ecologico che assumono, le fanerogame marine vengono considerate dei veri e propri Ecosystem Engineers (Duarte et al., 2006).

1.3 Biodiversità microbica in sistemi bentonici a fanerogame marine

Come per le piante terrestri e per altri organismi marini bentonici, anche le fanerogame marine ospitano abbondanti comunità microbiche: queste influenzano la fisiologia e la salute delle angiosperme creando una serie di interazioni (dal mutualismo al parassitismo) all'interno dell'intera prateria. Popolazioni diversificate di batteri, funghi, microalghe, invertebrati, cianobatteri, archaea e virus colonizzano le foglie, le radici, i rizomi delle piante e i sedimenti circostanti, trovando in essi numerose micro-nicchie occupabili (Borowitzka, Lavery e Van Keulen, 2006), (Sakayaroj *et al.*, 2010). Le attività metaboliche di alcuni microbi associati, come i batteri "diazotrofi" o gli ossidanti dello zolfo (Ettinger *et al.*, 2017), governano l'ambiente chimico locale in modo da facilitare la sopravvivenza, la crescita e la produttività delle angiosperme (Berg *et al.*, 2009).

D'altra parte, agenti patogeni come il parassita protozoo *Labyrinthula*, provocano malattie che possono portare alla morte dell'intera prateria (Larkum, Kendrick e Ralph, 2018).

La notevole biomassa batterica in associazione con le angiosperme marine sottolinea un'elevata relazione ecologica tra pianta-batterio: questo è permesso grazie all'elevato utilizzo da parte dei microbi, di grandi quantitativi di DOM

e POM (materia organica disciolta/particolata) prodotte dalle fanerogame stesse (Kaldy *et al.*, 2006). Questo si traduce in concentrazioni microbiche sulle foglie significativamente più elevate rispetto a quelle nell'acqua di mare (Kirchman *et al.*, 1984). A livello fogliare i batteri possono promuovere il ricircolo di nutrienti, in particolare i microbi eterotrofi utilizzano prodotti fotosintetici di scarto e in cambio forniscono fino a un terzo della domanda di azoto, alle piante, attraverso l'azoto fissazione (Tarquinio, 2019), (Cole e McGlathery, 2012). Sono coinvolti nell'accrescimento della foglia fornendo metaboliti e nutrienti (Martin *et al.*, 2020), controllano la crescita delle alghe epifitiche che possono causare la copertura della lamina diminuendo irraggiamento e assorbimento dei nutrienti (Celdrán *et al.*, 2012).

Le comunità epifitiche inoltre supportano la catena trofica del pascolo, fornendo cibo a isopodi e anfipodi (Moksnes *et al.*, 2008).

Allo stesso modo i sedimenti vegetati presentano abbondanze batteriche molto più alte rispetto ai sedimenti non vegetati adiacenti (Duarte, Holmer e Marba, 2005): produzione batterica, respirazione, riduzione del solfato, denitrificazione e fissazione dell'azoto avvengono in maniera molto più elevata a livello del rizoma e dei sedimenti circostanti (Williams, Boyer e Jochem, 2009).

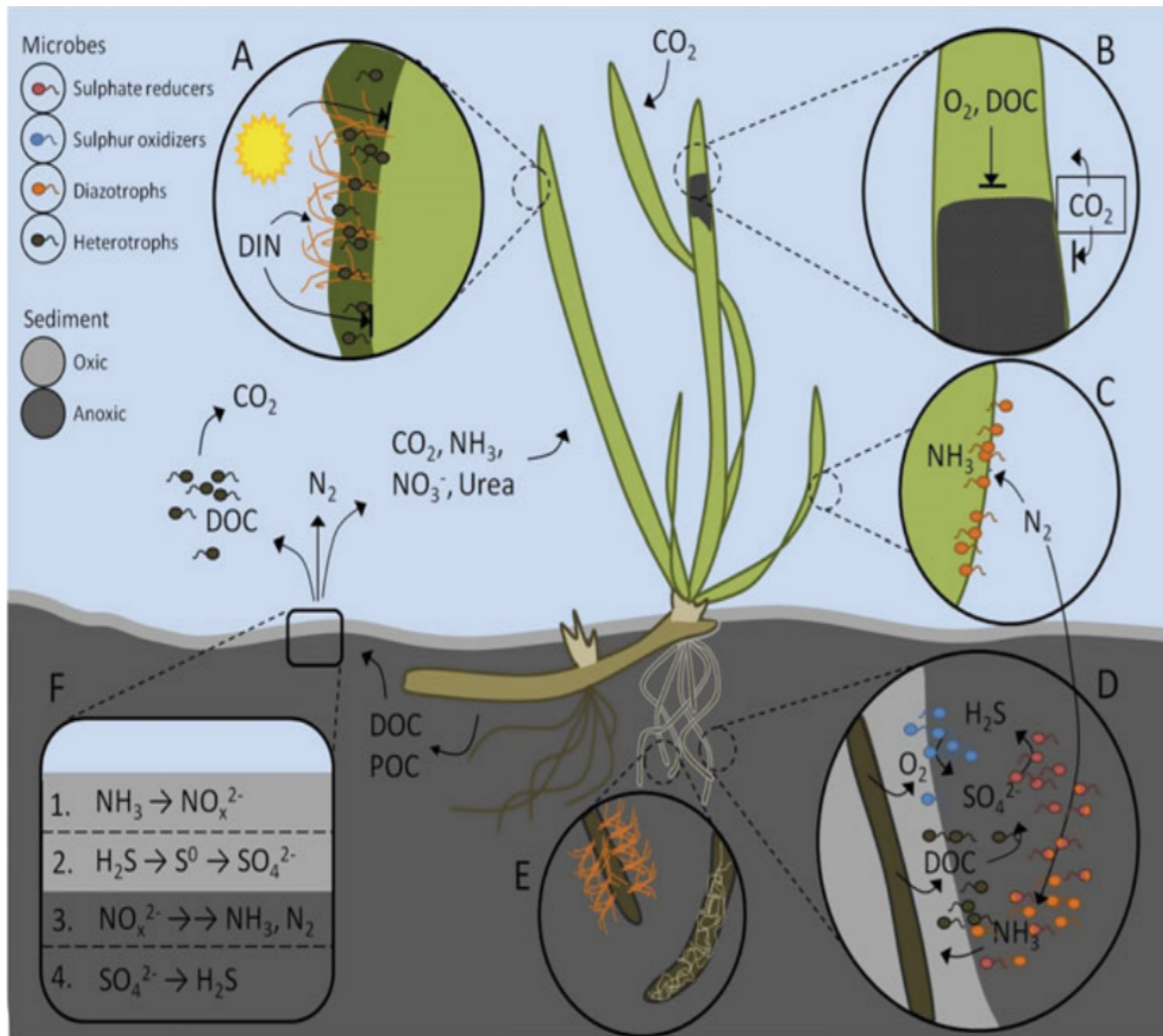


Figura 4 Diagramma concettuale delle principali interazioni fanerogame-microbioma. A: crescita sulla superficie fogliare di alghe, funghi e microbi eterotrofi con conseguente riduzione dell'irradiazione incidente e accesso all'azoto inorganico disciolto (DIN) nella colonna d'acqua. B: lesione (grigia) causata da *Labyrinthula* che limita la fissazione del carbonio e il trasporto di ossigeno e carbonio organico disciolto, al rizoma e alle radici. C: biofilm microbico (arancione) associato alla foglia, che fissa azoto facilitandone l'assorbimento attraverso le foglie. D: l'ossigeno e il carbonio organico disciolto (DOC) rilasciati dalla pianta, regolano i processi microbici tra cui il ciclo dello zolfo e l'azoto fissazione nel microambiente della radice e della rizosfera. E: batteri e funghi sulle radici della fanerogama. F: importanti processi microbici nei sedimenti della prateria che favoriscono il ciclo dei nutrienti e il ricambio di carbonio; (1) Nitrificazione, (2) Ossidazione dei solfuri, (3) Denitrificazione, Riduzione dei nitrati e Riduzione dissimilativa dei nitrati ad ammoniaca, (4) Riduzione dei solfati. (Kendrick, e Ralph, 2018)

D'altro canto, la pianta riesce a combattere la colonizzazione di organismi patogeni non solo grazie alle difese chimiche come fenoli, terpeni, caspasi e specie reattive dell'ossigeno, ma anche grazie alla sintesi diretta di composti antibiotici che la proteggono direttamente dalla colonizzazione microbica e dalla formazione di biofilm (Bushmann e Ailstock, 2006), (Engel, Puglisi e Jensen, 2006).

Per questi motivi, i sistemi a praterie di fanerogame presentano un'alta biodiversità microbica: questa però non è omogenea all'interno dell'habitat ma varia notevolmente in base alle zone. Le comunità batteriche associate alle foglie presentano alte diversità rispetto a quelle associate a radici, sedimento e all'acqua circostante.

Le comunità di batteri epifiti sono in genere dominati da eterotrofi aerobici, da alphaproteobatteri, insieme a flavobatteri, batterioideti e cianobatteri. Tra questi sono presenti importanti eterotrofi aerobici di diversi generi marini tra cui *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* e *Oceanospirillum* (Weidner *et al.*, 2000), (Uku *et al.*, 2007), (Crump e Koch, 2008), (Hassenruck *et al.*, 2015), (Crump *et al.*, 2018).

D'altra parte, sedimenti e radici sono caratterizzati da comunità batteriche molto diverse e sono tipicamente dominati dai batteri anaerobici obbligati,

riduttori del solfato, dagli ossidanti dello zolfo, dai deltaproteobatteri e dai gammaproteobatteri (Cifuentes *et al.*, 2000), (Jensen *et al.*, 2007). In particolare, ci sono prove per un'ulteriore suddivisione di questi gruppi, con le radici che ospitano una più alta proporzione di epsilonproteobatteri, gammaproteobatteri e Actinobatteri, rispetto ai sedimenti adiacenti che accolgono maggiormente riduttori del solfato come Deltaproteobatteri (Jensen *et al.*, 2007).

I batteri aerobici che abitano questi ambienti sono in genere molto attivi, caratterizzati da alti livelli di produzione e costituiti da gruppi batterici eterotrofi che sono onnipresenti negli ambienti di acqua di mare. Gli eterotrofi aerobici che abitano la zona che si estende per alcune centinaia di micrometri dalle radici delle piante otterranno il primo accesso ai substrati organici labili trasudati nella rizosfera (Devereux *et al.*, 2005). All'interno dei sedimenti circostanti, sebbene limitati a uno strato superficiale relativamente stretto e generalmente presenti in abbondanza sostanzialmente inferiore rispetto ai batteri anaerobici, gli eterotrofi aerobici sono responsabili di una frazione significativa della decomposizione della materia organica e quindi svolgono un ruolo importante sia nel ciclo del carbonio che nei processi di rimineralizzazione dei nutrienti (Kilminster e Garland, 2009).

Al di sotto di pochi millimetri dalla superficie del sedimento, la penetrazione di ossigeno è minima e domina il metabolismo batterico anaerobico. Nei sedimenti marini il solfato è l'accettore di elettroni terminale più disponibile (Capone e Kiene, 1988) e i batteri riducenti del solfato, che ossidano i substrati organici riducendo solfato a idrogeno solforato, sono responsabili fino al 50% della rimineralizzazione del materiale organico (Jørgensen *et al.*, 1982). All'interno dei sedimenti di fanerogame marine i batteri riducenti il solfato, appartenenti principalmente ai Deltaproteobatteri, sono tra i gruppi batterici più abbondanti (Cifuentes *et al.*, 2000). In particolare, il sottoprodotto del solfato, ridotto dall'attività batterica, l'idrogeno solforato (H_2S), è una potente fitotossina che ha dimostrato di inibire la crescita e la fotosintesi delle angiosperme ed è stata implicata come agente causale nel declino di quest'ultime (Holmer e Hassler-Sheetal, 2014). A causa del loro ruolo nella produzione di H_2S tossico, è in qualche modo paradossale che i batteri che riducono i solfati forniscano effettivamente servizi preziosi alle fanerogame marine e possano persino essere considerati importanti partner simbiotici. Le attività dei batteri che riducono i solfati possono aiutare a mantenere le condizioni geochimiche dei sedimenti appropriate per la crescita delle angiosperme marine (Pollard e Moriarty 1991), ma forse ancora più importante,

molti batteri che riducono i solfati sono anche diazotrofi, ovvero hanno la capacità di fissare gas dinitrogeno biologicamente non disponibile (N_2), in ammonio (NH_4^+). La fissazione dell'azoto è un processo importante all'interno delle praterie a fanerogame marine, dove la disponibilità di azoto può porre limiti sostanziali alla produzione primaria (Garcias-Bonet *et al.*, 2018). Infatti, i batteri diazotrofici forniscono alle praterie fino al 65% del loro fabbisogno di azoto (Welsh *et al.*, 2000), (Devereux *et al.*, 2005).

I diazotrofi cianobatteri vivono in associazione con le fanerogame marine (Lyimo e Hamisi, 2008), la maggior parte dell'attività diazotrofica proviene da batteri eterotrofi, con fino al 95% di fissazione dell'azoto attribuita a batteri che riducono il solfato (Capone *et al.*, 1982). La collaborazione reciproca tra le fanerogame e i batteri che riducono i solfati può essere ulteriormente facilitata dalla ricorrenza di batteri ossidanti dello zolfo dagli epsilon-proteobatteri tra cui *Sulphonimonas* e *Tiomicrospira*, che abitano le radici delle piante e disintossicano i sedimenti circostanti ossidando l' H_2S generato dai batteri che riducono il solfato (Jensen *et al.*, 2007). Queste interazioni multi-specie sono indicative di un microbioma complesso e altamente interconnesso, che coinvolge relazioni sinergiche tra le praterie e molteplici partner batterici.

2. OBIETTIVI

L'obiettivo principale del presente lavoro è stata l'analisi delle comunità microbiche (includendo batteri, archaea e microeucarioti) in diversi habitat marini caratterizzati dalla presenza di diverse specie di fanerogame marine. Nell'ambito del progetto MERCES si è infatti effettuato un campionamento a livello internazionale in diversi siti costieri caratterizzati da habitat a *Zostera*, a *Cymodocea* o a *Posidonia* in diversi mari Europei, al fine di confrontare in ciascun sito le comunità microbiche nei sedimenti vegetati e non vegetati (cioè in presenza o assenza della fanerogama tipica di quello specifico habitat), nonché nelle diverse parti di ciascuna specie di pianta (includendo le radici, le foglie più nuove e le foglie più vecchie).

Per effettuare una caratterizzazione più completa dei diversi sistemi marini campionati, si è proceduto anche all'analisi delle principali variabili abiotiche (Temperatura e Salinità), delle qualità e quantità della materia organica, nonché dell'abbondanza procariotica totale nei sedimenti.

Le principali domande a cui si è voluto rivolgere lo studio sono state le seguenti:

- I diversi siti di prelievo nei diversi mari europei oggetto del presente studio, caratterizzati dalla presenza di diverse specie di fanerogame marine, hanno caratteristiche ambientali diverse e di stato trofico nei sedimenti?
- I sedimenti vegetati considerati differiscono nelle caratteristiche trofiche e nelle abbondanze microbiche rispetto ai sedimenti non vegetati?
- Le comunità di batteri, archaea e microeucarioti differiscono (in termini di alfa-diversità e/o di composizione tassonomica della comunità) sulla base dei seguenti fattori? [tipo di campione (cioè tra comunità del sedimento e microbiomi di fanerogame); Mare (cioè tra diversi settori oceanografici); sito di campionamento (cioè tra diversi siti all'interno dello stesso settore oceanografico); specie di fanerogama (cioè tra microbiomi di diverse specie di fanerogame); tipologia di sedimento (vegetato o non vegetato); diversa porzione di pianta (radice, foglie nuove, foglie vecchie)].
- Quali di questi fattori sono più importanti nel determinare la composizione delle comunità microbiche?
- Quali sono i gruppi tassonomici di procarioti e di microeucarioti che mostrano differenze significative in termini di abbondanza relativa nel confronto delle comunità microbiche nei diversi tipi di campioni?

- Esistono taxa di procarioti e microeuceriotti che possono essere coinvolti nel migliorare le condizioni di salute delle fanerogame e che potrebbero risultare utili per facilitare il restauro delle praterie di fanerogame?

3. MATERIALI E METODI

3.1 Aree di studio e campionamento

Grazie alla collaborazione tra Italia, Croazia, Turchia, Finlandia, Estonia e Norvegia nell'ambito del progetto europeo MERCES, è stato possibile campionare praterie di diverse specie di fanerogame marine, situate in diversi mari europei, inclusi Mare del Nord, Mar Baltico, Mare Adriatico (Est e Ovest) e Mare Egeo.

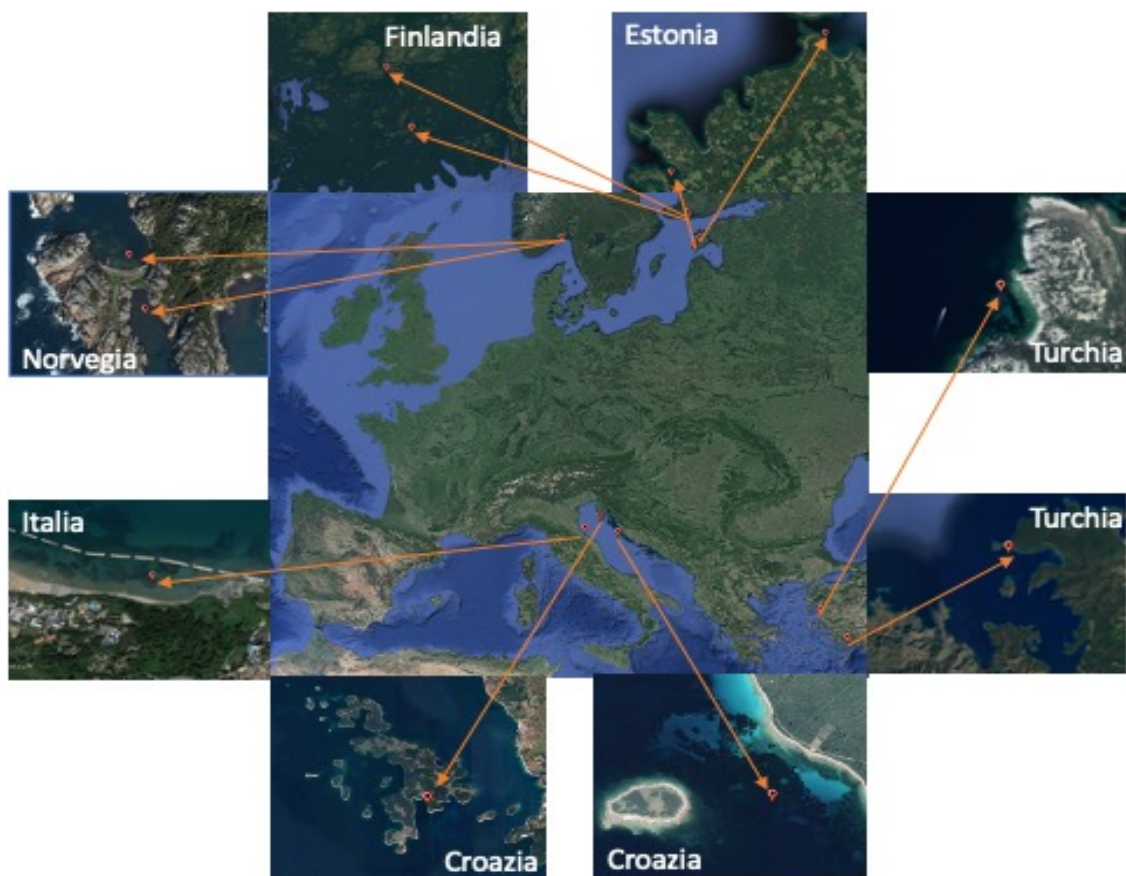


Figura 5 Mappa delle zone e dei siti di campionamento.

In ciascun sito di ciascuna Nazione sono state raccolte le seguenti tipologie di campioni:

1. Sedimento non vegetato,
2. Sedimento vegetato,
3. Foglie nuove,
4. Foglie vecchie,
5. Radici.

Tabella 1 Tipologia di campioni raccolti in ciascuna Nazione.

Nazione	Sedimento non vegetato	Sedimento vegetato	Radici	Foglie nuove	Foglie vecchie
Italia	V	V	V	V	V
Croazia	V	V	V	V	V
Finlandia	V	V			
Estonia	V	V	V	V	V
Norvegia	V	V	V	V	V
Turchia	V	V	V	V	V

Tabella 2 Coordinate di ogni sito campionato.

Nazione	Sito	Latitudine	Longitudine	Trattamento	Specie
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	Non vegetato	sedimento
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	Non vegetato	sedimento
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	Non vegetato	sedimento
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	vegetato	<i>Cymodocea</i>
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	vegetato	<i>Cymodocea</i>
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	vegetato	<i>Cymodocea</i>
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	Non vegetato	sedimento
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	Non vegetato	sedimento

Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	Non vegetato	sedimento
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	vegetato	<i>Cymodocea</i>
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	vegetato	<i>Cymodocea</i>
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	vegetato	<i>Cymodocea</i>
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	Non vegetato	sedimento
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	Non vegetato	sedimento
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	Non vegetato	bare
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	vegetato	<i>Posidonia</i>
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	vegetato	<i>Posidonia</i>
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	vegetato	<i>Posidonia</i>
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	Non vegetato	sedimento
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	Non vegetato	sedimento
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	Non vegetato	sedimento
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	vegetato	<i>Zostera</i>
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	vegetato	<i>Zostera</i>
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	vegetato	<i>Zostera</i>
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	Non vegetato	sedimento
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	Non vegetato	sedimento
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	Non vegetato	sedimento
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	vegetato	<i>Zostera</i>
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	vegetato	<i>Zostera</i>
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	vegetato	<i>Zostera</i>
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	Non vegetato	sedimento
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	Non vegetato	sedimento
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	Non vegetato	sedimento
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	vegetato	<i>Zostera</i>
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	vegetato	<i>Zostera</i>
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	vegetato	<i>Zostera</i>
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	Non vegetato	sedimento
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	Non vegetato	sedimento
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	Non vegetato	sedimento
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	vegetato	<i>Zostera</i>
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	vegetato	<i>Zostera</i>
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	vegetato	<i>Zostera</i>
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	Non vegetato	sedimento
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	Non vegetato	sedimento
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	Non vegetato	sedimento
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	vegetato	<i>Zostera</i>

Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	vegetato	<i>Zostera</i>
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	vegetato	<i>Zostera</i>
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	Non vegetato	sedimento
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	Non vegetato	sedimento
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	Non vegetato	sedimento
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	vegetato	<i>Zostera</i>
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	vegetato	<i>Zostera</i>
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	vegetato	<i>Zostera</i>
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	Non vegetato	sedimento
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	Non vegetato	sedimento
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	Non vegetato	sedimento
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	vegetato	<i>Posidonia</i>
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	vegetato	<i>Posidonia</i>
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	vegetato	<i>Posidonia</i>
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	Non vegetato	sedimento
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	Non vegetato	sedimento
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	Non vegetato	sedimento
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	vegetato	<i>Posidonia</i>
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	vegetato	<i>Posidonia</i>
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	vegetato	<i>Posidonia</i>

In Tabella 3 viene inoltre fornito un quadro sinottico della presenza delle diverse specie di fanerogame, nei diversi siti campionati nel presente studio.

Tabella 3 Specie di fanerogama marina presente nei diversi siti presi in esame.

	Posidonia spp.	Zostera spp.	Cymodocea spp.
Italia			V
Croazia	V		V
Finlandia		V	
Estonia		V	
Norvegia		V	
Turchia	V		

I campioni sono stati campionati da operatori subacquei scientifici, congelati e spediti in ghiaccio secco presso l'Università Politecnica delle Marche e conservati a - 27 °C fino alle successive analisi di laboratorio.

Per tutte le nazioni coinvolte nel progetto si sono effettuate le seguenti tipologie di analisi:

1. Analisi della quantità e qualità della materia organica (proteine, carboidrati, lipidi e pigmenti fotosintetici) nel sedimento non vegetato e vegetato;
2. Abbondanze procariotiche nei campioni di sedimento non vegetato e vegetato.
3. Estrazione e quantificazione del DNA procariotico ed eucariotico da campioni di sedimento non vegetato e vegetato e da campioni di radici e di foglie (vecchie e nuove) delle diverse fanerogame.

3.2 Quantità e qualità della materia organica nei sedimenti marini

3.2.1 Feopigmenti

L'estrazione dei feopigmenti dal sedimento viene eseguita seguendo il metodo di Lorenzen e Jeffrey (1980). Un'aliquota di sedimento umido viene messa in una provetta in cui vengono aggiunti dapprima 0,1g circa di Carbonato di Magnesio, che stabilizza l'atomo di Magnesio della clorofilla-a evitandone la decomposizione, quindi 5ml di acetone in soluzione acquosa (90%). Le provette vengono poi tappate e agitate al vortex per 45 secondi circa, sonicate per tre volte 1 minuto a intervalli di 30 secondi, infine lasciate al buio a 4°C per circa 12 ore. Dopo aver centrifugato a $800\times g$ (2150 rpm) per 10 minuti, l'estratto acetone viene usato per la lettura allo spettrofluorimetro, alle lunghezze d'onda di 430 nm (eccitazione) e 665 nm (emissione), prima e dopo acidificazione in cuvetta (tramite l'aggiunta di 200 μ l di HCl 0,1M lasciato reagire per 20 secondi).

Terminate le letture, il sedimento è posto ad essiccare in stufa a 60°C e poi pesato. Le concentrazioni di feopigmenti sono ottenute dall'applicazione delle formule di Plante-Cuny (Plante-Cuny, 1974), e vengono espresse in μ g di pigmento per grammi di sedimento secco.

3.2.2 Proteine totali

La determinazione delle proteine totali è stata eseguita usando il metodo di Hartree (Hartree, 1972), una modificazione del procedimento di Lowry (Lowry et al., 1951) adattato da Danovaro e Fabiano (Danovaro e Fabiano, 1990) per l'analisi dei sedimenti marini. Questo metodo colorimetrico sfrutta la proprietà dell'azoto del legame peptidico di reagire prima con il tartrato rameico e in seguito con il reattivo di Folin Ciocalteau in ambiente basico (pH 10). Quest'ultimo è a base di Fenolo e di Fosfomolibdato e permette di colorare la soluzione di un blu stabile, proporzionale al tenore proteico.

Un'aliquota di sedimento umido da ciascuno dei campioni viene posta singolarmente in una provetta. In ciascuna provetta viene aggiunto poi 1 ml di acqua milliQ, quindi agitata mediante vortex per circa 1 minuto. I campioni vengono sonicati poi per 3 minuti non consecutivi (sonicatore Branson 2200, 60W) a intervalli di 30 secondi, per distaccare la matrice organica dal sedimento (Danovaro e Fabiano, 1990). Vengono aggiunti al campione 0.9 ml della soluzione A (2 g di NaK-tartrato e 100 g di Na₂CO₃ disciolti in 500 ml di NaOH 1M e portati a volume con acqua milliQ) preparata precedentemente. Le provette vengono agitate mediante vortex per circa 1 minuto, poi vengono

messe in un bagno termostatico a 50°C per 10 minuti. A questo punto vengono aggiunti ai campioni 0.1 ml di soluzione B (contenente Solfato di Rame pentaidrato), agitati mediante vortex per 1 minuto e lasciati riposare per 10 minuti a temperatura ambiente.

Ad ogni campione si aggiungono infine 3 ml di una soluzione C contenente il reattivo di Folin-Ciocalteau, si agita mediante vortex, quindi si lascia in un bagno termostatico a 50°C per 10 minuti. In seguito, si procede con la centrifugazione a 2150 rpm per 15 minuti.

Per permettere la lettura spettrofotometrica il sopranatante viene versato in una cuvetta di vetro ottico (1 cm di passo), inserita nello strumento e letto a una lunghezza d'onda di 650 nm. Al termine dell'operazione il sopranatante si scarta e il sedimento viene messo ad essiccare a 60°C per poi essere pesato. Le concentrazioni di proteine sono espresse in mg/g equivalenti di albumina bovina su sedimento secco.

Allo stesso modo sono stati trattati bianchi e reagenti (1 ml di acqua milliQ). Per determinare la concentrazione delle proteine nei campioni è stata utilizzata una curva di taratura ottenuta con soluzioni standard di albumina bovina a concentrazioni crescenti.

3.2.3 Carboidrati totali

La determinazione dei carboidrati totali è stata condotta secondo il metodo di Dubois (Dubois *et al.*, 1956) adattato ai sedimenti da Gerchacov e Hatcher (Gerchacov and Hatcher, 1972). Il metodo è colorimetrico e sfrutta la capacità degli zuccheri di reagire con il fenolo in presenza di acido solforico concentrato. Un'aliquota di sedimento secco delle varie repliche dei campioni viene posta singolarmente in una provetta. In ciascuna provetta viene aggiunto 1 ml di acqua milliQ, quindi agitata mediante vortex per circa 1 minuto. I campioni vengono sonicati poi per 3 minuti non consecutivi (sonicatore Branson 2200, 60W) a intervalli di 30 secondi, per distaccare la matrice organica dal sedimento (Danovaro e Fabiano, 1990). A ciascuno viene aggiunto 1 ml di fenolo al 5% e agitato mediante vortex, quindi si lascia riposare per 10 minuti a temperatura ambiente.

Per la determinazione dei carboidrati totali vengono aggiunti a ciascun campione 5 ml di acido solforico concentrato che provoca la carbonizzazione dei composti fenol-glucidici mediante una reazione estremamente esotermica; le provette vengono successivamente agitate tramite vortex e la miscela di reazione si colora con una tonalità tra il giallo paglierino e il marrone scuro. I campioni vengono centrifugati a 2150 rpm per 15 minuti e il sovranatante

viene letto allo spettrofotometro mediante una cuvetta in vetro (passo ottico di 1 cm). L'assorbanza viene misurata alla lunghezza d'onda di 485 nm e la lettura a lunghezza d'onda di 600 nm viene usata per correggere la possibile interferenza causata dalla torbidità del sovrinatante.

Le concentrazioni dei carboidrati vengono espresse in mg/g equivalenti di glucosio su sedimento secco. Allo stesso modo sono stati trattati bianchi e reagenti (1 ml di acqua milliQ). Per determinare la concentrazione dei carboidrati nei campioni è stata utilizzata una curva di taratura ottenuta con soluzioni standard di D-Glucosio a concentrazioni crescenti.

3.2.4 Lipidi totali

La determinazione dei lipidi totali è eseguita usando il metodo di Bligh e Dyer (Bligh e Dyer, 1959) che sfrutta la solubilità dei lipidi in solventi organici, quali alcool metilico e cloroformio, adattato ai sedimenti da Danovaro e Fabiano (Danovaro e Fabiano, 1990).

Un'aliquota di sedimento umido dei campioni viene posta singolarmente in una provetta. In ciascuna provetta viene aggiunto 1 ml di acqua milliQ, quindi agitata mediante vortex per circa 1 minuto. I campioni vengono sonicati poi per 3 minuti non consecutivi (sonicatore Branson 2200, 60W) a intervalli di

30 secondi, per distaccare la matrice organica dal sedimento (Danovaro e Fabiano, 1990).

Si aggiungono quindi a ciascun campione 1.25 ml di cloroformio e 2.5 ml di alcool metilico, si agitano e si lasciano reagire a 4°C per 10 minuti.

I campioni vengono centrifugati a 2150 rpm per 10 minuti e il sovranatante ottenuto trasferito in provette Pyrex[®], mentre le provette con il sedimento rimasto vengono poste ad essiccare in stufa a 60°C. Alle provette si aggiungono 1.25 ml di cloroformio e 1.25 ml di acqua milliQ, si agitano al vortex per circa 1 minuto e si centrifugano a 2150 rpm per 5 minuti. In questo modo si separa la frazione sovranatante idroalcolica, che verrà scartata, dalla frazione sottostante di cloroformio (contenente i lipidi da misurare) che invece verrà posta ad evaporare in un bagno termostatico a secco a 90-100°C per 20-25 minuti fino a completa evaporazione.

Le provette vengono lasciate raffreddare a temperatura ambiente, quindi a ciascun campione vengono aggiunti 2 ml di acido solforico concentrato. Di nuovo, le provette vengono messe in un bagno termostatico a secco a 200°C per 15 minuti, poi trasferite in una vaschetta contenente ghiaccio per 5 minuti, fino a che non si raffreddano completamente. A ciascun campione si aggiungono 3 ml di acqua milliQ e si agita al vortex.

Si può procedere alla lettura allo spettrofotometro, usando una cuvetta in vetro di passo ottico di 1 cm ed una lunghezza d'onda di 375 nm.

I bianchi reagenti sono ottenuti mettendo in altre provette 1 ml di cloroformio e ponendole ad essiccare nel bagnetto termostatico a secco a 90-100°C per 20-25 minuti e poi trattate come i campioni.

Le concentrazioni dei lipidi vengono espresse in mg/g equivalenti di tripalmitina su sedimento secco. Il calcolo si basa su una curva di taratura ottenuta facendo reagire diluizioni seriali note di una soluzione di tripalmitina.

3.2.5 Carbonio biopolimerico

Il Carbonio biopolimerico (BPC) è stato definito come misura del Carbonio organico sedimentario potenzialmente disponibile per gli organismi eterotrofi bentonici. Il BPC è dato dalla somma delle tre categorie principali dei composti biochimici della materia organica (carboidrati, lipidi, e proteine) convertiti in carbonio equivalente usando i fattori di conversione relativi (rispettivamente 0.49, 0.40 e 0.75). La differenza tra Carbonio organico totale (total organic carbon, TOC) e Carbonio biopolimerico (biopolymeric carbon, BPC) è definita Carbonio geopolimerico (geopolymeric carbon, GPC).

3.3 Abbondanza procariotica nei sedimenti marini

Il metodo utilizzato per l'abbondanza procariotica totale si basa sulla microscopia a epifluorescenza dopo la colorazione delle cellule con SYBR Green I[®].

I campioni di sedimento sono stati trattati con pirofosfato di tetrasodio (concentrazione finale 5 mM) e agitati mediante ultrasuoni (tre volte per 1 minuto con pause di 30s). Il surnatante pulito è stato diluito con acqua di mare pre-filtrata su membrane da 0,2 µm.

I campioni sono stati filtrati su filtri Whatman nuclepore black[®] 0,2 µm usando una pompa del vuoto e colorati con 20 µl di SYBR Green I[®] (la soluzione madre di Invitrogen 10.000x è stata diluita 1:20 con soluzione tampone TE). I filtri sono stati incubati al buio per 20 minuti, lavati tre volte con tre ml di acqua sterile Milli-Q pre-filtrata su membrane da 0,2 µm e quindi montati su vetrini per microscopio, in vetro, con 20 µl di soluzione antifade (soluzione salina tampone fosfato 5% [pH 7,8], glicerolo 5%, ascorbico 0,5%). La conta dei procarioti è stata effettuata mediante microscopia a epifluorescenza analizzando 20 campi ottici (Danovaro, 2009).

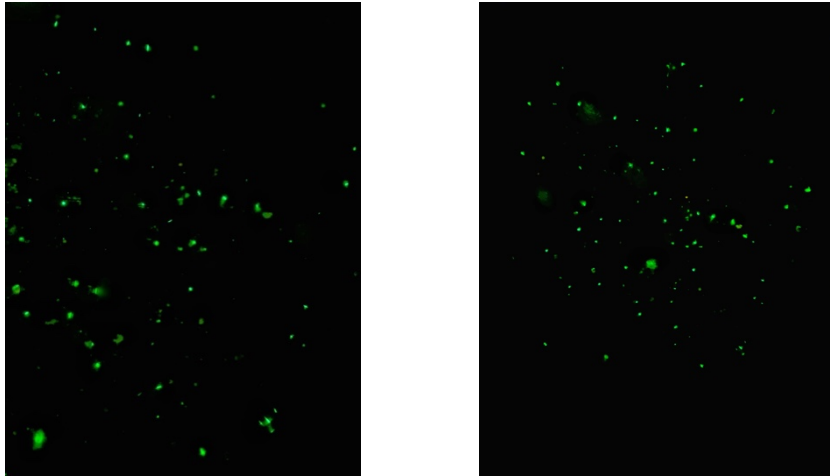


Figura 6 Foto al microscopio ad epifluorescenza del campo ottico risultante, dopo il trattamento del campione con Cyber Green.

Infine, per il calcolo dell'abbondanza procariotica si è utilizzata l'equazione:

$$\frac{n^{\circ} \text{ cellule}}{g} = \frac{N \times OFC \times D}{\text{peso secco sedimento (g)} \times 1,44}$$

Dove:

N: numero medio di batteri contati.

OFC: correction factor for the optical field (fattore di correzione per il campo ottico). Rappresenta l'area della griglia inserita nell'oculare, divisa per l'area

totale dell'imbuto dell'apparato di filtrazione.

D: fattore di diluizione.

1,44: coefficiente di estrazione (fattore di correzione per i campioni di sedimenti) (Danovaro, 2009).

I vetrini ottenuti sono stati conservati a -27°C mentre i pesi secchi sono stati ottenuti lasciando i campioni in stufa a 60°C per almeno 48h.

3.4 Estrazione del DNA microbico dai sedimenti marini e dalle radici e foglie di fanerogame marine

Sono state effettuate tre tipi di estrazioni:

1. Dai sedimenti (vegetati/nudi).
2. Dalle foglie (giovani/vecchie).
3. Dalle radici.

L'estrazione del Dna dal sedimento consta di due fasi e avviene mediante l'utilizzo del "DNeasy® PowerSoil® Kit".

Il primo passaggio si basa sul lavaggio del campione; questo step non è incluso nel protocollo del kit ma si è visto che migliora il successo dell'amplificazione del DNA, tramite PCR, nei sedimenti marini (Fortin *et al.*, 2004). 2.5g di sedimento in Falcon da 50ml vengono vortexati (2 minuti) e centrifugati

(2minuti, 6000xg) con l'aggiunta in serie di 3 "wash solution":

1. WS 1: 50mM Tris-HCl, pH 8.3; 200mM NaCl; 5mM Na₂EDTA; 0.05% Triton X-100.
2. WS 2: 50mM Tris-HCl, pH 8.3; 200mM NaCl; 5mM Na₂EDTA.
3. WS 3: 10mM Tris-HCl, pH 8.3; 0.1mM Na₂EDTA.

Ad ogni passaggio si scarta il supernatante.

Il secondo passaggio prevede di seguire le indicazioni date con il DNeasy® PowerSoil® Kit. Il protocollo consiste in una serie di passaggi dove vengono aggiunte in serie sei soluzioni differenti, che permettono l'estrazione e la purificazione del Dna. Immediatamente dopo l'aggiunzione della soluzione 1 sono state effettuate due incubazioni a 70°C per 5 minuti (esenti dalle istruzioni del kit) che si è visto permettono di aumentare la resa del DNA estratto (Danovaro, 2009).

Il procedimento per l'estrazione di Dna da foglie e radici differisce solamente nel metodo di preparazioni dei campioni; 1cm² di foglie e radici ancora congelate sono state poste all'interno delle beads fornite con il kit e successivamente sminuzzate e pestate; infine si è continuato seguendo le istruzioni del DNeasy® PowerSoil® Kit, con l'aggiunta delle due incubazioni a 70°C.

Per controllare la qualità dell'estrazioni è stato poi utilizzato il “Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers ®”.

Il Dna estratto all'interno di Eppendorf è stato conservato a -27°C.

3.5 Amplificazione tramite PCR e sequenziamento dei geni ribosomiali 16S e 18S

I campioni di DNA estratti sono stati sequenziati usando la piattaforma IonTorrent disponibile presso il Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica di Napoli "Anton Dohrn", utilizzando due diversi set di primer: 1) un set di primer universali per amplificare le regioni V4-5 del gene ribosomiale 16S procariotico e 18S eucariotico (Parada *et al.*, 2015); 2) un set di primer specifico per il gene ribosomiale 18S eucariotico per ottenere una visione più specifica della diversità dei micro-eucarioti associati alle matrici in oggetto (Hadziavdic *et al.*, 2014). Due diversi batch di sequenziamento sono stati effettuati separatamente: 1) uno contenente DNA estratto dai soli campioni di sedimento; 2) uno comprendente i campioni di DNA estratti da foglie e radici. Ciascun batch di campioni è stato successivamente analizzato mediante la pipeline di analisi QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019). Brevemente, ciascun set di campioni è stato trattato per rimuovere adattatori e primer mediante cutadapt

prima di essere analizzato con l'algoritmo DADA2 dedicato ai dati di pirosequenziamento per ottenere una tabella di abbondanze relative di Amplicon Sequence Variants (ASV) per ciascun campione per ciascun marker analizzato (Tangherlini *et al.*, 2020). Entrambi i set sono stati uniti in un secondo step. È stata ottenuta un'affiliazione tassonomica a tutte le ASV generate utilizzando: 1) il database SILVA, versione 132, per il set di campioni ottenuto dal primo set di primer (Tangherlini *et al.*, 2020); 2) il database PR2 (versione 4.12.0) per i campioni amplificati mediante il secondo set di primer (Guillou *et al.*, 2012).

Dai campioni generati con il primo set di primer sono state estratte le sequenze eucariotiche, plastidiche e ribosomiali, per poi effettuare una normalizzazione della tabella delle abbondanze relative di ASV a 3000 sequenze per campione per ottenere indici di alfa-diversità (Tangherlini *et al.*, 2020); le sequenze plastidiche sono state analizzate in modo più approfondito separatamente, usando una versione plastidiale del database PR2. Dai campioni generati con il secondo set di primer sono state separate le sequenze di micro-eucarioti (includendo micro-alghe, protisti e funghi) e di metazoi; la tabella delle abbondanze relative di ASV di micro-eucarioti è stata normalizzata a 100 sequenze.

3.6 Analisi statistiche

Per testare le differenze nei valori delle variabili analizzate nei diversi campioni del presente studio si è utilizzato il test della PERMANOVA (permutational multivariate analysis of variance) disponibile nel programma PRIMER V6+PERMANOVA. Nell'analisi sono stati considerati i seguenti fattori: Mare, Sito, tipo di sedimento (vegetato o non vegetato) e tipo di parte di fanerogama (radice, foglia nuova o foglia vecchia). Per illustrare la distribuzione dei campioni in base alle variabili ambientali si sono effettuate analisi di PCO (principal coordinate analysis) e MDS (multidimensional scaling), disponibili in PRIMER V6+PERMANOVA. L'analisi tramite MDS è stata utilizzata anche per illustrare la distribuzione dei campioni sulla base della composizione delle comunità di procarioti e microeucarioti nei campioni di sedimento e nei microbiomi di fanerogame. Per le analisi inerenti la composizione della comunità microbica, in caso di differenze significative per i fattori testati evidenziate dalla PERMANOVA, sono stati effettuati i relativi pairwise tests e si è utilizzato il programma STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) per individuare i gruppi tassonomici la cui abbondanza mostrava differenze significative tra differenti campioni.

4. RISULTATI

4.1 Variabili ambientali degli habitat a Zostera, Cymodocea e Posidonia analizzati.

Per ciascun sito sono state misurate temperatura (°C), salinità e la profondità a cui è avvenuto il campionamento.

Tabella 4 Coordinate e parametri ambientali (profondità, temperatura e salinità) di ogni sito campionato

Nazione	Sito	Latitudine	Longitudine	Trattamento	Specie	Profondità	Temperatura	Salinità
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	Non vegetato	sedimento	0.9	19	32.9
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	Non vegetato	sedimento	1.2	19	32.9
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	Non vegetato	sedimento	1	19	32.9
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	vegetato	<i>Cymodocea</i>	0.9	19	32.9
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	vegetato	<i>Cymodocea</i>	1	19	32.9
Italia	Gabicce	43.966475	12.768459	vegetato	<i>Cymodocea</i>	1	19	32.9
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	Non vegetato	sedimento	12	16	38.5
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	Non vegetato	sedimento	12	16	38.5
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	Non vegetato	sedimento	12	16	38.5
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	vegetato	<i>Cymodocea</i>	12	16	38.5
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	vegetato	<i>Cymodocea</i>	12	16	38.5
Croazia	Brjuni	44.9056	13.7639	vegetato	<i>Cymodocea</i>	12	16	38.5
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	Non vegetato	sedimento	8	23.5	38.8
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	Non vegetato	sedimento	8	23.5	38.8
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	Non vegetato	bare	8	23.5	38.8
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	vegetato	<i>Posidonia</i>	8	23.5	38.8
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	vegetato	<i>Posidonia</i>	8	23.5	38.8
Croazia	Dugi otok	44.09277778	14.92611111	vegetato	<i>Posidonia</i>	8	23.5	38.8
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	Non vegetato	sedimento	2.5	15	6

Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	Non vegetato	sedimento	2.5	15	6
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	Non vegetato	sedimento	2.5	15	6
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	vegetato	<i>Zostera</i>	2.5	15	6
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	vegetato	<i>Zostera</i>	2.5	15	6
Finlandia	Angso	60.109413	21.710139	vegetato	<i>Zostera</i>	2.5	15	6
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	Non vegetato	sedimento	2	14	6
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	Non vegetato	sedimento	2	14	6
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	Non vegetato	sedimento	2	14	6
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	vegetato	<i>Zostera</i>	2	14	6
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	vegetato	<i>Zostera</i>	2	14	6
Finlandia	Faro	59.919999	21.796085	vegetato	<i>Zostera</i>	2	14	6
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	Non vegetato	sedimento	3	15	6.9
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	Non vegetato	sedimento	3	15	6.9
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	Non vegetato	sedimento	3	15	6.9
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	vegetato	<i>Zostera</i>	3	15	6.9
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	vegetato	<i>Zostera</i>	3	15	6.9
Estonia	Soela	58.6420	22.6030	vegetato	<i>Zostera</i>	3	15	6.9
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	Non vegetato	sedimento	3	10	6.9
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	Non vegetato	sedimento	3	10	6.9
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	Non vegetato	sedimento	3	10	6.9
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	vegetato	<i>Zostera</i>	3	10	6.9
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	vegetato	<i>Zostera</i>	3	10	6.9
Estonia	Vilsandi	58.3799	21.9601	vegetato	<i>Zostera</i>	3	10	6.9
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	Non vegetato	sedimento	1.5	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	Non vegetato	sedimento	1.5	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	Non vegetato	sedimento	1.5	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	vegetato	<i>Zostera</i>	1.5	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	vegetato	<i>Zostera</i>	1.5	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Nord	59.008574	10.131248	vegetato	<i>Zostera</i>	1.5	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	Non vegetato	sedimento	1.5	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	Non vegetato	sedimento	1.5	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	Non vegetato	sedimento	1.5	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	vegetato	<i>Zostera</i>	1	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	vegetato	<i>Zostera</i>	1	14	20.9
Norvegia	Ibergh. Sud	59.007014	10.132178	vegetato	<i>Zostera</i>	1	14	20.9
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	Non vegetato	sedimento	10	16	38.9
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	Non vegetato	sedimento	10	16	38.9

Turchia	Gok	36.942067	28.157333	Non vegetato	sedimento	10	16	38.9
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	vegetato	<i>Posidonia</i>	10	16	38.9
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	vegetato	<i>Posidonia</i>	10	16	38.9
Turchia	Gok	36.942067	28.157333	vegetato	<i>Posidonia</i>	10	16	38.9
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	Non vegetato	sedimento	15	15	38.9
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	Non vegetato	sedimento	15	15	38.9
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	Non vegetato	sedimento	15	15	38.9
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	vegetato	<i>Posidonia</i>	15	15	38.9
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	vegetato	<i>Posidonia</i>	15	15	38.9
Turchia	Foga	38.744433	26.785917	vegetato	<i>Posidonia</i>	15	15	38.9

4.1.1 Materia Organica nei sedimenti marini dei diversi siti

Per ogni campione di sedimento sono stati analizzati i singoli componenti della materia organica quali proteine, carboidrati, lipidi e i loro rapporti all'interno di essa. Infine, è stato calcolato il carbonio biopolimerico.

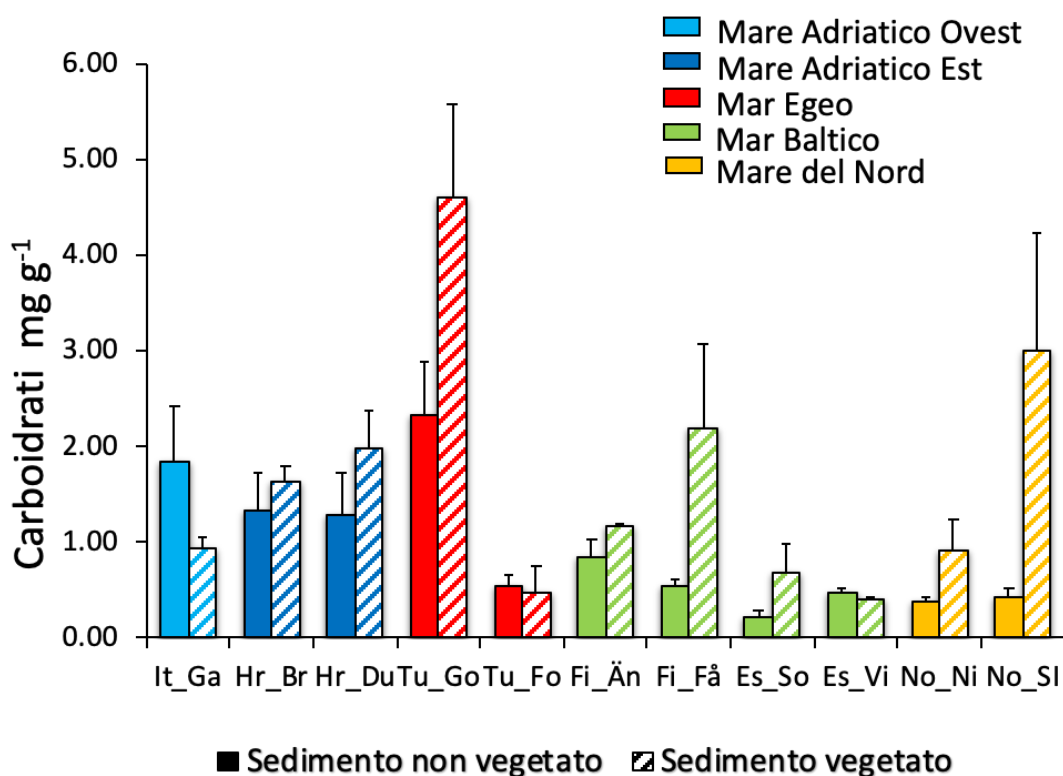


Figura 7 Confronto della concentrazione di carboidrati, espressa in mg g^{-1} , tra i sedimenti non vegetati/vegetati per singolo sito campionato: It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud). Il colore pieno rappresenta il sedimento non vegetato, il colore a linee il sedimento vegetato.

Le concentrazioni di carboidrati nei sedimenti hanno mostrato (Figura 7) valori da un minimo di 0.22 mg g^{-1} (Estonia, Vilsandi) ad un massimo di 2.32 mg g^{-1} (Turchia, Gokova), mentre per i sedimenti vegetati da un minimo di 0.39 mg g^{-1} (Estonia, Vilsandi) ad un massimo di 4.60 mg g^{-1} (Turchia, Gokova).

In generale, in ciascun sito, le concentrazioni di carboidrati nei sedimenti vegetati sono risultate simili o superiori rispetto a quelle riscontrate nei rispettivi sedimenti non vegetati.

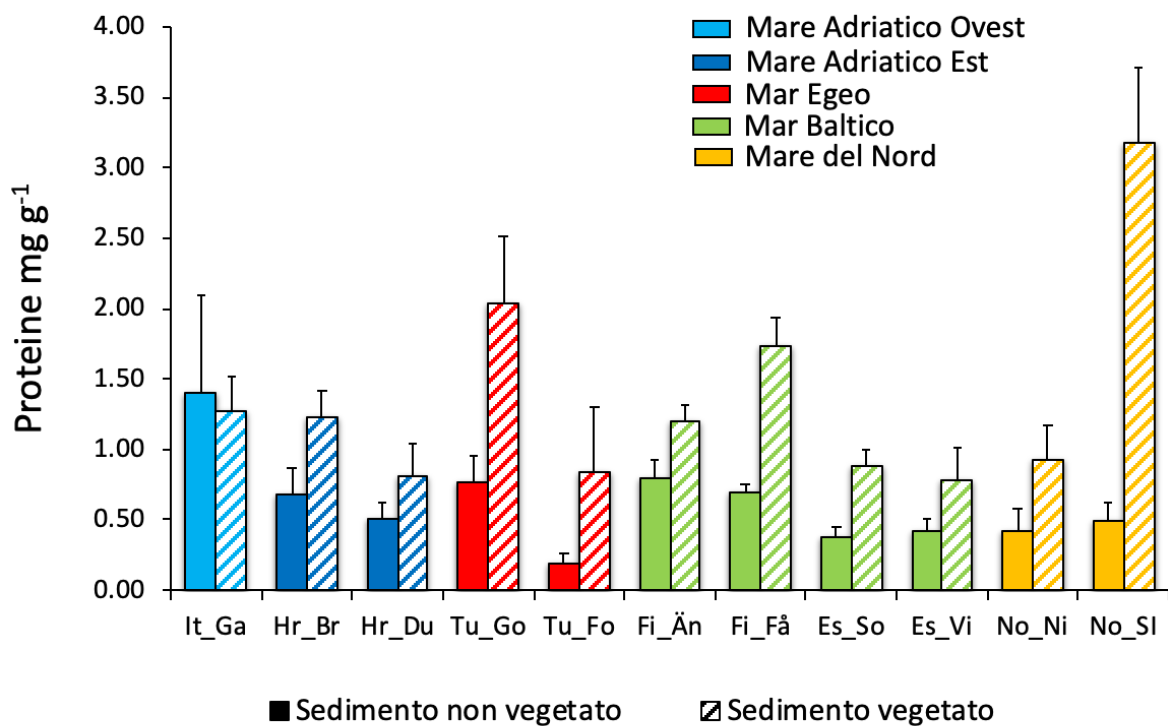


Figura 8 Confronto della concentrazione di proteine, espressa in mg g⁻¹, tra i sedimenti non vegetati/vegetati per singolo sito campionato: It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud). Il colore pieno rappresenta il sedimento non vegetato, il colore a linee il sedimento vegetato.

I valori medi di Proteine (Figura 8), per i sedimenti non vegetati, variano da un minimo di 0.20 mg g⁻¹ (Turchia, Foga) ad un massimo di 1.40 mg g⁻¹ (Italia, Gabicce); mentre per i sedimenti vegetati da un minimo di 0.79 mg g⁻¹ (Estonia, Vilsandi) ad un massimo di 3.17 mg g⁻¹ (Norvegia, Ibergh. Sud).

In generale, in ciascun sito, le concentrazioni di proteine nei sedimenti vegetati sono risultate simili o superiori rispetto a quelle riscontrate nei rispettivi sedimenti non vegetati.

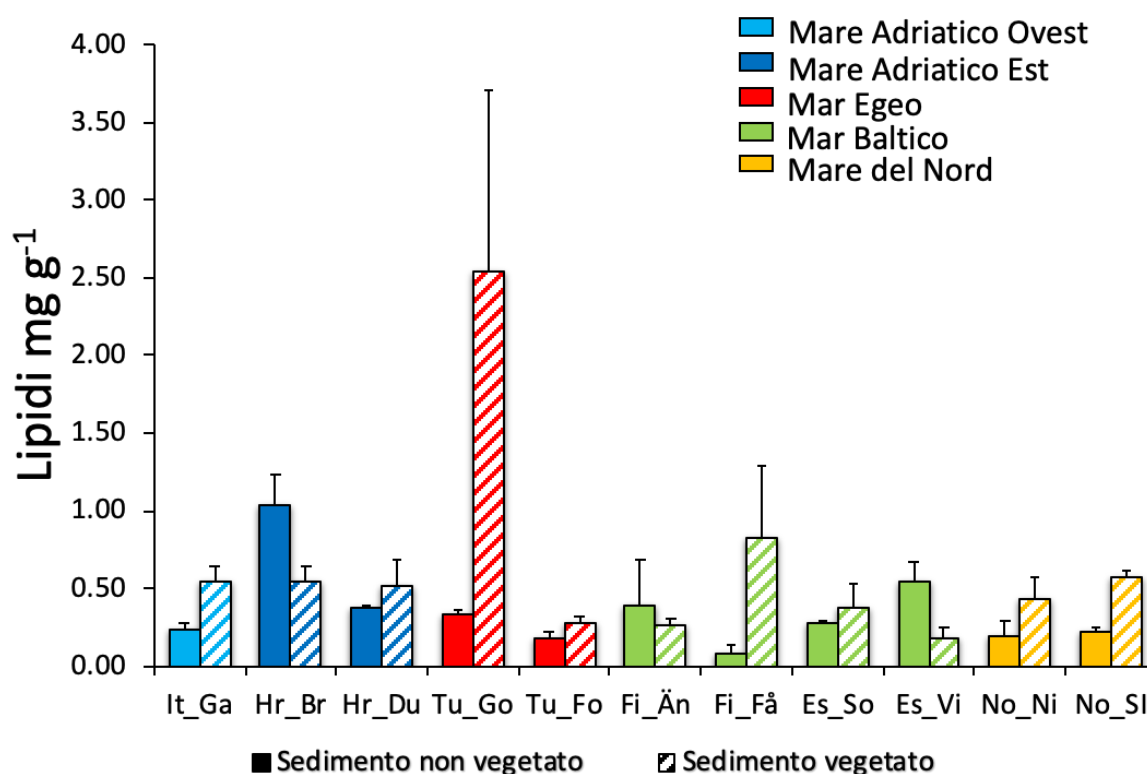


Figura 9 Confronto della concentrazione di lipidi, espressa in mg g^{-1} , tra i sedimenti non vegetati/vegetati per singolo sito campionato: It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud). Il colore pieno rappresenta il sedimento non vegetato, il colore a linee il sedimento vegetato.

Le concentrazioni medie lipidiche (Figura 9), per i sedimenti non vegetati, presentano un minimo di 0.09 mg g^{-1} (Finlandia, Fåro) ed un massimo di 1.04 mg g^{-1} (Croazia, Brjuni); mentre per i sedimenti vegetati un minimo di 0.18 mg g^{-1} (Estonia, Vilsandi) ed un massimo di 2.55 mg g^{-1} (Turchia, Gokova). Il

contenuto di lipidi, espresso in mg g^{-1} , è risultato più variabile rispetto al contenuto di proteine e carboidrati. Tuttavia, nella maggior parte dei siti, le concentrazioni di lipidi nei sedimenti vegetati sono risultate simili o superiori rispetto a quelle riscontrate nei rispettivi sedimenti non vegetati. Solamente il sito croato di Brjuni ed il sito estone di Vilsandi sembrano presentare, in controtendenza, un contenuto lipidico leggermente maggiore nei sedimenti non vegetati rispetto a quelli vegetati.

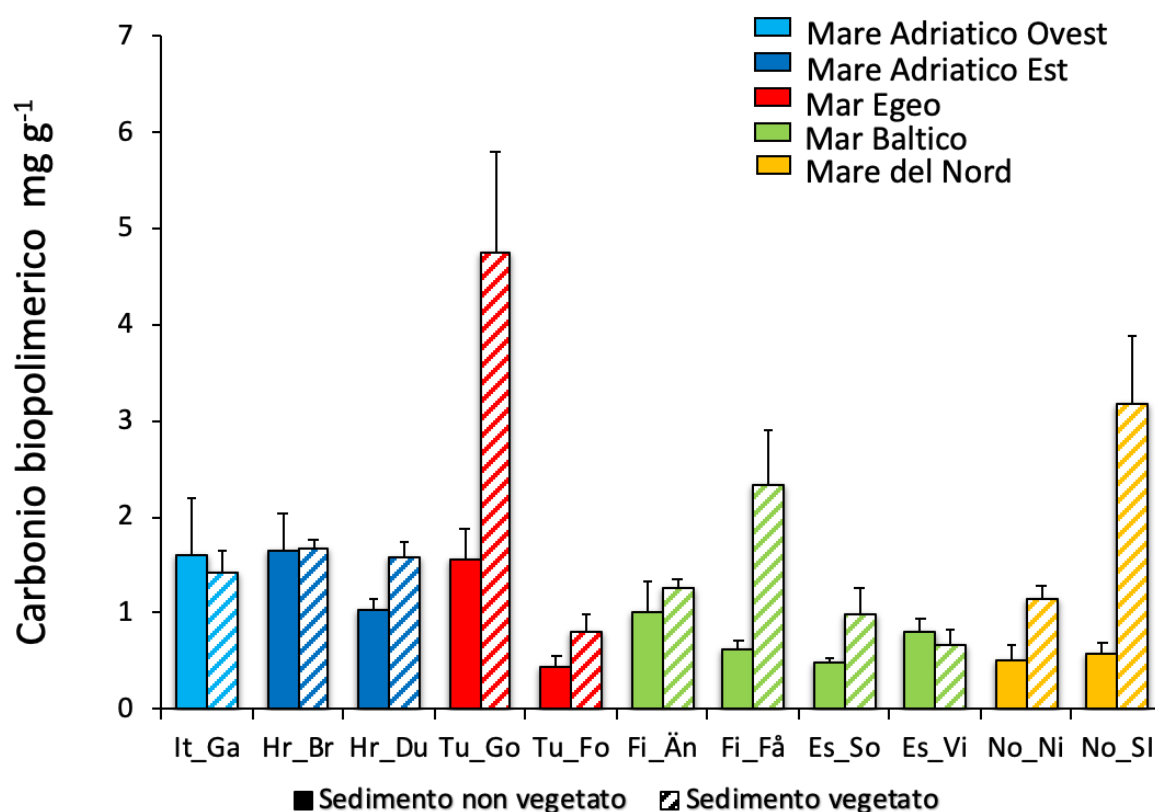


Figura 10 Confronto della concentrazione di carbonio biopolimerico, espressa in mg g^{-1} , tra i sedimenti non vegetati/vegetati per singolo sito campionato: It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud). Il colore pieno rappresenta il sedimento non vegetato, il colore a linee il sedimento vegetato.

I valori medi di carbonio biopolimerico (Figura10), per i sedimenti non vegetati, vanno da un minimo di 0.44 mg g^{-1} (Turchia, Foga) ad un massimo di 1.64 mg g^{-1} (Croazia, Brjuni), mentre per i sedimenti vegetati da un minimo di

0.67 mg g⁻¹ (Estonia, Vilsandi) ad un massimo di 4.75 mg g⁻¹ (Turchia, Gokova).

In generale, in ciascun sito, le concentrazioni di carbonia biopolimerico nei sedimenti vegetati sono risultate simili o superiori rispetto a quelle riscontrate nei rispettivi sedimenti non vegetati.

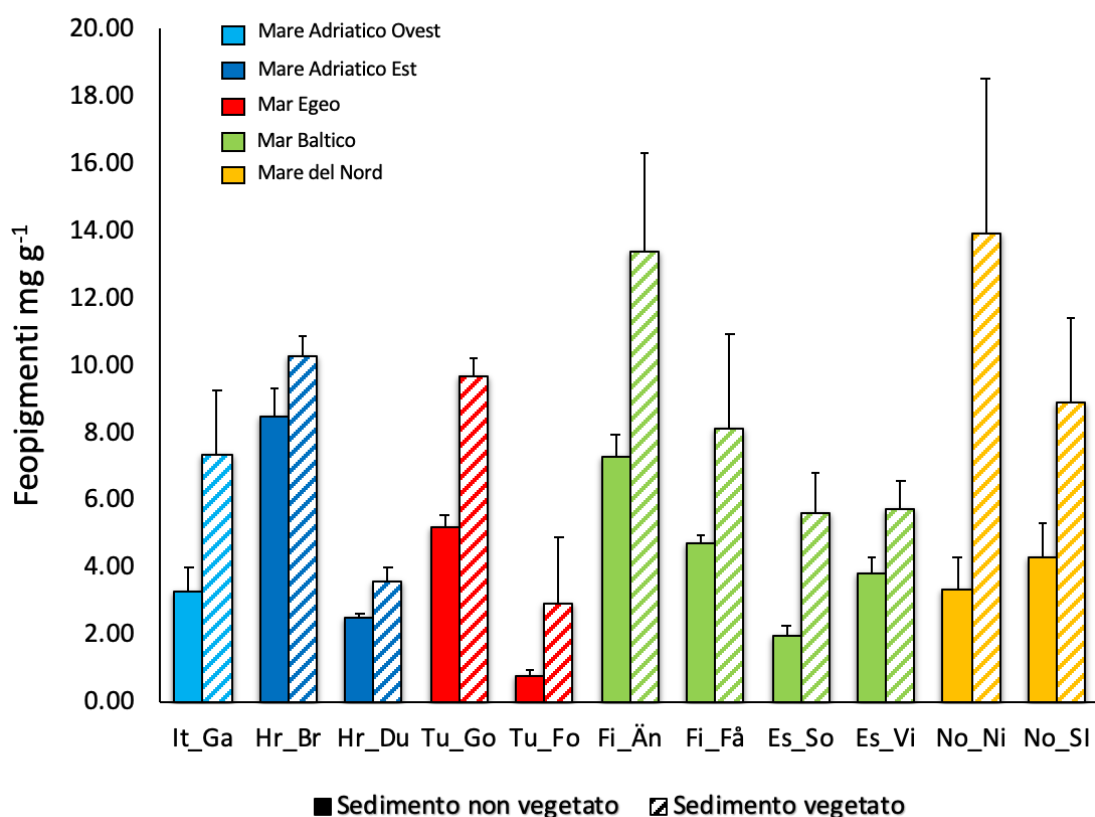


Figura 11 Confronto della concentrazione di pigmenti, espressa in mg g⁻¹, tra i sedimenti non vegetati/vegetati per singolo sito campionato: It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud). Il colore pieno rappresenta il sedimento non vegetato, il colore a linee il sedimento vegetato.

La concentrazione di pigmenti (Figura 11) nel sedimento non vegetato va da minime di 0.78 mg g⁻¹ (Turchia, Foga) a massime di 8.47 mg g⁻¹ (Croazia, Brjuni); mentre nel sedimento vegetato va da minime di 2.91 mg g⁻¹ (Turchia, Foga) a massime di 13.92 mg g⁻¹ (Norvegia, Ibergh, Nord).

In generale, in ciascun sito, le concentrazioni di feopigmenti nei sedimenti vegetati sono risultate simili o superiori rispetto a quelle riscontrate nei rispettivi sedimenti non vegetati.

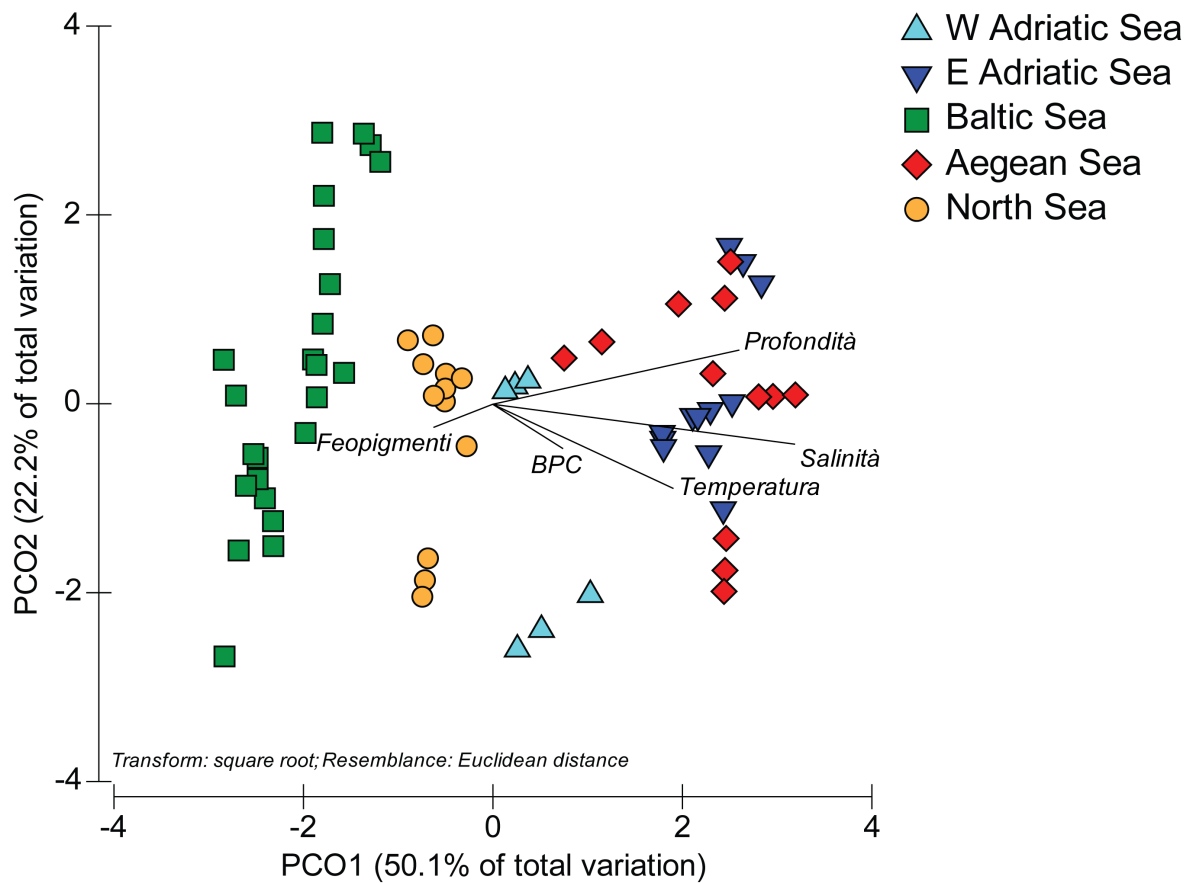


Figura 12 Analisi delle coordinate principali per illustrare il clustering dei diversi campioni sulla base delle variabili abiotiche e trofiche (profondità, salinità, temperatura, quantità e qualità della materia organica)

L'analisi PCO (Figura 12) mostra un chiaro raggruppamento dei diversi campioni di sedimento sulla base delle variabili abiotiche e trofiche. In particolare, le variabili che contribuiscono maggiormente a differenziare i campioni appaiono essere la salinità, temperatura e profondità piuttosto che le variabili relativi alla quantità e qualità di materia organica nei sedimenti.

4.1.2 Abbondanze procariotiche nei sedimenti marini dei diversi siti

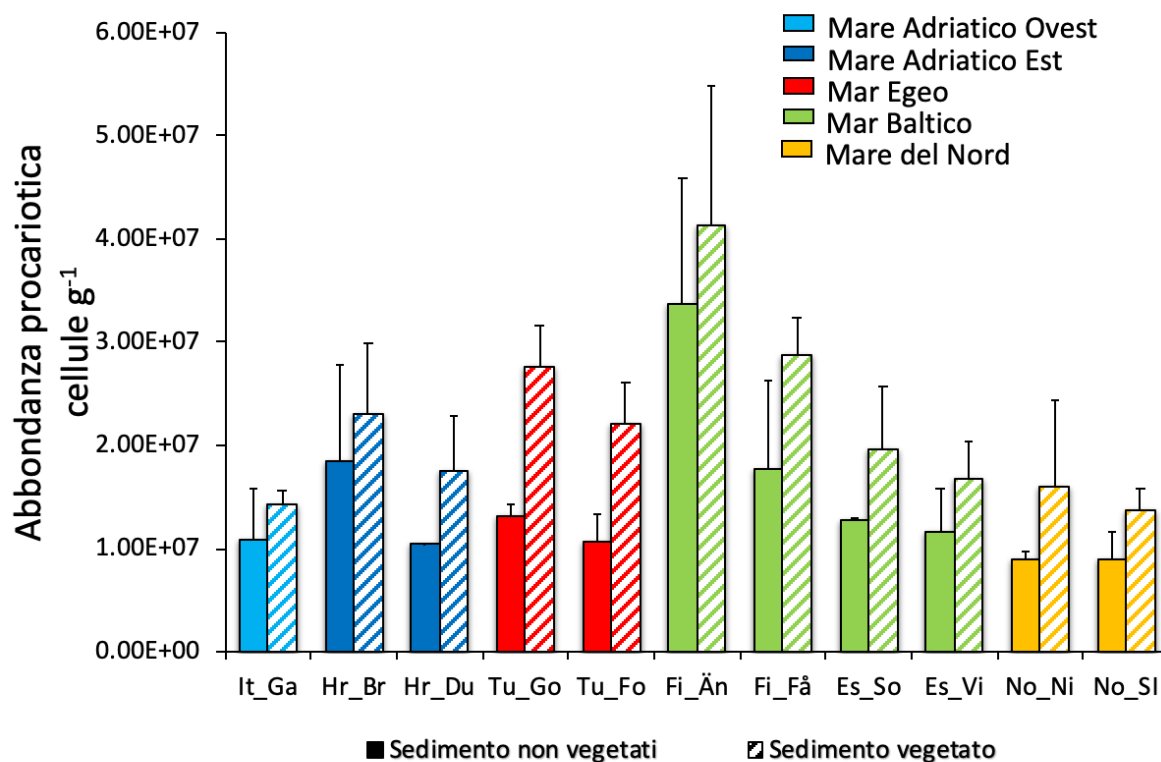


Figura 13 Confronto delle abbondanze procariotiche tra i campioni di sedimento non vegetato/vegetato, espresse in numero di cellule g⁻¹, per ogni sito campionato: It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud). Il colore pieno rappresenta il sedimento non vegetato, il colore a linee il sedimento vegetato.

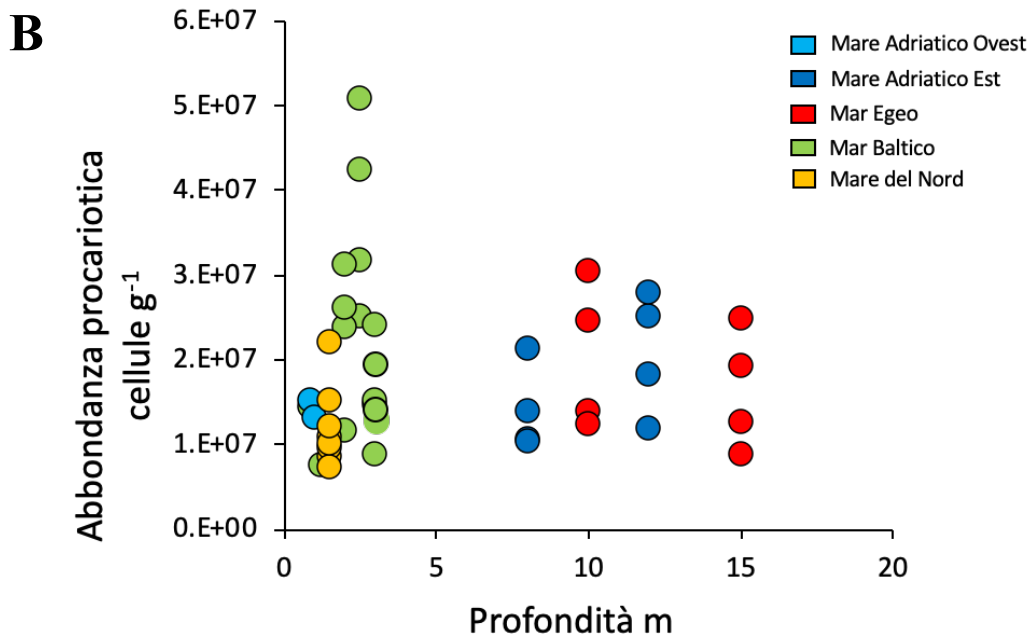
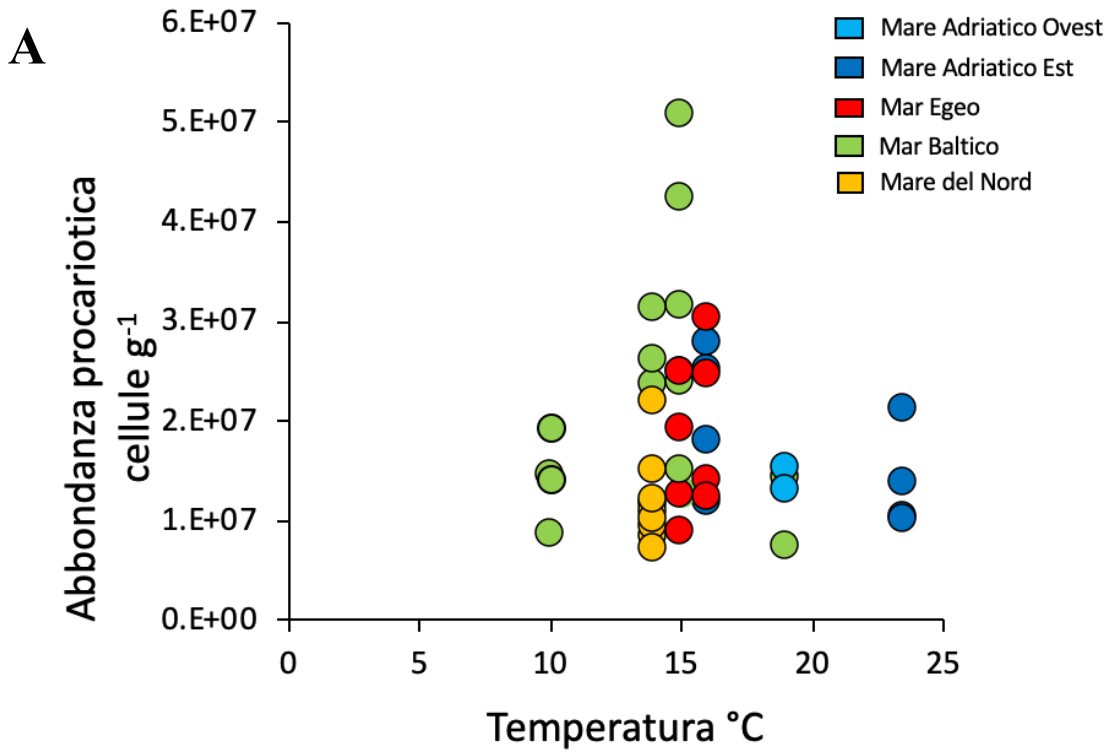
Come mostrato nella figura 13, i trattamenti non vegetati presentano valori medi minimi di 8.98E+06 cellule g⁻¹ (Norvegia Ibergh. Nord) e massimi di 3.37E+07 cellule g⁻¹ (Finlandia, Ängso), mentre in quelli vegetati si va da un

minimo di $1.36E+07$ cellule g^{-1} (Norvegia Ibergh. Sud) a un massimo di $4.13E+07$ cellule g^{-1} (Finlandia, Ängso).

I valori delle abbondanze procariotiche dei siti della Finlandia risultano i più alti, sia per le abbondanze non vegetate e sia per quelle vegetate.

In generale, in ciascun sito, le abbondanze procariotiche nei sedimenti vegetati sono risultate simili o superiori rispetto a quelle riscontrate nei rispettivi sedimenti non vegetati.

I dati ottenuti dalle abbondanze procariotiche sono stati poi confrontati con i parametri ambientali specifici di ogni sito, per capire se possano esserci delle correlazioni tra il numero di cellule e la salinità, temperatura e profondità dei campioni (Figura 14).



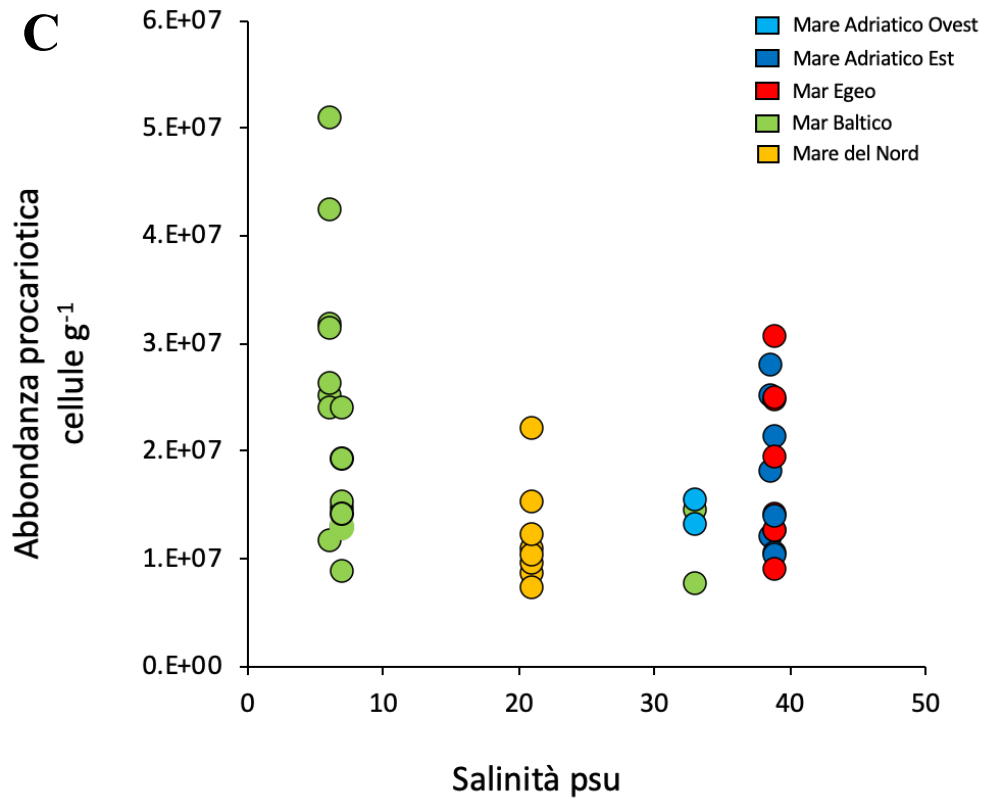
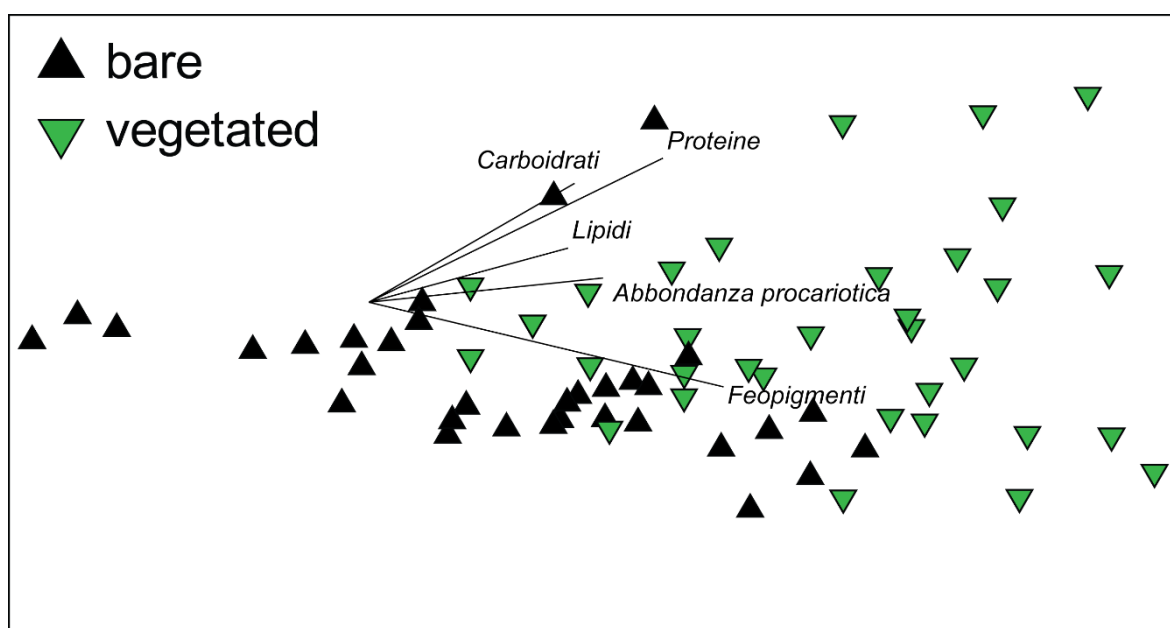


Figura 14 Correlazione dell'abbondanza procariotica dei diversi campioni divisi in mare di appartenenza (Mare Adriatico Ovest - azzurro; Mare adriatico Est - blu; Mar Egeo - rosso; Mar Baltico - verde; Mare del nord - giallo) con i parametri ambientali misurati: **A.** Temperatura (°C) **B.** Profondità (m) **C.** Salinità (psu).

Inoltre, la PERMANOVA ha messo in risalto come l'abbondanza procariotica varia in maniera significativa sia in base al mare sia in base al sito, e sia tra i campioni di sedimento non vegetato e vegetato ($p < 0.05$).



Transform: square root; Resemblance: D1 Euclidean distance; 2D Stress 0.02

Figura 15 Rappresentazione grafica delle differenze dello stato trofico e dell'abbondanza procariotica tra i campioni di sedimento non vegetato (in nero) e vegetato (in verde).

L'analisi MDS (Figura 15) mostra che i sedimenti vegetati mostrano valori più elevati di quantità e qualità di materia organica e feopigmenti, nonché di abbondanze procariotiche, risultando pertanto differenti dai sedimenti non vegetati (PERMANOVA $p < 0.05$).

4.2 Diversità di batteri, archaea e microeucarioti tramite sequenziamento dei geni 16s e 18s ribosomiali nei sedimenti marini e diverse parti delle fanerogame marine analizzate

4.2.1 Analisi a livello di Classe o Divisione della composizione tassonomica

delle comunità di procarioti e microeucarioti

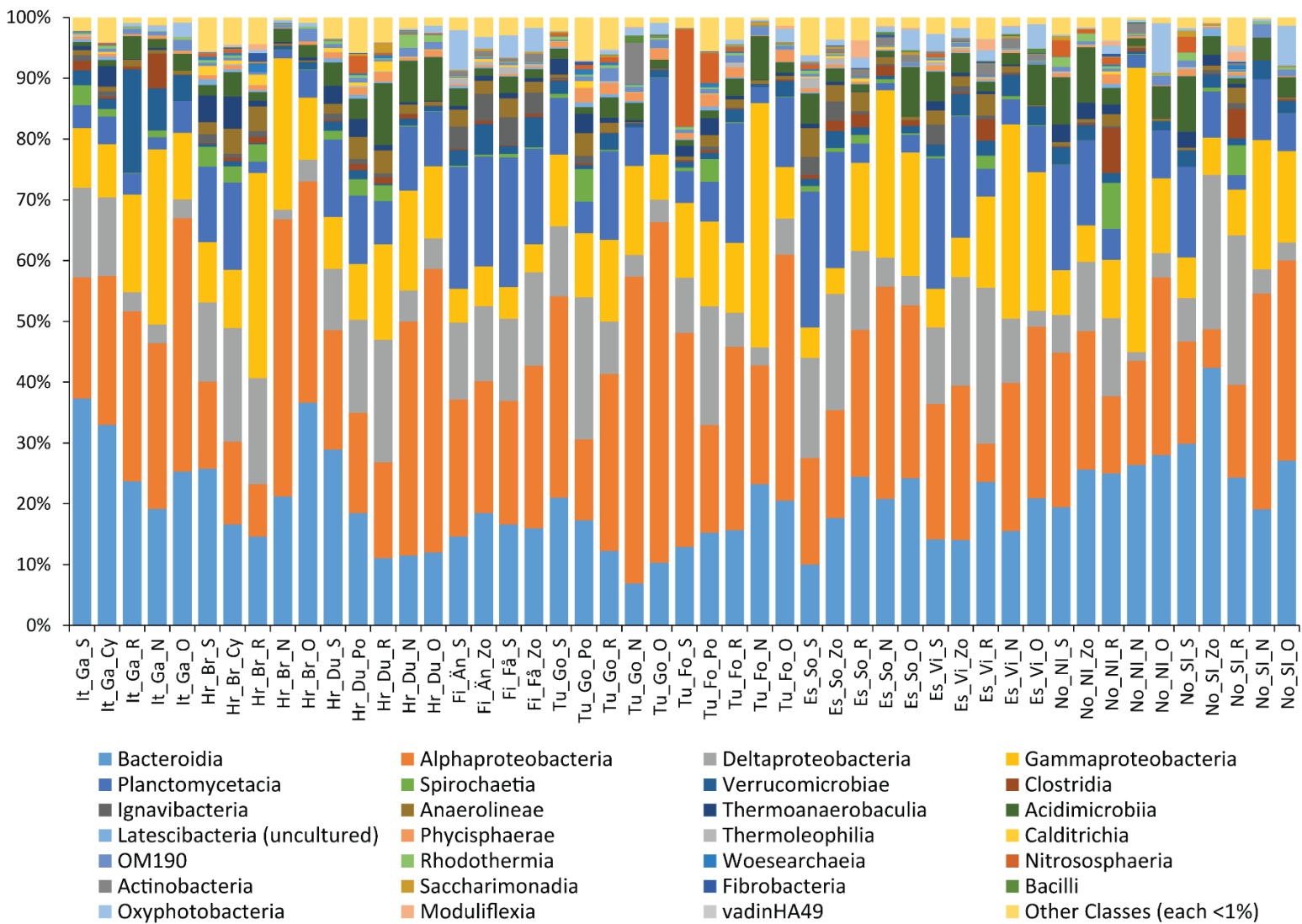


Figura 16 Composizione in % delle varie classi procariotiche presenti all'interno dei campioni di sedimento non vegetato/vegetato, radici, foglie nuove/vecchie, di ogni sito preso in esame: It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud). _S (sedimento non vegetato); _Cy/Po/Zo (sedimento vegetato rispettivamente di *Cymodocea/Posidonia/Zostera*); _R (radici); _N (foglie nuove); _O (foglie vecchie)

Come mostrate in Figura 16, le classi procariotiche più rappresentate nei campioni analizzati erano principalmente cinque: Bacteroidia, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria ed i Planctomycetacia.

I Bacteroidia rappresentano mediamente circa il 20% delle classi procariotiche totali, con minime del 6,5% (foglie nuove Turchia, Gokova) e massime del 42% (sedimento vegetato Zostera Norvegia, Ibergh. Sud);

Gli Alphaproteobacteria sono presenti con una media del 25% sul totale, con percentuale minima del 6% (radici Estonia, Vilsandi) e massima del 56% (foglie vecchie Turchia, Gokova);

I Deltaproteobacteria sono mediamente il 10% del totale, con minime del 1,5% (foglie nuove Norvegia, Ibergh. Nord) e massime del 25,5% (sedimento vegetato Zostera Norvegia Ibergh. Sud);

I Gammaproteobacteria rappresentano mediamente il 15% delle classi totali, con minime del 4% (sedimento vegetato Zostera Estonia, Solea) e massime del 47% (foglie nuove Norvegia, Ibergh. Nord);

I Planctomycetacia hanno una media del 9.5% sul totale, con percentuali minime del 2% (foglie nuove Italia, Gabicce) e massime del 22% (sedimento non vegetato Estonia, Solea).

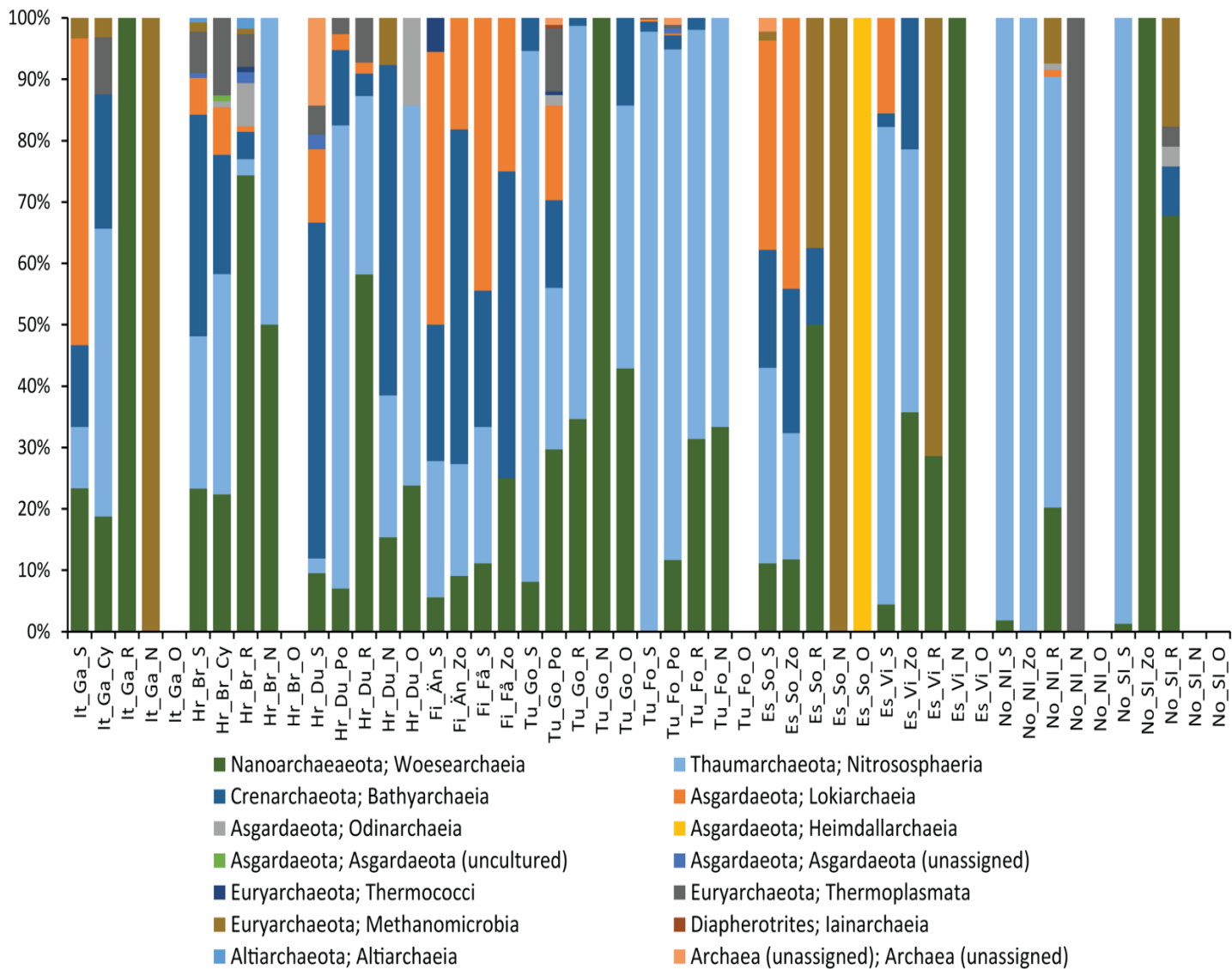
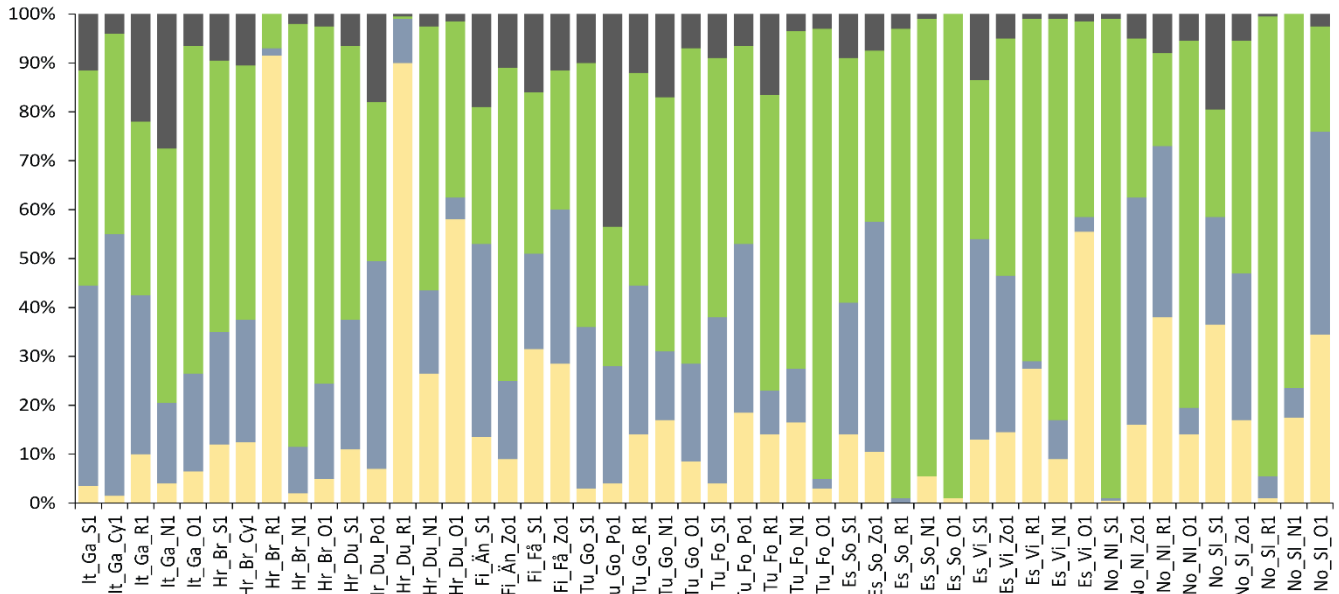


Figura 17 Composizione in % delle varie classi di Archaea presenti all'interno dei campioni di sedimento non vegetato/vegetato, radici, foglie nuove/vecchie, di ogni sito preso in esame: : It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud). _S (sedimento non vegetato); _Cy/Po/Zo (sedimento vegetato rispettivamente di *Cymodocea/Posidonia/Zostera*); _R (radici); _N (foglie nuove); _O (foglie vecchie)

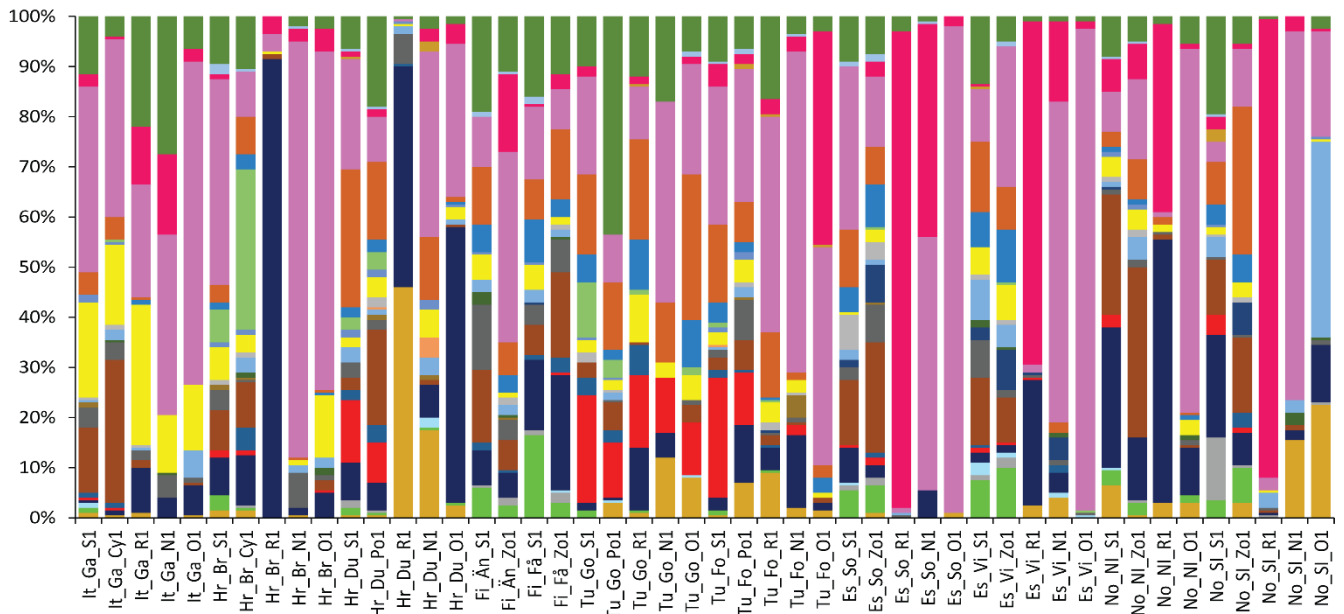
Come raffigurato in Figura 17 gli Archaea sono generalmente poco presenti o addirittura mancanti in certi campioni, e sono costituiti quasi interamente dai Thaumarchaeota, Nanoarchaeota, Crenarchaeota e Asgardaeota.

I sedimenti non vegetati della Norvegia (Ibergh. Nord) presentano i valori massimi di Thaumarchaeota, mentre le foglie nuove della Turchia (Gokova) e dell'Estonia (Vilsandi) presentano le massime abbondanze di Nanoarchaeota.

I Crenarchaeota sono meno abbondanti ma comunque ben rappresentati, e trovano la massima abbondanza all'interno dei campioni di sedimento non vegetato della Croazia (Dugi Otok); valori simili anche per gli Asgardaeota, ben rappresentati tra le foglie vecchie dell'Estonia (Solea).



■ Fungi/Pseudofungi
 ■ Protista
 ■ Microalgae
 ■ 18S Microeukaryota (Unassigned)



Fungi/Pseudofungi

- Ascomycota
- Chytridiomycota
- Fungi (unassigned)
- Other Fungi Classes (each <1%)
- Pseudofungi

Protista

- Alveolata (unassigned)
- Apicomplexa
- Cercozoa
- Ciliophora
- Lobosa
- Mesomycetozoa
- Opalozoa
- Opisthokonta (unassigned)
- Perkinsea
- Rhizaria (unassigned)
- Sagenista
- Other Protista Divisions (each <1%)

Microalgae

- Chlorophyta
- Dinoflagellata
- Archaeplastida (unassigned)
- Rhodophyta
- Stramenopiles (unassigned)
- Ochrophyta
- Other Microalgae Divisions (each <1%)
- 18S microeukaryota (Unassigned)

Figura 18 Composizione in % di funghi, protisti, microalghe, presenti all'interno dei campioni di sedimento non vegetato/vegetato, radici, foglie nuove/ vecchie, di ogni sito preso in esame: : It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud). _S (sedimento non vegetato); _Cy/Po/Zo (sedimento vegetato rispettivamente di *Cymodocea/Posidonia/Zostera*); _R (radici); _N (foglie nuove); _O (foglie vecchie)

Per quanto riguarda le comunità di microeucarioti (Figura 18) le più rappresentate sono le microalghe, che arrivano ad essere fino al 90% sul totale, non scendendo mai sotto al 20% a parte per due campioni di radici provenienti dalla Croazia (Brjuni e Dugi Otok).

In generale Ochrophyta è presente mediamente per il 30% all'interno dei campioni con minime del 10% circa (sedimento non vegetato Finlandia, Ängso) e massime del 98% (foglie vecchie Estonia, Vilsandi).

Stramenopili e Dinoflagellate sono rappresentate per circa il 10%: le prime hanno valori minimi del 2% (sedimento non vegetato Estonia, Vilsandi) e massimi del 95% (radici Estonia, Solea); le seconde non sono presenti in tutti i campioni, ma raggiungono anche valori massimi del 25% (sedimento vegetato Norvegia, Ibergh. Sud).

Anche i funghi e i protisti sono mediamente ben rappresentati, i primi con i Pseudofunghi, presenti mediamente circa al 10% mentre i secondi con i Cercozoa con medie sempre del 10% circa.

4.2.2 Analisi della diversità dei procarioti e microeucarioti a livello di amplicon sequence variants (ASVs)

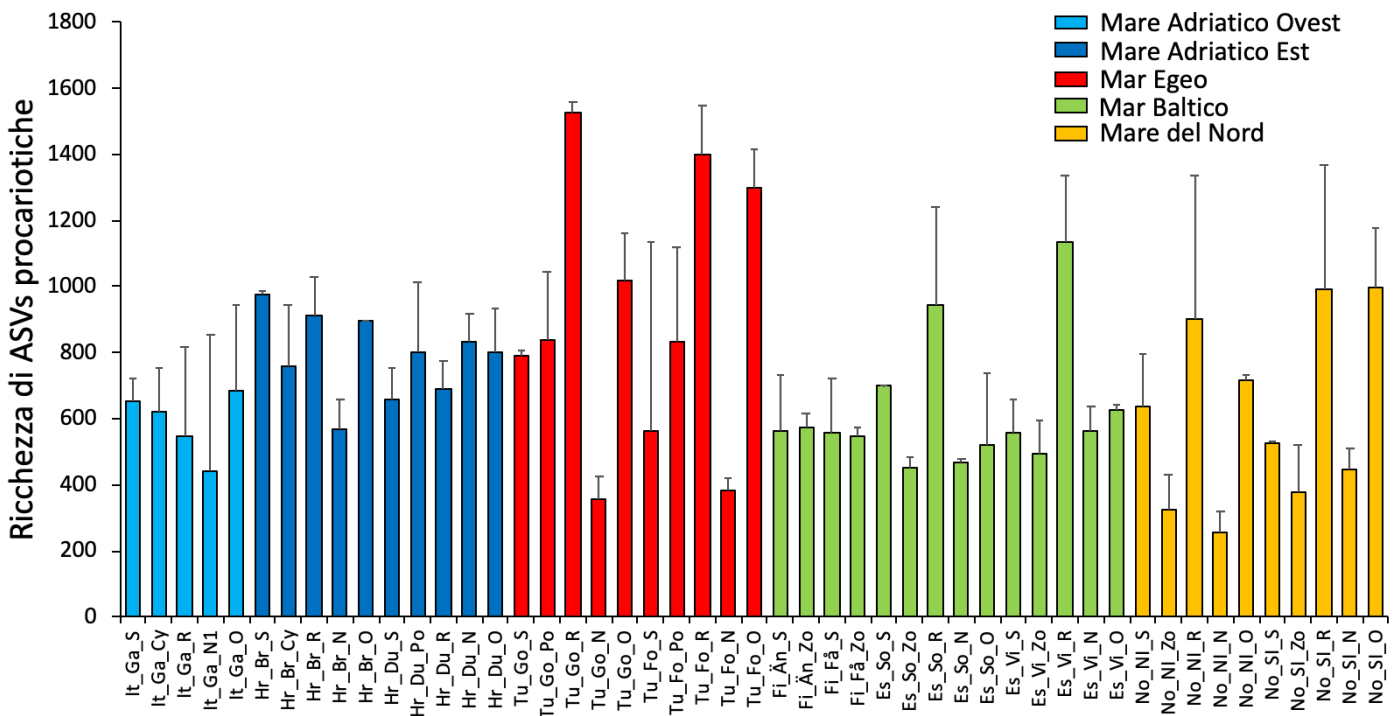


Figura 19 Specie totali procariotiche (16S ASV richness), presenti nei campioni di ogni sito analizzato. It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud).

Le analisi della ricchezza di taxa di procarioti condotte a livello di ASV (Amplicon sequence variant, Figura 19) ha riportato valori che partono da un numero minimo di 255 ASV (foglie nuove Norvegia, Ibergh. Nord), a un numero massimo di 1548 ASV (radici Turchia, Gokova).

Il test statistico della PERMANOVA, ha mostrato che i valori di alfa-diversità erano significativamente diversi soltanto nel confronto tra i diversi mari soggetti di studio ($p < 0.05$), mentre non mostravano differenze significative tra i diversi siti di ciascun mare né fra diverse tipologie di sedimento (vegetato o non vegetato) o di pianta (foglie o radici).

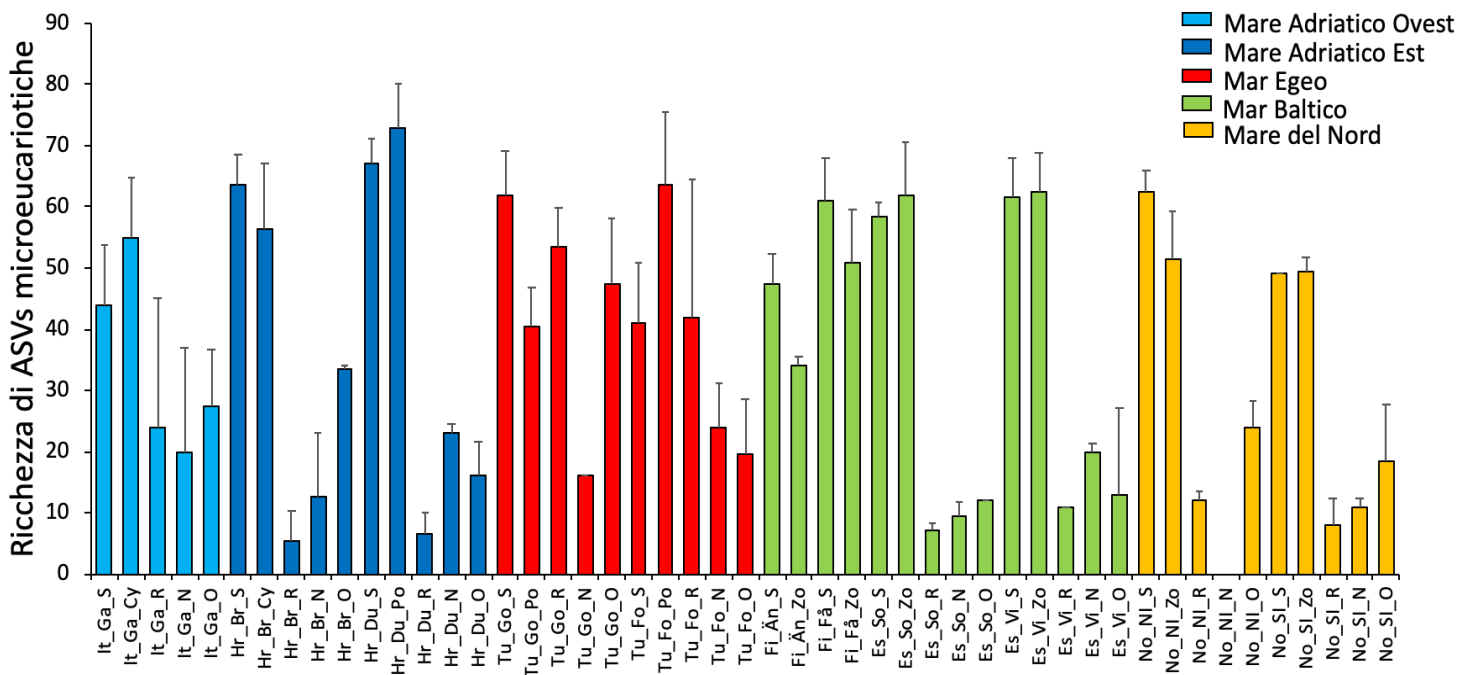


Figura 20 Specie totali eucariotiche (18S ASV richness), presenti nei campioni di ogni sito analizzato. It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud).

Come si può notare dalla Figura 20, le analisi della ricchezza di taxa di microeucarioti effettuate a livello di ASV ha riportato valori che partono da un numero minimo di di 0 ASV (foglie nuove Norvegia, Ibergh. Nord) e un numero massimo di 73 ASV (sedimento vegetato Croazia, Dugi Otok). La ricchezza di taxa di microeucarioti si presenta molto minore rispetto a quella procariotica.

4.2.3 Indici di diversità delle comunità procariotiche e di microeucarioti

L'indice di equitabilità di Pielou J (evenness) esprime il grado di omogeneità con il quale gli individui sono distribuiti nelle varie specie che compongono una comunità. Restituisce un numero compreso tra 0 ed 1: l'equitabilità tende a 1 quanto più gli organismi sono distribuiti uniformemente tra le specie; tende a 0 quanto più alcune specie dominano numericamente sulle altre.

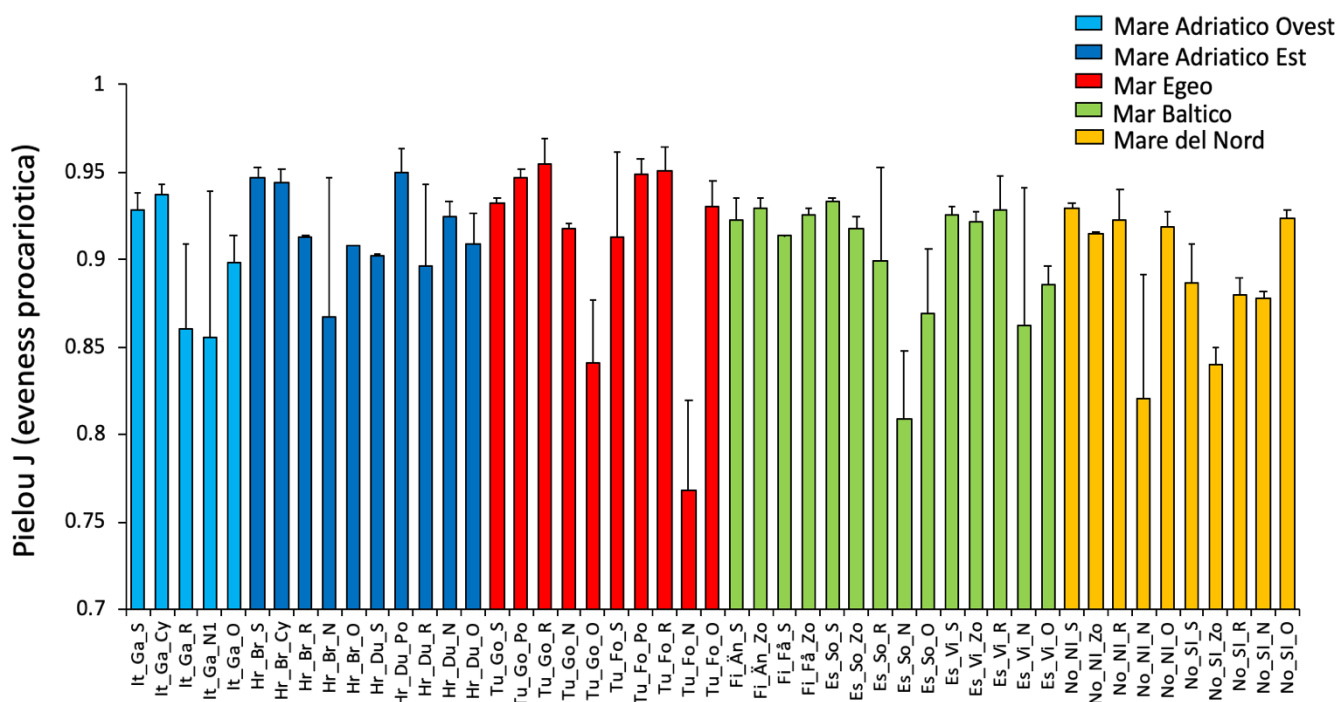


Figura 21 Indice di equitabilità di Pielou J (evenness procariotica) calcolato per i campioni di ogni sito analizzato. It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud).

Per quanto riguarda la evenness procariotica (Figura 21), le foglie nuove della Turchia (Foga) toccano i valori minimi di equitabilità con un valore di 0,7677 J, mentre le radici della Turchia (Gokova) presentano il valore massimo di 0.9545 J. Mediamente le foglie nuove presentano indici più bassi rispetto agli altri tipi di campioni, mentre i sedimenti (vegetati e non) i più alti. In generale la evenness procariotica rimane comunque abbastanza costante tra le varie

tipologie di campioni, a parte per le foglie nuove dove si toccano anche i valori minimi (0.7677 J Turchia, Foga).

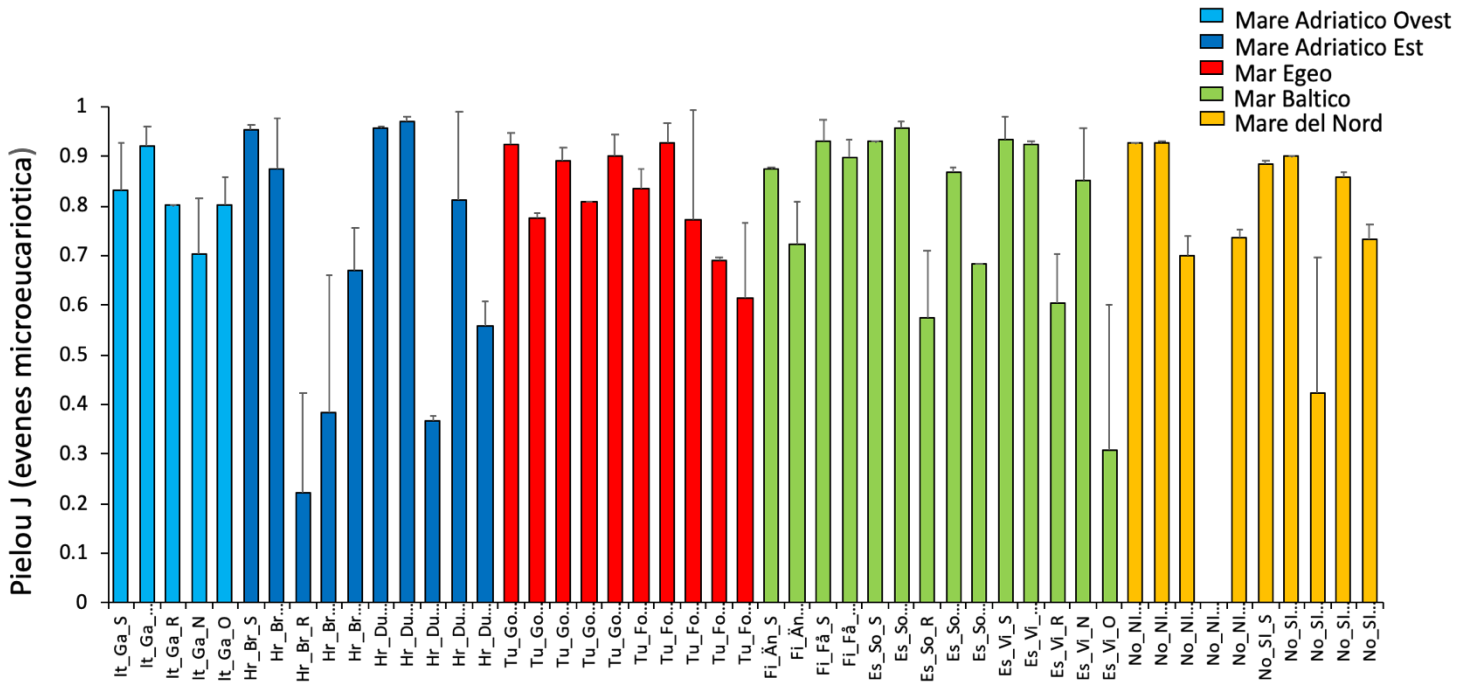


Figura 22 Indice di equità di Pielou J (evenness eucariotica) calcolato per i campioni di ogni sito analizzato. It_Ga (Italia, Gabicce); Hr_Br (Croazia, Brjuni); Hr_Du (Croazia, Dugi Otok); Fi_Än (Finlandia, Ängso); Fi_Få (Finlandia, Fåro); Tu_Go (Turchia, Gokova); Tu_Fo (Turchia, Foga); Es_So (Estonia, Solea); Es_Vi (Estonia, Vilsandi); No_Ni (Norvegia, Ibergh. Nord); No_Si (Norvegia, Ibergh. Sud).

Come mostrata in Figura 22, la evenness eucariotica varia da un valore minimo di 0.2226 J (radici Croazia, Brjuni) a un valore massimo di 0.9688 J (sedimento vegetato Croazia, Dugi Otok), risultando generalmente minore e più eterogenea tra i campioni, rispetto a quella procariotica.

Anche in questo caso sedimento non vegetato e vegetato presentano indici più alti rispetto al resto della pianta, con le radici e le foglie nuove che restituiscono i valori minimi (0.2226 J, radici Croazia, Brjuni).

4.2.4 Composizione tassonomica delle comunità di procarioti e microeucarioti a livello di amplicon sequence variants (ASVs)

Lo scaling multidimensionale (MDS, *MultiDimensional Scaling*) è una tecnica di analisi usata per mostrare graficamente le somiglianze/differenze dei singoli casi all'interno di un set di dati.

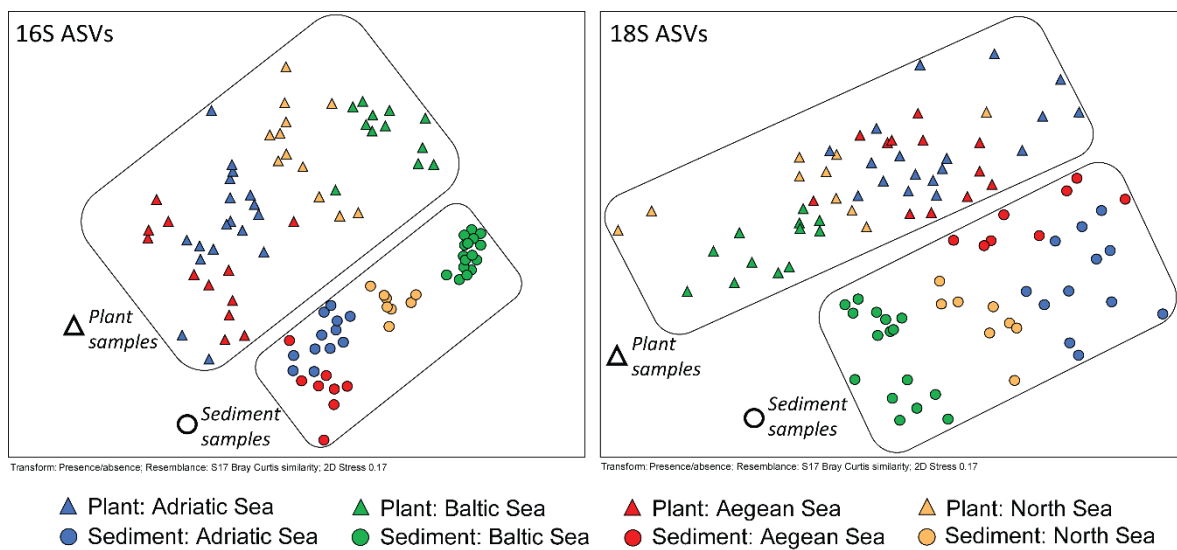


Figura 23 Analisi MDS della distribuzione dei diversi campioni analizzati nel presente studio, sulla base della composizione delle comunità procariotiche (16S ASVs) e microeucariotiche (18S ASVs)

I campioni di sedimenti e di pianta si distinguono dal punto di vista della composizione tassonomica (procariotica e microeucariotica) distinguendosi anche per mare di appartenenza (Figura 23). La PERMANOVA indica che in

tutti i mari, sia le comunità di procarioti che di microeucarioti dei sedimenti sono significativamente diverse rispetto a quelle dei microbiomi delle rispettive piante ($p < 0.05$).

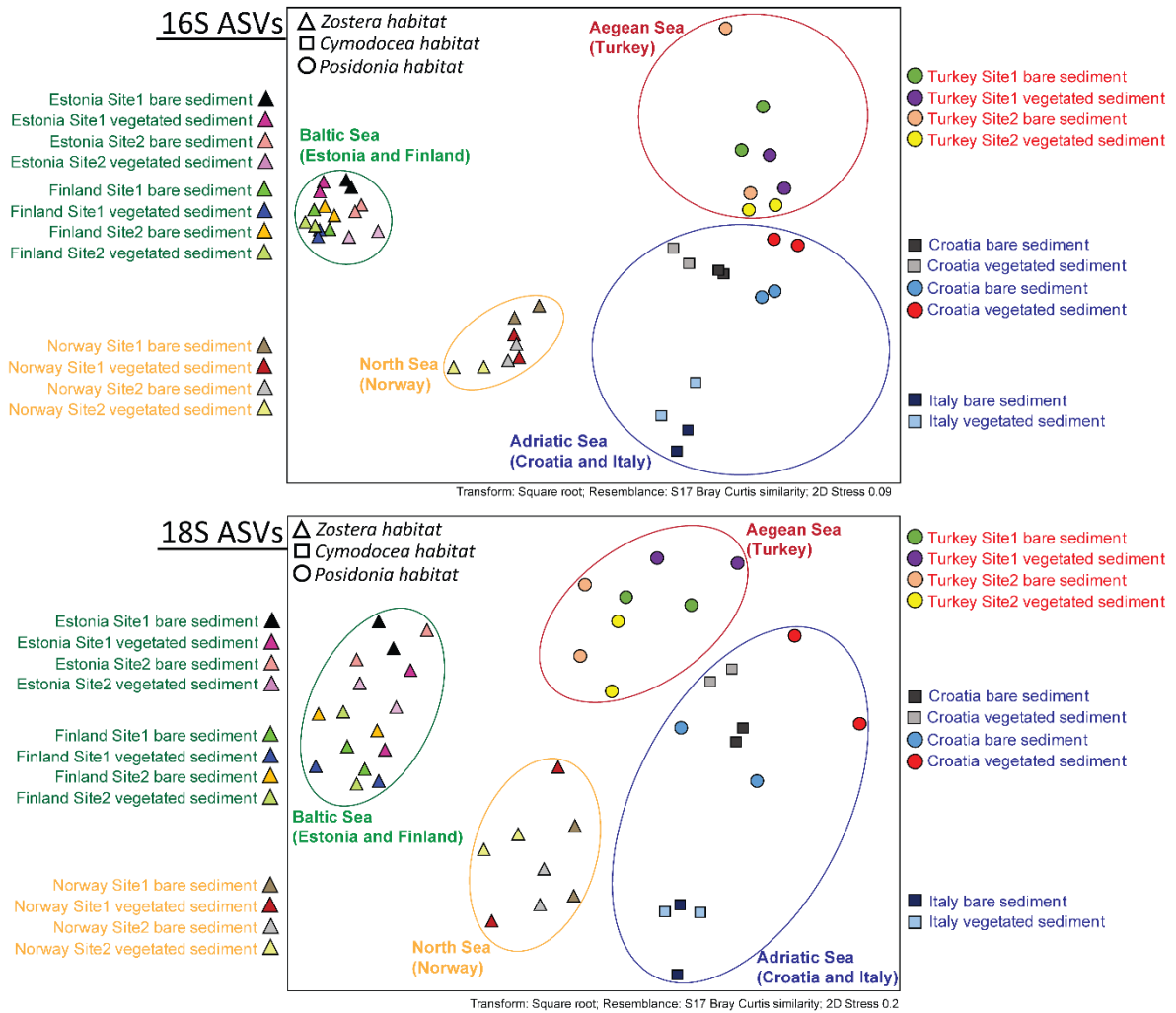


Figura 24 MDS sulle differenze, a livello di ASV (procariotiche nel pannello superiore, eucariotiche in quello inferiore), tra i campioni di sedimento non vegetato e sedimento vegetato, suddivisi per sito e raggruppati nei diversi mari. I siti sono stati raggruppati per mare di appartenenza: Estonia e Finlandia - Mar Baltico; Turchia - Mar Egeo; Croazia ed Italia - Mar Adriatico; Norvegia - Mare del Nord. All'interno di ogni gruppo i siti sono così divisi: Italia, Gabicce; Croazia 1, Brjuni; Croazia 2, Dugi Otok; Finlandia 1, Ängsö; Finlandia 2, Fårö; Turchia 1, Gokova; Turchia 2, Foga; Estonia 1, Solea; Estonia 2, Vilsandi; Norvegia 1, Ibergh. Nord; Norvegia 2, Ibergh. Sud.

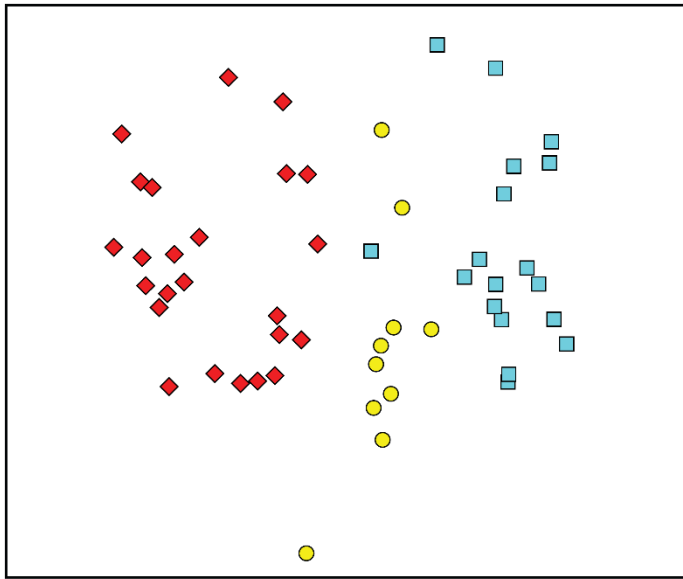
I campioni di sedimento non vegetato si dividono da quello vegetato, con un ulteriore frazionamento nei mari, e nei diversi siti di campionamento, sia a livello procariotico e sia a livello eucariotico (Figura 24).

La PERMANOVA ($p < 0.05$) fatta considerando tutti i fattori mette in evidenza che, sia la composizione delle comunità di procarioti che di microeucarioti dei sedimenti mostra differenze significative, sia tra diversi mari, che tra diversi siti (cioè tra diverse aree dello stesso mare), nonché tra diverse tipologie di sedimento (cioè confrontando in ciascun sito sedimenti vegetati rispetto ai non vegetati).

Inoltre, la PERMANOVA ($p < 0.05$) indica un'interazione significativa tra i fattori "sito" e "tipo", confermando che ci sono differenze significative nella composizione della comunità, di procarioti e microeucarioti, nei sedimenti prelevati in diversi siti, e che, nello stesso sito, ci sono differenze significative anche tra diversi tipi di sedimento (cioè vegetato o non vegetato).

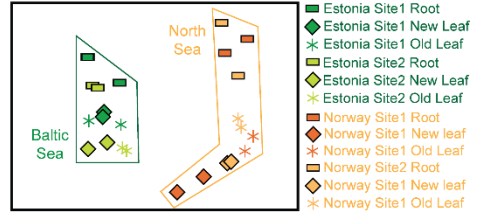
16S ASVs

◆ *Zostera* ● *Cymodocea* ■ *Posidonia*



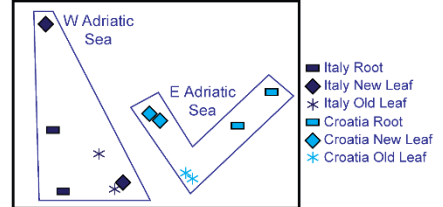
Transform: Square root; Resemblance: BCsim; 2D Stress 0.2

Zostera



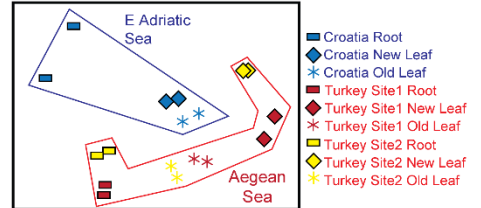
Transform: Square root; Resemblance: BCsim; 2D Stress: 0.08

Cymodocea



Transform: Square root; Resemblance: SBCsim; 2D Stress: 0.09

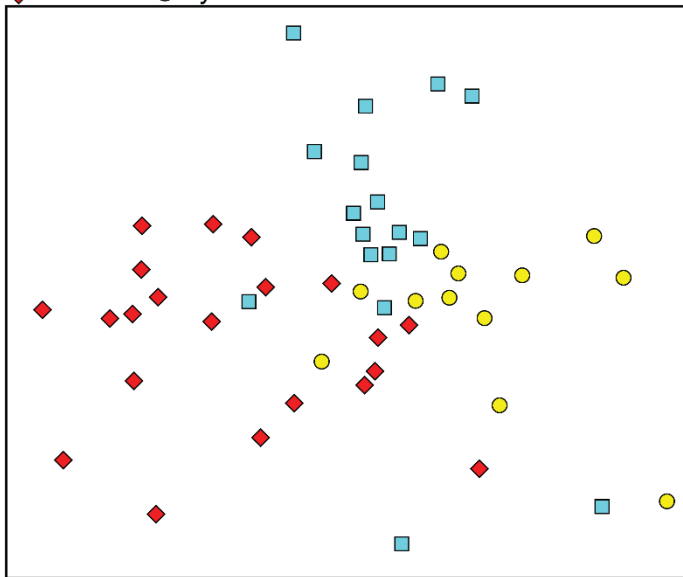
Posidonia



Transform: Square root; Resemblance: BCsim; 2D Stress: 0.1

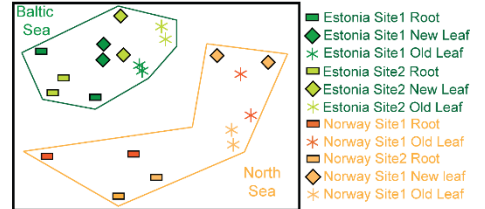
18S ASVs

◆ *Zostera* ● *Cymodocea* ■ *Posidonia*



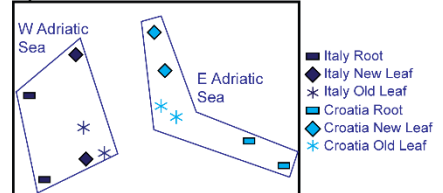
Transform: Square root; Resemblance: BCsim; 2D Stress 0.15

Zostera



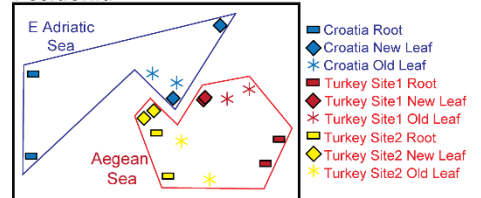
Transform: Square root; Resemblance: BBCsim; 2D Stress: 0.11

Cymodocea



Transform: Square root; Resemblance: BCsim; 2D Stress: 0.08

Posidonia



Transform: Square root; Resemblance: SBCsim; 2D Stress: 0.1

Figura 25 MDS sulle differenze, a livello di ASV (procariotiche nel pannello superiore, eucariotiche in quello inferiore), tra le tre specie di fanerogame marine: *Posidonia* (in azzurro), *Cymodocea* (in giallo), *Zostera* (in rosso). Nei pannelli di destra sono messe in risalto le differenze tra le tre parti della pianta (radici, foglia nuova, foglia vecchia) di una singola specie, suddivise per sito e quindi per mare di appartenenza: Estonia e Finlandia - Mar Baltico; Turchia - Mar Egeo; Croazia - Mar Adriatico Est; Italia - Mar Adriatico Ovest; Norvegia - Mare del Nord. Suddivisione di sito 1 e 2: Italia, Gabicce; Croazia 1, Brjuni; Croazia 2, Dugi Otok; Finlandia 1, Ängsö; Finlandia 2, Fårö; Turchia 1, Gökova; Turchia 2, Foga; Estonia 1, Solea; Estonia 2, Vilsandi; Norvegia 1, Ibergh. Nord; Norvegia 2, Ibergh. Sud.

Le comunità procariotiche ed eucariotiche, delle diverse specie di fanerogame, risultano essere separate, con un'ulteriore divisione tra i microbiomi di una stessa specie ma in mari diversi e tra le diverse parti della pianta (radici, foglie nuove e vecchie) (Figura 25).

La PERMANOVA ($p < 0.05$) indica che, sia le comunità di procarioti che di microeucarioti, mostrano differenze significative tra le tre diverse specie di piante (cioè ogni specie di pianta ha la sua distinta comunità di procarioti e di microeucarioti, con composizione diversa rispetto alle altre specie).

Inoltre, la PERMANOVA ($p < 0.05$) indica un'interazione significativa tra i fattori "sito" e "tipo", confermando che ci sono differenze significative nella composizione della comunità di procarioti e microeucarioti nei microbiomi di piante prelevate in diversi siti, e che, nello stesso sito, ci sono differenze

significative anche tra diverse parti (radici, foglie nuove e vecchie) della stessa specie di pianta.

4.2.5 Differenze nella composizione tassonomica delle comunità di procarioti fra i diversi gruppi di campioni

I pairwais tests sono stati effettuati per conoscere quale classe, procariotica ed eucariotica, partecipa maggiormente alla dissimilarità tra i campioni.

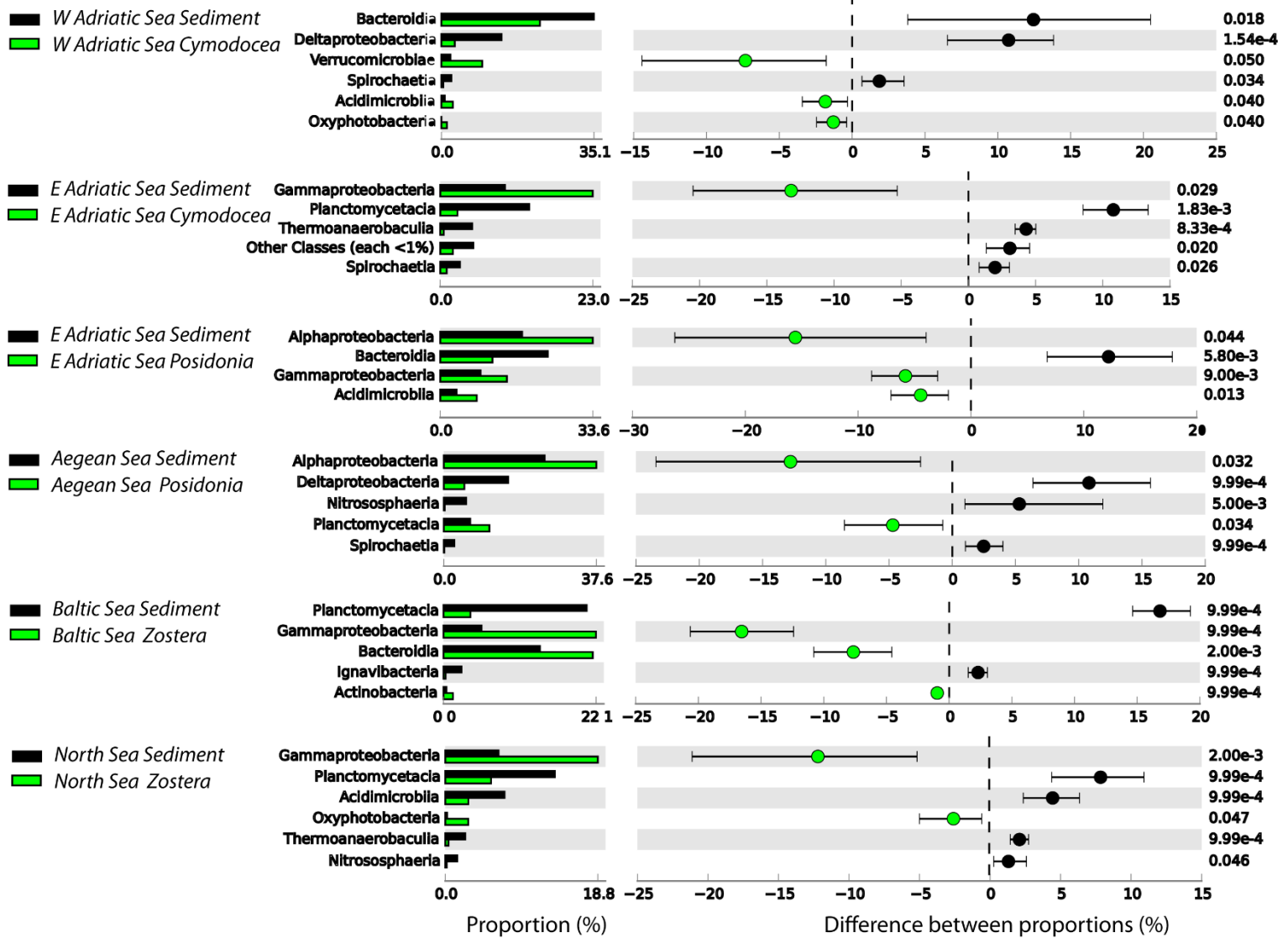


Figura 26 Risultati ottenuti con STAMP atti ad analizzare le differenze significative tra le proporzioni delle comunità procariotiche, dei sedimenti e delle piante, divise per mare: Mare del Nord, Mar Baltico, Mar Egeo, Mar Adriatico (costa Est e Ovest). In nero sono rappresentati i sedimenti e in verde le rispettive piante. Le barre di errore indicano gli intervalli di confidenza al 95% e sulla destra sono indicati i p values dei pairwise tests.

In questo caso sono state comparate le proporzioni delle classi procariotiche tra i sedimenti e la pianta, divisi per specie e quindi mare di appartenenza (Figura 26).

Per la parte ovest del bacino adriatico, la differenza maggiore tra sedimento e *Cymodocea* è data dai Bacteroidia con valori più alti di circa il 15% all'interno dei sedimenti.

Per il versante est invece, la differenza maggiore è data dai Gammaproteobatteri presenti maggiormente all'interno della comunità della pianta che del sedimento (per circa il 15%).

Sempre nel versante est dell'Adriatico, ma anche per il mar Egeo, la differenza maggiore tra sedimento e *Posidonia* è data dagli Alphaproteobatteri, presenti maggiormente nel microbioma vegetale che nel sedimento (poco più del 15%).

Invece, nei campioni di *Zostera* provenienti dal mare del Nord e dal Baltico, la differenza maggiore rispetto ai campioni di sedimento, è data dai Gammaproteobatteri, che toccano differenze del 15%.

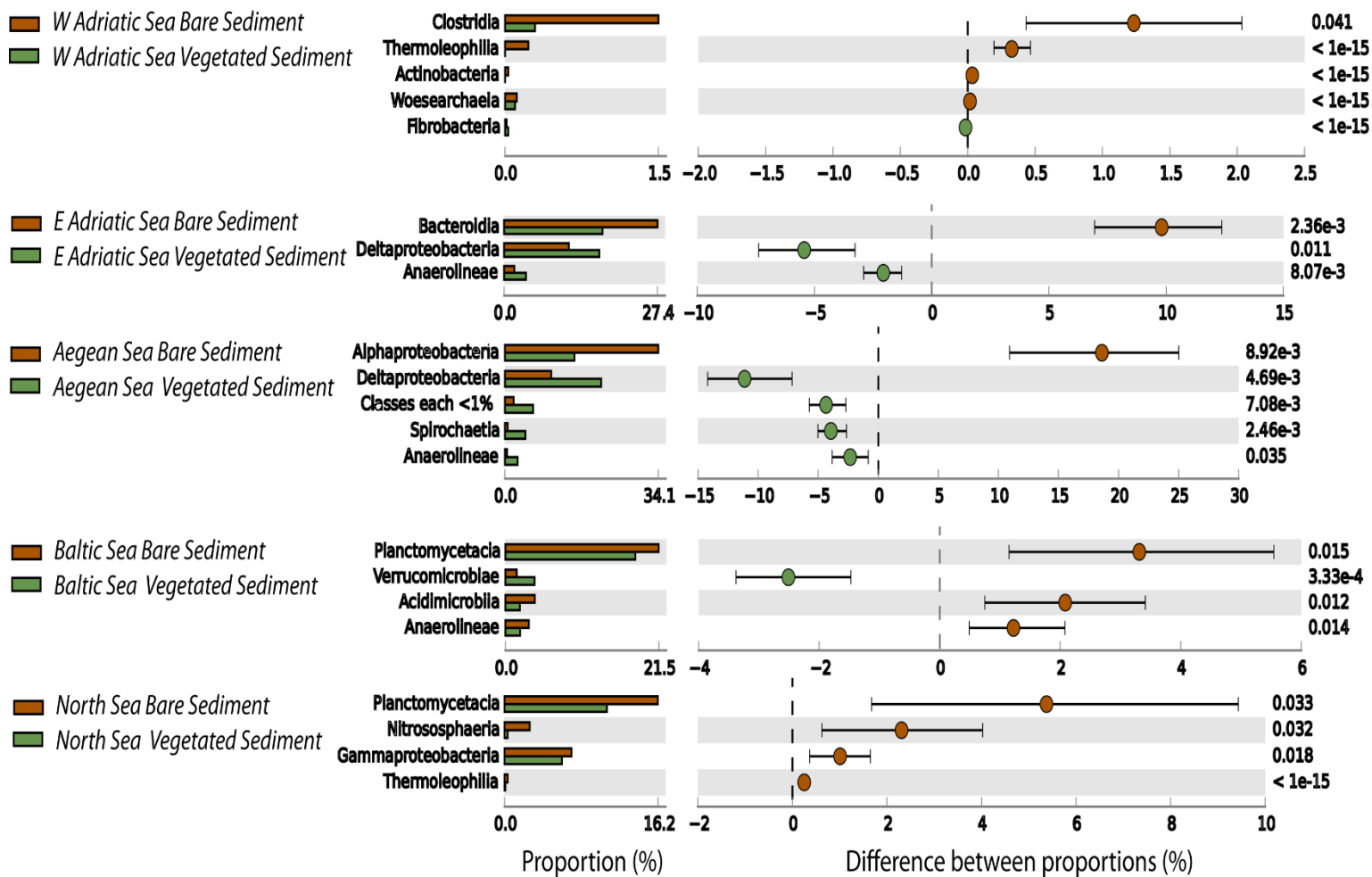


Figura 27 Differenze significative tra le comunità procariotiche dei sedimenti non vegetati e di quelli vegetati, divisi per mare: Mare del Nord, Mar Baltico, Mar Egeo, Mar Adriatico (costa Est e Ovest). In marrone sono rappresentati i sedimenti non vegetati e in verde quelli vegetati. Le barre di errore indicano gli intervalli di confidenza al 95% e sulla destra sono indicati i p values dei pairwise tests.

Come mostrato nella Figura 27, nella parte ovest del mar Adriatico il sedimento non vegetato differisce per Clostridia di circa il 1.5% rispetto al sedimento vegetato; nella parte est invece del 10% per quanto riguarda i Bacteroidia.

Nel mare Egeo la differenza maggiore tra i sedimenti è data dagli Alphaproteobatteri con un valore di circa il 20% in più nei non vegetati rispetto ai vegetati.

Invece, sia nel mar Baltico e sia in quello del Nord sono i Planctomycetacia a segnare differenze maggiori tra sedimento non vegetato e quello vegetato, con valori del 4% circa nel primo mare, mentre nel secondo del 6% circa.

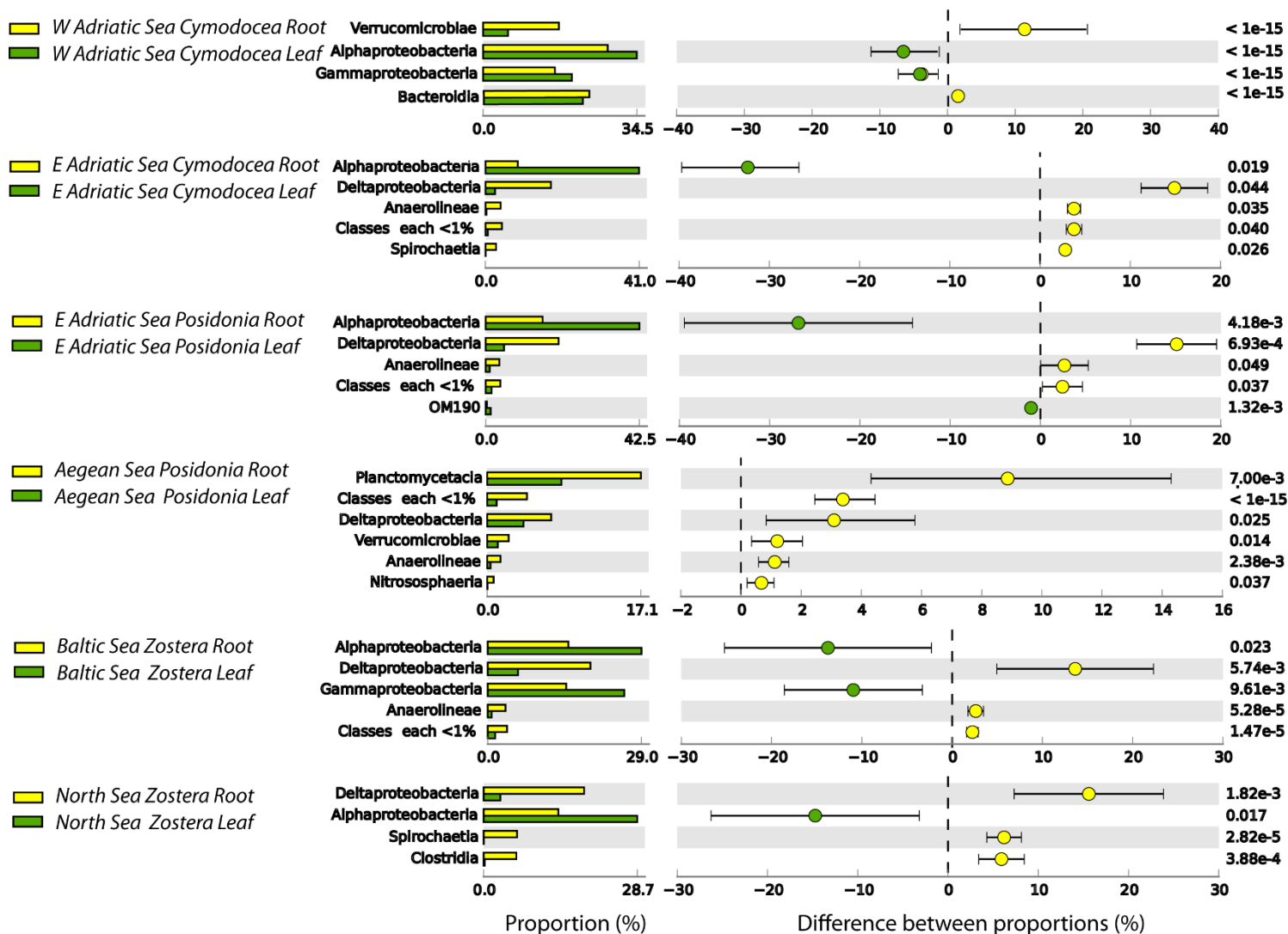


Figura 28 Differenze significative tra le comunità procariotiche delle radici e delle foglie, divise per specie e quindi per mare: Mare del Nord, Mar Baltico, Mar Egeo, Mar Adriatico (costa Est e Ovest). In giallo sono rappresentate le radici, in verde le rispettive foglie. Le barre di errore indicano gli intervalli di confidenza al 95% e sulla destra sono indicati i p values dei pairwise tests.

Come si nota nella Figura 28, una differenza significativa che rimane conservata all'interno di tutti i confronti tra le radici e le foglie (a parte per

Posidonia situata nel mar Egeo), è data dalle diverse proporzioni degli Alphaproteobatteri, presenti in percentuali maggiori all'interno dei campioni di foglie, con valori che variano da un minimo del 14% (Mar Baltico, *Zostera*) circa, ad un massimo del 30% (Mare Adriatico costa Est, *Posidonia*). Anche la differenza data dai Deltaproteobatteri è costante (a parte per i campioni di *Cymodocea* della zona ovest dell'Adriatico), con valori minimi del 4% (Mare Egeo, *Posidonia*) e massimi del 15% (Mare del Nord, *Zostera*) a favore delle radici.

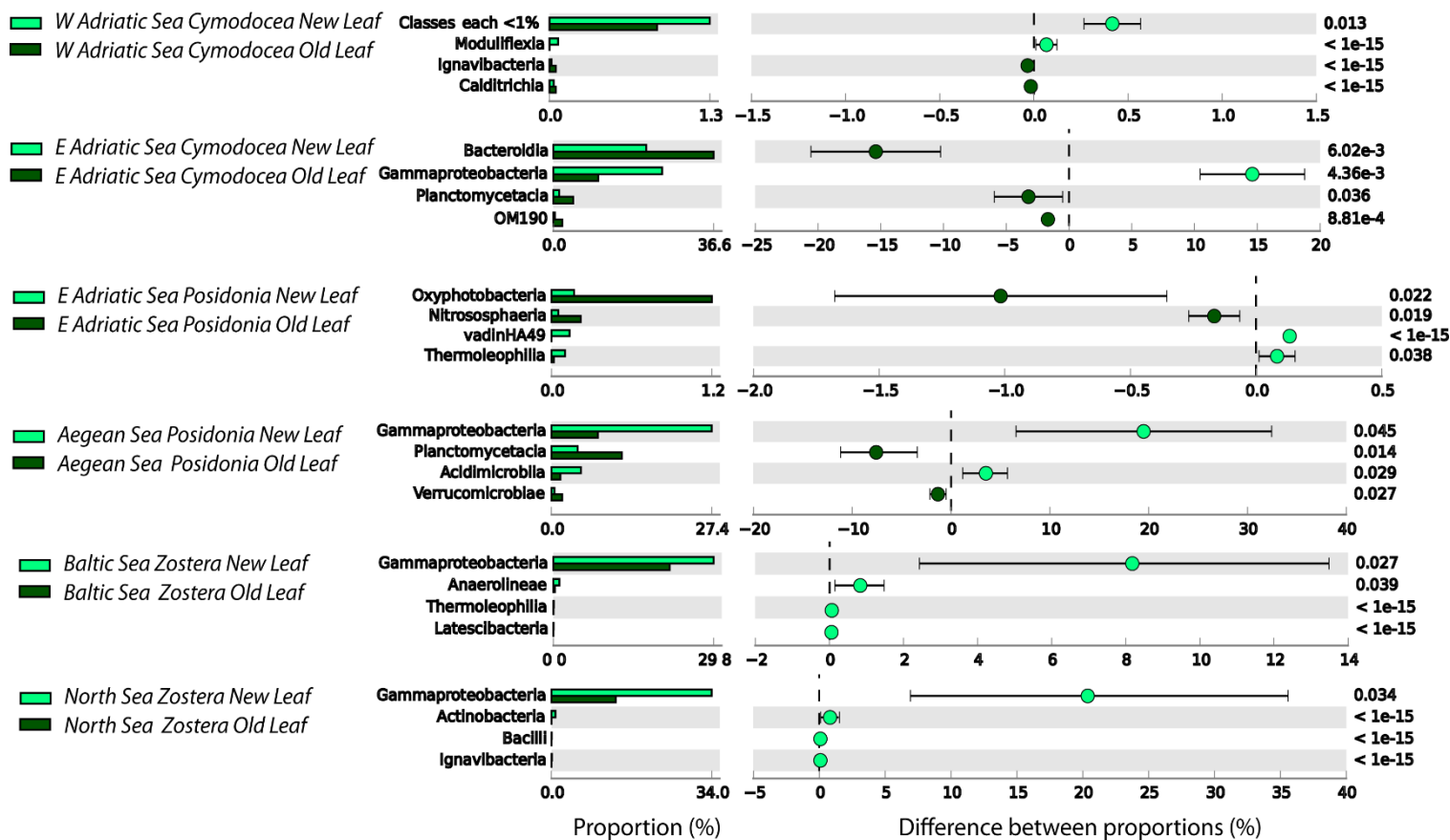


Figura 29 Differenze significative tra le comunità procariotiche delle foglie nuove e foglie vecchie, divise per specie e quindi per mare: Mare del Nord, Mar Baltico, Mar Egeo, Mar Adriatico (costa Est e Ovest). In verde chiaro sono rappresentate le foglie nuove, in verde scuro le foglie vecchie. Le barre di errore indicano gli intervalli di confidenza al 95% e sulla destra sono indicati i p values dei pairwise tests.

Altresì nei confronti tra foglie nuove e vecchie è presente un trend significativo, con una percentuale di Gammaproteobatteri maggiore nelle foglie nuove rispetto a quelle vecchie, con differenze minime del 8% (Mar Baltico, *Zostera*) e massime del 20% (Mare del Nord, *Zostera*). L'unico confronto che si discosta

è tra le foglie nuove e vecchie di *Cymodocea* della costa ovest del mare Adriatico, che presenta bassissime differenze tra i due campioni (Figura 29).

4.2.6 Differenze nella composizione tassonomica delle comunità di microeucarioti fra i diversi gruppi di campioni

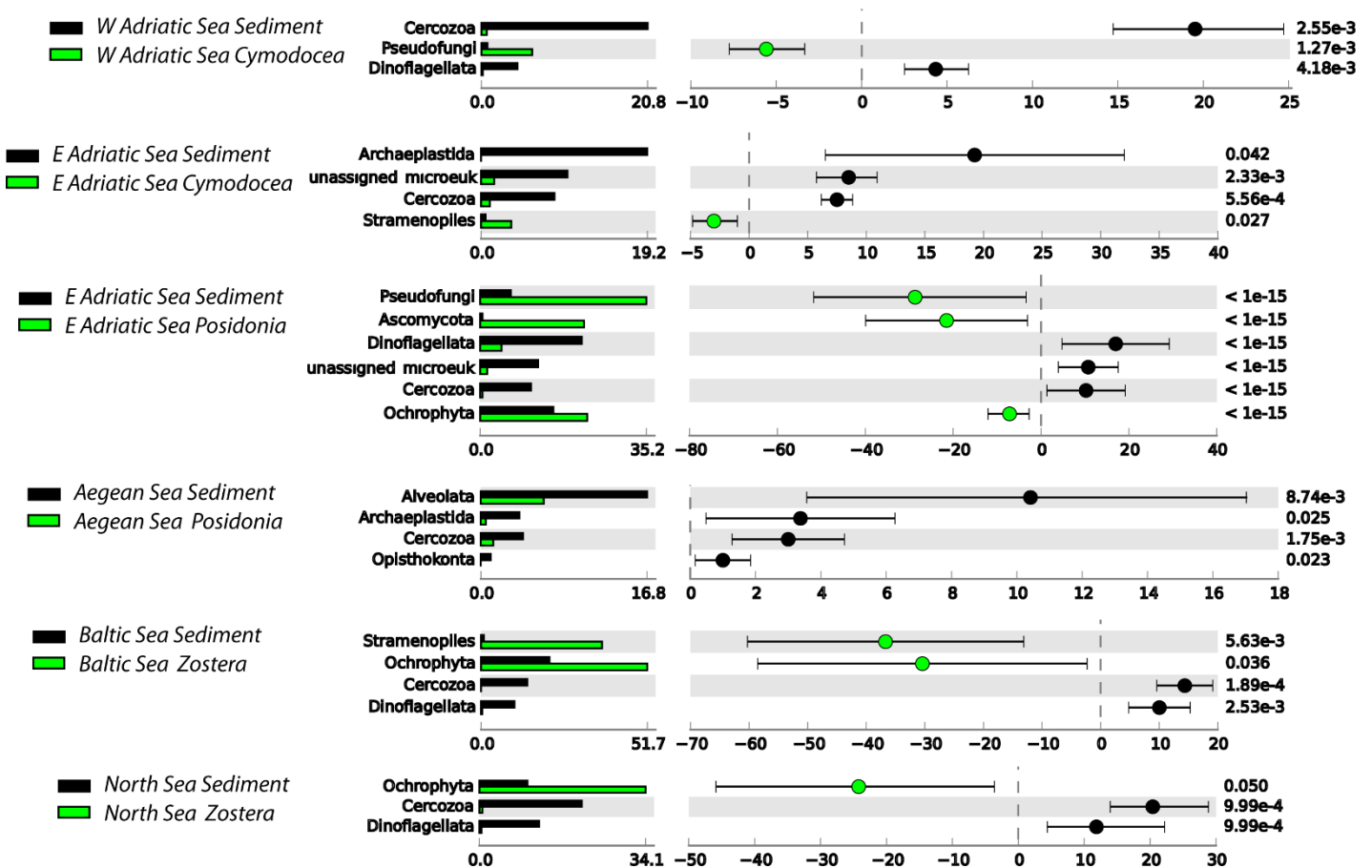


Figura 30 Risultati ottenuti con STAMP atti ad analizzare le differenze significative tra le proporzioni delle comunità eucariotiche, dei sedimenti e delle piante, divise per mare: Mare del Nord, Mar Baltico, Mar Egeo, Mar Adriatico (costa Est e Ovest). In nero sono rappresentati i sedimenti e in verde le rispettive piante. Le barre di errore indicano gli intervalli di confidenza al 95% e sulla destra sono indicati i p values dei pairwise tests.

Per quanto riguarda le disparità eucariotiche tra i campioni di sedimento e i campioni di pianta, ci sono tre differenze significative comuni a quasi tutti i confronti (Figura 30).

I sedimenti contengono abbondanze maggiori sia di Cercozoa e sia di Dinoflagellate, rispetto ai campioni di pianta, con una disparità per i primi di circa il 20%, mentre i secondi con valori che vanno dal 5% (Mar Adriatico Ovest, *Cymodocea*) al 20% circa (Mare Adriatico Est, *Posidonia*).

Mentre le piante differiscono dai sedimenti per le Ochrophyte, con valori che vanno dal 5% (Mare Adriatico Est, *Posidonia*) al 30%. (Mar Baltico, *Zostera*)

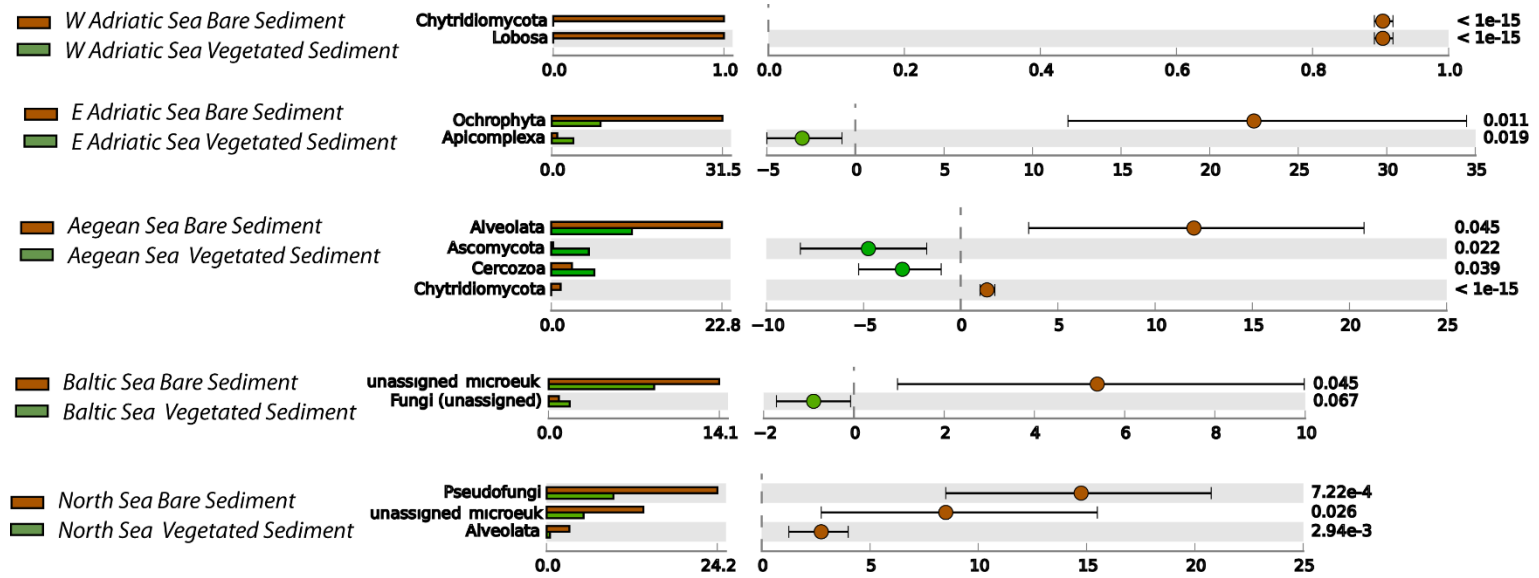


Figura 31 Differenze significative tra le comunità eucariotiche dei sedimenti non vegetati e di quelli vegetati, divisi per mare: Mare del Nord, Mar Baltico, Mar Egeo, Mar Adriatico (costa Est e Ovest). In marrone sono rappresentati i sedimenti non vegetati e in verde quelli vegetati. Le barre di errore indicano gli intervalli di confidenza al 95% e sulla destra sono indicati i p values dei pairwise tests.

Le differenze tra sedimento non vegetato e sedimento vegetato non mostrano andamenti comuni e sono abbastanza eterogenee (Figura 31).

I valori più alti si trovano nei sedimenti della costa est del mar Adriatico, con i sedimenti non vegetati che differiscono di circa del 22,5% dai sedimenti vegetati, per le Ochrophyta.

Nel mare Egeo e nel mare del Nord Alveolata differisce quasi del 15% nel primo e del 3% nel secondo, nei sedimenti non vegetati rispetto a quelli vegetati.

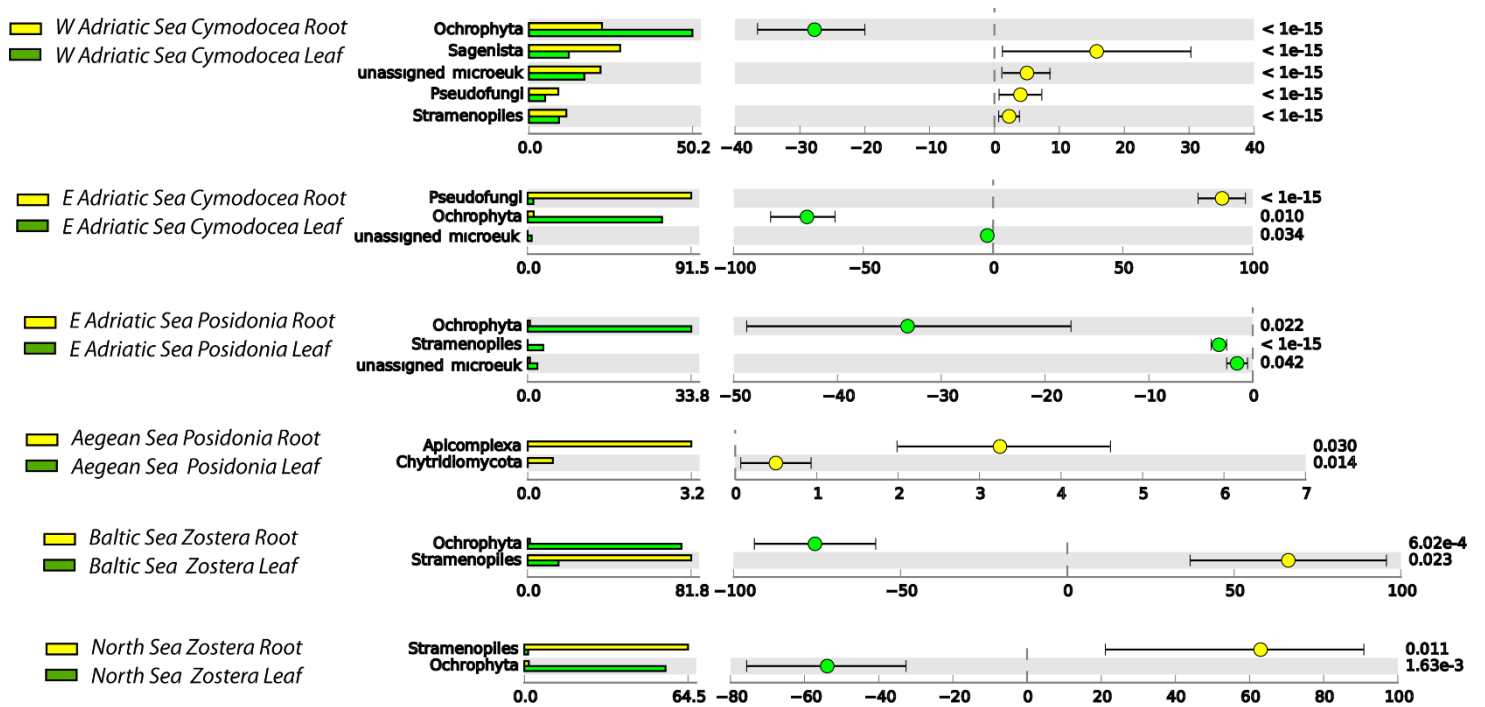


Figura 32 Differenze significative tra le comunità eucariotiche delle radici e delle foglie, divise per specie e quindi per mare: Mare del Nord, Mar Baltico, Mar Egeo, Mar Adriatico (costa Est e Ovest). In giallo sono rappresentate le radici e in verde le foglie. Le barre di errore indicano gli intervalli di confidenza al 95% e sulla destra sono indicati i p values dei pairwise tests.

Anche nei confronti tra radici e foglie, riportati in Figura 32, sono presenti due differenze significative comune a quasi tutti i campioni (escluso *Posidonia* nel Mar Egeo), che comprendono le Ochrophyta e le Stramenopili.

Le Ochrophyta sono presenti maggiormente tra i campioni di foglie rispetto alle radici, con minimi di circa il 30% (Mare Adriatico Est, *Posidonia*) e massimi del 75% circa (Mar Baltico, *Zostera*); le Stramenopili invece sono più rappresentate tra le radici con massimi del 81% (Mar Baltico, *Zostera*).

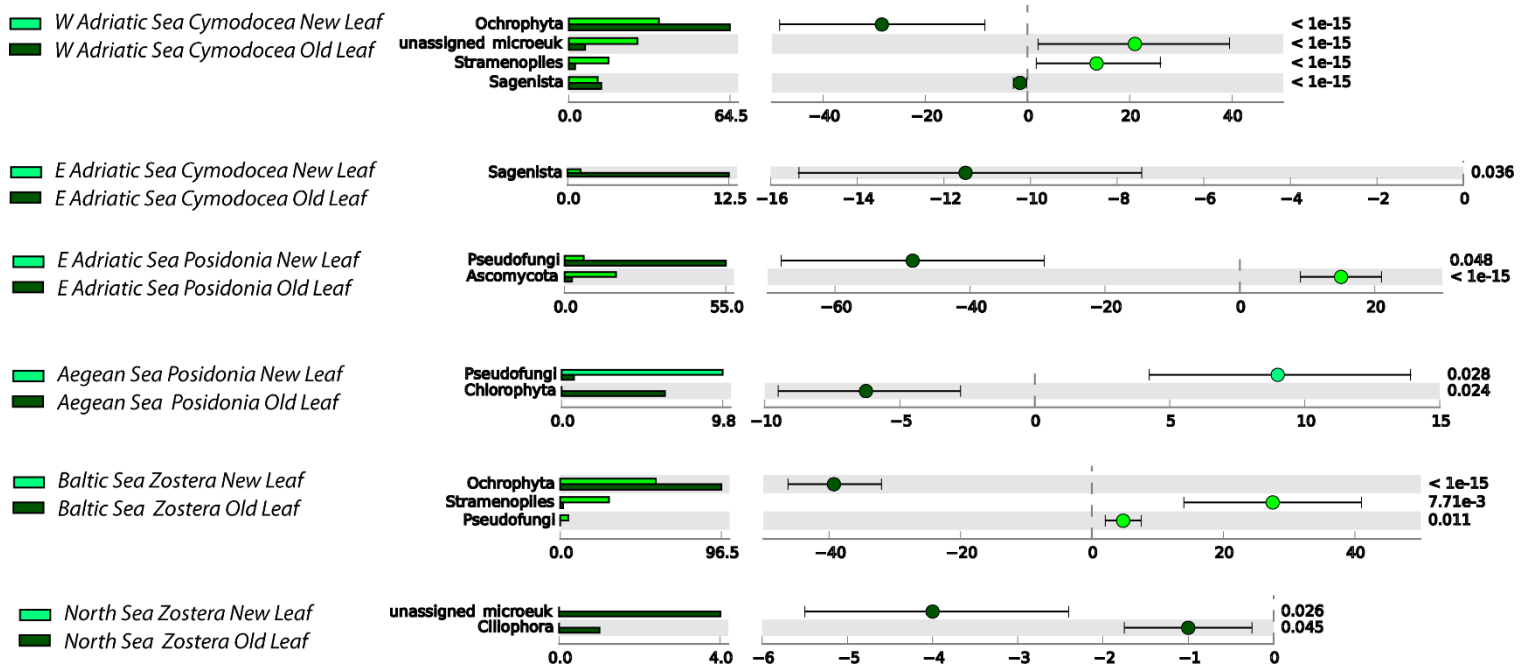


Figura 33 Differenze significative tra le comunità eucariotiche delle foglie nuove e foglie vecchie, divise per specie e quindi per mare: Mare del Nord, Mar Baltico, Mar Egeo, Mar Adriatico (costa Est e Ovest). In verde chiaro sono rappresentate le foglie nuove, in verde scuro le foglie vecchie. Le barre di errore indicano gli intervalli di confidenza al 95% e sulla destra sono indicati i p values dei pairwise tests.

Come per il confronto tra sedimenti anche il confronto tra foglie nuove e vecchie (Figura 33) non presenta un trend comune a tutti i campioni. Le foglie

vecchie di *Zostera* (Mar Baltico), *Posidonia* (Mar Egeo) e *Cymodocea* (Costa Ovest, Mar Adriatico) differiscono significativamente (del 40%, 5% e 30% rispettivamente) per la presenza di comuni gruppi di alghe epifitiche quali le Ocrophyte e le Chlorophyte.

5. DISCUSSIONE

Come per le piante terrestri e per altri organismi marini bentonici, anche le fanerogame marine ospitano abbondanti comunità microbiche: queste influenzano la fisiologia e la salute delle angiosperme creando una serie di complesse ed altamente interconnesse interazioni, all'interno dell'intera prateria. Popolazioni diversificate di batteri, funghi, microalghe, archaea e virus colonizzano le foglie e le radici delle piante e i sedimenti circostanti, trovando in essi numerose micro-nicchie occupabili (Borowitzka, Lavery e Van Keulen, 2006), (Sakayaroj *et al.*, 2010).

Lo studio delle comunità microbiche in habitat marini a fanerogame è particolarmente utile per comprendere meglio il funzionamento di questi sistemi e le interazioni tra fanerogame e microrganismi, e come queste interazioni possano influenzare le fanerogame stesse, che sono importanti "Ecosystem Engineers" in questi sistemi naturali (Duarte *et al.*, 2006).

In questo studio è stata analizzata la biodiversità, l'abbondanza e la composizione delle comunità microbiche (sia procariotiche che di microeucarioti) in diversi habitat caratterizzati dalla presenza di diverse specie di fanerogame marine (*Cyomodocea* spp., *Posidonia* spp., oppure *Zostera*

spp.), includendo siti del Mar Adriatico, Mar Egeo, Mare del Nord e Mar Baltico.

Inizialmente, è stata effettuata una caratterizzazione dei diversi siti di campionamento nei diversi mari europei, confrontando le diverse variabili abiotiche e la quantità e qualità della materia organica nei diversi sedimenti. Questa prima analisi ha messo in luce che i campioni di sedimento raccolti nel presente studio mostravano differenze dal punto di vista sia delle variabili ambientali abiotiche (temperatura, salinità e profondità) che trofiche (quantità di materia organica e fitopigmenti). In particolare, il raggruppamento dei campioni rifletteva la loro origine geografico-oceanografica, con una principale suddivisione tra campioni provenienti dal Mar Baltico e Mar del Nord (caratterizzati da acque a minor temperatura e salinità) rispetto a quelli provenienti da Mar Adriatico e Egeo (caratterizzati da temperature e salinità maggiori). Inoltre, sia in generale per tutto il dataset che in ciascun sito campionato, i sedimenti vegetati hanno mostrato caratteristiche trofiche (in termini di quantità e qualità dei contenuti di materia organica) migliori rispetto a quelli non vegetati.

Nel presente studio si è pertanto voluto testare quali fossero i fattori in grado di influenzare la diversità e la composizione delle comunità microbiche nei diversi siti campionati.

Per quanto riguarda l'alfa-diversità (come numero di specie diverse), è risultato che i pattern di diversità procariotica ed eucariotica erano diversi. L'alfa diversità delle comunità procariotiche ha infatti mostrato ridotta variabilità, mantenendosi a livelli abbastanza simili nei diversi campioni o comunque mostrando pattern di variabilità non costanti. In particolare, per quanto riguarda i valori di alfa diversità, la PERMANOVA ha messo in evidenza differenze significative soltanto nel confronto fra diversi settori oceanici ($p < 0.05$), mentre altri fattori quali il sito (all'interno di ciascun settore oceanografico) o la tipologia di campione (cioè sedimento vegetato vs non vegetato, oppure campione di sedimento vs campione di fanerogama oppure tra i diversi generi di fanerogama) non hanno messo in luce differenze significative.

In maniera differente, l'alfa-diversità delle comunità di microeucarioti hanno mostrato variazioni significative solamente nel confronto tra campioni di sedimento e campioni di fanerogama, mostrando valori di alfa-diversità inferiori per i microbiomi di fanerogame.

Questi risultati lasciano supporre che, in termini di numero di diverse ASV presenti nei sistemi analizzati, l'alfa-diversità delle comunità di procarioti ed eucarioti potrebbe essere influenzata da fattori distinti.

Per quanto riguarda invece la composizione tassonomica delle comunità microbiche, i risultati del presente studio mostrano che, in generale, il principale fattore utile a distinguere le diverse comunità microbiche analizzate è la tipologia di campione. In particolare, infatti, i sedimenti hanno mostrato una composizione tassonomica delle comunità di procarioti e di eucarioti significativamente diversa rispetto a quelle dei campioni di fanerogama (cioè rispetto ai microbiomi associati alle fanerogame) (Figura 23. PERMANOVA $p < 0.05$). In particolare, si è notato che questa netta distinzione tra comunità microbiche del sedimento e della rispettiva specie di fanerogama era conservata in tutte le aree oceanografiche, in ciascun sito di campionamento, e quindi per tutte le specie di fanerogama ($p < 0.05$).

Proseguendo più in dettaglio nei confronti tra le comunità microbiche nei sedimenti, è risultato che la composizione tassonomica delle comunità di procarioti e di eucarioti bentonici differiva significativamente anche in base alla tipologia di sedimento (cioè comparando le comunità di sedimenti vegetati e non vegetati (Figura 24. PERMANOVA $p < 0.05$).

Questi risultati indicano quindi che, nonostante l'alfa-diversità delle comunità microbiche non abbiano mostrato chiari pattern in relazione alla maggior parte dei fattori testati nel presente studio (e.g., mare, sito, tipologia di campione), le differenze nella composizione tassonomica delle comunità microbiche sono risultate più marcate tra i diversi campioni e dovute ad una complessa interazione di fattori. In generale infatti, è risultato che la composizione delle comunità di procarioti e microeucarioti possono differire in base al tipo di campione (cioè tra comunità del sedimento e microbiomi di fanerogame), tra diversi settori oceanografici, tra diversi siti all'interno dello stesso settore oceanografico, tra diverse specie di fanerogame, nonché in base alla diversa tipologia di sedimento (vegetato o non vegetato) ed alla diversa porzione di fanerogama (cioè tra radice, foglie nuove e foglie vecchie della stessa fanerogama).

I nostri risultati sembrano dunque confermare quindi che la presenza delle praterie di fanerogame sono in grado di influenzare la biodiversità bentonica a livello locale anche se in generale, è l'ambiente circostante a selezionare maggiormente il microbioma (Ettinger *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda i campioni di fanerogame, sono state trovate differenze significative (Figura 25. PERMANOVA $p < 0.05$) nella composizione delle

comunità di procarioti ed eucarioti associate ai 3 diversi generi (*Zostera*, *Cymodocea* o *Posidonia*), dimostrando che ciascuno possedeva un microbioma distinto dalle altre. Inoltre, sia per la comunità di procarioti che di microeucarioti, sono state trovate differenze significative nella composizione dei microbiomi della stessa specie di fanerogama se prelevata in diversi siti. Scendendo ancora più nel dettaglio, i risultati mostrano che, nello stesso sito e quindi per ogni singola specie, ci possono essere differenze significative anche tra diverse parti (radici, foglie nuove e vecchie) della stessa pianta (Figura 25. PERMANOVA $p < 0.05$).

Questi risultati suggeriscono che la presenza delle praterie di fanerogame ha una influenza duplice sulle comunità procariotiche. Da un lato, la presenza delle praterie di fanerogame può modificare lo stato trofico dei sistemi bentonici, quindi potenzialmente contribuire a spiegare le differenze nella composizione tassonomica delle comunità microbiche tra sedimenti vegetati e non vegetati. Dall'altra, la pianta stessa ospita specifici taxa di batteri, archaea e microeucarioti che non sono presenti o che mostrano abbondanze molto inferiori nell'ambiente bentonico circostante. Questo contribuisce dunque a mantenere elevata la beta-diversità a livello locale nei siti analizzati. Inoltre, il fatto che diverse specie di fanerogame presentino specifici microbiomi, distinti

dalle altre specie di fanerogame, contribuisce a mantenere elevati i livelli di gamma-diversità (in quanto diversi settori oceanografici ospitano diverse specie di fanerogame e relativi specifici microbiomi).

A livello tassonomico di Classe, i taxa procariotici più abbondanti sono risultati Bacteroidia, Alphaproteobatteri, Deltaproteobatteri, Gammaproteobatteri, e Planctomycetacia.

Il confronto dettagliato della composizione tassonomica delle comunità di procarioti tra le diverse tipologie di campioni ha messo in luce che queste 5 classi più abbondanti erano anche quelle che contribuivano maggiormente alle differenze significative riscontrate tra i diversi campioni analizzati.

Per quanto riguarda invece il confronto dettagliato della composizione tassonomica delle comunità di microeucarioti tra le diverse tipologie di campioni, la principale evidenza emersa è stata una evidente presenza di microalghe epifitiche nei campioni di fanerogama, soprattutto a livello fogliare.

In termini di equitabilità, sia per i procarioti che per i microeucarioti si sono riscontrati valori generalmente elevati in quasi tutti i campioni analizzati, con alcuni valori più bassi nei campioni di fanerogama rispetto a quelli di sedimento. Questo risultato suggerisce che le interazioni tra pianta e microrganismi e le differenze di habitat tra ambiente bentonico dei sedimenti e

stile di vita in associazione con la pianta possono contribuire a selezionare particolari gruppi di procarioti e microeucarioti maggiormente adattati ai diversi habitat.

In merito ai confronti interni alle praterie è stato riscontrato che a livello procariotico foglie e radici differiscono significativamente ($p < 0.05$) per gli Alphaproteobatteri (con le prime contenenti abbondanze maggiori rispetto alle seconde) e i Deltaproteobatteri (in quantità maggiori nelle radici). Fanno parte degli Alphaproteobatteri organismi aerobi dipendenti, che sfruttano luce e composti vegetali diffusi dalle foglie, per la crescita (Weidner *et al.*, 2000), mentre i Deltaproteobatteri partecipano alla detossificazione dei solfuri, prodotti da batteri solfato riduttori, andando a migliorare le condizioni dell'ambiente colonizzato dalle radici della pianta (Crump e Koch, 2008), (Jensen *et al.*, 2007).

Nello specifico le foglie nuove sono caratterizzate da alte abbondanze di Gammaproteobatteri che differiscono significativamente con quelle trovate nei campioni di foglie vecchie ($p < 0.05$). I Gammaproteobatteri sono solitamente associati al sedimento, poiché implicati nell'ossidazione dello zolfo (Cifuentes *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2007). Uno studio recente (Crump *et al.*, 2018) ha messo in correlazione la scoperta di organismi appartenenti ai

Gammaproteobatteri, che popolano le foglie di *Zostera japonica*, con la produzione di sostanze che idrolizzano l'agarosio; questi organismi potrebbero essere coinvolti con la regolazione della comunità epifitica e potrebbero quindi avere importanti implicazioni sulle interazioni competitive tra epifiti e pianta. Nel complesso, il presente studio suggerisce che le differenze evidenziate dal confronto dei diversi microbiomi dei campioni analizzati, potrebbero aiutare nella identificazione dei taxa di procarioti e microeucarioti, coinvolti nel migliorare le condizioni di salute delle fanerogame marine. Simili studi potrebbero infatti risultare utili non solo per comprendere meglio l'ecologia microbica degli habitat caratterizzati dalla presenza delle fanerogame, ma anche per identificare potenziali ceppi microbici, in grado di facilitare il restauro e il recupero delle praterie di fanerogame (Weaver, 2017) (English, 2019) (Wang *et al.*, 2020).

6. CONCLUSIONI

- I campioni di sedimento raccolti nel presente studio mostravano differenze dal punto di vista sia delle variabili ambientali abiotiche (temperatura, salinità e profondità) che trofiche (quantità di materia organica e fitopigmenti). In particolare, i campioni clusterizzavano sulla base della diversa origine geografico-oceanografica. Tuttavia, in ciascun sito i sedimenti vegetati si distinguevano dai non vegetati per le concentrazioni generalmente più alte di materia organica e fitopigmenti, probabile effetto della presenza delle fanerogame.
- I pattern di alfa-diversità procariotica ed eucariotica nei campioni analizzati nel presente studio, sono risultati diversi. L'alfa diversità delle comunità procariotiche ha mostrato ridotta variabilità, con pattern non costanti e differenze significative soltanto nel confronto fra diversi settori oceanici. L'alfa-diversità delle comunità di microeucarioti ha mostrato invece valori inferiori per i microbiomi di fanerogame rispetto ai campioni di sedimento, senza mostrare altre variazioni significative sulla base degli altri fattori testati (ad esempio tra diversi settori oceanici o siti).

- La composizione tassonomica delle comunità microbiche variava primariamente in base alla tipologia di campione, con netta distinzione tra campioni di sedimento e di fanerogame in tutti i siti analizzati e per tutte le specie di fanerogame.
- Proseguendo più in dettaglio nei confronti tra le comunità microbiche, la composizione tassonomica delle comunità sia di procarioti che di microeucarioti differivano significativamente anche comparando i) le comunità bentoniche in sedimenti vegetati rispetto ai non vegetati, ii) le comunità associate a diverse specie di pianta (*Zostera*, *Cymodocea* o *Posidonia*), e iii) le comunità associate a diverse porzioni di una stessa pianta (cioè radici, foglie nuove o foglie vecchie).
- Per quanto riguarda i procarioti, a livello tassonomico di Classe, i taxa più abbondanti e responsabili delle principali differenze tra campioni sono stati Bacteroidia, Alphaproteobatteri, Deltaproteobatteri, Gammaproteobatteri, e Planctomycetacia. Per quanto riguarda invece i microeucarioti, a livello tassonomico di Divisione, la principale evidenza emersa è stata una generale maggiore presenza di microalghe epifitiche nei campioni di foglie di tutte le fanerogame.

7. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i partner del progetto MERCES per aver messo a disposizione i campioni di sedimento e di fanerogame analizzati nel presente studio.

Di seguito, si elenca il dettaglio dei contributi al presente lavoro di Tesi:

R. Danovaro, C. Corinaldesi, E. Rastelli: concettualizzazione, metodologia, validazione, analisi complessiva dati, acquisizione risorse, scrittura, revisione ed editing, supervisione ed amministrazione del progetto di Tesi.

M. Ilacqua: analisi di laboratorio, analisi dati ambientali (variabili abiotiche, trofia dei sistemi, microscopia), scrittura ed editing.

M. Tangherlini: analisi bioinformatiche.

Si ringrazia inoltre il seguente personale per le attività di campionamento:

Università Politecnica delle Marche (Italia): Marco Lo Martire; Zaira da Ros.

University of Zagreb (Croazia): Tatjana Bakran-Petricioli; Silvija Kipson.

University of Tartu (Estonia): Liina Pajusalu.

Åbo Akademi University (Finlandia): Christoffer Boström; Karine Gagnon.

Norwegian Institute for Water Research (Norvegia): Eli Rinde.

Ege University (Turchia): Elizabeth Grace Tunka Eronat; Inci Tuney.

8. BIBLIOGRAFIA

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.

Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Bai, Y. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.

Borowitzka, M. A., Lavery, P. S., & van Keulen, M. (2007). Epiphytes of seagrasses. In *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (pp. 441-461). Springer, Dordrecht.

Buia, M. C., Gambi, M. C., & Dappiano, M. (2004). Seagrass systems. *Biologia Marina Mediterranea*, 10(Suppl.), 133-183.

Bushmann, P. J., & Ailstock, M. S. (2006). Antibacterial compounds in estuarine submersed aquatic plants. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 331(1), 41-50.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Bai, Y. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.

Celdran, D., Espinosa, E., Sanchez-Amat, A., & Marín, A. (2012). Effects of epibiotic bacteria on leaf growth and epiphytes of the seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology Progress Series*, 456, 21-27.

Cifuentes, A., Antón, J., Benlloch, S., Donnelly, A., Herbert, R. A., & Rodríguez-Valera, F. (2000). Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(4), 1715-1719.

Cole, L. W., & McGlathery, K. J. (2012). Nitrogen fixation in restored eelgrass meadows. *Marine Ecology Progress Series*, 448, 235-246.

Crump, B. C., & Koch, E. W. (2008). Attached bacterial populations shared by four species of aquatic angiosperms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(19), 5948-5957.

Crump, B. C., Wojahn, J. M., Tomas, F., & Mueller, R. S. (2018). Metatranscriptomics and amplicon sequencing reveal mutualisms in seagrass microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00388>.

Danovaro, R. (Ed.). (2009). *Methods for the study of deep-sea sediments, their functioning and biodiversity*. CRC press.

Devereux, R. (2005). Seagrass rhizosphere microbial communities. Interactions between macro-and microorganisms in marine sediments. *Am. Geophys. Union*, 199-216.

Duarte, C. M., Holmer, M., & Marbà, N. (2005). Plant-microbe interactions in seagrass meadows. *Interactions between macro-and microorganisms in marine sediments*, 60, 31.

Duarte, C. M., Larkum, A. W., & Orth, R. J. (Eds.). (2006). *Seagrasses: biology, ecology and conservation*. Springer.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. J. A. C. (1956). Phenol sulphuric acid method for total carbohydrate. *Anal. Chem*, 26, 350.

EG, B. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can, J. Biochem. Physiol*, 37, 911-917.

Engel, S., Puglisi, M. P., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2006). Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology*, 149(5), 991-1002.

English, M. K. (2019). Recovery and development of the microbial community in the *Zostera marina* rhizosphere after transplantation.

Ettinger, C. L., Voerman, S. E., Lang, J. M., Stachowicz, J. J., & Eisen, J. A. (2017). Microbial communities in sediment from *Zostera marina* patches, but not the *Z. marina* leaf or root microbiomes, vary in relation to distance from patch edge. *PeerJ*, 5, e3246.

Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K., & Greer, C. W. (2004). Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *Journal of microbiological methods*, 56(2), 181-191.

Fourqurean, J. W., Duarte, C. M., Kennedy, H., Marbà, N., Holmer, M., Mateo, M. A., ... & Serrano, O. (2012). Seagrass ecosystems as a globally significant carbon stock. *Nature geoscience*, 5(7), 505-509.

Garcias-Bonet, N., Fusi, M., Ali, M., Shaw, D. R., Saikaly, P., Daffonchio, D., & Duarte, C. M. (2018). High denitrification and anaerobic ammonium

oxidation contribute to net nitrogen loss in a seagrass ecosystem in the central Red Sea.

Gerchakov, S. M., & Hatcher, P. G. (1972). IMPROVED TECHNIQUE FOR ANALYSIS OF CARBOHYDRATES IN SEDIMENTS 1. *Limnology and Oceanography*, 17(6), 938-943.

Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., ... & Del Campo, J. (2012). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic acids research*, 41(D1), D597-D604.

Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PloS one*, 9(2), e87624.

Hassenrück, C., Hofmann, L. C., Bischof, K., & Ramette, A. (2015). Seagrass biofilm communities at a naturally CO₂-rich vent. *Environmental microbiology reports*, 7(3), 516-525.

Hemminga, M. A., & Duarte, C. M. (2000). *Seagrass ecology*. Cambridge University Press.

Holmer, M., & Hasler-Sheetal, H. (2014). Sulfide intrusion in seagrasses assessed by stable sulfur isotopes—a synthesis of current results. *Frontiers in Marine Science*, 1, 64.

Jensen, S. I., Kühl, M., & Priemé, A. (2007). Different bacterial communities associated with the roots and bulk sediment of the seagrass *Zostera marina*. *FEMS microbiology ecology*, 62(1), 108-117.

Jørgensen, B. B. (1982). Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic—oxic interface environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 298(1093), 543-561.

Kaldy, J. E., Eldridge, P. M., Cifuentes, L. A., & Jones, W. B. (2006). Utilization of DOC from seagrass rhizomes by sediment bacteria: ¹³C-tracer experiments and modeling. *Marine Ecology Progress Series*, 317, 41-55.

Kiene, R. P., & Capone, D. G. (1988). Microbial transformations of methylated sulfur compounds in anoxic salt marsh sediments. *Microbial ecology*, 15(3), 275-291.

Kilminster, K., & Garland, J. (2009). Aerobic heterotrophic microbial activity associated with seagrass roots: effects of plant type and nutrient amendment. *Aquatic microbial ecology*, 57(1), 57-68.

Kuo, J., & Den Hartog, C. (2007). Seagrass morphology, anatomy, and ultrastructure. In *SEAGRASSES: BIOLOGY, ECOLOGY AND CONSERVATION* (pp. 51-87). Springer, Dordrecht.

Kurtz, J. C., Yates, D. F., Macauley, J. M., Quarles, R. L., Genthner, F. J., Chancy, C. A., & Devereux, R. (2003). Effects of light reduction on growth of the submerged macrophyte *Vallisneria americana* and the community of root-

associated heterotrophic bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 291(2), 199-218.

Larkum, A. W., Kendrick, G. A., & Ralph, P. J. (Eds.). (2018). *Seagrasses of Australia: structure, ecology and conservation*. Springer.

Larkum, A. W., Orth, R. J., & Duarte, C. M. (2006). *Seagrasses* (p. 691). Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.

Lowry, O. I., Rosebrough, N. J. L. F. A., Farr, A., & Randall, R. J. R. J. (1951). Protein determination by a modified Folin phenol method. *J. biol. Chem*, 193, 265-275.

Lyimo, T., & Hamisi, M. (2008). Cyanobacteria occurrence and nitrogen fixation rates in the seagrass meadows of the East Coast of Zanzibar:

comparisons of sites with and without seaweed farms. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 7(1).

Martin, B. C., Alarcon, M. S., Gleeson, D., Middleton, J. A., Fraser, M. W., Ryan, M. H., ... & Kilminster, K. (2020). Root microbiomes as indicators of seagrass health. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(2), fiz201.

Martin, B. C., Gleeson, D., Statton, J., Siebers, A. R., Grierson, P., Ryan, M. H., & Kendrick, G. A. (2018). Low light availability alters root exudation and reduces putative beneficial microorganisms in seagrass roots. *Frontiers in microbiology*, 8, 2667.

Moksnes, P. O., Gullström, M., Tryman, K., & Baden, S. (2008). Trophic cascades in a temperate seagrass community. *Oikos*, 117(5), 763-777.

Otsuki, A., & Wetzel, R. G. (1974). Release of dissolved organic matter by autolysis of a submersed macrophyte, *Scirpus subterminalis* L. *Limnology and Oceanography*, 19(5), 842-845.

Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*, 18(5), 1403-1414.

Piazzzi, L., Balata, D., & Ceccherelli, G. (2016). Epiphyte assemblages of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: an overview. *Marine Ecology*, 37(1), 3-41.

Pollard, P. C., & Moriarty, D. J. W. (1991). Organic carbon decomposition, primary and bacterial productivity, and sulphate reduction, in tropical seagrass beds of the Gulf of Carpentaria, Australia. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 69(1), 149-159.

Sakayaroj, J., Preedanon, S., Supaphon, O., Jones, E. G., & Phongpaichit, S. (2010). Phylogenetic diversity of endophyte assemblages associated with the tropical seagrass *Enhalus acoroides* in Thailand. *Fungal diversity*, 42(1), 27-45.

Short, F., Carruthers, T., Dennison, W., & Waycott, M. (2007). Global seagrass distribution and diversity: a bioregional model. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350(1-2), 3-20.

Tangherlini, M., Corinaldesi, C., Rastelli, E., Musco, L., Armiento, G., Danovaro, R., & Dell'Anno, A. (2020). Chemical contamination can promote turnover diversity of benthic prokaryotic assemblages: the case study of the Bagnoli-Coroglio bay (Southern Tyrrhenian Sea). *Marine Environmental Research*, 105040.

Tarquino, F. (2017). The role of the seagrass leaf microbiome in assisting nitrogen uptake by the Western Australian seagrass, *Posidonia sinuosa*.

Uku, J., Björk, M., Bergman, B., & Díez, B. (2007). Characterization and Comparison of Prokaryotic Epiphytes Associated with Three East African Seagrasses 1. *Journal of phycology*, 43(4), 768-779.

Valentine, J. F., & Duffy, J. E. (2007). The central role of grazing in seagrass ecology. In *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (pp. 463-501). Springer, Dordrecht.

Wang, L., English, M. K., Tomas, F., & Mueller, R. S. (2020). Recovery and Community Succession of the *Zostera marina* Rhizobiome After Transplantation. *bioRxiv*.

Weaver, C. L. (2017). *The effects of sediments and associated microbial communities in Zostera marina restoration* (Doctoral dissertation, San Francisco State University).

Weidner, S., Arnold, W., Stackebrandt, E., & Pühler, A. (2000). Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with leaves of the seagrass *Halophila stipulacea* by a culture-independent small-subunit rRNA gene approach. *Microbial ecology*, 39(1), 22-31.

Welsh, D. T. (2000). Nitrogen fixation in seagrass meadows: regulation, plant–bacteria interactions and significance to primary productivity. *Ecology Letters*, 3(1), 58-71.

Welsh, D. T., Bourgues, S., De Wit, R., & Herbert, R. A. (1996). Seasonal variations in nitrogen-fixation (acetylene reduction) and sulphate-reduction rates in the rhizosphere of *Zostera noltii*: nitrogen fixation by sulphate-reducing bacteria. *Marine Biology*, 125(4), 619-628.

Williams, C. J., Boyer, J. N., & Jochem, F. J. (2009). Microbial activity and carbon, nitrogen, and phosphorus content in a subtropical seagrass estuary (Florida Bay): evidence for limited bacterial use of seagrass production. *Marine biology*, 156(3), 341-353.

Wood, D. C., & Hayasaka, S. S. (1981). Chemotaxis of rhizoplane bacteria to amino acids comprising eelgrass (*Zostera marina* L.) root exudate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 50(2-3), 153-161.