



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

Corso di Laurea Magistrale in
BIOLOGIA MARINA

INCORPORAZIONE SELETTIVA E BIOMINERALOGIA IN
***CHONDROSIA RENIFORMIS* (PORIFERA: DEMOSPONGIAE)**

LUNGO LA RIVIERA DEL CONERO

SELECTIVE INCORPORATION AND BIOMINERALOGY IN
***CHONDROSIA RENIFORMIS* (PORIFERA: DEMOSPONGIAE)**

ALONG THE CONERO COAST

Candidato
Matilde Baruffaldi

Relatore
Dr.
Cristina Di Camillo

Correlatore
Prof.
Carlo Cerrano

Sessione Straordinaria
Anno Accademico 2018/2019

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Mare Adriatico	1
1.2 Ciclo vitale di <i>Chondrosia reniformis</i>	7
1.3 Biomineralizzazione e incorporazione sedimenti.....	9
1.4 Struttura e importanza del collagene.....	13
1.5 Relazioni simbiotiche con diatomee.....	16
2. SCOPO DELLA TESI	20
3. MATERIALI E METODI	25
3.1 Campionamenti	25
3.2 Analisi in laboratorio	28
3.3 Microanalisi dei sedimenti	31
3.4 Osservazione dei processi di incorporazione	33
3.5 Ricerca bibliografica.....	35
4 RISULTATI	36
4.1 Analisi bibliografica.....	36
4.2 Confronto tra sedimenti inorganici totali e silicei	38
4.3 Parametri ambientali.....	40
4.4 Analisi quantitativa comparativa tra sedimento sopra ectosoma ed ambientale	42
4.5 Confronto tra sedimenti di aree diverse	44
4.6 Sedimenti inorganici ambientali.....	45
4.6.1 Sedimenti silicei ambientali.....	47
4.7 Sedimenti inorganici sopra Ectosoma	49
4.7.1 Sedimenti silicei sopra Ectosoma	51
4.8 Sedimenti inorganici nell'Ectosoma	53
4.8.1 Sedimenti inorganici nell'coanosoma	55
4.9 Sedimenti silicei nell' Ectosoma	57
4.9.1 Sedimenti silicei nell'coanosoma	59
4.10 Riepilogo delle classi dimensionali di tutti i sedimenti	61

4.11 Analisi qualitativa della composizione dei sedimenti	62
4.12 Time-lapse	65
4.13 Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)	66
4.14 Analisi sedimenti con diffrattometro	70
5. DISCUSSIONI.....	71
6. CONCLUSIONI	85
7 APPENDICE:	87
7.1 Protocollo di inclusione	87
BIBLIOGRAFIA	91

1. INTRODUZIONE

1.1 Mare Adriatico

Il mare Adriatico è considerato un bacino diviso in 3 settori (settentrionale, centrale e meridionale); si estende per circa 800 km in direzione NW -SE. Il bacino settentrionale (Laguna di Venezia – transetto di Ancona) risente della presenza dei fiumi che trasportano in mare una grande quantità di sedimenti e nutrienti, per cui presenta prevalentemente fondi incoerenti con profondità media di 35 m ed acque eutrofiche. Il bacino del medio Adriatico, che da Ancona giunge sino al traverso dell'isola di Pianosa, presenta una profondità media più elevata ed è caratterizzata dalla presenza della fossa medio adriatica "Fossa di Pomo" che raggiunge i 250 m di profondità.

Il bacino meridionale presenta caratteristiche ecologiche del tutto peculiari che lo differenziano nettamente dal restante bacino Adriatico; le sue acque, a causa dell'assenza di rilevanti apporti fluviali, si presentano particolarmente trasparenti e povere di nutrienti.

La sedimentazione attuale dell'Adriatico è legata principalmente agli apporti fluviali, al regime di correnti marine e al moto ondoso. Il Po è una delle fonti principali di sedimento per l'Adriatico, durante l'anno esso presenta due momenti di massimo apporto: in autunno, a causa di un aumento delle precipitazioni e in primavera in coincidenza con lo scioglimento della neve

sulle Alpi e sugli Appennini. Risulta quindi evidente come in Adriatico la sedimentazione sia fortemente condizionata dagli apporti del fiume Po i cui sedimenti, prevalentemente fini, vengono distribuiti quasi esclusivamente verso Sud. Si riconoscono quindi due situazioni diverse: a Nord della foce del Po, da costa verso largo, si passa da sabbie costiere direttamente alle sabbie relitte che rappresentano l'ambiente costiero dell'ultimo low-stand glaciale in aree dove la sedimentazione attuale è praticamente assente. A Sud della foce del Po, da costa verso largo, si osserva la normale transizione da sabbie a peliti. Nel bacino settentrionale i sedimenti sono soprattutto calcareo-dolomitici mentre nel bacino medio troviamo sedimenti di natura quarzoso-feldspatico-carbonatico, infine nel bacino meridionale vi è prevalenza di sedimenti carbonatici con locali arricchimenti in minerali pesanti vulcanici. In prossimità del promontorio del Conero, l'azione radiale delle plume dei fiumi appenninici interferisce stagionalmente con il trasporto longitudinale dei sedimenti da parte delle correnti marine, di conseguenza, si origina una serie di fasce di sedimenti distribuiti in modo parallelo alla linea di costa con composizione variabile. (Fonti e De Lucia, Arpae)

Caratteristica fondamentale di questo bacino è una circolazione ciclonica di origine termoalina che confina le acque a bassa salinità di origine fluviale sul lato occidentale del bacino (Malanotte-Rizzoli e Bergamasco, 1983); inoltre,

tale circolazione contribuisce a dividere in tre masse d'acqua l'Adriatico: 1) mixed – layer superficiale 2) LIW, Levantine intermediate water layer e 3) bottom-water. Questa stratificazione è maggiormente evidente in primavera estate mentre in inverno l'assenza del termoclino rende la temperatura e densità dell'acqua più omogenee. L'Adriatico settentrionale è considerata la più grande piattaforma ombrosa del Mediterraneo, il che porta a basse temperature invernali (7 °C) e stratificazione verticale in estate, l'input di acque fredde lo rende uno dei bacini più produttivi e anche maggiormente sfruttati del Mediterraneo. Ospita circa il 49 % della diversità del Mediterraneo; in particolare, proprio la zona settentrionale mostra un alto livello di endemismi dovuto probabilmente all'alta peculiarità delle condizioni ambientali, come l'essere isolato e ricco di nutrienti per tutti i livelli trofici. Qui gli organismi bentonici, come le spugne, raggiungono grandi dimensioni e abbondanze, il che sembra dovuto agli alti tassi di produttività (Di Camillo e Cerrano 2015).

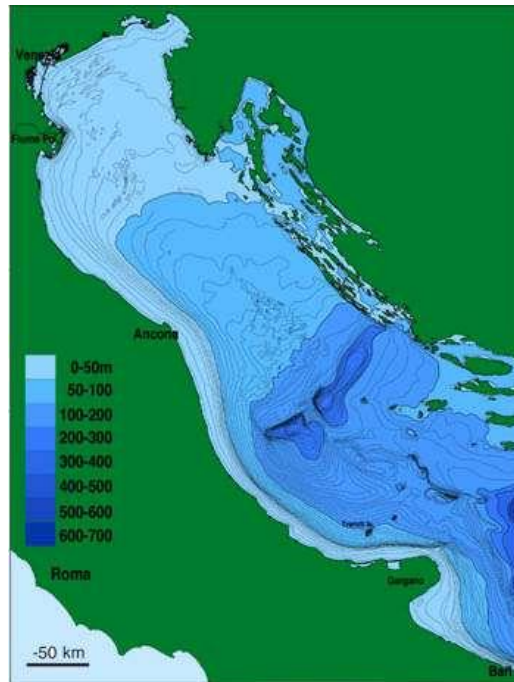


Figura 1.1: batimetria Mare Adriatico

Questi organismi risultano spesso influenzati dalla dinamica dei sedimenti. In particolare si sono riscontrati, in *Chondrosia reniformis* picchi massimi di accumulo di sedimenti in autunno (periodo di maggiori precipitazioni) e in primavera (periodo di piena da disgelo) (Cattaneo et al.,2003). Tra gli organismi bentonici che occupano questo bacino le spugne sono metazoi fondamentali per la tridimensionalità del substrato e il ricircolo di minerali. Questo studio si è concentrato su una delle spugne più comuni lungo la Riviera del Conero ovvero *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847 appartenente alla classe Demospongiae (ordine Chondrosiida). (Fig.1.1.2)

“L’essere singolare, sul quale interesse la cortese vostra attenzione, e tra il novero di quelli, su cui natura sembra abbia voluto stendere più fitto il suo velo, per cimentare maggiormente la curiosità di coloro che più anelano penetrare nell’ intimo de’ suoi secreti. E esso non è raro nel nostro Adriatico, e si conosce dai pescatori col nome di Carnitine, de mar o con quello di Rognon de mar, confondendosi con varie specie di Ascidie, composte, colle quali ha rassomiglianza, ed in cui unione spesse volte si pesca”. Nardo, (1847)



Figura 1.1.2: *Chondrosia reniformis*, Passetto (AN)

Chondrosia reniformis è una spugna massiva dalla caratteristica forma a rene, composta da uno o più cuscini tondeggianti collegati tra loro. Il colore varia dal bianco al marrone, spesso assume una tipica colorazione a macchie. La superficie è lucida, al tatto liscia. Ha una struttura leucon, (Fig.1.1.3) ovvero

una serie di canali che aumentano la capacità di assorbimento e l'efficienza dell'intera struttura. L'acqua entra nel corpo della spugna tramite piccoli pori formati da cellule specifiche chiamate porociti che sono attraversati da un minuscolo canale per il passaggio dell'acqua che viene trasportata all'interno delle camere coanocitiche, dove sono alloggiati i coanociti, (fig.1.1.3), ovvero cellule caratterizzate da un lungo flagello, circondato da un collare di microvilli, il cui battito causa la corrente di ingresso tramite i pori. I coanociti sono cellule specializzate adibite alla cattura delle particelle alimentari (compresi microrganismi vivi). L'acqua viene escreta tramite aperture chiamate osculi di maggiori dimensioni rispetto agli osti. (Trainito e Baldasconi,2014)

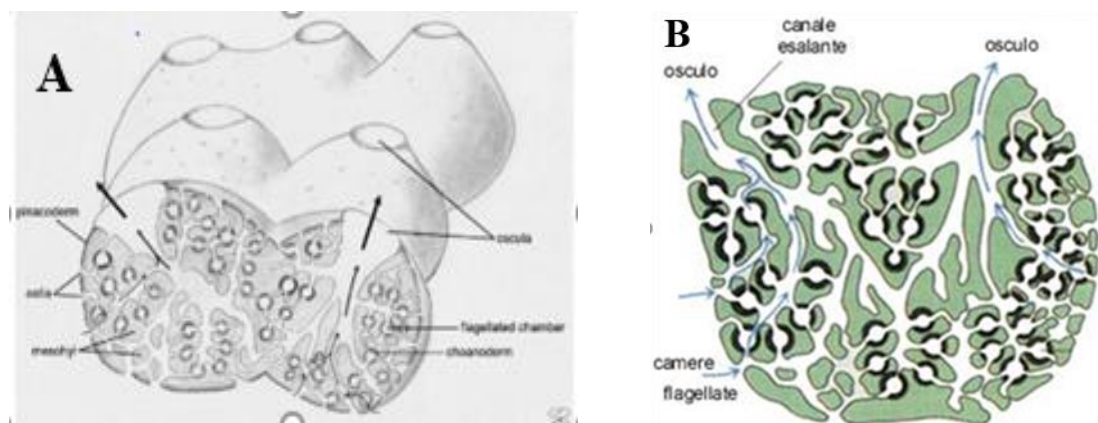


Figura 1.1.3: struttura leucon poriferi (A); dettaglio della struttura interna di Demospongiae (B)

In sezione trasversale sono evidenti tre regioni: quella corticale detta ectosoma, quella interna detta coanosoma e una intermedia detta mesoilo, quest'ultima include cellule mobili e materiale scheletrico. L'ectosoma è collaginoso e

rafforzato dalla presenza di granuli di sabbia e spicole esogene, attivamente incorporate dalla spugna. *Chondrosia reniformis* ha una consistenza gommosa, data dalle fibre di spongina proteina del collagene, più concentrate nel cortex. Vive tra le alghe, nel coralligeno in grotte. E' tipica del Mediterraneo, Atlantico fino alla Groenlandia e Islanda a nord e fino all'Amazzonia e al Golfo di Guinea a sud. Le spugne grazie alla loro filtrazione/alimentazione sono fondamentali nella catena alimentare, regolano direttamente la produzione primaria e indirettamente quella secondaria. Inoltre, essendo una spugna silicea ha un ruolo fondamentale nel riciclo e conservazione del Silicio.

1.2 Ciclo vitale di *Chondrosia reniformis*

La riproduzione asessuata della spugna mostra un picco in autunno mentre diminuisce in primavera estate. In estate sono prodotti i propaguli che sono gli elementi riproduttivi per un ciclo asessuato che prevede la formazione di filamenti di collagene, (Fig.1.2.1) anche molto lunghi che colano piano verso il basso finché si staccano e precipitano per gravità sul fondo. I propaguli potrebbero essere trasportati dal moto ondoso e potrebbero aderire ad un nuovo substrato. La formazione di questi filamenti è correlata alla forza di gravità (Bonosaro et al., 2001); in genere, le porzioni che si staccano con maggiore facilità sono quelle colonizzate da qualche altro organismo: il peso degli

epibionti favorisce l'allungamento e successivamente il distacco di parti di spugna.



Figura 1.2.1: riproduzione asessuata di *Chondrosia reniformis*, Portoselvaggio (LE)

Per quanto riguarda il ciclo sessuato vi è una produzione di oociti continua che evidenzia una maggiore intensità in agosto, seguita dal rilascio dei gameti (spawning) e la formazione di nuovi individui. Esperimenti con campioni provenienti dal nord adriatico hanno riscontrato concentrazioni di oociti più alte rispetto ai campioni della Puglia, grazie alla maggiore presenza, ad esempio di fitoplancton.

1.3 Biomineralizzazione e incorporazione sedimenti

Il processo di biomineralizzazione sembra avere origine tra gli eucarioti circa 570 milioni di anni fa (Cambriano) quando gli organismi viventi iniziano ad utilizzare minerali presenti negli oceani formando scheletri mineralizzati. Questo straordinario processo, che spesso porta a parlare di esplosione del Cambriano, rappresenta un punto fondamentale per la formazione di complessi geochimici integrati tra biosfera, idrosfera e litosfera.

Per la costruzione del loro scheletro, diverse demosponge utilizzano materiali estranei come granelli di sabbia, melma e altre particelle formando spicole sia silicee che calcaree. (Sollas, 1908; Shaw, 1927; Sara & Vacelet, 1973). Questo fenomeno sembra essere tipico proprio delle spugne: in quanto, anche se molti altri organismi utilizzano sostanze esterne per costruire teche e altre strutture, le spugne sono gli unici organismi che le incorporano al loro interno modificando anche la propria morfogenesi in funzione di queste sostanze. Il corpo della spugna è di un materiale composito: tessuto organico (spongina) e scheletro inorganico (spicole o materiale estraneo incorporato). La diversa proporzione dei due materiali influenzerà le proprietà del corpo spugnoso: la spongina la renderà più elastica, lo scheletro inorganico più dura e più resistente a pressione e forze fisiche.

In particolare, *Chondrosia reniformis* è stata spesso utilizzata come modello per studiare l'incorporazione di sostanze estranee. E' infatti evidente una polarità della spugna che sembra riuscire a selezionare differenti minerali tra ectosomi superiori ed inferiori (Bavestrello et al.,1998). Incorporare sedimenti sulla superficie esterna, negli ectosomi è utile in molte spugne per creare un'armatura che ne favorisca la protezione o in caso di spugne che vivono nell'intertidale limitare il disseccamento.

In *Chondrosia reniformis* la scelta del minerale dell'ectosoma superiore può essere attivata dall'adesione della spugna stessa al substrato. Se è ancorata la parte superiore raccoglie quarzo e silicati mentre il lato inferiore inghiottisce le particelle calcaree, aiutando così la spugna a vincolarsi al substrato. Questo comportamento è in relazione anche, alla riproduzione asessuata, infatti spugne che vivono in grotte o zone pendenti producono dei filamenti che una volta rotti (Gain et al., 1995) cadono e devono attaccarsi rapidamente al suolo indipendentemente dal lato dell'ectosoma che entra in contatto con il substrato. Questo comportamento indica, non solo che i recettori minerali sono distribuiti uniformemente sulla superficie della spugna, ma anche che questi recettori possono essere attivati o disattivati in condizioni particolari da un interruttore ambientale. (Bavestrello et al., 1998)

Quando non ancorata, la spugna non seleziona tra silice e carbonato, incorpora sedimento come le spugne che vivono su substrati morbidi, la sua priorità è la stabilizzazione e la formazione di una nuova polarità. In conclusione, l'uso dei sedimenti dipende dall' habitat delle specie e può essere selettiva (quando le spugne sono stabili sul substrato) o meno (quando le spugne non sono stabili). Inoltre la composizione mineralogica delle particelle può influenzare la crescita della spugna; in particolare il quarzo che, a seconda della specie, può migliorare o limitare questo processo. Questo straordinario comportamento è difficile da spiegare, sembrerebbe poter essere legato al fatto che l'assorbimento e la successiva dissoluzione del quarzo stimoli la produzione di collagene, essendo l'espressione del gene per il collagene indotto in base alle concentrazioni di silice, ma per ora rimane un'ipotesi (Bavestrello et al.,2003).

Un altro fattore che interviene sull'incorporazione di materia inorganica è sicuramente la turbolenza dell'acqua. Alcuni esperimenti condotti nel 2000 in Liguria (Cerrano et al.,1999), avevano dimostrato l'importanza di ciò; analizzando due zone: una di forte sedimentazione e l'altra soggetta a rimescolamento. Campionando a diverse profondità, si è osservato che gli alti tassi di sedimentazione in condizioni di mare calmo, favoriscono l'incorporazione in *C. reniformis*, allo stesso tempo il moto ondoso ad alte profondità favorisce un rimescolamento che aumenta la possibilità di

incorporare sedimenti e quindi minerali. Le specie più superficiali, generalmente hanno un tasso di incorporazione minore, proprio perché soggette a maggior idrodinamismo. Inoltre, è stato osservato come in *Chondrosia* e in altre demospongiae ci sia un meccanismo di traslocazione delle particelle dalla membrana esterna a strutture interne dove sono inghiottite. Infine, sembra che la spugna abbia un meccanismo attivo per quanto riguarda la scelta del minerale da incorporare, mentre al contrario vi sia un meccanismo passivo per la dimensione delle particelle incorporate. Se i sedimenti incorporati sono di natura grossolana allora si tratta di specie non sessili.

Il meccanismo di incorporazione vero e proprio è particolare in quanto le particelle sono trasferite in una specifica zona degli ectosomi, qui vengono rapidamente digerite e la dimensione delle particelle rielaborata. L'uptake è influenzato sia dalla viscosità della superficie della spugna che dall'intensità delle correnti d'acqua. Dopo l'incorporazione una caratteristica fondamentale è la capacità, della spugna, di liberare silicio disciolto, favorendone il turn-over importante per molti altri organismi come il fitoplancton (Cerrano et al., 1999). Un'altra caratteristica interessante è l'incorporazione di silice amorfa, sotto forma di spicole di altre demospongiae, le quali non vengono degradate ma sono mantenute all'interno di *Chondrosia reniformis* per rafforzarla. Questo sembra avvenire sia perché l'erosione causata dall'acido ascorbico è inefficace

su questa forma di silice sia perché *C. reniformis* non possiede silicasi, enzimi che dissolvono specificamente la silice amorfa e sono presenti solo in demospongae in grado di produrre spicole di silice. (Enrilch et al.,2010).

1.4 Struttura e importanza del collagene

Il collagene è una proteina strutturale comune, presente in molti sistemi viventi. È ormai noto che i collageni sono fondamentali per l'integrità strutturale e biomeccanica dei vari tessuti, matrici extracellulari, di Metazoi come spugne di vetro e cornee, ossa e tendini di vertebrati e invertebrati. Il collagene è un sistema che mostra un ampio grado di polimorfismo perché le sue molecole possono formare una varietà di diverse strutture. Ogni tipo è costituito da triplo filamento, il cosiddetto tropocollagene. Dai primi animali multicellulari (le spugne di vetro) agli umani compaiono solo due tipi di collagene, cioè il fibrillare e il collagene della membrana basale.

In *Chondrosia reniformis* il collagene è stato molto studiato fin dal 1970 a causa delle sue diverse forme (tipo IV, fibrillare e non fibrillare) e per le proprietà ecofisiologiche come la resistenza ad attività enzimatiche di degradazione e le proprietà meccaniche dello stesso ordine della cartilagine nasale di bovini (secondo la visione moderna, solo la presenza del gene del collagene IV era correlato con l'emergere di membrane basali negli animali: nel caso di collagene fibrillare condizioni specifiche inducono la disposizione

laterale delle molecole di quest'ultimo che porta all'autoassemblaggio di super eliche destrose fibrillari, a volte mostrando regioni alternate di diversa densità (Periodo D) lungo l'asse longitudinale.

Per quanto riguarda il collagene che forma la membrana basale è estremamente antico. Le reti di quest'ultimo hanno un'architettura poligonale che forma, per l'appunto, le membrane basali con una resistenza alla trazione sufficiente a proteggere i tessuti dallo stress meccanico. Il collagene inoltre serve come importante regolatore degli eventi dinamici associati all'adesione cellulare, alla segnalazione e sopravvivenza.

I fasci fibrillari, formati dall'associazione di diverse centinaia di fibrille di collagene, sono stati osservati in diverse specie dei generi *Tethya*, *Chondrosia*, *Chondrilla*, *Jaspis* e *Suberites*. Questi fasci densamente fitti di fibrille di collagene sono secreti esclusivamente da cellule lofocitarie altamente polarizzate.

Il collagene presente nel corpo di *Chondrosia*, a seguito di stress meccanici continui, si modifica diventando lentamente più piatto e scivoloso, allungandosi fino a diventare un filo sottile per evitare la compressione. Questo comportamento è utilizzato per lo studio di stress meccanici come fattori morfogenetici. Sebbene la nanomorfologia di *C. reniformis* abbia permesso di analizzare le fibrille di collagene, diversi meccanismi restano ancora poco

chiari come la relazione tra le caratteristiche ultrastrutturali di questo collagene, la sua meccanica e le proprietà fisico-chimiche. Tuttavia la possibilità di applicazione del collagene fibrillare di *Chondrosia* come modello organico per la silicizzazione in vitro è stata confermata in diversi studi. (Heinemann et al., 2007). Questo processo prevede la sostituzione di atomi di C con atomi di Si, il che contribuisce a rendere i materiali molto più resistenti. Inoltre il collagene di *Chondrosia* è risultato idoneo per la formazione di bioceramiche usate a livello biomedico o di composti come lo xerogel, (Heinemann, et al.,2007), composto inerte in grado di sequestrare ed eliminare dall'organismo tossine, sostanze nocive, agenti patogeni ed allergeni presenti nell'intestino e stomaco. In alcune sperimentazioni si è cercato un metodo di estrazione di collagene efficiente. L'estrazione è stata eseguita separatamente per le due diverse regioni delle spugne: l'ectosoma (Ec, lo strato corticale esterno) e il coanosoma (Ch) che costituisce la componente principale della massa della spugna. Estrazioni di collagene sono state eseguite in parallelo al fine di valutare le potenziali differenze nelle caratteristiche degli idrogel dato che il collagene di tipo IV è più abbondante nell'ectosoma che nel coanosoma.

In *Chondrosia reniformis* la biosintesi del collagene è favorita dalla presenza dell'acido ascorbico (AA) che è coinvolto come coenzima nell'idrossilazione di prolina e lisina.

Inoltre, l'AA gioca un ruolo nella dissoluzione del quarzo che a sua volta ha effetti positivi sulla produzione di collagene (Ehrlich, 2010).

L'AA potrebbe anche avere un ruolo nel mantenere stabile il ferro ferroso (Fe^{2+}) (Plug et al. 1984) che sembrerebbe promuovere la formazione di osculi nelle spugne (Osinga e Kotterman, 2007)

1.5 Relazioni simbiotiche con diatomee

Le spugne sono in grado di creare molte relazioni simbiotiche con metazoi ma anche batteri e alghe unicellulari (Chromista). L'ospite può ottenere carbonio e azoto dal simbionte, mentre le alghe unicellulari sfruttano i cataboliti dell'ospite, ottengono protezione da erbivori, da radiazioni ultraviolette e sono maggiormente disperse grazie alla frammentazione (Ávila et al. 2007; Rützler 1990; Wilkinson e Fay, 1979). Le spugne possono contribuire ad aumentare la produttività primaria specialmente in ecosistemi oligotrofici (Steindler et al. 2002; Wilkinson 1983). Devy et al. hanno ipotizzato che la scarsità di nutrienti in particolare la mancanza di nitrogeno, fondamentale per le alghe sia ovviata dall'attività catalitica delle spugne. L'analisi di alcuni campioni, prelevati tra maggio 2010 e 2011 presso lo "Scoglio del Trave", Riviera del Conero, hanno evidenziato la presenza di diatomee all'interno dello scheletro fibroso di spugne *Dictyoceratide* (Di Camillo et al., 2016). Lo strato superficiale di

Dysidea pallescens (ectosoma) è sottile, trasparente e reticolare (Teragawa 1986); inoltre esso è sollevato dal corpo della spugna in diversi punti, permettendo il passaggio della luce. Le fibre di *D. pallescens* sono trasparenti e possono essere attraversate dalla luce, consentendo la crescita delle alghe. Tuttavia, le alghe sopravvivono anche incorporate all'interno del corpo non direttamente raggiunto dalla luce. (Brümmer et al., 2008; Cattaneo-Vietti et al., 1996; Gaino and Sarà ,1994) È possibile che le fibre di collagene agiscano come fibre ottiche multimodali trasportando la luce dalla superficie verso la base della spugna. Anche la presenza di grani di sabbia e spicole estranee potrebbero influenzare la riflessione interna totale, l'assorbimento e la dispersione. (Di Camillo et al., 2017)

Per quanto riguarda le relazioni spugne e diatomee sono state maggiormente studiate le simbiosi tra organismi Antartici. (Cerrano et al., 2004)

Le spugne antartiche indicano che l'abbondanza di diatomee all'interno dei tessuti è legata alla fioritura del Fitoplancton. La prima evidenza ottenuta, analizzando i risultati della sperimentazione, è che la presenza di diatomee nei tessuti spugnosi è un fenomeno stagionale; l'assenza di frustoli all'inizio di novembre indica chiaramente che le diatomee non sono mantenute, durante la stagione invernale all'interno delle spugne. In tutte le specie esaminate i pigmenti clorofilliani mostravano i valori più alti nella seconda metà di

Dicembre, in accordo con l'insorgenza del picco di fitoplancton (Innamorati et al., 2000; Nuccio et al., 2000). Questo picco di clorofilla corrispondeva a una quantità relativamente bassa di frustoli di diatomee che invece aumentava successivamente fino alla seconda metà di gennaio, quando la concentrazione di clorofilla progressivamente diminuiva. Questi dati suggeriscono che le diatomee sono incorporate vive (Gaino et al., 1994; Bavestrello et al., 2000) ma muoiono all'interno dei tessuti di spugna dove l'incorporazione continua di queste alghe causa un progressivo accumulo di frustoli. Questa evidenza suggerisce che le spugne usano le diatomee come fonti trofiche solo durante la stagione estiva e non, come suggerito da Gaino et al. (1994) come cibo riserva per l'inverno oligotrofico australe Cerrano et al., (2004). Inoltre l'assenza di frustoli marcescenti nei tessuti spugnosi ha confermato che le diatomee sono usate come fonte di cibo immediata dalla spugna.

Tra le spugne antartiche, *Mycale acerata* rappresenta una specie molto comune, per via del suo alto tasso di crescita ed efficiente capacità di sfruttare alimenti di dimensioni microscopiche durante l'anno. (Dayton et al., 1974; Kowalke 2000). Durante la XVII Campagna Antartica Italiana in Terra Nova (2001-2002) sono stati raccolti campioni che hanno evidenziato come vengono assimilate le diatomee che prelevate dal fitoplancton presente in colonna

d'acqua prima penetrando nel sistema acquifero inalatorio, si accumulano nella spugna e passano successivamente negli ectosomi e nei coanosomi.

Molti dei dati fino ad ora analizzati suggeriscono un complesso schema di relazioni tra diatomee e spugne antartiche che vanno dal mutualismo al parassitismo, grazie alla mixotrofia delle diatomee che sono in grado di utilizzare lo zucchero accumulato nei tessuti delle spugne, in assenza di luce. Tuttavia alcune domande importanti su tali associazioni rimangono ancora irrisolte. (Cerrano et al.,2004)

Le Diatomee (Regno Protista, Divisione Bacillariophyta, Classe Bacillariophyceae) sono alghe brune, unicellulari, eucariotiche, generalmente delle dimensioni di pochi μm , possono vivere isolate o formare colonie e popolare ambienti diversi sia d'acqua dolce che salata. Sono organismi eucarioti ed autotrofi.

Caratteristica peculiare delle Diatomee è la parete cellulare, detta frustulo, composta principalmente da silice amorfa idrata. Il frustulo è costituito da due valve, la parte superiore (epivalva) e quella inferiore (ipovalva). In alcune forme di Diatomee sul frustulo è presente anche il rafe, una fenditura longitudinale di struttura complessa che si interrompe a formare dei noduli centrali più o meno spessi e visibili a seconda della specie. In base alla simmetria e morfologia del frustulo le Diatomee sono suddivise nei due grandi

ordini: Centrales (Diatomee centriche), a simmetria raggiata, assenza di rafe, forma circolare, ovale, triangolare o quadrata, tipicamente planctoniche, principalmente marine. Pennales (Diatomee pennate), valve a simmetria bilaterale rispetto all'asse longitudinale, frustulo di forma ellittica, bastoncellare o a navetta. Sono bentoniche e colonizzano tutti gli ambienti acquatici.

2. SCOPO DELLA TESI

Come già sottolineato, *C. reniformis* è considerata una specie strutturante che favorisce la tridimensionalità del substrato e, essendo un filtratore, contribuisce al ricircolo di sostanze minerarie, rappresentando una specie chiave nell'ecosistema bentonico della Riviera del Conero. Il processo di incorporazione che la caratterizza la rende un organismo interessante che ha stimolato una serie di domande ed ipotesi; è stata condotta una ricerca di 12 mesi da Dicembre 2018 a Dicembre 2019 con campionamenti mensili e osservazioni sott'acqua dello strato di ricoprimento della spugna. Per la costruzione del collagene questo organismo predilige materiale siliceo (Cerrano et al., 2008) allo stesso tempo incorpora spicole esogene che mantiene al suo interno. *C. reniformis* è stata studiata in diverse aree, ma manca un'analisi dell'incorporazione in un bacino con così alti tassi di sedimentazione come la Riviera del Conero (Mare Adriatico). In questa zona gran parte del

sedimento è trasportato da fiumi come il Po, in alcuni periodi dell'anno gli input fluviali uniti alle piogge provocano un abbassamento della salinità e particolari blooms fitoplanctonici.

Gli obiettivi principali di questo lavoro sono stati sia quello di analizzare il comportamento di incorporazione di *C. reniformis* e in più quello di fornire ulteriori informazioni riguardanti l'interazione tra componente minerale e organismi marini paragonando sia sedimenti ambientali che quelli incorporati da *C. reniformis*

Tabella 1.1

Issues	Objectives	Research questions	Hypothesis	N.	Methods
<p>The North Adriatic Sea is a basin characterised by high productivity, with rates comparable to those of North seas. River dynamics strongly affect this area due to organic load, sediments and freshwater inputs. After periods of intense rain, salinity could be very low and anomalous and dense phytoplanktonic blooms occur along the coast. Benthic organisms living here are likely adapted to exploit these irregular supply of matter. The sponge <i>Chondrosia reniformis</i> (one of the species reaching higher biomass here and able to filter over $300 \text{ L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{m}^{-1}$) is a good model to study incorporation of sediments and to investigate a possible relationships with benthic microalgae.</p>	<p>To analyse the ecological behavior of <i>Chondrosia reniformis</i> regarding sediment selection and incorporation</p>	<p>How <i>Chondrosia reniformis</i> could be a model to study interactions between sediments and marine benthic organisms? Which aspects of sediment incorporation should be considered?</p>	<p>Concentrations, quality and granulometry of embedded particles vary over time in relation to fluctuations of physical parameters such as water movement and sediment load</p>	1	<p>Periodic (monthly) sampling conducted all year round; preparation of sponge dissociates; determination of the concentration and granulometry of embedded particles; analysis of environmental sediments; relationships between sediment concentrations and environmental parameters</p>
				2	<p>Sponge rearing; time lapse of embedding process with different flow conditions; subministration of different particles</p>
			3	<p>Method (1) repeated examining two different sponge layers: external ectosome and choanosome</p>	
	<p>To contribute adding information about interaction between mineral and living components by comparing ambient sediments with sediments embedded by <i>Chondrosia reniformis</i>.</p>	<p>How is the sediment selection in an area with high sedimentation rates such as the Rivera del Conero? What are differences between Conero and other Mediterranean areas?</p>	<p>Quantity and quality of embedded particles change in sponges from different localities</p>	5	<p>Comparison between sponges collected once in different localities (Apulia and Aeolian Archipelago) by applying method (1)</p>
					<p>How could <i>Chondrosia reniformis</i> exploit diatoms? (as a possible source of silica, even if amorphous, or as food?)</p>

La ricerca è iniziata chiedendosi come *C. reniformis* selezioni i vari sedimenti minerali e se il processo di incorporazione di quest'ultimi sia un comportamento continuo o meno, come *Chondrosia reniformis* possa essere utilizzata come modello per lo studio dell'interazione tra sedimento e organismi bentonici? Quali caratteristiche del sedimento incorporato devono essere prese in considerazione? *Chondrosia reniformis* come seleziona il sedimento in un bacino con alti tassi di sedimentazione come quello della Riviera del Conero? Quali sono le differenze di selezione tra Riviera del Conero e altri bacini del Mediterraneo?

In un secondo tempo si è cercato di completare la ricerca studiando la potenziale biomineralogia della spugna ovvero l'utilizzo di diatomee per formazione del collagene, cercando di identificare affinità e differenze con il resto delle composizioni esogene che la spugna incorpora come sedimento e le spicole.

Le ipotesi elaborate sono state:

- 1) Concentrazione e granulometria del sedimento sono differenti tra ectosoma ed coanosoma;
- 2) La quantità e qualità delle particelle incorporate si modificano nel tempo in funzione del moto ondoso;
- 3) Quantità e qualità dei sedimenti variano in spugne di differenti aree;

4) Durante blooms fitoplanctonici *Chondrosia reniformis* incorpora diatomee utilizzandole anche come fonte di silice e/o trofica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamenti

I campioni di *Chondrosia* sono stati prelevati mensilmente da gennaio 2018 a gennaio 2019 lungo la Riviera del Conero (Fig.3.1.1) in immersione (ARA). Nel medesimo sito, le spugne sono state fotografate per mezzo di una fotocamera Canon Ixus munita di custodia subacquea.

A causa delle condizioni meteomarine, non è stato possibile effettuare campionamenti nei mesi di Febbraio e Marzo 2018. L'area di campionamento scelta rientra nel territorio della Riviera del Conero, (Fig.3.1.2) più precisamente l'area antistante la spiaggia del "Passetto".



Figura 3.1.1: campionamento di sedimento sopra *Chondrosia reniformis*



Figura 3.1.2: area di campionamento, Passetto

I campionamenti sono stati svolti tra i 5 e i 7 metri di profondità, su parete rocciosa. Il prelievo dei campioni è avvenuto secondo il seguente schema sperimentale: raccolta multipla di frammenti di *Chondrosia*, 5 carotaggi (utilizzando carotatore metallico di 2 cm di diametro) da 5 differenti spugne campionate in modo casuale nell'area marina sopra indicata. Successivamente i frammenti di spugna sono stati raccolti in 5 falcon differenti. Durante il campionamento, sono state utilizzate siringhe da 50ml (Fig.3.1.3) per prelevare il sedimento sopra l'ectosoma di ciascuna spugna e siringhe da 20 ml (Fig.3.1.4) per prelevare sedimento presente nel sistema acquifero. Infine, durante ogni campionamento è stato raccolto sedimento ambientale, ovvero sedimento del substrato marino circostante le spugne campionate, anche in questo caso sono state utilizzate una siringa da 50ml.

Le siringhe sono state costruite dapprima togliendo l'ago e incastrando sulla punta un tubo in plastica del diametro di pochi mm, in modo che si inserisse

perfettamente nella parte apicale della siringa la quale veniva chiusa con una eppendorf, riempita di sabbia in modo da evitarne il galleggiamento.



Figura 3.1.4: siringa da 50 ml per prelevare sedimento ambientale e sedimento depositato sopra ectoderma



Figura 3.1.3: siringa da 20 ml per prelevare sedimento all'interno del corpo acquifero

Per rendere più pratico il campionamento è stato legato un lato di un elastico alla base delle siringhe e l'altro lato a una eppendorf, riempita con sabbia. Infine le Siringa da 50ml quella da 20ml e la falcon venivano poi poste in un sacchetto numerato (fig.3.1.5), in modo da non confondere le varie ripetizioni tra loro. In laboratorio veniva conservato il tutto in alcool 70°.



Figura 3.1.5: da sinistra falcon, siringa 20ml, siringa 50ml

3.2 Analisi in laboratorio

Per ogni replica la spugna è stata sezionata dividendo ectosoma da coanosoma è stato scelto un peso standard di circa 1 g per entrambi i tessuti, pesato all'interno di provette previamente tarate. Successivamente ad ogni provetta è stato aggiunto perossido di idrogeno 30°, le provette sono state lasciate 1 notte in stufa a 60° per far sciogliere la componente organica, una volta ottenuto il pellet sul fondo della provetta, quest'ultime sono state lasciate essiccare su una piastra riscaldata e ripesate, per poter calcolare la percentuale di materia inorganica presente in funzione del peso iniziale dei frammenti di spugna. In una seconda fase è stato attuato lo stesso procedimento sopra citato, ma i tessuti della spugna sono stati sciolti in acido nitrico, in questo modo si può calcolare la percentuale silicea del campione, che è il minerale su cui si è

focalizzata la ricerca relativa all'incorporazione di *Chondrosia reniformis*. Infine con il pellet creatosi dopo il processamento sono stati fatti vetrini da osservare al microscopio ottico. Per l'osservazione quest'ultimi sono stati divisi in 12 campi uguali, per ogni campo è stata scattata una foto e con l'utilizzo del programma di "image j" sono stati contati e misurati i granelli incorporati nell'ectosoma e coanosoma. I campioni di sedimento sono stati trattati in maniera differente, inizialmente una parte di sedimento è stato filtrato su conetti di carta bibula e lasciato seccare, inserito poi in provette previamente tarate e ripesate con il sedimento. Successivamente, sia per il sedimento sopra l'ectosoma delle spugne che per quello ambientale sono state fatti tre vetrini, utilizzando il pellet formatosi dal sedimento sciolto. Quest'ultimo è stato trattato prima in perossido di idrogeno al 30%, lasciato seccare, ripesato e successivamente il pellet rimanente è stato trattato con acido nitrico. Infine è stato fatto un vetrino per ogni campionamento con sedimento non sciolto, in modo da poter fare un'analisi sia quantitativa del numero di granelli presenti nei campioni che qualitativa; il campione non sciolto evidenzierà sia una componente carbonatica che silicea. Infine sempre a livello qualitativo si può osservare la presenza di altri organismi come foraminiferi, frammenti di bivalvi, diatomee. Per riuscire a fare queste analisi ogni vetrino è stato diviso in 12 campi uguali, per ogni campo è stata scattata una fotografia random e

infine grazie all' utilizzo del programma "image j" è stato possibile, non solo contare in modo preciso la quantità di granelli presenti, ma anche misurarne il diametro. Sono stati contati tutti granelli di dimensione misurabile, spesso nel sedimento ambientale e in quello presente sopra l'ectosoma sono stati osservati granelli $< 0.3 \mu\text{m}$, quest'ultimi sono stati esclusi dal conteggio, in quanto le misurazioni non sarebbero state precise. Anche i vetrini del sedimento sopra ectosoma con prevalenza di cristalli non sono stati inclusi nella valutazione quantitativa e dimensionale dei granelli.

La concentrazione di sedimento incorporato da ciascun tessuto è stata calcolata come percentuale di gr di sedimento/gr di spugna \pm SD.

I dati ottenuti sono stati confrontati con le fluttuazioni delle precipitazioni mensili totali da gennaio 2019 a gennaio 2020 (pluviometro 'Ancona Regione') e i livelli medi mensili relativi allo stesso periodo (sensore 'Fiume Esino') (Fonte: Protezione Civile Marche). La consultazione del sito www.mareografico.it ha permesso inoltre di annotare le date in cui si sono registrate le mareggiate di intensità maggiore, mentre dai bollettini ARPAE è stato possibile ottenere i valori di clorofilla a ($\mu\text{gr/L}$) e di salinità della stazione più vicina alla Riviera del Conero (Cattolica).

3.3 Microanalisi dei sedimenti

Per riuscire ad identificare la componente minerale dei sedimenti presenti sull'ectosoma sono state necessarie analisi più specifiche come l'utilizzo del SEM, e del diffrattometro.

Il SEM ovvero il microscopio elettronico utilizza gli elettroni per l'imaging in un modo molto simile a come la microscopia ottica sfrutta i fotoni. La risoluzione di uno strumento di imaging dipende principalmente dalla lunghezza d'onda della particella utilizzata come sonda. Dato che la lunghezza d'onda degli elettroni è più piccola di quella dei fotoni, la risoluzione del microscopio elettronico è superiore rispetto a quella del microscopio ottico di circa 1000 volte. Gli elettroni che vengono respinti dalla zona del campione vicina alla superficie per generare l'immagine. Perché le immagini risultino ben osservabili è necessario fare una doratura del campione che favorisca un contrasto di colore più equilibrato. Il diffrattometro è invece uno strumento che utilizza la diffrazione di raggi X, si basa sullo scattering elastico coerente: il fenomeno macroscopico della diffrazione nasce infatti dalla somma coerente di tutte le onde elettromagnetiche diffuse dagli atomi che si trovano lungo una stessa famiglia di piani reticolari. Per manifestarsi, richiede necessariamente la presenza di un ordine reticolare, come si riscontra nei cristalli, sebbene questo fenomeno possa essere osservato con successo anche nei liquidi utilizzando

uno strumento EDXD (energy dispersion X-ray diffraction) a scansione energetica. La diffrattometria a raggi-X (XRD) è stata utilizzata per determinare le fasi cristalline contenute nei minerali e le componenti principali di cristalli, ottenuti durante lo scioglimento dei campioni.

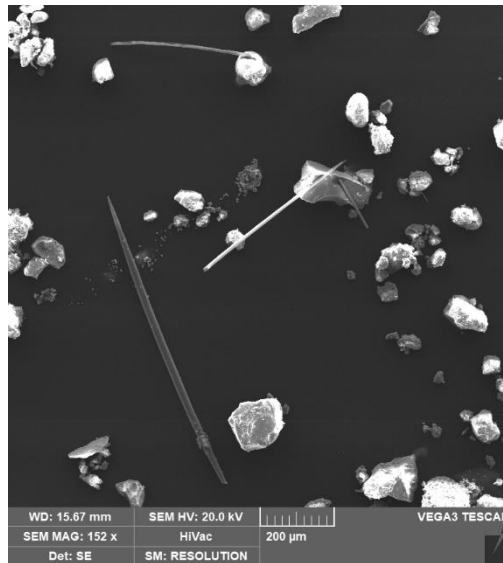


Fig.3.3: fotografia al SEM del sedimento nell' ectosoma

3.4 Osservazione dei processi di incorporazione

Un'altra fase della sperimentazione si è basata sull'osservazione di processi di incorporazione della spugna utilizzando time-lapse una serie di fotografie accelerate scattate automaticamente ogni 10 secondi per 7 ore. Per mantenere il frammento di spugna in una situazione di minor stress è stato costruito un sistema di ricircolo d'acqua chiuso, (Fig.3.4.1) utilizzando 3 vaschette di plastica, 1 tubo di gomma, una pompetta dalla portata da 120 l/h a 320 l/h.

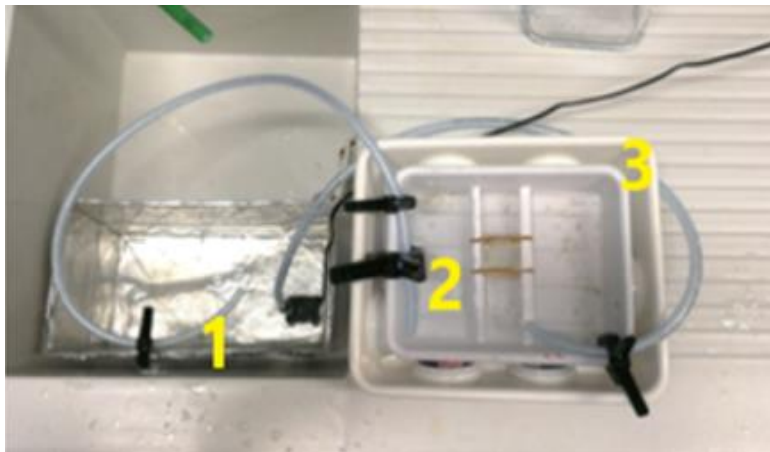


Figura3.4.1: (1) vasca di scarico con all'interno pompetta (2) vasca contenente la spugna (3) vasca di sicurezza



Figura3.4.2:sistema di ricircolo d'acqua con time lapse in funzione

Quest'ultima è stata immersa all'interno di una vasca 1 (Fig. 3.4.1) contenete acqua marina che veniva pompata all'interno della vaschetta 2 (Fig.3.4.1), l'acqua percorreva un dislivello di circa 50 cm contenete il frammento di spugna, sotto quest'ultima vi era un'ulteriore vaschetta di sicurezza 3 (Fig.3.4.1) nella quale è stato inserito il tubo di gomma che scaricava nella vasca 1.

Questo piccolo sistema di ricircolo ha permesso maggiore ossigenazione dell'acqua ed evitato il ristagno (Fig.3.4.2) L'acqua doveva mantenere una temperatura bassa di circa 18 °C per non creare alterazioni nella struttura e integrità dei frammenti di Chondrosia. Una volta creata questa strumentazione

è stata sezionata una parte di ectosoma della spugna posizionata su un vetrino e immersa nella vaschetta 2, successivamente sono stati pipettati alcuni granelli di silice, sedimento organico, diatomee sulla superficie della *Chondrosia* e una volta trovata l'inquadratura corretta e il fuoco veniva fatto partire il time-lapse. Questa serie di foto accelerate sono state fatte grazie all'utilizzo di una macchina fotografica Nikon posizionabile sullo stereomicroscopio (Fig.3.4.2) Infine altre prove sono state fatte osservando allo stereomicroscopio diverse sezioni di ectosoma di vari campioni di *Chondrosia* e posizionando sulla superficie delle spugna particelle di ferro, plastiche per osservare la selezione di determinate sostanze da parte della spugna e il possibile rifiuto di altre. Monitorando il cambio conformazionale di quest'ultima scattando fotografie ad intervalli regolari di circa due ore per 8 ore consecutive. Infine sono state fatte inclusioni in resina per osservare l'incorporazione di *Chondrosia*, secondo i passaggi presenti in appendice.

3.5 Ricerca bibliografica

Una vasta ricerca bibliografica è stata condotta sul database Scopus di Elsevier (www.scopus.com) digitando parole chiave nel motore di ricerca selezionando l'opzione "Titolo articolo, Riassunto, Parole chiave. Il tipo di documento scelto nella strategia di ricerca includeva "articolo", "revisione".

Nella prima ricerca le parole chiave utilizzate sono state: “*Chondrosia and reniformis*”.

Nel secondo passaggio, i primi risultati sono stati perfezionati cercando una per volta, le parole “collagene”, “incorporation” “reproduction”, “diatoms” tra gli articoli ottenuti con la prima ricerca. In seguito sono stati selezionati gli articoli leggendo i titoli e gli abstract ed escludere gli articoli irrilevanti per il nostro obiettivo. Nel quarto e ultimo passaggio, gli articoli rimanenti sono stati accuratamente selezionati e divisi per temi e aree geografiche.

4 RISULTATI

4.1 Analisi bibliografica

Con la prima ricerca, *Chondrosia reniformis*, sono stati trovati 69 articoli 14 per ‘collagene’, 30 per ‘incorporazione’, 5 per ‘riproduzione’, 20 per ‘comportamento’. La selezione degli articoli è stata ulteriormente perfezionata leggendo almeno il titolo e l'abstract. Gli articoli che non erano pertinenti con il nostro obiettivo non sono stati presi in considerazione. I grafici seguenti illustreranno le distribuzioni temporali e geografiche degli articoli considerati; tutti i dettagli degli articoli (anno di pubblicazione, autori, titolo, DOI, metodologie applicate, specie di indicatori e frequenza di campionamento) sono disponibili come materiale supplementare.

Per quanto riguarda la distribuzione temporale degli studi selezionati La Figura 4.1 (C) mostra gli studi negli anni. I 2 articoli più antichi trovati risalgono prima del 2000 (1975 e 1995). 7 articoli sono stati pubblicati tra il 1996-1999, 2 tra 2000-2003, 4 tra 2004-2007, 1 tra 2008-2011, 7 tra 2012-2015 e 8 tra 2016-2019.

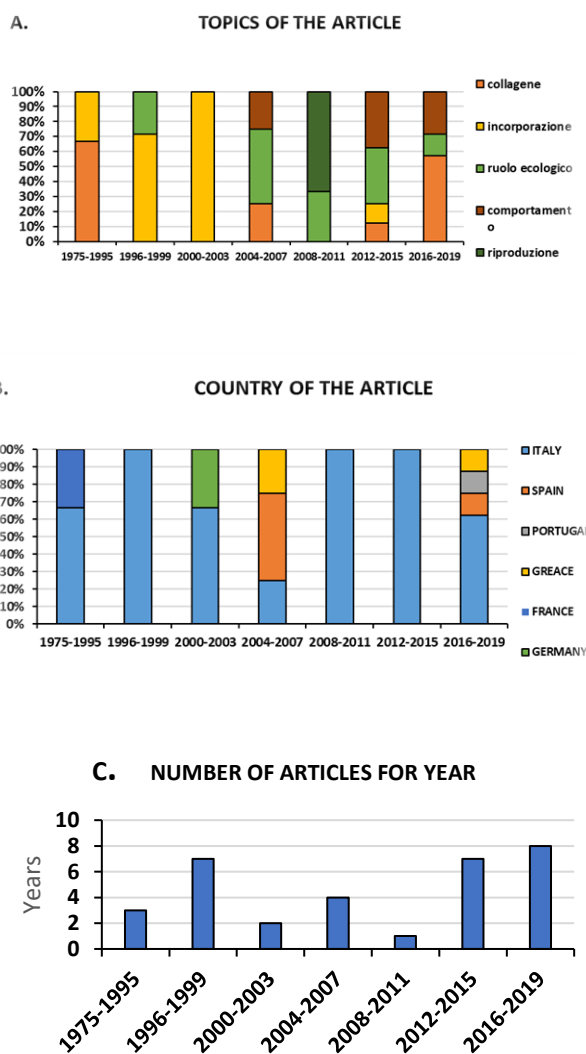


Figura 4.1: (A) Temi di indagine negli anni. (B) distribuzione geografica degli articoli (C) Distribuzione degli articoli negli anni

4.2 Confronto tra sedimenti inorganici totali e silicei

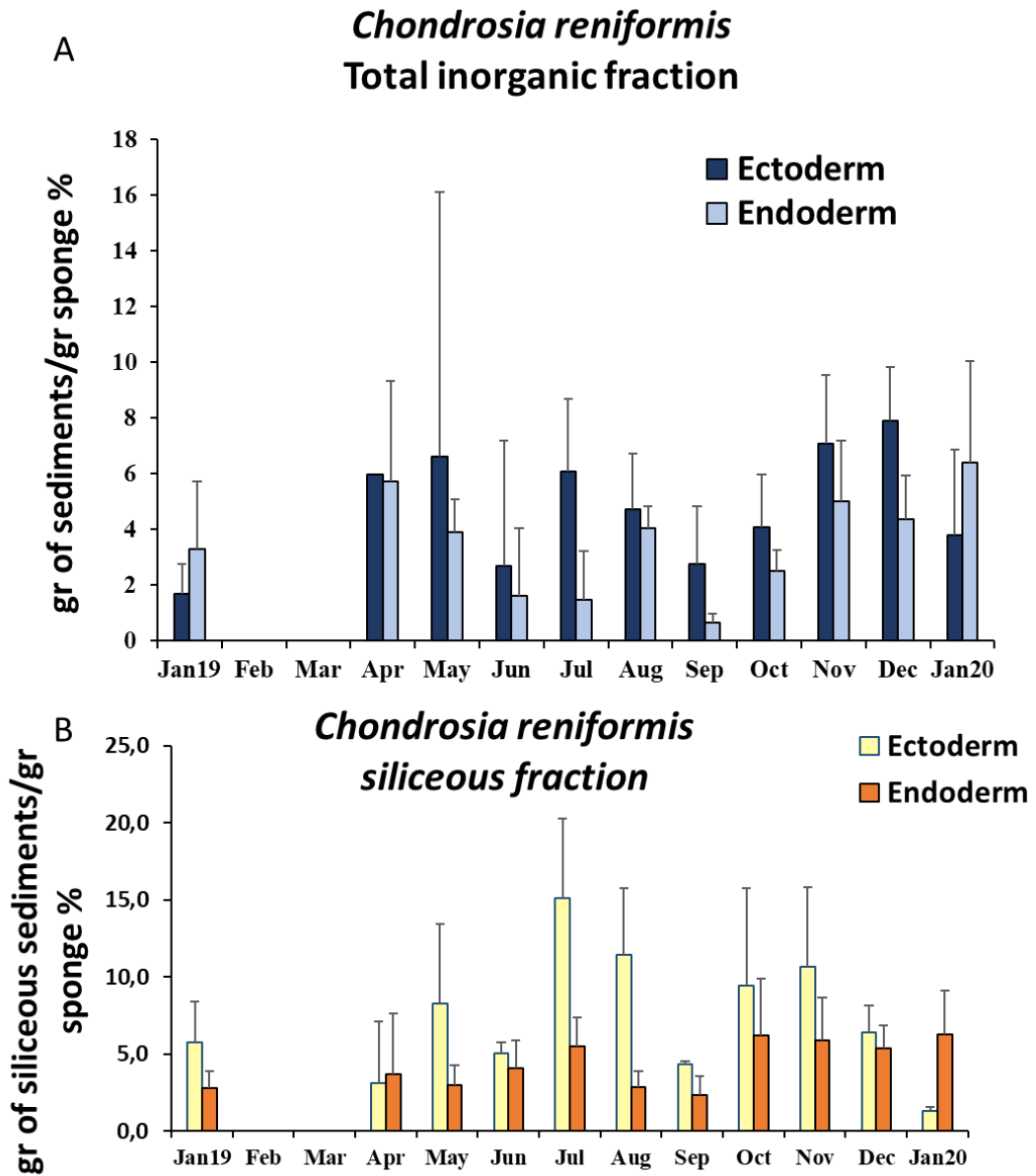


Fig.4.2: frazione inorganica presente in ectosoma ed coanosoma (A). Frazione silicea in ectosoma ed coanosoma (B).

Dal grafico (Fig.4.2 A) risulta evidente come la percentuale di sedimento (frazione inorganica totale) sia nettamente superiore nell' ectosoma rispetto all'coanosoma. Questa differenza tra il 2 e 4% è maggiormente evidente nei mesi di maggio, luglio, agosto, novembre e dicembre; al contrario risulta molto inferiore nel mese di aprile. Nell'ectosoma i valori variano da meno di 1% a 25% e nell'coanosoma da meno di 1% a 23%.

L'eccezione è evidente sia a gennaio 2019 che a gennaio 2020, infatti vi è una chiara inversione di tendenza, ovvero la percentuale inorganica appare maggiore nell' coanosoma (gennaio 2019 la frazione inorganica corrisponde a un 3%, a gennaio 2020 questa stessa frazione rappresenta il 7%), mentre rispettivamente nell'ectosoma di gennaio 2019 la percentuale di frazione inorganica è 1% mentre a gennaio 2020 tale frazione risulta essere circa 4%. La percentuale maggiore di frazione inorganica è rappresentata dalla frazione nell'ectosoma di dicembre (8%) mentre, quella minore, dall'coanosoma di settembre (0.5%). Quindi, dall'analisi statistica di questo andamento, i valori osservati variano nel tempo in modo significativo (Ectosoma: $H=20.81$, $p<0.05$; coanosoma: $H=27.5$, $p<0.05$).

Per quanto riguarda la frazione silicea (Fig.4.2 B), le variazioni sono significative solo per i valori dell'ectosoma ($H=16.9$, $p<0.05$) i valori dell'ectosoma variano da 1% di gennaio 2020 fino al 15% a luglio.

L'andamento generale evidenzia una maggior percentuale di frazione silicea nell'ectosoma, le uniche eccezioni sono aprile e gennaio 2020. Discrepanze maggiori tra i due tessuti sono evidenti soprattutto a maggio, luglio, agosto, ottobre e novembre. Al contrario a giugno si nota una differenza molto piccola tra silice dell'coanosoma e dell'ectosoma.

4.3 Parametri ambientali

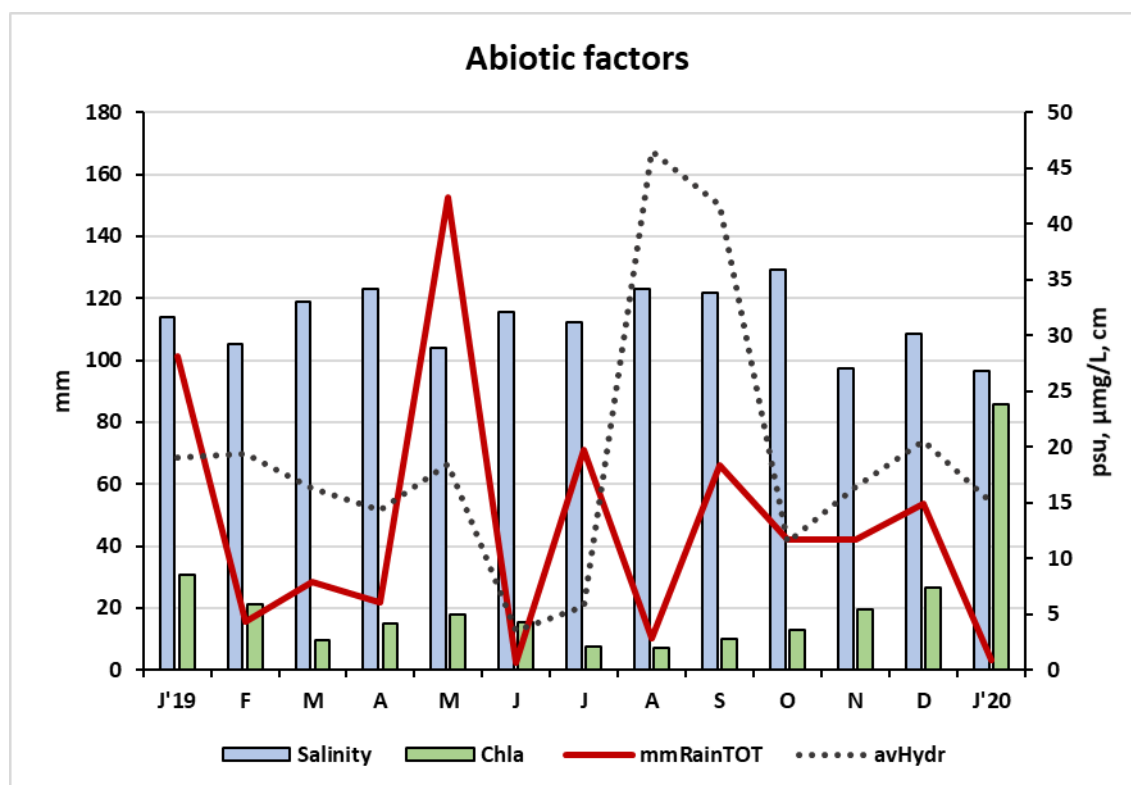


Fig. 4.3. Variazioni parametri ambientali (Dati da ARPAE, Protezione civile Marche)

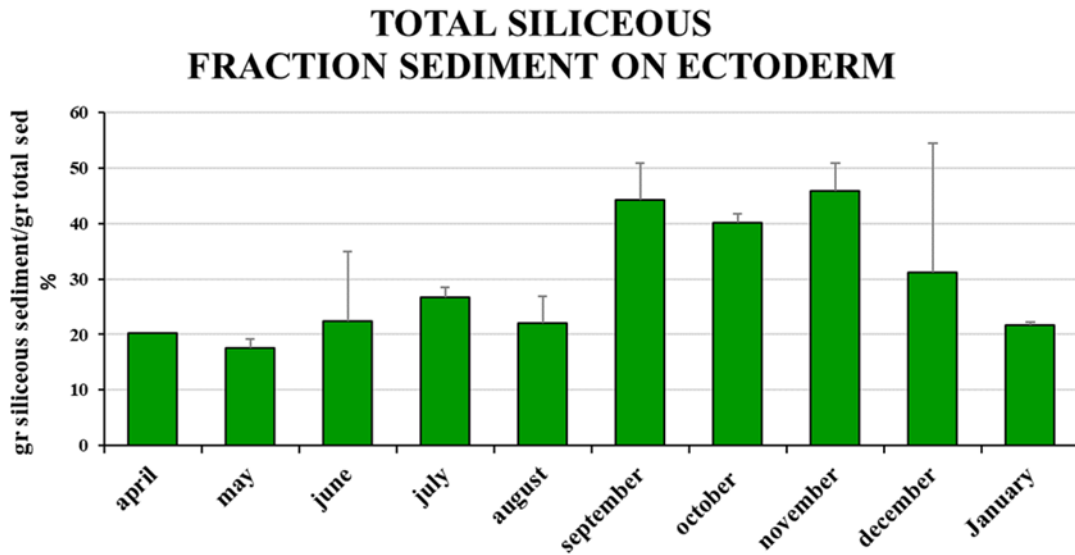
I valori delle concentrazioni di sedimento non mostrano nessuna relazione con i trend dei parametri ambientali considerati. A ogni modo, i valori più bassi di salinità si osservano tra novembre 2019 e gennaio 2020; inoltre, a gennaio la concentrazione di clorofilla è particolarmente elevata rispetto ad altri periodi

dell'anno (Fig. 4.3.). Il mese di maggio è caratterizzato da intense precipitazioni, con oltre 150 mm di pioggia caduta. I livelli idrometrici maggiori si riscontrano ad agosto e settembre.

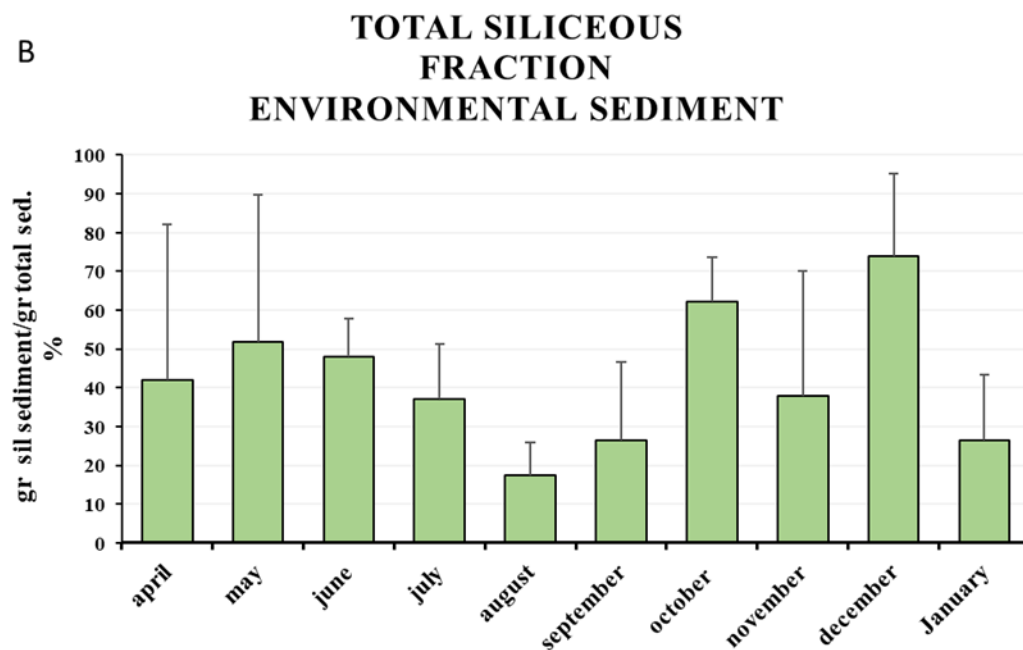
Riguardo al moto ondoso, i campionamenti sono avvenuti durante condizioni di mare calmo che perduravano da almeno una settimana.

4.4 Analisi quantitativa comparativa tra sedimento sopra ectosoma ed ambientale

A



B



a

Fig.4.4: quantificazione della frazione silicea nel sedimento sopra ectosoma (A); e nel sedimento ambientale (B)

Il primo grafico evidenzia come la percentuale di sedimento siliceo sia abbastanza uniforme durante l'anno, con valori compresi tra il 10% e il 20% durante i mesi primaverili ed estivi, a settembre aumentano raggiungendo circa il 50% fino a dicembre, per poi tornare al 20% a gennaio.

Il sedimento ambientale mostra un collasso della percentuale di sedimento siliceo ad agosto, durante il resto dell'anno la percentuale è simile aggirandosi intorno al 50%. I valori più alti sono stati riscontrati a ottobre con il 60% e a novembre con il 70%.

Anche i trend dei sedimenti sull'ectosoma e dei sedimenti ambientali non mostrano correlazione con gli andamenti di precipitazioni, salinità, livelli idrometrici e clorofilla a.

4.5 Confronto tra sedimenti di aree diverse

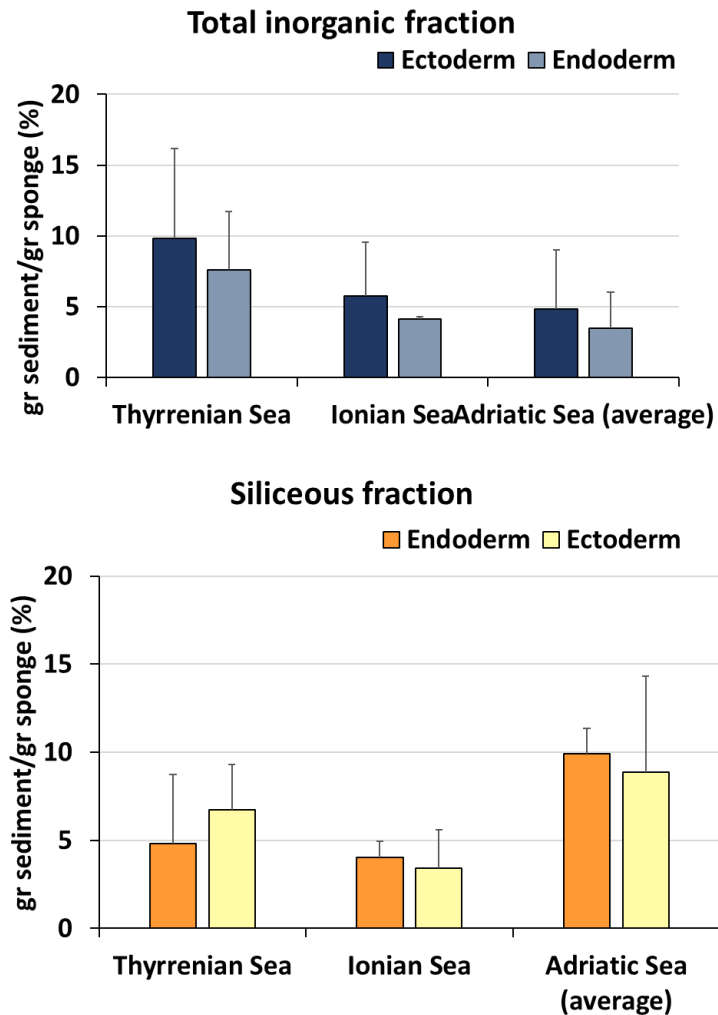


Fig.4.5: Sedimenti inorganici (A); sedimenti organici (B) tra Isole Eolie (SC), Punta Lea (LE) e Riviera del Conero (AN)

I grafici evidenziano come i valori di frazione totale inorganica siano nettamente maggiori nei campioni dal Tirreno, al contrario quelli della frazione esclusivamente silicea. La percentuale di sedimento inorganico è maggiore nell'ectosoma in tutti e tre i siti mentre per i sedimenti silicei si inverte tra Tirreno (>nell'ectosoma) e Adriatico (> nell'coanosoma).

4.6 Sedimenti inorganici ambientali

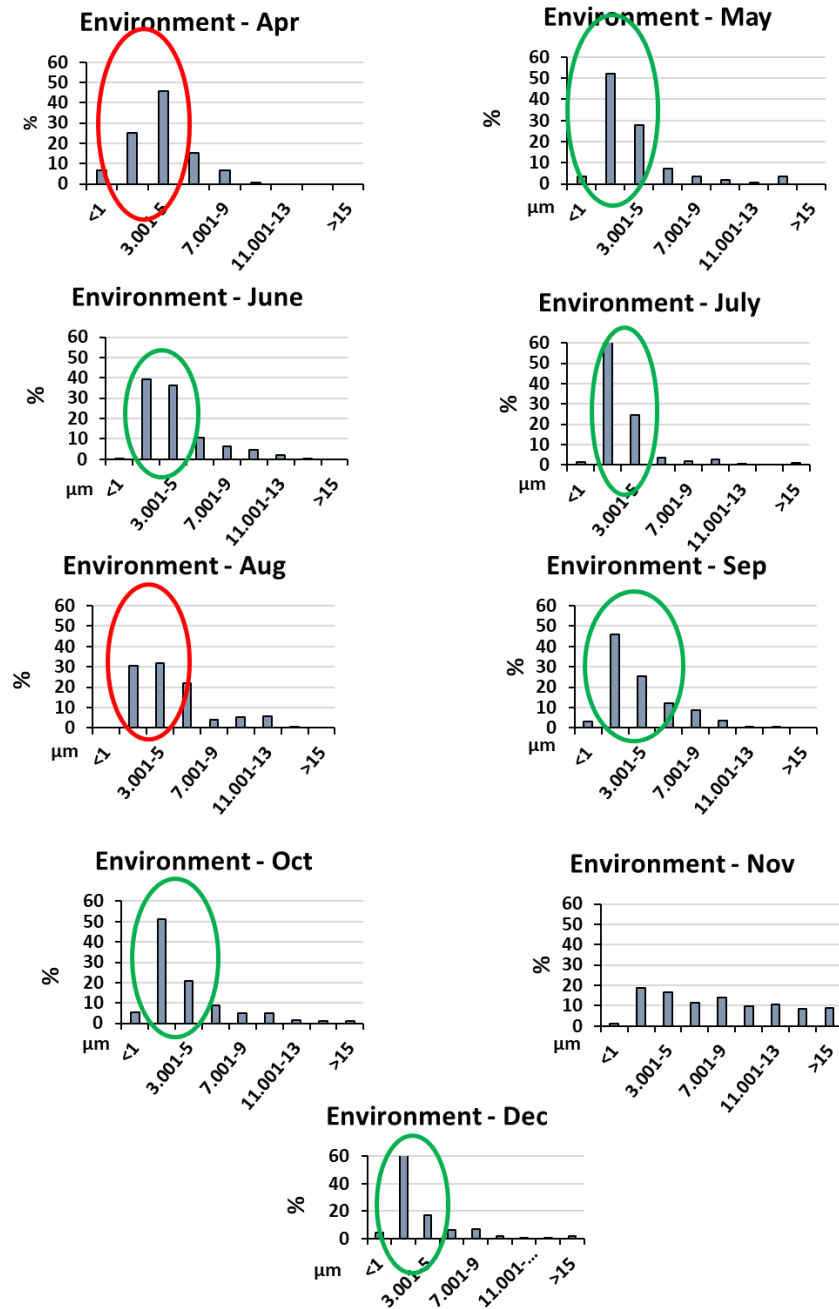


Fig.4.6: frequenza delle classi dimensionali dei sedimenti ambientali totali

Dai grafici rappresentanti (Fig.4.6) le classi di frequenza dimensionale dei sedimenti ambientali, risulta evidente una preponderanza delle classi 1-3 μm 3-5 μm nei mesi di maggio, giugno, luglio, agosto, settembre, ottobre e dicembre. Osservando le seguenti classi nel dettaglio si nota che nei mesi di aprile ed agosto sono i granelli tra 3- 5 μm che dominano, al contrario gli altri mesi mostrano come la classe 1-3 μm sia quella più numerosa. L'eccezione è rappresentata dal mese di novembre che mostra una maggior uniformità tra le classi dimensionali; nessuna classe si impone sulle altre, al contrario si manifesta una situazione omogenea. Nei mesi primaverili estivi le classi > 5 μm sono assenti, le ritroviamo più numerose tra ottobre e novembre per ridiminuire in maniera evidente a dicembre. Maggio e ottobre sono i mesi in cui i sedimenti nel range 1-3 μm hanno valori massimi, fino a un 60% rappresentato da luglio.

4.6.1 Sedimenti silicei ambientali

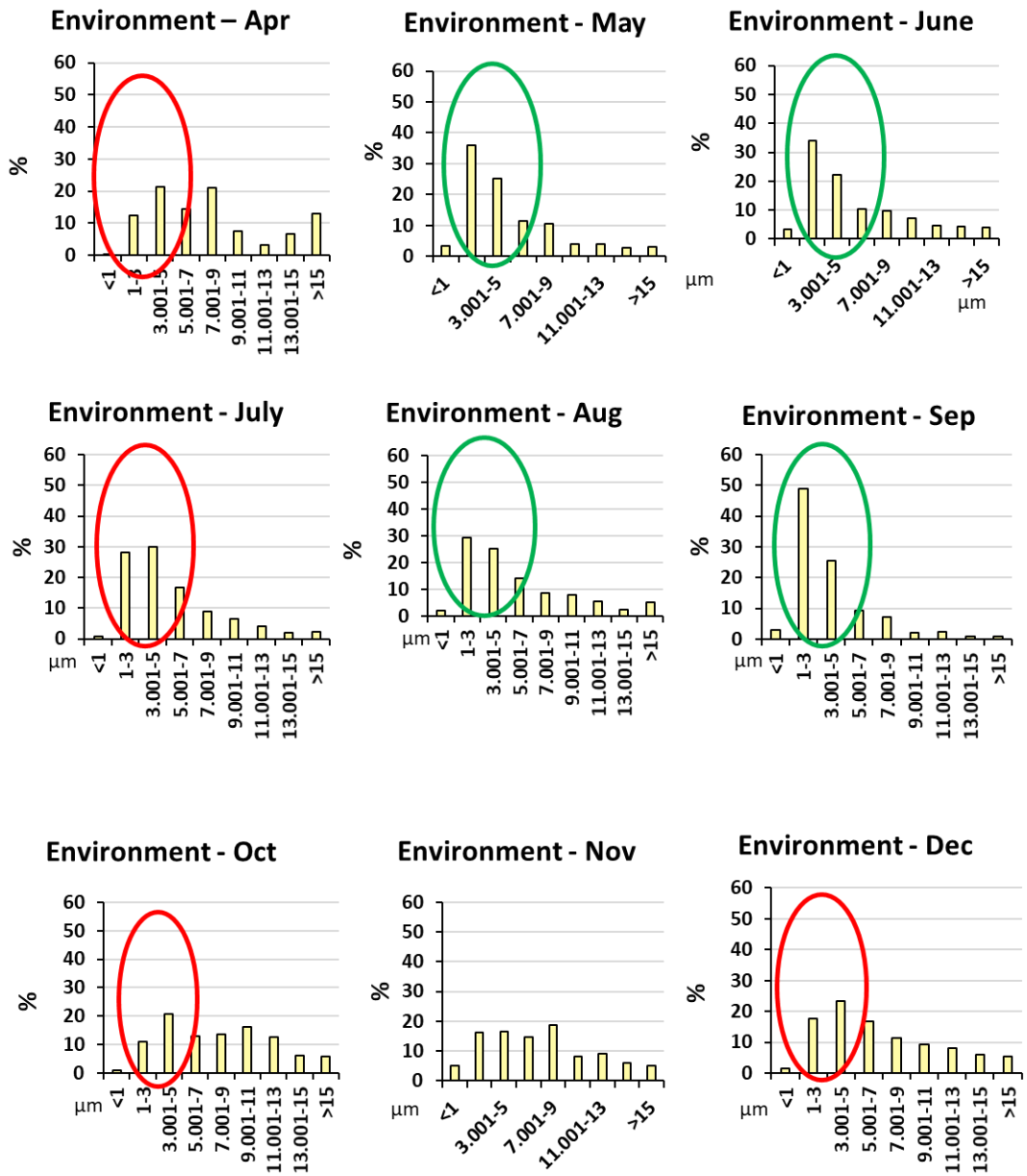


Fig.4.6.1: frequenza delle classi dimensionali dei sedimenti ambientali silicei

Le classi di frequenza dimensionale dei sedimenti silicei, ottenuti sciogliendo il campione di sedimento in perossido di idrogeno e successivamente acido nitrico, mostrano una maggior omogeneità e la dominanza delle classi 1-3 μm e 3-5 μm (Fig. 4.6.1) è evidente nei mesi di maggio, giugno, luglio e settembre con un picco massimo a settembre dove il range 1-3 μm raggiunge il 50%. Anche le classi $> 5 \mu\text{m}$ sono rappresentate durante tutti i mesi. Soprattutto nei mesi autunno - invernali le dimensioni medie dei granelli risultano varie, ma con percentuali di frequenza più omogenee tra il 20% e il 30%. La classe meno rappresentata in tutti i mesi è quella dei sedimenti silicei di dimensione < 1 .

4.7 Sedimenti inorganici sopra Ectosoma

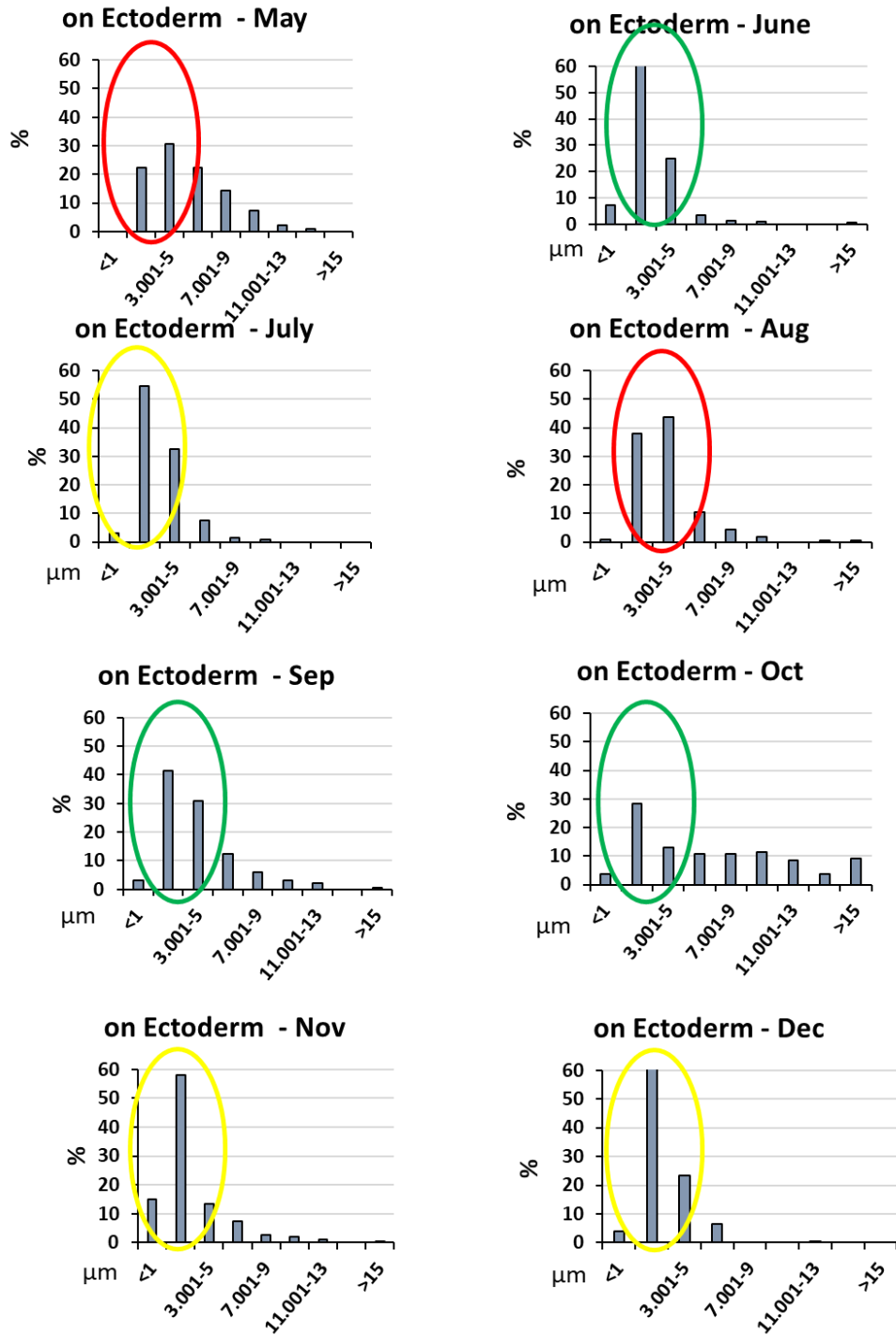


Fig.4.7: frequenze delle classi dimensionali di sedimento sopra l'ectosoma di *Chondrosia reniformis*

Anche per quanto riguarda il sedimento presente sopra l'ectosoma ovvero l'insieme di residui carbonatici e silicei, classi dominanti sono 1-3 μm e 3-5 μm . Del primo range osserviamo picchi fino al 60% tra giugno, luglio, novembre e dicembre (Fig.4.7.), in questi mesi si ha una quasi totale assenza di particelle di sedimento $> 5 \mu\text{m}$. A maggio e ad agosto vi è una lieve prevalenza di sedimenti tra i 3 -5 μm . I mesi di settembre e ottobre mostrano una eterogenità di dimensioni e quindi un andamento più omogeneo tra le classi di frequenza.

E' da osservare che la classe <1 è più abbondante solo nel mese di novembre. Inoltre questi range non tengono conto di granelli di sedimento inferiore a 0.3 μm , in quanto non misurabili con precisione tramite il programma "image j" utilizzato.

4.7.1 Sedimenti silicei sopra Ectosoma

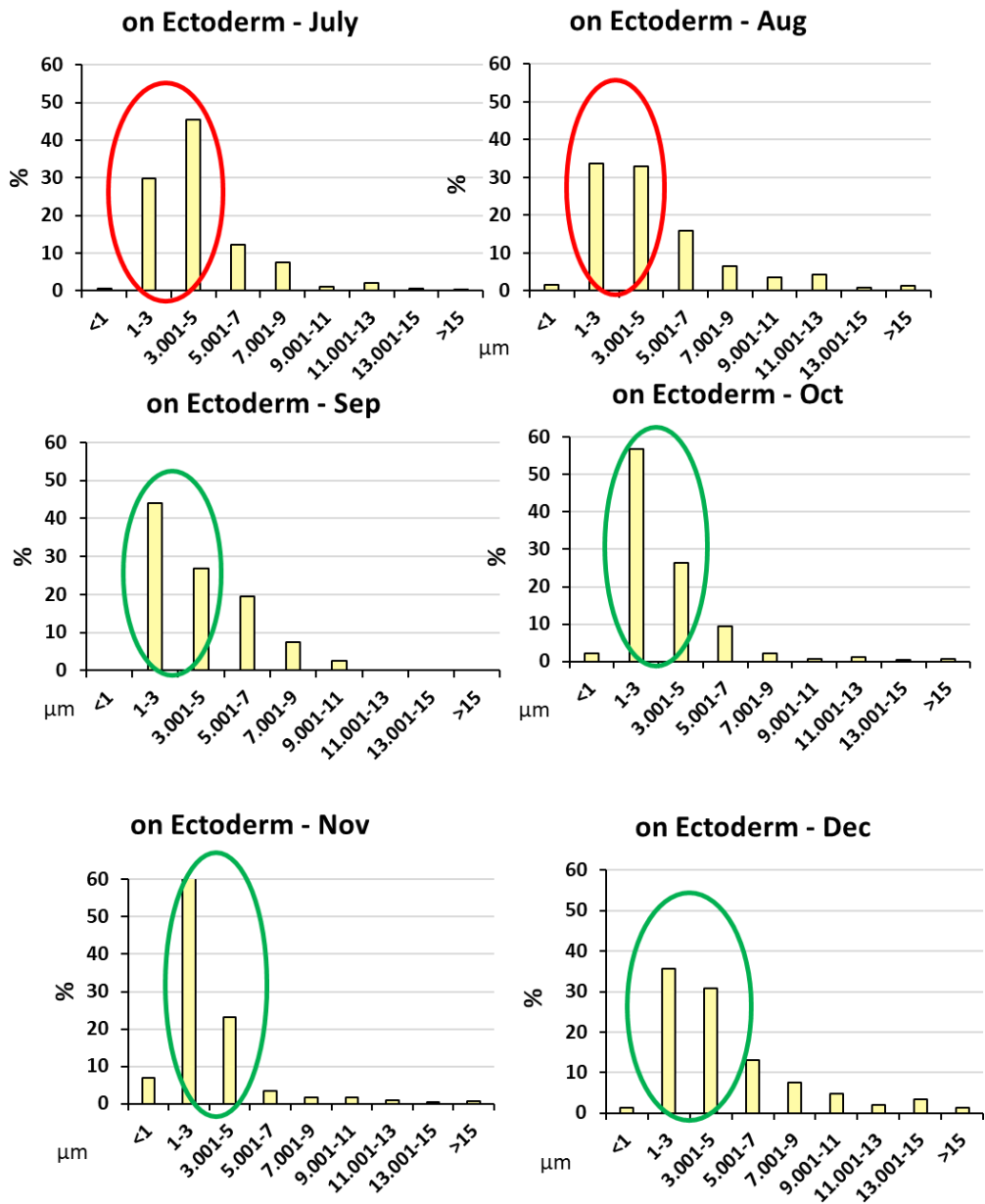


Fig.4.7.1: frequenze delle classi dimensionali di sedimento siliceo sopra l'ectosoma di *Chondrosia reniformis*

Nel sedimento sopra l'ectosoma anche le altre classi di taglia sono espresse maggiormente rispetto a quanto osservato precedentemente, risultano infatti evidenti frequenze tra 10- 25 % per le taglie 5-7 μm (Fig.4.7.1). I mesi che mostrano più variabilità dimensionale sono: luglio, agosto e dicembre. La classe di taglia 1- 3 μm è comunque quella mediamente più numerosa con frequenze massime di 50%, 60% a settembre, ottobre e novembre. I mesi di aprile, maggio e giugno non sono presenti in quanto l'osservazione dei vetrini ha rivelato la presenza di cristalli —probabilmente artefatti— che non ha permesso il conteggio dei granelli silicei. Le classi meno espresse sono: <1 e >15.

4.8 Sedimenti inorganici nell'Ectosoma

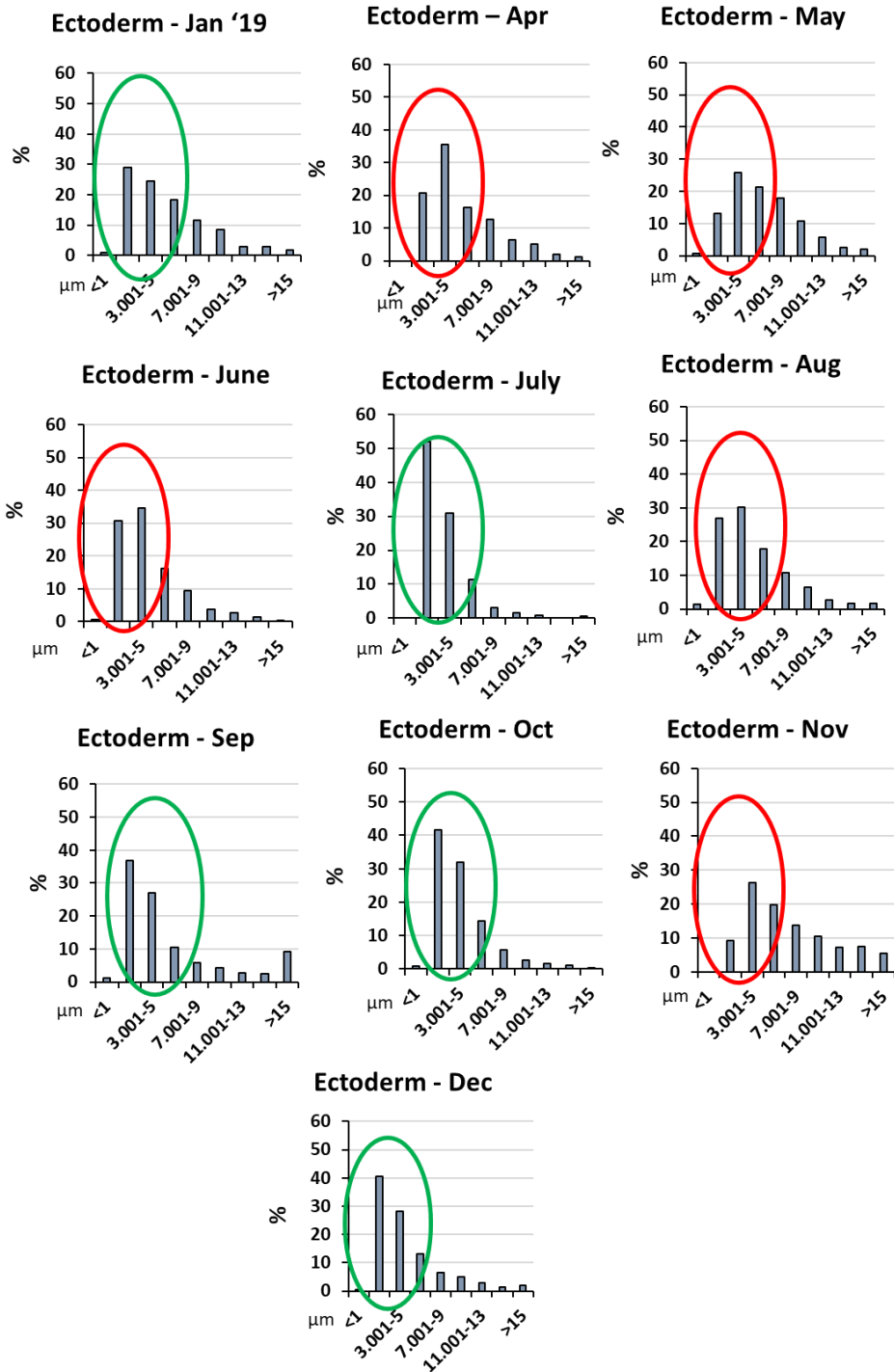


Fig.4.8: Frequenze delle classi dimensionali di sedimento inorganico sopra l'ectosoma di *Chondrosia reniformis*

Per quanto riguarda il sedimento nell'ectosoma, ossia il sedimento che viene incorporato inizialmente dalla spugna, la frequenza delle classi di taglia evidenzia, anche in questo caso, una preponderanza delle dimensioni comprese tra 1-3 μ m e tra 3-5 μ m, (Fig.4.8). La prima è chiaramente più rappresentata, soprattutto nei mesi di settembre, ottobre e dicembre fino al picco massimo di 50% a luglio. La seconda classe più frequente risulta dominante nei mesi di aprile, maggio, agosto e novembre; questo andamento rispecchia l'andamento dei sedimenti ambientali, ma in questi grafici ci sono meno discrepanze tra le varie classi di taglia. La classe < di 1 è assente e quella >15 ha valori maggiori a settembre e una frequenza di circa 10%.

4.8.1 Sedimenti inorganici nell'coanosoma

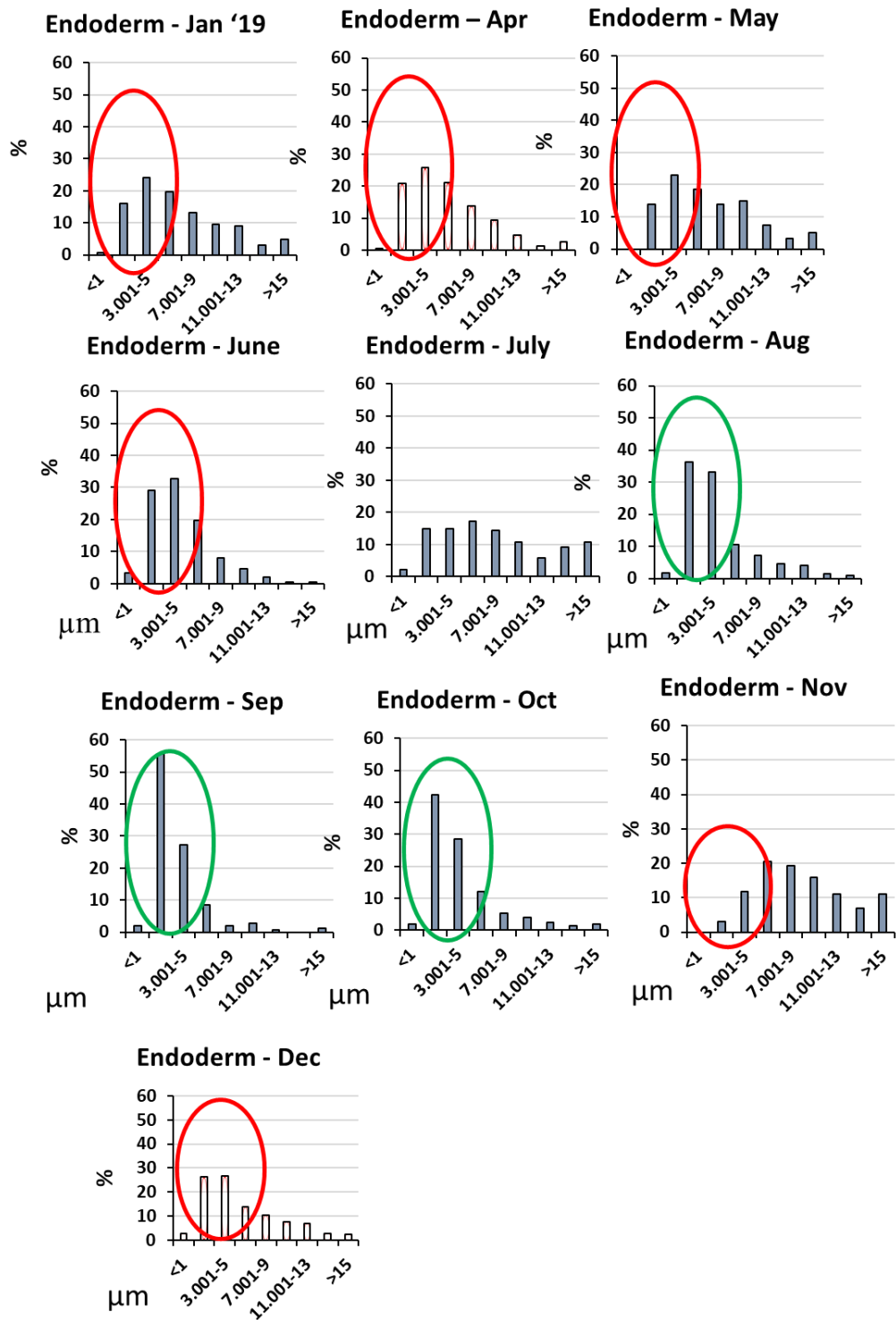


Fig.4.8.1: frequenze delle classi dimensionali di sedimento inorganico sopra l'coanosoma di *Chondrosia reniformis*

Le classi più abbondanti sono sempre 1-3 μm e 3-5 μm , anche se vi è una minor divergenza tra le classi di taglia soprattutto nei mesi di gennaio, aprile, maggio, luglio, ottobre e dicembre

4.9 Sedimenti silicei nell' Ectosoma

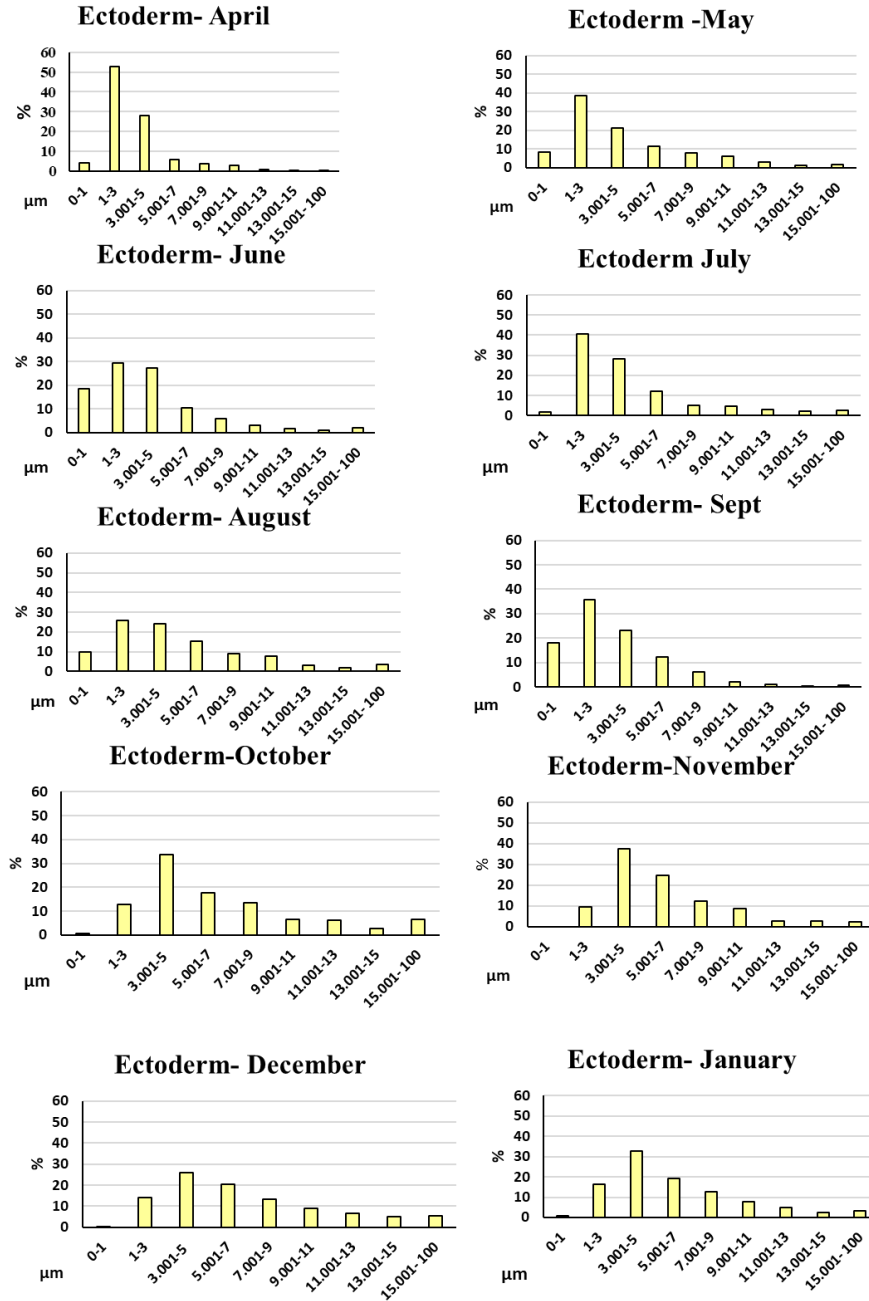


Fig.4.9: frequenze delle classi dimensionali di sedimento siliceo sopra l'ectosoma di *Chondrosia reniformis*

Anche in questo caso le classi dimensionali predominanti sono 1-3 μm o 3-5 μm , la prima sembra la più abbondante. Da ottobre a Gennaio si osserva un aumento della classi $>$ di 9 μm .

4.9.1 Sedimenti silicei nell'coanosoma

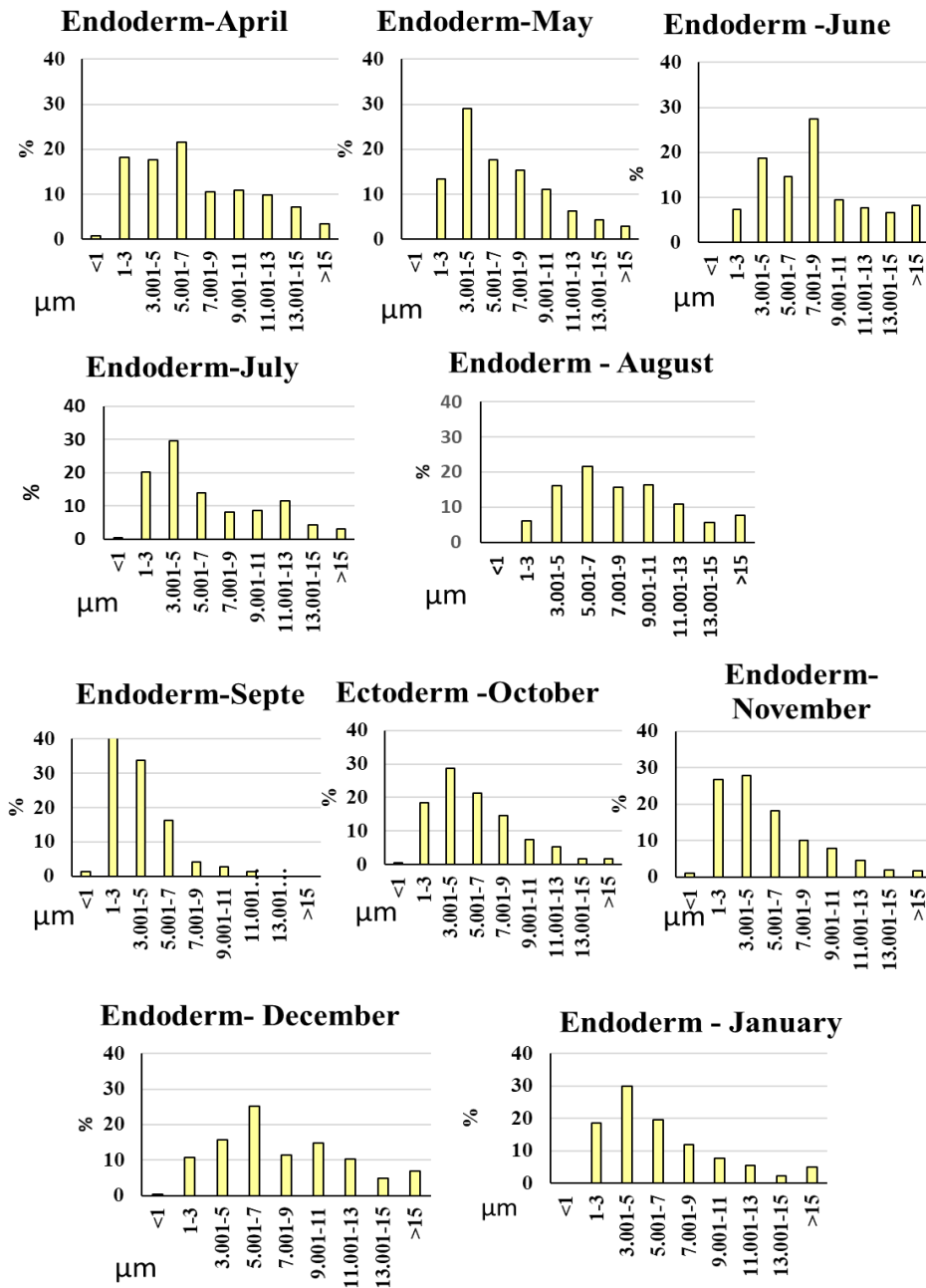


Fig.4.9.1: frequenze delle classi dimensionali di sedimento siliceo sopra l' coanosoma di *Chondrosia reniformis*

Classi dimensionali più abbondanti sono 3-5 μm e 5-7 μm , la prima raggiunge percentuali massime intorno al 30%, la seconda intorno al 25%. Le classi dimensionali sono più uniformi, come per la frazione inorganica, le classi maggiori di 9 μm hanno frequenze superiori rispetto agli altri tessuti.

4.10 Riepilogo delle classi dimensionali di tutti i sedimenti

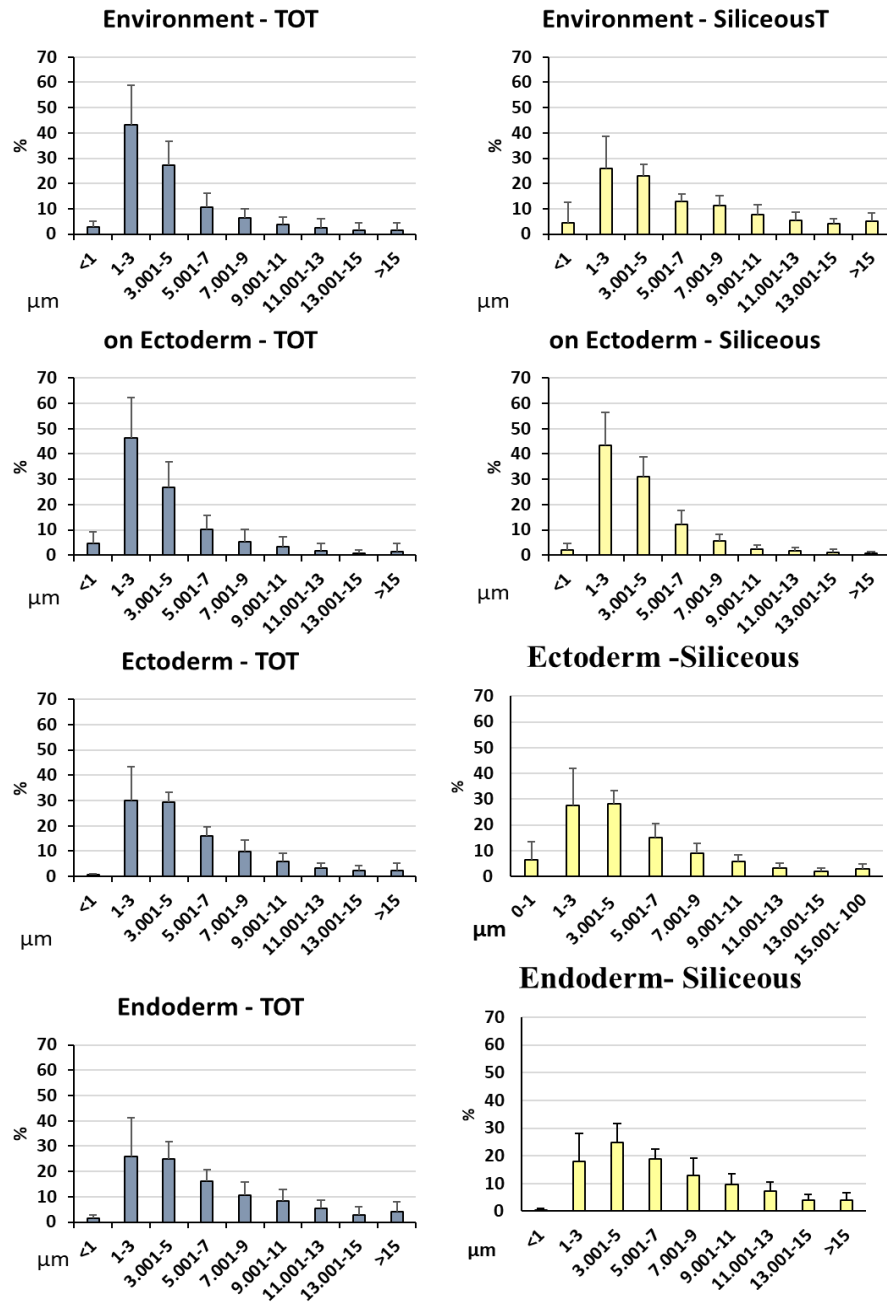


Fig.4.10: confronto del totale delle classi dimensionali per sedimenti ambientali (A) sull'ectosoma (B) dell'ectosoma (C) e dell'coanosoma (D)

4.11 Analisi qualitativa della composizione dei sedimenti

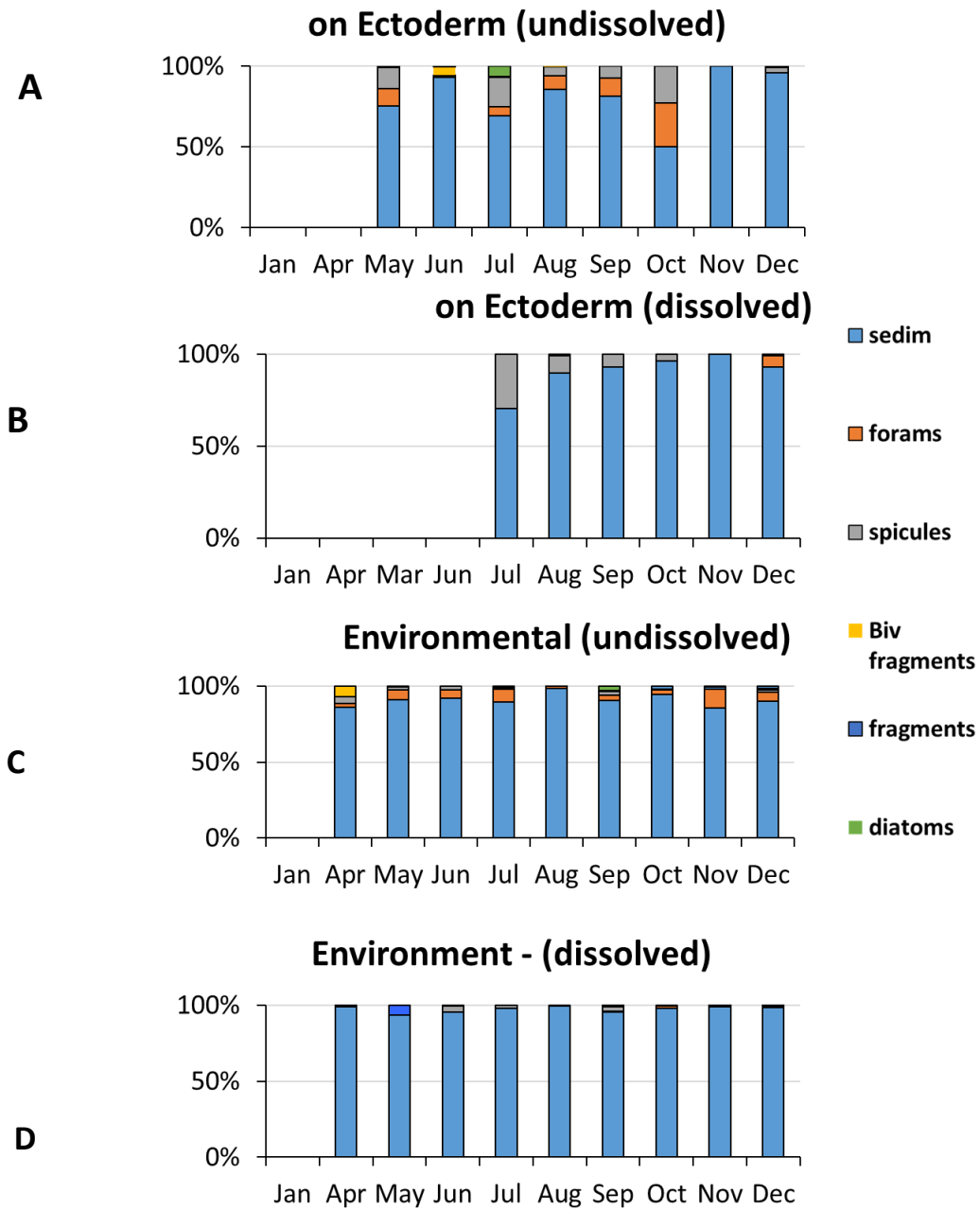


Fig.4.11.1: analisi qualitativa dei sedimenti ambientali, sull'ectosoma sciolto (A), non sciolto(B); ambientale sciolto (C) e non (D).

Questi grafici evidenziano come ci sia una maggior variabilità nei sedimenti ambientali che, come descritto precedentemente, non sono stati campionati con trappole di sedimentazione ma siringati direttamente dal fondale, non si tratta quindi di un sedimento sospeso. Si possono notare percentuali differenti di foraminiferi, altri frammenti di organismi carboniosi e silicei, spicole. Appare molto chiaramente una netta differenza tra la varietà di frammenti presenti nel sedimento non sciolto (A) in acido nitrico, rispetto al sedimento trattato (B). Diversamente nel sedimento sopra l'ectosoma sciolto (D) si osserva la prevalenza di granelli minerali e di spicole, con solo una piccola percentuale di foraminiferi. Le spicole sono più abbondanti nel mese di luglio. Nel sedimento sopra l'ectosoma non sciolto (C) ritroviamo nuovamente una eterogeneità di frammenti che rispecchia il sedimento ambientale, anche se in questo grafico si osservano percentuali di foraminiferi molto alte e una piccola quantità di diatomee. Le spicole sono ben evidenti a giugno e il sedimento minerario non è più completamente dominante.

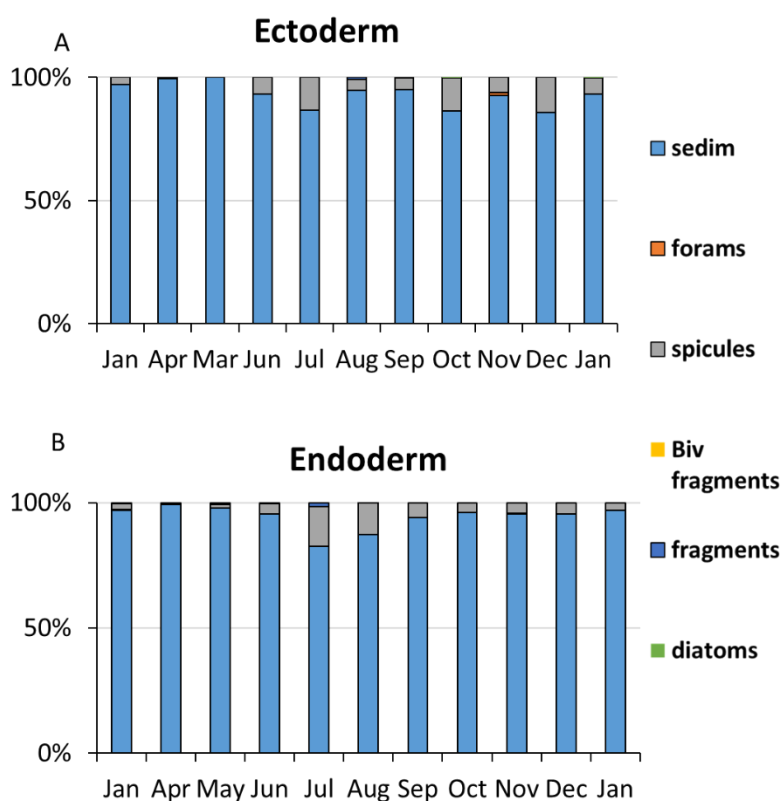


Fig.4.11.2: analisi qualitativa dei sedimenti nell'ectosoma (A) e nell'coanosoma (B)

Il sedimento incorporato nell'ectosoma mostra alte percentuali di granelli, una piccola quantità di spicole, tra gennaio, agosto, settembre e novembre e un'assenza di quest'ultime nei mesi di aprile e marzo. Al contrario nei mesi di luglio, ottobre e dicembre la percentuale di spicole è decisamente maggiore. Si può inoltre osservare una piccola quantità di foraminiferi nel mese di novembre. Infine il sedimento incorporato nell'coanosoma post scioglimento, risulta quasi totalmente caratterizzato da granelli minerali e alcune spicole, più numerose nei mesi di luglio e agosto.

4.12 Time-lapse

I video ottenuti con l'impostazione time-lapse, mostrano un succedersi di contrazioni e movimenti della spugna che portano ad un conseguente spostamento del sedimento sulla sua superficie. Inizialmente il sedimento è distribuito in maniera disomogenea, sparso sull'ectosoma di *Chondrosia reniformis*; con il passare delle ore i granelli si condensano in aree precise formando dei "cordoni" di sedimento, ben aderenti alla spugna. Stesso comportamento è stato notato anche somministrando spicole esogene che con il passare delle ore tendono ad accumularsi in punti precisi formando degli agglomerati ben evidenti.

La formazione di "cordoni" di sedimento è stata osservata durante la sperimentazione solo quando la pompa a immersione, con potenza 6 Watt, funziona ad una portata di 120 l/h, al contrario, se regolata sulla portata massima di 320l/h, l'incorporazione non avviene. si osservano i granelli venir trasportati dalla corrente senza che la spugna li riesca a trattenere. Anche per quanto riguarda le diatomee somministrate sull'ectosoma si osservano mutazioni nel tempo: durante le prime ore di registrazione le diatomee si distinguono facilmente grazie al loro colore verde brillante, con il passare delle ore si osserva un progressivo schiarimento e il colore assunto da questi

organismi tende al giallo sempre più chiaro fino a non essere più distinguibili dal tessuto superficiale della spugna.

4.13 Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)

Per identificare nel dettaglio la composizione del sedimento è stata fondamentale la microanalisi.

In particolare il sedimento scelto come soggetto per queste analisi è stato quello presente sopra l'ectosoma. Quest'ultimo è infatti fondamentale per correlare la natura dei granelli presenti nell'ambiente con quelli che la spugna inizia a selezionare. I grafici ottenuti da quest'analisi (Fig.4.13.3) evidenziano picchi rappresentanti silice e calcio, in alcuni casi sembrano essere presenti anche altri metalli ma, in quantità trascurabile. Un'altra osservazione rilevante, ottenuta grazie all'utilizzo del SEM è la presenza di diatomee, che al microscopio ottico non sono state osservabili, in particolare si tratta della specie *Skeletonema-marinoi* (Fig.4.13.1). Tali organismi erano stati osservati sull'ectosoma della spugna campionata nel mese di gennaio 2020 (Fig.4.13.2). Tuttavia, una volta sciolti i tessuti di *Chondrosia reniformis*, non sono state più distinguibili e osservabili. Il SEM ha evidenziato la presenza di frustoli soprattutto nel sedimento prelevato all'interno del corpo acquifero della spugna.

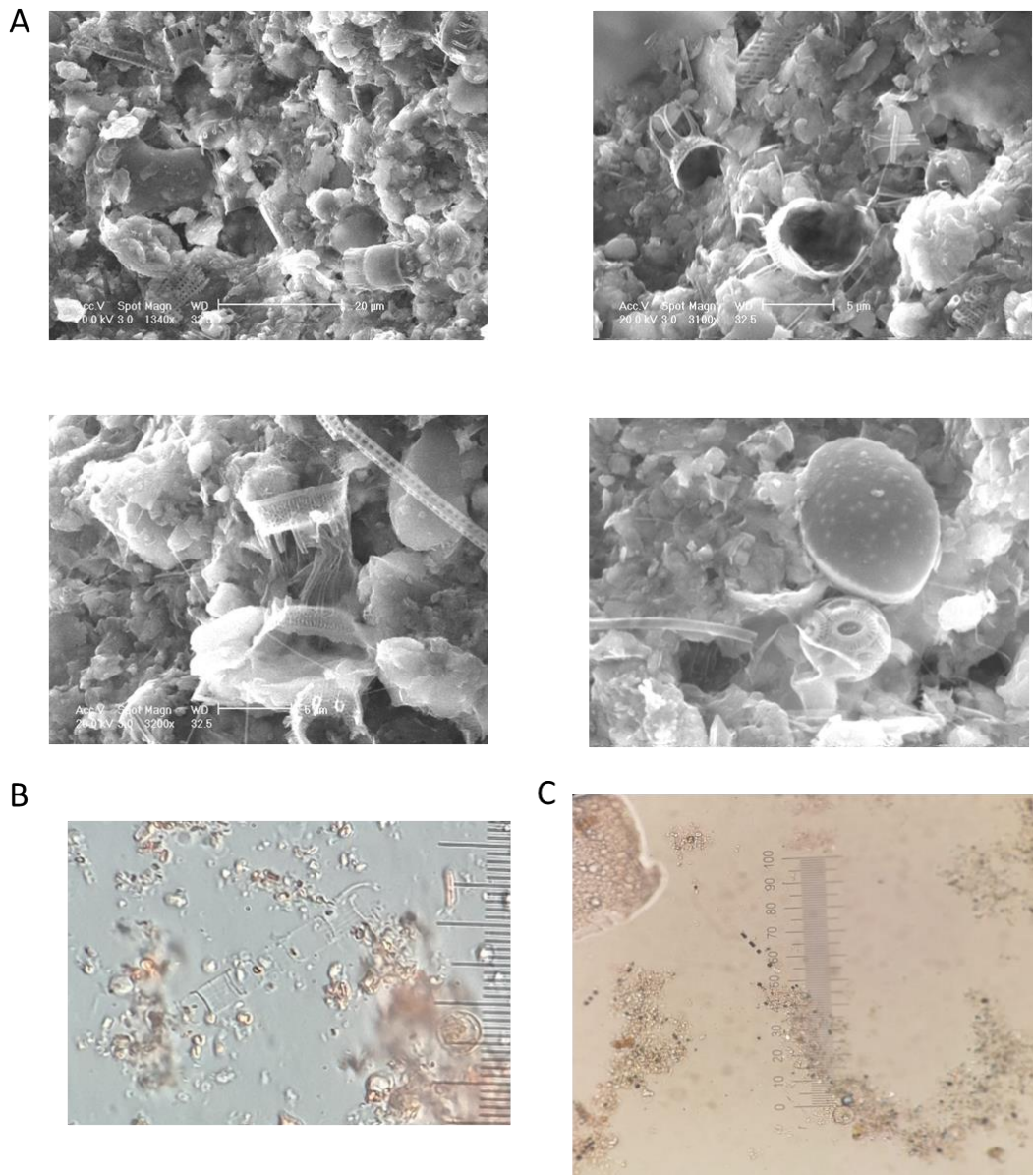


Fig.4.13.1: diatomee *Skeletonema marinoi* osservate al SEM (A), in vivo (B) e fissate (C) al microscopio ottico

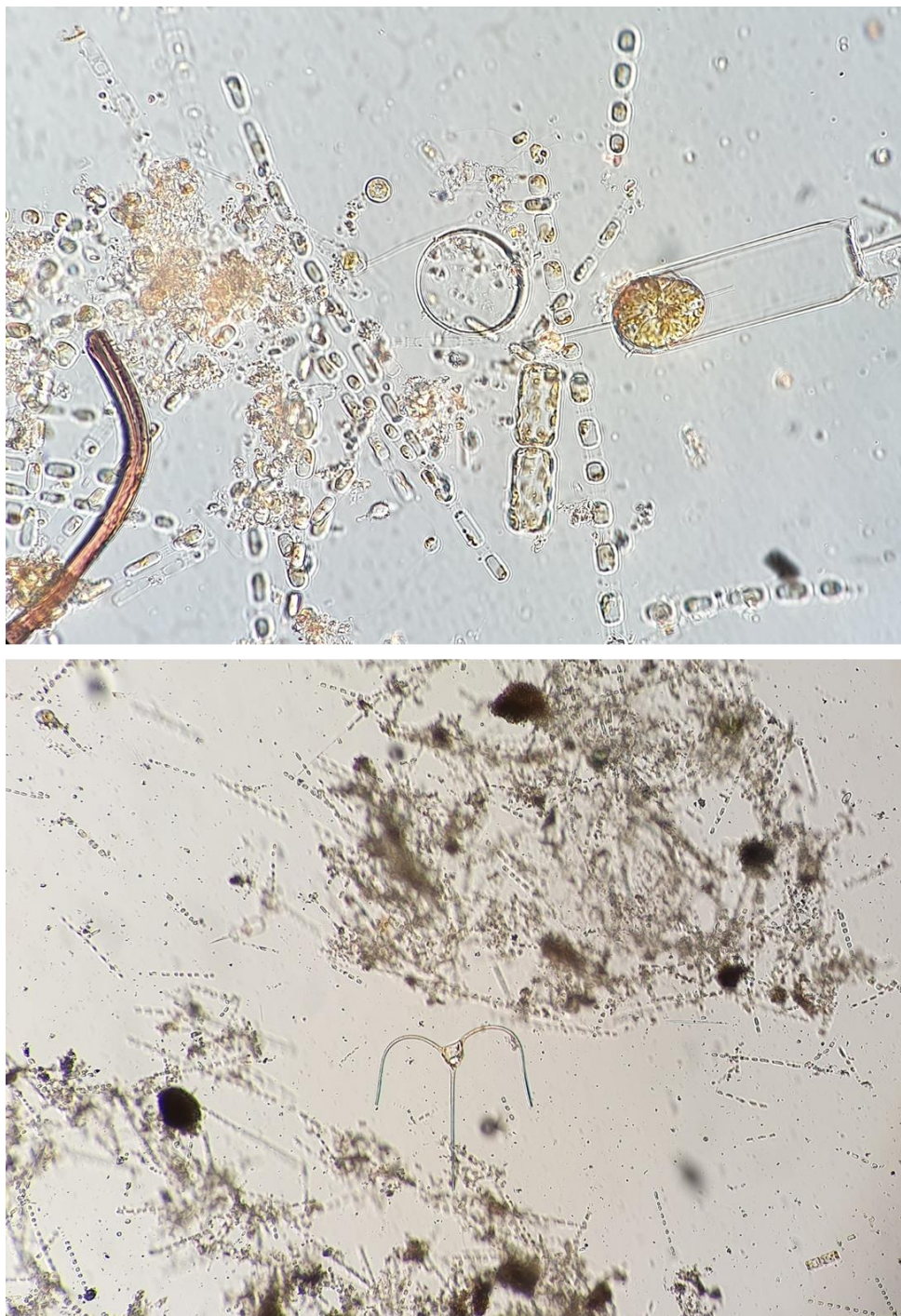
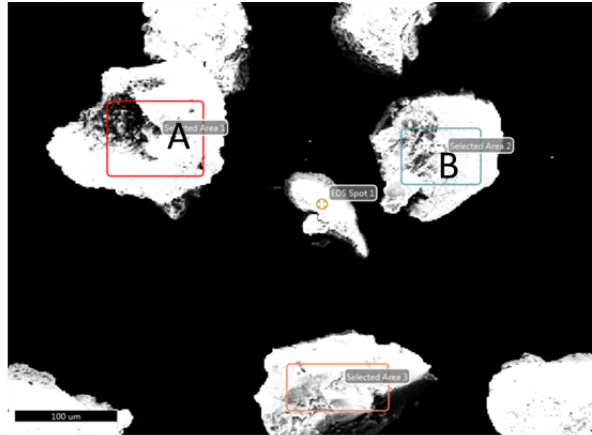
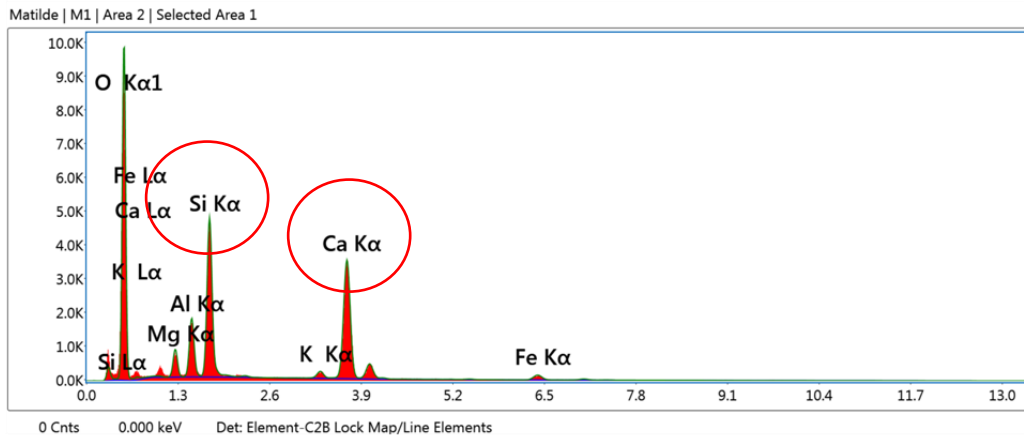


Fig.4.13.2: *Skeletonema marinoi* in vivo sull'ectosoma di *Chondrosia reniformis*, campionamento gennaio 2020.



A



B

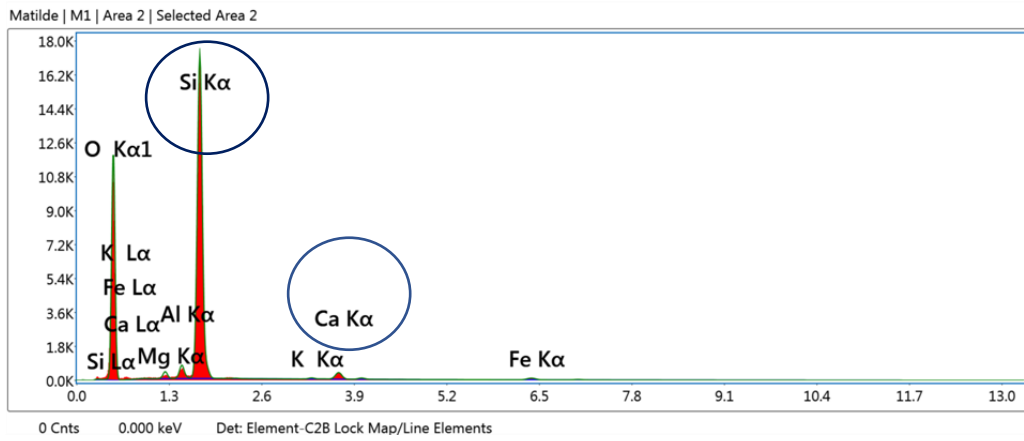


Fig4.13.3: sedimento silicio-carbonatici (A) sedimento siliceo (B)

4.14 Analisi sedimenti con diffrattometro

L'analisi dei sedimenti attraverso il diffrattometro ha permesso di conoscere la natura dei cristalli formati soprattutto nel sedimento sopra l'ectosoma, dopo lo scioglimento in perossido di idrogeno e successivamente acido nitrico.

Nel campione di maggio lo spettro evidenzia alcuni picchi rossi che indicano la presenza di idrogeno e di oxalato idratato.

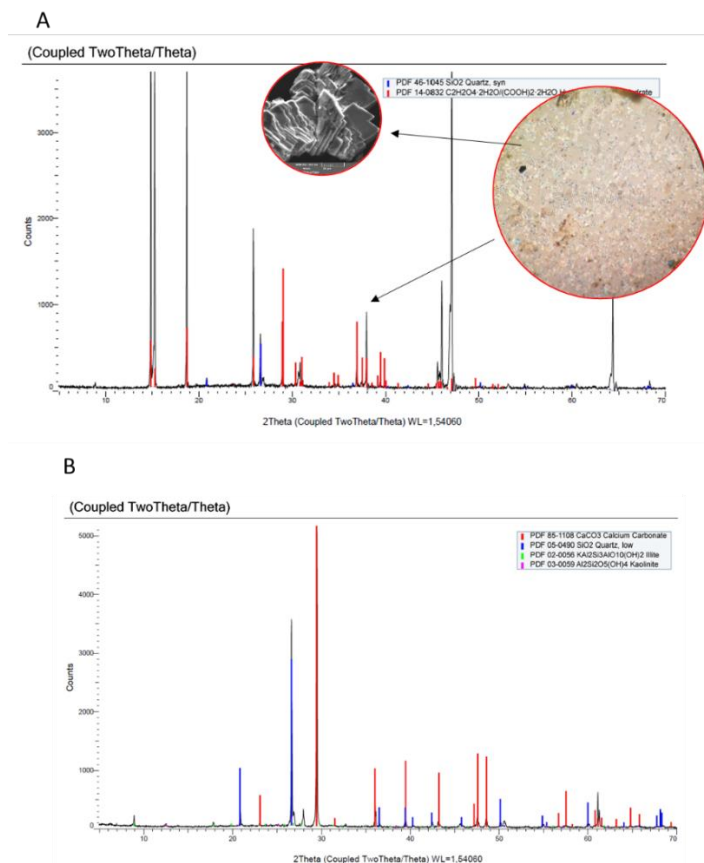


Fig.4.14: analisi al diffrattometro e al SEM che confermano la presenza di oxalato di calcio(A); analisi al diffrattometro e al SEM che confermano la presenza di minerali argillosi(B)

Nel campione di gennaio sono stati osservati illite e caolinite (minerali argillosi, < 2 μ m).

5. DISCUSSIONI

La variazione della quantità di sedimenti nei tessuti di *Chondrosia reniformis* (ectosoma -coanosoma), potrebbe dipendere da fattori sia biotici che abiotici. Il moto ondoso e le correnti potrebbero causare la risospensione dei sedimenti presenti sul fondo, mentre, altri apporti di sedimento deriverebbero dai numerosi corsi d'acqua presenti a nord del sito considerato (es. Fiumi Esino, Misa, Po) (Brian et al., 2017) e dal dilavamento della falesia a causa delle precipitazioni. A seconda delle condizioni meteo-marine (fasi di burrasca o di calma, fiumi in piena o in secca, precipitazioni di diversa entità), la spugna alternerebbe fasi di incorporazione e fasi di utilizzo del sedimento incorporato, riassunte in (Fig. 5.1)

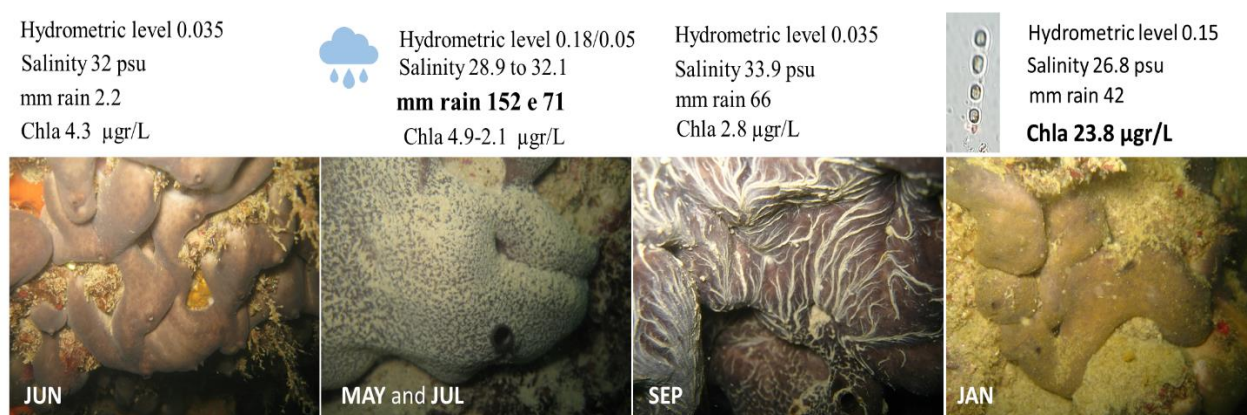


Fig.5.1: Diverse fasi di incorporazione di *Chondrosia reniformis* nel mare Nord Adriatico , foto in immersione.

June 2019 mare calmo (A); May and July sedimento distribuito omogeneamente sulla superficie delle spugna(B); sedimento forma cordoli September 2019) (C); sedimento e diatomee ricoprono la spugna January 2020.(D)

In generale, le spugne osservate *in situ* mostravano la superficie libera dal sedimento quando il campionamento era effettuato durante prolungati periodi di mare calmo (Fig. 5.1 A da www.maregrafico.it). Durante il campionamento di maggio l'acqua era torbida e abbondante sedimento era distribuito in modo omogeneo sull'ectosoma. (B) I dati ambientali fanno presupporre che le intense piogge che hanno caratterizzato il mese di maggio abbiano contribuito ad apportare sedimenti in mare. A settembre è stata osservato che la spugna è in grado di disporre i sedimenti in maniera ordinata sulla sua superficie, dando origine a cordoni disposti a spirale. (C) Probabilmente, questa è la fase, successiva all'adesione, in cui la spugna seleziona il materiale presente sull'ectosoma, incorporandone una parte e utilizzandone un'altra per la sintesi del collagene. Durante i bloom di fitoplancton, come quello osservato a gennaio 2020, la superficie della spugna si ricopre, oltre che da sedimento, anche da diatomee. (D) Sono stati registrati valori di bassa salinità nei mesi precedenti di novembre e dicembre. (ARPAE e Protezione civile)

Le immagini della spugna scattate in laboratorio corroborano queste ipotesi, mostrando i sedimenti dapprima sparsi sulla superficie della spugna, poi riuniti in cordoni ed infine incorporati.

I dati ambientali riportati nei paragrafi precedenti non considerano le correnti, che potrebbero giocare un ruolo nella risospensione dei sedimenti. Inoltre, la

mancata correlazione tra i valori di concentrazione dei sedimenti nella spugna e i parametri chimico-fisici potrebbe dipendere che in certi periodi dell'anno prevale il moto ondoso ed in altri prevalgono le piene o le precipitazioni.

Le spugne, durante i campionamenti, non mostravano stress evidenti, quindi i diversi stadi di incorporazione, riscontrati durante l'anno, non sono dovuti ad esigenze differenti di quest'ultime: come l'ancorarsi al substrato, post frammentazione o il rimarginare tessuti danneggiati, eventi che bloccano momentaneamente il processo selettivo di incorporazione (Giovine et al., 2013). L'andamento del grafico (fig.4.2) mostra una maggior percentuale di sedimento nell'ectosoma rispetto all'coanosoma, il che è dovuto principalmente all'alto tasso di sedimentazione del bacino della Riviera del Conero che provoca l'accumulo di particolato nell'ectosoma della spugna, ma anche a fasi iniziali di incorporazione. Inoltre, la presenza dell'area portuale di Ancona, il passaggio di imbarcazioni e l'attività di pesca, soprattutto dragaggio creano un tasso di sedimentazione sopra la norma. (Petovic et al., 2016). Uno tra gli stress maggiori creati da questa abbondanza è l'aumento di deposito di sedimento sugli organismi bentonici. (Jones et al., 2016)

I mesi di gennaio 2019 - 2020 evidenziano una inversione di tendenza dovuta, probabilmente, ad una fase di incorporazione già avanzata di *C. Reniformis*. Infatti, se si osserva il grafico (Fig.4.2.1), la quantità di silice presente nei

tessuti dell'organismo è maggiore nell'coanosoma, i granelli sono stati quindi incorporati e saranno poi sciolti per rafforzare il collagene di *C. Reniformis* (Bavestrello et al.,2003 Giovine et al.,2013).

La quantità di sedimenti silicei all'interno dell'coanosoma è inferiore essendo appunto, prima selezionati dall'ectosoma e secondariamente sciolti e utilizzati dalla spugna. Tale discrepanza era meno accentuata nella frazione inorganica totale poiché esprime l'insieme di minerali presenti nell'area campionata principalmente carbonatici e silicei. All'interno dell'coanosoma si suppone ci sia una prevalenza di sedimenti silicei e quindi la quantità di sedimenti inorganici totali nell'ectosoma è risultata più simile a quella dei sedimenti all'interno dell'coanosoma perché sono selezionati i sedimenti silicei, mentre i carbonatici vengono eliminati. (Giovine et al.,2013)

Il confronto tra le diverse aree di campionamento ovvero Salina (Isole Eolie, Sicilia), Punta Lea (Puglia) con la Riviera del Conero evidenzia come *C. reniformis* delle Isole Eolie abbia un alto tasso di sedimento totale nei tessuti ma una bassa percentuale di sedimento siliceo; ciò è attribuibile alla differente composizione del sedimento dei tre siti considerati; infatti, a Salina il sedimento è prevalentemente vulcanico e l'unica fonte di silice è vetro vulcanico, mentre, i sedimenti a sud del delta padano sono di natura quarzoso-

feldspatico-carbonatica e le coste ioniche hanno sedimenti prevalentemente carbonatici (ISPRA 2016).

Difatti, la diffrattometria a raggi x ha evidenziato la presenza di caolinite ed illite nei sedimenti sull'ectosoma delle spugne adriatiche; inoltre, l'analisi granulometrica ha rilevato la presenza di granelli molto piccoli, anche inferiori a 1 μm , che potrebbero corrispondere ai sedimenti argillosi sopracitati *Chondrosia reniformis* incorpora questi materiali amorfi che non riesce a sciogliere, (Bavestrello et al.,1996). Infatti i granelli sono di dimensioni molto più grandi (8 μm). Anche il fatto che la frazione silicea sia più presente nell'ectosoma che nell'coanosoma, al contrario di ciò che avviene in Adriatico, esprime quanto appena affermato.

Per quanto riguarda Punta Lea, i valori di frazione inorganica nei tessuti della spugna sono più in linea con i valori dell'Adriatico, l'input di sedimento fondamentale dello Ionio è il fattore eolico che trasporta soprattutto sabbie dal deserto del Sahara e i sedimenti sono principalmente terrigeni, costituiti da granuli in prevalenza calcarei.

Il fenomeno d'incorporazione e soprattutto la selezione dei sedimenti è stato per molto tempo discusso (Haeckel 1872; Schulze1879-Lendefeld 1889). Haeckel 1872 considerava questo processo attivo, mentre Schulze (1879) sosteneva che l'incorporazione fosse passiva. Lendefeld (1889) supportava la

prima teoria avendo osservato la selezione dello stesso tipo di sedimenti dalla stessa spugna in diverse località (Giovine et al.,2013). Gli studi di *Chondrosia reniformis* hanno evidenziato come si tratti di fenomeni complessi (Bavestrello et al.,2003) che possono essere considerati passivi, per quanto riguarda la composizione dei sedimenti sospesi e presenti sulla superficie della spugna e attivi per l'attività dei pinacociti e l'incorporazione delle particelle selezionate. (Bavestrello et al.,1996,1998). Questo studio ha evidenziato come sia presente una selezione attiva da parte della spugna, essendoci una differenza importante tra sedimento nell'ectosoma e all'interno dell'coanosoma. Ovviamente, la disponibilità delle particelle dipende dalle condizioni ambientali, dagli apporti fluviali, dal moto ondoso, dalla risospensione in colonna d'acqua che varia continuamente con l'idrodinamismo. Tutto ciò è infatti dimostrato dai grafici (fig.4.3.A-B). La quantità di sedimento inorganico aumenta nei mesi autunnali-invernali, aumentando temporali, mare mosso (tra novembre e dicembre si hanno onde alte più di 2 m cinque giorni prima dei campionamenti). Maggio e giugno sono i mesi con mare più calmo. In generale il sedimento presente sopra l'ectosoma sembra seguire l'andamento del sedimento ambientale, le differenze sono dovute comunque al fenomeno di incorporazione della spugna che in condizione di disturbo diminuisce sicuramente, ma non si annulla totalmente. Anche le dimensioni delle particelle incorporate sono legate alle

condizioni ambientali. (Bavestrello et al.,2003) Dai grafici delle classi dimensionali (Fig.4.4 fino a 4.10.) si è potuto osservare come le classi dominanti siano quelle tra 13 μm e 3-5 μm . Ritroviamo questa dominanza a partire dai sedimenti ambientali fino a quelli dell'ectosoma e dell'coanosoma, in particolare il range più piccolo 1-3 μm sembra dominare nei mesi dove il campionamento è avvenuto in seguito a mareggiate con onde > di 1 metro, ovvero maggio, settembre, dicembre. Novembre è un'eccezione probabilmente a causa del forte rimescolamento e dei maggiori input fluviali dati dalle piogge. I sedimenti dell'ectosoma mostrano anche essi una predominanza delle classi 1-3 e 3-5 μm , ma la minor discrepanza tra le classi di taglia da 1 a 9 μm indica che il sedimento più risospeso e maggiormente selezionato nella prima fase dell'incorporazione è in questo range. Inoltre le classi dimensionali osservate seguono l'andamento del sedimento sopra l'ectosoma con un leggero spostamento verso i range 3-5 μm dovuto a una più veloce incorporazione del sedimento fine. Concentrandosi sul particolato siliceo, si nota come le classi di taglia siano più uniformi, il che è probabilmente dovuto principalmente, come già affermato, alla velocità di incorporazione e scioglimento dei granelli di dimensione più piccola che fa sì che diminuisca il divario numerico tra le classi 1-3 3-5 μm e le altre. Un'altra spiegazione è data dal fatto che i granelli più piccoli sono comunque trattenuti più facilmente anche con condizioni meteo

marine avverse. Il che è in linea con la teoria di Cerrano et al., 1999 che sostiene come in caso di mare mosso *Chondrosia reniformis* incorpori solo particelle fini che si legano alla superficie mucosa mentre, in caso di mare calmo, anche granelli di dimensioni superiori possano essere trattenuti. La situazione varia nell'coanosoma perché le classi dimensionali si uniformano in linea con quanto affermato da Bavestrello et al., 1995. Al contrario però di quanto afferma quest'ultimo, le dimensioni medie sono superiori soprattutto per i granelli silicei, il che è dovuto al fatto che i più piccoli sono subito sciolti e usati dalla spugna per la formazione di collagene. Questo processo richiede uno sforzo energetico inferiore rispetto allo scioglimento più lungo e laborioso dei granelli di dimensioni maggiori. Il fatto che la spugna conservi quest'ultimi può essere una strategia per avere una struttura più stabile e rinforzata. Infine l'alto tasso di sedimentazione della Riviera del Conero fa sì che la spugna debba trovare strategie di "smaltimento" più rapide possibile per non rischiare di venire sommersa dal particolato in deposizione. Novembre mostra maggiore uniformità tra le classi dimensionali, questo può essere dovuto al fatto che la spugna ha continuato il processo in corso di incorporazione, senza inglobare nuove particelle, essendo le condizioni meteo marine avverse. Infatti dal lavoro di Bavestrello et al., 1995 è evidente come con il passare dei giorni la spugna tenda ad uniformare la dimensione dei granelli al suo interno. La maggior

uniformità dimensionale all'interno dell'coanosoma indica quindi che il processo di incorporazione è più che avviato.

L'analisi qualitativa dei sedimenti ha evidenziato come la composizione di quelli ambientali sia più varia rispetto alle altre tipologie di sedimenti. Il che non ci ha sorpresi trattandosi di sedimento prelevato dal fondale e non in sospensione. Durante tutto l'anno ci sono alte quantità di foraminiferi, in particolare *Globigerina* spp., che riescono a costruire il proprio guscio grazie alla presenza di CaCO_3 , inoltre questi organismi si nutrono di batteri e diatomee il che potrebbe spiegare perché sono così abbondanti anche sul sedimento sopra l'ectosoma di *Chondrosia reniformis*, superficie su cui sono state osservate alte concentrazioni di diatomee. Si nota una diminuzione di questa diversità di organismi nel sedimento ambientale sciolto in acido nitrico, rimangono le forme silicee come granelli e soprattutto spicole. Nel sedimento sopra ectosoma e anche nel sedimento dell'ectosoma e dell'coanosoma le concentrazioni di spicole esogene sono alte, soprattutto tra giugno e luglio, fase di incorporazione indisturbata per la spugna essendo limitati sia i fenomeni di moto ondoso che di affluenza dei fiumi. Nei sedimenti sopra ectosoma sciolti, alcuni mesi mancano nell'analisi qualitativa, in quanto i vetrini analizzati sono risultati ricchi di cristalli che si è cercato di identificare. Le diatomee, in particolare *Skeletonema* spp. e alcune centriche (*Bacillariophyceae*) sono state trovate

nell'ecosistema nei mesi estivi di giugno, luglio, agosto, anche se i bollettini Arpam evidenziano da giugno una regressione del bloom fitoplanctonico. Le diatomee sono gli organismi silicei predominanti e la maggior componente del fitoplancton, come affermano Penna et al., 2003, dalla loro ricerca è evidente come questi organismi crescano sfruttando forme di Si differenti. La polvere di quarzo (SiO_2) e la silice disciolta $\text{Si}(\text{OH})_4$ sono le forme usate più velocemente dalle diatomee per la costruzione del frustolo. *C. reniformis* dopo l'incorporazione e quindi durante lo scioglimento dei granelli di quarzo aumenta nell'ambiente circostante la quantità di silice disciolta (Bavestrello et al., 1995). È risaputo che la quantità di silice disciolta in acqua dolce e marina deriva da quella amorfa che è maggiormente solubile in acqua, (Kamatani et al., 1971) mentre all'interno di *Chondrosia reniformis* avviene esattamente il contrario perché l'acido ascorbico agisce con più efficacia sul quarzo rispetto che sulla silice amorfa. (Fenoglio et al., 2000). Le diatomee preferiscono il quarzo disciolto (Penna et al., 2003) quindi la relazione con questa spugna sembra essere molto utile per questi organismi. Le diatomee possono sfruttare la remineralizzazione del silicio per la costruzione del frustolo. Allo stesso modo si è osservato come questi organismi possano sciogliere piccoli frammenti di quarzo in modo simile a *Chondrosia reniformis* (Penna et

al.,2003) quindi, in qualche modo, sono anche delle potenziali competitori della spugna per il sequestro di piccole particelle di quarzo.

Quando le particelle di quarzo si depositano sull'ectosoma, le cellule del tessuto iniziano a contrarsi con movimenti simultanei modificando la tipica superficie liscia di *Chondrosia reniformis*, creando zone leggermente rialzate. Successivamente queste particelle vengono inghiottite dai pinacociti che formano un bordo intorno ai granelli (Bavestrello et al., 2003). La formazione di aree globose sull'ectosoma è stato notato in tutti i video time-lapse.

Inoltre si è potuto osservare come queste contrazioni portino a un accumulo di granelli in cordoli e in determinati punti. Il tempo di incorporazione dei granelli studiato è circa di 50 ore (Bavestrello et al.,1996), i video lo confermano anche se il comportamento delle spugne era alterato da stress di temperatura dell'acqua non ottimale e dal fatto che non erano integre e quindi la loro incorporazione può essere stata rallentata, dal momento che non incorpora se deve ristabilire la sua polarità. (Bavestrello et al.,1998). Infatti durante la frammentazione la spugna non seleziona esclusivamente silice, ma incorpora anche carbonato, strategia di ancoraggio adottata anche da altre spugne. (Cerrano et al., 2007). Per quanto riguarda le spicole queste sono prima ricoperte da una matrice organica e poi incorporate, senza che la spugna perda la sua configurazione. Questo comportamento prevede la formazione di una

copertura verso la quale altri esopinacociti protudono pseudopodi lunghi e sottili. Col passare del tempo, nuovi esopinacociti si allineano e coprono le spicole che diventano completamente incorporate (Bavestrello et al.,2003) Questo processo potrebbe essere lo stesso anche con le diatomee che nel video, con il passare delle ore da ben visibili, verdi brillanti passano a colori chiari per poi scomparire.

Le analisi al SEM e al diffrattometro hanno permesso di identificare i cristalli presenti nel sedimento sull'ectosoma di *C. reniformis*. Nel primo caso sono stati identificati i cristalli di whewellite, nel secondo caso il diffrattometro ha identificato la presenza di ossalato di calcio. L'abilità della spugna a incorporare e sciogliere quarzo è dovuto ad una precisa reazione chimica. L'agente fondamentale è l'acido ascorbico che nella spugna è presente in un range da 1-10µm/g di peso bagnato (Cerrano et al.,1999). L'acido è continuamente rilasciato dall'ectosoma, soprattutto quando la spugna è disturbata (Bavestrello et al.,1995) e in ambiente alcalino come l'acqua di mare pH tra 7-8 viene spontaneamente trasformato in ossalato di calcio. (Cerrano et al., 1999) L'acido ascorbico è un'agente riducente nell'idrossilazione della prolina durante la sintesi del collagene; sembra favorire lo scioglimento solo del quarzo non della silice amorfa (spicole), infatti le spicole all'interno dell'coanosoma sono perfettamente intatte, trattenute per rafforzare la struttura della spugna

proteggendole dalla degradazione marina. Il fatto che da aprile a giugno ci fosse una produzione così alta di oxalato sull'ectosoma identifica che ci sia stata qualche elemento di disturbo per *C.reniformis*, potrebbe trattarsi di uno stress di tipo ambientale, dato dalla diminuzione della salinità per ingenti apporti d'acqua dolce e conseguente aumento di nutrienti e quindi fenomeni di eutrofizzazione, quindi acqua troppo ricca di particolato e alghe, che ha reso più difficoltosa l'incorporazione. Grazie al SEM sono state osservate diatomee *Skeletonema* spp. nel corpo acquifero della spugna e questo ha confermato l'ipotesi fatta precedentemente, i frustuli erano rovinati, ma non sciolti quindi le usa come fonte trofica e non di silice in linea con quanto studiato nelle relazioni tra diatomee e spugne antartiche da Cerrano et al.,2004 .

Nelle spugne cornee, particelle inorganiche estranee sono incorporate nelle fibre spongistiche e nell'ectosoma, mentre in *C. reniformis*, formano uno strato sotto la superficie della spugna. (Bavestrello et al.,1996).

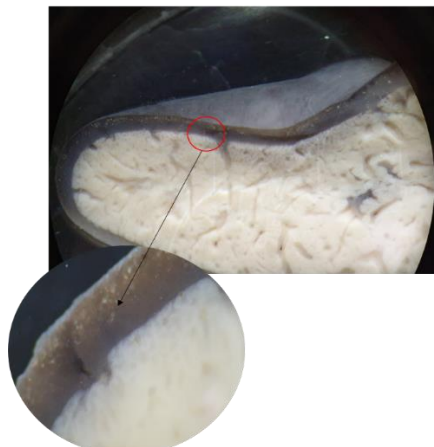


Fig5.1: formazione del layer di sedimenti in *C.reniformis*

Le sezioni al microtomo hanno evidenziato che i granelli sono disposti in maniera circolare, il che potrebbe essere dovuto all'azione degli esopinacociti che formano un anello intorno ai granelli e mano a mano che i granelli affondano nella matrice corticale collagena della spugna, l'anello cellulare si restringe fino a quando il grano è completamente incorporato. (Fig.5 D) Infine, l'esopinacoderma ritorna al suo stato originale (Bavestrello et al.,2003).

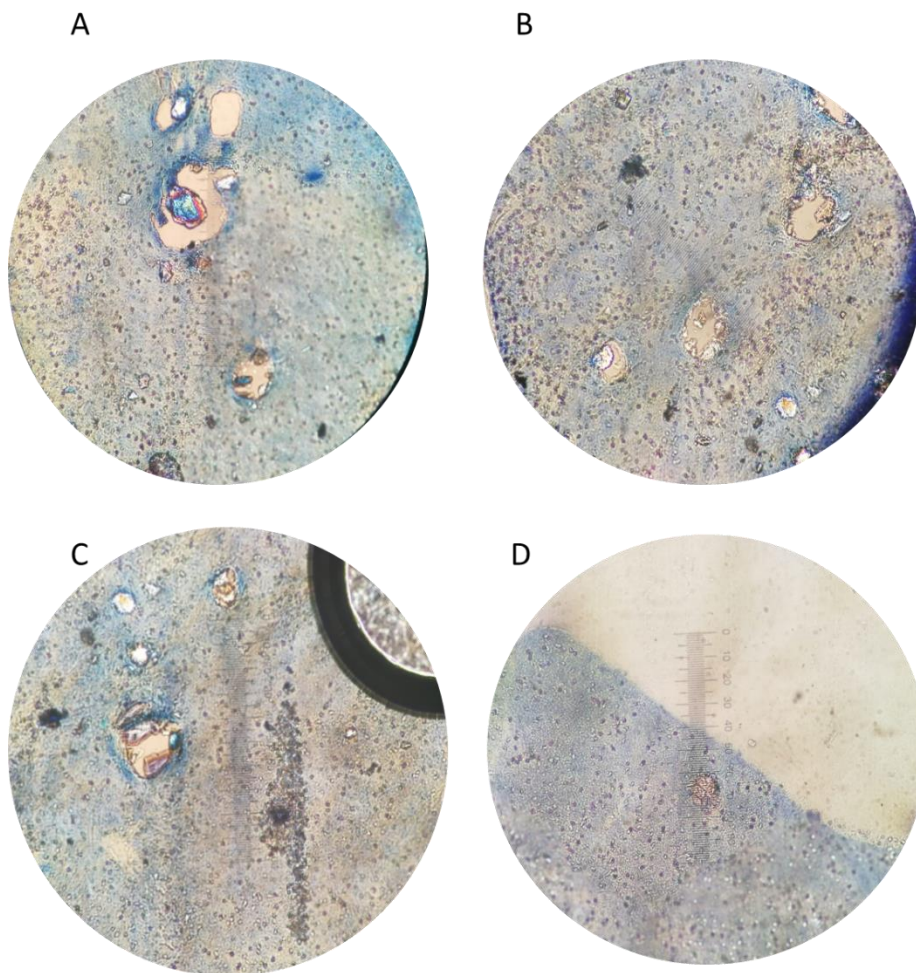


Fig.5.2: sezioni al microtomo di coanosoma di *Chondrosia reniformis*

6. CONCLUSIONI

Chondrosia reniformis, si conferma in questo studio, essere un organismo dotato di una plasticità sorprendente. Si riesce ad adattare ad ambienti diversi, tassi di sedimentazione variabili e composizione del sedimento differente. L'andamento durante l'anno della quantità di frazione inorganica e silicea nella Riviera del Conero conferma gli alti tassi di sedimentazione presenti il che apre nuove ipotesi e domande su come *Chondrosia* riesca a bloccare l'eccesso di sedimento al di là di dell'espulsione di particelle dal sistema acquifero potrebbe attuare una serie di strategie attive come descritto in altre spugne da Bell et al.,2015, come la produzione di muco, la chiusura degli osculi, o la regressione del tessuto per diminuire la superficie di deposito del sedimento, o ancora il passaggio del sedimento fine per canali che evitino i coanociti per evitarne l'occlusione. (Bavestrello, Burlando e Sara,1988; Hammelet al., 2012) Un'alternativa è che potrebbero bastare meccanismi passivi come la pulizia della superficie dovuta a correnti, la morfologia e orientamento della spugna. (Bell et al.2015).

Le analisi svolte hanno evidenziato che la quantità di sedimento inorganico e siliceo varia tra ectosoma ed coanosoma, essendo maggiormente presente nel primo e selezionato poi nel secondo, questo cambiamento è dovuto alle condizioni meteo marine, moto ondoso, ma anche attività di pesce, essendo

l'Adriatico un mare molto sfruttato, metodologie come strascico e dragaggio condizionano la sospensione e rimescolamento dei sedimenti. Gli apporti fluviali sono una fonte di silt e sostanze organiche e anche in funzione di questi varia sia la composizione del sedimento che la quantità. Il confronto con diversi bacini Isole Eolie e Punta Lea evidenziano nuovamente l'adattabilità della spugna che nel Tirreno cresce sfruttando la poca silice presente. L'associazione con le diatomee rende questa spugna ancora più interessante, potrebbe infatti favorire la crescita delle diatomee che sfruttano la silice eliminata da *C.reniformis* dopo lo scioglimento del quarzo. Le diatomee sono organismi necessari per rimuovere l'eccesso di CO₂ presente nei mari. E' perciò fondamentale stabilire la presenza di possibili riserve di assorbimento biologico di silice oltre agli scheletri di diatomee, radiolari. Il progetto europeo sponGES ha stimato che le spugne siano una riserva di silice di 48 milioni di tonnellate l'anno, tramite frammenti dei loro scheletri e collagene aumentano la disponibilità di silice in oceano del 28%. Il ruolo ecologico di *C. reniformis* risulta quindi importante soprattutto per il ciclo biogeochimico del Si nelle acque costiere, dove questo elemento diminuisce velocemente durante blooms fitoplanctonici e pressione dei grazers (Schules et al., 2010) a maggior ragione in un bacino come Riviera del Conero che è così soggetto a stagionali blooms fitoplanctonici. Questa ricerca è un'ulteriore prova di quanto l'habitat marino

sia governato da fragili ma potenti equilibri e che le relazioni tra organismi e ambiente si evolvono continuamente. Ci sono sicuramente ancora molti aspetti da approfondire, considerando che questa specie un ruolo fondamentale nell'ambiente bentonico della Riviera del Conero.

7 APPENDICE:

7.1 Protocollo di inclusione

1. FISSAZIONE

- Scegliere pezzi < 0.5 cm
- Passaggio in glutaraldeide 2,5 % tamponata a pH 7.8 per 12-24 ore

2. SALITA

- 6 ore 50°
- 24 ore 70°
- 24 ore 80°
- 24 ore 90°
- 24 ore 95°
- 24 ore 100°
- 24 ore 100° - Resina pura (Technovit 8100) (Non contaminare resina con alcool o acqua, usare sempre pipette pulite)

- 24 ore Resina pura (Technovit 8100)
- 24 ore Resina pura (Technovit 8100)

3. RESINA DA INFILTRAZIONE

- Preparare resina di infiltrazione (sotto cappa): 100 cc Resina pura (Technovit 8100) + 1 bustina Hardner I. Agitare con magnete pulito e asciutto per 15 minuti in beker pulito e asciutto. Riporre in barattolo di vetro e mettere un'etichetta con data di preparazione. Si può mantenere in frigo per diversi mesi (quando diventa gialla cambiarla).

4. INCLUSIONE

- Pulire la superficie della piastra in TEK dalla polvere e dai residui di colla
- Fare schema della disposizione dei campioni su foglio di carta
- Preparare a lato del piano di lavoro diversi foglietti di plastica di copertura dei pozzetti
- Preparare resina di inclusione: 15 cc di resina di infiltrazione (misurata in un cilindro graduato pulito e asciutto) + 0.5 cc di Hardner II (preso con micro pipetta con puntale blu nuovo). Agitare con magnete pulito e asciutto per circa 30 sec-1 min fino a quando il liquido non diventa leggermente azzurro. Tempo disponibile: max 20 minuti.

- Con l'aiuto di una pipetta Pasteur pulita a punta spezzata riempire il fondo dei pozzetti
- Con una pinzetta pulita e asciutta disporre i campioni nei pozzetti cercando di mantenerli il più centrale possibile (ad eccezione dei pezzi che vanno tagliati in verticale che posso essere appoggiati anche a un bordo, basta che non sia la punta del pozzetto)
- Con l'aiuto della pipetta Pasteur riempire i pozzetti di resina facendo attenzione a non creare delle bolle. Far colare la resina piano e in maniera continua da un bordo del pozzetto. Se si formano bolle romperle. Se necessario aggiustare la posizione del pezzo incluso. Riempire i pozzetti fino a far leggermente traboccare la resina nel margine rettangolare esterno del pozzetto.
- Coprire i pozzetti con i foglietti di plastica utilizzando una pinzetta asciutta
- Disporre la piastra in frigo in un ripiano basso in posizione perfettamente orizzontale per 1 notte. Controllare ogni tanto che la condensa non si infiltri nei pozzetti facendo diventare la resina rosa. Eventualmente tamponare leggermente con un po' di carta assorbente.

- 5. COLLA** (Preparare la colla in un barattolo di vetro asciutto. Mescolare 2 parti di polvere gialla e 1 parte di liquido Technovit 3040 (per 10 pozzetti in genere 18 cc di polvere + 9 cc di liquido))
- Mescolare rapidamente: coprire la superficie dei pozzetti, disporre i cavalierini, versare un po' di colla al centro dei supporti (non eccessivamente)
 - Lasciare indurire sotto cappa per 12-24 ore

6. TAGLIO E COLORAZIONE:

- Tagliare i blocchetti di resina sul microtomo con una lama D in acciaio o tungsteno (fette migliori comprese tra 5-10 μm). Aiutarsi con un pennello per far scorrere le fette sulla lama.
- Selezionare le fette e disporle su un vetrino precedentemente coperto con acqua distillata. Far asciugare le fette su una piastra.
- Colorare le fette con Blu di Toluidina diluito per meno di 1 minuto, sciacquarle e farle asciugare su una piastra.
- Chiudere con Eukitt.

BIBLIOGRAFIA

Bavestrello, G., Arillo, A., Benatti, U., Cerrano, C., Cattaneo-Vietti, R., Cortesognoi, L., ... & Sarà, M. (1995). Quartz dissolution by the sponge *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae). *Nature*, 378(6555), 374-376.

Bavestrello, G., Benatti, U., Calcinai, B., Cattaneo-Vietti, R., Cerrano, C., Favre, A., & Sarà, M. (1998). Body polarity and mineral selectivity in the demosponge *Chondrosia reniformis*. *The Biological Bulletin*, 195(2), 120-125.

Bavestrello, G., Benatti, U., Cattaneo-Vietti, R., Cerrano, C., & Giovine, M. (2003). Sponge cell reactivity to various forms of silica. *Microscopy research and technique*, 62(4), 327-335.

Bavestrello, G., Cerrano, C., Cattaneo-Vietti, R., Sara, M., Calabria, F., & Cortesogno, L. (1996). Selective incorporation of foreign material in *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae). *Italian Journal of Zoology*, 63(3), 215-220.

Bell, J. J., McGrath, E., Biggerstaff, A., Bates, T., Bennett, H., Marlow, J., & Shaffer, M. (2015). Sediment impacts on marine sponges. *Marine pollution bulletin*, 94(1-2), 5-13.

Bonasoro, F., Wilkie, I. C., Bavestrello, G., Cerrano, C., & Carnevali, M. D. C. (2001). Dynamic structure of the mesohyl in the sponge *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae). *Zoomorphology*, 121(2), 109-121.

Cattaneo, A., Correggiari, A., Langone, L., & Trincardi, F. (2003). The late-Holocene Gargano subaqueous delta, Adriatic shelf: sediment pathways and supply fluctuations. *Marine Geology*, 193(1-2), 61-91.

Cerrano C., Bavestrello G., Arillo A, Benatti U, Bonpadre S, Cattaneo-Vietti, R., Sarà, M. (1999). Calcium oxalate production in the marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Marine Ecology Progress Series*, 179, 297–300.

Cerrano C., Bavestrello G., Benatti U., Cattaneo-Vietti R, Giovine M, Sarà M (1999) Incorporation of inorganic matter in *Chondrosia reniformis* (Porifera: demospongia: the role of water turbulence. *Memories of the Queensland Museum* 44: 85-90. Brisbane.

Cerrano, C., Calcinai, B., Cucchiari, E., Camillo, C. D., Nigro, M., Regoli, F., & Bavestrello, G. (2004). Are diatoms a food source for Antarctic sponges?. *Chemistry and Ecology*, 20(sup1), 57-64.

Cerrano, C., Calcinai, B., Cucchiari, E., Di Camillo, C., Totti, C., & Bavestrello, G. (2004). The diversity of relationships between Antarctic sponges and diatoms: the case of *Mycale acerata* Kirkpatrick, 1907 (Porifera, Demospongiae). *Polar Biology*, 27(4), 231-237.

Cerrano, C., Calcinai, B., Di Camillo, C. G., Valisano, L., & Bavestrello, G. (2007). How and why do sponges incorporate foreign material? Strategies in Porifera. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. Série Livros*, 28, 239-246.

Di Camillo, C. G., & Cerrano, C. (2015). Mass mortality events in the NW Adriatic Sea: phase shift from slow-to fast-growing organisms. *PloS one*, 10(5).

Di Camillo, C. G., Cerrano, C., Romagnoli, T., & Calcinai, B. (2017). Living inside a sponge skeleton: the association of a sponge, a macroalga and a diatom. *Symbiosis*, 71(3), 185-198.

Diehl-Seifert, B., Kurelec, B., Zahn, R. K., Dorn, A., Jericevic, B., Uhlenbruck, G., & Muller, W. E. (1985). Attachment of sponge cells to collagen substrata: effect of a collagen assembly factor. *Journal of cell science*, 79(1), 271-285.

Ehrlich, H., Demadis, K. D., Pokrovsky, O. S., & Koutsoukos, P. G. (2010). Modern views on desilicification: biosilica and abiotic silica dissolution in natural and artificial environments. *Chemical Reviews*, 110(8), 4656-4689.

Ehrlich, H., Deutzmann, R., Brunner, E., Cappellini, E., Koon, H., Solazzo, C., & Baessmann, C. (2010). Mineralization of the metre-long biosilica structures of glass sponges is templated on hydroxylated collagen. *Nature chemistry*, 2(12), 1084-1088.

Fassini, D., Duarte, A. R. C., Reis, R. L., & Silva, T. H. (2017). Bioinspiring *chondrosia reniformis* (nardo, 1847) collagen-based hydrogel: A new extraction method to obtain a sticky and self-healing collagenous material. *Marine drugs*, 15(12), 380.

Fassini, D., Parma, L., Wilkie, I. C., Bavestrello, G., Bonasoro, F., & Carnevali, M. D. C. (2012). Ecophysiology of mesohyl creep in the demosponge

Chondrosia reniformis (Porifera: Chondrosida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 428, 24-31.

Fassini, D., Parma, L., Lembo, F., Carnevali, M. D. C., Wilkie, I. C., & Bonasoro, F. (2014). The reaction of the sponge *Chondrosia reniformis* to mechanical stimulation is mediated by the outer epithelium and the release of stiffening factor (s). *Zoology*, 117(4), 282-291.

Fenoglio, I., Fubini, B., Tiozzo, R., & Di Renzo, F. (2000). Effect of micromorphology and surface reactivity of several unusual forms of crystalline silica on the toxicity to a monocyte-macrophage tumor cell line. *Inhalation toxicology*, 12(sup3), 81-89.

Genta-Jouve, G., Cachet, N., Oberhänsli, F., Noyer, C., Teyssié, J. L., Thomas, O. P., & Lacoue-Labarthe, T. (2012). Comparative bioaccumulation kinetics of trace elements in Mediterranean marine sponges. *Chemosphere*, 89(3), 340-349.

Garrone, R., Huc, A., & Junqua, S. (1975). Fine structure and physicochemical studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo. *Journal of ultrastructure research*, 52(2), 261-275.

Giovine, M., Scarfi, S., Pozzolini, M., Penna, A., & Cerrano, C. (2013). Cell reactivity to different silica. In *Biomedical Inorganic Polymers* (pp. 143-174). Springer, Berlin, Heidelberg.

Jesionowski, T., Norman, M., Żółtowska-Aksamitowska, S., Petrenko, I., Joseph, Y., & Ehrlich, H. (2018). Marine spongin: Naturally prefabricated 3D scaffold-based biomaterial. *Marine drugs*, 16(3), 88.

Heinemann, S., Ehrlich, H., Douglas, T., Heinemann, C., Worch, H., Schatton, W., & Hanke, T. (2007). Ultrastructural studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo. *Biomacromolecules*, 8(11), 3452-3457.

Imhoff, J. M., & Garrone, R. (1983). Solubilization and characterization of *Chondrosia reniformis* sponge collagen. *Connective tissue research*, 11(2-3), 193-197.

Kamatani, A. (1974). Studies on the dissolution of diatomaceous silica as a function of heating. *Journal of Oceanography*, 30(4), 157-162.

Lucchetti, G., Gaggero, L., & Bavestrelló, G. Minerogenetic activity of the marine sponge *Chondrosia reniformis* and local.

Nickel, M., & Brümmer, F. (2003). In vitro sponge fragment culture of *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847). *Journal of Biotechnology*, 100(2), 147-159.

Osinga, R., Kotterman, M. (2007) Ferric iron promotes the formation of oscules: observations on sponges in aquaria. In: Custódio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G (eds) *Porifera Research. Biodiversity, Innovation and Sustainability*. Livros de Museu Nacional 28, Rio de Janeiro, pp 497-502.

Penna, A., Magnani, M., Fenoglio, I., Fubini, B., Cerrano, C., Giovine, M., & Bavestrello, G. (2003). Marine diatom growth on different forms of particulate silica: evidence of cell/particle interaction. *Aquatic microbial ecology*, 32(3), 299-306.

Petović, S., Marković, O., Ikica, Z., Đurović, M., & Joksimović, A. (2016). effects of bottom trawling on the benthic assemblages in the south Adriatic Sea (Montenegro). *Acta Adriatica*, 57(1).

Pozzolini, M., Bruzzone, F., Berilli, V., Mussino, F., Cerrano, C., Benatti, U., & Giovine, M. (2012). Molecular characterization of a nonfibrillar collagen from the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo 1847 and positive effects of soluble silicates on its expression. *Marine biotechnology*, 14(3), 281-293.

Pozzolini, M., Ferrando, S., Gallus, L., Gambardella, C., Ghignone, S., & Giovine, M. (2016). Aquaporin in *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847 and its possible role in the interaction between cells and engulfed siliceous particles. *The Biological Bulletin*, 230(3), 220-232.

Rizzoli, P. M., & Bergamasco, A. (1983). The dynamics of the coastal region of the northern Adriatic Sea. *Journal of Physical Oceanography*, 13(7), 1105-1130.

Sarà, M., Bavestrello, G., Cattaneovietti, R., & Cerrano, C. (1998). Review article Endosymbiosis in Sponges: Relevance for Epigenesis and Evolution. *Symbiosis*.

Schönberg, C. H. L. (2016). Happy relationships between marine sponges and sediments—a review and some observations from Australia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(2), 493-514.

Schulze, F. E. (1879). Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Spongien. Siebente Mittheilung Die Familie der Spongidae. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 32, 593-600.

Silva, J. C., Barros, A. A., Aroso, I. M., Fassini, D., Silva, T. H., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2016). Extraction of collagen/gelatin from the marine demosponge *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847) using water acidified with carbon dioxide—process optimization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(25), 6922-6930.

Strehlow, B. W., Pineda, M. C., Duckworth, A., Kendrick, G. A., Renton, M., Wahab, M. A. A., ... & Clode, P. L. (2017). Sediment tolerance mechanisms identified in sponges using advanced imaging techniques. *PeerJ*, 5, e3904.

Teragawa, C. K. (1986). Sponge dermal membrane morphology: histology of cell-mediated particle transport during skeletal growth. *Journal of morphology*, 190(3), 335-347.

Wilkie, I. C., Parma, L., Bonasoro, F., Bavestrello, G., Cerrano, C., & Carnevali, M. C. (2006). Mechanical adaptability of a sponge extracellular matrix: evidence for cellular control of mesohyl stiffness in *Chondrosia reniformis* Nardo. *Journal of experimental biology*, 209(22), 4436