

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dip. di Biomedicina comparata e Alimentazione

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per  
l'Alimentazione

## Caratterizzazione del microbiota intestinale di specie di pesci pappagallo

Relatore

Prof. ssa Maria Elena Martino

Correlatore

Dott. Andrea Quagliariello

Laureanda

Virginia Chiari

Matricola n.

2055418

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



## RIASSUNTO

I pesci pappagallo o Scaridi sono pesci marini che vivono nelle aree tropicali, in associazione con le barriere coralline, e tra le loro caratteristiche distintive è possibile annoverare le colorazioni vivaci e brillanti, e una bocca dotata di un becco osseo. Questa bocca permette loro di raschiare la superficie dei coralli per nutrirsi di alghe, di detriti o di particolato depositato sui coralli stessi. Tale strategia alimentare, da un lato, aiuta le barriere coralline a rigenerarsi e a rimanere in buone condizioni, dall'altro permette agli Scaridi di produrre buona parte del sedimento corallino che costituisce la sabbia bianca dei tropici. Negli ultimi anni, la comunità scientifica si è mossa per capire se e in che misura il microbiota intestinale di questi pesci sia coinvolto in questo processo. L'obiettivo principale della nostra ricerca è quello di effettuare una caratterizzazione, mediante estrazione e sequenziamento del DNA batterico, del microbiota intestinale di diverse specie di pesce pappagallo.

## ABSTRACT

Parrotfishes, or Scaridae, are marine fishes that live in tropical areas, in association with coral reefs; among their distinctive features are their bright and vivid colors and the presence of a bone beak-like mouth. This particular trait allows the parrotfish to scrape the surface of corals to feed on algae, detritus or deposited particulate matter. This feeding strategy results in a two-fold beneficial effect: it helps maintain the coral reefs healthy, and allows the Scaridae to produce much of the coral sediment that makes up the white sand of the tropics. In recent years, the scientific community has moved to understand whether and to what extent the gut microbiota of these fishes is involved in this process. The main focus of our research is the characterization, through bacterial DNA extraction and sequencing, of the gut microbiota of different species of parrotfish.

## INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Biologia dei pesci pappagallo.....	1
1.1.1 Caratterizzazione dei pesci pappagallo.....	1
1.1.2 Strategie nutritive dei pesci pappagallo.....	5
1.1.3 Ruolo dei pesci pappagallo all'interno dell'ecologia marina.....	7
1.2 Ecosistema della barriera corallina.....	10
1.2.1 Caratterizzazione della barriera corallina.....	10
1.2.2 Ruolo dei pesci pappagallo nel mantenimento dell'ecosistema della barriera corallina.....	13
1.3 Microbiota intestinale dei pesci pappagallo.....	15
1.3.1 Cos'è il microbiota.....	15
1.3.2 Influenza delle strategie nutritive dei pesci pappagallo sul loro microbiota intestinale.....	17
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	19
3. MATERIALI E METODI.....	20
3.1 Campionamento.....	20
3.2 Estrazione del DNA.....	22
3.3 Valutazione quantitativa e qualitativa del DNA estratto tramite Nanodrop.....	24
3.4 Amplificazione del DNA tramite PCR e sequenziamento.....	25
3.5 Analisi bioinformatiche.....	26
4. RISULTATI.....	28
4.1 Valutazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto tramite Nanodrop.....	28
4.2 Amplificazione e PCR.....	31
a. Analisi bioinformatiche.....	33
5. DISCUSSIONE.....	36
6. CONCLUSIONE.....	38
7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	39



## 1. INTRODUZIONE

### 1.1. Biologia dei pesci pappagallo

#### 1.1.1 Caratterizzazione dei pesci pappagallo

Con il termine “pesce pappagallo” si intende una serie di pesci di mare dell’ordine *Perciformes*, sottordine *Labroidei*, facenti parte della famiglia degli Scaridi (*Scaridae*). Gli Scaridi sono a loro volta suddivisi per ragioni di tipo ecologico in due tribù o sottofamiglie: gli *Scarini*, di cui fanno parte i generi *Bolbometopon*, *Cetoscarus*, *Chlorurus*, *Hipposcarus* e *Scarus*, e gli *Sparisomatini*, di cui fanno parte i generi *Calotomus*, *Cryptotomus*, *Leptoscarus*, *Nicholsina* e *Sparisoma* (Bellwood D. R., 1994). Le motivazioni che hanno portato alla suddivisione in queste due tribù sono legate principalmente a fattori di tipo ambientale ed ecologico, come ad esempio il fatto che gli individui facenti parte degli *Scarini* sono per la maggior parte diffusi nelle regioni dell’Indo-Pacifico, così come i generi *Leptoscarus* e *Calotomus*, mentre gli altri *Sparisomatini* sono maggiormente diffusi nell’area dell’Oceano Atlantico. Un’altra caratteristica che li distingue e li differenzia è che gli *Scarini* vivono in ambienti corallini e rocciosi, mentre la maggior parte degli *Sparisomatini* abita ambienti dominati da alghe e altre piante marine (Viviani J., 2019, *Evolutionary dynamics of the dentition in relationship with habitat, behaviour and diet in parrotfishes (Scarinae, Labriformes)*. Animal biology, Université de Lyon).

Questa suddivisione sembra dettata anche dall’evoluzione del rapporto tra habitat e modalità di alimentazione e dal loro “*feeding habit*”, e in questo senso molti studi filogenetici suggeriscono un passaggio graduale dai *browsers* che vivono in ambienti dominati da piante marine, agli *excavators* che abitano le barriere

rocciose e/o coralline, fino agli *scrapers*, i quali si trovano esclusivamente in associazione coi coralli (Streelman J. T. et al., 2002).

L'analisi filogenetica della distribuzione geografica suggerisce che i pesci pappagallo hanno avuto origine nel Mare della Tetide orientale (il precursore dell'Indo-Pacifico), e che la loro separazione nelle due sottofamiglie di cui abbiamo parlato in precedenza è probabilmente avvenuta durante l'Eocene, in relazione alle diverse preferenze di habitat. Al giorno d'oggi i pesci pappagallo sono principalmente diffusi in aree tropicali, ad eccezione di una specie che vive nel mar Mediterraneo, lo *Sparisoma cretense* (Viviani J., 2019).

Gli Scaridi sono caratterizzati, in generale, da un corpo dalla forma ovale, lievemente allungato e compresso sui fianchi; presentano inoltre, nella maggior parte dei casi, una pinna dorsale piuttosto allungata, e una pinna anale dalle dimensioni più contenute. Le dimensioni del corpo variano enormemente in base alla specie, possono andare dai pochi centimetri, fino al metro e mezzo di lunghezza nel caso di *Bolbometopon muricatum*.

La caratteristica distintiva dei pesci appartenenti a questa famiglia, che gli ha fatto guadagnare nell'uso comune il nome di "pesci pappagallo", è la bocca. I due gruppi principali hanno seguito percorsi evolutivi distinti in termini di anatomia cranica: negli *Sparisomatini*, ad eccezione di alcune specie di *Sparisoma*, in particolare *S. viride*, le mascelle orali presentano denti in file oblique senza alcuna evidenza di cementazione esterna; le ossa che compongono la mascella inferiore, e gli adduttori mandibolari (muscoli della guancia responsabili della chiusura della mascella) presentano la tipica forma dei Labridi. Negli *Scarini* invece, e in alcuni *Sparisoma*, i denti formano un mosaico di file verticali e oblique con la faccia esterna delle mascelle rivestita di cemento dentale (Streelman J. T. et al., 2002).

I denti della mascella superiore e inferiore sono fusi a formare un bordo tagliente nei generi *Leptoscarus*, *Sparisoma*, *Cetoscarus*, *Bolbometopon*, *Hipposcarus*,



*Chlorurus* e *Scarus*, conferendo alle mascelle un aspetto caratteristico a forma di becco, mentre nei rimanenti generi i denti sono separati tra loro e caniniformi (n.b. fa eccezione *Calotomus*, provvisto di denti appiattiti). I pesci appartenenti al secondo gruppo sono principalmente quelli che abitano ambienti dominati da alghe e piante marine, mentre tutti i taxa che posseggono il “becco” (ad eccezione di alcuni *Sparisoma*) sono abitanti della barriera corallina, suggerendo di fatto una relazione tra l’anatomia dell’apparato boccale e la modalità di alimentazione. La struttura a forma di becco dei pesci pappagallo è fondamentale per consentire a questi animali di raschiare la superficie dei coralli e delle rocce, permettendo loro di nutrirsi di ciò che vi è depositato in superficie, come ad esempio alghe, microrganismi, detriti (Hoey A. S., Bonaldo R. M., 2018. *Biology of parrotfishes*. Boca Raton. CRC Press, Taylor and Francis Group).

Un’altra caratteristica peculiare dei pesci appartenenti a questa famiglia, e in generale dei pesci che vivono nella barriera corallina, sono le colorazioni vivaci e brillanti. Secondo uno studio condotto da *Endler* (1978) il pattern dei colori ha tre funzioni principali: la termoregolazione, facilitare la comunicazione tra i membri della stessa specie, ad esempio per agevolare i rituali di accoppiamento, e infine allontanare i predatori. È importante sottolineare che, nella maggior parte dei casi, le colorazioni cambiano nel corso della vita dei pesci, e questo ha portato negli anni a una maggiore difficoltà nella classificazione tassonomica delle varie specie (Sabbagh S. M., 2013. *Significance of colors and patterns of coral reef fishes: an overview*).

Nel caso dei pesci pappagallo, la maggior parte delle specie presentano differenti colorazioni in base al sesso e alle diverse fasi della maturazione sessuale; nello specifico, il cambiamento di colore sembra essere associato coi cambiamenti ormonali. In questi pesci il cambiamento di colorazione è particolarmente evidente in quanto tutte le specie, ad eccezione di *Leptoscarus*, vanno incontro a un cambiamento di sesso durante il corso della loro vita.

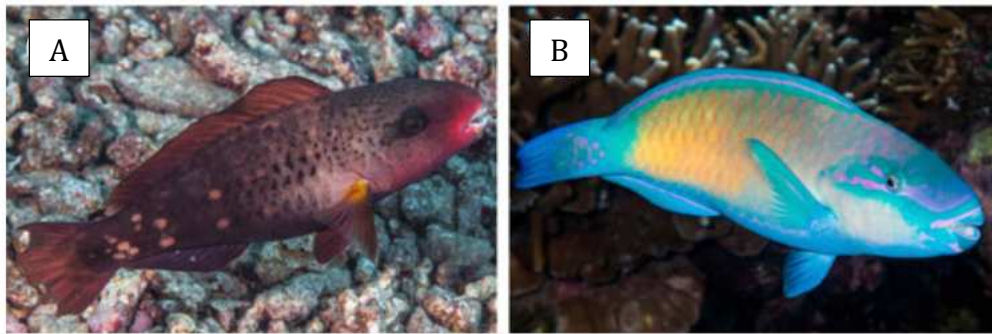


Figura 1. In figura viene messo in evidenza il cambiamento di colore tra la fase iniziale (A) e la fase terminale (B) in *Chlorurus spilurus* (Hodge J. R. et al., 2020).

Nel corso di vari studi è stato osservato e messo in luce che l'ermafroditismo sequenziale è accompagnato da un cambiamento della colorazione, da quella della "fase iniziale" associata alle femmine, alla colorazione della "fase terminale" associata ai maschi. Ad ogni modo, ci sono casi in cui i maschi non cambiano colore nello stesso momento in cui cambiano sesso (Cardwell J. R., Liley N. R., 1991).

I pesci sono gli unici esemplari, tra i vertebrati, a essere in grado di mettere in atto un cambio di sesso nel corso della loro vita, di solito partendo come femmine e poi evolvendosi in maschi. Questo sembra dovuto principalmente a vantaggi riproduttivi legati alla taglia dell'animale, e al fatto che i maschi sono in grado di fornire protezione alle compagne e di garantire loro risorse, assicurandosi un territorio con sufficiente cibo e un riparo (<https://www.sciencedaily.com/releases/2020/03/200309165239.htm>).

Per quanto riguarda la riproduzione, alcune specie di Scaridi si spostano in aree specifiche, solitamente nei fondali marini, in grandi aggregazioni riproduttive, nelle quali ogni femmina produce un numero elevato di uova che vengono fecondate dallo sperma rilasciato dai maschi. Dopo circa un giorno, le uova si schiudono e vengono rilasciate le forme larvali, ovvero la forma di dispersione dell'animale nell'ambiente marino. A partire dalle larve inizia poi un ciclo di maturazione dell'animale, fino al raggiungimento della forma adulta.

### 1.1.2 Strategie nutritive dei pesci pappagallo

Come abbiamo visto in precedenza, la maggior parte dei pesci pappagallo vive in associazione e/o in ambienti marini dominati da coralli. Una grande percentuale del substrato calcareo della barriera corallina è colonizzata da piccole alghe filamentose e da un insieme di microrganismi autotrofi noti collettivamente come endoliti, tra cui si possono trovare i cianobatteri (Nicholson G. M. et al., 2022).

Inizialmente i pesci pappagallo sono stati classificati come corallivori, ma successivamente sono stati riconosciuti come erbivori a causa dell'elevata ingestione di alghe e altre piante marine (Viviani J., 2019). Tuttavia, recenti studi e osservazioni sull'ecologia trofica di questi pesci hanno messo in luce una nuova ipotesi, sostenuta da varie evidenze scientifiche: al giorno d'oggi gli Scaridi sono considerati dei microfagi (Clements K. D. et al., 2016).

Questa ipotesi è coerente con i risultati delle analisi del contenuto intestinale di varie specie di pesci pappagallo: nell'intestino di questi esemplari sono state ritrovate ingenti quantità di sedimento inorganico e di materiale organico microscopico; presentano inoltre alte quantità di acido vaccenico, un acido grasso che viene utilizzato per tracciare la presenza di microrganismi nelle reti alimentari bentoniche ed è considerato un biomarcatore per i cianobatteri. Inoltre, l'anatomia della bocca e della faringe indica che questi pesci presentano un meccanismo unico di alimentarsi, essendo in grado di trattenere e triturare elementi alimentari di dimensioni microscopiche.

I principali target alimentari dei pesci pappagallo sembrano essere dunque gli autotrofi microscopici epilittici ed endolittici presenti sul substrato calcareo della barriera corallina, come i cianobatteri, e in misura minore anche le macroalghe e i detriti; questo perché i cianobatteri crescono molto rapidamente e presentano un contenuto proteico maggiore rispetto alle alghe macroscopiche (Clements K. D. et al., 2016).

Dopo aver stabilito che i pesci pappagallo sono considerati dei microfagi, è necessario andare più in profondità nella caratterizzazione delle strategie nutritive e fare un'ulteriore suddivisione, in quanto questi animali si differenziano nelle modalità con cui si procurano il nutrimento. La maggior parte degli *Sparisomatini*, ad eccezione di *Sparisoma* (ad esempio *S. viride* è un *excavator*), utilizzano i denti per rimuovere alghe epilitiche e/o macroalghe dal substrato minerale senza raschiarlo, e sono per questo motivo classificati come "*browsers*". Gli *Scarini*, al contrario, raschiano il substrato minerale mentre si alimentano della matrice algale, e in base alla modalità con cui lo fanno sono a loro volta suddivisi in due ulteriori gruppi: gli "*scrapers*", che effettuano dei morsi piuttosto superficiali, e gli "*excavators*" che invece rimuovono porzioni piuttosto consistenti del substrato.

Gli *scrapers* eseguono un morso che non provoca lesioni profonde e possiedono articolazioni della mascella mobili e complesse, con una muscolatura non eccessivamente sviluppata. Al contrario gli *excavators* sono dotati di mascelle piuttosto robuste e muscoli dell'apparato boccale massicci, che permettono di generare dei morsi molto potenti (Streelman J. T. et al., 2002).

Riassumendo, i target alimentari principali degli *scrapers* e degli *excavators* sono gli endoliti, ottenuti raschiando le superfici calcaree delle barriere coralline, mentre i *browsers* si nutrono prevalentemente di alghe epilitiche, di macroalghe e di detriti.

In aggiunta, è importante riportare che talvolta i pesci pappagallo manifestano abitudini predatorie, soprattutto nei confronti di coralli vivi e spugne; questo potrebbe essere dovuto al fatto che in questi organismi è abbondante la presenza di cianobatteri (Viviani J., 2019).

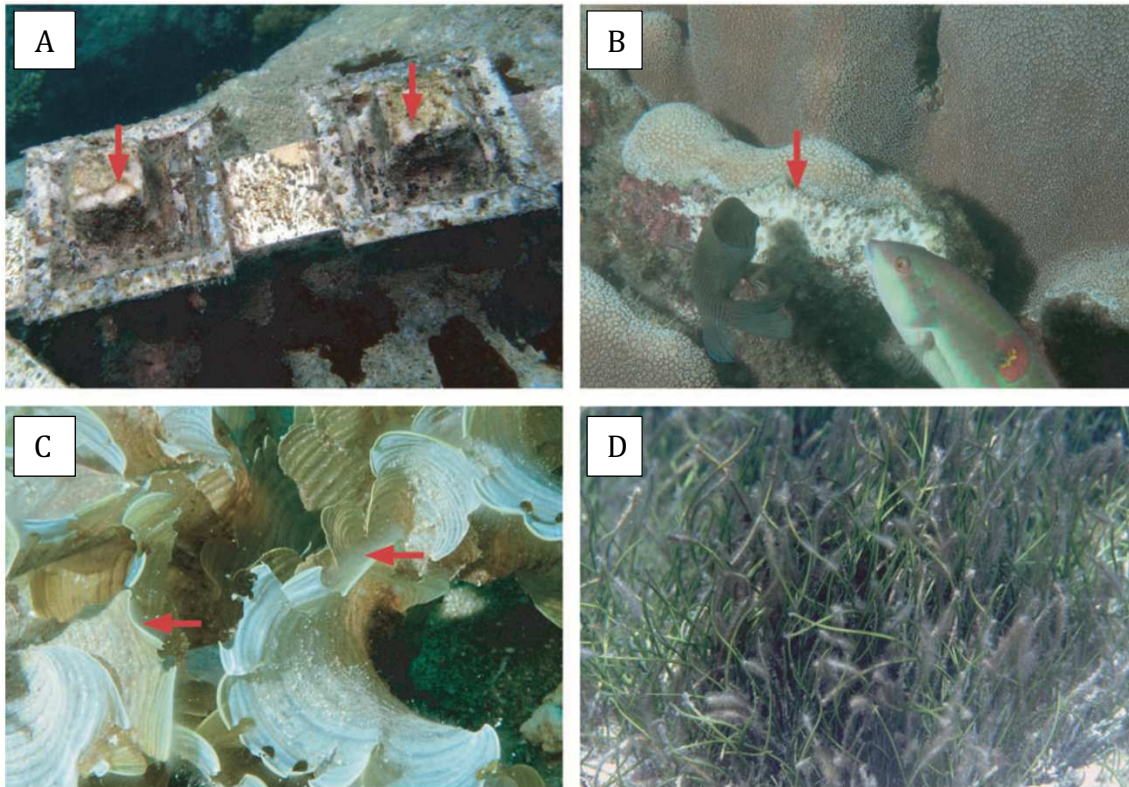


Figura 2. In figura è possibile notare: A) blocchi di corallo colonizzati da cianobatteri, le frecce rosse segnalano cicatrici lasciate dai morsi degli *excavators*; B) la freccia indica una cicatrice lasciata dal morso di un esemplare di *Scarus perrico*; C) la figura mostra la macroalga *Padina gymnospora*, coperta da epifiti cianobatterici (vedi le frecce); D) epifiti cianobatterici distribuiti sulle alghe, target alimentare dei *browsers* (Clements K. D. et al., 2016).

### 1.1.3 Ruolo dei pesci pappagallo all'interno dell'ecologia marina

Gli Scaridi sono una componente vitale degli ecosistemi marini tropicali e subtropicali e hanno un ruolo centrale nel mantenimento dell'equilibrio degli habitat corallini e delle praterie di alghe marine. Nello specifico, questi esemplari vanno a favorire e facilitare l'insediamento, la crescita e la resistenza dei coralli, controllando la proliferazione di quelle alghe che competono con i coralli per lo spazio vitale. Come abbiamo visto in precedenza, i pesci pappagallo si distinguono

in tre gruppi funzionali in base alle diverse modalità con cui si procurano il nutrimento, e questo si va a riflettere anche in un diverso impatto all'interno dell'ecologia marina: gli *scrapers* rimuovono le alghe erbacee raschiando la struttura carbonatica della barriera corallina, creando spazio e un microhabitat adatti alla selezione e al reclutamento dei coralli. I *browsers* hanno invece come target principale le macroalghe, controllandone così la crescita e l'espansione, ed evitando sia che queste vadano a danneggiare la barriera corallina, che la loro competizione con i coralli già esistenti per lo spazio. Infine, gli *excavators* scavano nella struttura carbonatica dei coralli per colpire gli endoliti, agendo in questo modo come importanti "bioeroditori" e svolgendo un ruolo chiave nella produzione dei sedimenti (Ruttenberg B. I. et al., 2019).

Lo sfregamento dei denti a forma di becco di questi pesci sulle rocce e sui coralli contribuisce quindi alla rimozione di alghe incrostanti, permettendo in questo modo di prevenire l'asfissia dei coralli e favorendone una crescita rigenerativa, impedendo alle alghe di prendere il sopravvento sugli ecosistemi, garantendo in questo modo una diversità di habitat per le altre specie marine. Inoltre, concorrono al mantenimento di uno stato di salute della barriera corallina, tramite il consumo di quelle spugne il cui ciclo nutritivo potrebbe coadiuvare una crescita eccessiva di alghe (Clements K. D. et al., 2016).

Gli Scaridi sono anche considerati degli "ingegneri ecologici" in quanto contribuiscono alla formazione e al mantenimento di zone di sabbia corallina, che possono fungere da aree di riproduzione e rifugio per altre specie marine, aiutando in questo modo a sostenere la biodiversità.

I pesci pappagallo sono infatti i principali produttori di sedimenti marini, generando oltre l'85% di nuovi sedimenti sabbiosi ogni anno. Questo processo è portato avanti principalmente dagli *excavators*, i quali triturano e ingoiano lo scheletro dei coralli, composto da carbonato di calcio, e rilasciano come sottoprodotto di escrezione quei sedimenti che contribuiscono alla composizione della sabbia delle spiagge dei tropici (Perry C. T. et al., 2015).

Questi pesci sono quindi centrali nel mantenimento dell'equilibrio dell'ecologia marina, e il declino delle varie popolazioni può portare a gravi conseguenze. In molte aree marine, la pesca intensiva e l'inquinamento hanno messo a rischio la sopravvivenza di questi animali. Nel corso del tempo è diventato quindi centrale limitare la pesca eccessiva, promuovere la ripopolazione e proteggere gli habitat critici per permettere la conservazione dei pesci pappagallo, e di conseguenza anche dell'ecologia marina nel suo complesso (Shantz A. A. et al., 2019).

## 1.2 Ecosistema della barriera corallina

### 1.2.1 Caratterizzazione della barriera corallina

Le barriere coralline sono tra gli ecosistemi maggiormente diversificati e importanti presenti negli oceani del nostro pianeta.

Si formano grazie all'accumulo di scheletri di corallo pietroso o *Scleractinia*, principalmente di specie appartenenti ai generi *Acropora*, *Porites*, e *Favia*, i quali sono costituiti da piccoli organismi coloniali chiamati polipi. I polipi sono strutturalmente simili alle anemoni di mare, e nei coralli si trovano all'interno di una struttura a forma di calice costituita da carbonato di calcio. Ciascun polipo è interconnesso ad un altro, costituendo una rete di tessuto vivente sullo scheletro calcareo. Quando i polipi muoiono, lasciano dietro di sé i propri scheletri che vengono poi colonizzati dai polipi viventi. Questi coralli sono responsabili della costruzione delle strutture complesse e ramificate che costituiscono la barriera corallina. (<https://www.britannica.com/science/coral-reef>)

La presenza di altre specie di coralli duri e molli, alghe coralline e organismi marini come pesci, tartarughe marine, crostacei, spugne e altri invertebrati, contribuisce alla biodiversità e alla struttura complessa di questo ecosistema, ed è un indicatore della sua salute e del suo funzionamento, poiché le interazioni tra le diverse specie contribuiscono alla stabilità e alla resilienza dell'ecosistema corallino.

Un fattore biologico particolarmente importante che aiuta la barriera corallina a prosperare e ingrandirsi è la presenza di zooxantelle nei tessuti viventi dei coralli. Le zooxantelle rappresentano gli stadi vegetativi delle alghe dinoflagellate, hanno un'associazione simbiotica coi coralli di barriera e svolgono la fotosintesi. Rimuovono alla fonte parte dell'anidride carbonica (insieme ad azoto, fosforo e zolfo) prodotta dalla decomposizione metabolica all'interno del corallo, che



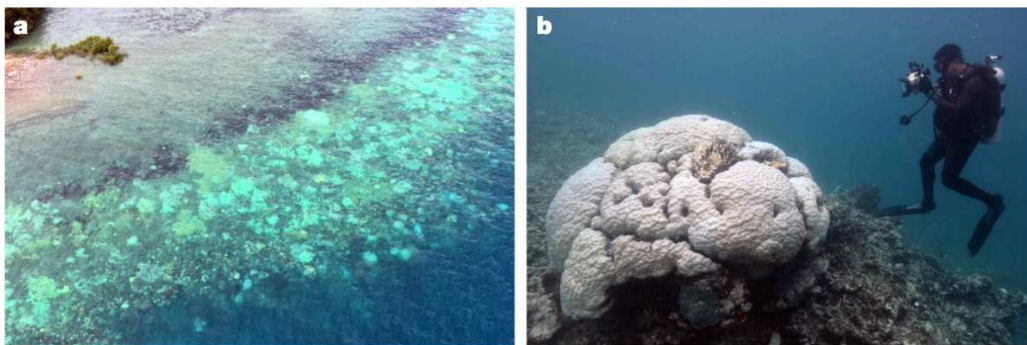
altrimenti verrebbe espulsa; in questo modo contribuiscono notevolmente alla formazione dello scheletro corallino, aumentando la velocità di rimozione dell'anidride carbonica e la velocità di formazione del carbonato di calcio dello scheletro dei coralli. (<https://www.britannica.com/science/coral-reef/Threats-to-coral-reefs>)

Negli anni, vari scienziati hanno studiato a fondo le barriere rocciose, e sulla base della loro morfologia sono stati in grado di fare una classificazione dei tre maggiori tipi di barriera corallina:

1. Barriera corallina “a frange”: è il tipo più diffuso di barriera corallina, si sviluppa vicino alle coste e in acque poco profonde. I siti ideali per la sua formazione sono le coste rocciose di giovani isole vulcaniche, o di isole composte da altri tipi di roccia dura. La parte in crescita attiva è quella verso il mare aperto, dove le condizioni di luminosità, nutrimento e ossigeno sono maggiormente favorevoli allo sviluppo di coralli. Si trovano tipicamente nel Mar Rosso, nei Caraibi e in Africa orientale.
2. Barriera corallina: si tratta di barriere continue e lineari che possono estendersi anche per migliaia di chilometri, e sono separate dalla terraferma da una laguna. Gli esempi maggiormente noti di questo tipo di barriera sono la Grande Barriera Corallina in Australia, la barriera corallina della Nuova Caledonia e quella che si estende tra le due isole maggiori delle Fiji, Viti Levu e Vanua Levu.
3. Atolli: si tratta di formazioni coralline circolari che si trovano vicino alla superficie del mare. Si sviluppano in cima ad isole sottomarine o attorno a isole vulcaniche inattive, che nel tempo vanno incontro a fenomeni di erosione e sprofondano sotto il livello del mare. Alcuni esempi di atolli si ritrovano nel Pacifico meridionale, come le Isole Cook, e nell'Oceano Indiano, come ad esempio le Maldive.

(Jones O. A., Endean R., 1977. *Biology and geology of coral reefs*. Academic Press).

Al giorno d'oggi le barriere coralline sono sottoposte a diverse minacce che mettono in pericolo la loro salute e sopravvivenza. Tra queste rientrano l'inquinamento da varie sostanze, che può danneggiare i coralli, ridurre la qualità dell'acqua e compromettere la sopravvivenza degli organismi marini, la pesca eccessiva, che può andare a modificare l'equilibrio dell'ecosistema, con conseguenti impatti negativi sulla biodiversità, le attività umane come il turismo non regolamentato, e soprattutto l'attuale scenario di cambiamento climatico, caratterizzato da crescenti emissioni di gas serra e aumento delle temperature globali. Il principale impatto del riscaldamento globale è rappresentato dall'aumento della temperatura superficiale dei mari, con conseguente acidificazione delle acque e impatto termico sulle barriere coralline, causando il fenomeno noto come "sbiancamento dei coralli" o "*bleaching*". Come abbiamo detto in precedenza infatti, i coralli vivono in simbiosi con delle alghe fotosintetiche chiamate zooxantelle, che forniscono loro energia tramite la fotosintesi. Tuttavia, quando le temperature aumentano troppo, queste vengono espulse dai coralli, causando il loro sbiancamento, indebolendoli e rendendoli più vulnerabili a malattie e stress ambientali. (<https://www.britannica.com/science/coral-reef/Threats-to-coral-reefs>)



*Figura 3.* In figura è possibile vedere esempi di coralli colpiti dal fenomeno del bleaching (Hughes T. P. et al., 2017).

Le alterazioni dei coralli a causa dei cambiamenti climatici comportano ripercussioni su tutto l'ecosistema della barriera corallina, in quanto si va a ridurre

la complessità strutturale dell'ecosistema, compromettendo di conseguenza le aree di rifugio e alimentazione per numerose specie marine.

Questo fenomeno, influenzando sulla crescita e sopravvivenza dei coralli, incide negativamente anche sulla produzione di sabbia corallina, in quanto il declino dello stato di salute e prosperità dei coralli colpiti dal *bleaching* compromette la loro capacità di calcificare e di produrre scheletri di carbonato di calcio. Il rallentamento della calcificazione comporta una riduzione dell'accumulo dei frammenti di corallo, inficiando in questo modo la produzione complessiva di sabbia corallina e influenzando i processi di rinnovamento delle spiagge e dell'habitat circostante. Il ridotto tasso di produzione della sabbia corallina ha un forte impatto sulla stabilità delle spiagge in quanto possono verificarsi fenomeni di erosione costiera più rapida, con conseguente perdita di biodiversità degli habitat costieri.

### **1.2.2 Ruolo dei pesci pappagallo nel mantenimento dell'ecosistema della barriera corallina**

La barriera corallina è uno degli ecosistemi maggiormente diversificati e importanti al mondo, ma è anche uno dei più minacciati, e la sua struttura e il suo funzionamento sono intaccati dagli effetti della pesca eccessiva, dell'inquinamento, dei cambiamenti climatici e dell'eutrofizzazione delle acque. In questo contesto, i pesci pappagallo hanno un ruolo centrale nel mantenimento delle condizioni ottimali di questo ecosistema, e sono al centro di una serie di processi fisici e biologici: influenzano infatti la biomassa, la composizione e la produzione delle alghe, facilitano l'insediamento di organismi bentonici e sono i maggiori agenti di bioerosione e di produzione e trasporto di sedimenti.

Si può dire quindi che l'importanza unica dei pesci pappagallo e i ruoli che svolgono nell'ecosistema della barriera corallina hanno portato alla considerazione che

l'ecologia di questo gruppo è fondamentale per permetterci di comprendere la struttura, le dinamiche e la resilienza delle barriere coralline.

Il ruolo svolto da questo gruppo di pesci nel mantenimento di sistemi di barriera sani può variare, in quanto vi è una considerevole variabilità tra le varie specie di pesci pappagallo in termini di morfologia della mandibola, modalità di alimentazione e habitat. In generale, le funzioni principali svolte da questi pesci nel mantenimento dell'ecosistema della barriera corallina sono:

1. Pulizia dei coralli, dal momento che si nutrono di parassiti e detriti che si accumulano sui coralli, prevenendo in questo modo infezioni e malattie e contribuendo alla sopravvivenza e al benessere dei coralli stessi;
2. Riduzione della competizione per lo spazio sulla barriera corallina, grazie al consumo di quelle alghe che competono coi coralli per lo spazio disponibile;
3. Controllo della crescita delle alghe tramite la loro ingestione, ad opera principalmente dei *browsers*; questo permette di preservare la salute dei coralli prevenendone il soffocamento e favorendo la crescita di nuovi coralli.
4. Bioerosione, produzione e trasporto di sedimenti. La bioerosione è la rimozione di carbonato dai coralli da parte dei pesci pappagallo, in particolare degli *excavators*; tra gli stessi *excavators* vi è una variazione dei tassi di erosione che è dipendente dalla taglia dell'animale, più questo è di grandi dimensioni, maggiore sarà la loro influenza sulla bioerosione. Il carbonato che viene ingerito poi viene scartato sotto forma di sedimenti, e di conseguenza il tasso di erosione è strettamente correlato con quello di produzione dei sedimenti (Bonaldo R., Bellwood D. R., Hoey A. S., 2014).

## 1.3 Microbiota intestinale dei pesci pappagallo

### 1.3.1 Cos'è il microbiota

Il termine “microbiota”, negli ultimi decenni, ha guadagnato una notevole notorietà nel campo della biologia e della medicina, e si riferisce all’insieme di microrganismi come batteri, archea, funghi, virus, che interagiscono tra loro e colonizzano un ambiente specifico (il corpo umano, un animale, il suolo, ecc.), e che in relazione a questo ambiente possono essere patogeni, commensali o mutuali. Il termine microbiota è strettamente correlato e interconnesso a quello di microbioma, ovvero l’insieme di tutti i geni contenuti in queste comunità microbiche, il loro patrimonio genetico.

Nel 1988, Whipps et al. che lavoravano sull'ecologia dei microrganismi della rizosfera, hanno fornito la prima definizione del termine microbioma. Essi descrissero il "microbioma" come una combinazione delle parole "micro" e "bioma", indicando come “teatro di attività” una “comunità microbica caratteristica” in un “habitat ragionevolmente ben definito che presenta proprietà fisicochimiche distinte” (Berg G. et al., 2020). Questa definizione va a caratterizzare una comunità microbica con proprietà e funzioni distinte e le sue interazioni con l'ambiente, con conseguente formazione di nicchie ecologiche specifiche. Tuttavia, esistono molte altre definizioni di microbioma pubblicate negli ultimi decenni. La definizione attualmente più citata è quella di Lederberg che descrive il microbioma in un contesto ecologico, come una “comunità di microrganismi commensali, simbiotici e patogeni all'interno di uno spazio corporeo o di un altro ambiente”. Marchesi e Ravel, nella loro definizione, si sono concentrati sui genomi, sui modelli di espressione genica microbica e sui proteomi in un determinato ambiente e nelle sue condizioni biotiche e abiotiche prevalenti. Tutte queste definizioni implicano

che i concetti generali di macroecologia possono essere facilmente applicati alle interazioni microbo-microbo e microbo-ospite.

Tuttavia, non è del tutto chiaro fino a che punto questi concetti, sviluppati per i macroeucarioti, possano essere applicati ai procarioti, con i loro diversi stili di vita per quanto riguarda la dormienza, la variazione del fenotipo e il trasferimento genico orizzontale. Ciò pone la sfida di considerare un corpo completamente nuovo di modelli ecologici concettuali e di teoria per l'ecologia del microbioma, in particolare in relazione alle diverse gerarchie di interazioni dei microbi tra loro e con gli ambienti biotici e abiotici ospitanti. Molte definizioni attuali non riescono a cogliere questa complessità e descrivono il termine microbioma come comprendente solo i genomi dei microrganismi. Al giorno d'oggi si ritiene la definizione di Whipps et al. la più completa; questa comprende non solo la comunità dei microrganismi, ma anche il loro "teatro di attività", inteso come lo spettro di molecole prodotte da tali microrganismi. È importante sottolineare però che tutti gli elementi genetici mobili, come ad esempio i fagi, dovrebbero essere inclusi nella definizione di microbioma, ma non fanno parte del microbiota (Berg G. et al., 2020).

Il microbiota è una componente molto importante e svolge molteplici funzioni vitali per l'organismo ospite, tra cui la modulazione del sistema immunitario, la protezione contro invasori patogeni, la produzione di composti bioattivi che possono andare ad influenzare positivamente la salute generale dell'ospite, la digestione e il metabolismo di carboidrati complessi e proteine, e l'assorbimento di nutrienti (Rajilic-Stojanovic M., 2013).

Negli ultimi decenni, la ricerca è stata in grado di dimostrare la grande importanza del microbiota nella salute umana e nell'ecosistema. L'alterazione del microbiota, che prende il nome di disbiosi, è stata associata a numerose condizioni mediche tra le quali le malattie infiammatorie intestinali, l'obesità, il diabete, e vari disturbi di tipo neurologico. Per questo motivo, lo studio del microbiota e delle sue funzioni è

diventato centrale per comprendere al meglio la salute umana ed eventualmente sviluppare nuovi approcci terapeutici.

### **1.3.2 Influenza delle strategie nutritive dei pesci pappagallo sul loro microbiota intestinale**

I pesci pappagallo hanno un ruolo centrale nel mantenimento della salute e del buon funzionamento dell'ecosistema della barriera corallina, e il loro microbiota intestinale può essere considerato un tratto funzionale potenzialmente importante per la salute e la resilienza non solo degli animali stessi, ma anche di questi ambienti (Bourne D. G. et al., 2016).

Il microbiota intestinale dei pesci pappagallo è composto principalmente da batteri, ma può includere anche virus e funghi, e tale comunità microbica svolge un ruolo centrale nella digestione degli alimenti, nella sintesi dei nutrienti essenziali, nel mantenimento di un ambiente acido nell'intestino che aiuta a prevenire la crescita di patogeni potenzialmente dannosi, e nella modulazione e nel sostegno del sistema immunitario dell'ospite (Chiarello M. et al., 2020).

Ad oggi vi sono ancora pochi studi sulla composizione del microbiota intestinale dei pesci pappagallo, e su come questa possa variare in funzione di fattori esterni come ad esempio i cambiamenti climatici ed i fenomeni ad essi associati. Ciò che si sa, è che può essere influenzata dallo stato di salute del pesce e del tipo di dieta predominante (Miyake S. et al., 2015).

Alcune ricerche (Liu H. et al., 2016) hanno dimostrato che gli Scaridi che si nutrono principalmente di alghe hanno un microbiota intestinale ricco di batteri capaci di degradare la cellulosa e altre fibre vegetali complesse; tra questi batteri rientrano ad esempio i Bacteroidetes e i Firmicutes, in grado di decomporre le pareti cellulari delle alghe e di estrarne i nutrienti. Al contrario, i pesci pappagallo con abitudini

alimentari carnivore tendono ad ospitare un microbiota dominato da batteri di tipo proteolitico, come ad esempio i Proteobatteri (Gao Y. M. et al., 2020).

Inoltre è importante sottolineare che spesso, proprio grazie alle loro particolari strategie nutritive e alla composizione unica del loro apparato boccale, i pesci pappagallo ingeriscono anche porzioni di coralli più o meno grandi. I frammenti di corallo possono contenere delle sostanze e dei composti particolari, come il carbonato di calcio, che potrebbero andare a influenzare l'ambiente intestinale e la composizione microbica; ad esempio, potrebbe promuovere l'abbondanza di batteri in grado di degradare il carbonato e di scomporre efficacemente altri materiali corallini (Smith R. L. et al., 1975).

Il microbiota intestinale di questi pesci è dunque in grado di adattarsi rapidamente a cambiamenti nella dieta, e si modifica di pari passo quando i pesci cambiano alimentazione nel corso della loro vita. Questi adattamenti possono essere guidati, ad esempio, dalle esigenze metaboliche dell'ospite. Questo perché un microbiota equilibrato ed efficiente è in grado di contribuire alla digestione degli alimenti e all'assorbimento dei nutrienti necessari, pertanto, qualsiasi alterazione non controllata nella dieta dei pesci pappagallo potrebbe avere delle conseguenze sulla loro salute intestinale (Egerton S. et al., 2018).

In alcuni studi più recenti poi (Léon-Zayas R. et al., 2020), sono stati analizzati i microrganismi presenti nelle acque oceaniche, nei sedimenti, nei coralli, nelle alghe e nei pesci di diverse località tropicali, ed è stato evidenziato che esiste una connessione tra il materiale fisicamente circolante, mediata dai pesci stessi.

Eseguire una caratterizzazione microbica più approfondita, comprendere più a fondo la connessione tra i vari agenti dell'ecosistema della barriera corallina, e analizzare come, ad esempio, i cambiamenti climatici e l'inquinamento modifichino la ricchezza e la composizione non solo delle specie marine, ma anche dei microrganismi a loro associate, potrebbe essere centrale per la ricerca futura.



## 2. SCOPO DELLO STUDIO

I pesci pappagallo hanno un ruolo centrale nel mantenimento delle condizioni ottimali dell'ecosistema della barriera corallina, e grazie alle loro peculiari strategie nutritive, sono in grado di ingerire porzioni di corallo che poi vengono rilasciate nelle loro feci sotto forma di sabbia corallina.

Lo scopo centrale di questo lavoro di ricerca è quello di andare a effettuare una caratterizzazione dettagliata del microbiota intestinale di diverse specie di pesci pappagallo delle Maldive, tramite l'estrazione e il sequenziamento del DNA batterico orale e intestinale. Questo serve come base per comprendere poi, in studi futuri, se e come questi microrganismi sono coinvolti nel processo di creazione del sedimento corallino, e se i cambiamenti climatici in atto possono influenzare e modificare la composizione microbica di questo ecosistema.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Campionamento

Per questo studio sono stati raccolti 9 campioni di acqua (5 mL), 9 campioni di coralli della specie *Porites lutea lobata*, e 48 campioni di pesce pappagallo di 8 specie diverse. Tutti i campioni sono stati prelevati nell'arcipelago delle Maldive, più precisamente nell'isola di Magoodhoo. Per quanto riguarda i campioni di acqua e di corallo, sono stati tutti prelevati durante attività di snorkeling, mentre i campioni di pesce pappagallo sono stati prelevati in notturna, mentre l'animale dormiva, da 8 specie diverse con le seguenti modalità:

- 1 campione di *Scarus niger*, di sesso maschile, prelevato tramite *hand snorkeling*;
- 1 campione di *Cetoscarus bicolor*, di sesso femminile, prelevato tramite *hand diving*;
- 1 campione di *Scarus scaber*, di sesso femminile, prelevato tramite *hand diving*;
- 2 campioni di *Chlorurus sordidus*, di sesso uno maschile e uno femminile, prelevati entrambi tramite *hand diving*;
- 1 campione di *Scarus ghobban*, di sesso maschile, prelevato tramite attività di pesca (è stato portato ai ricercatori già morto da alcuni pescatori);
- 1 campione di *Hipposcarus harid*, di sesso ignoto, prelevato tramite attività di pesca;
- 1 campione di *Chlorurus strongylocephalus*, di sesso femminile, prelevato tramite *hand diving*;

- 4 campioni di *Scarus frenatus*, di sesso maschile, prelevati tramite *hand diving*.

Di ogni campione di pesce, sono stati forniti 2 replicati tecnici orali e due replicati tecnici rettali. Il tampone con cui è stato effettuato il prelievo è arrivato in laboratorio all'interno di una falcon, immerso in 2 mL di RNA later come stabilizzante; anche i frammenti di corallo sono stati conservati in RNA later all'interno di una falcon, inizialmente a 4°C, poi a temperatura ambiente per il trasporto.



**Scarus niger - scraper**



**Cetoscarus bicolor - excavator**



**Chlorurus sordidus - excavator**



**Scarus scaber - scraper**



**Scarus ghobban - scraper**



**Scarus frenatus - scraper**



**Hipposcarus harid - scraper**



**Chlorurus strongylocephalus - excavator**

*Figura 4.* In figura è possibile vedere le 8 specie di pesci pappagallo campionate.

### 3.2. Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto sotto cappa, seguendo le istruzioni presenti nel *PowerSoil DNA Isolation Kit - QIAGEN*, con alcune modifiche.

Per quanto riguarda l'estrazione di DNA dai campioni di pesce, abbiamo preso il tampone con delle forbici sterili e lo abbiamo trasferito momentaneamente in un tubino Eppendorf da 2 mL. Con una pipetta abbiamo trasferito i 2 mL di RNA later in un altro tubino da 2 mL e abbiamo centrifugato alla massima velocità in rpm per 5 minuti. Abbiamo rimosso il surnatante e trasferito il tampone in questo tubino, avendo cura di rimuovere la parte di legno usando forbici sterili. In questo stesso tubino abbiamo aggiunto poi le biglie fornite dal *PowerSoil DNA Isolation Kit - QIAGEN* e 800 microlitri del buffer di lisi CD1, il tutto poi è stato portato al *Tissue Lyser* per favorire la lisi meccanica. Per quanto riguarda il *Tissue Lyser*, i campioni da SC01A a SC06D hanno subito una lisi a 20 hz, per 30 secondi, per 3 volte, mentre i campioni da SC07A a SC12D sono stati sottoposti a una lisi a 30 hz, per 30 secondi, per 2 volte. Abbiamo trasferito il surnatante ottenuto in nuovo tubino fornito dal kit e centrifugato a 15.000 rpm per 1 minuto. Da questo punto in poi, abbiamo seguito la procedura di estrazione descritta nel protocollo.

Per quanto riguarda l'estrazione del DNA dai campioni di corallo, il frammento di corallo è stato estratto dalla falcon, posizionato in una piastra Petri sterile, e triturato con una lama da bisturi sterile. I pezzi sono poi stati trasferiti in un tubino sterile e triturati ulteriormente con un pestello sterile. Abbiamo trasferito 1 mL di RNA later in un tubino da 2 mL e centrifugato alla massima velocità in rpm per 5 minuti (alla fine ci si aspetta di avere un pellet). Abbiamo rimosso il surnatante e risospeso il tutto con il buffer di lisi CD1; la soluzione è stata poi trasferita all'interno del tubo contenente i frammenti di corallo, abbiamo aggiunto le biglie fornite dal Kit e portato al *Tissue Lyser*. In questo caso, per tutti i campioni di corallo, è stata effettuata una lisi meccanica a 30 hz, per 30 secondi, per 2 volte.

Successivamente abbiamo centrifugato a 15.000 rpm per un minuto, e da questo punto in poi abbiamo seguito la procedura descritta nel protocollo.

Per quanto riguarda l'estrazione di DNA dai campioni di acqua, abbiamo traferito 2 mL in un tubino e centrifugato alla massima velocità in rpm per 5 minuti. Abbiamo rimosso lo scarto e aggiunto le biglie e il buffer di lisi CD1. Abbiamo portato il tutto al Tissue Lyser, a 30 hz, per 30 secondi, per 2 volte. Il surnatante ottenuto è stato trasferito in un nuovo tubino, messo in centrifuga, e centrifugato a 15.000 rpm per 1 minuto. Da qui in poi abbiamo seguito il protocollo di estrazione.

CAMPIONE	SPECIE	RETTALE I	RETTALE II	ORALE I	ORALE II	FIN_ETOH	SESSO	TAGLIA (CM)	FEEDING HABIT
SC01	<i>Scarus_niger</i>	SCO1A	SCO1B	SCO1C	SCO1D	SCO1E	Male	25	scraper
SC02	<i>Cetoscarus_bicolor</i>	SCO2A	SCO2B	SCO2C	SCO2D	SCO2E	Female	35	excavator
SC03	<i>Chlorurus_sordidus</i>	SCO3A	SCO3B	SCO3C	SCO3D	SCO3E	Male	25	excavator
SC04	<i>Scarus_scaber</i>	SCO4A	SCO4B	SCO4C	SCO4D	SCO4E	Female	20	scraper
SC05	<i>Chlorurus_sordidus</i>	SCO5A	SCO5B	SCO5C	SCO5D	SCO5E	Female	20	excavator
SC06	<i>Scarus_ghobban</i>	SCO6A	SCO6B	SCO6C	SCO6D	SCO6E	Male	30	scraper
SC07	<i>Hipposcarus_harid</i>	SCO7A	SCO7B	SCO7C	SCO7D	SCO7E	?	30	scraper
SC08	<i>Chlorurus_strongylocephalus</i>	SCO8A	SCO8B	SCO8C	SCO8D	SCO8E	Female	45	excavator
SC09	<i>Scarus_frenatus</i>	SCO9A	SCO9B	SCO9C	SCO9D	SCO9E	Male	40	scraper
SC10	<i>Scarus_frenatus</i>	SC10A	SC10B	SC10C	SC10D	SC10E	Male	35	scraper
SC11	<i>Scarus_frenatus</i>	SC11A	SC11B	SC11C	SC11D	SC11E	Male	35	scraper
SC12	<i>Scarus_frenatus</i>	SC12A	SC12B	SC12C	SC12D	SC12E	Male	35	scraper
CO01	<i>Porites_lutea-lobata</i>								
CO02	<i>Porites_lutea-lobata</i>								
CO03	<i>Porites_lutea-lobata</i>								
CO04	<i>Porites_lutea-lobata</i>								
CO05	<i>Porites_lutea-lobata</i>								
CO06	<i>Porites_lutea-lobata</i>								
CO07	<i>Porites_lutea-lobata</i>								
CO08	<i>Porites_lutea-lobata</i>								
CO09	<i>Porites_lutea-lobata</i>								
WA01	Water								
WA02	Water								
WA03	Water								
WA04	Water								
WA05	Water								
WA06	Water								
WA07	Water								
WA08	Water								
WA09	Water								

*Tabella 1.* In tabella è possibile vedere un elenco di tutti i campioni analizzati, accompagnati dalle relative informazioni su sesso, taglia e abitudini alimentari dell'animale.

### **3.3. Valutazione quantitativa e qualitativa del DNA estratto tramite Nanodrop**

Il DNA estratto è stato valutato sia in termini qualitativi che quantitativi con l'utilizzo dello spettrofotometro Nanodrop, seguendo questa procedura:

- abbiamo pulito le superfici dello strumento usando acqua deionizzata pura, pipettata sulla superficie ottica inferiore;
- abbiamo abbassato la leva in modo che questa entri in contatto con l'acqua deionizzata; poi abbiamo sollevato la leva e pulito il tutto con un pezzo di carta;
- abbiamo aperto il software e selezionato l'applicazione "acidi nucleici". È stato necessario calibrare lo strumento facendo una misurazione a vuoto: abbiamo pipettato 1 microlitro di buffer nella superficie ottica inferiore, abbiamo abbassato la leva e selezionato la voce "Blank" nell'applicazione;
- una volta che la misurazione è completa, abbiamo pulito lo strumento ed effettuato le misurazioni vere e proprie;
- abbiamo pipettato 1 uL di campione di interesse nella superficie ottica inferiore, abbiamo abbassato la leva dello strumento e poi cliccato su "Measure", lo strumento in automatico ha calcolato la concentrazione del DNA e i rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230.

I rapporti di assorbanza servono per verificare la qualità e la purezza del DNA estratto: il rapporto 260/280 indica la contaminazione da proteine e altre impurità

e deve avere idealmente un valore di 1,8, mentre il valore 260/230 indica la contaminazione da, ad esempio, solventi utilizzati durante l'estrazione, e ha un valore ideale di 2/2,2.

### **3.4. Amplificazione del DNA tramite PCR e sequenziamento**

I campioni di DNA estratto sono stati spediti a una ditta esterna, il BMR, per essere amplificati e sequenziati (N.B. per questo primo screening sono stati mandati solamente 46 campioni).

In laboratorio abbiamo effettuato una PCR end point di alcuni campioni, per verificare se aumentando i cicli si ha un miglioramento dell'amplificazione.

La concentrazione finale dei campioni analizzati deve essere di 2 ng/uL, e il fattore di diluizione di base è 1:2. Abbiamo come prima cosa effettuato una lista delle diluizioni effettive, e poi fatto una media. Alla fine abbiamo ottenuto i seguenti fattori di diluizione:

- SC05A – 1:10
- SC05C – 1:5
- SC12D – 1:5
- WA08 – 1:20
- WA09 – 1:20

Per scegliere il volume di diluizione abbiamo moltiplicato i fattori di diluizione per 2, di conseguenza 1:10 è diventato 2:20 (20 microlitri finali, di cui 2 uL di DNA e 18 uL di acqua BDH), e così via per tutti i campioni di interesse.

Successivamente abbiamo preparato la mix per la PCR, in Eppendorf da 1,5 mL.

Infine abbiamo preparato le strip per la PCR, e in questo caso abbiamo utilizzato una strip da 8 pozzetti; in ogni pozzetto della strip abbiamo caricato 18 uL di mix

(costituita da 10 uL di Master Mix, 0,5 uL di Primer Forward 10 mM e 0,5 uL di Primer Reverse 10 mM, 7 uL di BDH) e 2 uL di DNA diluito.

La PCR è stata fatta partire con il seguente protocollo termico:

- 94°C per 2 minuti
- 94°C per 20 secondi
- 54°C per 30 secondi
- 72°C per 30 secondi
- Temperatura di melting dell'ultimo ciclo 72°C per 7 minuti

Il tutto per 40 cicli.

Una volta conclusa la PCR abbiamo preparato il gel di agarosio da 50 mL per la corsa elettroforetica degli amplificati. Per la preparazione del gel abbiamo utilizzato 50 mL di TAE, 5 uL di *Sybr Safe* e 0,9 grammi di agarosio 1,8%. Nel primo pozzetto abbiamo caricato 1,4 mL del marcatore, mentre negli altri pozzetti 5 uL di *Loading dye* e 5 uL di prodotto di PCR. Abbiamo fatto partire la corsa elettroforetica a potenza 100 per circa 40 minuti.

Questa procedura è servita per scegliere quali campioni fare sequenziare al BMR.

### **3.5. Analisi bioinformatiche**

Una volta ottenuti i risultati del sequenziamento, i campioni sono stati analizzati tramite il software R per l'analisi bioinformatica al fine di descrivere l'ecologia microbica dei campioni. In particolar modo, sono state effettuate le analisi di *alpha* e *beta diversity*: per l'*alpha diversity* è stato calcolato il numero grezzo di taxa, insieme agli indici di Shannon e Chao1 utilizzando il pacchetto "*vegan*"; mentre per la *beta diversity* sono state calcolate le distanze *UniFrac* pesata e non pesata (*Weighed* e *Unweighted*) utilizzando il pacchetto "*phyloseq*".



L'alpha e la beta diversity sono indici di misurazione della biodiversità che vengono usati per studiare la diversità biologica in un ecosistema. L'alpha diversity, nello specifico, misura la biodiversità tassonomica all'interno di un singolo campione e/o ambiente; ci sono diversi modi per calcolarla, quelli utilizzati nel nostro studio sono:

- L'indice di Shannon, che tiene conto sia della ricchezza delle specie, ovvero del numero di specie presenti, che dell'abbondanza di ciascuna specie;
- CHAO1 serve sempre per stimare la ricchezza di specie, ma da' maggiore rilevanza alle OTUs rare.

La beta diversity misura la distanza, in termini di biodiversità, tra diversi campioni e/o ambienti; cerca quindi di quantificare quanto le comunità cambiano in termini di composizione delle specie tra siti diversi e in momenti diversi. In sostanza è utile per confrontare la diversità tra diverse comunità. Esistono due approcci per calcolare la beta diversity:

- *Weighted*: in questo approccio si tiene conto delle abbondanze relative delle specie quando si calcola la differenza tra le comunità, questo vuol dire che le specie più abbondanti hanno un peso maggiore nel calcolo della diversità;
- *Unweighted*: in questo approccio non si tiene conto delle abbondanze relative delle specie ma solo delle relazioni filogenetiche tra taxa.

## 4. RISULTATI

### 4.1. Valutazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto tramite Nanodrop

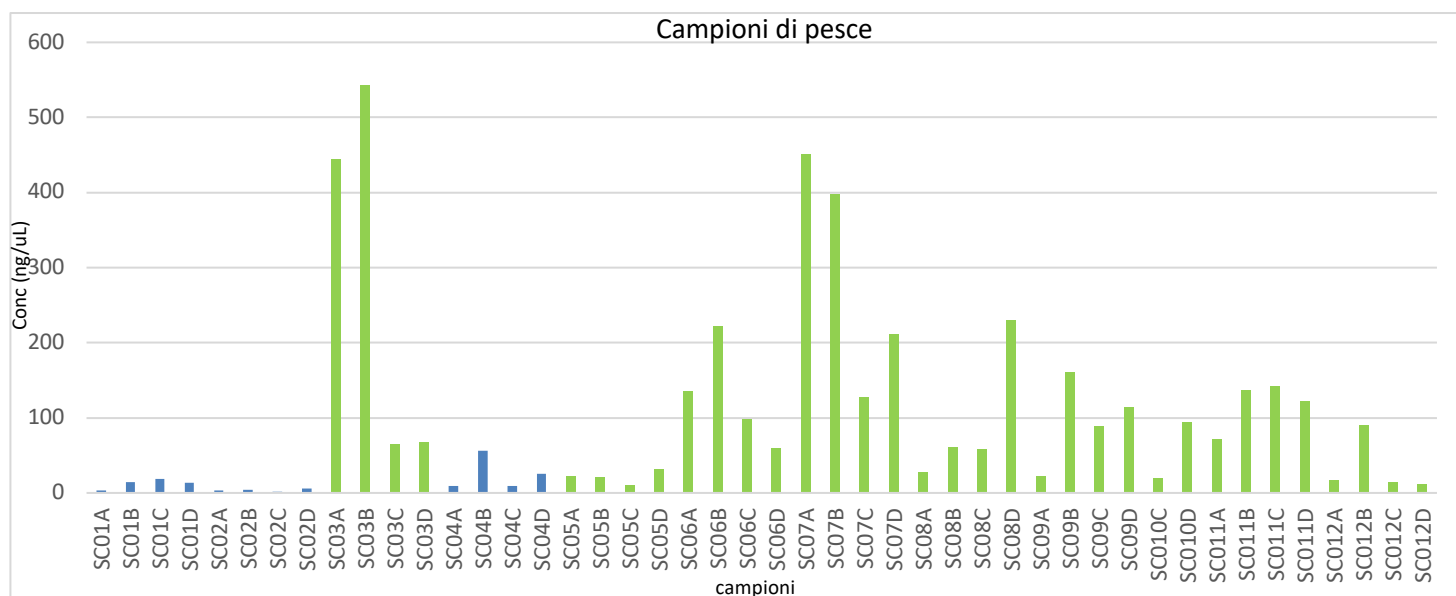
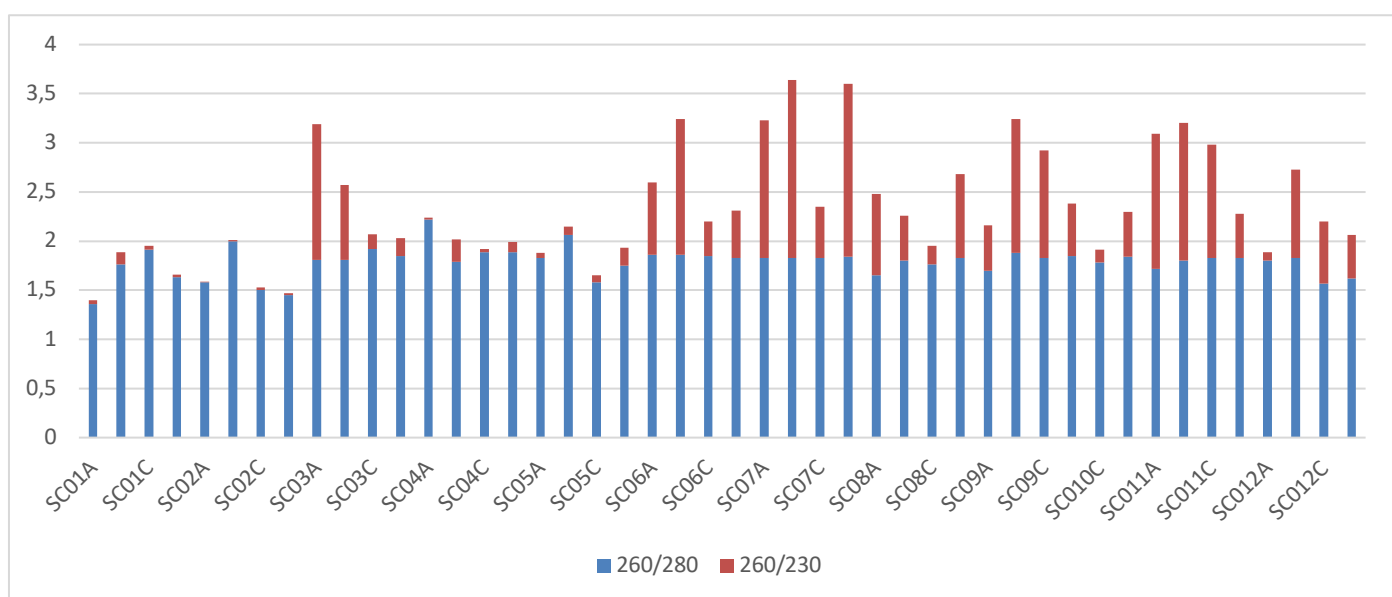
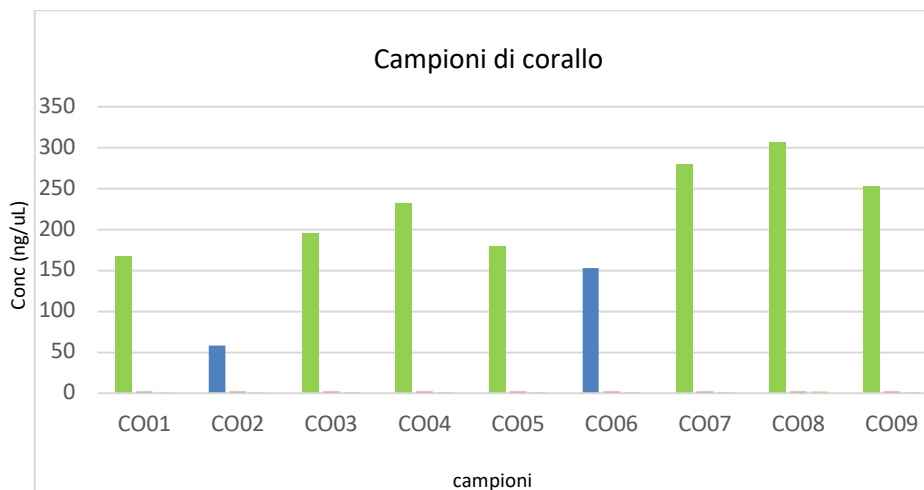


Grafico 1. In questo grafico è possibile vedere i risultati della quantificazione tramite spettrofotometro dei campioni di pesce.



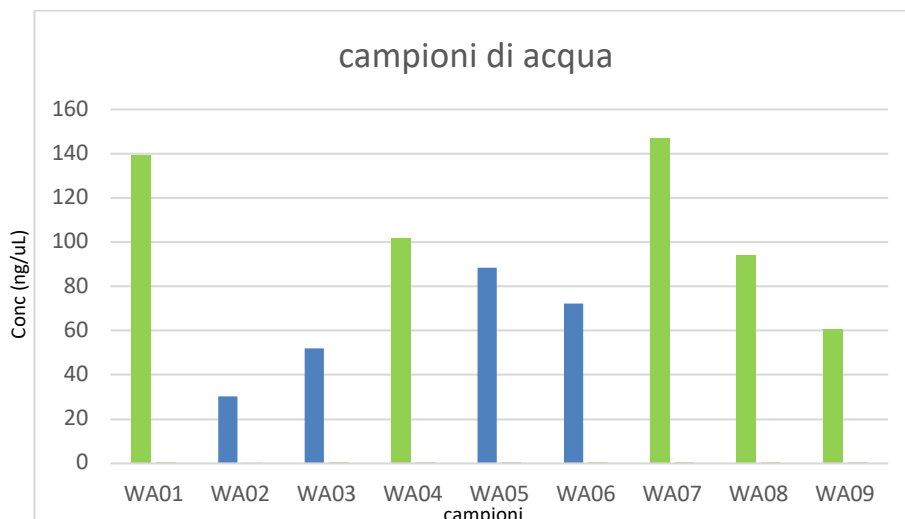
*Grafico 2.* In questo grafico è possibile vedere i risultati dei rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230 ottenuti tramite spettrofotometro dei campioni di pesce pappagallo.



*Grafico 3.* In questo grafico è possibile vedere i risultati della quantificazione tramite spettrofotometro dei campioni di corallo.

sample	260/280	260/230
CO01	1,86	0,72
CO02	1,82	0,72
CO03	1,85	1,27
CO04	1,87	1,19
CO05	1,85	0,79
CO06	1,83	1,5
CO07	1,86	1,01
CO08	1,87	1,94
CO09	1,87	1,44

*Tabella 2.* In tabella è possibile vedere i risultati dei rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230 ottenuti tramite spettrofotometro dei campioni di corallo.



*Grafico 4.* In questo grafico è possibile vedere i risultati della quantificazione tramite spettrofotometro dei campioni di acqua.

sample	260/280	260/230
WA01	1,51	0,38
WA02	1,53	0,16
WA03	1,51	0,49
WA04	1,49	0,58
WA05	1,51	0,53
WA06	1,54	0,57
WA07	1,48	0,56
WA08	1,5	0,34
WA09	1,49	0,4

*Tabella 3.* In tabella è possibile vedere i risultati dei rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230 ottenuti tramite spettrofotometro dei campioni di acqua.

Per quanto riguarda i grafici 1 e 4, sembra non esserci nessuna correlazione tra i risultati ottenuti con il Nanodrop e i risultati della PCR, mentre per quanto riguarda il grafico 3 sembra esserci una correlazione tra la concentrazione del campione e i risultati della PCR, in quanto come vedremo successivamente, tutti i campioni di corallo ad eccezione di uno sono stati amplificati. Dai risultati di questa analisi

abbiamo deciso di mandare solo 46 campioni al BMR per procedere con l'amplificazione; tali campioni, di cui 34 di pesce, 7 di corallo e 5 di acqua, sono quelli colorati di verde nei grafici 1, 3 e 4.

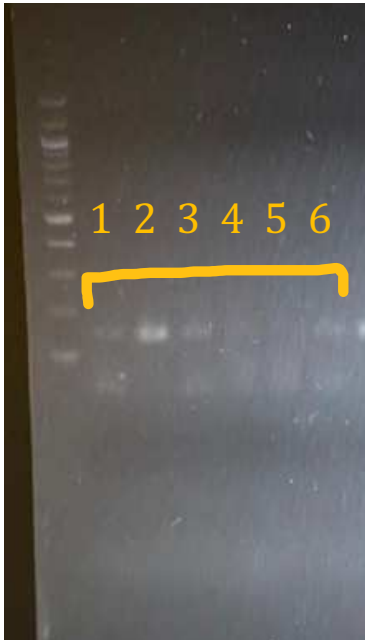
#### **4.2. Amplificazione e PCR**

Dei 46 campioni spediti alla ditta BMR per essere amplificati, nessun campione di acqua è stato amplificato, un solo campione di corallo non è stato amplificato (CO05) così come alcuni campioni di pesce. Dato che alcuni dei campioni sono stati invece scarsamente amplificati, si è deciso di procedere con una PCR end-point di alcuni campioni con un numero di cicli maggiore, per verificare se aumentando il numero di cicli migliora l'amplificazione di tali campioni.

I campioni selezionati per questa analisi sono i seguenti:

- SC05A è il controllo positivo, in quanto è l'unico tra i campioni selezionati per questa analisi che è stato amplificato correttamente – concentrazione 22,3 ng/uL;
- SC05C – concentrazione 9,7 ng/uL;
- SC12D – concentrazione 11,67 ng/uL;
- WA08 – concentrazione 94,1 ng/uL;
- WA09 – concentrazione 60,8 ng/uL;
- BDH è il controllo negativo.

Dai risultati della PCR si è deciso di procedere al sequenziamento solamente di 25 campioni, ovvero quelli che erano stati amplificati e scarsamente amplificati.



**Legenda**

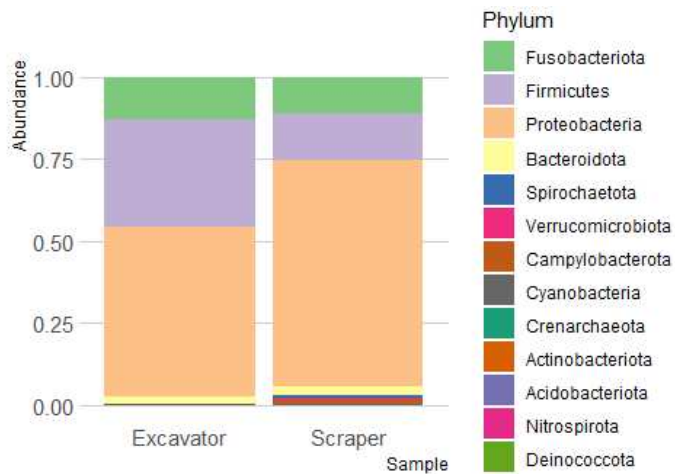
- 1 = controllo negativo (BDH)
- 2 = controllo positivo (SC05A)
- 3 = SC05C
- 4 = SC12D
- 5 = WA08
- 6 = WA09

*Figura 5.* Risultato della PCR

CAMPIONE	SPECIE	RETTALE I	RETTALE II	ORALE I	ORALE II	SESSO	FEEDING HABIT	PCR
SC01	Scarus_niger	SC01A	SC01B	SC01C	SC01D	Male	scraper	NO
SC02	Cetoscarus_bicolor	SC02A	SC02B	SC02C	SC02D	Female	excavator	NO
SC03	Chlorurus_sordidus	SC03A	SC03B	SC03C	SC03D	Male	excavator	SI (A - B)
SC04	Scarus_scaber	SC04A	SC04B	SC04C	SC04D	Female	scraper	NO
SC05	Chlorurus_sordidus	SC05A	SC05B	SC05C	SC05D	Female	excavator	SI (A - B)
SC06	Scarus_ghobban	SC06A	SC06B	SC06C	SC06D	Male	scraper	SI (A)
SC07	Hipposcarus_harid	SC07A	SC07B	SC07C	SC07D	?	scraper	SI (B - C - D)
SC08	Chlorurus_strongylocephalus	SC08A	SC08B	SC08C	SC08D	Female	excavator	SI (C - D)
SC09	Scarus_frenatus	SC09A	SC09B	SC09C	SC09D	Male	scraper	SI
SC10	Scarus_frenatus	SC10A	SC10B	SC10C	SC10D	Male	scraper	SI (D)
SC11	Scarus_frenatus	SC11A	SC11B	SC11C	SC11D	Male	scraper	SI (B - C - D)
SC12	Scarus_frenatus	SC12A	SC12B	SC12C	SC12D	Male	scraper	SI (B)
CO01	Porites_lutea-lobata							SI
CO02	Porites_lutea-lobata							NO
CO03	Porites_lutea-lobata							SI
CO04	Porites_lutea-lobata							SI
CO05	Porites_lutea-lobata							NO
CO06	Porites_lutea-lobata							NO
CO07	Porites_lutea-lobata							SI
CO08	Porites_lutea-lobata							SI
CO09	Porites_lutea-lobata							SI

*Tabella 4.* In questa tabella è possibile vedere i risultati della PCR per ogni campione, ed è stata fatta per verificare se ci fosse correlazione tra la specie e il risultato dell'amplificazione. Per quanto riguarda i pesci in particolare, non sembra esserci nessuna correlazione, se non il fatto che i replicati orali tendono ad avere una qualità di DNA più bassa di quelli rettali, ma ci sono molteplici fattori da tenere in considerazione, ad esempio se chi ha fatto i campionamenti è lo stesso operatore, e se c'è continuità di campionamento. I campioni che sono stati mandati al BMR per essere sequenziati sono quelli che in tabella alla voce "PCR" sono contrassegnati con un "SI".

### 4.3. Analisi bioinformatiche



*Figura 6.* In figura è possibile vedere i risultati della composizione tassonomica dei microrganismi del tratto GI dei pesci pappagallo presi in analisi a livello di phylum, suddivisi secondo le loro modalità di alimentazione in *scraper* ed *excavator*. Sulla destra sono riportati, con diversi colori, i vari phyla rilevati, e nell'istogramma è possibile vedere l'abbondanza di ogni phyla negli *scraper* e negli *excavator*. Per entrambi, i phyla maggiormente presenti sono *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteriota*, e in misura minore anche *Bacteroidota*.

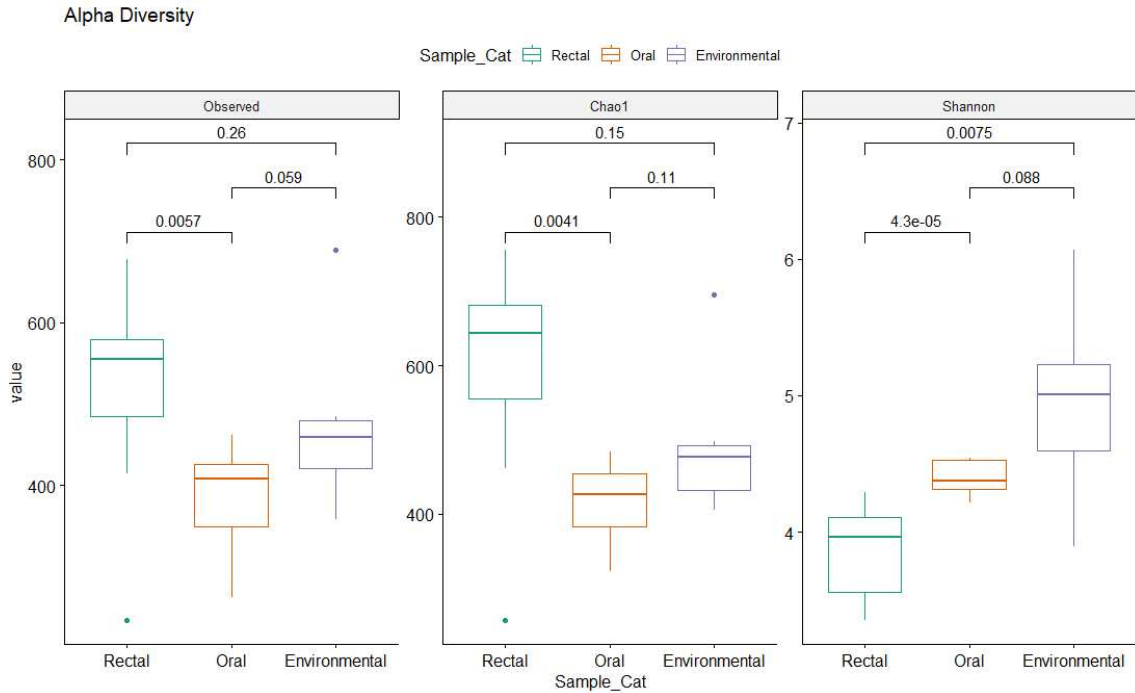


Figura 7. In figura è possibile osservare l'*alpha diversity* dei campioni orali, rettali, e di corallo analizzati. In ogni riquadro è riportata anche la significatività tra gruppi ottenuta tramite test di Wicoxon. Mentre l'andamento dei risultati è simile per l'osservato e l'indice di Chao, la situazione cambia con l'indice di Shannon, che aggiunge anche l'omogeneità. Da questa immagine è possibile vedere che i campioni rettali presentano un livello di biodiversità maggiore, ma con una distribuzione meno omogenea rispetto a quelli orali.

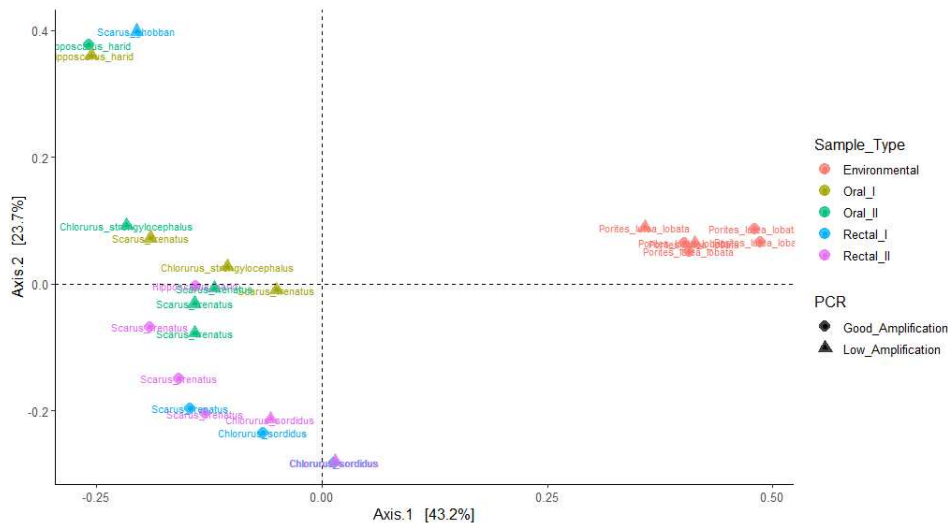


Figura 8. In figura è possibile valutare la *beta diversity weighted*.



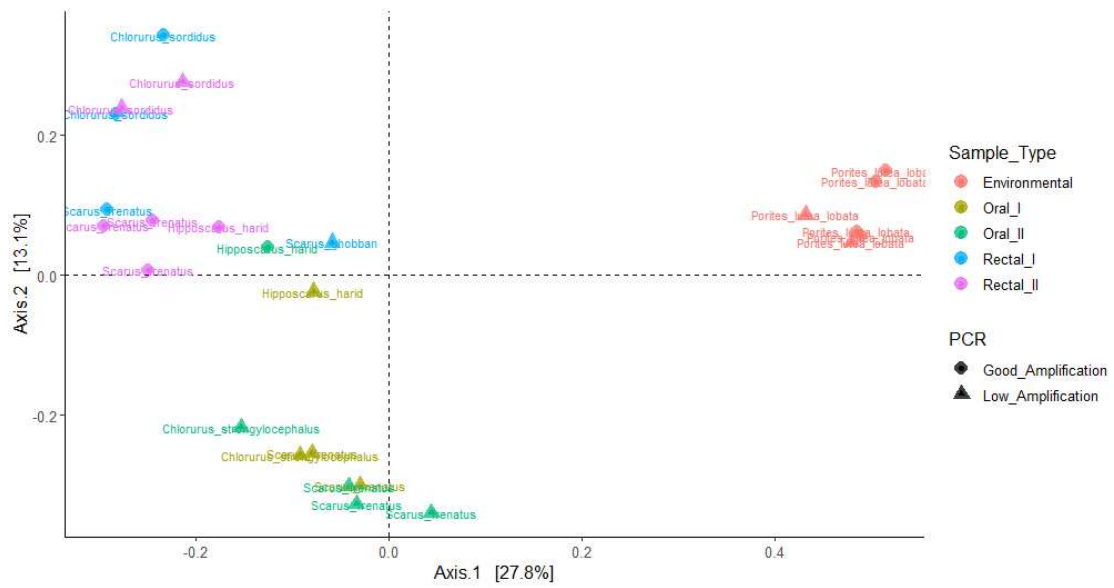


Figura 9. In figura è possibile valutare la *beta diversity unweighted*.

Con la beta diversity (figure 8 e 9) si voleva verificare se il microbiota dei campioni di pesce si distinguesse per tipologia (orale e rettale), e si distinguesse da quello dei campioni di corallo. Siamo arrivati a concludere che la composizione microbica orale è diversa da quello fecale, che è diversa da quella ambientale.

## 5. DISCUSSIONE

Nonostante in letteratura si trovino studi sulla caratterizzazione della microflora intestinale dei pesci che abitano la barriera corallina, la ricerca è ancora in evoluzione per quanto riguarda nello specifico il microbiota dei pesci pappagallo e la potenziale importanza che questi microrganismi hanno nel mantenimento della salute di questo delicato ecosistema.

Nel nostro studio è stata fatta una caratterizzazione preliminare del microbiota del tratto gastrointestinale di specie diverse di pesci pappagallo, suddivisi secondo le loro abitudini alimentari in *scraper* ed *excavator*. Dai risultati delle nostre analisi è emerso che a livello di phylum, i microrganismi maggiormente presenti, sia per gli *scraper* che per gli *excavator* sono *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteriota*, e in misura minore anche *Bacteroidota*. Questi risultati sono coerenti con i risultati di studi precedenti (Gao Y. M. et al., 2020) svolti su altri pesci tropicali della barriera corallina. È importante sottolineare che l'abbondanza di *Fusobacteriota* è pressoché invariata tra *scraper* ed *excavator*; al contrario, *Firmicutes* è più abbondante negli *excavator*, mentre *Proteobacteria* negli *scraper*, suggerendo di fatto un possibile collegamento tra la modalità di alimentazione e il microbiota del tratto gastrointestinale.

Per rendere più completo lo studio, è stata fatta anche un'indagine sulla diversità biologica dei campioni analizzati, tramite il calcolo dell'alpha e della beta diversity. Dallo studio dell'alpha diversity è emerso che i campioni rettali hanno un livello di biodiversità maggiore rispetto a quelli orali; questo potrebbe dipendere da vari fattori come la metodologia di campionamento utilizzata, la modalità di alimentazione dell'animale e il fatto che nell'intestino possono essere presenti diversi parassiti e simbionti intestinali che contribuiscono a una maggiore diversità nei campioni rettali.

Con la beta diversity invece si voleva verificare se la composizione microbica dei campioni di pesce si distinguesse tra di loro per tipologia, e si distinguesse da quella dei campioni di corallo. I risultati hanno dimostrato che il tipo di campione influisce sui risultati dell'analisi, infatti il microbiota orale è diverso da quello fecale, che è diverso da quello ambientale. Nell'immagine 9 è possibile notare come tutti i campioni di corallo siano raggruppati tra loro, così come i campioni orali da un lato e quelli rettali dall'altro. Fanno eccezione i replicati orali della specie *Hipposcarus harid*, che sono spostati verso il raggruppamento dei campioni rettali; questo potrebbe essere dovuto non solo alla modalità di alimentazione, ma anche alla modalità di prelievo del campione. Questa specie è stata infatti l'unica, insieme a *Scarus ghobban*, a essere prelevata tramite attività di pesca.

## 6. CONCLUSIONI

Gli Scaridi sono dei pesci tropicali estremamente particolari, sia per quanto riguarda le loro colorazioni vivaci e brillanti, sia per la struttura e l'anatomia del loro apparato boccale, che gli ha fatto guadagnare nell'uso comune il nome di "pesce pappagallo" e che si riflette in una modalità unica di alimentarsi, sia per il loro ruolo all'interno dell'ecologia marina e dell'ecosistema della barriera corallina. Questi animali sono infatti di grande importanza per il ruolo centrale che svolgono nel mantenimento di un buono stato di salute dei coralli, nell'evitare che si abbia un'eccessiva crescita di alghe e nella rielaborazione e rilascio di sedimenti che contribuiscono alla creazione della maggior parte della sabbia corallina.

Sfortunatamente al giorno d'oggi questi animali non sono ancora tanto studiati, così come non è chiaro se e che ruolo abbiano i microrganismi che abitano il loro tratto gastrointestinale nel processo di produzione della sabbia bianca dei tropici. In questo studio è stata svolta una caratterizzazione preliminare del microbiota intestinale di alcune specie di pesci pappagallo, e si propone di essere una base di partenza per un progetto futuro più ampio, in grado di andare a determinare se e in quale misura tale microbiota è coinvolto nei processi sopra citati.

Inoltre, sarebbe interessante collocare questo progetto in un contesto ancora più ampio, proponendosi di andare a verificare se l'attuale scenario di cambiamento climatico che il mondo sta attraversando sia in grado di apportare delle modifiche al microbiota intestinale dei pesci pappagallo, in che misura, e soprattutto quali potrebbero essere le conseguenze a lungo termine di una tale modifica all'interno dell'ecosistema della barriera corallina.

## 7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Viviani J., 2019, *Evolutionary dynamics of the dentition in relationship with habitat, behaviour and diet in parrotfishes (Scarinae, Labriformes)*. Animal biology, Université de Lyon;
- Hoey A. S., Bonaldo R. M., 2018. *Biology of parrotfishes*. Boca Raton. CRC Press, Taylor and Francis Group;
- Sabbagh S. M., 2013. *Significance of colors and patterns of coral reef fishes: an overview*;
- <https://www.sciencedaily.com/releases/2020/03/200309165239.htm>
- <https://www.britannica.com/science/coral-reef>
- <https://www.britannica.com/science/coral-reef/Threats-to-coral-reefs>
- Jones O. A., Endean R., 1977. *Biology and geology of coral reefs*. Academic Press;
- Smith, R. L., & Paulson, A. C. (1975). Carbonic anhydrase in some coral reef fishes: Adaptation to carbonate ingestion? *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 50(1), 131–134;
- Ferreira, C. E. L., & Gonçalves, J. E. A. (2006). Community structure and diet of roving herbivorous reef fishes in the Abrolhos Archipelago, south-western Atlantic. *Journal of Fish Biology*, 69(5), 1533–1551;
- Gao, Y. M., Zou, K. S., Zhou, L., Huang, X. D., Li, Y. Y., Gao, X. Y., ... Zhang, X. Y. (2020). Deep insights into gut microbiota in four carnivorous coral reef fishes from the South China Sea. *Microorganisms*, 8(3);
- Perry, C. T., Kench, P. S., O’Leary, M. J., Morgan, K. M., & Januchowski-Hartley, F. (2015). Linking reef ecology to island building: Parrotfish identified as major producers of island-building sediment in the Maldives. *Geology*, 43(6), 503–506;

- Streelman, J. T., Alfaro, M., Westneat, M. W., Bellwood, D. R., & Karl, S. A. (2002). Evolutionary history of the parrotfishes: Biogeography, ecomorphology, and comparative diversity. *Evolution*, *56*(5), 961–971;
- Yarlett, R. T., Perry, C. T., & Wilson, R. W. (2021). Quantifying production rates and size fractions of parrotfish-derived sediment: A key functional role on Maldivian coral reefs. *Ecology and Evolution*, *11*(22), 16250–16265;
- Lange, I. D., Perry, C. T., Morgan, K. M., Roche, R., Benkwitt, C. E., & Graham, N. A. J. (2020). Site-level variation in parrotfish grazing and bioerosion as a function of species-specific feeding metrics. *Diversity*, *12*(10), 1–16;
- Hodge, J. R., Santini, F., & Wainwright, P. C. (2020). Colour dimorphism in labrid fishes as an adaptation to life on coral reefs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *287*(1923);
- Bonaldo, R. M., Hoey, A. S., & Bellwood, D. R. (2014). The ecosystem roles of parrotfishes on tropical reefs. In *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* (Vol. 52, pp. 81–132). CRC Press.
- Clements, K. D., German, D. P., Piché, J., Tribollet, A., & Choat, J. H. (2017, April 1). Integrating ecological roles and trophic diversification on coral reefs: Multiple lines of evidence identify parrotfishes as microphages. *Biological Journal of the Linnean Society*. Blackwell Publishing Ltd;
- Scott, J. J., Adam, T. C., Duran, A., Burkepile, D. E., & Rasher, D. B. (2020). Intestinal microbes: An axis of functional diversity among large marine consumers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *287*(1924);
- Tebbett, S. B., Goatley, C. H. R., & Bellwood, D. R. (2017). Algal Turf Sediments and Sediment Production by Parrotfishes across the Continental Shelf of the Northern Great Barrier Reef. *PLoS ONE*, *12*(1);
- Adam, T. C., Duran, A., Fuchs, C. E., Roycroft, M. V., Rojas, M. C., Ruttenberg, B. I., & Burkepile, D. E. (2018). Comparative analysis of foraging behavior and

- bite mechanics reveals complex functional diversity among Caribbean parrotfishes. *Marine Ecology Progress Series*, 597, 207–220;
- Cheutin, M. C., Villéger, S., Hicks, C. C., Robinson, J. P. W., Graham, N. A. J., Marconnet, C., ... Auguet, J. C. (2021). Microbial shift in the enteric bacteriome of coral reef fish following climate-driven regime shifts. *Microorganisms*, 9(8);
  - León-Zayas, R., McCargar, M., Drew, J. A., & Biddle, J. F. (2020). Microbiomes of fish, sediment and seagrass suggest connectivity of coral reef microbial populations. *PeerJ*, 8;
  - Bellwood, David. (1994). A Phylogenetic Study of the Parrotfishes Family Scaridae (Pisces: Labroidei), with a Revision of Genera. Records of the Australian Museum Supplement. 20. 1-86;
  - G. Mohammad Abu-Taweel, Z. Al-Fifi, E. Abada, H. Khemira, G. Almalki, Y. Modafar, K. Mohamed Khedher, Z. Mundher Yaseen, Parrotfish: an overview of Ecology, Nutrition, and reproduction behaviour, Journal of King Saud University - Science (2023);
  - van Woesik, R., Shlesinger, T., Grottoli, A. G., Toonen, R. J., Vega Thurber, R., Warner, M. E., ... Zaneveld, J. (2022). Coral-bleaching responses to climate change across biological scales. *Global Change Biology*, 28(14), 4229–4250;
  - Shantz, A. A., Ladd, M. C., & Burkepile, D. E. (2020). Overfishing and the ecological impacts of extirpating large parrotfish from Caribbean coral reefs. *Ecological Monographs*, 90(2);
  - Nicholson, G. M., & Clements, K. D. (2022). *S. carus spinus*, crustose coralline algae and cyanobacteria: an example of dietary specialization in the parrotfishes. *Coral Reefs*, 41(5), 1465–1479;
  - Miyake, S., Ngugi, D. K., & Stingl, U. (2015). Diet strongly influences the gut microbiota of surgeonfishes. *Molecular Ecology*, 24(3), 656–672;

- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., ... Schloter, M. (2020, June 30). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. BioMed Central Ltd;
- Bessell-Browne, P., Negri, A. P., Fisher, R., Clode, P. L., & Jones, R. (2017). Cumulative impacts: Thermally bleached corals have reduced capacity to clear deposited sediment. *Scientific Reports*, 7(1);
- Hughes, T. P., Kerry, J. T., Álvarez-Noriega, M., Álvarez-Romero, J. G., Anderson, K. D., Baird, A. H., ... Wilson, S. K. (2017). Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature*, 543(7645), 373–377.