



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

Dottorato di ricerca in:

Ecologia e gestione delle risorse biologiche
XXVII ciclo

Studio della Biodiversità batterica in acqua marina e rocce del continente Antartide

Settore scientifico-disciplinare: BIO/19

Dottoranda:
Silvia Silvi

Coordinatore: Prof. Daniele Canestrelli
Tutor: Prof. Massimiliano Fenice

*Lo scienziato non è l'uomo che fornisce le vere risposte,
ma è quello che pone le vere domande.*

(Claude Lévi-Stauss)

*Grande è il potere delle tigri e degli elefanti,
più grande quello delle termiti e delle cavallette,
ancora maggiore quello dei batteri.*

(Hans Jonas)

Indice

<i>Capitolo I</i>	INTRODUZIONE.....	1
1.1	La Biodiversità.....	1
1.2	Ambienti estremi	3
1.3	L'Antartide	5
1.4	Le terre Antartiche.....	8
1.4.1	Terra Vittoria	11
1.4.2	Gli habitat litobiontici	13
1.4.3	Le comunità endolitiche	15
1.5	Oceano Antartico.....	17
1.5.1	L'ecosistema marino antartico.....	20
1.5.2	Il Mare di Ross.....	23
1.6	Studio dei microrganismi: quantificazione e identificazione delle comunità microbiche.....	24
1.6.1	Tecniche colturali.....	26
1.6.2	Tecniche coltura-indipendenti.....	29
<i>Capitolo II</i>	OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	40
<i>Capitolo III</i>	MATERIALI E METODI.....	42
3.1	Campionamento.....	42
3.2	Microrganismi, isolamento e identificazione.....	45
3.2.1	Isolamento dei ceppi.....	45
3.2.2	Test fisiologici e morfologici.....	46
3.2.3	Estrazione del DNA.....	47
3.2.4	Amplificazione del gene 16S rDNA e sequenziamento.....	47
3.3	Studio filogenetico.....	48
3.3.1	Allineamento e costruzione degli alberi filogenetici.....	48
3.4	Condizioni colturali.....	49
3.4.1	Determinazione dei profili di crescita a differenti temperature.....	49
3.4.2	Determinazione dei profili di crescita a differenti concentrazioni di cloruro di sodio (NaCl).....	49
3.5	Studio della comunità microbica mediante DGGE.....	50
3.5.1	Estrazione del DNA genomico da campioni di acqua marina.....	50

3.5.2 Estrazione del DNA genomico da campioni di roccia.....	51
3.5.2.1 Preparazione del campione.....	51
3.5.2.2. Ottimizzazione ed estrazione del DNA.....	52
3.5.3 Amplificazione del gene 16S rDNA (PCR I) e della regione ipervariabile V3 (PCR II).....	54
3.5.3.1 PCR I.....	54
3.5.3.2 PCR II.....	54
3.5.4 Determinazione della concentrazione del DNA genomico mediante fluorimetro Qubit.....	56
3.5.5 Purificazione e concentrazione dei prodotti di PCR.....	57
3.5.6 DGGE fingerprinting.....	57
3.5.6.1 Casting del gel e corsa elettroforetica.....	57
3.5.7 Ri-amplificazione e sequenziamento delle bande.....	60
3.5.8 Albero filogenetico.....	60
3.6 Analisi statistica dei dati.....	61
3.6.1 Analisi d'immagine mediante i software Quantity-one1-D e Phoretix 1-D.....	61
3.6.2 Organizzazione funzionale (Fo).....	61
3.6.3 Indice di Ricchezza, di Ricchezza Ponderata (Rr) e indice di Margaleff.....	64
3.6.4 Indici di diversità: Indici di Simpson e Shannon.....	65
3.6.5 Indice di Stabilità e di Evenness.....	66
3.6.6 Analisi Multivariata.....	67

Capitolo IV RISULTATI E DISCUSSIONE.....69

4.1 Studio degli isolati.....	69
4.1.1 Test preliminari.....	69
4.1.2 Identificazione dei ceppi batterici.....	76
4.1.3 Studio filogenetico basato sull'allineamento del gene 16S rDNA.....	81
4.1.4 Determinazione dell'optimum e del range di crescita a differenti temperature.....	93
4.1.5 Determinazione dell'optimum e del range di crescita a differenti concentrazioni saline.....	99
4.2 Studio della comunità batterica mediante PCR-DGGE fingerprinting.....	106
4.2.1 Studio della comunità batterica di campioni di acque marine.....	107
4.2.1.1 Analisi d'immagine del gel DGGE.....	107
4.2.1.2 Affiliazione tassonomica e studio filogenetico.....	111
4.2.1.3 Analisi della comunità: indici di diversità.....	116
4.2.1.4 Analisi statistica multivariata.....	121
4.2.2 Studio della comunità batterica endolitica.....	124

4.2.2.1 Analisi d’immagine del gel DGGE dei campioni rocciosi.....126

4.2.2.2 Analisi d’immagine del gel DGGE del micro e macro habitat roccioso.....133

4.2.2.3 Analisi della comunità: indici di diversità del micro e macro ambiente roccioso139

4.2.2.4 Affiliazione tassonomica e studio filogenetico.....141

4.2.2.5 Analisi della comunità batterica endolitica: indici di diversità.....147

4.2.2.6 Analisi statistica multivariata dei campioni rocciosi.....154

Capitolo V CONCLUSIONE.....157

BIBLIOGRAFIA.....162

Capitolo I

INTRODUZIONE

1.1 La Biodiversità

Il significato di Biodiversità, con le sue diverse accezioni, lo si comprende più facilmente quando non lo si considera come termine assoluto, ma come qualcosa dipendente dal contesto che si sta studiando (Miller, 2006). Il termine biodiversità, abbreviazione di *diversità biologica*, è divenuto di uso comune dopo la dichiarazione di Agenda 21, un documento scaturito dalla Conferenza delle Nazioni Unite sullo Sviluppo e l'Ambiente tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992. Tale documento promuoveva la collaborazione scientifica a livello internazionale per incrementare le conoscenze sulla Biodiversità e le sue funzioni negli ecosistemi.

Il termine "Biodiversità" fu utilizzato per la prima volta nella sua versione più estesa "*diversità biologica*" nel 1980 da Lovejoy per descrivere il numero di specie. Riconoscendo che i metodi convenzionali di determinazione e separazione delle specie era inadeguato, altri scienziati cercarono di elaborare una definizione che includesse non solo il numero, ma anche la varietà e la variabilità degli organismi viventi (Swingland, 2001).

De Long nel 1996 afferma: "*La Biodiversità è un attributo di un territorio e in particolare si riferisce alla varietà all'interno e tra organismi viventi, nell'insieme di organismi viventi, nelle comunità biotiche e nei processi biotici presenti in natura o modificati dall'uomo. La Biodiversità può essere misurata in termini di diversità genetica e con l'identità e il numero di diversi tipi di specie, insieme di specie, comunità biotiche e processi biotici, e la quantità (abbondanza, biomassa, copertura,) e la struttura. Può essere osservata e misurata in qualunque scala spaziale che va da microscopi a differenti habitat per l'intera biosfera*".

Tuttavia, non è stata ancora concordata in modo chiaro una definizione universale ed è spesso ridefinita di volta in volta secondo lo scopo e il contesto in cui la si usa. La Biodiversità può essere definita come l'insieme delle specie vegetali, animali e microbiche, del loro materiale genetico e gli ecosistemi a cui appartengono.

La Biodiversità è spesso confusa con la diversità, tuttavia esistono differenze concettuali tra i due termini (Margalef, 1994). La Biodiversità è la ricchezza tassonomica (o genetica) totale e specifica, contenuta in natura; per chiarezza può essere anche indicata col termine di *global diversity*. La diversità invece è l'effettiva distribuzione degli individui (delle specie) e delle loro biomasse in un

particolare tempo e in un dato ecosistema; può essere anche chiamata *ecodiversity* o *locally active diversity*.

La Biodiversità riassume pertanto l'informazione genica totale presente sulla Terra o su una parte di essa, mentre la diversità ne è la componente attiva e abbondante in un particolare tempo e spazio.

La Biodiversità è un descrittore importante del funzionamento degli ecosistemi (Hooper et al., 2005; Balvanera et al., 2006) ed è legata ai processi ecologici che vi si svolgono quali la competizione, la predazione e la produzione all'interno della comunità. Inoltre, è un indicatore fondamentale della stabilità della comunità (Carr et al., 2002; Clark e McLachlan, 2003). Negli anni '60, seguendo i primi passi degli ecologi vegetali e animali, i microbiologi cominciarono a studiare l'impatto della Biodiversità sulla funzione e sulla struttura delle comunità microbiche (Hariston et al., 1968; Swift, 1974). L'aspetto principale della Biodiversità è senza dubbio quello di assicurare la moltitudine delle funzioni che possono essere attribuite agli organismi che vivono in un dato ecosistema. L'equilibrio di un ecosistema è mantenuto nel tempo dalle relazioni tra tutti gli esseri viventi che lo abitano attraverso il continuo scambio di materia e di energia. Tutti i fattori ambientali di natura chimico-fisica che caratterizzano un ecosistema, quali la temperatura, il pH, la concentrazione di sali minerali, la quantità di luce, l'ossigeno e l'anidride carbonica disponibili costituiscono le componenti abiotiche. In questa parte inanimata detta "biotopo" si trova la comunità vivente costituita dall'insieme delle componenti biotiche, formate da specie vegetali, animali e microrganismi e sono dette nel loro insieme "biocenosi" che rappresentano la Biodiversità di quell'ecosistema.

Un secondo ruolo, correlato al primo, è di assicurare che tutte le funzioni biologiche siano mantenute in condizioni di stress, ovvero al sopraggiungere di una perturbazione (Giller et al., 1997). La variabilità genetica all'interno delle specie e tra le specie conferisce resistenza alle perturbazioni. Una specie con una maggiore adattamento a un determinato stress probabilmente diventerà predominante di fronte a quello stress. Inoltre, se l'adattamento genetico alle condizioni di stress è rapido, come avviene per gli organismi dal ciclo biologico molto breve, individui dalle caratteristiche nuove potranno emergere e superare gli effetti dovuti alle perturbazioni (Giller et al., 1997).

Lo studio della Biodiversità è stato spesso affrontato per chiarire le relazioni tra l'eterogeneità funzionale dei microrganismi ed alcune delle principali variabili ecologiche. A causa dell'immenso numero di microrganismi sulla Terra e dell'ampio spettro di habitat che essi occupano, la potenziale eterogeneità e variabilità dei microrganismi è probabilmente più grande di qualsiasi altro gruppo di organismi (Morris et al., 2003; Selama et al., 2013).

Uno dei principali problemi nello studio della Biodiversità dei microrganismi è legato alle loro ridotte dimensioni che non ne permettono una sicura tipizzazione morfo-dimensionale. La ridotta diversità nelle forme e dimensioni ha condotto gli ecologi microbici verso un approccio meno diretto: la coltivazione dei microrganismi come metodo per la loro identificazione. Molti microbiologi, come Martinus Beijerinck e Sergei Winogradsky, pionieri nell'uso dei metodi culturali per studiare la

biologia generale dei microrganismi nei loro ambienti, dubitavano che questo approccio avrebbe fornito una descrizione precisa dei microrganismi e della loro presenza nei loro habitat naturali. Questo approccio, tuttavia, è ancora oggi considerato essenziale per la caratterizzazione dei microrganismi poichè le colture pure sono necessarie per effettuare non solo analisi genetiche ma anche permettere lo studio della fisiologia microbica. Purtroppo, la complessità di isolare e coltivare in laboratorio i microrganismi; oggi si ritiene che solo l'1% circa di questi è coltivabile in laboratorio, ha spinto la comunità scientifica ad affiancare ai metodi colturali nuove tecniche coltura-indipendenti per lo studio della caratterizzazione delle comunità microbiche. Con le più tradizionali analisi molecolari sono state generate innumerevoli sequenze geniche che, in alcuni casi, non hanno permesso di decifrare il reale ruolo ecologico che tali microrganismi hanno nell' ambiente in cui vivono. E' per questo che le più recenti tecniche di fingerprinting molecolare hanno affiancato le più tradizionali tecniche colturali per lo studio della Biodiversità permettendo di ottenere un maggiore numero di informazioni.

L'importanza del mondo microbico è strettamente connessa alla consapevolezza dell'enorme potenziale che esso possiede e l'approccio molecolare rappresenta un mezzo essenziale per comprendere questa grande biodiversità. L'analisi molecolare, che Wilson ed altri scienziati hanno sviluppato per comprendere la diversità delle specie più grandi, è sicuramente indispensabile per sviluppare il concetto di diversità microbica sia in termini di ecologia di comunità che di biologia evoluzionistica.

1.2 Ambienti estremi

Ci sono numerosi ambienti sulla terra definiti estremi e popolati da numerosi organismi che sono in grado non solo di sopravvivere, ma anche di prosperare. Questi organismi sono definiti estremofili. Definire in modo chiaro un "ambiente estremo" non è affatto facile; i termini estremo ed estremofilo sono relativamente antropocentrici essendo l'uomo, in base alle proprie necessità e limiti, a definire quali siano gli habitat estremi e i suoi abitanti (Bell, 2012).

Ciò fa sì che un ambiente estremo per un essere umano potrebbe non esserlo per un organismo adattato a quelle condizioni (Wingfield et al., 2011). Beniston e Stephenson nel 2004 suggeriscono dei criteri per valutare cosa e quali siano gli eventi estremi e il loro verificarsi: a) quanto sono rari e quale è la loro frequenza?, b) che impatto hanno sull'ambiente e sugli organismi a livello di costi economici e danni?

Negli ultimi anni si è avuto un ampliamento delle conoscenze dei limiti fisico-chimici della vita. Numerose riviste hanno pubblicato come anche organismi superiori (Seckbach 2000, Seckbach e

Walsh, 2010), oltre a procarioti e virus (Le Romancer et al., 2008) siano in grado di svilupparsi e proliferare in ambienti definiti estremi.

Gli estremofili includono tutti quegli organismi dei tre domini della vita: Archea, Batteri e Eucarioti, che sono in grado di prosperare in ambienti caratterizzati da condizioni fisico-chimiche vicine ai valori limite in cui un organismo può vivere (Le Romancer et al., 2008). La caratteristica specifica degli estremofili è la loro capacità di adattarsi alle condizioni estreme in termini di pH, salinità, disseccamento, pressione idrostatica, radiazioni, anaerobiosi che potrebbero essere inevitabilmente letali per gli altri organismi.

Alcuni estremofili definiti termofili, proliferano a temperature superiori a 80-100°C, mentre altri vivono a temperature inferiori a 0°C. Gli psicrotolleranti e psicrofili sono in grado di svolgere attività metaboliche fino a -20°C in determinate condizioni (Rivkina et al., 2000; D'amico et al., 2006) . Molti microrganismi sono stati scoperti in ambienti con temperature di 113°C e 122°C e possiedono enzimi in grado di essere attivi e stabili fino a 130°C (Leveque et al., 2000). I piezofili o barofili estremi, possono resistere a pressioni idrostatiche enormi associate alle elevate profondità; sono in grado di crescere negli abissi oceanici e anche associati a sedimenti a 1000 m di profondità in condizioni di anaerobiosi (Horikoshi, 1999; Lindo-Atichati et al., 2014)

Gli estremofili sono in grado di affrontare ambienti con ridotte risorse idriche e svilupparsi bene in ambienti desertici o in ambienti iperalini (alofili estremi); mentre gli acidofili e gli alcalofili vivono in ambienti estremamente acidi o basici con valori di pH al di sotto di 2 e al di sopra di 10 rispettivamente (Lefèvre et al., 2011; Hsu et al., 2013).

Molti degli organismi che vivono in queste condizioni estreme sono poli-estremofili, ossia hanno la capacità di adattarsi a più condizioni estreme contemporaneamente.

La vita in questi ambienti è un argomento estremamente interessante anche perché rappresenta un punto di convergenza per due questioni importanti:” *come la vita è comparsa sul nostro pianeta?*” e “*c'è vita oltre il nostro pianeta?*”. La durezza degli ambienti estremi offre un punto di vista prossimo alle condizioni che probabilmente esistevano quando la vita apparve sul nostro pianeta e offrono anche possibili analoghi per le condizioni su altri corpi planetari.

Oggi si ritiene che la terra abbia circa 4.5 miliardi di anni e le più antiche rocce ritrovate fino ad ora sono datate 3.5-3.8 miliardi di anni (Westall, 2005; Le Romancer et al., 2008). Le rocce vulcaniche e sedimentarie sono di particolare interesse per comprendere come la vita si sia originata sulla terra. Questo perché la loro formazione necessita di acqua liquida, probabilmente in forma di oceani. Le prove dell'inizio della vita microbica sono derivate da fossili di cellule all'interno di antiche rocce. Microfossili che sono stati trovati in vecchie rocce sedimentarie con caratteristiche simili per dimensioni e forma ai batteri moderni. Le prime forme microbiche furono probabilmente cocci, corti bastoncelli e piccoli bastoncelli curvi (Westall, 2005; Noffke et al., 2006; Errington, 2013).

L'ambiente sulla terra era molto differente da oggi, si pensa che la temperatura superficiale della terra nei primi 200 milioni di anni superava i 100°C e che l'accumulo di acqua si sia verificato solo successivamente con il raffreddarsi della crosta terrestre. Quando tale fenomeno si verificò non è ancora stato stimato, ma se la vita si è originata 3.6 miliardi di anni fa, come suggeriscono i microfossili, la terra era ancora molto calda e i primi microrganismi comparsi sulla terra furono termofili o termotolleranti.

L'atmosfera della terra non conteneva ossigeno, i principali gas presenti erano anidride carbonica, vapore acqueo, idrogeno solfato, con probabilmente piccole quantità di azoto, metano e monossido di carbonio (Wastall, 2005) per cui le prime forme di vita erano probabilmente anaerobiche. Inoltre, la mancanza di ossigeno significava che non c'era strato protettivo di ozono nell'atmosfera superiore e quindi un elevato flusso di radiazioni ultraviolette raggiungeva la superficie terrestre (Westall, 2005). La Terra primordiale era un ambiente con condizioni asperre e per molto tempo le prime forme di vita furono microbiche grazie alla loro capacità di sviluppare alte forme di diversità e di adattamento a varie condizioni ambientali estreme (Xiao e Zhang, 2014).

1.3 L'Antartide

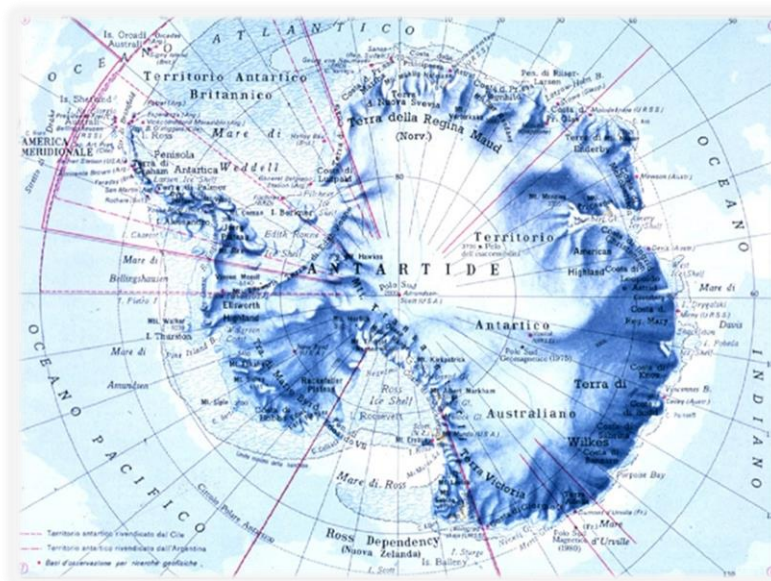


Fig.1. L'Antartide

Il nome Antartide deriva dal greco *Antarktikos*, coniato da filosofi greci nel VI secolo a.C. Il termine nacque per descrivere le terre posizionate nella parte opposta alle regioni del nord *Arktikos*.

L'Antartide dal punto di vista giuridico è un territorio non assoggettato alla sovranità di alcuno Stato. Il Trattato Antartico, stipulato a Washington il 1° dicembre 1959 fra i 12 Paesi partecipanti all'Anno Geofisico Internazionale (1957-58), è lo strumento che regola i rapporti tra gli Stati presenti sul territorio antartico; tramite questo trattato infatti gli stati firmatari si impegnarono a rinunciare ad ogni rivendicazione territoriale e a trasformare il continente in un gigantesco laboratorio, che per il suo isolamento, per la posizione geografico-astronomica e la lontananza da ogni forma di inquinamento umano (o perlomeno dalla maggior parte di esso), si presenta come il luogo ideale per lo studio del pianeta su larga scala. L'Italia ha aderito al Trattato Antartico nel 1981.

L'Antartide rappresenta un ambiente estremo particolarmente interessante per la ricerca scientifica; non solo per lo studio della Biodiversità che qui si può osservare, ma anche per la ricerca dei vari processi evolutivi e i cambiamenti climatici che prendono parte al "global change" (Walther et al., 2002; Selbmann et al., 2012).

L'Antartide costituisce una delle otto regioni biogeografiche della terra: *l'Ecozona Antartica*. E' il quinto continente per estensione; misura circa 13 milioni di Km² durante l'estate e raggiunge i 25 milioni di Km² nel periodo invernale a causa del ghiaccio che si forma ai margini delle terre costiere. L'Antartide è il continente più meridionale della terra, si sviluppa quasi totalmente all'interno del Circolo Polare Antartico e comprende i mari e le terre che circondano il Polo Sud. E' il continente più freddo, più secco e ventoso della terra. La temperatura varia da valori che si aggirano attorno a 0°C in estate sulla costa, fino a sfiorare i -90°C in inverno a 3000 metri di quota all'interno (Convey 1996; Kenarova et al., 2012; Martinez-Rosales et al., 2012).

Dal punto di vista climatico il continente può essere suddiviso in tre regioni distinte: una *regione Sub-antartica*, caratterizzata da un freddo clima oceanico con precipitazioni annuali al di sopra dei 1000 mm e temperature al di sopra degli 0°C per sei mesi all'anno, una *regione antartica marina*, caratterizzata da un freddo secco nella regione meridionale e un freddo relativamente più umido in quella settentrionale ed infine una *regione continentale*, caratterizzata da un clima freddo ed arido con la minore incidenza di precipitazioni e temperature che vanno da -10°C nel periodo estivo a -80°C nel periodo invernale.

In Antartide le precipitazioni annuali si aggirano in media tra 5 e 20 g/cm²/anno e la velocità massima del vento fino ad ora registrata è stata di 327 km/h. Ha la più alta elevazione media se confrontato con gli altri continenti (Martinez-Rosales et al., 2012).

Fino a 180 milioni di anni fa, l'Antartide faceva parte del super-continente Gondwana, che riuniva l'Australia, l'Africa, il Sudamerica, l'India e la Nuova Zelanda. Successivamente, circa 140 milioni di anni fa, iniziò lo smembramento del Gondwana e l'Antartide, formato da due parti, una più grande l'Antartide orientale e una più piccola l'Antartide occidentale, si spostò verso sud permettendo l'apertura del Passaggio di Drake, che oggi separa il Sudamerica dalla Penisola Antartica. Circa 60

milioni di anni fa, l'Antartide si separò dall'Australia originando il mare di Tasmania e da 40 milioni di anni l'Antartide si trova nella posizione attuale.

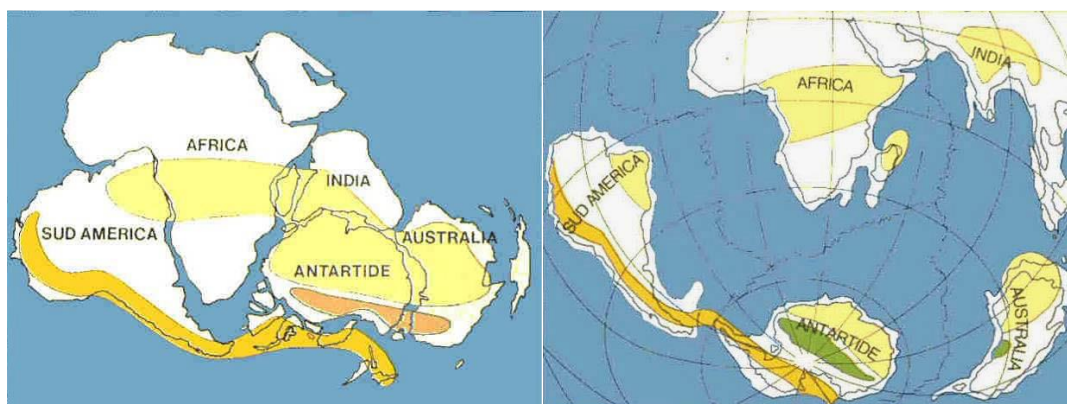


Fig.2. Successione della rottura del supercontinente Gondwana e disposizione attuale dei continenti (Manzoni, 2001).

L'isolamento provocò la genesi di una corrente circumpolare antartica, che iniziò ad essere alimentata dai moti convettivi tra le masse d'acqua di diversa temperatura, sostenuta dalla circolazione atmosferica di tipo ciclonico e influenzata dalla rotazione terrestre. Tale corrente ostacola la miscelazione diretta delle acque provenienti da zone più temperate con quelle fredde continentali. In seguito a questi eventi e alla posizione geografica polare, la grande estensione continentale, l'altitudine media elevata e la forte riflessione dei raggi solari da parte della superficie innevata iniziò il progressivo raffreddamento del continente. Queste condizioni portarono ad un lento accumulo della coltre di ghiaccio che si formò a spese dell'umidità atmosferica proveniente dai settori più temperati degli oceani circostanti (Mulvaney et al., 2012; Hemming et al., 2013). La calotta dell'Antartide orientale si formò intorno a 14 milioni di anni fa, mentre quella dell'Antartide occidentale circa 9 milioni di anni fa.

L'isolamento e la successiva deriva del continente e lo svilupparsi della corrente circumpolare antartica hanno fatto sì che gli scambi biotici tra organismi terrestri e marini fossero estremamente ridotti o in alcuni casi del tutto annullati (Cary et al., 2010; Margesin e Miteva, 2010).

I forti cambiamenti climatici che caratterizzarono il periodo dalla fine del Mesozoico hanno causato importanti cambiamenti nella composizione della struttura del biota sia marino che terrestre e le attuali condizioni ambientali estreme che caratterizzano l'Antartide forniscono intuizioni interessanti su come la fisiologia sia fortemente influenzata dall'ecologia (Clarke et al., 2012).

Infine, i recenti cambiamenti climatici che interessano l'intero pianeta stanno avendo un forte effetto sull'ambientale Antartide con evidenti segnali sia sulle terre che in mare (Clarke et al., 2007; Schofield et al., 2010). L'Antartide è una delle tre aree del globo a elevate latitudini insieme al nord-ovest America e la Siberia centrale che stanno subendo rapidi cambiamenti climatici e hanno registrato un aumento della temperatura media annua di oltre 1,5 gradi dal 1950 a fronte di un aumento medio globale di circa 0,6 gradi (Clake et al., 2012). Il riscaldamento dell'atmosfera antartica ha avuto una profonda influenza sull'ambiente; causando un consistente ritiro dei ghiacci nel corso degli ultimi 50 anni con il tasso medio di ritiro in continua accelerazione (Cook et al., 2005; Vaughan, 2006). Recenti studi basati su fotografie e immagini satellitari hanno confermato come sia molto diffuso il ritiro delle piattaforme di ghiaccio sia nella parte occidentale che orientale dell'Antartide (Ferrigno et al., 2009).

L'Antartide è considerato un ambiente di estrema importanza per comprendere e rispondere a numerosi quesiti. E' un laboratorio naturale per comprendere la genetica e la struttura degli adattamenti a condizioni estreme sia di organismi procarioti che eucarioti. Inoltre, molti scienziati considerano il Continente un serbatoio per numerose e nuove risorse come, ad esempio, la possibilità di individuare organismi in grado di produrre prodotti biotecnologici innovativi e di grande importanza (Martínez-Rosales et al., 2012; Clarke et al., 2012).

1.4 Le terre Antartiche

Il continente Antartide offre gli ambienti più freddi e più aridi della terra (Onofri et al., 2004). Poiché il continente è ricoperto quasi interamente da ghiaccio non è possibile riconoscere con facilità la sua morfologia.

Ciò nonostante dal punto di vista geografico e geomorfologico il Continente presenta una forma piuttosto tondeggiante; è attraversato dalla catena montuosa Transantartica considerata un proseguimento della catena delle Ande, a cui è unita da una dorsale sottomarina. La catena si estende per circa 3500 Km a partire dalla Terra Vittoria per arrivare alla Terra di Coats, bagnata dal mare di Webber.

Circa il 98% della superficie continentale è ricoperta dalla più grande calotta di ghiaccio della terra: la *Calotta Glaciale Antartica*, che presenta uno spessore massimo, di circa 4700 m in corrispondenza della Terra di Adelia. La catena Transantartica divide la Calotta Glaciale Antartica in calotta orientale e occidentale con uno spessore medio rispettivamente di 2500 e 1700 metri. Il volume medio di ghiaccio presente in Antartide è di 26.6 milioni di Km³ e costituisce circa il 92% delle riserve d'acqua dolce dell'intero pianeta (Patterson e Laybourn-Parry, 2012).

Il continente viene attraversato dal meridiano di Greenwich che lo divide in due parti: L'Antartide Minore che comprende la Penisola Antartica, la Terra di Mary Bird e la Terra di Ellsworth e l'Antartide Maggiore costituito da un vasto altopiano di circa 10 milioni di Km². Il punto di maggiore altitudine è in corrispondenza dei monti Ellsworth con il massiccio Vinson (4897 m s.l.m.); mentre la maggiore depressione è nella fossa subglaciale di Bentley a 2538 m sotto il livello del mare.

Il clima antartico è il più rigido del pianeta e le temperature atmosferiche raramente superano gli 0°C (Defendi, 2004). Le condizioni climatiche non sono omogenee in tutto il continente e notevoli differenze si osservano tra la cupola glaciale, le Valli Secche e la regione peninsulare. Mentre la maggioranza della superficie terrestre del continente è coperta in modo permanente da uno strato multi-chilometrico di ghiaccio, solo circa l'1-3% ne è privo per almeno un periodo durante l'anno (Cowan e Ah-Tow, 2004). Queste regioni libere dal ghiaccio comprendono principalmente alcune delle montagne (*nunatak*) che emergono al di sopra dell'altopiano di ghiaccio, regioni desertiche costiere caratterizzate da suoli aridi con poca o nessuna vegetazione e regioni costiere di terra Vittoria, le colline Vestfold, la Penisola Antartica e la Marts Oasis.

L'ambiente terrestre deglaciato del continente antartico offre una combinazione unica di condizioni climatiche, con temperature estremamente basse, limitate disponibilità di acqua, lunghi periodi di oscurità e un'alta incidenza periodica di radiazioni solari (Cowan e Ah-Tow, 2004; Onofri et al., 2004). Il suolo è quasi continuamente esposto ad una condizione di disidratazione, con bassi livelli di umidità sia nell'estate australe che in inverno. Questo associato a bassi tassi di precipitazione, porta ad un'elevata essiccazione negli strati superiori del profilo del suolo.

In Antartide il permafrost, la parte inferiore del terreno, pervade stabilmente tutto il sottosuolo fino a grande profondità mantenendo una temperatura costante al di sotto degli 0°C. Lo strato attivo è limitato a pochi centimetri e a pochi luoghi: le Valli secche, alcune coste piane e le isole subantartiche. La scarsa diffusione delle strutture periglaciali superficiali è dovuta sia alla scarsità stessa dei territori liberi dai ghiacci, sia alle basse temperature dell'aria che hanno medie quasi sempre negative anche in estate. Il permafrost è necessariamente longevo: i tempi della sua persistenza vanno dal migliaio alle centinaia di migliaia di anni. Si pensa che il permafrost antartico occupi il sottosuolo da quando la glaciazione si è insediata sul continente e che si spinga a molte centinaia di metri di profondità.

La disponibilità di acqua liquida nel suolo antartico è estremamente ridotta anche a causa della elevata salinità del suolo (Vishniac, 1993, Deuerling et al., 2014). Anche se non è uniformemente distribuita, un'elevata salinità è evidente nella maggior parte dei terreni deglaciati, con livelli di salinità decrescenti con l'altitudine (Vishniac, 1993). L'accumulo di sale in suoli superficiali ha diverse cause; può dipendere sia dal substrato, l'acqua per capillarità arriva dal permafrost fuso, che dal trasporto eolico di aerosol marini (Wynn-Williams, 1990, Aislabie et al., 2012). Il contenuto di materiale organico nel suolo è molto basso. Le poche percentuali misurate derivano dal movimento glaciale

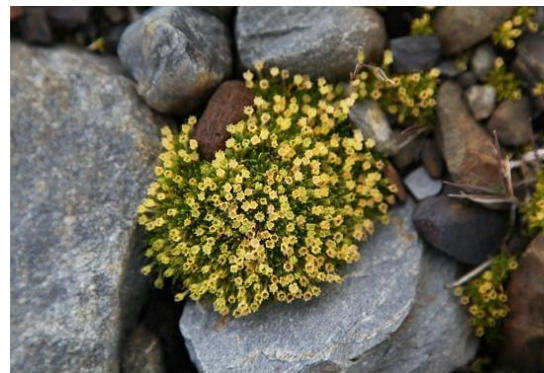
nella regione, dall' abrasione fisica delle rocce e conseguente esfoliazione delle comunità endolitiche, dal erosione di sedimenti esposti in antichi letti di laghi e di mare (Burkins et al., 2000).

Le terre emerse rappresentano un ambiente molto più ostile rispetto a quello marino ed è per questo che il continente è quasi completamente privo di organismi viventi superiori e quasi completamente spoglio di vegetazione. Per le piante superiori la vita risulta quasi impossibile anche nelle aree che non presentano una copertura nevosa continua. La più ampia area priva di ghiacci è l'Oasi di Bunge, che ospita però solo pochi esemplari di muschi e licheni. Le rare crittogame che si possono trovare nelle zone non ghiacciate rappresentano un ottimo substrato per lo sviluppo di protozoi, tardigradi e altri microinvertebrati, che, come tutti gli organismi che vivono in Antartide per l'intera durata del loro ciclo vitale, hanno evoluto strategie per la resistenza alla disidratazione e a tutte quelle condizioni ostili alla vita (Bullini et al., 1998).

La presenza di piante vascolari è limitata alla penisola antartica e comprende due sole specie: *Descampsia antarctica* (Desvaux, 1854) e *Colobanthus quitensis* (Kunth e Bartling, 1821), (fig.3).



Descampsia antarctica



Colobanthus quitensis

Fig.3. Piante vascolari in Antartide

I pinguini, uccelli inetti al volo, ma abili nuotatori, sono i principali abitanti delle terre emerse e, proprio per le loro caratteristiche anatomiche e adattative, restano strettamente legati alle aree costiere. Oltre ai pinguini altre specie di uccelli, come albatrici e procellarie, compiono parte del loro ciclo vitale in Antartide.

La natura estrema dell'ambiente portò in passato a concludere che l'Antartide fosse quasi priva di forme di vita. Oggi è noto che esiste un'abbondante vita microbica anche in quegli ambienti antartici più estremi e che la diversità microbica e la biomassa in terreni desertici antartici sono piuttosto rilevanti (Aislabie et al., 2006).



Fig.4. *Aptenodytes forsteri* (pinguino imperatore) e *Mirounga leonina* (elefante marino del sud).

1.4.1 Terra Vittoria

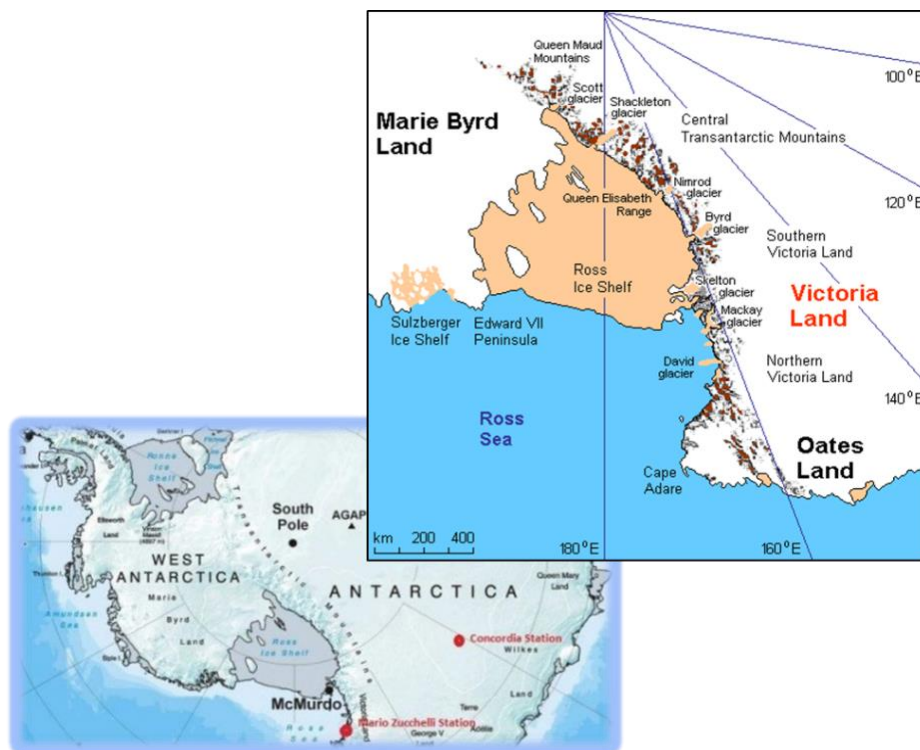


Fig.5. Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria.

Terra Vittoria è una regione dell'Antartide situata a sud del continente e così chiamata da James Clark Ross in onore della sovrana britannica la regina Vittoria. Confina a est con il mare di Ross e a ovest con la terra di Wilkes. Con la catena montuosa Transantartica che costituisce una barriera di oltre 1000 km tra la voluminosa calotta di ghiacci dell'Antartide Orientale e il Mare di Ross, la Terra

Vittoria rappresenta una regione chiave del pianeta dove il più grande sistema di fratture crostali con grandi bacini e un' ampia catena montuosa sollevata di oltre 4000 m è stata scolpita per milioni di anni dalla più grande calotta glaciale in una storia complessa di espansioni e contrazioni punteggiata da innumerevoli episodi vulcanici. Per le sue innumerevoli caratteristiche geologiche e geomorfologiche la Terra Vittoria rappresenta una delle regioni del pianeta con la più elevata geodiversità indispensabile per comprendere le complesse interazioni dei processi ambientali nelle regioni polari, la risposta delle calotte di ghiaccio ai cambiamenti climatici e l'eventuale futuro utilizzo di geo-risorse in un'ottica di sviluppo sostenibile.

La parte meridionale di Terra Victoria che comprende le Valli Secche di McMurdo (o deserto di Ross), costituisce la parte più estesa priva di ghiaccio in Antartide e comprende un'area di circa 4800 km² (Friedmann e Ocampo, 1976; Onofri et al., 2004). I secchi venti catabatici con velocità maggiori di 100 km/h scendono dagli altopiani ghiacciati lungo le valli e contribuiscono al mantenimento delle condizioni desertiche (Friedmann, 1982; Doran et al, 2002). Queste valli desertiche sono costituite da roccia nuda e suolo, senza copertura di ghiaccio o neve costante (Friedmann, 1982).

La temperatura dell'aria annuale media del deserto di Ross va da -20°C a -25°C, anche se le temperature estive e invernali variano notevolmente. La temperatura dell'aria oscilla tra -20°C e -50°C nella stagione invernale sebbene siano stati registrati valori superiori a -60°C. Durante l'estate la temperatura dell'aria può variare tra -35°C e +3°C a seconda delle condizioni meteorologiche e la particolare posizione geografica (Friedmann, 1982; Onofri et al., 2004; Aislabie et al., 2013).

La temperatura superficiale del suolo nel deserto di Ross può variare significativamente rispetto alla temperatura dell'aria. La superficie del terreno durante i periodi di luce solare diretta può superare i 15°C (Ellis e Evans 1997; Aislabie et al., 2013). Evidenti oscillazioni di temperatura delle superfici sono comuni e dipendono dalla luce diretta del sole e dalla copertura nuvolosa. Inoltre il continuo sole estivo può aumentare la temperatura interna delle rocce fino a 10°C rispetto alla temperatura dell'aria (De la torre et al., 2003). L'unica forma di precipitazioni nella regione delle Valli Secche sono le nevicate, con una precipitazione media annua di circa 10 g/cm²/anno (Ugolini, 1979; Eveland et al., 2013). Il tasso di evaporazione/sublimazione supera quello di precipitazioni (Marchant e Head, 2007).



Fig.6. Distese di ghiaccio a Morris Basin e Kay Island, Terra Vittoria del Nord.

1.4.2 Gli habitat litobiontici

Le condizioni climatiche dell'Antartide e in particolare delle Valli Secche hanno portato all'apparente ritiro della vita in microambienti protetti offerti da pietre e rocce (Wierzchos et al., 2011). Habitat associati con le rocce sono indicati come litici o litobiontici e possono essere classificati in tre tipi a seconda dello spazio occupato dagli organismi: *epilitico* sulla superficie di contatto roccia-atmosfera, *endolitico* all'interno della roccia e *ipolitico* sulla superficie di contatto roccia-suolo (fig.7). Sebbene la crescita epilitica si verifichi nelle regioni costiere, climaticamente meno estreme del Continente, le superfici della roccia sono per lo più prive di vita a causa delle condizioni climatiche che favoriscono uno sviluppo maggiormente endolitico ed ipolitico (Friedmann e Ocampo, 1976, Friedmann, 1982; Yung et al., 2014). Queste comunità litiche sono prevalenti nel deserto antartico e la loro distribuzione è onnipresente nelle regioni senza ghiaccio (Nienow e Friedmann, 1993). La funzione più evidente delle rocce è quella di proteggere le comunità microbiche dai forti venti che qui si osservano ed inoltre, hanno anche un ruolo di protezione verso le forti e intense radiazioni ultraviolette (Friedmann, 1982; Wierzchos et al., 2013).

Tutti i microrganismi possiedono meccanismi di riparazione per danni dovuti alle irradiazione UV, ma gli organismi litobiontici vengono ulteriormente protetti dai sovrastanti strati di roccia (Cockell et al., 2002; Cockell e Córdoba-Jabonero, 2004). Le rocce sono, inoltre in grado di intrappolare l'umidità e fornire una fonte di acqua liquida, che è estremamente scarsa nelle condizioni di disidratazione tipiche di molte zone dell'Antartide (Cockell e Stokes, 2004; Cary et al., 2010). Le comunità litobiontiche occupano nicchie dove è disponibile acqua sia liquida o sotto forma di vapore. Gli strati rocciosi possono assorbire vapore acqueo utilizzando meccanismi fisici indipendenti dei processi biologici della comunità che la colonizza. Tali processi possono aumentare la quantità di acqua disponibile per la crescita microbica in particolare nei mesi estivi, quando il riscaldamento

delle rocce e del suolo provocano un parziale e superficiale scioglimento del permafrost sottostante. La roccia può quindi fungere da riserva di acqua biologicamente accessibile durante i cicli di gelo e disgelo.

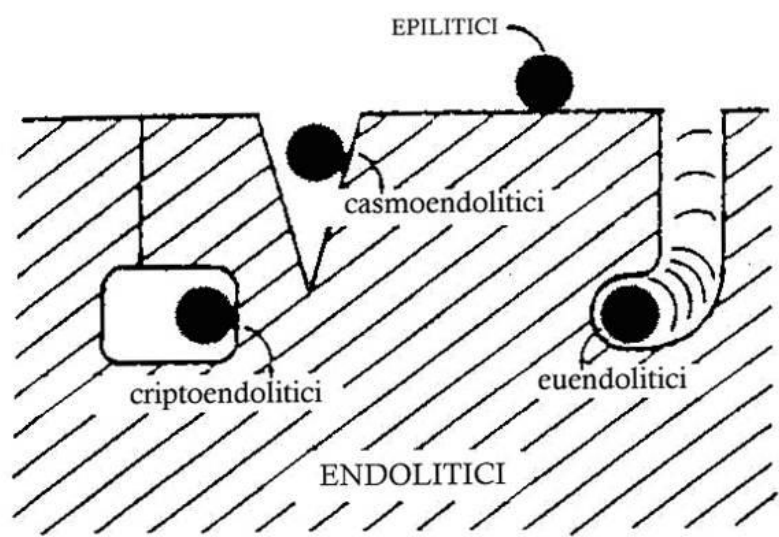


Fig.7. Schema della classificazione della vita nelle rocce (Golubic et al., 1981)



Fig.8. A sinistra, lichene epilitico su dolerite a Convoy Range, Terra Vittoria del Sud, a destra, licheni su roccia a Kay Island, Terra Vittoria del Nord.

Sono state descritte numerose comunità microbiche che occupano una varietà di substrati rocciosi differenti come selce (Berner e Evenari, 1978), calcare (Cockell e Stokes, 2009; McNamara et al.,

2006), gesso (Hunghe e Lawley, 2003) e arenaria (Friedmann e Ocampo, 1976; (Hunghe e Lawley, 2003; Yung et al., 2014). La colonizzazione microbica di rocce dipende dalla combinazione di numerose variabili. Oltre ai fattori ambientali, le proprietà fisico-chimiche delle rocce, come l'ultrastruttura, la composizione minerale e pH contribuiscono alla capacità della roccia di ospitare habitat adatti a microrganismi. I cianobatteri dominano tipicamente substrati rocciosi che hanno elevate quantità di carbonati di calcio e magnesio. Viceversa, comunità dominate da funghi sono state trovate in ambienti caratterizzati da concentrazioni elevate di ossidi metallici. La temperatura delle superfici rocciose e del suolo è strettamente legata alla temperatura dell'aria e alle radiazioni solari (Nienow e Friedmann, 1993). Durante il periodo invernale, quando la luce solare è quasi totalmente assente, le temperature delle superfici rocciose sono in media 1-2°C inferiori alla temperatura dell'aria. In estate, tuttavia, le temperature superficiali aumentano significativamente raggiungendo valori al di sopra della temperatura ambientale. Inoltre, la temperatura delle superfici rocciose può variare anche in base ad altri importanti fattori quali la posizione, l'orientamento, l'altitudine, la permanenza della copertura nevosa. Questi sono fattori significativi nella scelta da parte dei microrganismi della posizione rocciosa sulla quale avverrà la colonizzazione.

1.4.3 Le comunità endolitiche

La nicchia endolitica viene sfruttata dalle comunità microbiche in modo differente. Si parla di comunità *euendolitiche*, quando i microrganismi penetrano attivamente all'interno della struttura rocciosa, comunità *criptoendolitiche* che occupano le cavità naturali e strutturali della roccia e le comunità *cosmoendolitiche* che abitano le crepe già presenti nella roccia. I fattori ambientali che regolano l'insediamento, la crescita e la struttura della comunità microbica all'interno della roccia sono molteplici come la temperatura, l'umidità, le radiazioni UV, l'esposizione e generano notevoli differenze nelle condizioni microclimatiche. Queste caratteristiche ambientali costringono le comunità a periodi di inattività metabolica seguiti da rapidi risvegli non appena si presentano condizioni favorevoli. Ciò permette lo sviluppo solo di microrganismi dotati di un ampio range di tolleranza a molteplici e variabili stress. I microrganismi presenti nelle rocce antartiche sono soprattutto estremofili (Shivaji, 2005; Teixeira et al., 2010) che mostrano un notevole grado di specializzazione e adattamento (Gorbushina, 2007).

L'arenaria è una roccia comunemente presente nelle Valli Secche ed è fortemente colonizzata dalle comunità microbiche, rendendola un importante habitat criptoendolitico (Friedmann et al., 1988; Hirsch et al., 2003).

Le comunità endolitiche possono essere ulteriormente classificate in base all'organismo dominante nella comunità: per cui si parla di comunità dominate dai cianobatteri, comunità dominate dai licheni e le comunità dominate da alghe verdi (Friedmann, 1982).

Le comunità dominate dai licheni sono le più diffuse nelle Valli Secche (Friedmann, 1982; De la Torre et al, 2003). Sono visibili come distinte bande colorate, formate da funghi filamentosi e alghe verdi unicellulari. Le zone colonizzate sono costituite da una zona superiore nera di 1 mm, una zona bianca di dimensioni 2-4 mm e una zona inferiore verde (Friedmann, 1982).

Gli studi delle comunità delle Valli Secche hanno rivelato che i cianobatteri e i licheni sono i produttori primari di questi sistemi (Friedmann et al., 1988; De los Rios et al., 2004; Yung et al., 2014). Nelle comunità criptoendolitiche lichenizzate analisi molecolari hanno mostrato la presenza di una specie dominante di alga verde, *Trebouxia Jamesii* (De la Torre et al., 2003; Yung et al., 2014). Questa alga è un componente nota di associazioni licheniche (Kroken e Taylor, 2000). Per quanto riguarda la componente procariotica è stata evidenziata la presenza di *Actinobacteria*, *α -proteobacteria*, *γ -proteobacteria* (De la Torre et al., 2003).

Le comunità dominate da alghe verdi sono rappresentate in massima parte da *Hemichloris antarctica*, che spesso è l'unico organismo presente. Questa comunità si sviluppa sulla parte inferiore di rocce sporgenti ricevendo solo la luce riflessa dalla superficie rocciosa e dalla neve. Questo è il motivo dell'assenza di licheni, incapaci di sopravvivere a così basse quantità di luce incidente.

Le comunità dominate dai cianobatteri sono suddivise principalmente in tre gruppi sulla base del microrganismo dominante: *Gleocapsa* sp., *Hormathonema-Gleocapsa*, e *Chroococcidiopsis* sp. (Bowman et al., 2000; Adams et al., 2006).

La prima, è tipica di massi e affioramenti di arenaria, e l'organismo prevalente è *Gleocapsa* sp. (Brinkmann et al., 2007).

La comunità *Hormathonema-Gleocapsa* è tipica di rocce prive di ferro. La sua presenza è limitata a zone dove l'acqua allo stato liquido è disponibile grazie allo scioglimento delle nevi e del ghiaccio (Brinkmann et al., 2007).

La terza comunità, è dominata da *Chroococcidiopsis* sp. che rappresenta l'unico organismo fotosintetizzatore. E' tipica di rocce ferrose e si ritrova in ambienti particolarmente secchi ed estremamente freddi (Dadheech, 2010).

La forte competizione in un ambiente tanto piccolo e complesso porta alla totale occupazione di tutti gli spazi disponibili della porzione endolitica della roccia. La tipica stratificazione di queste comunità è dovuta sia a esigenze fisiologiche dei vari microrganismi che agli stress ascrivibili alla competizione intra e inter specifica. Il differente adattamento alle intensità luminose porta gli organismi maggiormente tolleranti nella parte alta della stratificazione e i meno tolleranti negli strati inferiori. Inoltre, la produzione di sostanze ad azione antibiotica può spingere alghe e cianobatteri verso gli strati più profondi.

Le comunità dominate da cianobatteri sono caratterizzate dalla presenza di specie del genere *Chroococcidiopsis*, insieme a cianobatteri morfologicamente simili alle specie *Gloeocapsa*, *Plectonema*, *Hormathonema* (De la Torre et al., 2003). Queste comunità sono caratterizzate dalla presenza di più specie fungine e numerosi procarioti tra cui molte del gruppo α -proteobacteria (Pointing et al., 2009).

Analisi molecolari effettuate su rocce provenienti dalle Valli Secche hanno evidenziato la presenza di batteri appartenenti agli *Actinobacteria*, α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* (De la Torre et al., 2003). Tra gli α -*Proteobacteria* si trovano *Blastomonas ursincola*, *Sphingomonas subterranea*, *Acinetobacter* sp.. Tra gli *Actinobacteria* si trovano *Arthrobacter* sp., *A. agilis* e *Pseudomonas* sp. (De la Torre et al., 2003).

Alcuni studi, volti alla ricerca di enzimi e antibiotici da parte di batteri criptoendolitici antartici, hanno permesso l'isolamento di batteri appartenenti al genere: *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micromonospora* (Gesheva, 2010).

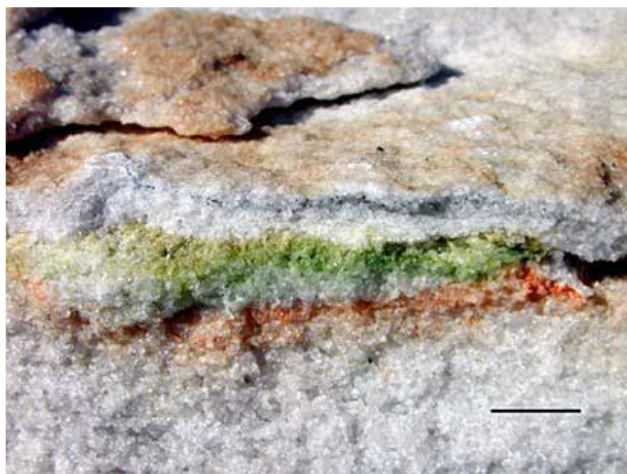


Fig.9. Colonizzazione criptoendolitica di una comunità dominata dai licheni lungo una frattura di arenaria (Battleship Promontory, Convoy Range, Valli Secche di McMurdo). Dall'alto verso il basso: la crosta silicea superficiale; la zona nera colonizzata dai funghi lichenizzati e non; la zona bianca colonizzata da funghi ed alghe lichenizzate; la zona verde colonizzata da alghe non lichenizzate e cianobatteri; la zona di accumulo (Friedmann, 1982) (barra = 10 mm) (Onofri et al., 2007).

1.5 Oceano Antartico

L'oceano Antartico o Australe è il quarto oceano più grande al mondo. Copre circa 21 milioni di chilometri quadrati ed è l'oceano più meridionale della terra, tanto da essere definito anche oceano Meridionale (Manzoni, 2005). A differenza degli altri oceani e mari, le acque dell'Antartide sono costantemente caratterizzate da bassa temperatura e da valori piuttosto elevati di densità e di ossigeno disciolto. Alle alte latitudini polari la salinità è circa 34‰ (Doval et al., 2002). I fattori fondamentali che influenzano la salinità sono dovuti alle temperature molto basse che minimizzano l'evaporazione delle acque e influiscono in modo determinante sulla formazione e sullo scioglimento dei ghiacci. La

salinità torna a livelli leggermente più alti scendendo in profondità contemporaneamente ad un aumento della temperatura (Close et al., 2012). Le acque antartiche sono comunque molto "fertili" poiché le correnti portano in superficie dal fondo una grande quantità di sali minerali, sostanze nutritive ed il freddo, che aumenta la solubilità dei gas, fa sì che l'acqua diventi molto ricca di ossigeno e anidride carbonica. L'oceano Antartico, è separato dagli altri oceani da un netto confine oceanografico determinato dalle masse d'acqua. Uno strato superficiale di ghiacci marini a ciclo annuo, la banchisa, copre per molti mesi i due terzi meridionali dell'oceano Australe fino a 800-1300 km a nord dalle coste antartiche.

I mari Antartici sono più interni, meno profondi e vicini al continente, insediati sulla piattaforma e la scarpata del continente Antartide. I fondali dei mari antartici e dell'oceano Antartico si distribuiscono geograficamente attorno al continente in anelli concentrici differenziati per profondità e struttura. La cintura dei mari costieri occupa la piattaforma continentale, una fascia piana e stretta dei fondali che circondano l'Antartide come una terrazza sommersa. La piattaforma è in media larga 100 km con una profondità media di circa 460 m. Questa si è formata dall'erosione del continente in tempi geologici relativamente recenti dove i sedimenti portati a largo dalle correnti e dai ghiacci galleggianti si depositano prevalentemente sul pendio della scarpata continentale facendo progredire progressivamente la piattaforma verso l'esterno (Knox, 2006).

L'oceano Australe ha un ruolo fondamentale nel sistema termodinamico terrestre. Le grandi correnti che lo percorrono, organizzate a più livelli, ne fanno una complessa macchina che è insieme una pompa di calore ed un motore essenziale alla stabilità ed al funzionamento del clima planetario. Il ruolo essenziale dell'oceano Australe deriva da varie condizioni come la posizione circumpolare, la posizione dei bacini, le caratteristiche delle acque come dinamicità e circolazione (Knox, 2006).

Per capire come e su quali scale temporali l'enorme massa d'acqua oceanica interagisce con l'atmosfera e regola il clima della terra è necessario determinare i meccanismi di trasferimento delle acque superficiali verso le profondità e da qui di nuovo in superficie regolando i flussi di calore dalle zone più calde a quelle più fredde e trasferendo, di conseguenza, le acque più fredde dai poli all'equatore.

Il principale flusso marino è la *Corrente Circumpolare Antartica* (CCA), l'unica corrente che fluisce intorno al globo senza incontrare terre emerse che la ostacolano. La particolare situazione meteorologica di questa fascia latitudinale caratterizzata dalla presenza di basse pressioni continuamente in movimento lungo la direttrice NO - SE, implica che l'Oceano Meridionale risulti animato da un moto quasi permanente da ovest verso est con una debole componente verso nord e con un trasporto di massa dell'ordine di 100-200 milioni di metri cubi al secondo (Meredith et al., 2004). Questo flusso verso est, guidato dal vento, viene definito "West Wind Drift". In prossimità del continente antartico, invece, lo stress del vento induce un flusso netto verso ovest, la *Corrente Polare*, che mantiene attivi alcuni vortici orari a sud della Corrente Circumpolare Antartica come il Ross

Gyre nell'Oceano Pacifico ed il Weddell Gyre nell'Oceano Atlantico. Tra le due correnti che si muovono in senso opposto, si delimita una zona che prende il nome di *Divergenza Antartica* e che attiva una consistente risalita di acque profonde, più calde e più salate, con relativo trasferimento di calore negli strati superiori (Crease, 1964; Hemmings, 2014). Nell'Oceano Meridionale avviene un notevole scambio di energia fra le acque fredde antartiche e quelle settentrionali più calde. Si tratta di un processo che tende a compensare il surplus di energia prodotto nelle acque equatoriali e fondamentale per il mantenimento del sistema climatico globale. Lungo la corrente circumpolare si realizza, infatti, lo scambio di energia e del contenuto di sali che regola e condiziona il trasferimento delle sostanze chimiche e delle specie biologiche, consentendo all'ecosistema antartico di mantenere le sue peculiari caratteristiche. La zona che meglio manifesta questi fenomeni è la *Convergenza Antartica*.

La Convergenza Antartica, nota anche come Fronte Polare Antartico o Zona Frontale Polare, è la frontiera che limita verso nord l'oceano Australe. E' una fascia con larghezza che varia da 40 a 80 Km tra le latitudini 40° Sud e 60° Sud a circa 1600 Km dalle coste. Qui l'acqua che fluisce verso nord, fredda, densa e vicina al punto di congelamento, sprofonda sotto l'acqua più temperata sub-antartica che si muove verso sud. Le due masse d'acqua non si mescolano, dato che i venti occidentali le deviano in due correnti parallele. Una differenza di temperatura marca chiaramente il confine tra i due flussi: quando si supera questo limite verso Sud, quasi subito, la temperatura d'acqua cala di 2-3°C.

La Convergenza Antartica costituisce una barriera insormontabile per gran parte degli organismi marini di minori dimensioni soprattutto planctonici. E' per questo che a sud di questa si sono evoluti ecosistemi del tutto particolari, gran parte dei quali endemici (Clarke et al., 2005; O'Loughlin, 2011).

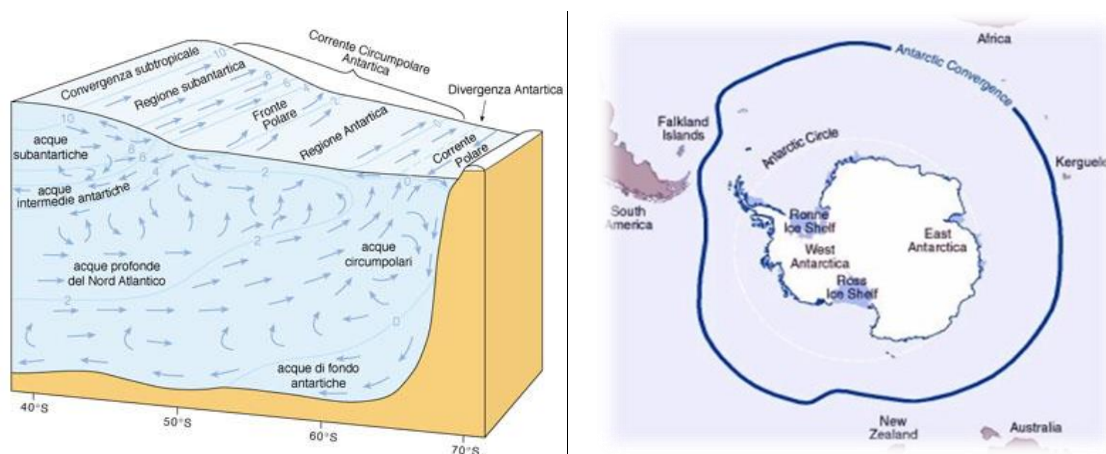


Fig.10. Rappresentazione delle correnti che originano la *Convergenza Antartica* e area su cui si estende.

1.5.1 L'Ecosistema marino antartico

L'ambiente marino antartico presenta una maggiore varietà di organismi viventi rispetto all'ambiente terrestre Antartico. Le acque sono molto fertili poiché le correnti portano in superficie dal fondo una grande quantità di sostanze nutritive e sali minerali. Inoltre le basse temperature, che aumentano la solubilità dei gas, e le correnti marine rendono queste acque molto ricche di ossigeno e anidride carbonica, tanto che si trovano specie di pesci che vivono con quantità molto basse di emoglobina (Verde et al., 2006; Russo et al., 2010).

In questo habitat i principali produttori primari sono gli organismi fotosintetici del fitoplancton e seppur in misura minore, i componenti del cryoplancton (soprattutto alghe verdi che vivono nell'acqua di fusione sulla superficie dei ghiacciai) (Michaud et al., 2004).

Lo zooplancton si divide in meroplancton (o plancton temporaneo) e oloplancton (o plancton permanente): il primo comprende uova e larve di specie bentoniche come policheti, echinodermi e molluschi; il secondo, invece, comprende crostacei, rotiferi, celenterati, ecc.

In questo habitat sono presenti in grande abbondanza piccoli crostacei del genere *Euphausia* (*E. superba*) noti come *krill*, che rappresentano la principale fonte di nutrimento per una ricca fauna ittica e soprattutto per i cetacei.

L'abbondanza di questi piccoli crostacei e di altri piccoli organismi animali è conseguenza dell'abbondanza di fitoplancton e batterioplancton, di cui si nutrono (Sullivan et al., 1990; Karl, 1993; Michaud et al., 2004). Infatti, grandi quantità di krill si sviluppano in primavera in occasione della fioritura algale. Molti crostacei si nutrono anche dei microrganismi che compongono le comunità di alghe, protozoi e batteri che si sviluppano nelle piccole fessure del ghiaccio marino. Infatti, questo rappresenta un habitat popolato da un'ampia varietà di organismi tra cui diatomee, flagellati, protozoi e batteri (Bowman et al., 1997).



Fig.11. Abitanti delle acque oceaniche; *Pterapogon kauderni* (pesce ghiacciolo) e *Euphausia superba* (Krill).

Nei mari antartici si trovano molti organismi che fanno parte del necton, ossia organismi marini natanti, come molluschi cefalopodi (importante risorsa alimentare per cetacei, uccelli e foche), crostacei decapodi, pesci e mammiferi marini. Sui fondali si trovano invece molti rappresentanti del benthos come anellidi, echinodermi e spugne; questi assieme a vari invertebrati nectonici sfruttano come principale fonte di nutrimento alghe e zooplankton.

Tra i vertebrati che vivono nelle acque antartiche vanno innanzitutto ricordati i teleostei, caratterizzati da straordinari adattamenti alle basse temperature, come la quasi totale assenza di emoglobina, la bassissima quantità di eritrociti, la produzione di glicopeptidi che impediscono il congelamento dei liquidi corporei e li rendono capaci di vivere in queste acque (Verde et al., 2006; Russo et al., 2010). Per quanto riguarda i mammiferi marini, troviamo specie appartenenti all'ordine dei Cetacei, come Mysticeti e Odontoceti: i primi, di cui fanno parte anche le balene, sono provvisti di fanoni, strutture che permettono loro di catturare il krill (la loro principale fonte di nutrimento), mentre i secondi, come per esempio le orche, possiedono un efficace sistema di ecolocalizzazione e veri e propri denti che li rendono abili predatori. Oltre ai Cetacei abitano queste acque anche varie specie di mammiferi pinnipedi quali l'otaria, l'elefante marino, la foca di Weddel, la foca Leopardo, la foca mangiatrice di granchi e la foca di Ross, che si nutrono prevalentemente di krill, pesci e molluschi cefalopodi (Bullini et al., 1998).

Tra i microrganismi marini troviamo alghe, batteri, funghi, lieviti e protozoi: alcuni fanno parte del plancton, altri invece sono microrganismi bentonici, spesso racchiusi all'interno di biofilm ancorati al fondale. Tra tutte le specie di microrganismi planctonici, quelle appartenenti al batterioplancton (l'insieme dei microrganismi batterici presenti nel plancton) giocano indubbiamente un ruolo molto importante nell'ecosistema dell'Oceano Antartico (Sullivan et al. 1990; Karl, 1993; Michaud et al., 2004), come del resto in tutti gli oceani del pianeta, e rappresentano, inoltre, una componente numericamente rilevante dei microrganismi marini.

Questi hanno sviluppato adattamenti che li rendono in grado di vivere in ambienti freddi, come enzimi funzionanti a basse temperature ricchi di α -eliche e con pochi foglietti- β (l' α -elica fornisce elasticità alla struttura, il foglietto- β rigidità) e con un elevato contenuto di aminoacidi polari e un basso contenuto di aminoacidi idrofobici (ciò contribuisce all'elasticità della proteina); inoltre le membrane degli psicrofili hanno un elevato contenuto di acidi grassi insaturi, al fine di mantenere la fluidità anche a basse temperature (Madigan e Martinko, 2007; Russo et al., 2010).

Un aspetto importante da tenere in considerazione quando si parla del batterioplancton, è che possono avvenire oscillazioni nella composizione delle comunità durante l'anno dovute al susseguirsi di diversi avvenimenti, come per esempio lo scioglimento del ghiaccio marino o la fioritura algale (Delille e Rosiers, 1995; Ducklow et al., 2001).

Nonostante la biodiversità batterica dell'oceano Antartico non sia eccessivamente ampia, presenta comunque un numero piuttosto elevato di specie appartenenti alle classi α -*Proteobacteria* e γ -

Proteobacteria (facenti parte del phylum *Proteobacteria*) e ai phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, anche se a quest'ultimo phylum in misura minore rispetto agli altri. La classe γ -*Proteobacteria* è rappresentata per lo più dai generi *Psychrobacter*, *Psychromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Glaciecola*, *Colwellia* e *Shewanella*. I γ -*Proteobacteria* sono microrganismi ubiquitari presenti in gran parte delle comunità marine di batterioplancton. Della classe degli α -*Proteobacteria*, invece, sono state ritrovate specie appartenenti per lo più ai generi *Roseobacter* e *Sphingomonas* (Lo Giudice et al., 2012). Il genere *Roseobacter* è esclusivamente marino e spesso abbondantemente presente nelle comunità batteriche associate alla fioritura algale (Buchan et al., 2005; Lo Giudice et al., 2012). Per quanto riguarda invece il phylum degli *Actinobacteria*, nell'oceano Antartico sono presenti specie appartenenti al genere *Arthrobacter*. È stato osservato che alcuni *Actinobacteria*, isolati nei pressi di Baia Terra Nova, sono in grado di vivere a bassissime concentrazioni saline, e ciò fa pensare ad una loro probabile origine terrestre e un loro trasporto da parte dei forti venti catabatici presenti in questa zona. Dei *Bacteroidetes* sono stati invece rilevati i generi *Gillisia*, *Bizionia*, *Gelidibacter*, *Polaribacter* e *Psychroflexus*. Sembra che anche i *Bacteroidetes* appartenenti al batterioplancton provengano dallo scioglimento del ghiaccio marino (essendo in esso ben rappresentati).

Infine la piccola frazione di specie appartenenti al phylum *Firmicutes* è stata ricondotta ai generi *Bacillus* e *Planococcus*. Come per *Roseobacter*, *Sphingomonas* e per gli *Actinobacteria*, anche questi generi sembrano provenire dallo scioglimento del ghiaccio marino (Lo Giudice et al., 2012).

Oltre ai batteri è stata osservata una presenza piuttosto massiccia di Archea nel tardo inverno/inizio primavera; perlopiù rappresentati da *Crenarcheota* e da *Euryarcheota* (DeLong et al., 1994; Murray et al., 1998). Gli Archea sono spesso caratterizzati dalle nicchie estreme che occupano e da cui traggono un notevole vantaggio dal punto di vista ecologico: la scarsa competizione con altri microrganismi. È infatti questo uno dei vantaggi dell'essere estremofili, e per quanto riguarda gli Archea endemici dell'Antartide, significa proliferare soprattutto nel periodo di fine inverno/inizio primavera, in cui evidentemente la pressione per le risorse è minore, data la bassa quantità di microrganismi adattati a queste condizioni e che possiedono le loro stesse esigenze nutrizionali (Murray et al., 1998, Murray e Grzymalski, 2007).

Una grossa parte dei batteri marini antartici si trovano inclusi nel ghiaccio marino della banchisa e del pack. È stato osservato che la diversità microbica nel pack diminuisce nelle sezioni di ghiaccio con bassa o trascurabile biomassa algale. Nel ghiaccio marino sono presenti, oltre ai batteri, anche molti altri microrganismi come diatomee, flagellati e protozoi (Bowman et al., 1997).

I batteri psicrofili sono stati isolati per lo più da ghiaccio contenente livelli significativi di biomassa algale, e qui è stato rilevato un maggior numero di psicrofili rispetto agli psicrotolleranti (in proporzione 3:1). Dei batteri appartenenti al gruppo *Flexibacter-Bacteroidetes-Cytophaga* sono state

ritrovate specie appartenenti ai generi *Cytophaga*, *Flavobacterium* e *Polaribacter*. Infine le specie Gram-positive appartengono ai generi *Arthrobacter* e *Planococcus* (Bowman et al., 1997).

1.5.2 Il mare di Ross

Il mare di Ross, così chiamato in onore di James Ross che nel 1841 lo scoprì, è una profonda baia situata in Antartide meridionale tra la Terra Vittoria e la Terra Marie Byrd.

Il mare di Ross è per più della sua metà costantemente coperto da una spessa coltre di ghiaccio la *Ross Ice Shelf* (barriera di Ross) che ha una superficie di circa 500.000 km² ed emerge dalla superficie per circa 50 m lasciando coperti più di 300 m di ghiaccio nella parte inferiore. Il mare di Ross è la più grande piattaforma continentale, con una profondità di 200-1100 m, lungo il margine antartico e la regione più biologicamente produttiva nei mari del sud (Long, 2010). Ai confini della barriera vive un terzo dell'intera popolazione di pinguini di Adelia. Qui forti tempeste scostano i ghiacci e permettono la formazione di vaste superfici di acque libere, *polynyas*, che favoriscono la fioritura di microscopiche alghe che a loro volta costituiscono l'alimento principale del krill di cui poi si nutriranno i pinguini.

Nel mare di Ross si distinguono due acque di fondo caratteristiche: le acque ad alta salinità e le acque super fredde. La prima è prodotta principalmente lungo la terra Victoria in prossimità di Baia Terra Nova in area di polynya, la seconda si origina sotto la cavità della piattaforma ghiacciata di Ross e fuoriesce intorno al meridiano di cambio data con la caratteristica di avere una temperatura inferiore al punto di congelamento superficiale. Queste due correnti vanno a formare la *Ross sea Bottom Water* e con due differenti traiettorie si dirigono verso la scarpata dove sprofondano negli abissi ventilandoli.

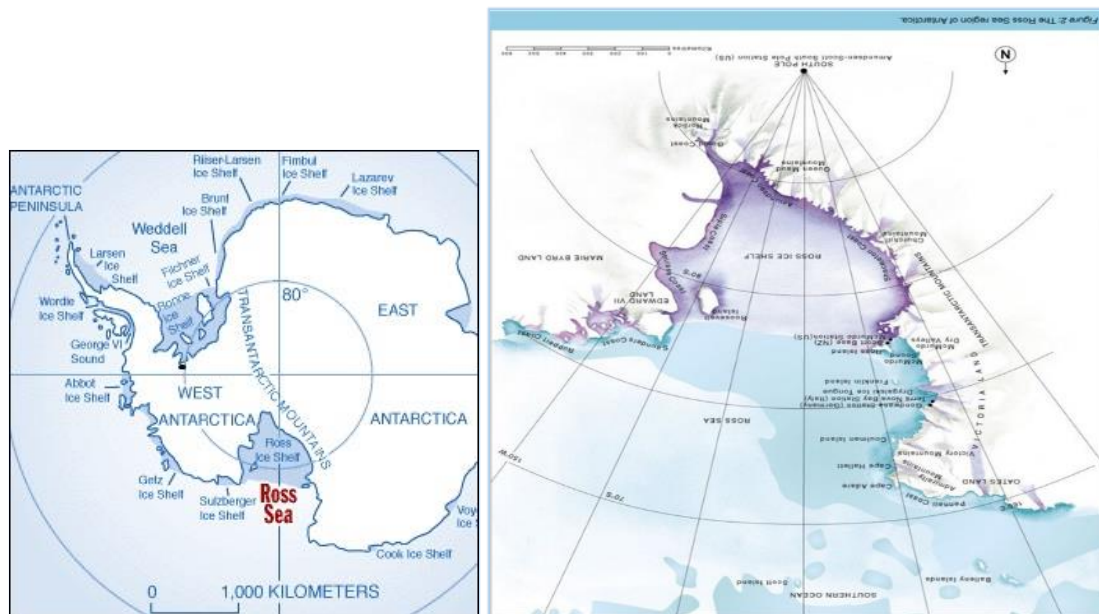


Fig.12. Mare di Ross, Oceano Antartico.

1.6 Studio dei microrganismi: quantificazione e identificazione delle comunità microbiche

I microrganismi, per la loro abbondanza, la diversità specifica e la molteplicità delle attività metaboliche che sono in grado di espletare costituiscono una parte molto importante degli ecosistemi di cui fanno parte. Risulta pertanto essenziale comprendere le relazioni esistenti tra essi e il loro ambiente attraverso lo studio della diversità strutturale e funzionale delle comunità microbiche e come esse potrebbero reagire a possibili disturbi, sia naturali che antropici (Zhou et al., 2003; Zhang et al., 2008).

I microrganismi sono responsabili di numerose funzioni fondamentali per gli ecosistemi. Tra esse vi sono la decomposizione della sostanza organica, la trasformazione dei nutrienti, la fissazione dell'azoto atmosferico e del carbonio, la formazione di associazioni simbiotiche con molte specie vegetali che favoriscono l'assorbimento dei nutrienti da parte delle radici, il miglioramento delle proprietà chimico-fisiche del suolo attraverso la formazione di molecole complesse (acidi umici) (Giller et al., 1997; Degens et al., 2000).

La Biodiversità microbica può essere considerata come la ricchezza e la variabilità di individui che afferiscono ai vari taxa. La messa a punto di metodi d'indagine sempre più rapidi, precisi ed efficaci, ha permesso in tempi recenti di allargare questo concetto, che oggi include la diversità di individui al di sotto dei ranghi di specie e che può essere definita come la diversità ereditabile a livello di geni all'interno di una popolazione o specie, la variabilità di specie che compongono in parte o in toto una comunità e la variabilità di comunità microbiche riferibili ai vari ecosistemi (Bonari e Ceccon, 2002).

Le comunità microbiche presenti negli ambienti naturali, come le acque, il suolo e le rocce, rappresentano i più complessi, diversi e importanti agglomerati di microrganismi della biosfera. Nonostante la loro importanza dal punto di vista ecologico, si conosce molto poco riguardo le specie microbiche che le compongono. (Barbieri *et al.*, 2008).

I metodi per valutare la diversità dei microrganismi, sia a livello di generi e/o specie sono numerosi. Tra essi vi sono i metodi tradizionalmente basati sulla coltivazione dei ceppi batterici in terreni specifici, che permettono di valutare la ricchezza in specie e l'abbondanza specifica. I loro vantaggi risiedono nel fatto che sono ormai di facile attuazione nei laboratori microbiologici anche semplici, forniti di strumentazione non necessariamente costosa. Inoltre, queste tecniche permettono, nel momento in cui si è ottenuta la coltura pura, di ottenere dettagliate e numerose informazioni sull'isolato.

Ciò nonostante, le metodologie basate esclusivamente sulla coltivazione dei microrganismi non sono sufficientemente adeguate a descrivere la diversità esistente nelle comunità microbiche in campioni ambientali poiché si ritiene che meno dell'1% dei batteri è coltivabile (Torsvik e Øvreås, 2002; Zhang *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011). Ciò è dovuto in parte alla limitata conoscenza degli adattamenti, della fisiologia e delle condizioni di crescita della maggior parte dei microrganismi nel loro ambiente naturale (Amann *et al.*, 1995). Negli ultimi decenni sono stati sviluppati numerosi metodi molecolari, che non necessitano la coltivazione dei microrganismi in laboratorio per lo studio della diversità microbica di campioni ambientali permettendo di studiare e scoprire parte di quel 99% circa di diversità microbica che non può essere studiata con i più tradizionali metodi di coltivazione.

Questi metodi si basano sull'estrazione di materiale genetico da campioni ambientali senza che sia necessario coltivare i microrganismi. Il DNA ribosomiale (rDNA) 16S è il marcatore molecolare d'elezione sia per l'identificazione dei procarioti che per la ricostruzione delle loro relazioni filogenetiche (Olsen *et al.*, 1986; Amann *et al.*, 1995; Muyzer e Smalla, 1998; Kesmen *et al.*, 2012). Sia nei procarioti che negli eucarioti gli rRNA vengono distinti in base al loro coefficiente di sedimentazione.

Il gene codificante il 16S rRNA, lungo circa 1500 bp, presenta una sequenza nucleotidica in parte ampiamente conservata, soprattutto tra le specie strettamente correlate dal punto di vista filogenetico. Questo gene muta molto lentamente nel corso dell'evoluzione e solo in rarissimi casi è soggetto ad eventi di trasferimento genetico orizzontale. La bassa velocità di evoluzione è dovuta al fatto che il ribosoma è soggetto a forti costrizioni strutturali e funzionali, dato che l'rRNA 16S deve prendere contatto correttamente con le altre componenti del ribosoma, altrimenti la sintesi proteica non procede correttamente e quindi la vita della cellula risulta compromessa. Inoltre, all'interno del gene codificante il 16S rRNA vi sono alcune regioni definite *ipervariabili*, che sono soggette a cambiamenti nella sequenza nucleotidica senza che ciò influisca sul processo di traduzione. Sono proprio queste regioni altamente variabili che permettono l'identificazione delle varie specie

microbiche presenti in un dato ambiente e la determinazione della struttura della comunità (Barbieri et al., 2008).

L'estrazione di DNA da un campione ambientale, viene comunemente seguita dall'amplificazione mediante la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) del gene 16S, in modo da permettere l'identificazione delle specie batteriche presenti all'interno del campione. I primers utilizzati per l'amplificazione delle regioni ipervariabili del 16S sono disegnati sulla base delle regioni conservate adiacenti a quelle ipervariabili e per questo definiti "primers universali".

Le reazioni di PCR e la maggior parte delle metodologie molecolari utilizzate correntemente nello studio della diversità microbica, producono un "fingerprinting molecolare" delle specie presenti nel campione, ossia "un'impronta molecolare" che consente la valutazione della diversità genetica di una comunità, e può inoltre rilevare l'appartenenza filogenetica dei singoli membri presenti in essa (Ranjard et al., 2000).

Sebbene l'applicazione di queste tecniche abbia fortemente migliorato le conoscenze sulla struttura e la dinamica delle comunità microbiche, essa soffre ancora alcune limitazioni legate principalmente alle caratteristiche della matrice, e nessuna di esse, singolarmente, è in grado di fornire una misura completa sulla diversità delle comunità microbiche. Per questo motivo la possibilità di affiancare alle più tradizionali metodiche colturali tecniche più innovative (Pereira et al., 2011; Cook et al., 2013) permette di ottenere maggiori informazioni circa la comunità microbica e permette di valutare le loro funzioni ecologiche e fisiologiche (Zhang et al., 2008, Widmer et al., 2001).

1.6.1 Tecniche colturali

Per metodi colturali si intendono metodi che prevedono la coltivazione del microrganismo, spesso in combinazione con analisi fenotipiche (fisiologiche e biochimiche) e genotipiche (PCR specie-specifica) che permettono la corretta identificazione e tipizzazione delle specie studiate. I metodi colturali generalmente definiscono gruppi e/o generi e con minore probabilità la loro sensibilità arriva a descrivere correttamente la specie. Quindi l'isolamento delle colonie dalla piastra e la loro identificazione e tipizzazione biochimica e molecolare è necessaria per aumentare la sensibilità delle analisi (Giraffa, 2004; Jany et al., 2008; Nocker et al., 2007).

Le tecniche tradizionali per analizzare e studiare i microrganismi sono basate sulla coltivazione e l'isolamento su substrati selettivi e semi selettivi (Van Elsas et al., 1998).

La possibilità di coltivare microrganismi su terreni di coltura appropriati permette di studiare i tratti morfologici e metabolici delle colonie che si sviluppano, nonché la loro riproduzione e i tempi di crescita propri di quelle specie. Questo tipo di approccio risulta quindi molto utile, nonostante sia

limitata la percentuale delle specie a cui è applicabile. Risulta quindi indispensabile ricorrere alle tecniche di isolamento in colture pure delle varie specie microbiche, in modo da poter analizzare le caratteristiche di ogni singola specie al di fuori del contesto ambientale da cui vengono prelevati e separatamente dalle altre specie presenti in quell'ambiente.

Uno dei metodi più utilizzati per ottenere questo tipo di coltura è quello della semina diretta su piastra di materiale contenente più specie microbiche e, solo in seguito alla crescita delle colonie, si procede con le fasi di isolamento. L'isolamento di specie microbiche da un campione ambientale può essere semplificato utilizzando in alcuni casi *terreni di coltura selettivi*, contenenti sostanze che inibiscono la crescita di specie sensibili ad esse e che eliminano tutte quelle specie che non sono l'organismo d'interesse. Possono essere utilizzati anche *terreni differenziali o di identificazione* che addizionati di sostanze che consentano una crescita differenziale in quanto metabolizzate solo da alcuni ceppi, che ne permettano quindi l'identificazione.

Una volta ottenute le colture pure si può procedere con i test biochimici che ci permettono di identificare velocemente alcune caratteristiche del ceppo, come ad esempio la colorazione di Gram (Haleblian et al., 1981), il “test del KOH”, simile alla colorazione, che prevede l'utilizzo dell'idrossido per il riconoscimento dei Gram-positivi e Gram-negativi (Ryu, 1940). Altri test come: il “test dell'ossidasi” e “della catalasi” per verificare la produzione degli enzimi *Citotromo Ossidasi* e della *Catalasi* rispettivamente da parte dei ceppi esaminati. Inoltre è possibile condurre studi sulle dimensioni e la morfologia delle cellule e delle colonie.

Talvolta in ecosistemi microbici complessi la capacità di alcuni batteri con deficit metabolici può essere stimolata dalla presenza e dall'interazione con altri microrganismi che sono in grado di supplire a questi loro deficit (Nadkarni et al., 2009). Purtroppo, i terreni di coltura permettendo tipicamente la crescita solo di una piccola frazione di microrganismi e non sono in grado di riprodurre le nicchie ecologiche e le interazioni simbiotiche presenti in ambienti naturali complessi. Spesso permettono la crescita di alcune specie sopprimendo la crescita di altre per cui la composizione della comunità della frazione coltivabile è distorta. Infine, la maggior parte dei terreni di coltura sono fonti estremamente ricche di carbonio rispetto ai substrati che si ritrovano normalmente in situ, e questo potrebbe influenzare la composizione della comunità microbica coltivata verso copiotrofi, microrganismi che crescono in presenza di elevati livelli di fattori nutritivi (Nocker et al., 2007).

Alcune tecniche colturali permettono di ottenere informazioni sul fenotipo metabolico dei ceppi studiati.

Un approccio che permette di ottenere informazioni tassonomiche e saggiare sia la diversità metabolica di un ceppo è il sistema Biolog® (Haywood, California, USA). Il metodo si basa sull'utilizzo di micropiastre con 96 pozzetti contenenti differenti substrati carboniosi e un colorante, il violetto di tetrazolio (Smalla et al., 1998), utilizzato come indicatore redox per evidenziare l'avvenuto utilizzo della fonte di carbonio. Ai pozzetti viene aggiunta una sospensione del

microrganismo isolato. Un pozzetto contenente la sola sospensione viene considerato come controllo. Dalla riduzione dei sali di tetrazolio osservata misurando l'assorbanza allo spettrofotometro dopo un'incubazione di 24–48 ore, si riesce a stimare l'attività catabolica microbica in risposta a ciascun substrato. Confrontando il profilo ottenuto con quello delle specie in banca dati è possibile ottenere informazioni tassonomiche del microrganismo in esame. Il sistema Biolog da interessanti informazioni sul profilo metabolico permettendo di osservare come alcuni microrganismi abbiano competenze metaboliche comuni, mentre altre specie abbiano invece caratteristiche totalmente differenti. Le informazioni biochimiche che così si ottengono risulteranno utili per definire la componente metabolica dei ceppi non ancora identificati, ma non può rappresentare un'alternativa all'identificazione molecolare, ma piuttosto può essere un'ulteriore prova da affiancare ai dati molecolari che verranno condotti. I dati ottenuti potrebbero essere analizzati in relazione a differenti parametri chimico-fisici come temperatura, salinità, nutrienti.

Il metodo purtroppo, presenta gli stessi limiti dei metodi colturali, in quanto permette di valutare l'attività dei microrganismi in grado di crescere alle condizioni di incubazione e in presenza di determinati substrati. Pertanto, i risultati ottenuti potrebbero non riflettere la reale diversità funzionale del microrganismo all'interno della comunità e nel suo habitat.

Simile al sistema Biolog è il sistema Api20 o Api100 (BioMerieux), tramite il quale viene identificata la diversità metabolica o la specie del microrganismo che si sta studiando (Bartelt-Ryser et al., 2005; Philips et al., 2012) utilizzando delle strisce (Api strips) contenenti fonti di carbonio differenti (20 o 100) e se il microrganismo è in grado di ossidare la fonte di carbonio nella striscia, quest'ultima assumerà una determinata colorazione evidenziando l'attività del ceppo testato e dell'enzima coinvolto in questa ossidazione (Holmes et al., 1978). Sia il metodo Biolog che le strisce Api sono estremamente utili per lo studio della diversità metabolica microbica, soprattutto quando utilizzati come strumento di analisi complementare ad altri, come ad esempio i metodi molecolari (Barbieri et al., 2008). I dati ottenuti permetteranno di avere sia tassonomiche che metaboliche dei ceppi non ancora identificati. Ovviamente non possono da soli rappresentare un'alternativa all'identificazione molecolare, piuttosto possono essere un'ulteriore prova da affiancare ai dati molecolari.

Un'ulteriore tecnica d'indagine che permette di ottenere interessanti informazioni sugli isolati studiati è il matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI-TOF MS (Karas, 1988; Hillenkamp, 1991). La tecnica si basa sulla spettrometria di massa (MS) la quale è una tecnica analitica che viene impiegata per l'identificazione di composti incogniti, per determinazioni quantitative di composti noti e per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole. Sebbene essa abbia trovato fin dagli inizi del secolo scorso un vasto impiego in diversi campi, la sua applicazione è stata estesa all'analisi di macromolecole biologiche solo alla fine degli anni ottanta quando vennero introdotti metodi di ionizzazione soft. Il MALDI-TOF MS è un veloce e accurato metodo per classificare ed identificare microrganismi e ottenere informazioni tassonomiche. Tale metodo consente di analizzare, con elevate

sensibilità (dalle pico alle femto moli) analiti polari, poco volatili e termolabili come le macromolecole biologiche ad elevato peso molecolare (oltre 200 KDa), senza provocarne frammentazione in sorgente. La tecnica MALDI-TOF MS analizza simultaneamente ed in tempi rapidi miscele complesse di proteine o peptidi senza la necessità di una preventiva separazione. Per tale motivo, una delle principali applicazioni, riguarda l'identificazione di proteine a partire dall'analisi dei peptidi generati mediante digestione enzimatica (peptide mass fingerprinting). Recenti ed interessanti applicazioni di questa tecnologia riguardano l'analisi diretta di cellule intere. E' possibile infatti analizzare cellule batteriche (Krishnamurthy, 1996; Krishnamurthy, 2000; Warscheid, 2004; English, 2003; Krishnamurthy, 1996), allo scopo di identificare i microrganismi sulla base del loro caratteristico profilo di espressione proteica. Il materiale di partenza può essere una singola colonia o una porzione di un centrifugato di cultura liquida. Lo strato sottile con i microrganismi viene coperto con una matrice e consentire misure in un range compreso fra 2.000 e 20.000 Da. Il MALDI-TOF offre un'eccellente alternativa ai metodi tradizionali di identificazione di microrganismi e la velocità, robustezza e i costi minimi per la preparazione dei campioni e dell'effettuazione delle analisi fanno di questa tecnica un'eccellente metodo sia nelle applicazioni di routine che nelle applicazioni su grandi numeri.

Numerosi sono gli studi in cui il MALDI-TOF è applicato per studiare batteri isolati da ambienti antartici e comprendere le loro caratteristiche fenotipiche e biologiche di adattamento (Solomon et al., 2003; Dieckmann et al., 2005; Nevot et al., 2006; Jagannadham et al., 2012; García-Descalzo et al., 2014).

1.6.2 Tecniche coltura-indipendenti

Le differenze osservate tra la diversità che emerge utilizzando i metodi colturali e la reale diversità in situ ha aumentato l'importanza di un approccio molecolare non legato alla coltivazione in laboratorio del microrganismo che descrivesse in modo più reale la comunità microbica studiata.

Le strategie elaborate nell'ultimo decennio comprendono metodologie molecolari che producono un "*fingerprinting molecolare*", un'impronta molecolare della comunità studiata, permettendo l'apertura di nuove frontiere nello studio dell'ecologia microbica (Abee et al., 2004).

Queste tecniche, definite complessivamente "*genetic fingerprinting techniques*", nel campo dell'ecologia microbica sono utilizzate per confrontare la diversità microbica dei vari ambienti o per seguire le dinamiche e i cambiamenti di una comunità nel tempo (Muyzer, 1999).

Con questi metodi coltura-indipendenti i microrganismi non vengono più coltivati ed isolati, ma si rilevano direttamente all'interno del campione attraverso l'analisi del loro DNA ed RNA. La principale novità di questi procedimenti è l'estrazione diretta degli acidi nucleici dalle matrici in

esame e la successiva analisi per valutare la diversità, la quale è in stretta connessione con la complessità microbica del sistema in studio (Giraffa et al., 2001).

Con lo studio del DNA si può definire quante e quali specie microbiche sono presenti in un determinato campione (Coppola et al., 2003). Queste metodiche si basano sia sul clonaggio e sequenziamento dei frammenti di DNA che sull'amplificazione di sequenze target mediante utilizzo della PCR (Nocker et al., 2007).

Anche se con gli approcci di tipo molecolare si riescono a superare i limiti delle metodiche tradizionali, bisogna comunque considerare che talvolta anche le tecniche molecolari possono mostrare dei punti critici quali i limiti della PCR e la dipendenza dei risultati dall'efficienza di lisi cellulare durante l'estrazione degli acidi nucleici. Per questo motivo nell'analisi di ecosistemi microbici complessi è spesso richiesto l'utilizzo di entrambi gli approcci, sia coltura dipendente che indipendente.

Alcune delle metodiche coltura-indipendenti su cui si basano gli studi di ecologia microbica sono la *PLFA analisi degli acidi grassi dei fosfolipidi di membrana*, la *SSCP single strand conformation polymorphism*, la *T-RFLP terminal restriction fragment length polymorphism*, , la *RISA ribosomal intergenic spacer analysis*, la *TGGE temperature gradient gel electrophoresis*, la *DGGE denaturing gradient gel electrophoresis*, il *NGS New generation sequencing (Deep-sequencing)*.

❖ *Analisi degli acidi grassi dei fosfolipidi di membrana (PLFA)*

Tra le tecniche di analisi delle comunità microbiche la Fatty Acid Methyl Ester (FAME) consiste in un metodo biochimico che fornisce informazioni sulla composizione delle comunità microbiche raggruppando gli organismi in base alla composizione in acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA) presenti nella membrana cellulare (Zhang et al., 2008). I fosfolipidi costituiscono una componente strutturale della membrana delle cellule viventi, in quanto non vengono accumulati come prodotto di riserva e vengono rapidamente degradati da enzimi idrolitici quando una cellula muore. La composizione in acidi grassi dei fosfolipidi di membrana è specifica per gruppi di microrganismi e permette di misurare la diversità di una comunità microbica, nonché valutarne i cambiamenti in funzione delle condizioni ambientali. I metodi basati sui PLFA prevedono l'estrazione degli stessi direttamente dal campione, una reazione di metilazione e l'analisi mediante gas cromatografia (Ibekwe e Kennedy, 1999; Winding et al., 2005; Kelly et al., 2007; Steinbeiss et al., 2009; Watzinger et al., 2014).

Questa tecnica è stata impiegata per investigare la biodiversità e le strutture delle comunità microbiche di numerosi campioni antartici (Bowman et al., 1997; Yakimov et al., 2003; Yergeau et al., 2006) per suoli con contaminazione chimica (Kelly et al., 2007; Zhang et al., 2006), per suoli sottoosti a intense pratiche agricole (Esperschütz et al., 2007; Steinbeiss et al., 2009).

❖ *Single strand conformation polymorphism (SSCP)*

La SSCP permette di separare molecole di DNA a singolo filamento, di lunghezza simile ma con diversa sequenza. Inizialmente il DNA viene denaturato e poi caricato su un gel elettroforetico privo di agente denaturante, in modo che i singoli filamenti di DNA possano formare strutture secondarie ripiegate, la cui conformazione dipende principalmente dalla sequenza nucleotidica della molecola e dall'ambiente chimico-fisico in cui si trova (Schweiger e Tebbe, 1998; Schmalenberger e Tebbe, 2014). Diverse conformazioni producono diversi comportamenti di migrazione nel gel e questo permette di separare il DNA di complesse comunità microbiche (Orita et al., 1989; Hori et al., 2006; Mnif et al., 2012). Le bande individuali possono essere isolate e sequenziate dopo l'estrazione dal gel. Il singolo filamento deve poi essere ri-amplificato e clonato in un vettore. Un limite di questa tecnica è l'elevato tasso di re-annealing del singolo filamento durante la migrazione che può rigenerare molecole di DNA a doppio filamento con complesse strutture secondarie intra-catena (Selvakumar et al., 1997; Bouasria et al., 2012). Questo potrebbe essere critico quando si caricano elevate concentrazioni di DNA che potrebbero essere richieste quando si analizzano comunità con una elevata diversità al loro interno. Il fatto quindi che una specie possa essere rappresentata da più picchi complica l'interpretazione dei risultati (Liu et al., 1997).

Numerosi studi riportano l'utilizzo della tecnica SSCP per comprendere e conoscere le comunità microbiche presenti in Antartide (Zhu et al., 2002; Sjöling e Cowan, 2003; Ducklow et al., 2011; Ghiglione e Murray, 2012).

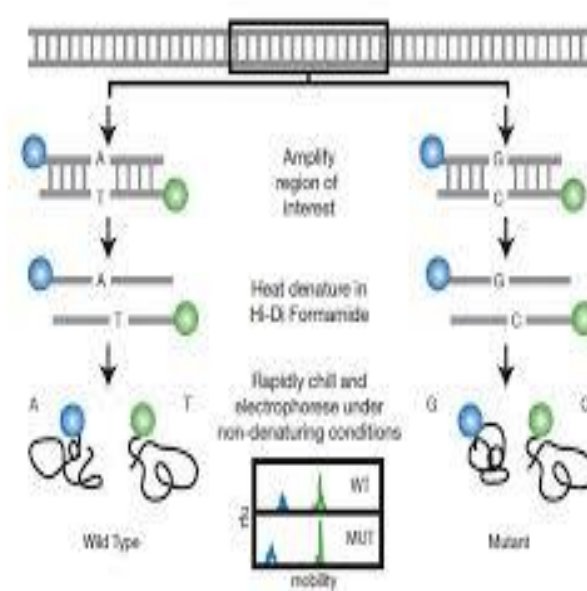


Fig.13. Schema della tecnica SSCP (Single strand conformation polymorphism).

❖ *Terminal Restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)*

La tecnica T-RFLP è in grado di rilevare differenze anche minime tra i microrganismi consentendo la comprensione della struttura e l'evoluzione della comunità microbica in esame. In bibliografia sono riportati numerosi lavori in cui la tecnica viene applicata per studiare le comunità microbiche Antartiche (Priscu et al., 1999; Baldwin et al., 2005; Widme et al., 2006; Shivaji et al., 2011).

Come indica il suo nome, l'analisi T-RFLP misura il polimorfismo di lunghezza dei frammenti terminali di restrizione di un marker genetico amplificato mediante PCR. L'analisi T-RFLP è basata sulla digestione con endonucleasi di restrizione di prodotti di PCR marcati all'estremità con una molecola fluorescente. Uno o entrambi i primers possono essere marcati con fluorocromi differenti. I prodotti di digestione vengono mescolati con uno standard interno di taglie molecolari, marcato con un differente colorante fluorescente ed i frammenti vengono poi separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide o con sistemi basati sull'elettroforesi capillare con rilevamento automatico dei frammenti marcati di DNA mediante laser (Liu et al., 1997). Il risultato è un elettroferogramma costituito da una serie di picchi che differiscono per mobilità (taglia molecolare), altezza e area e che rappresentano le diverse forme microbiche presenti nella comunità in esame. L'uso di un solo primer potrebbe sottostimare la diversità perché diverse popolazioni batteriche potrebbero condividere lo stesso frammento terminale. Questo problema può essere ridotto usando due primer marcati.

L'utilizzo di un marker, contenente frammenti con lunghezza nota, marcati con una fluorescenza diversa da quella emessa dai frammenti, può permettere l'assegnazione della lunghezza dei frammenti con una risoluzione pari ad una coppia di basi.

Per aumentare la precisione e quindi l'affidabilità del test vengono utilizzati più enzimi di restrizione (Osborne et al., 2006), perché l'utilizzo di un singolo enzima di restrizione non fornisce una risoluzione adeguata (Marsh, 2005). Inoltre è importante che la digestione enzimatica tramite le endonucleasi di restrizione non avvenga in maniera parziale, dato che ciò può portare ad una sovrastima della diversità microbica presente nel campione (Dunbar et al., 1999; Osborn et al., 2000). Si è visto che questa metodica è più efficiente quando si analizzano comunità con una ricchezza in specie bassa-intermedia e quindi non troppo complesse. La digestione in silico è importante per valutare l'abilità degli enzimi di restrizione a discriminare tra le diverse sequenze. Ci sono vari strumenti web come T-RFLP analysis program (TAP), MiCA 16S rRNA, restriction endonuclease peaker (REPK), che determinano automaticamente set di enzimi di restrizione sulla base delle sequenze FASTA che si vogliono analizzare. Anche se le analisi in silico rivelano la capacità dei vari enzimi di restrizione a risolvere i gruppi batterici, l'output deve essere preso in considerazione con cautela. Bisogna considerare che solo una piccola frazione della totale diversità batterica è stata descritta e i database con le sequenze del DNA batterico sono incompleti. L'analisi dei dati non è sempre semplice, spesso può risultare difficile distinguere il segnale reale dal rumore di fondo. Il protocollo T-RFLP spesso può includere una ripulitura dei prodotti di PCR prima della restrizione.

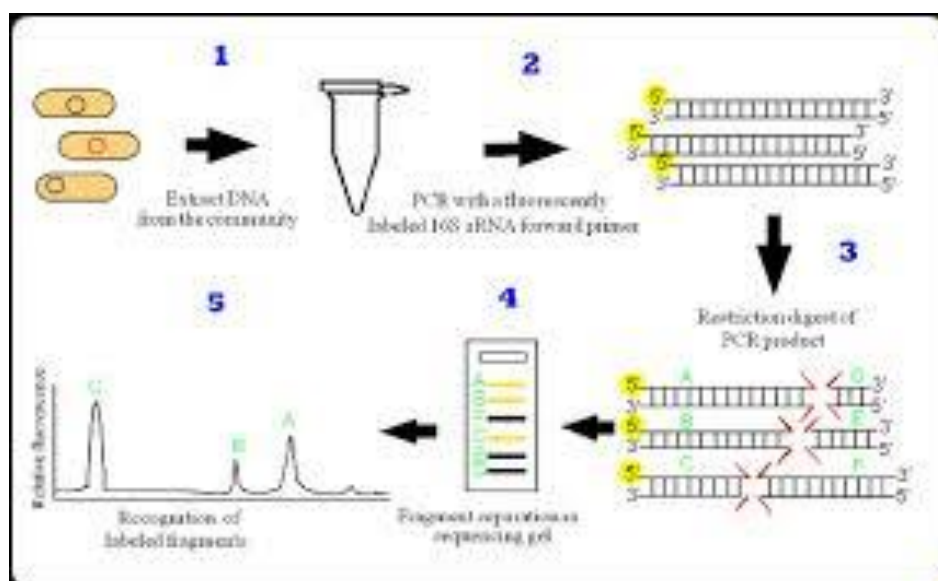


Fig.14. Schematizzazione della Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).

❖ *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)*

La metodica si basa sulla variazione delle taglie degli ampliconi specie-specifici. È un metodo di fingerprinting molecolare delle comunità microbiche basato sul polimorfismo di lunghezza della regione spaziatrice compresa tra i geni codificanti l'rRNA 16S e l'rRNA 23S che permette di stimare sia il numero di specie diverse in un campione ambientale, che la variabilità esistente all'interno delle specie stesse. Le regioni ITS (*intergenic transcribed spacer*) mostrano un'eterogeneità significativamente più elevata sia in lunghezza che nella sequenza nucleotidica rispetto alle regioni fiancheggianti (Schoch e Seifert, 2012; Ghatee, et al., 2014). Entrambe questi tipi di variazioni li rendono adatti per la tipizzazione batterica dei ceppi e di specie strettamente connesse quando il fingerprinting delle sequenze dei geni ribosomali non offre una sufficiente risoluzione.

I primers sono disegnati su regioni relativamente conservate così da garantire l'amplificazione delle regioni spaziatrici tramite PCR anche in ceppi filogeneticamente distanti. Il polimorfismo dei frammenti prodotti dalla PCR viene esaminato tramite elettroforesi. Nella versione automatizzata, *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* ARISA, un primer viene marcato al terminale 5' con un fluorocromo rendendo possibile il rilevamento della presenza e della dimensione del frammento tramite un sequenziatore automatico (Fisher e Triplett, 1999).

Una limitazione di questa tecnica può dipendere al fatto che queste sequenze spaziatrici possono essere ripetute più volte in un singolo genoma e le mutazioni che ne modificano la lunghezza non insorgono su tutte allo stesso modo, quindi un singolo organismo può produrre più di un segnale

(Mateos e Markov, 2005); viceversa i patterns prodotti tramite RISA possono non rivelare la composizione tassonomica della comunità se le regioni spaziatrici di specie diverse hanno la stessa lunghezza (Ranjard et al., 2000). Inoltre, la possibile amplificazione preferenziale dei templati più corti e poiché sono possibili variazioni della lunghezza inter-operonica all'intero di un singolo genoma, un singolo microrganismo potrebbe contribuire a più di un segnale (Jensen et al., 1993).

❖ *Temperature gradient gel electrophoresis* (TGGE)

La TGGE si basa sulla variazione della composizione in basi dei frammenti del gene 16SrDNA ottenuto per amplificazione con un set specifico di primers. La separazione dei frammenti avviene grazie alla differenza di mobilità delle molecole di DNA amplificate mediante PCR in un gel al quale viene applicato un gradiente di temperatura. Le molecole di DNA, aventi una differente composizione nucleotidica, presenteranno un diverso comportamento di “fusione”. I frammenti del 16S che migrano lungo il gel in corrispondenza di particolari domini di fusione subiscono una parziale denaturazione trasformandosi a singolo filamento. Le molecole di DNA parzialmente o completamente denaturate termineranno la loro migrazione nel gel e occuperanno nello stesso posizioni differenti in funzione della loro composizione in basi e della variazione della sequenza (Heuer e Smalla, 1997; Muyzer et al., 1993; Calderón et al., 2012; Pohlen et al., 2013). Regioni variabili del DNA estratto dalle comunità microbiche vengono amplificate scegliendo primers che si inseriscono in regioni conservate che affiancano quelle variabili.

❖ *Denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE)

Introdotta per la prima volta da Muyzer e collaboratori (Muyzer et al., 1993), la DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis si basa sul differente comportamento che hanno frammenti di DNA della stessa lunghezza, ma differente composizione in basi, all'interno di un gel contenente un gradiente chimico denaturante.

Il marcatore molecolare d'elezione per lo studio delle comunità batteriche mediante l'utilizzo della DGGE (Olsen et al., 1986; Amann et al., 1995; Muyzer e Smalla, 1998) è il gene ribosomiale 16S, dove le regioni ipervariabili V1-V9 sono utilizzate come frammento target nello studio della biodiversità di una comunità microbica.

La DGGE permette di separare le molecole di DNA mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide contenente un gradiente denaturante di tipo chimico, composto da urea e formamide (Muyzer e Smalla, 1998). La separazione dei frammenti, di uguale lunghezza e di dimensioni comprese tra 200

e 700 paia di basi, è basata sulla ridotta mobilità elettroforetica che hanno le molecole di DNA parzialmente denaturate rispetto al DNA a doppia elica. Migrando lungo il gel, i frammenti di dsDNA incontrano condizioni denaturanti sempre maggiori, fino a che esse non causano l'apertura del doppio filamento. La transizione da doppio filamento a filamenti parzialmente denaturati avviene in un range molto stretto; questo determina l'arresto della molecola sul gel in corrispondenza del suo specifico dominio di melting. Sequenze differenti hanno domini di melting differenti ed arresteranno la loro corsa in posizioni diverse sul gel. In questo modo è possibile separare frammenti di identica lunghezza, che differiscono anche per una singola coppia di basi. Talvolta i frammenti tendono però a denaturarsi completamente e non arrestando la loro corsa fuoriescono dal gel. Per ovviare a questo inconveniente, nella PCR che precede la DGGE, si utilizzano primers modificati. Il DNA estratto dalla comunità microbica viene amplificato scegliendo primers che si inseriscono in regioni conservate che affiancano quelle ipervariabili. Il primer forward viene legato covalentemente all'estremità 5' ad una sequenza ricca in guanina e citosina, che conferisce stabilità all'oligonucleotide (Sheffield et al., 1989; Sheffield et al., 1992). Questa porzione, definita *GC-clamp*, lunga circa quaranta basi, impedisce la totale denaturazione del DNA a doppio filamento favorendone l'arresto sul gel (Heuer e Smalla, 1997; Muyzer et al., 1993).

Usare i primers per amplificare direttamente il DNA estratto dal campione ambientale può causare inneschi aspecifici, è per questo che in genere si effettua una prima PCR per amplificare il 16S rDNA e poi si procede con una seconda reazione di PCR, detta nested-PCR, per amplificare la regione specifica all'interno del 16S, ossia la regione ipervariabile scelta (Nicolaisen e Ramsing, 2002; Ward e O'Mullan, 2002).

Inoltre è utile effettuare un protocollo PCR "*Touch Down*" durante la seconda amplificazione (Watanabe et al., 2001), che consiste nella diminuzione progressiva della temperatura durante i cicli di PCR per evitare amplificazioni aspecifiche.

Le bande ben separate sul profilo DGGE possono essere tagliate dal gel, ri-amplificate e sequenziate. Confrontando tali sequenze con quelle presenti nelle banche dati si può risalire alle famiglie/genere e in alcuni casi alle specie presenti nel campione (Smalla et al., 2001; Heuer et al., 2002).

La scelta dei primers ha una notevole importanza nella PCR-DGGE. Infatti, impiegando primers universali o generici il profilo molecolare ottenuto potrebbe mostrare bande corrispondenti alle specie microbiche più rappresentate nel campione esaminato. L'utilizzo di primers specifici per gruppi o generi aumenta la sensibilità della tecnica permettendo di evidenziare specie meno rappresentative, ma non meno importanti, della comunità. Come tutti i metodi che producono un profilo molecolare, anche la DGGE riesce a rilevare solo una parte della diversità microbica permettendo di individuare solo le specie predominanti, cioè quelle che costituiscono almeno l'1% della comunità totale (Muyzer et al., 1993; Murray et al., 1996; Casamayor et al., 2000). Un ulteriore limite della tecnica è la separazione di frammenti con dimensioni non superiori a 500-700 bp (Myers et al., 1985).

Anche l'amplificazione può essere caratterizzata da difficoltà che possono compromettere inevitabilmente le analisi post-PCR. Il principale problema è costituito dalla complessità della matrice che influenza le metodiche di estrazione mirate ad ottenere acidi nucleici dalle caratteristiche adatte all'amplificazione stessa mediante PCR. Le caratteristiche della matrice possono influenzare notevolmente la scelta della tecnica di estrazione, che rappresenta una fase critica della tecnica molecolare. Infatti, per la complessità del campione durante l'estrazione del DNA si può avere una co-estrazione di sostanze organiche come acidi umici, acidi fulvici, detriti cellulari, proteine, solventi, pesticidi, metalli pesanti, minerali argillosi che possono compromettere le fasi successive e il risultato dell'analisi (Roose-Amsaleg et al., 2001; Takada-Hoshino e Matsumoto, 2004).

Martin et al. (2006) hanno applicato la tecnica DGGE per osservare e individuare differenze nella struttura della comunità batteriche di campioni di acqua di mare e ghiaccio raccolti in Antartide. In bibliografia sono riportati numerosi studi condotti mediante l'ausilio della tecnica DGGE per comprendere la biodiversità microbica di campioni di suolo antartico (Barrett, et al., 2006; Arenz et al., 2006; Chong et al., 2009; Teixeira et al., 2010), di acqua marina (Webster, et al., 2004; Webster et al., 2006; Murray et al., 2007), di acque dolci (Pearce, 2003; Coolen et al., 2004; Karr et al., 2006). La DGGE rappresenta un metodo rapido per indagare molti campioni contemporaneamente al fine di determinarne le differenze nella struttura delle comunità microbiche. Inoltre, questa tecnica risulta un valido strumento per valutare le differenze spaziali e temporali nelle comunità microbiche e fornire informazioni sui cambiamenti delle popolazioni dominanti (Øvreås et al., 1998; Smalla et al., 2001). La tecnica è impiegata per determinare la presenza e l'abbondanza relativa delle differenti specie e per ottenere un profilo sia qualitativo, presenza/assenza di bande e semi-quantitativo, intensità delle bande, delle comunità microbiche oggetto di studio.

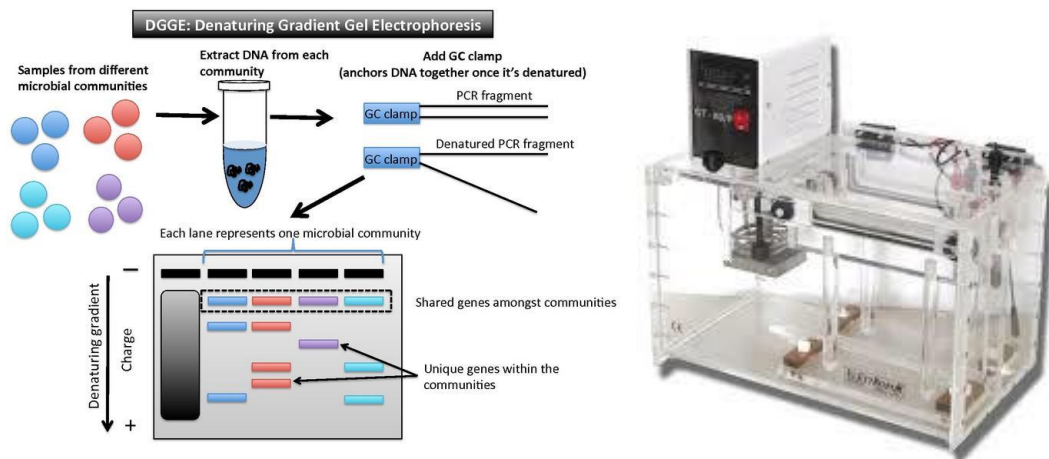


Fig.15. Schema riassuntivo della tecnica e immagine dello strumento DGGE Elettrofor.

❖ *New generation sequencing (NGS)*

L'analisi metagenomica di complessi campioni ambientali è divenuta un importante strumento per comprendere la storia evolutiva della comunità e la biodiversità funzionale ed ecologica (Shokralla et al., 2012). Le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione, con la capacità di fornire milioni di sequenze di DNA hanno cambiato il modo di approcciarsi all'analisi dei genomi. L'abbattimento dei costi e dei tempi hanno avuto ricadute in diversi ambiti disciplinari, come la ricerca contro il cancro, la metagenomica, la ricerca sugli animali e la selezione biologica. Queste discipline hanno tutte trovato, nelle tecniche NGS, degli strumenti potenti e validi per il loro sviluppo (Mardis, 2008; Shokralla et al., 2012; Mutz et al., 2013).

La NGS (New generation sequencing) anche chiamata *high-throughput sequencing* (sequenziamento ad alta resa) a differenza del sequenziamento tradizionale col metodo Sanger, consente di sequenziare moltissimi frammenti in parallelo. Esistono diversi sistemi NGS, sviluppati da diverse compagnie. Tutti questi sistemi, tuttavia, condividono almeno tre passi fondamentali: la preparazione e immobilizzazione del DNA (cioè la preparazione della cosiddetta sequencing library), la reazione di amplificazione e la reazione di sequenziamento.

Alcuni metodi di sequenziamento di nuova generazione sono ad esempio: pyrosequencing, Illumina Genome Analyzer, Applied Biosystems SOLID e più recentemente: Helicos Heliscope e Ion Torrent.

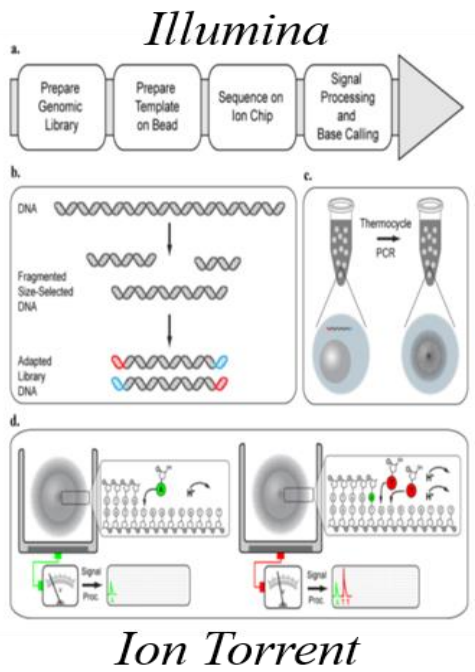
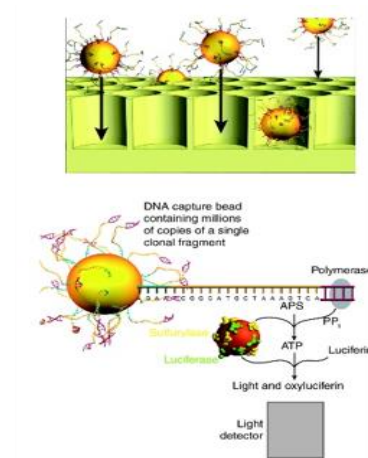
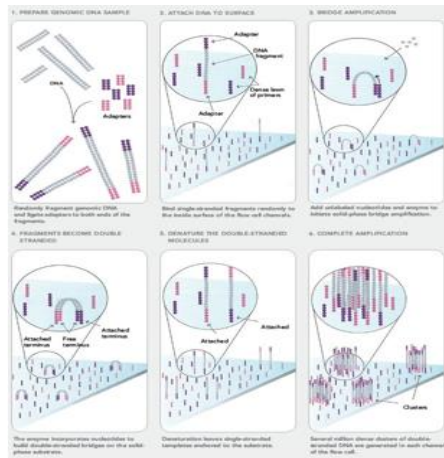
➤ Il *pyrosequencing* si basa sul rilascio del pirofosfato (PPi) a seguito dell'incorporazione di un nucleoside trifosfato (dNTP) durante la sintesi del nuovo filamento di DNA, questo induce una serie di reazioni a valle che portano all'emissione finale di luce ad opera dell'enzima luciferasi (Margulies et al., 2005; Mardis, 2008). Il DNA da sequenziare viene amplificato tramite PCR e il prodotto viene poi incubato con DNA Polimerasi, ATP solforilasi, luciferasi, i nucleotidi e la luciferina: il PPi viene convertito in ATP nella reazione catalizzata dalla ATP solforilasi, l'ATP prodotta fornisce l'energia necessaria alla luciferasi per l'ossidazione della luciferina, che quindi genera luce. A questo punto sarà noto il nucleotide presente in quella posizione dato che ne viene aggiunto uno alla volta alla soluzione. La luce prodotta viene letta da un sensore che permette, tramite un programma, di capire quanti nucleotidi identici sono presenti uno successivo all'altro nella sequenza, grazie all'intensità della luce prodotta. Nonostante ciò è comunque difficile capire con precisione quanti ne sono stati incorporati in sequenza nel nuovo filamento (Ronaghi, 2001).

➤ Nel *Illumina Genome Analyzer*, i frammenti del genoma vengono legati alle estremità con degli oligonucleotidi, detti "adapters": uno dei due adapters permette al frammento di appaiarsi, una volta denaturato, ad un oligonucleotide legato covalentemente alla superficie di una piastra di vetro detta "flow cell". Avvenuto l'appaiamento, il frammento di DNA si piega "a ponte" dato che l'altro adapter lo ancora alla superficie della flow cell, quindi ora tramite una polimerasi può avvenire l'amplificazione del frammento (cosa che nel pirosequenziamento avviene tramite PCR) (Mardis,

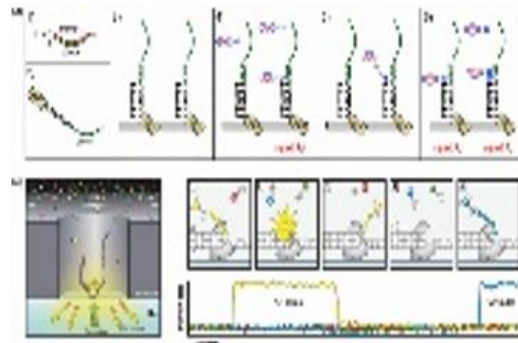
2008). In seguito si effettua la denaturazione delle molecole prodotte e può quindi iniziare il sequenziamento: vengono forniti nucleotidi marcati con un fluorocromo (diverso per ogni base) la cui fluorescenza viene individuata una volta che la piastra viene illuminata con un laser a lunghezza d'onda specifica (Kircher et al., 2010). Inoltre ogni nucleotide fornito possiede il gruppo OH, legato al carbonio 3' del ribosio, chimicamente modificato in modo che non possa continuare la reazione di polimerizzazione finché non viene "ripristinato" dallo sperimentatore; ciò viene effettuato in seguito all'identificazione del nucleotide presente in quella posizione grazie alla fluorescenza prodotta (Mardis, 2008).

➤ L'*Helicos single-molecule sequencing device*, (Heliscope), è stato presentato per la prima volta nel 2007. Il metodo, a differenza dei precedenti, utilizza una tecnica che analizza le molecole singolarmente, in questo modo è possibile ottenere un'accuratezza ancora maggiore, non sporcando il genoma con reagenti chimici (Thompson e Steinmann, 2007). Lo svantaggio principale di questo metodo resta tuttavia la bassa capacità di gestire in modo corretto tutte le letture, con un conseguente aumento di errori. Altro problema è la lunghezza delle reads, che difficilmente superano le 50bp.

➤ Lo *Ion torrent*, sfrutta la tecnologia dei semiconduttori, coniugandola con un meccanismo di sequenziamento basato su processi biochimici noti. Infatti, nei sistemi biologici, quando un singolo nucleotide è incorporato dall'enzima DNA polimerasi nella catena nascente di DNA a doppia elica, viene rilasciato uno ione idrogeno come sottoprodotto (Rothberg et al., 2011). La tecnologia dell'Ion Torrent è incentrata sull'impiego di un sofisticato array ad alta densità con micropozzetti all'interno dei quali questo processo di sintesi (e conseguente rilascio di ioni idrogeno) viene ripetuto ciclicamente. Ogni micropozzetto del chip racchiude una molecola di template nonché un sensore in grado di registrare anche minime variazioni del pH ambientale quando uno ione idrogeno è rilasciato. Il pH subirà una modificazione rilevata dal pH-metro presente nel pozzetto e di conseguenza l'informazione viene convertita da chimica a digitale. Il sistema consente l'aggiunta al chip di un nucleotide noto alla volta: se il nucleotide aggiunto al sistema non viene incorporato nella molecola di DNA neosintetizzata, in quanto non complementare al template contenuto nel micropozzetto, non verrà prodotta nessuna modifica del pH e di conseguenza nessuna modifica del voltaggio. Un ciclo del processo dura pochi secondi poiché non richiede una rilevazione ottica, come accade invece negli altri sistemi di Next Generation Sequencing (Glenn, 2011; Whiteley et al., 2012).



Pirosequenziamento



Heliscope

Fig.16. Immagini riassuntive di alcuni New generation sequencing (NGS).

CAPITOLO II

OBIETTIVO DELLA RICERCA



Fig.17. Antartide

Le comunità batteriche rivestono un ruolo fondamentale nell'equilibrio degli ecosistemi terrestri e marini e sono caratterizzate da una grande variabilità fenotipica e genotipica che dipende fortemente dalle caratteristiche dell'ambiente in cui si vengono a trovare.

L'Antartide per la posizione geografica, le caratteristiche fisiche e la quasi totale assenza di perturbazioni antropiche è uno dei luoghi privilegiati per un'osservazione globale del pianeta. Rappresenta un ambiente estremo particolarmente interessante per la ricerca scientifica; non solo per lo studio della biodiversità che qui si può osservare, ma anche per la ricerca dei vari processi evolutivi e i cambiamenti climatici che prendono parte al "global change". Uno studio approfondito dell'ecologia microbica permette di ottenere un quadro completo della distribuzione dei microrganismi studiati e in parallelo, di ampliare gli studi sulla tassonomia e sulla fisiologia di questi. La Biodiversità microbica può essere studiata mediante l'applicazione di metodi colturali, metodiche tradizionali basate su isolamento diretto o mediante metodi molecolari colture-indipendenti, tecniche di fingerprinting. Le tecniche di fingerprinting molecolare consentono di stimare e di comparare, in modo relativamente semplice e veloce, i livelli di diversità nella comunità microbica e di monitorare i cambiamenti della sua struttura.

La possibilità di applicare metodi coltura-indipendenti permette di superare l'ostacolo legato alla coltivabilità dei singoli organismi e di studiare le comunità microbiche nel loro insieme. Inoltre, molte tecniche di biologia molecolare permettono di valutare la diversità strutturale e genetica della comunità e di valutare in tempi relativamente brevi le risposte in seguito a perturbazioni come anche la presenza e l'attività dell'uomo.

Il progetto di ricerca presentato prevede lo studio delle popolazioni batteriche presenti in campioni di acqua marina e di rocce prelevate in diverse zone dell'Antartide.

L'attività è stata caratterizzata da un approfondimento bibliografico e un lavoro sperimentale suddiviso in due parti fondamentali: la prima, legata ad un approccio basato su tecniche coltura-indipendenti e la seconda legata all'utilizzo di tecniche colturali.

I campioni marini provenienti dal mare di Ross e i campioni di roccia sono stati raccolti durante la campagna 2010-2011 del progetto PNRA (Programma Nazionale di Ricerche in Antartide).

Le acque sono state prelevate in tre periodi distinti, in 4 differenti siti a differente distanza dalla costa: Faraglione, Santa Maria Novella, Portofino e Thetys Bay, mentre le rocce sono state campionate secondo un transetto longitudinale e altitudinale a crescente distanza dal mare nelle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria.

Durante gli ultimi decenni si è sviluppato un crescente interesse verso tutti questi ambienti estremi dove è possibile individuare nuovi microrganismi che potrebbero avere un notevole interesse scientifico soprattutto per il loro elevato grado di adattamento (Martínez-Rosales et al., 2012).

Le informazioni sulle comunità batteriche marine, in particolare quelle di acque fredde come l'oceano Meridionale, stanno diventando sempre più numerose permettendo di ampliare le informazioni su tali ecosistemi. Di contro, le informazioni sulle comunità batteriche endolitiche, in particolare quelle delle regioni Antartiche, sono ancora molto scarse e non consentono di delineare un quadro dettagliato di quali siano i taxa più rappresentativi e principalmente adattati alle condizioni estreme antartiche. Lo studio delle comunità batteriche endolitiche di ambienti estremi e in particolare quelle delle rocce delle Valli Secche di McMurdo rappresenta un aspetto dell'ecologia microbica di notevole importanza per comprendere quali siano i limiti a cui la vita è in grado di spingersi e delineare il sottile confine tra vita e morte. Di fatto la biologia delle Valli Secche è quella tipica dei deserti estremi: la vita epilittica è limitata ad alcuni licheni che crescono sulla nuda roccia in nicchie protette, mentre la forma di vita predominante è costituita da microrganismi endolitici. Quando le condizioni ambientali si fanno estreme l'esistenza anche di minime variazioni dei parametri fisici possono diventare critiche e determinanti per la sopravvivenza microbica e nei pochi millimetri sopra e sotto la superficie rocciosa si racchiude la differenza tra la vita e la morte (Nienow e Friedmann, 1993). La scelta da parte dei microrganismi, non solo batteri, ma anche funghi, alghe, cianobatteri e licheni di cercare protezione nelle rocce e di creare qui comunità attive e produttive descrive l'elevata versatilità adattativa che i microrganismi possiedono.

Inoltre, la possibilità di individuare in Antartide nuove specie potrebbe essere fondamentale anche per applicazioni biotecnologiche come ad esempio la possibilità di sfruttare la capacità di produrre enzimi adattati al freddo (Park et al., 2012; Park e Cho, 2012; Kuddus e Ramteke, 2012) o la capacità di degradare idrocarburi in caso di inquinamento o sversamenti in mare (Saul et al., 2005; Aislabie et al., 2006; Okere et al., 2012).

MATERIALE E METODI

3.1 Campionamento

I campioni sono stati raccolti durante la campagna 2010-2011 del progetto PNRA (Programma Nazionale di Ricerche in Antartide) da Zucconi L. e Selbmann L..

I campionamenti in mare sono stati condotti in quattro differenti aree di Baia Terra Nova (mare di Ross) (Fig.3): Santa Maria Novella (SMN) 2,5 Km dalla costa, Portofino (PTF) 1 Km dalla costa, Tethys Bay e Faraglione (FAR) 300 m dalla costa, campionando acque superficiali (tab.1). Per ogni campione sono stati prelevati 500 ml di acqua, conservati in contenitori sterili; successivamente, sono stati filtrati in sterilità su membrane (filtri di nitrato di cellulosa 0,45µm Ø, Sartorius Stedim Biotech). Le membrane sono state conservate disidratate in tubi sterili contenenti silica gel a 4°C (Pesciaroli et al., 2015).

I campioni di roccia sono stati raccolti nelle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria (Fig. 19), seguendo un transetto longitudinale e altitudinale a crescente distanza dal mare in 48 differenti siti. Per ogni sito sono stati prelevati più campioni di roccia (tab.2). Il campionamento ha previsto l'utilizzo di scalpelli e buste sterili.

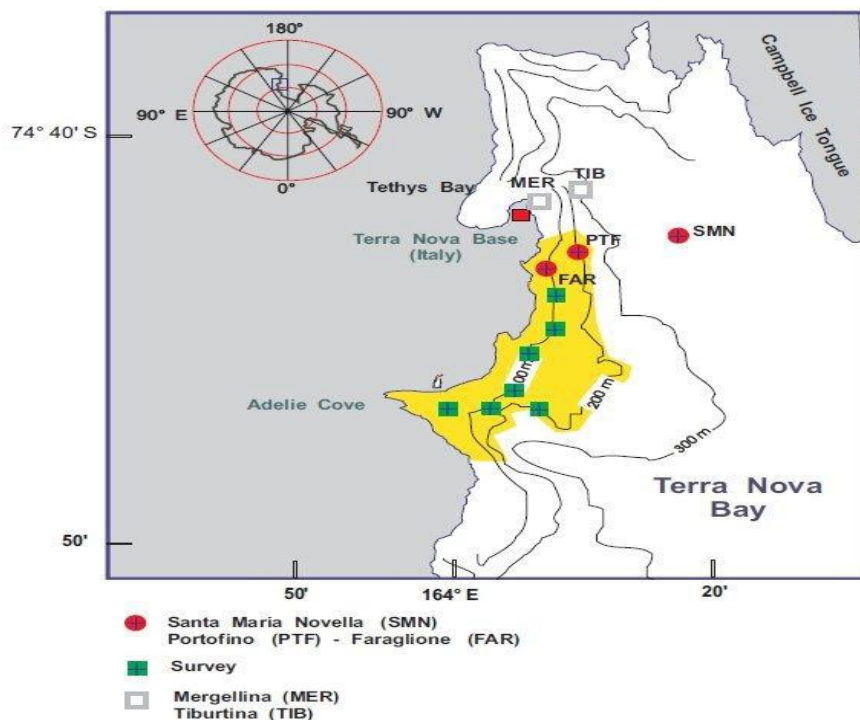


Fig.18. Mappa raffigurante i siti di campionamento nel mare di Ross.

Tabella 1. Informazioni relative al campionamento di acqua marina.

sito campionamento e coordinate	tempo (gg)	Salinità (%)	Temperatura (°C)	Pack
Thetys Bay 74° 41' 34.4''S 164° 0.3' 50.5''E	15/12/2010	0,0320122	-0,56	Sì
	20/12/2010	0,0320122	0,4	Sì
	20/01/2011	0,0320122	-0,44	No
Faraglione 74° 42.7' S 164° 0.8'E 300 m dalla costa	24/12/2010	0,0320122	0,51	No
	04/01/2011	0,0320122	2,5	No
	25/01/2011	0,0320122	0,85	No
Portofino 74° 42' S 164° 0.9'E 1km costa	27/12/2010	0,0320122	0,69	No
	06/01/2011	0,0320122	2,95	No
	20/01/2011	0,0320122	1,45	No
S.M.Novella 74° 43' S 164° 13'E 2.5km costa	28/12/2010	0,0320122	3,75	No
	07/01/2011	0,0320122	2,79	No
	28/01/2011	0,0320122	1,16	No

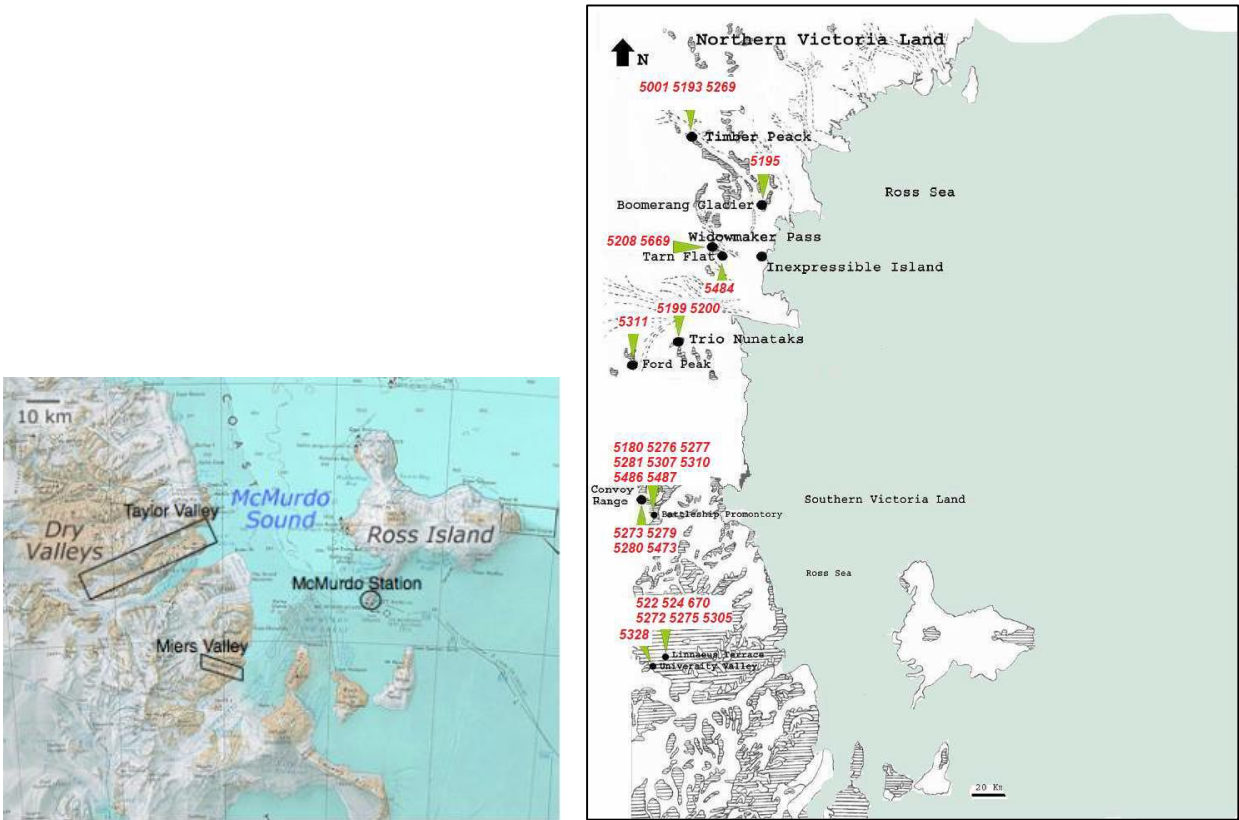


Fig. 19. Siti di campionamento nelle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria.

Tabella 2. Descrizione del campionamento nelle Valli Secche.
 (*) A= arenaria, CA= conglomerato arenaria, G=granito, D= dolerite, Q= quarzite, L=lava.

sito di campionamento	coordinate	altitudine (m)	distanza dal mare (Km)	tipologia roccia*
Chisholm Hills	73°26'46"S 163°18'50"E	2500	81	A/D
Stewart Heights	73°29'26"S 163°54'44"E	2670	74	CA/G
Archambault Ridge	73°41'06"S 162°25'50"E	3200	90	CA
	73°44'26"S 162°40'32"E	2725	80	G
	73°40'09"S 162°35'37"E	3400	87	CA
Mt Adamson	73°55'59"S 162°58'43"E	3600	60	A
Mt McGee	74°00'10"S 164°28'56"E	1000	19	G
	74°01'42"S 164°44'45"E	230	13	G
Shafer Peak	74°02'19"S 162°37'16"E	3100	59	CA
	74°02'38"S 162°36'46"E	3300	48	G
Harrow Peak	74°04'33"S 164°48'32"E	1230	6,5	G
Kay Island	74°04'13"S 165°18'57"E	80	0	Q
Pinkard Table	74°04'30"S 164°03'05"E	1550	13,5	G
Random Hills	74°06'11"S 164°22'53"E	1700	13	G
Bier Point	74°08'11"S 164°08'00"E	1460	8	G
Timber Peak	74°10'11"S 162°25'34"E	2800	50	CA
Mt New Zealand	74°10'46"S 162°31'01"E	2888	47	A
Mt. Meister	74°12'38"S 162°44'53"E	1632	41	G
Unnamed site	74°15'13"S 162°30'52"E	2700	40,5	A
Eskimo Point	74°16'14"S 162°36'33"E	1816	37	Q
Mount Burrows	74°18'S 163°39' E	2000	2,6	G
Mt Dickason	74°23'58"S 164°00'21"E	1840	21	G
	74°23'29"S 164°01'13"E	1586	21,5	G
Wishbone Ridge	74°26'24"S 163°58'01"E	1396	17	G
Mt Keinath	74°33'03"S 164°03'92"E	385	5,2	G
Mt Nansen	74°37'43"S 162°35'38"E	2240	12,5	G
	74°32'11"S 162°33'55"E	2349	20	A
	74°34'44"S 162°14'37"E	1200	23,2	CA
Thern Promontory	74°33'S 162°04'E	1500	29	A
Anderson Ridge	74°42'51"S 162°37'04"E	500	4,7	G
Campo Icaro	74°42'57"S 164°06'41"E	60	0,1	G/Q
Vegetation Island	74°47'03"S 163°39'35"E	200	0	G
Reed Nunatak	74°49'19"S 161°58'31"E	1133	19	G
Mt Larsen	74°53'03"S 162°09'54"E	935	10	G
Inexpressible Island	74°53'21"S 163°44'43"E	see level	0	G/Q
Olson Nunatak	74°55'55"S 162°24'08"E	200	2	A/G
Trio Nunatak	75°30'02"S 159°40'28"E	1000	82	A
	75°28'59"S 159°35'21"E	1400	84,5	A
Mt Howard	75°40'22"S 161°17'01"E	200	33,8	D/Q/CA
	75°40'50"S 161°16'15"E	1352	33,8	CA
Prior Island	75°41'31"S 162°52'49"E	50	0	G/Q

Ford Peak	75°41'29''S 160°25'57''E	1190	57	CA
Mt Stephen	75°41'49''S 161°45'12''E	532	20,3	L
Mt Billing	75°42'12''S 160°54'28''E	1300	44	CA/D
Ricker Hills	75°38'39''S 159°01'42''E	1115	96	A
	75°43'25''S 159°10'55''E	1820	91,5	A
Mt Bowen	75°45'24''S 161°03'46''E	1874	30,5	A
Bobby Rocks	75°48'35''S 159°11'15''E	1680	91	A/D
Pudding Butte	75°52'02''S 159°58'58''E	1600	58,6	CA
	75°52'51''S 160°08'56''E	1600	64	A
Starr Nunatak	75°53'56''S 162°35'38''E	1420	3,2	G
Richard Nunatak	75°56'24''S 159°38'41''E	1863	74	A
	75°56'00''S 159°47'38''E	2000	70,2	CA
Ambalada Peak	75°57'05''S 158°24'25''E	1800	105,5	CA
McLea Nunatak	75°59'47''S 159°30'05''E	2100	75,6	D/A
The Mitten	75°59'00''S 160°30'00''E	1600	50,3	A
Battleship Promontory	76°54'36''S 160°56'05''E	1000	33,5	A

3.2 Microrganismi, isolamento e identificazione

3.2.1 Isolamento dei ceppi

I ceppi oggetto di questo studio sono stati isolati da acque di mare (BA) e da rocce (BAR).

Le colture batteriche derivanti dai campioni di acqua di mare sono state ottenute posizionando le membrane filtrate su terreni di Plate count agar (PCA, ProLabo VWR), e Marine agar (Biotec) e incubate a 5,10,15 e 20 °C. Le colture derivanti dai campioni di roccia sono state ottenute da roccia precedentemente frammentata e posizionata su piastre di PCA contenenti Nipagina (Merck) (0.03 w/v, disciolta in etanolo 99% e filtrata 0.2µm con membrane PVDF). Le piastre sono state incubate a 5 e 15 °C.

Le colture pure sono state ottenute mediante il metodo di isolamento per striscio su piastre Petri contenenti PCA.

I ceppi puri erano mantenuti in tubi di PCA a 4°C.

3.2.2 Test fisiologici e morfologici

Al fine di eliminare la presenza di duplicati ottenuti con l'isolamento, sono stati condotti test preliminari su ogni ceppo isolato. Inoltre per le colonie sono state considerate caratteristiche morfologiche quali colore, forma, aspetto, dimensione e spessore. Per le cellule si è esaminata la morfologia e le dimensioni.

La colorazione di Gram è stata condotta utilizzando un kit commerciale (Merck, Germany) seguendo i suggerimenti presenti nel manuale riportato in tabella 3. Le dimensioni dei batteri sono state determinate utilizzando un microscopio Leitz Laborlux 11, recante un oculare micrometrico calibrato con un vetrino micrometrico (Leitz Wetzlar, Germania). I test della Catalasi e dell'Ossidasi sono stati condotti come descritto di seguito (Kovacs, 1956; Whittenbury, 1964). Per il test dell'Ossidasi, il reattivo di Kovacs (1% of N,N,N^I,N^I tetrametil-p-phenylenediamine in acqua) era addizionato ad una colonia fresca e dopo 60 secondi la colorazione violetta della colonia indicava la positività del test. La presenza della catalasi veniva evidenziata dalla presenza di ossigeno gassoso successivamente all'addizione di H₂O₂ al 3% ad una colonia fresca.

Tabella 3. Colorazione di Gram come riportata dal kit commerciale (Merck, Germany)

Step	tempo
Soluzione Cristal Violetto	1.5 min.
Lavare con acqua	30sec.
Soluzione Lugol	3 min.
Lavare con acqua	30 sec.
Sol. decolorante	5-10 sec.
Lavare con acqua	30 sec.
Soluzione Safranina	1 min.
Lavare con acqua	30 sec.

3.2.3 Estrazione del DNA

Tutti i ceppi erano identificati attraverso l'analisi delle sequenze del gene codificante per il 16S rRNA. Gli isolati, cresciuti per 24-72 ore su piastre di PCA, erano usati per l'estrazione del DNA genomico mediante shock termico (Selbmann et al., 2010) come segue: una singola colonia era sospesa in 14 µl di acqua deionizzata sterile, riscaldata a 100°C per 5 min. e immediatamente dopo posta in ghiaccio. La sospensione veniva centrifugata a 4000g per 3 min. Il surnatante era usato per l'amplificazione (PCR Polymerase chain reaction).

3.2.4 Amplificazione del gene 16S rDNA e sequenziamento

Le amplificazioni sono state effettuate in una miscela di reazione (volume finale 25µl) contenente 12 µl di MasterMix 2X (Biomix, BioLine Ltd. London: BioTaq DNA Polymerase, 32 mM (NH₄)₂ SO₄, 125 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 0.02% Tween 20.2 mM dNTPs, stabilizzatore), 10 µl di H₂O milliQ sterile, 1µl di DNA genomico e 5 pmol/µl di primers universali (Sigma-Aldrich, USA) riportati di seguito (Hongoh et al., 2003).

- 63f: CAGGCCTAACACATGCAAGTC

- 1389 r: ACGGGCGGTGTGTGTACAAG

L'amplificazione era effettuata utilizzando un termociclatore Quanta Biotech Thermal Cycler (Biotech, Ltd) secondo il seguente protocollo:

1. Denaturazione a 95°C per 5 min.

2. Denaturazione a 95°C per 45 sec.

3. Annealing a 61°C per 1 min.

4. Estensione a 72°C per 1 min. e 30 sec.

5. Estensione finale a 72°C per 5 min.

6. Mantenimento a 4°C

} 30 cicli

I prodotti di amplificazione erano visualizzati attraverso un elettroforesi su gel di agarosio (1.5%) (Agarose - IBI-Shelton Inc., Shelton, Conn. USA) in buffer TAE 1X (40 mM tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8.3, OMEGA, bio-tek) aggiungendo 5µl di colorante GelRed (10,000x, Biotium, USA), un intercalante che permette la visualizzazione del DNA tramite esposizione a radiazione ultravioletta.

In ogni pozzetto sono stati caricati: 5 µl di DNA campione e 1 µl di Loading Dye 6X (tampone di caricamento al 25% di blu di bromo fenolo e 40% w/v di saccarosio in acqua). Nel primo pozzetto è stato caricato 1µl di marker (GeneRuler™ 100 pb LadderPlus), il quale permette l'individuazione della lunghezza dei frammenti producendo una serie di bande di lunghezza nota, 1 µl di Loading Dye e 4 µl di H₂O.

La corsa è avvenuta applicando una differenza di potenziale di 100 mV per 45 min. di cui gli ultimi 15 min. a 40 mV. Successivamente la visualizzazione delle bande avveniva mediante un trans illuminatore (Vilber Lourmat, Genenco) ad una lunghezza d'onda di 269 nm.

Il sequenziamento era condotto dall'azienda Macrogen (Macrogen Inc., Korea-Amsterdam) e i risultati erano analizzati mediante il software ChromasPro 1.3 (Technelysium Pty Ltd, Australia) in grado di visualizzare la sequenza nucleotidica sotto forma di elettroferogramma, dove ad ogni picco, di colore differente, corrisponde un nucleotide. Le sequenze ottenute erano identificate mediante confronto con le sequenze disponibili nella banca dati NCBI GenBank (Altschul et al., 1997). Le sequenze erano depositate in GenBank per ottenere un numero di identificazione, “*accession number*”.

3.3 Studio filogenetico

3.3.1 Allineamento e costruzione degli alberi filogenetici

Tutte le sequenze d'interesse e l'outgroup opportuno, sono state allineate automaticamente utilizzando il programma ClustalX (Thompson et al.,1997). L'allineamento è stato poi migliorato manualmente con il software Mega 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura et al., 2007). In alcuni casi è stato necessario eliminare le porzioni iniziali e terminali delle sequenze in modo da comparare frammenti della medesima lunghezza.

L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo Maximum Likelihood e radicato con un outgroup. L'outgroup è un organismo esterno al gruppo in studio, originato da un antenato più antico,

ma più vicino evolutivamente al gruppo oggetto di studio più di quanto sia qualunque altro gruppo esterno.

La validità dell'inferenza filogenetica è stata stimata con l'analisi di bootstrap (Felsenstein, 1985) calcolata su 1000 pseudoreplicanti generati ed analizzati da Mega 6.0.

3.4 Condizioni colturali

3.4.1 Determinazione dei profili di crescita a differenti temperature

La crescita dei ceppi batterici, è stata testata in un range di temperature 0-45°C con intervalli di 5 $\pm$ 0.5°C, su piastre di PCA (Plate Count Agar) (Pesciaroli et al., 2012).

I ceppi sono stati seminati su piastre (diametro 90 mm), mediante un inoculo puntiforme (diametro di 1 mm). L'esperimento è stato condotto in triplicato.

La crescita microbica, è stata poi valutata, attraverso la misurazione del diametro della colonia, mediante l'utilizzo di un calibro e monitorata ogni 24 ore, per una durata totale di 30 giorni.

3.4.2 Determinazione dei profili di crescita a differenti concentrazioni di cloruro di sodio (NaCl)

Per valutare la capacità dei ceppi di crescere in presenza di differenti concentrazioni di cloruro di sodio (NaCl), i microrganismi sono stati inoculati su piastre di PCA addizionate con NaCl in concentrazioni crescenti: 0, 20, 30, 40, 60, 80, 100 g/l.

Tutte le piastre, sono state inoculate tramite un inoculo puntiforme (diametro di 1 mm). L'esperimento è stato condotto in triplicato.

La tolleranza alle differenti concentrazioni saline è stata valutata mediante la misurazione dell'incremento delle dimensioni della colonia a $15\pm0.5^{\circ}\text{C}$, mediante l'utilizzo di un calibro. Le misurazioni, sono state effettuate giornalmente, per la durata complessiva di 30 giorni.

3.5 Studio della comunità microbica mediante DGGE

La tecnica PCR-DGGE fingerprinting era scelta per studiare la comunità batterica totale presente nelle acque marine antartiche e nelle rocce campionate nelle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria. Dopo l'estrazione del DNA totale della comunità, questo era usato come stampo per l'amplificazione del gene ribosomiale 16S rDNA e la successiva amplificazione della regione ipervariable V3 mediante PCR. I prodotti di amplificazione erano separati attraverso DGGE, le bande ottenute erano excise dal gel, ri-amplificate, sequenziate e successivamente comparate con le sequenze presenti in banca dati.

3.5.1 Estrazione del DNA genomico da campioni di acqua marina

Le membrane sono state prelevate e inserite in falcon sterili contenenti 1,5 ml di H₂O sterile ciascuna. Le membrane sono state frantumate con pestelli sterili così da portare le cellule in sospensione e centrifugate a 7500 rpm per 10 minuti. E' stato scartato il surnatante e recuperato il pellet.

L'estrazione del DNA è stata realizzata tramite il kit commerciale "Quiagen DNeasy Blood & Tissue Handbook kit" (QIAGEN) come di seguito riportato:

1. Aggiungere al pellet 180 µl di Buffer di lisi (tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, Tween 20 1%, lisozima 20 mg/ml) e vortexare;
3. Incubare per 30 min. a 37°C;
4. Aggiungere 25 µl di Proteinasi K ed in seguito 200 µl di Buffer AL, quindi vortexare;

5. Incubare a 56°C per 30 min.;
6. Aggiungere 200 µl di etanolo e mescolare accuratamente, poi vortexare per rendere omogenea la soluzione;
7. Prelevare il surnatante assieme al precipitato e trasferire in una colonna “DNeasy mini spin” e quindi inserire la colonna in un “collection tube”;
8. Centrifugare a 8000 rpm per 1 min., quindi eliminare eluito e tubo;
9. Sostituire il tubo con uno nuovo ed aggiungere 500 µl di Buffer AW1;
10. Centrifugare a 8000 rpm per 1 min., quindi eliminare eluito e tubo;
11. Sostituire tubo con uno nuovo ed aggiungere 500 µl di Buffer AW2;
12. Centrifugare a 14000 rpm per 3 min. e poi successivamente a 14000 rpm per 1 min. (per eluire completamente l’etanolo) ;
13. Eliminare il tubo e trasferire la colonna su una eppendorf da 1,5 ml;
14. Aggiungere 100 µl di Buffer AE;
15. Incubare a temperatura ambiente per 1 min;
16. Centrifugare a 8000 rpm per 1 min.

3.5.2 Estrazione del DNA genomico da campioni di roccia

3.5.2.1 Preparazione del campione

Le rocce raccolte sono state preventivamente frammentate in condizioni di sterilità con l’utilizzo di uno scalpello. In seguito, per permettere l’estrazione del DNA, i frammenti di roccia sono stati ulteriormente frantumati e macinati fino a ridurle in polvere mediante lo strumento Vibromulino MM200 (Retsch).

Lo strumento prevedeva l’utilizzo di capsule e biglie (10 mm Ø) di acciaio inox precedentemente sterilizzate. Le rocce sono state frammentate per 3 minuti a 20 Hz di frequenza.

3.5.2.2. Ottimizzazione ed estrazione del DNA

Al fine di ottimizzare l'estrazione del DNA genomico dai campioni di roccia, sono state testate varie procedure di estrazione (tab. 4) utilizzando tre differenti kit:

- GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (*EURx Ltd.*)
- Maxwell® 16 System DNA Purification Kit (*Promega*)
- NUCLEOSPIN PLANT Kit (*Macherey-Nagel, Gmbh & Co.*)

Le estrazioni sono state condotte il triplicato.

Tabella 4. Procedure di estrazione da campioni di roccia delle Valli Secche.

<i>campione</i>	<i>kit e procedura di estrazione</i>
1	MAXWELL 0,5g
2	MAXWELL 0,05g + 1ml buffer lisi
3	MAXWELL 0,05g + 1ml sol.salina (0,9% NaCl)
4	KIT NUCLEOSPIN PLANT 0,5g roccia
5	KIT NUCLEOSPIN PLANT 1g roccia
6	KIT EURX 0,5g + buffer
7	KIT EURX 0,5g + 2X buffer
8	KIT EURX 0,5g + 1,5ml acqua, centrifugaz., recupero pellet
9	MAXWELL KIT SPERIMENTALE
10	MAXWELL KIT SPERIMENTALE

Dopo aver analizzato i campioni attraverso l'uso della tecnica PCR-DGGE, è stato scelto il kit di estrazione NUCLEOSPIN PLANT poiché è stato quello che ha prodotto il maggior numero di bande. Di seguito viene riportato il protocollo utilizzato, modificato rispetto alle indicazioni fornite dalla casa produttrice. È stata infatti introdotta un'incubazione a 65°C dopo la seconda aggiunta di buffer di lisi ed è stato eliminato il passaggio in cui il surnatante, prelevato dopo la separazione delle fasi con cloroformio, viene purificato con un passaggio nella colonnina.

- Pesare 0.5 g di polvere di roccia,
- Effettuare un lavaggio in EtOH a 95°. Aggiungere 1 ml di EtOH a copertura totale del campione, miscelare (pipettando) quindi aspirare l'etanolo.
- Pesare 150 mg di sfere di vetro siliconizzato (Siliconized glass beads) e aggiungerli alla provetta contenente il campione.
- Aggiungere 200 µl di buffer di lisi "C1".
- Omogeneare il campione con l'aiuto di un pestello (i pestelli conservati in acido acetico al 10% devono essere sciacquati con acqua distillata prima dell'uso).
- Vorticare per pochi secondi, quindi aggiungere ulteriori 100 µl di buffer di lisi "C1" e ripetere l'operazione di omogeneazione.
- Incubare a bagnomaria a 65°C per 30 minuti.
- Aggiungere 100 µl di cloroformio, vorticare per 10" e centrifugare (5' x 13.500 rpm).
- Prelevare il surnatante e trasferirlo in una provetta sterile, incubare 30' a 60°C.
- Aggiungere 300 µl del binding buffer "C4" (preparato con "C3" e "C2" in rapporto 1:4. Il "C4" dopo essere stato mescolato può mantenersi inalterato a t.a. per oltre un anno) e 200 µl di etanolo.
- Vortexare per 30".
- Trasferire la miscela in una colonnina Nucleospin e centrifugare per 1' x 13.500 rpm. - Scartare il liquido di filtrazione.
- Aggiungere 400 µl di buffer di lavaggio "CW" e centrifugare per 1' x 13.500 rpm.
- Scartare il filtrato.
- Aggiungere 700 µl di buffer di lavaggio "C5", centrifugare per 1' x 13.500 rpm.
- Aggiungere 200 µl di buffer di lavaggio "C5", centrifugare per 2' x 13.500 rpm.
- Mettere la colonnina su una nuova provetta Eppendorf.
- Aggiungere 100 µl di Elution Buffer ("CE") preventivamente scaldato a 70°C e quindi incubare per 5' a temperatura ambiente.
- Centrifugare per un minuto a 13.500 rpm e raccogliere l'eluato.
- Conservare il DNA a -20°C.

3.5.3 Amplificazione del gene 16S rDNA (PCR I) e della regione ipervariabile V3 (PCR II)

Due PCR consecutive (nested-PCR) erano utilizzate per ottenere l'amplificazione della regione ipervariabile V3 del gene ribosomiale 16s rDNA, come precedentemente descritto da altri autori sia per la tecnica DGGE che TGGE (Gray et al., 2002; Molina-Muñoz et al., 2009).

3.5.3.1 PCR I

Le condizioni per l'amplificazione del gene 16S rDNA erano le stesse riportate nel paragrafo 3.2.4.

3.5.3.2 PCR II

Gli amplificati della prima PCR sono stati sottoposti ad una seconda reazione di PCR per amplificare la regione ipervariabile V3 (frammento genico corrispondente alla posizione 341-534 di *Escherichia Coli*, ca. 0,2 Kb) utilizzando i primers batterici universali GC-341f e 534r (Muyzer et al. 1993) (tab. 5).

Tab. 5 Primers utilizzati per l'amplificazione del gene 16S rRNA, 63f e 1389r, e per l'amplificazione della regione ipervariabili V3, GC-341f e 534r.

primers	Sequenza da 5' a 3'
63 f	CAGGCCTAACACATGCAAGTC
1389 r	ACGGGCGGTGTGTGTACAAG
GC-341 f	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGATCCCTAC GGGAGGCAGCAG
534 r	ATTACCGCGGCTGCTGG

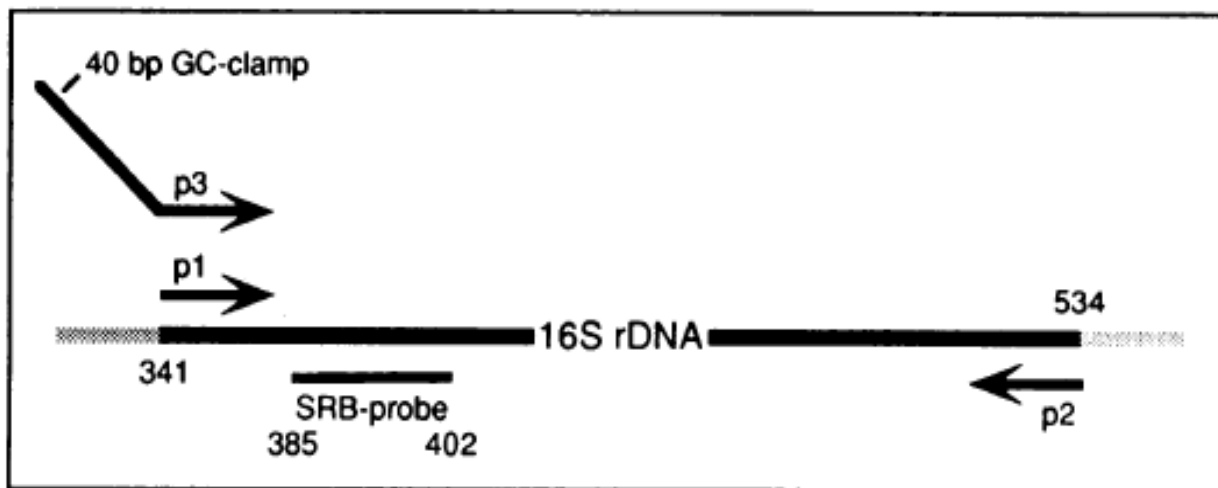


Fig. 20. Meccanismo di amplificazione dei primers GC-341f e 354r.

La sequenza del primer GC-341f contiene una coda GC di 40 bp all'estremità 5', la quale evita che il doppio filamento si denaturi completamente durante la migrazione nel gradiente chimico durante la corsa di DGGE (Muyzer e Smalla, 1998).

La reazione di PCR è stata effettuata su un volume totale di 100 µl contenente: 50 µl di Mastermix 2X (Biomix, BioLine Ltd. London: BioTaq DNA polymerase, 32 mM (NH₄)₂SO₄, 125 mM tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 0,02% Tween 20.2 mM dNTPs, stabilizzatore), 4 µl di ciascun primer (concentrato 5 pmol/µl), 38 µl di H₂O e 4 µl di DNA stampo. Le condizioni di reazione, la temperatura ed i cicli del programma seguiti sono una modificazione della tecnica *touch down* descritta da Watanabe e colleghi (1998). La reazione di PCR è stata effettuata utilizzando l'apparecchio Quanta Biotech Thermal Cycler (Biotech Ltd) ed utilizzando il seguente programma di amplificazione:

1. Denaturazione 94°C per 7 min.
2. Denaturazione 94°C per 1 min.
3. Annealing 65°C per 1 min.
4. Da questo punto in poi la temperatura diminuisce automaticamente di 1°C ogni due cicli, fino a raggiungere la temperatura di 55°C alla quale sono stati effettuati ulteriori 10 cicli
5. Estensione 72°C per 2 min.
6. Estensione finale 72°C per 10 min.

7. Mantenimento 4°C

L'avvenuta amplificazione è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (1.5%)
La corsa ha seguito le modalità descritte nel paragrafo 3.3.4.

3.5.4 Determinazione della concentrazione del DNA genomico mediante fluorimetro Qubit

Dopo l'estrazione, il DNA di ogni campione è stato quantificato tramite il sistema Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Questo permette la quantificazione del DNA tramite il rilevamento dell'intensità della fluorescenza data dal legame dell'acido nucleico in questione con un fluorocromo. Prima di procedere con la misurazione dei campioni, sono state preparate due soluzioni contenenti ciascuna uno standard di DNA per la calibratura dello strumento: standard 1 con concentrazione 0 ng/μl (quant-it ds DNA HS standard #1) e standard 2 con concentrazione 10 ng/μl (quant-it ds DNA HS standard #2). Per la misurazione dei campioni e degli standards è stato utilizzata una working solution (WS), contenente un buffer (Qubit ds DNA HS buffer, Invitrogen) e il reagente fluorescente (Qubit ds DNA HS reagent 200X, invitrogen) per la misurazione dell'assorbanza.

Le soluzioni degli standards contengono: 10 μl di standard e 190 μl di WS, mentre i campioni sono misurati mediante una soluzione contenente: 1 μl di DNA campione e 199 μl di WS; la soluzione finale avrà un volume di 200 μl. Lo strumento fornisce la concentrazione in ng/ml, e da questa è stato ricavato il corrispondente in ng/μl di DNA presente nel campione mediante la formula:

$$\text{DNA ng/ } \mu\text{l} = [\text{DNA}] \text{ ng/ml} \times 200 / 1000$$

3.5.5 Purificazione e concentrazione dei prodotti di PCR

Tutti i prodotti finali di PCR, per ogni campione, sono stati concentrati 5 volte, utilizzando il kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN). Questo procedimento consente anche di purificare i prodotti di PCR eliminando sali ed altri componenti a basso peso molecolare. I passi previsti dal protocollo sono stati i seguenti:

1. Aggiungere in una QIAquick spin column 5 volumi del buffer PB ad un volume del prodotto ottenuto dalla reazione di PCR e centrifugare a 13000 rpm per 1 min.
2. Dopo aver buttato l'eluato aggiungere 750 µl di buffer PE e centrifugare a 13000 rpm per 1 min. Buttare l'eluato e centrifugare nuovamente a 13000 rpm per 1 min.
3. Aggiungere 20 µl di buffer EB e centrifugare 13000 rpm per 1 min per due volte
4. Recuperare il DNA concentrato e purificato.

3.5.6 DGGE fingerprinting

3.5.6.1 Casting del gel e corsa elettroforetica

L'elettroforesi su gel con gradiente chimico denaturante è stata condotta con il sistema DGGE (Elettrofor, scientific instruments; Fig.21). Per la separazione dei frammenti, è stato utilizzato un gel denaturante di poliacrilamide a concentrazione 7,5% con un gradiente denaturante lineare composto da urea e formammide, parallelo alla direzione dell'elettroforesi, con un range denaturante 20% - 70%.



Fig. 21. Sistema Elettrofor, scientific instruments.

E' stata preparata, inoltre, una soluzione priva di agenti denaturanti per lo stacking gel, il quale permette al DNA di distribuirsi all'interno dei pozzetti e iniziare in modo omogeneo la corsa. Il gel è stato preparato utilizzando una soluzione al 40% di acrilamide: bis-acrilamide 37.5:1 (MERCK, Germany), TAE 50X (OMEGA, bio-tek), Urea (VWR, ProLabo) e Formammide (VWR, ProLabo), come riportato in tabella 6.

La polimerizzazione del gel avviene grazie all'aggiunta di ammonio persolfato 10% (APS) e tetrametiletilendiammina (TEMED) entrambi alla concentrazione di 0,09%(V/V), all'interno di una cella costituita da due vetri disposti verticalmente e separati da due spaziatori di 1 mm ciascuno.

Il gel è stato preparato secondo il seguente protocollo:

1. Collocare i due vetri su un foglio di carta da filtro e lavarli con acqua Milli-Q e pulirli con etanolo
2. Con carta assorbente distribuire in modo omogeneo sulla superficie del vetro piccolo la soluzione dimetildiclorosilano 2% in 1,1,1-tricloroetano (REPEL-SILANO, GE Healthcare Bio-Science AB), la quale faciliterà il distacco del gel polimerizzato una volta avvenuta la corsa elettroforetica
3. Inserire tra i due vetri gli spaziatori e bloccarli con le apposite clamps in metallo. Successivamente posizionare il tutto sul supporto che permetterà ai vetri di rimanere in posizione verticale
4. Versare le soluzioni denaturanti nell'apposito formatore di gradiente, il quale distribuirà le soluzioni nello spazio tra i cristalli generando un gradiente lineare (si prelevano 23 ml per ogni soluzione e ad ognuna si aggiungono 100 µl di APS e 8 µl di TEMED)
5. Attendere 1h e 30 min. per la solidificazione del gel

6. Ad avvenuta solidificazione inserire lo stacking gel (gel di poliacrilamide al 7,5% senza gradiente denaturante) con una siringa e quindi il pettine per i pozzetti
7. Attendere quindi che il gel polimerizzi. La polimerizzazione del gel richiederà circa 12 ore.

Tabella 6. Reagenti utilizzati per la preparazione delle soluzioni denaturanti.

Reagenti	soluzione 20%	Soluzione 70%	stacking gel
Acrilamide: bis-acrilamide 37,5:1 40%	18,8 ml	18,8 ml	18,8 ml
TAE 50X	2 ml	2 ml	2 ml
Urea	8,4 g	29,4 g	0 ml
Formammide	8 ml	28 ml	0 m
H₂O	Fino a 100 ml	Fino a 100 ml	Fino a 100 ml

Il gel è stato immerso nell'apparato per DGGE contenente circa 8 litri di buffer di corsa TAE 1X preriscaldato fino alla temperatura di 60°C. In ogni pozzetto sono stati caricati 20 µl di DNA campione concentrato 5X, 3 µl di Loading buffer (5X), preparato con: 0.5% triton X-100, 0.05% di blu di bromofenolo, 0.05% xylene cianolo, 10 mM EDTA e buffer TAE 10X, e 3 µl di glicerolo, che permette alle molecole di DNA di posizionarsi sul fondo del pozzetto grazie al suo elevato peso molecolare. Nel primo pozzetto del gel è stato caricato un marker di controllo che produce una serie di bande corrispondenti a specie batteriche note.

La corsa è avvenuta per 5 ore a 60 °C, passando da un voltaggio di 20 V, mantenuto per i primi 10 min., a uno di 200 V per le successive ore.

Terminata la corsa il gel è stato prelevato dall'apparato per DGGE.

E' stato, quindi, rimosso il vetro piccolo ed il gel è stato immerso per 40 min. in una soluzione di: 1.34 g NaCl, 66.7 µl GelRed (GelRed Nucleic Acid Stain, 10000X in Water, Biotium) e 200ml di H₂O deionizzata.

Le bande sono state rilevate mediante un sistema automatizzato di rilevamento immagine (BioLab molecular imager, chemidoc XRS, BIO-RAD), il quale fornisce una foto ad alta risoluzione del gel.

3.5.7 Ri-amplificazione e sequenziamento delle bande

Le bande che presentavano maggiore intensità sono state tagliate con bisturi e incubate a 4°C overnight in una eppendorf 0.5 ml contenente 100 µl di buffer di eluizione TE (Sckiguchi, 2002; Muyzer, 1996).

I frammenti sono stati usati come stampo per effettuare una ri-amplificazione seguendo il procedimento descritto nel paragrafo 3.5.3.2. I prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Germany) secondo il protocollo già riportato nel paragrafo 3.5.5. Le reazioni di sequenziamento sono state effettuate con il metodo Sanger dalla Macrogen Inc. (Amsterdam, Korea).

Per la ricostruzione e l'analisi delle sequenze è stato utilizzato il programma ChromasPro 1.32 (Conor McCarthy School of Health Science, Griffith University, Southport, Queensland, Australia). Le sequenze, una volta ricostruite, sono state confrontate con quelle depositate nella banca dati NCBI GenBank (National Centre for Biotechnology Information), utilizzando BLASTN (Basic Alignment Search Tool Nucleotide).

3.5.8 Albero filogenetico

Le sequenze ottenute sono state allineate attraverso il software ClustalX ver. 2.0.3 (Jeanmougin et al., 1998). L'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando il programma MEGA 6.0 e un albero è stato costruito attraverso il modello Maximum Likelihood. Il test di Bootstrap era applicato per dedurre l'affidabilità dell'albero (Felsenstein, 1985) con una ripetibilità di 1000 replicanti.

3.6 Analisi statistica dei dati

3.6.1 Analisi d'immagine mediante i software Quantity-one e Phoretix 1-D

La foto dei gel di DGGE sono state analizzate mediante i software d'immagine Quantity one 1-D versione 4.6.3" (BIO-RAD) e Phoretix™ 1-D versione 11.3 (Totalab, life Science Analysis Essentials).

Mediante i due software è possibile individuare le lanes (profili) presenti nel gel ed evidenziare sia manualmente che automaticamente le bande presenti in ogni profilo stimando l'intensità di ognuna rapportandola alla sua lane (intensità relativa) o determinando l'intensità assoluta.

Il Quantity one 1-D e il Phoretix™ 1-D hanno permesso di investigare le relazioni esistenti tra i profili di DGGE mediante due indici di similitudine: il coefficiente di correlazione di Pearson e il coefficiente di Dice.

Il coefficiente di Pearson analizza le curve di intensità dei vari campioni, fornendo informazioni riguardo l'abbondanza relativa di ogni singola banda. Questo indice è influenzato molto meno, rispetto ad altri coefficienti basati sulla similarità delle bande, dalla quantità di prodotti di PCR caricati su gel (Van Verseveld, 2004).

Il coefficiente di Dice stabilisce la similitudine dei profili tenendo conto della posizione relativa delle bande. E' un coefficiente dipendente dall'assegnazione delle bande ossia presenza o assenza di una banda in una data posizione.

Nell' assegnazione delle bande è stata applicata una tolleranza di posizione delle bande dell'1% (rispetto alla lunghezza totale del gel), che indica lo spostamento massimo consentito per due bande in diverse corsie DGGE per essere considerati identici.

I dendrogrammi che correlano la similitudine dei distinti profili delle bande dei campioni sono stati costruiti applicando il metodo UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean).

3.6.2 Organizzazione funzionale (Fo)

È possibile definire l'organizzazione funzionale di una comunità come l'abilità della stessa di organizzarsi in maniera d'avere un'adeguata distribuzione di microrganismi dominanti e di microrganismi resilienti, condizione che assicura la capacità di reagire all'esposizione ad uno stress. La stabilità della funzionalità è assicurata dalla flessibilità della comunità microbica che presenta

membri minoritari, i quali possono diventare dominanti per brevi periodi successivi ad una perturbazione.

Per determinare l'organizzazione funzionale di una comunità è stata utilizzata la curva di Pareto-Lorenz basata sull'intensità delle bande presenti nel gel di DGGE (Wittebolle et al., 2008). Per ogni profilo di DGGE, le rispettive bande sono state ordinate in base alla loro intensità, dal valore più alto a quello più basso. La curva viene disegnata in un grafico in cui in ascissa è riportato il valore cumulativo normalizzato di bande e in ordinata è le rispettive intensità cumulative normalizzate (fig.22). Per interpretare numericamente la curva di Pareto-Lorenz si fa riferimento alla proiezione del valore dell'asse y nel punto in cui le intensità corrispondono alla verticale del 20% sull'asse x; tale valore fa riferimento alla legge dell'80/20 di Pareto secondo cui ad una intensità cumulativa dell'80% corrisponde, in ascissa un valore intorno al 20%. Ciò significa che il 20% del totale delle bande presenti nel gel rappresenta da sola l'80% dell'intensità. Dunque in corrispondenza di questo 20% verranno a trovarsi le specie numericamente maggioritarie (Mertens et al., 2005; Wittebolle et al., 2008). Più le curve di Pareto-Lorenz si allontanano dalla diagonale che rappresenta la linea della teorica perfect evenness (uniformità della comunità ideale) meno la comunità oggetto di studio è uniforme.

L'interpretazione delle curve ottenute si basa sul fatto che la distribuzione delle specie in una comunità microbica è in relazione con la capacità di ottimizzare e conservare la funzionalità anche in condizioni di perturbazione. In funzione del punto in cui le curve intersecano la retta del 20% si possono individuare tre casi di riferimento che caratterizzano tre differenti tipologie di comunità (Fig. 23):

- 25%: comunità con alta uniformità risultante dall'assenza di pressione selettiva. Tale comunità non presenta una struttura interna ben definita in termini di specie dominanti. Visto che non ci sono specie presenti ad alte concentrazioni in caso di stress ha bisogno di una lunga fase di latenza per reagire. In media questo tipo di comunità ha una Fo bassa.
- 45%: comunità in cui le specie più adattate sono dominanti e presenti in alto numero, mentre la maggior parte delle altre specie (80% nell'asse x) è presente ma in quantità minori. Tale tipo di comunità può potenzialmente sopportare cambiamenti ambientali mantenendo la sua funzionalità (specie minoritarie che possono divenire maggioritarie per brevi periodi). La comunità ha una Fo media.
- 80%: comunità caratterizzata da poche specie dominanti e altre specie presenti ma in bassissimo numero, con una grande differenza tra i due gruppi. Questa comunità ha un'alta

organizzazione funzionale ma è fragile rispetto ai cambiamenti esterni, infatti in caso di stress questa necessita di lunghi periodi di recupero.

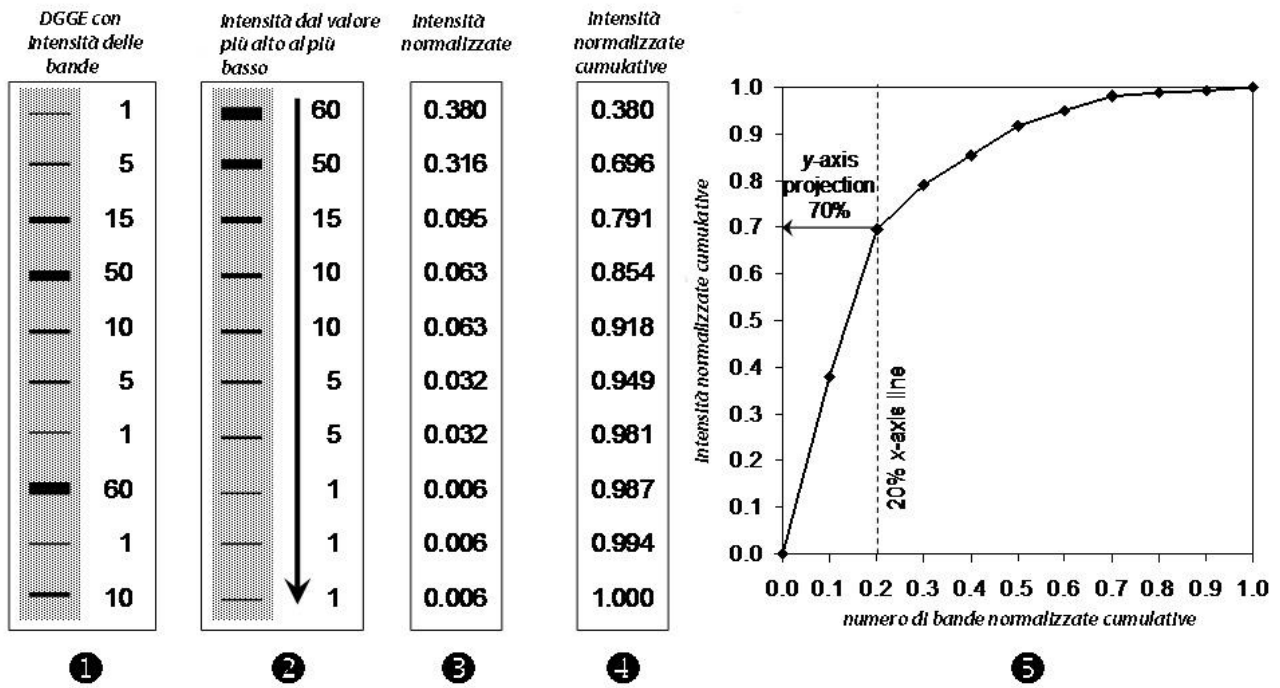


Fig.22. Costruzione delle curve di Pareto-Lorenz.

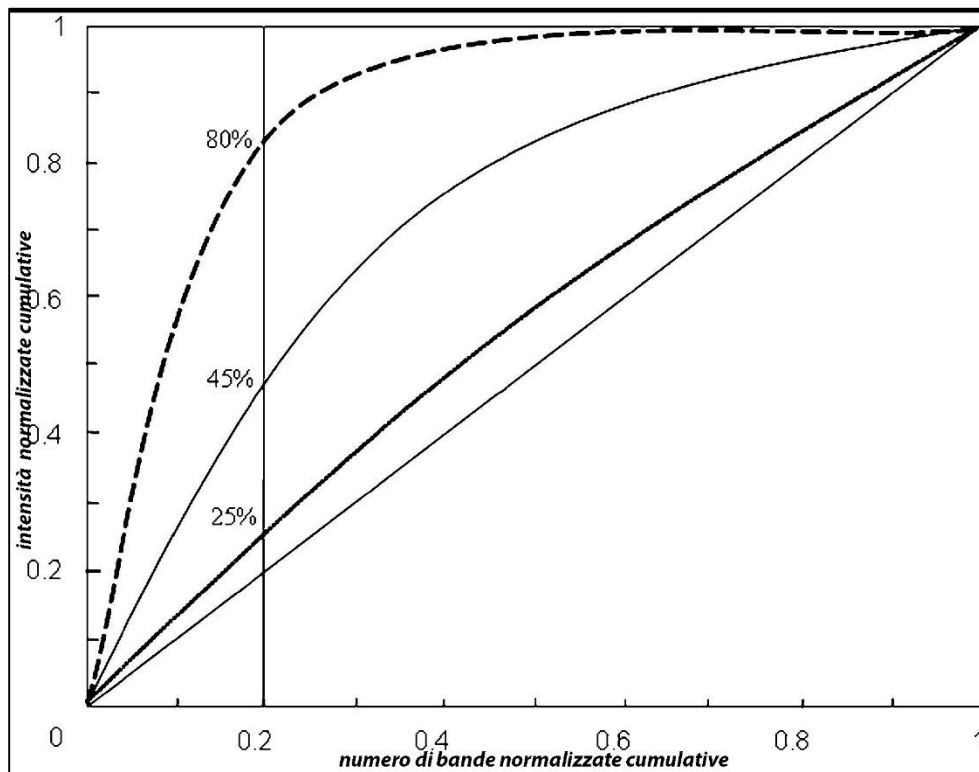


Fig.23. Curva di Pareto-Lorenz derivata da tre ipotetici profili di comunità microbica. La diagonale a 45° rappresenta la perfect evenness.

3.6.3 Indice di Ricchezza, di Ricchezza Ponderata (Rr) e di Margaleff

- L'indice di ricchezza descrive l'abbondanza di specie presenti all'interno di un campione. Se si assume che ogni banda all'interno di un profilo rappresenta una specie, il numero di bande totali rappresenta la ricchezza del campione analizzato.
- L'indice di ricchezza ponderata (Rr) è stato calcolato in base al numero totale di bande presenti in ogni profilo (N) e il gradiente chimico denaturante compreso tra la prima e l'ultima banda presente nello stesso (Marzorati et al., 2008) applicando la seguente formula:

$$Rr = (N^2 \times D_g)$$

Per calcolare il gradiente denaturante D_g è stata utilizzata una griglia graduata per dividere il gel in 25 porzioni, ognuna di ampiezza 5 mm. Inoltre, veniva calcolato un valore iniziale di denaturazione

(D_i) ed un valore finale (D_f). Il delta ($D_f - D_i$) ottenuto era diviso per 100 così da ottenere un valore dell'ordine di grandezza dell'indice di ricchezza ponderata descritto da Marzorati et al. (2008).

$$T_g = (D_f - D_i) / 100$$

- L'*indice di Margalef* o anche indice di ricchezza specifica (d) (Margalef, 1958) è basato sul rapporto tra il numero di specie e il numero totale di individui.

$$d = (S - 1) / \ln(N)$$

S = numero delle specie trovate;

N = numero degli individui trovati.

3.6.4 Indici di diversità: Indici di Simpson e Shannon

La diversità batterica dei campioni era misurata attraverso il calcolo di differenti indici basati sul numero delle bande ottenuto per ogni profilo. Gli indici erano calcolati per ogni profilo di ogni campione attraverso il numero e l'intensità delle bande come rappresentazione del numero e dell'abbondanza relativa delle differenti specie in ogni campione.

- L'*indice di diversità di Simpson* (Simpson, 1949) misura la probabilità che due individui selezionati in modo casuale nel campione appartengono alla stessa specie. Può essere calcolato applicando la seguente formula:

$$1 - D = 1 - \sum (p_i)^2$$

p_i = intensità relativa di una banda.

Il valore $1 - D$ è compreso in un intervallo da 0 a 1; dove 1 rappresenta la massima diversità e 0 indica una diversità nulla. Più alto è il valore di $1 - D$, più alta è la diversità e quindi il valore della ricchezza del campione.

- L' *indice di diversità di Shannon* è uno degli indici più utilizzati per sintetizzare l'informazione contenuta nella struttura della comunità batterica (Shannon, 1948). L'indice misura la probabilità che un individuo preso a caso dalla popolazione appartenga ad una specie differente da una specie estratta in un precedente ipotetico campionamento.

$$H = -\sum_{i=1}^p n_i/N \log_2 n_i/N$$

Dove p è il numero di specie, n_i è il numero di individui che appartengono alla i -ma specie ed N è il numero totale di individui di tutte le specie presenti nel campione. Il suo valore teoricamente, è compreso tra 0 e $+\infty$.

Questa espressione rappresenta la quantità media d'informazione per individuo, secondo un criterio per cui ogni individuo di una specie, una volta identificato, ha un contenuto di informazione tanto più rilevante quanto più la specie è rara. Si può facilmente dimostrare che il massimo valore di H si ottiene quando tutte le specie hanno la medesima frequenza, mentre il minimo si osserva quando tutte le specie sono rappresentate da un solo individuo, tranne una a cui appartengono tutti i rimanenti individui.

3.6.5 Indice di Stabilità e di Evenness

- L' *indice di Evenness* o di equiripartizione di Pielou (J) (Pielou E.C., 1975), valuta il grado di uniformità nella distribuzione degli individui tra le diverse specie. L'indice misura la ripartizione delle abbondanze delle varie specie: è massimo quando tutte le specie sono presenti con la stessa abbondanza, ha invece valori bassi quando ci è presente una sola specie abbondante e numerose specie rare. L'indice mostra quanto la diversità sia dovuta ad un equilibrato rapporto tra le specie, ed è calcolato come rapporto H'/H_{max} .

$$J = H'/H_{max} = H'/\ln S$$

S = numero delle specie del campione;

H' = indice di Shannon;

H_{max} = indice di Shannon calcolato per una situazione teorica di riferimento.

- L'*indice di Stabilità* (Asakawa and Kimura, 2008) indica la stabilità di una comunità microbica.
Lo si calcola:

$$S = \sum \left(\frac{P_i}{P_{imax}} \right) / n$$

P_i= intensità relativa

P_{imax}= intensità relativa più alta all'interno del profilo

n= numero di bande presenti all'interno di ogni profilo

3.6.6 Analisi Multivariata

L'analisi multivariata è stata condotta attraverso il software Past Program versione 3.04 (Hammer, et al., 2001). E' un software gratuito per l'analisi statistica che permette di manipolare i dati, condurre analisi univariate e multivariate, analisi ecologiche, analisi spaziali e temporali, analisi morfometriche e stratigrafiche.

L'*analisi NMDS* (Nonmetric Multi-dimensional Scaling) è un metodo libero da qualsiasi assunzione sulla linearità e può basarsi su ogni tipo di matrice di dissimilarità o distanza simmetrica. Il modello si basa sul principio secondo il quale le differenze tra i valori di distanza, utilizzate per valutare il rispetto o meno degli assiomi metrici, vengono completamente ignorate mentre viene considerato solo l'ordine di rango delle distanze. L'obiettivo consiste nel posizionare i punti in un numero prescelto di dimensioni tale che l'ordine di rango delle distanze dell'ordinamento sia più vicino possibile all'ordine di rango delle distanze iniziali. Ciò significa che la relazione di ordine fra le dissimilarità tra oggetti e le distanze di orientamento deve essere monotona.

Capitolo IV

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Studio degli isolati

4.1.1 Test preliminari

I campionamenti condotti sia nel mare di Ross che nelle Valli Secche, terra Vittoria, hanno permesso l'isolamento di numerosi ceppi batterici, alcuni dei quali affiliati alla stessa specie. Per eliminare gli isolati presenti in più copie, tutte le colture pure sono state sottoposte a test preliminari, i quali hanno consentito di ottenere 100 isolati (tab. 7). In alcuni casi, si è deciso di mantenere isolati apparentemente uguali non essendo chiari e i risultati ottenuti dai test preliminari.

Il 64% dei ceppi erano Gram-positivi e il restante 36% Gram-negativi. Gli isolati derivanti dai campioni marini (BA) erano prevalentemente Gram-negativi (75%), mentre il 78% dei ceppi isolati dai campioni di roccia (BAR) risultavano essere Gram-positivi.

Sin dai primi studi di microbiologia marina fu osservato che la maggior parte dei batteri presenti nelle acque erano Gram-negativi (Watson et al., 1977; Delille, 1992; Munn, 2011). I gram-negativi hanno una parete più sottile rispetto ai Gram-positivi, ma più complessa, con un sottilissimo strato di peptidoglicano che manca degli acidi teicoici. Inoltre, hanno un'ulteriore membrana esterna che è formata da un complesso doppio strato di lipidi (lipopolisaccaridi) e proteine.

Nella membrana sono presenti particolari proteine, come ad esempio le *porine*, che possiedono una struttura trimerica che agisce come un canale per le molecole a basso peso molecolare permettendo il loro ingresso nella cellula. Altre proteine sono in grado di facilitare l'ingresso di ioni ferrosi e altri nutrienti chiave. Queste proteine non sono prodotte in modo costitutivo, ma la sintesi può essere indotta o repressa sulla base delle concentrazioni dei vari nutrienti. Questo rappresenta un esempio importante di come i batteri acquisiscono in un ambiente oligotrofico, come le acque di mare, nutrienti essenziali (Munn, 2011).

Il 56% degli isolati erano ossidasi positivi, mentre tutti i ceppi possedevano l'enzima catalasi.

Tra gli isolati era presente un'ampia eterogeneità nella forma cellulare riscontrando cocci, bastoncelli e coccobacilli con una vasta gamma di dimensioni.

Dai quattro siti marini (tabella 1, pagina 44) sono stati isolati 32 ceppi senza osservare differenze significative fra i siti e le date di campionamento.

Un lavoro iniziale ha permesso l'isolamento di oltre 200 isolati dai campioni rocciosi raccolti nelle Valli Secche. Un successivo screening ha permesso di selezionare un totale di 68 isolati. Inoltre, come mostrato in tabella 8 solo 19 siti su 72 totali hanno permesso l'isolamento di coltivabili. Come mostra la figura 25 la distribuzione dei siti all'interno dell'area di campionamento, considerando altitudine e distanza dal mare, non sembra aver influito sull'isolamento.

Il granito ha dato il maggior numero di isolati (56%) seguito dall'arenaria (28%) e questo può essere spiegato dalla loro struttura. Il granito è una roccia ignea intrusiva felsica con grana media o grossolana e può presentare mega e microcristalli. Inoltre, è considerato una roccia sovrassatura con contenuti di quarzo compresi tra il 20 e il 60%. L'arenaria è una roccia sedimentaria clastica derivante dal consolidamento diagenetico delle sabbie. E' costituita per la maggior parte da granuli di dimensioni comprese tra 2,00 e 0,06 mm, derivanti dalla disgregazione, a opera di processi naturali, di rocce di vario tipo e tra i grani più resistenti all'abrasione e all'alterazione chimica comunemente abbondano quelli di quarzo. Gli spazi compresi tra i granuli possono essere riempiti da una frazione detritica più fine, siltoso-argillosa. Le comunità che vivono all'interno delle rocce sono principalmente fotosintetiche e comprendono cianobatteri e alghe unicellulari (Thomas, 2005) che grazie alla translucenza dei cristalli, i quali permettono un'adeguata penetrazione della luce solare, sono in grado di svolgere la fotosintesi (Schlesinger et al., 2003; Khan et al., 2011). Molte delle comunità microbiche litiche vivono associate a vari tipi di roccia traslucenti come il calcare (Cockell e Stokes, 2004), il gesso (Hughes e Lawley, 2003) o l'arenaria (Friedmann e Ocampo, 1976).

Tabella7. Caratteristiche morfologiche, fenotipiche e biochimiche dei ceppi isolati dai campioni di acqua provenienti dal mare di Ross e campioni di rocce delle Valli Secche, Terra Vittoria.

CEPPI	GRAM	OXY	CAT	dimensioni ^a (μ m)	descrizione colonia ^b colore/margine/forma/superficie/spessore
BA1	+	-	+	B 0,2 $\pm$ 0,1/ 0,7 $\pm$ 0,2	B/I/C/L/G/S
BA2	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/I/C/L/G/S
BA3	-	+	+	C 0,8 $\pm$ 0,5	B/I/C/L/G/C
BA4	-	+	+	C 0,8 $\pm$ 0,5	B/I/R/L/G/P
BA6	-	+	+	C 0,5 $\pm$ 0,5	B/I/I/L/G/F
BA7	-	+	+	C 0,6 $\pm$ 0,2	B/I/I/L/G/F
BA8	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/I/I/L/G/F
BA10	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/I/C/L/G/S
BA11	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/R/C/L/G/F
BA12	-	+	+	Cb 1,0 $\pm$ 0,2/1,4/0,3	G/I/C/L/G/S
BA15	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	P/I/C/L/G/S
BA16	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/I/C/L/G/C
BA17	-	+	+	Cb 1,0 $\pm$ 0,2/1,4 $\pm$ 0,3	B/I/I/L/G/C
BA18	-	+	+	C 0,8 $\pm$ 0,5	B/I/C/L/G/C
BA21	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/I/C/L/G/C
BA22	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/I/C/L/G/S
BA23	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/I/C/L/G/S
BA24	+	+	+	B 0,3 $\pm$ 0,1/0,4 $\pm$ 0,1	G/I/C/L/G/C
BA25	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/F/I/L/O/F
BA27	-	+	+	C 0,5 $\pm$ 0,2	B/I/I/L/T/F
BA29	+	-	+	B 0,3 $\pm$ 0,1/0,9 $\pm$ 0,1	B/I/I/L/G/F
BA30	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/I/C/L/G/S
BA31	-	+	+	Cb 0,4 $\pm$ 0,3/0,8 $\pm$ 0,6	B/I/C/L/G/S
BA33	-	+	+	C 1,0 $\pm$ 0,5	B/I/I/F/L/T/F
BA34	+	-	+	B 0,3 $\pm$ 0,1/0,9 $\pm$ 0,1	P/I/C/L/G/C
BA35	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	C/I/C/L/G/F
BA37	+	-	+	B 0,2 $\pm$ 0,1/0,7 $\pm$ 0,3	A/I/C/L/G/C
BA38	+	-	+	B 0,2 $\pm$ 0,1/0,7 $\pm$ 0,4	A/I/C/L/G/C
BA39	-	+	+	Cb 1,0 $\pm$ 0,2/1,4 $\pm$ 0,3	B/I/C/L/G/C
BA40	+	+	+	B 0,4 $\pm$ 0,2/2 $\pm$ 0,5	B/I/I/L/G/C
BA41	+	-	+	C 0,8 $\pm$ 0,2/1,0 $\pm$ 0,5	R/I/C/L/S/S
BA42	-	+	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	G/I/C/L/G/S
BAR1	+	+	+	B 0,6 $\pm$ 0,2/1,0 $\pm$ 0,3	R/I/C/L/G/S
BAR2	+	-	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	G/I/C/L/G/S
BAR3	+	-	+	B 0,4 $\pm$ 0,2/2 $\pm$ 0,5	B/R/C/L/O/U
BAR4	+	-	+	B 0,6 $\pm$ 0,4/2,0 $\pm$ 0,5	G/I/C/L/G/P
BAR5	-	+	+	B 0,5 $\pm$ 0,3/1,0 $\pm$ 0,3	C/I/R/L/T/U
BAR6	-	+	+	B 0,5 $\pm$ 0,3/1,0 $\pm$ 0,4	B/I/R/L/G/C
BAR8	+	-	+	B 0,4 $\pm$ 0,2/2 $\pm$ 0,5	G/I/C/L/G/C
BAR9	+	-	+	Cb 0,7 $\pm$ 0,3/1 $\pm$ 0,6	B/I/R/L/G/C
BAR10	+	-	+	B 0,6 $\pm$ 0,4/2,0 $\pm$ 0,5	B/I/R/L/G/U
BAR11	-	+	+	B 0,5 $\pm$ 0,3/1,0 $\pm$ 0,3	C/I/C/L/G/U

BAR12	+	-	+	B 0,6±0,4/2,0±0,5	G/I/C/L/G/C
BAR13	+	-	+	C 0,8±0,6	B/I/C/L/G/C
BAR14	-	+	+	B 0,5±0,3/1,0±0,3	B/I/C/L/G/C
BAR20	-	+	+	B 0,5±0,3/1,0±0,2	B/I/C/L/T/F
BAR21	-	+	+	B 0,5±0,3/1,0±0,5	G/I/C/L/G/F
BAR22	-	+	+	B 0,6±0,4/2,0±0,5	C/I/R/L/G/F
BAR23	+	-	+	B 0,4±0,2/1,0±0,3	B/I/R/L/G/S
BAR24	+	-	+	Cb 0,7±0,3/1±0,6	R/I/C/L/G/S
BAR25	+	-	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	B/I/C/L/O/S
BAR26	+	-	+	Cb 1,0±0,2/1,4±0,3	B/I/C/L/G/C
BAR27	+	+	+	Cb 0,7±0,3/1±0,6	B/I/C/L/O/S
BAR29	+	-	+	B 0,3±0,1/0,9±0,1	B/I/C/L/G/S
BAR30	+	-	+	B 0,7±0,1/0,9±0,5	B/I/C/L/G/S
BAR31	+	-	+	B 0,9±0,4/1,3±0,6	A/I/C/L/G/C
BAR32	+	-	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	A/I/C/L/G/C
BAR33	+	+	+	Cb 0,7±0,3/1±0,6	B/I/C/L/G/F
BAR34	+	-	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	P/I/C/L/G/C
BAR35	+	+	+	C 0,8±0,6	B/I/C/L/O/S
BAR37	-	+	+	B 0,5±0,2/3±1,0	B/I/C/L/O/S
BAR39	+	-	+	C 0,6±0,2	P/I/C/L/G/C
BAR41	+	-	+	B 1±0,5/0,5±0,3	P/I/C/L/G/C
BAR42	+	-	+	B 1±0,5/0,9±0,6	P/I/C/L/G/C
BAR43	-	+	+	Cb 1,0±0,2/1,4±0,3	B/I/C/L/G/S
BAR44	+	-	+	B 0,3±0,1/0,9±0,1	G/I/C/L/G/F
BAR45	-	+	+	B 0,5±0,3/1,0±0,4	C/I/C/L/G/S
BAR46	-	+	+	B 0,7±0,3/1,0±0,5	B/I/C/L/G/P
BAR47	+	-	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	B/I/C/L/G/S
BAR48	-	+	+	B 0,5±0,2/3±1,0	B/I/C/L/G/F
BAR49	+	-	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	B/I/C/L/G/S
BAR50	+	-	+	C 0,6±0,3	C/I/C/L/G/S
BAR51	+	-	+	Cb 1,0±0,2/1,4±0,3	C/I/C/L/G/S
BAR53	+	+	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	B/I/C/L/G/S
BAR54	+	+	+	C 0,8±0,5	B/I/C/L/G/S
BAR56	+	-	+	C 0,9±0,4	C/I/C/L/G/S
BAR57	+	-	+	B 0,6±0,4/2,0±0,5	B/I/C/L/G/S
BAR58	+	-	+	C 0,7±0,2/1,7±0,2	A/I/C/L/G/C
BAR59	+	-	+	C 0,7±0,2/1,7±0,3	A/I/C/L/G/C
BAR60	+	-	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	B/I/C/L/G/S
BAR61	+	-	+	B 0,6±0,4/2,0±0,5	B/I/C/L/G/C
BAR62	+	-	+	C 0,7±0,2/1,7±0,2	A/I/C/L/G/C
BAR63	+	+	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	B/I/C/L/G/S
BAR65	+	-	+	Cb 0,7±0,3/1,5±0,5	G/I/C/L/G/C
BAR66	-	+	+	Cb 0,7±0,3/1±0,6	B/I/C/L/G/S
BAR67	+	+	+	C 0,8±0,5	C/I/C/L/G/S
BAR68	+	+	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	B/I/C/L/G/C
BAR69	+	-	+	C 0,7±0,2/1,7±0,3	A/I/C/L/G/C
BAR70	+	+	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	B/I/C/L/G/C

BAR71	+	-	+	C 0,6±0,3	C/I/C/L/G/S
BAR72	+	-	+	C 0,9±0,4	C/I/C/L/G/S
BAR73	+	-	+	C 1,0±0,5/0,5±0,3	G/R/C/L/O/C
BAR75	+	+	+	Cb 0,7±0,3/0,8±0,7	B/I/C/L/G/C
BAR76	+	+	+	Cb 0,9±0,3/0,8±0,2	B/I/C/L/G/C
BAR77	-	-	+	Cb 0,5±0,1/3,0±1	G/I/C/L/G/C
BAR78	+	+	+	Cb 0,4±0,3/0,8±0,2	B/I/C/L/G/C
BAR79	+	+	+	Cb 0,7±0,3/0,9±0,3	C/I/C/L/G/C
BAR80	+	+	+	Cb 0,5±0,3/0,8±0,6	B/I/C/L/G/C
BAR81	+	+	+	Cb 0,3±0,3/0,8±0,3	C/I/C/L/G/C
BAR82	+	+	+	Cb 0,4±0,3/1,0±0,6	B/I/C/L/G/C

Leggenda:

oxy= ossidasi; cat= catalasi;

^adimensione= sono valori medi di almeno 10 misurazioni, la DS era inferiore al 10%.

B= bastoncello, C= cocco, Cb= coccobacillo.

^bdescrizione colonia= l'aspetto della colonia è stato descritto accordando i seguenti parametri:

colore: B= bianco, C= crema, G=giallo, A=arancione, P= rosa, R=rosso; **Margine:** I=intero, F=filamentoso, R= irregolare; **Forma:** C= circolare, I= irregolare; **Superficie:** L= liscia, G= lucida, R= rugosa, S= secca, P= polverosa, O= opaca, T= trasparente; **Spessore:** S= sollevata, C= convessa, F= piatta, P= pulvinata, U= umbonata.

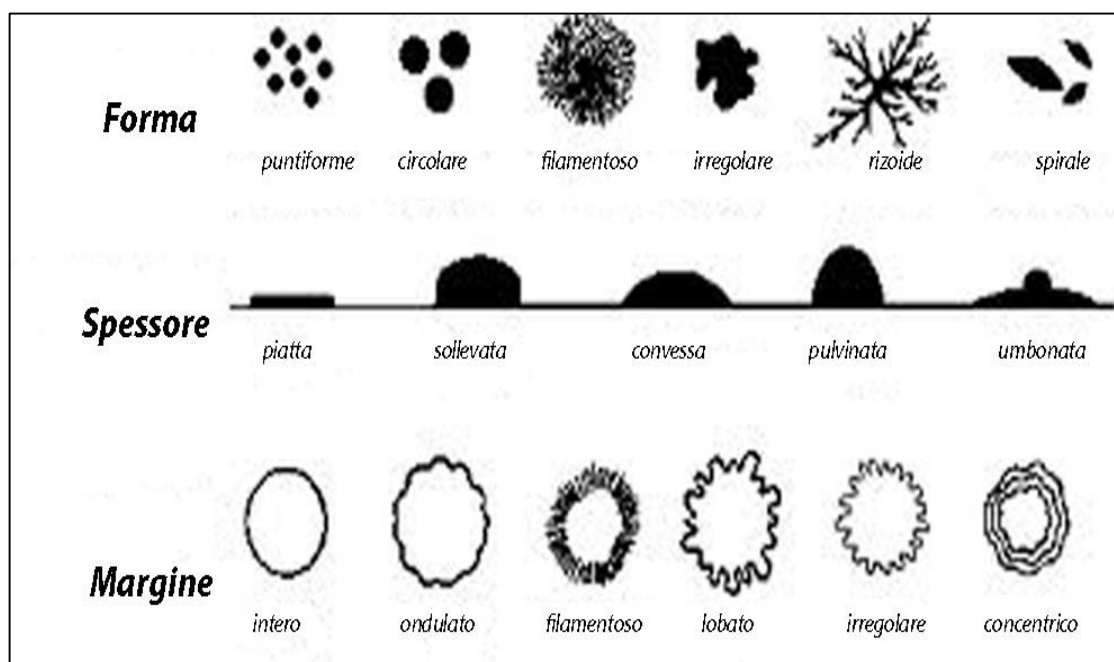


Fig.24. Caratteristiche morfologiche delle colonie batteriche

Tabella.8. Siti e tipologia di roccia da cui sono stati isolati i ceppi BAR.

(*) A= arenaria, G= granito, CA= conglomerato arenaria, Q= quarzite, D= dolerite.

Sito di campionamento	isolato	tipologia roccia*
Bobby rock	BAR4	A
	BAR5	A
	BAR6	A
	BAR8	A
	BAR9	A
	BAR10	A
	BAR11	A
	BAR12	A
Bobby rock	BAR20	A
	BAR21	A
	BAR22	A
	BAR23	A
	BAR70	D
	BAR71	D
Stewart Heights	BAR1	A
	BAR3	G
	BAR33	CA
	BAR34	CA
Pudding Butte	BAR2	A
Inexpressible Island	BAR13	Q
	BAR39	Q
	BAR41	Q
	BAR42	Q
	BAR43	Q
	BAR44	G
	BAR45	G
	BAR46	G
McLea Nunatak	BAR14	D
	BAR26	D
Mt Bowen	BAR24	A
	BAR25	A
Anderson Ridge	BAR27	G
Mt Nansen	BAR29	G
Starr Nunatak	BAR30	G
	BAR31	G
	BAR32	G
Ricker Hills	BAR35	A
	BAR37	A

Archambault Ridge	BAR47	CA
	BAR48	CA
	BAR49	CA
	BAR50	G
	BAR54	G
Mt Keinath	BAR67	G
	BAR51	G
	BAR53	G
	BAR56	G
Mt McGee	BAR63	G
	BAR57	G
	BAR60	G
	BAR61	G
	BAR79	G
	BAR80	G
Prior Island	BAR58	G
	BAR59	G
	BAR62	G
	BAR65	G
	BAR66	G
	BAR69	G
Mt Dickason	BAR68	G
Harrow Peak	BAR72	G
Vegetation Island	BAR73	G
	BAR75	G
	BAR76	G
Campo Icaro	BAR77	G
	BAR78	G
Mt. Meister	BAR81	G
	BAR82	G

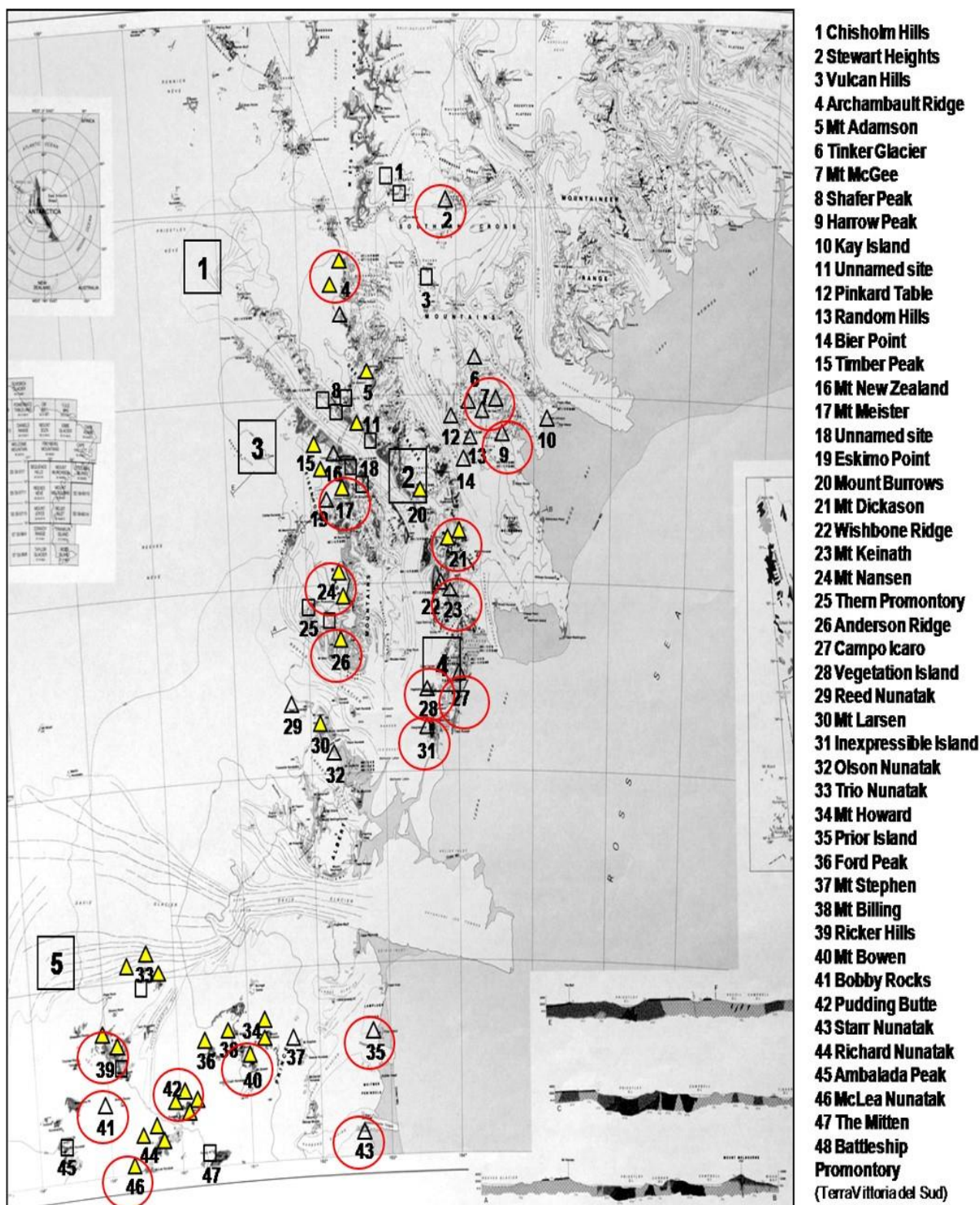


Fig.25. Mappa dei siti delle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria in cui è avvenuto l'isolamento dei ceppi BAR.

4.1.2 Identificazione dei ceppi batterici

Il sequenziamento del gene 16S rDNA ha permesso l'identificazione dei 100 isolati; i quali sono stati affiliati ai seguenti generi: *Microbacterium*, *Psychrobacter*, *Dietzia*, *Marisediminicola*, *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Deinococcus*, *Brevundimonas*, *Fron dihabitans*, *Rhodococcus*, *Agrococcus*, *Auraticoccus*, *Kocuria*

La maggior parte delle sequenze avevano valori di similarità (*max. identity* e *query coverage*) con le sequenze presenti nella banca dati NCBI GenBank compresi tra 95% e 100%. Nella tabella 9 sono riportati i GenBank *accession number* degli isolati e le specie e/o generi più vicini filogeneticamente. Dei 100 ceppi il 54% è stato identificato a livello di specie mentre i restanti sono stati identificati solo a livello di genere.

Il Phylum *Actinobacteria* con i generi *Microbacterium*, *Dietzia*, *Marisediminicola*, *Arthrobacter*, *Friedmaniella*, *Fron dihabitans*, *Rhodococcus*, *Agrococcus*, *Auraticoccus* e *Kocuria* risultava essere il più rappresentativo, circa l'80% degli isolati appartenevano a questo phylum, seguito dal phylum *Proteobacteria* (*Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Psychrobacter*). Inoltre, erano presenti altri due phyla: *Firmicutes* (*Sporosarcina* e *Bacillus*) e *Deinococcus-Thermus* (*Deinococcus*) (fig.26).

Tra gli isolati marini il gruppo *Proteobacteria* è il più rappresentativo confermando ciò che viene riportato in bibliografia per altri ambienti freddi (Yakimov et al., 2004; Bai et al., 2006; Srinivas et al., 2009). Tra i vari generi, *Psychrobacter* è quello maggiormente presente. Gli *Psychrobacter* sono batteri Gram-negativi psicrofili isolati in un'ampia varietà di ambienti freddi come ad esempio il ghiaccio e gli ambienti costieri che rappresentano un eccellente habitat per la loro sopravvivenza (Bowmann et al., 1997; Brinkmeyr et al., 2003; Yumoto et al., 2003). *Psychrobacter cryohalolentis*, è un batterio fortemente adattato agli ambiente freddi; euriterma e psicrofilo è in grado di crescere ad una temperature di -10°C (Amato et al., 2009).

Tra gli isolati dal mare di Ross particolarmente interessanti sono i ceppi BA37 e BA38 appartenenti alla specie *Marisediminicola antarctica*.

M. antarctica è un batterio Gram-positivo, psicrotollerante, isolato per la prima volta da campioni di sabbia costiera dell'oceano Meridionale (Li et al., 2010) e costituisce uno dei maggiori rappresentanti delle comunità microbiche in Antartide (Li et al., 2010; Pan et al., 2013).

Il ceppo BA24, appartiene alla specie *Dietzia maris*; la quale è ampiamente distribuita in ambienti acquatici: acque e sedimenti marini (Colquhoun et al., 1998), sulla pelle dei pesci (Rainey et al., 1995) ed è stata isolata anche da campioni derivanti dalla Fossa delle Marianne (Takami et al., 1997).

Le estreme condizioni climatiche che caratterizzano le terre antartiche hanno portato molti microrganismi al ritiro in microambienti protetti come pietre e rocce (Wierzychos et al., 2011). La funzione più evidente è quella di proteggere i microrganismi da venti, da basse temperature e dalle forti ed intense radiazioni UV che caratterizzano queste Terre (Nienow e Friedmann, 1993; De la Torre et al., 2003).

I primi lavori riportati in bibliografia descrivono le comunità endolitiche come dominate da licheni e cianobatteri; ma negli ultimi anni, nonostante non siano numerosi gli studi, si è osservato come i batteri siano parte integrante delle comunità litiche e svolgano al loro interno un ruolo fondamentale (De la Torre et al., 2003; Hirsch et al., 2003).

Numerosi ceppi isolati appartengono al genere *Arthrobacter*, *Rhodococcus* e *Agrococcus*.

Molteplici specie del genere *Arthrobacter* sono state isolate da differenti fonti come acqua, suolo, sedimenti (Kageyama et al., 2008) e negli ultimi anni nuove specie sono state osservate anche in ambienti freddi come Artico e Antartide (Margesin et al., 2004; Chen et al., 2005; Wang et al., 2009; Zhang et al., 2010). Reddy e collaboratori (2000) descrivono il genere *Arthrobacter* come caratterizzato dalla presenza di ceppi psicrofili tipici esclusivamente di ambienti freddi, i quali si differenziano dalle specie mesofile per numerosi aspetti sia morfologici che genetici, come ad esempio un differente contenuto di citosina e guanina nel DNA. Inoltre i ceppi psicrofili di *Arthrobacter* sembrano contenere glucosio come zucchero nella parete cellulare e non idrolizzano amido (Reddy et al., 2000).

I membri del phylum *Actinobacteria* costituiscono una significativa porzione dei batteri isolati in ambienti estremi come le Valli Secche dell'Antartide (Smith et al., 2006). Insieme ai *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Deinococcus-Thermus* rappresentano i più comuni phyla e si ritrovano in numerose comunità del suolo e della roccia (Buckley e Schmidt, 2001; Zhou et al., 2003; Janssen, 2006).

Il ceppo BAR13 risulta affiliato, al genere *Deinococcus*. Le specie appartenenti a questo genere hanno un'ampia tolleranza al disseccamento e si trovano in numerosi microambienti antartici caratterizzati da estreme condizioni di essiccamento e basse temperature (Yung et al., 2014).

Il 10% dei ceppi sono affiliati a *Pseudomonas*. Le specie appartenenti a questo genere sono ampiamente descritte in Antartide, soprattutto in campioni di suolo e in comunità microbiche epilitiche (Reddy et al., 1994; Kirby et al., 2011). E' considerato un genere altamente disperdibile essendo stato ritrovato spesso in campioni di aria antartica (Chong et al., 2012).

Nella collezione degli isolati antartici ci sono alcuni ceppi che risultano affiliati alla stessa specie dal confronto in banca dati. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che alcuni isolati caratterizzati da numeri progressivi vicini, come ad esempio BA37 e BA38, entrambi identificati come *Marisediminicola antarctica* siano stati isolati da uno stesso sito e quindi potrebbero essere

semplicemente repliche della stessa specie. Ceppi che invece pur essendo affiliati alla stessa specie presentano numeri progressivi distanti, come ad esempio BA8 e BA31, *Psychrobacter cryohalolentis* sono sicuramente la stessa specie, ma ceppi differenti essendo stati isolati da piastre ottenute da siti differenti, spesso anche geograficamente distanti.

Tabella 9. Identificazione dei ceppi Antartici basata sull'analisi del gene 16s rDNA

ceppo	accession number	affiliazione	max identity (%)	query coverage (%)
BA1	KP756649	<i>Microbacterium foliorum</i>	100	100
BA2	KP717913	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	100	100
BA3	KP717912	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	100	99
BA4	KP717905	<i>Psychrobacter fozii</i>	100	100
BA6	KP717906	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	100	99
BA7	KP756657	<i>Psychrobacter</i> sp.	100	100
BA8	KP756658	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	100	100
BA10	KP756659	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	100	100
BA11	KP756654	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	100	99
BA12	KP717915	<i>Psychrobacter namhaensis</i>	100	99
BA15	KP717911	<i>Psychrobacter</i> sp.	100	99
BA16	KP756660	<i>Psychrobacter</i> sp.	98	99
BA17	KP756656	<i>Psychrobacter namhaensis</i>	99	99
BA18	KP717916	<i>Psychrobacter fozii</i>	100	99
BA21	KP756650	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	100	99
BA22	KP717909	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	100	99
BA23	KP717917	<i>Psychrobacter</i> sp.	99	99
BA24	KP717966	<i>Dietzia maris</i>	100	97
BA25	KP717918	Uncultured <i>Psychrobacter</i> sp.	100	99
BA27	KP717926	Uncultured bacterium	57	83
BA29	KP756651	<i>Microbacterium oxydans</i>	100	98
BA30	KP756652	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	100	99
BA31	KP717967	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	100	99
BA33	KP717910	<i>Psychrobacter glacincola</i>	100	98
BA34	KP717919	<i>Microbacterium oxydans</i>	100	98
BA35	KP756661	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	100	100
BA37	KP717968	<i>Marisediminicola antarctica</i>	99	99
BA38	KP717907	<i>Marisediminicola antarctica</i>	100	98
BA39	KP717908	<i>Psychrobacter namhaensis</i>	100	98
BA40	KP717921	<i>Bacillus psychrodurans</i>	100	99
BA41	KP756653	Uncultured bacterium	100	99
BA42	KP717920	<i>Psychrobacter</i> sp.	97	97
BAR1	KP717946	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	99	99

BAR2	KP717947	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	99
BAR3	KP717948	<i>Bacillus megaterium</i>	99	100
BAR4	KP717922	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	99	98
BAR5	KP717923	<i>Pseudomonas lini</i>	100	99
BAR6	KP717949	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	99
BAR8	KP717924	<i>Arthrobacter psycrolactophilus</i>	100	99
BAR9	KP717950	<i>Arthrobacter</i> sp.	99	98
BAR10	KP717951	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	100	97
BAR11	KP717952	<i>Pseudomonas lini</i>	100	99
BAR12	KP717953	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	99	98
BAR13	KP756663	<i>Deinococcus proteolyticus</i>	100	100
BAR14	KP717925	<i>Pseudomonas lini</i>	100	99
BAR20	KP717933	<i>Pseudomonas lini</i>	100	99
BAR21	KP717934	<i>Pseudomonas lini</i>	100	99
BAR22	KP756662	<i>Pseudomonas mondellii</i>	100	99
BAR23	KP717935	<i>Pseudomonas lini</i>	100	99
BAR24	KP756672	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	99
BAR25	KP756664	<i>Arthrobacter</i> sp.	99	99
BAR26	KP756665	<i>Arthrobacter pascens</i>	100	98
BAR27	KP717926	<i>Bacillus</i> sp.	79	99
BAR29	KP756667	<i>Microbacterium</i> sp.	99	99
BAR30	KP717936	<i>Arthrobacter oxydans</i>	100	99
BAR31	KP717937	<i>Friedmanniella lacustris</i>	100	99
BAR32	KP756668	<i>Arthrobacter</i> sp.	99	99
BAR33	KP717939	Uncultured bacterium	99	99
BAR34	KP717940	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	99
BAR35	KP717930	Uncultured bacterium	99	96
BAR37	KP717969	<i>Brevundimonas diminuta</i>	100	98
BAR39	KP717931	Uncultured bacterium	99	96
BAR41	KP717932	<i>Fron dihilitans peucedoni</i>	100	99
BAR42	KP717942	<i>Fron dihabitans</i> sp.	100	99
BAR43	KP717943	<i>Psychrobacter</i> sp.	100	99
BAR44	KP717944	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	100	99
BAR45	KP717938	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	99	99
BAR46	KP717927	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	99
BAR47	KP756673	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	99
BAR48	KP717945	<i>Brevundimonas diminuta</i>	100	99
BAR49	KP756674	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	98
BAR50	KP717970	<i>Rhodococcus</i> sp.	99	99
BAR51	KP756675	<i>Rhodococcus fascians</i>	100	99
BAR53	KP756677	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	99
BAR54	KP756676	<i>Arthrobacter agilis</i>	99	99
BAR56	KP717971	<i>Rhodococcus</i> sp.	100	99
BAR57	KP717954	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	100	98
BAR58	KP717955	<i>Agrococcus jenensis</i>	100	97
BAR59	KP717956	<i>Agrococcus jenensis</i>	100	97
BAR60	KP717957	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	100	98

BAR61	KP717958	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	100	98
BAR62	KP717959	<i>Agrococcus jenensis</i>	100	97
BAR63	KP717961	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	97
BAR65	KP756678	<i>Agrococcus baldri</i>	100	99
BAR66	KP717962	<i>Psychrobacter</i> sp.	100	100
BAR67	KP756679	<i>Auraticoccus monumenti</i>	99	99
BAR68	KP756680	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	99
BAR69	KP756681	<i>Agrococcus jenensis</i>	100	99
BAR70	KP717963	Uncultured <i>Arthrobacter</i> sp.	99	98
BAR71	KP717964	<i>Rhodococcus</i> sp.	100	99
BAR72	KP717928	<i>Rhodococcus</i> sp.	98	99
BAR73	KP756682	<i>Kocuria rhizophila</i>	99	99
BAR75	KP756666	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	99
BAR76	KP756683	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	100
BAR77	KP717929	<i>Pseudomonas graminis</i>	99	99
BAR78	KP756669	Uncultured organism	100	98
BAR79	KP717960	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	99
BAR80	KP756670	Uncultured organism	100	100
BAR81	KP717965	<i>Arthrobacter</i> sp.	99	99
BAR82	KP756671	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	99

(a) Accession number assegnato dall'NCBI GenBank

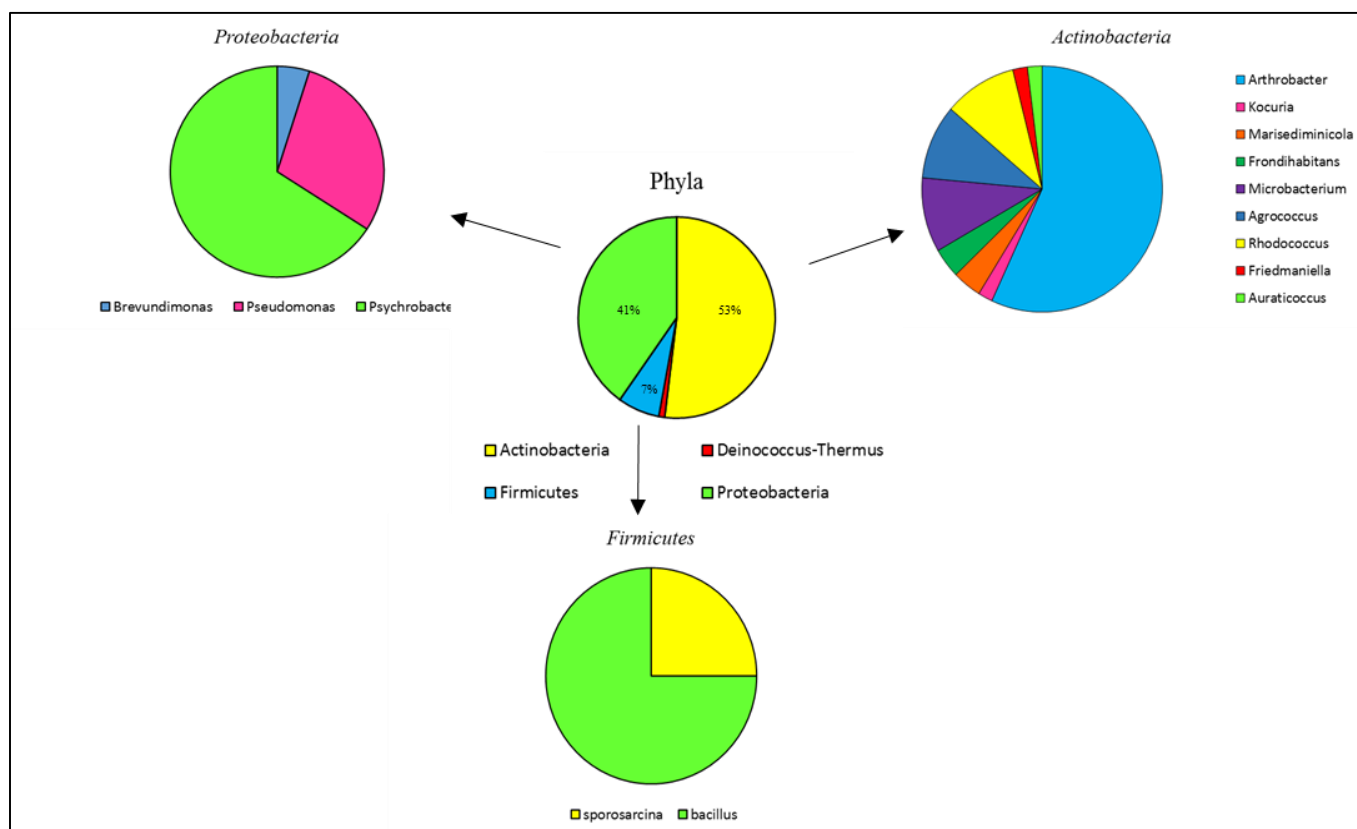


Fig.26. Rappresentazione grafica dei *phyla* e dei *genera* presenti tra gli isolati BAR e BA.

4.1.3 Studio filogenetico basato sull'allineamento del gene 16S rDNA

I ceppi isolati dal mare di Ross e dalle rocce di terra Vittoria sono stati sottoposti ad un'analisi filogenetica basata sull'allineamento del gene 16S rDNA.

Le sequenze, sono state allineate automaticamente tramite il software ClustalX e dopo aver eliminato le porzioni iniziali e finali per comparare frammenti della stessa lunghezza l'albero è stato generato tramite il software Mega 6.0 con il modello evolutivo Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati.

L'albero filogenetico mostrato in figura 27, evidenzia la presenza di quattro raggruppamenti principali corrispondenti ai quattro phyla di cui fanno parte gli isolati: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Deinococcus-Thermus*. Gli *Actinobacteria* e i *Proteobacteria* sono i phyla più rappresentativi, mentre il *Deinococcus-Thermus* è rappresentato da un solo membro, *Deinococcus* sp. Ciò conferma le informazioni riportate in bibliografia che descrivono questi phyla come dominanti nell'ambiente antartico (Lee et al., 2013; Aislabie et al., 2013; Dsouza et al., 2015).

Inoltre, tra gli isolati sono presenti 6 batteri che mostrano una maggior grado di similarità con sequenze batteriche depositate come uncultured bacterium. Questi clusterizzano diversamente all'interno dell'albero lasciando ipotizzare che appartengano a generi differenti tra loro.

I ceppi BAR80 e BAR81, clusterizzano all'interno del gruppo *Arthrobacter*. Non sono presenti come un ramo separato, ma all'interno dello stesso cluster lasciando supporre che possano appartenere a questo genere.

L'isolato BAR33 si trova su un ramo a sé all'interno di un cluster più ampio formato dalla specie *Diezia maris* e il genere *Rhodococcus*, mentre i ceppi BA41, BAR39 e BAR35 clusterizzano insieme formando un gruppo a sé all'interno del cluster dei *Bacillus*.

Per ottenere una risoluzione migliore delle relazioni filogenetiche tra gli isolati sono stati costruiti quattro differenti alberi sulla base dei maggiori gruppi presenti: *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter* e un albero con tutti gli altri generi minoritari. Gli alberi ottenuti sono il risultato della comparazione tra i ceppi antartici e le specie presenti in banca dati con i quali si ottenevano i più alti valori di similarità.

➤ *Arthrobacter*

Il genere *Arthrobacter* rappresenta un gruppo predominante all'interno del suolo sia in ambienti mesofili, sia in ambienti freddi come l'Antartide (Keddie et al., 1986; Reddy et al., 2000; Dsouza et al., 2015). All'interno del phylum *Actinobacteria* è il genere più frequentemente isolato e ciò è dovuto

principalmente alla notevole versatilità metabolica e alla forte resistenza agli stress ambientali (Stackebrandt e Schumann, 2006; Dsouza et al., 2015). Inoltre, numerosi studi descrivono le specie di *Arthrobacter* come dominanti all'interno delle comunità batteriche lungo le coste del mare di Ross, nella Terra Vittoria, sui monti Transantartici, in campioni di ghiaccio e in campioni di acqua marina dell'oceano Antartico (Boyd et al., 1963; Cameron et al., 1970; Aislabie et al., 2013; Dsouza et al., 2015). Nonostante l'elevata versatilità del genere, i ceppi di *Arthrobacter* sono stati isolati solo da campioni di rocce. Ciò potrebbe lasciar supporre che nell'habitat roccioso il genere *Arthrobacter* rappresenti un gruppo particolarmente ben adattato e sicuramente maggiormente presente se confrontato con i risultati ottenuti per i campioni marini.

L'albero filogenetico (fig.28) è stato costruito allineando 56 sequenze e comprende gli isolati e le specie depositate in banca dati con i quali si sono ottenuti i maggiori valori di similarità. L'outgroup scelto appartiene al genere *Bacillus*, Phylum *Firmicutes*.

Numerosi ceppi clusterizzano con le specie a cui sono stati affiliati permettendo un'attribuzione più chiara.

L'isolato BAR49, *Arthrobacter* sp., si trova all'interno del gruppo degli *Arthrobacter oxydans*, anche se su un ramo lievemente più lungo lasciando ipotizzare che possa appartenere a questa specie. Inoltre, le specie di *A. oxydans* ottenute dalla comparazione in banca dati che presentano la maggiore similarità con gli isolati BAR, derivano principalmente dall'Antartide.

Questa maggiore similarità tra individui provenienti da ambienti estremi potrebbe essere spiegata da comuni adattamenti a livello genetico. Gli *Arthrobacter* estremofili presentano alcune sequenze geniche che li differenziano da altre specie di *Arthrobacter* mesofile isolati in ambienti meno asperissimi (Shivaji et al., 1989; Reddy et al., 2000).

Gli isolati BAR68, BAR81 e BAR34 pur essendo stati identificati solo a livello di genere si trovano all'interno del gruppo degli *A. agilis* insieme al ceppo BAR54, che invece è stato affiliato proprio a questa specie.

I ceppi BAR53 e BAR2 hanno la maggiore similarità con un ceppo identificato come *Arthrobacter* sp. DJ88211 e clusterizzano in un gruppo a sé all'interno dell'albero senza poter essere affiliati a nessuna specie presente.

Inoltre, nell'albero sono stati inseriti due ceppi che presentano analogie con ceppi non coltivabili, uncultured bacterium, BAR78 e BAR80, che all'interno dell'albero di tutti gli isolati (fig.27) clusterizzavano nel gruppo degli *Arthrobacter*. I due isolati insieme a BAR25, BAR24 e BAR32, *Arthrobacter* sp., si trovano sul ramo opposto a quello da cui diparte l'intero dendrogramma e ciò li rende meno affini filogeneticamente a tutti gli altri *Arthrobacter* presenti nell'albero. Questo potrebbe essere spiegato dalla grande eterogeneità che caratterizza questo genere (Goodfellow et al., 2012).

➤ *Psychrobacter*

Il genere *Psychrobacter* comprende microrganismi generalmente psicrofili e osmotolleranti. Le specie del genere sono capaci di crescere a temperature comprese tra i -10°C e i 42°C e sono spesso isolati in ambienti freddi, nel ghiaccio antartico, in sedimenti marini, nelle profondità marine e nel permafrost (Bowman et al., 1997; Maruyama et al., 2000; Vishnivetskaya et al., 2000; Romanenko et al., 2002; Bozal et al., 2003).

Al genere *Psychrobacter* appartengono un ampio numero di specie batteriche perfettamente adattate alle condizioni estreme che caratterizzano gli ambienti freddi e possono fornire interessanti informazioni sulla biologia d'adattamento (Kim et al., 2012). Quindi per il genere *Psychrobacter* gli ambienti freddi costituiscano un'importante nicchia ecologica e come sostenuto da Bozal e collaboratori (2003) l'Antartide ne è un esempio estremamente importante.

L'albero filogenetico degli isolati BAR e BA riconducibili al genere *Psychrobacter* è stato costruito utilizzando come outgroup la specie *Bacillus cereus* appartenente al Phylum *Firmicutes* (fig.29).

Osservando l'albero si notano due distinti gruppi: il primo comprende la maggior parte degli isolati e le specie a loro più affini presenti in banca dati, il secondo, che clusterizza esternamente, comprende gli isolati BA6, BA3, BAR43, BA25, BAR66 insieme alla specie *P. nivimaris*. Di questi solo i primi due sono stati affiliati alla specie *P. nivimaris*, seppur localizzati su un'ulteriore ramo all'interno del gruppo. Gli altri ceppi risultano essere delle specie non identificate, ma sicuramente affini a *P. nivimaris*.

I ceppi BA25, uncultured *psychrobacter* sp. e BA27 uncultured bacterium, clusterizzano all'interno del primo gruppo, ma in una posizione piuttosto esterna e su un ramo molto lungo. Inoltre, la posizione del ceppo BA27 conferma ulteriormente i risultati ottenuti dal primo albero degli isolati (fig.27) nel quale BA27 clusterizzava all'interno del gruppo *Psychrobacter* ma su un ramo molto lungo lasciando supporre che forse si tratti di una nuova specie.

Gli isolati BA2, BA21 e BA31 classificati come *P. cryohalolentis* raggruppano all'interno del cluster di quest'ultima specie con valori di bootstrap relativamente alti (98) favorendo una loro chiara attribuzione.

Anche i ceppi BA4 e BA18 si trovano all'interno del gruppo degli *P. fozii*, specie a cui sono stati affiliati, confermando la loro appartenenza.

Infine, il resto degli isolati riconducibili al genere *Psychrobacter* si trovano all'interno di un gruppo nel quale non sono riportate specie ottenute dal confronto in banca dati. Ad esempio, gli isolati BA10,

BA8, BA35, BA11 e BA30, seppur identificati come *P. cryohalolentis*, non si trovano nello stesso gruppo di quest'ultimi. Lo stesso risultato lo si ottiene per i ceppi BA39, BA12 e BA17 classificati come *P. namhaensis*.

Questa apparente contraddizione potrebbe essere spiegata attraverso varie ipotesi come ad esempio valori non sufficientemente alti di *massima identità* e *query coverage* per attribuire in modo certo l'appartenenza ad una specie, differenze a livello genetico sviluppatesi per la necessità di adattarsi all'ambiente in cui sono stati isolati, inefficienza del gene bersaglio scelto per l'analisi filogenetica o anche possibili errori di identificazione riportati in GenBank. Inoltre, alcuni cladi sono caratterizzati da bassi valori di bootstrap che confermano l'incertezza nell'attribuzione.

Alcuni autori hanno riferito che in alcuni casi il grado di risoluzione ottenuto con l'analisi del gene 16S rDNA non è sufficientemente discriminatorio per favorire una risoluzione chiara nei rapporti intragenerici (Yamamoto et al., 2000, Ait Tayeb et al., 2005 Mulet et al., 2009). Quindi, per cercare di ottenere un risultato più chiaro potrebbe risultare utile lo studio di un ulteriore target genetico dal quale ottenere altre informazioni sulle vicinanze filogenetiche.

➤ *Pseudomonas*

Il genere *Pseudomonas* fu introdotto per la prima volta da Migula (1894) e nel corso degli anni è stato ulteriormente ridefinito (Stanier et al., 1966; De Ley, 1992; Moore et al. 1996; Anzai et al., 2000) fino a delineare un gruppo piuttosto ampio suddiviso in due grandi cluster sulla base di analisi filogenetiche (Anzai et al., 2000).

Questo genere comprende numerose specie caratterizzate da un'ampia varietà metabolica e dalla capacità di colonizzare numerose nicchie ecologiche inclusi ambienti estremi come l'Antartide (Reddy et al., 2004, Cornelis, 2008) e l'Artico (Pesciaroli et al., 2012).

Kriss e collaboratori (1976) furono i primi a descrivere la presenza in Antartide del genere *Pseudomonas* e più recentemente Maugeri nel 1996 e successivamente Bruni nel 1999 hanno isolato batteri appartenenti a questo genere da acque marine provenienti da Baia Terra Nova e da acque dolci campionate nel lago di Wanda. Numerosi batteri appartenenti al genere sono stati isolati anche da suolo e campioni di roccia provenienti dalle Valli Secche di McMurdo (Paniker et al., 2002; Reddy et al., 2004; Halmi et al., 2013).

I ceppi riconducibili al genere *Pseudomonas* sono stati isolati esclusivamente dai campioni di roccia.

L'outgroup utilizzato appartiene alla specie *Bacillus cereus*.

Il dendogramma (fig.30) è suddiviso in due distinti cluster; nel primo è presente la specie *P. lini* e numerosi *Pseudomonas* sp. mentre il secondo comprende le specie *P. monteilii* e *P. graminis*.

All'interno del primo gruppo si trovano i ceppi BAR5 e BAR21, i quali clusterizzano con i rappresentanti della specie *P. lini*. In particolare, BAR21 si posiziona su un ramo separato insieme a *P. lini* JX827332, il quale è stato isolato nella regione Qinghai-Tibet, Cina (Long, 2012). Questo li differenzia dagli altri isolati che invece risultano essere stati isolati tutti da campioni di suolo della rizosfera.

Gli isolati BAR20, BAR6, BAR23 e BAR14 identificati come *P. lini*, pur essendo nello stesso cluster della specie, sembrano avere una maggiore affinità con specie non identificate del genere *Pseudomonas*. Ciò potrebbe essere spiegato con l'elevata eterogeneità che caratterizza questo genere (Anzai et al., 2000) e con la possibilità che i ceppi appartengano a specie affini a *P. lini*, pur non trattandosi della stessa.

Il ceppo BAR77 clusterizza all'interno del gruppo dei *P. graminis* con un valore di bootstrap piuttosto elevato confermando l'appartenenza a questa specie. Inoltre, le specie di *P. graminis* presenti all'interno dell'albero e con il quale l'isolato presenta la maggiore similarità sono tutti derivanti da campioni di suolo. Nel caso di *P. graminis* HQ327116, questi deriva da campioni di neve prelevati sull'altopiano Tibetano (Zhao e Ma, 2010) confermando la presenza della specie anche in altri ambienti freddi oltre alle regioni antartiche.

All'interno dello stesso cluster si trova il ceppo BAR22, il quale clusterizza con i membri della specie *P. monteilii* riportati nell'albero.

➤ Altri generi

E' stato costruito un albero filogenetico (fig.31) con 84 sequenze comprendenti tutti i generi e le specie presenti in numero minore all'interno degli isolati antartici. L'outgroup scelto è stato *Thermoproteus tenax*.

L'albero è suddiviso in due cluster principali che rispecchiano l'appartenenza dei vari generi ai differenti phyla presenti. Il primo cluster comprende tutti i generi appartenenti al phylum *Actinobacteria*: *Friedmaniella*, *Auraticoccus*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Kocuria*, *Frondihabitans*, *Agrococcus*, *Microbacterium* e *Marisediminicola*.

I ceppi BA29, BAR29, BA34 e BA1 si trovano all'interno del gruppo dei *Microbacterium* genere a cui sono stati affiliati. Nel gruppo è collocato anche l'isolato BAR44, identificato come *Microbacterium paraoxydans*, il quale pur clusterizzando con questo genere si trova su un ramo più esterno rispetto agli altri isolati e specie.

La presenza di *Microbacterium* in Antartide è stata ampiamente documentata da numerosi studi di recente pubblicazione (Reddy et al., 2000; Trappen et al., 2002; Shivaji et al., 2004; Ferreras et al. 2014).

Gli isolati BAR62, BAR58, BAR59, BAR65, BAR69, appartenenti al genere *Agrococcus* clusterizzano tutti all'interno dello stesso raggruppamento insieme alle specie presenti in banca dati con le quali presentano i più alti valori di similarità.

All'interno del gruppo *Fron dihabitans* si collocano i ceppi BAR41 e BAR42.

Il genere *Fron dihabitans* nel 2009 è stato attribuito alla famiglia delle *Microbacteriaceae*, phylum *Actinobacteria*, da Greene e collaboratori per sostituire l'illegittimo nome *Fron dicola* introdotto da Zhang et al. nel 2007. Quest'ultimo era già usato per classificare un genere fungino da Hyde e Sutton nel 1992.

Anche se di recente scoperta, differenti specie appartenenti al genere *Fron dihabitans* sono state identificate in Antartide (Vasileva-Tonkova et al., 2014; Lee et al., 2014) confermando la presenza di questo genere in ambienti freddi.

All'interno del cluster degli *Actinobacteria* si trovano anche gli isolati BA37 e BA38, riconducibili al genere *Marisediminicola*. Essi clusterizzano in un gruppo a se con i rappresentanti di questo genere. I valori di bootstrap sono superiori a 50 lasciando supporre che la loro affiliazione sia piuttosto certa. Inoltre il gruppo dei *Fron dihabitans* e dei *Marisediminicola* formano a loro volta un gruppo a se all'interno del cluster principale. Questo è spiegato dall'appartenenza alla stessa famiglia, *Microbacteriaceae*, e quindi una vicinanza filogenetica maggiore rispetto agli altri generi dello stesso phylum.

BAR73 clusterizza all'interno del gruppo *Kocuria rhizophila* pur trovandosi su un ramo esterno e piuttosto lungo.

All'interno del gruppo delle *Dietzia maris* si trova il ceppo BA24. I membri appartenenti a questo genere sono principalmente isolati da ambienti marini e suoli costieri (Rainey et al., 1995; Colquhoun et al., 1998; Duckworth et al., 1998; Sutcliffe, 2000). Il genere *Dietzia* accoglie organismi che precedentemente erano classificati come *Rhodococcus maris* (Rainey et al., 1995). La stretta correlazione filogenetica esistente tra i due generi è evidente anche dalla distribuzione dei due all'interno dell'albero. Infatti, *Dietzia* e *Rhodococcus* clusterizzano in un gruppo a se all'interno del cluster più generale.

Al gruppo dei *Rhodococcus* appartengono i ceppi BAR56, BAR50, BAR71, BAR33, anche se quest'ultimo si trova su un ramo più esterno e alquanto lungo.

BAR67, identificato come *Auraticoccus monumenti*, clusterizza con le stesse specie presenti in banca dati ma su un ramo esterno. Le specie con le quali il ceppo presenta una maggiore similarità non

derivano né dall'Antartide né da altri ambienti freddi lasciando ipotizzare che il ceppo BAR67 possa presentare delle differenze genetiche date dalla necessità di adattarsi ad un ambiente tanto asperissimo. *Auraticoccus* insieme al genere *Friedmanniella* costituiscono un ulteriore sottogruppo all'interno del cluster degli *Actinobacteria* a conferma degli studi riportati in bibliografia da Vega e collaboratori (2011) che descrivono la vicinanza filogenetica dei due generi.

Il ceppo BAR31 clusterizza con i rappresentanti del genere *Friedmanniella* con un valore di bootstrap piuttosto alto indicando una sua chiara attribuzione.

Il secondo cluster all'interno dell'albero filogenetico è formato a sua volta da due importanti sottogruppi costituiti dagli appartenenti al phylum *Deinococcus-Thermus* e ai phyla *Firmicutes* e *Proteobacteria*.

All'interno del primo gruppo si trova il ceppo BAR13 il quale clusterizza con i membri del genere *Deinococcus*, ma su un ramo esterno piuttosto lungo. Il gruppo dei *Deinococcus* comprende numerose specie con caratteristiche biochimiche, fisiologiche e fenotipiche molto differenti (Garrity e Holt, 2001). All'interno di questo genere si trovano specie che hanno un'alta resistenza alle radiazioni ionizzanti, alle radiazioni ultraviolette, ad agenti ossidanti e alle condizioni di disseccamento (Cox e Battista, 2005; Garrity e Holt 2001, Omelchenko et al., 2005). Numerose specie di *Deinococcus* sono state isolate da ambienti antartici (José et al., 2003; Hirsch et al., 2004; Aislabie et al., 2008).

Gli isolati BA40, BAR3, BA41, BAR35 e BAR39 clusterizzano all'interno del gruppo dei *Bacillus*. In particolare, BA40, BAR35 e BAR39, i quali hanno una maggiore affiliazione con sequenze depositate come uncultured bacterium, si trovano su un ramo esterno e piuttosto lungo, formando un proprio sottogruppo. Ciò potrebbe essere spiegato con una possibile vicinanza filogenetica fra i tre isolati e il genere *Bacillus* se confrontati con agli altri, ma non sufficiente a descriverli come appartenenti a questo genere. Questa loro distribuzione potrebbe far ipotizzare anche una possibile appartenenza ad una specie e/o genere completamente nuovo.

All'interno del sottogruppo dei *Bacillus* si trova anche il cluster del genere *Sporosarcina* al quale è affiliato l'isolato BAR1.

Il genere *Sporosarcina* appartiene alla famiglia delle Bacillaceae e originariamente comprendeva solo due specie: *S. ureae* e *S. halophila* (Claus, et al., 1983; Claus e Fahmy, 1936). Successivamente, tre specie del genere *Bacillus* furono riassegnate e inserite in questo gruppo (Yoon et al., 1984; Ash et al., 1991; Janarthine e Eganathan, 2012). Ciò spiega l'evidente vicinanza filogenetica che si osserva all'interno dell'albero tra i due differenti generi.

All'interno di un sottogruppo più esterno, costituito dai rappresentanti del phylum *Proteobacteria*, si trovano gli isolati BAR7 e BAR48 che clusterizzano nel gruppo *Brevundimonas* con un valore di bootstrap piuttosto alto favorendo così un'attribuzione chiara.

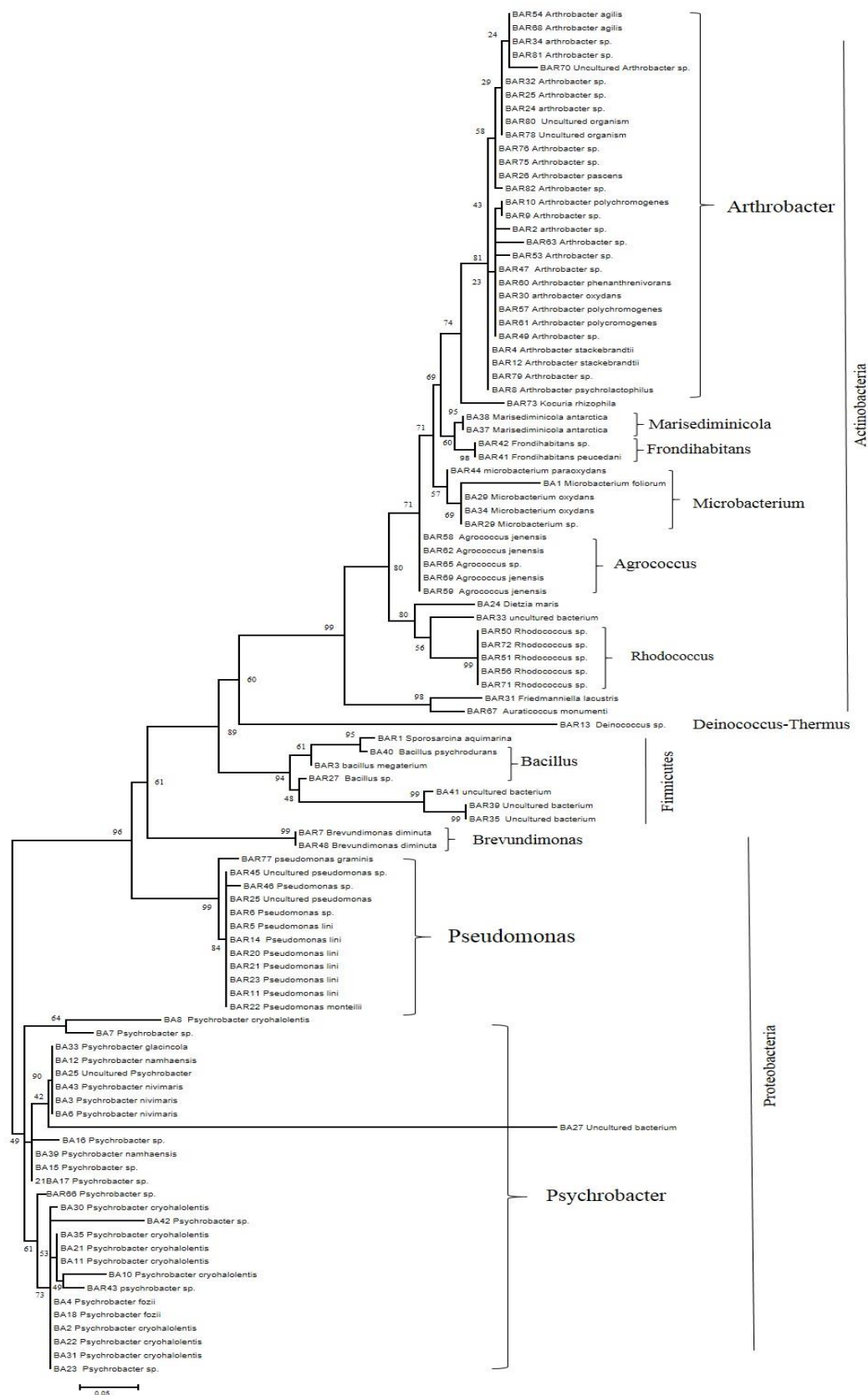


Fig.27. Filogenesi molecolare degli isolati antartici basata sulle sequenze del gene 16S rDNA. L'albero è stato costruito con il criterio Maximum Likelihood e i valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati.

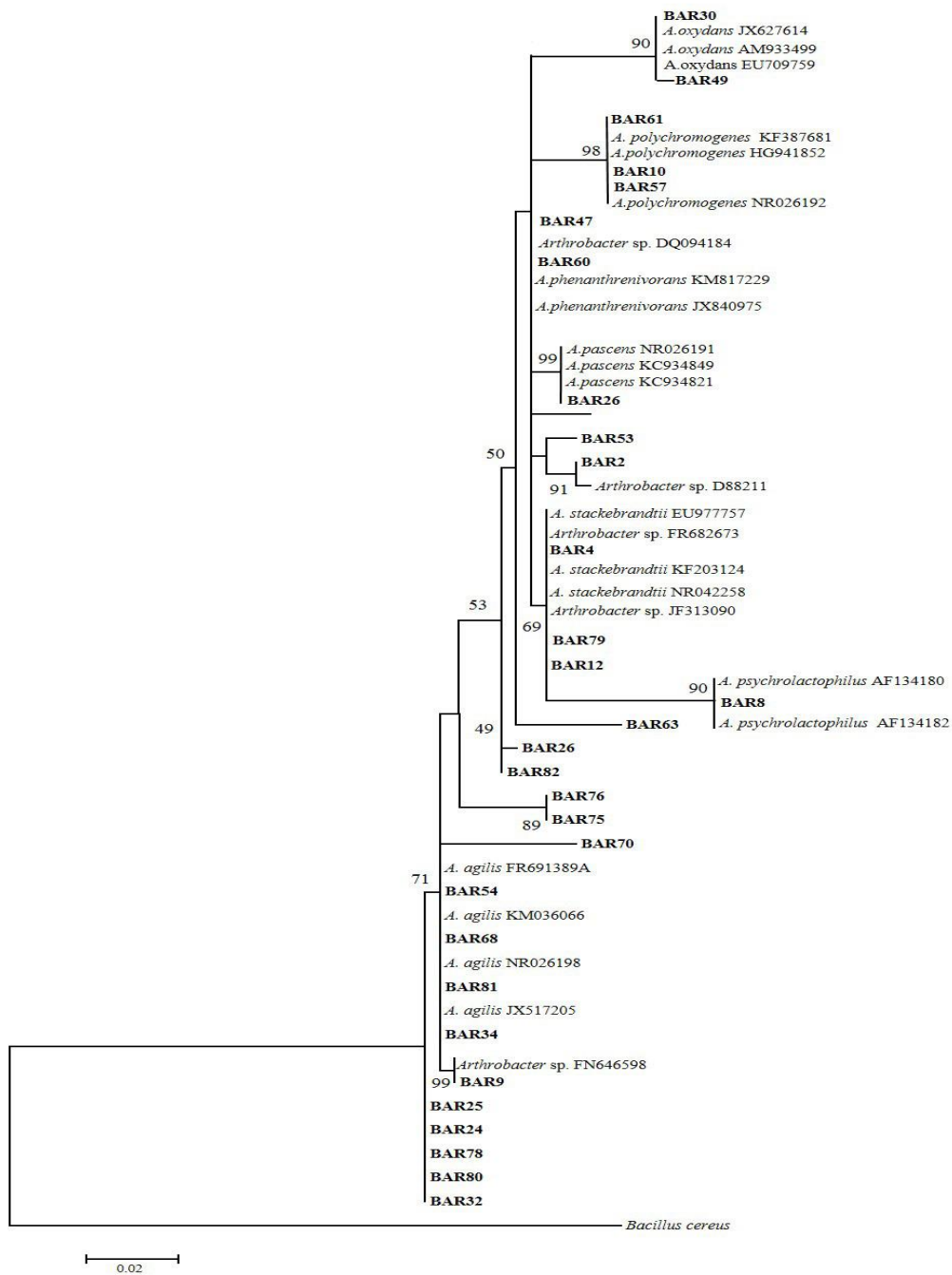


Fig.28. Albero filogenetico costruito con le sequenze del genere *Arthrobacter* isolate e le sequenze con maggiore similarità presenti in banca dati NCBI-BLAST. L'albero era costruito con il criterio Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati I valori di bootstrap inferiori a 50 non sono riportati. L'outgroup scelto apparteneva al phylum *Firmicutes* (*Bacillus cereus*).

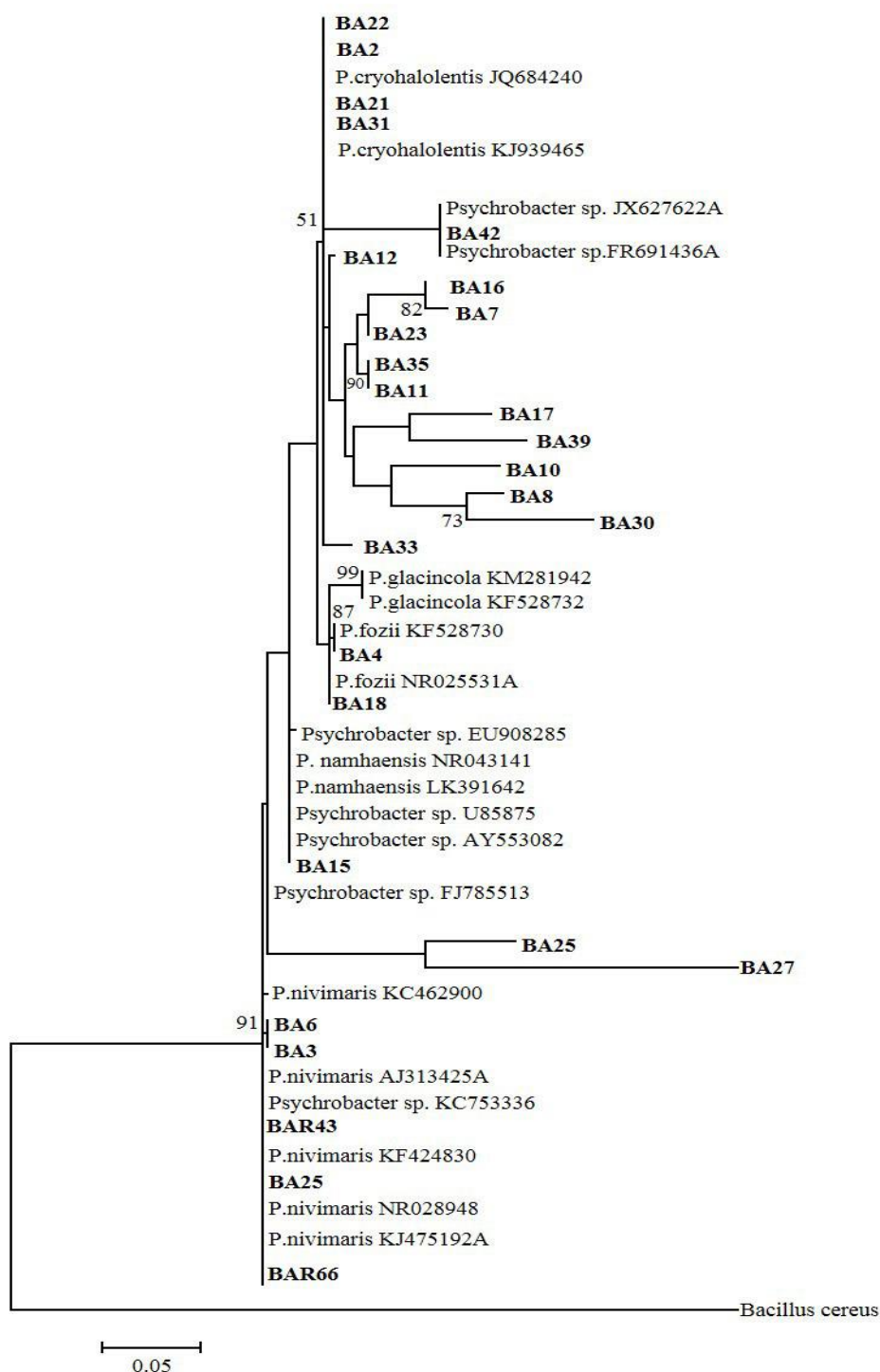


Fig.29. Albero filogenetico costruito con le sequenze del genere *Psychrobacter* degli isolati antartici e le sequenze con maggiore similarità presenti in banca dati NCBI-BLAST. L'albero era costruito con il criterio Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati e risultati inferiori a 50 non sono riportati. L'outgroup scelto apparteneva al phylum *Firmicutes* (*Bacillus cereus*).

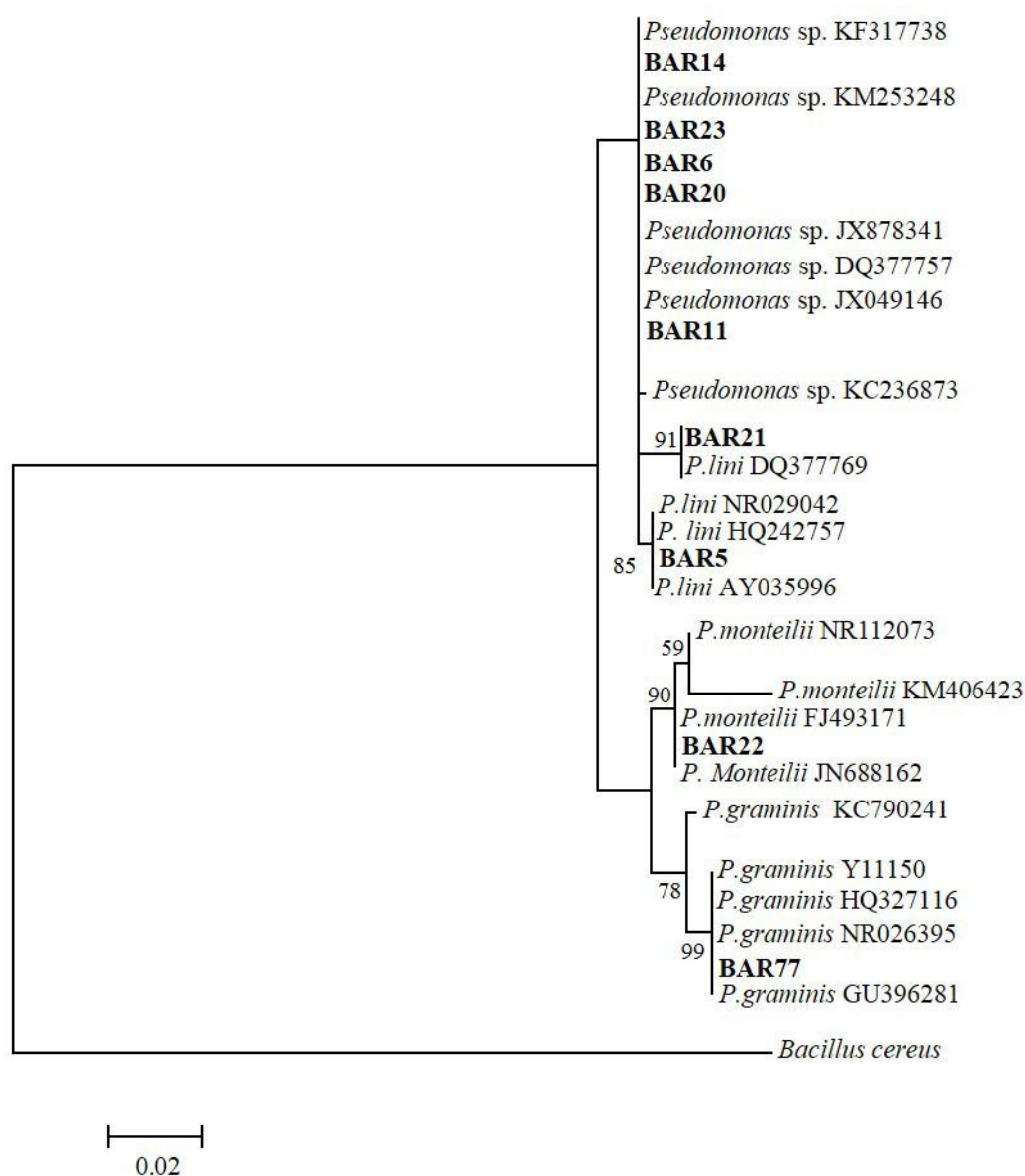


Fig. 30. Albero filogenetico costruito con le sequenze del genere *Pseudomonas* degli isolati antartici e le sequenze con maggiore similarità presenti in banca dati NCBI-BLAST. L'albero era costruito con il criterio Maximum Likelihood. Il bootstrap è stato calcolato su 1000 pseudoreplicati e i valori inferiori a 50 non sono riportati. L'outgroup scelto apparteneva al phylum *Firmicutes* (*Bacillus cereus*).

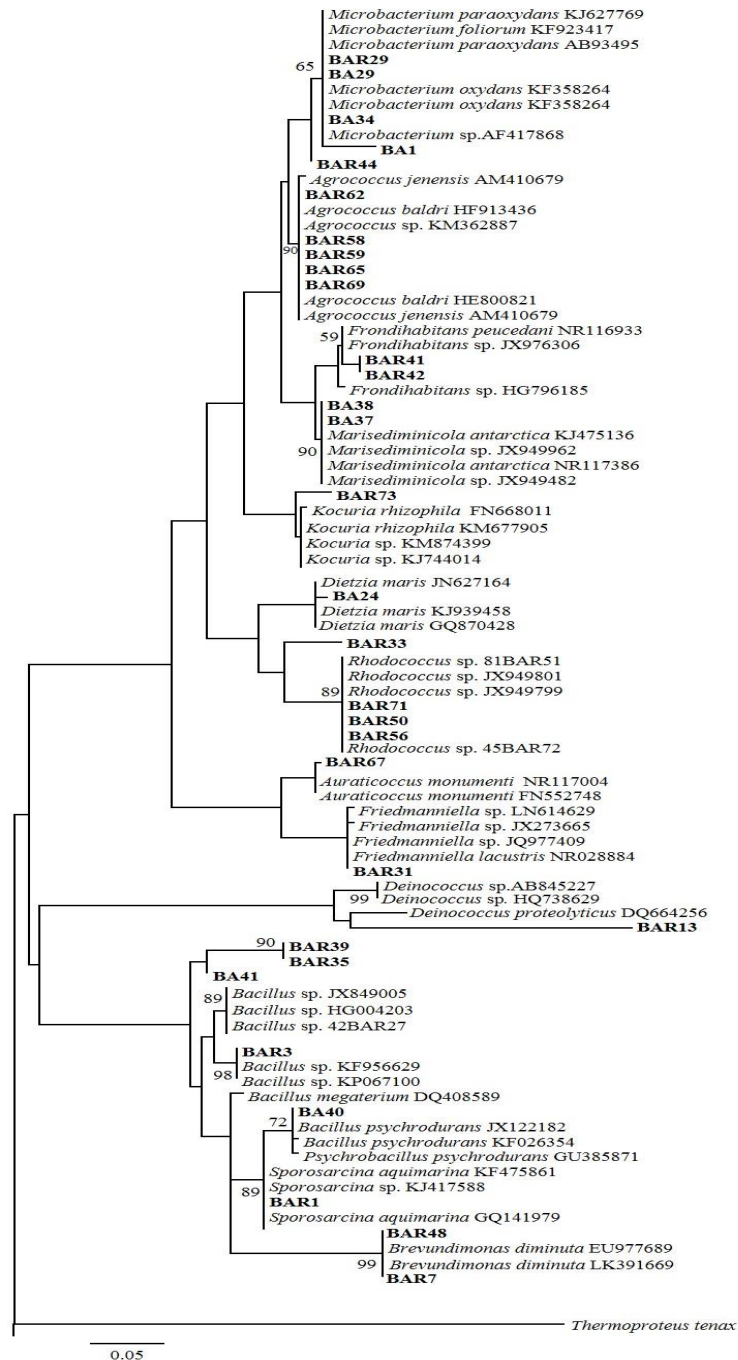


Fig. 31. Albero filogenetico costruito con le sequenze degli isolati appartenenti a generi minoritari e le sequenze con maggiore similarità presenti in banca dati NCBI-BLAST. L'albero era costruito con il criterio Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati. I valori inferiori a 50 non sono riportati. L'outgroup scelto era *Thermoproteus tenax*.

4.1.4 Determinazione dell'optimum e del range di crescita a differenti temperature

Nelle tabelle 10 e 11 (pag. 105) sono riportati gli intervalli di crescita e gli *optima* di temperatura dei ceppi isolati. Inoltre, per i ceppi identificati a livello di specie, è riportato un confronto con le stesse presenti in bibliografia così da permettere una comparazione.

Molti dei ceppi BA, circa l'88%, erano in grado di crescere in un ampio intervallo di temperatura e solo per il restante 12% (BA10, BA21, BA31, BA39) la crescita si arrestava a temperature superiori ai 35°C. L'84% degli isolati aveva un *optimum* di crescita compreso fra 15 e 25 °C. Per tre ceppi la massima crescita si aveva a temperature superiori: BA30 e BA33 a 30°C, BA41 a 35°C.

Per il ceppo BA15, *Psychrobacter* sp., la temperatura ottimale di crescita risultava essere 5°C e per BA 27 (Uncultured bacterium) e BA39 (*Psychrobacter namhaensis*) l'*optimum* era a 10°C.

Tutti i ceppi BAR crescevano in un ampio intervallo di temperatura e il 78% di essi aveva un *optimum* tra 20 e 25°C. Per un solo ceppo, BAR3 (*Bacillus megaterium*) la massima crescita si registrava a 30°C, mentre i restanti isolati avevano l'*optimum* a 15°C. Le figure 32 e 33 mostrano i profili di crescita dei ceppi BA e BAR.

Per decenni la microbiologia generale ha classificato e raggruppato i microrganismi sulla base delle loro temperature cardinali. Tra questi gruppi, i batteri che vivono in ambienti freddi sono solitamente indicati o come psicrofili facoltativi o psicrofili (Morita, 1975; Wiegel, 1990). Le più tradizionali definizioni non risultano però soddisfacenti per descrivere l'enorme variabilità microbica oggi osservata e come riportato in numerosi studi la semplice considerazione delle temperature di crescita minime, ottimali e massime non può non essere sufficiente per classificare come psicrofili o mesofili i ceppi studiati (Rouf e Rigney, 1971). Le più tradizionali definizioni introdotte da Morita nel 1975 descrivono come *psicrofili* tutti quei microrganismi che hanno un *optimum* a 15°C e la temperatura minima di crescita è 0°C o al di sotto. I microrganismi che sono in grado di crescere a 0°C, ma hanno una temperatura ottimale di crescita sopra i 20°C (l'*optimum* non veniva menzionato) erano definiti *psicrotrofi* (Morita, 1975; Dalluge et al., 1997) anche se oggi questo termine è stato sostituito dal più recente *psicrotollerante* (Rothschild e Mancinelli, 2001; Helmke e Weyland, 2004) . I microrganismi che hanno un intervallo di crescita compreso tra 10-50°C (Russell e Fukunaga, 1990; Wiegel, 1990) e un *optimum* generalmente tra 30 e 40°C sono definiti *mesofili*. Tuttavia, molti microrganismi, tra cui i funghi isolati da ambienti freddi mostrano un *optimum* riconducibile ai mesofili, ma hanno un range di crescita che può arrivare anche a 0°C; per questo essi possono essere definiti *mesofili-psicrotolleranti* (Zucconi et al., 1996; Helmke e Weyland, 2004).

Recentemente Pesciaroli e collaboratori (2012) hanno introdotto delle nuove definizioni per i batteri isolati da ambienti freddi attraverso la descrizione di profili di crescita e gli *optima* di ceppi isolati nella baia di Kandalaksha in Russia sul mar Bianco all'interno del Circolo Polare Artico. Nel lavoro si suggerisce di definire *psicrotolleranti* i batteri che crescono a 0°C e hanno l'*optimum* tra 15 e 25°C e *mesofili-psicrotolleranti* quelli che crescono a 0°C e la massima crescita è nel range di 25-40°C.

Molti microrganismi estremofili hanno adattamenti non comuni e non riflettono i tipici profili di crescita delle stesse specie isolate in ambienti dove la pressione selettiva non è altrettanto forte (Helmke e Weyland, 2004; Xiao e Zhang, 2014). Molto spesso queste definizioni sono obsolete e non sono sufficienti per descrivere in modo appropriato le caratteristiche di crescita di molti batteri soprattutto quelli isolati da ambienti non solo freddi, ma anche estremi come l'Antartide.

Nonostante i ceppi BA fossero stati isolati da ambienti estremamente freddi, quindi in grado di vivere a temperature più basse di quelle scelte per le prove, sembravano crescere meglio a temperature più moderate.

Riprendendo le definizioni di Pesciaroli et al. del 2012, 28 degli isolati BA erano psicrotolleranti, 3 isolati potevano essere classificati come psicrofili e 1 solo ceppo era mesofilo-psicrotollerante. Numerosi studi rivelano come gli psicrotolleranti siano prevalenti nelle acque fredde e possiedono un dominio incontrastato rispetto agli altri gruppi (Delille et al., 1992; Gosink et al., 1997; Helmke e Weyland, 2004). La presenza in Antartide di microrganismi psicrotolleranti, piuttosto che psicrofili, è abbondantemente documentata (Zucconi et al., 1996; Ray et al., 1999; Shivaji et al., 2005). Tra i BA tre ceppi, BA15, BA27, BA39, potrebbero essere classificati come psicrofili pur avendo la massima crescita a 5 e 10°C. Come scritto precedentemente, gli psicrofili hanno un *optimum* a 15°C per cui tali isolati non rientrerebbero in questa classificazione. Si potrebbe definirli *psicrofili stretti* evidenziando non solo la capacità di crescere a basse temperature, ma anche il loro pieno adattamento all'ambiente in cui vivono.

Benché più dell'80% della biosfera (in volume) è permanentemente al di sotto dei 5°C (Priscu et al., 2006) si conosce molto poco della fisiologia di adattamento al freddo dei microrganismi. Numerosi studi hanno rivelato come esista una rilevante attività metabolica a temperature ambientali inferiori a zero in ambienti come il permafrost antartico, campioni di neve e ghiaccio marino (Rivkina et al., 2000; Jakosky et al., 2006; Junge et al., 2004; Panikov et al., 2006). Ciò ad ulteriore conferma che le classificazioni che fino ad ora sono state introdotte, in cui non si menzionano microrganismi che hanno *optimum* di crescita al di sotto dei 15°C, potrebbero non essere sufficientemente risolutive per tutti i microrganismi in particolar modo per coloro che si sono perfettamente adattati a vivere in ambienti definiti estremi.

Un aspetto particolarmente interessante è la conoscenza dell'intervallo di crescita di questi microrganismi e non solo il loro *optimum*. Un ampio range di crescita (ceppi euritermi) rende l'organismo più versatile e con una maggiore capacità di adattamento ai cambiamenti ambientali. Inoltre, consente all'organismo di utilizzare più nicchie ecologiche (Wiegel, 1990; Mieczan et al., 2013).

La maggior parte dei ceppi BA presentano delle curve di crescita caratterizzate da andamenti asimmetrici in cui la pendenza oltre il punto di *optimum* è maggiore rispetto alla pendenza che lo precede. Un aumento di appena pochi gradi oltre la temperatura ottimale è spesso sufficiente per inibire o ridurre fortemente la crescita del ceppo. Invece, le temperature che precedono la crescita ottimale, favoriscono una graduale crescita del microrganismo e generalmente l'*optimum* risulta più pronunciato rispetto sia al più alto che al più basso dei valori limite. Per contro, alcuni ceppi (BA35, BA1, BA39, BA21) presentano delle curve con andamento più simmetrico in cui l'*optimum* non risulta facilmente individuabile ad un primo sguardo indicando quindi come non sia presente una vera e propria temperatura ottimale di crescita, ma piuttosto un intervallo all'interno del quale il ceppo è in grado di crescere al meglio. Questa simmetria nella struttura della curva potrebbe indicare una risposta simile sia alle alte che alle basse temperature. Questo riflette il forte adattamento che molti microrganismi hanno sviluppato per vivere e sopravvivere in ambienti estremi come l'Antartide (Gorbushina, 2007; Xiao e Zhang, 2014).

Tra i ceppi BAR 22 sono psicotolleranti avendo un *optimum* compreso tra 15 e 25°C, crescono a 0°C, ma non a 45°C. Tra gli isolati dalle rocce fa eccezione un solo ceppo, BAR3 *Bacillus megaterium*, il quale invece, ha un optimum a 30°C e quindi può essere classificato come mesfilo-psicotollerante.

Molti microhabitat terrestri sono caratterizzati da microclimi che presentano elevate escursioni termiche e temperature che spesso sono superiori a quelle dell'aria (Boyd et al. 1966; Kerry, 1990; Vishniac, 1993). Le condizioni di instabilità che caratterizzano i microhabitat antartici fanno sì che questi siano prevalentemente colonizzati da organismi psicotolleranti piuttosto che psicrofili (Zucconi et al., 1996; Vasileva-Tonkova e Gesheva, 2007). Morita nel 1978 ha evidenziato come la stabilità della temperatura in ambienti freddi è fattore fondamentale per il tipo di microrganismo che andrà a colonizzarli e che gli psicrofili sono tipici principalmente degli ambienti freddi stabili. Ciò spiegherebbe la presenza di psicotolleranti nei campioni BAR piuttosto che psicrofili. La temperatura delle rocce è strettamente legata a quella dell'aria e alle radiazioni solari (Nienow e Friedmann, 1993). Durante il periodo invernale quando la luce solare è assente, le temperature delle superfici rocciose sono in media 1-2°C inferiori alla temperatura dell'aria, mentre in estate le temperature aumentano raggiungendo valori al di sopra della temperatura ambientale. Inoltre, le

variazioni di temperatura sono fortemente legate anche ad altri fattori quali la posizione della roccia, l'orientamento, l'altitudine, la permanenza della copertura nevosa.

Anche per i ceppi BAR si ha un ampio intervallo di crescita caratterizzato da curve asimmetriche in cui un aumento di appena pochi gradi oltre la temperatura ottimale è spesso sufficiente per ridurre fortemente la crescita del ceppo, mentre le temperature che precedono la crescita ottimale, favoriscono un graduale sviluppo del microrganismo. Gli psicotolleranti sembrano essere caratterizzati da ampi intervalli di temperatura nei profili delle curve di crescita riflettendo in questo modo la loro adattabilità ai repentini cambiamenti climatici (Zucconi et al., 1996; Juck, 2000). Ciò li differenzia dagli psicrofili che comunemente non crescono in un ampio intervallo di temperatura ma, rispondono alle escursioni termiche attraverso una fase di dormienza che termina quando le condizioni ritornano favorevoli per la loro sopravvivenza (Zucconi et al., 1996).

Confrontando le curve di crescita di tutti i ceppi del genere *Psychrobacter*, sia BA che BAR, ci si aspetterebbe sia optimum che curve di crescita dall'andamento simile. Invece come si può notare ogni isolato è caratterizzato da un andamento della curva distintivo che non permette né di descrivere un profilo comune per tutti i rappresentanti del genere né di individuare elementi comuni sulla base del sito di provenienza, marini da un lato e litici dall'altro. Nonostante la maggior parte dei ceppi di *Psychrobacter* derivi dall'ambiente marino e solo il ceppo BAR43 sia di origine rocciosa, non è possibile descrivere un optimum comune a tutti i rappresentanti del genere e anche le loro curve di crescita presentano notevoli differenze sia nell'andamento sia nelle dimensioni raggiunte dalle colonie. Un discorso simile può essere sostenuto anche per il genere *Arthrobacter*, il quale pur avendo rappresentanti solo tra i ceppi BAR, è caratterizzato da isolati che presentano tutti, fatta eccezione per il solo ceppo BAR30, un optimum a 20 °C. Osservando però le loro curve di crescita si nota come ognuna presenti un andamento caratteristico che in alcuni casi risulta essere piuttosto marcato. Queste osservazioni, probabilmente descrivono l'esistenza di un'adattabilità analoga alla temperatura da parte degli *Arthrobacter* litici da noi studiati, ma sottolinea come ogni isolato arrivi al medesimo risultato seguendo percorsi e vie differenti dovute principalmente all'ambiente in cui essi si trovano a vivere. Per cui gli isolati che derivano sia da differenti tipologie di roccia, sia da siti con caratteristiche di altitudine, posizione, orientamento, copertura nevosa molto diversi potranno avere lo stesso adattamento a quelle specifiche condizioni, ma potrebbero esserci arrivati seguendo percorsi differenti. Un'ulteriore esempio sono i ceppi di *Brevundimonas diminuta*, BAR37 e BAR48, i quali a differenza di quanto descritto sopra oltre a presentare uno stesso valore di optimum, sono caratterizzati anche da curve di crescita molto simili. Ciò probabilmente deriva dal fatto che entrambi pur non derivando dalla stessa roccia sono stati campionati nello stesso sito. In

questo caso il percorso di adattamento sembra aver seguito la stessa linea facendo sì che entrambi i ceppi presentino profili pressochè identici.

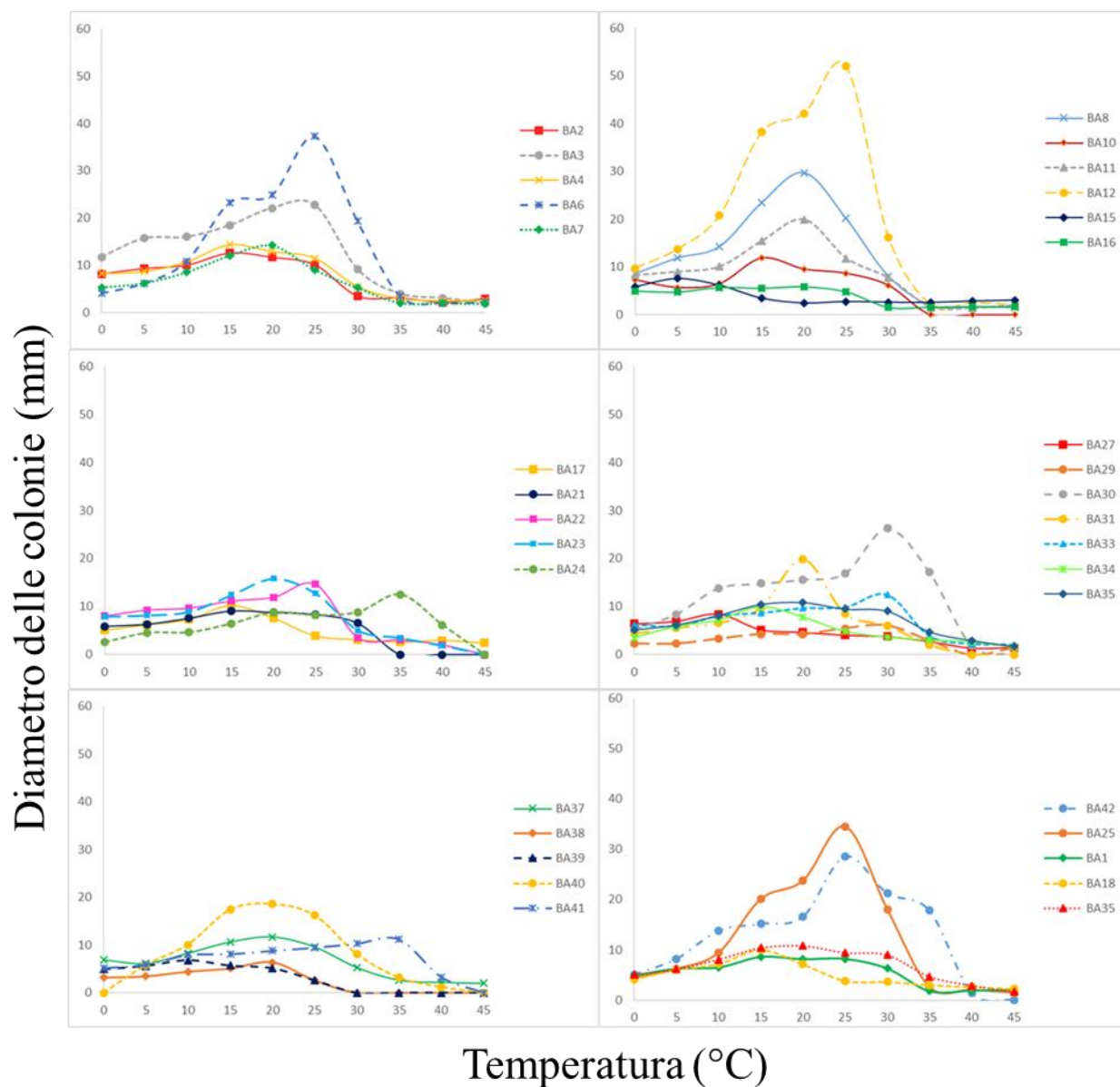


Fig.32. Curve di crescita a differenti temperature dei ceppi BA coltivati su terreno PCA in un intervallo di temperatura 0-45°C. La crescita era determinata come valore medio di duplicati e misurando l'incremento del diametro ogni 24 ore per 30 giorni. La deviazione standard era inferiore a 0.6 mm.

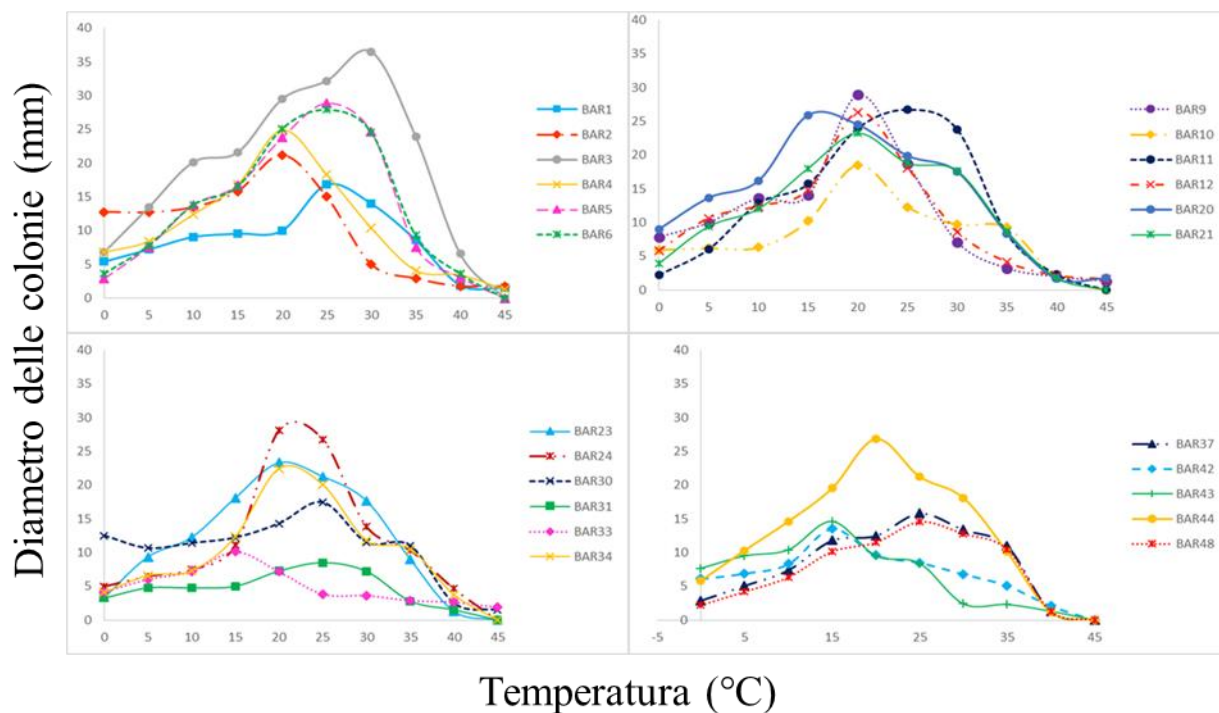


Fig.33. Curve di crescita a differenti temperature dei ceppi BAR coltivati su terreno PCA in un intervallo di temperatura 0-45°C. La crescita era determinata come valore medio di duplicati e misurando l'incremento del diametro ogni 24 ore per 30 giorni. La deviazione standard era inferiore a 0.6 mm.

4.1.5 Determinazione dell'optimum e del range di crescita a differenti concentrazioni saline

Gli ambienti estremi freddi presentano situazioni di scarsa disponibilità di acqua allo stato liquido, necessaria al metabolismo cellulare (Grant, 2004). Gli organismi capaci di crescere tollerando condizioni di aridità vengono definiti *xerotolleranti* e coloro che prediligono condizioni di aridità *xerofili*.

I microrganismi possono essere classificati in base alla loro risposta alla salinità in: *non-alofili*, *alotolleranti* e *alofili*. I non-alofili, richiedono un'elevata disponibilità d'acqua ed una concentrazione di soluti molto bassa. L'*optimum* di crescita per questi batteri prevede una salinità inferiore all'10% (Dehò e Galli, 2012).

Gli alotolleranti sono organismi capaci di sopportare concentrazioni saline più elevate e il loro *optimum* di crescita è compreso tra 10 e il 20% (Dehò e Galli, 2012).

Gli alofili, sono organismi che necessitano di elevate concentrazioni di soluti e sono comunemente distinti in: *alofili deboli*, che presentano l'*optimum* di crescita a concentrazioni saline comprese tra il 20 e il 50%, *alofili moderati* con *optimum* tra il 50 e il 200% e gli *alofili estremi* con *optimum* superiore a 200% (Marquez et al., 1987; Oren, 2000). Come per la temperatura le definizioni che cercano di catalogare i microrganismi in base alla loro tolleranza alla salinità sono piuttosto limitate e riescono a descrivere con difficoltà la reale situazione che li caratterizza, soprattutto quelli isolati da ambienti estremi. Questo sottolinea ulteriormente la necessità di modificare e allargare le definizioni oggi in vigore.

In figura 34 e 35 sono riportati gli *optimum* e gli intervalli di crescita a differenti concentrazioni saline (NaCl) dei ceppi BA e BAR rispettivamente.

Il 69% degli isolati BA non tolleravano alte concentrazioni saline; il 35% era non alofilo con *optimum* a 0 g/L di NaCl e il 34% era classificabile come alotollerante avendo la massima crescita a 20 g/L. Il 31% dei ceppi erano alofili deboli avendo l'*optimum* a 30 g/L.

Il mare di Ross è un mare interno, per più della sua metà è coperto da una spessa coltre di ghiaccio e solo forti tempeste scostano i ghiacci e permettono la formazione di vaste superfici di acque libere (Long, 2010). Ciò fa sì che la salinità media delle acque non raggiunga mai valori troppo elevati tipici di mari interni come il Mediterraneo. Le acque costiere dell'Antartide presentano un'evaporazione molto bassa e una bassa salinità superficiale. Il ghiaccio è composto da acqua praticamente pura e pertanto solo le acque marine al di sotto della banchisa risultano maggiormente ricche di sali e più dense (Stichel et al., 2012).

Inoltre, il parziale scongelamento della banchisa ai margini della costa durante le estati australi determina un apporto di acque dolci che ulteriormente mantiene la salinità a livelli bassi (Jacobs et al., 1996; Østerhus e Darelus, 2013).

Questo potrebbe rappresentare una spiegazione all'isolamento di batteri principalmente alotolleranti piuttosto che non alofili.

Alcuni ceppi presentano delle curve di crescita asimmetriche, ma contrariamente a quanto osservato per la temperatura, la pendenza della curva è maggiore verso le minori concentrazioni indicando una tolleranza più alta alle salinità maggiori. Inoltre gran parte dei BA è in grado di crescere sia a 0 g/L che a 100g/L di NaCl.

Ciò andrebbe ulteriormente a convalidare la tesi secondo cui i batteri antartici pur vivendo in ambienti sfavorevoli alla vita hanno sviluppato adattamenti alle condizioni estreme che non solo permettono loro di sopravvivere, ma proliferare là dove altri organismi soccomberebbero (Vincent, 2000; Le Romancer et al., 2008).

Il 65% degli isolati BAR è non alofilo con un optimum a 0g/L di NaCl, il 26% è rappresentato da alofili deboli e solo due ceppi, BAR24 *Arthrobacter* sp. e BAR42 *Fronidhabitans* sp. sono alotolleranti. Inoltre, il 61% degli isolati cresce sia alla massima concentrazione di sale (100g/L), sia in totale assenza.

Le Valli Secche rappresentano i più freddi ed aridi deserti presenti sulla Terra caratterizzati da condizioni ambientali asperime. Le temperature estremamente basse, le scarse precipitazioni, la bassa umidità, i venti catabatici, i forti gradienti chimico-fisici che si stabiliscono negli habitat terrestri ed il basso contenuto di materia organica impongono le maggiori limitazioni per la sopravvivenza e la crescita microbica (Wynn-Williams e Edwards, 2000).

Per le comunità endolitiche l'unica risorsa d'acqua è lo scioglimento della neve accumulatasi sulla superficie della roccia che una volta entrata in essa può essere trattenuta anche per tempi relativamente lunghi, a causa sia del basso potenziale di evaporazione esistente nelle Valli Secche sia per la crosta superficiale che rallenta gli scambi gassosi (Friedman, 1978; Friedman e Weed, 1987; Friedman et al., 1988).

Molti batteri endolitici isolati non hanno un *optimum* di crescita ad alte concentrazioni saline e questo potrebbe essere spiegato dal fatto che le rocce una volta bagnate sono in grado di trattenere un sufficiente grado di umidità all'interno della sua struttura e non favorire l'accumularsi di alte concentrazioni di soluti.

Ciò nonostante, i BAR crescono anche a concentrazioni di NaCl relativamente alte, 100 g/L e questo potrebbe descrivere l'adattamento a repentini cambiamenti climatici e alla possibilità di un aumento

di concentrazione di soluti all'interno del loro habitat litico a causa di lunghi periodi di gelo in cui l'acqua non è disponibile.

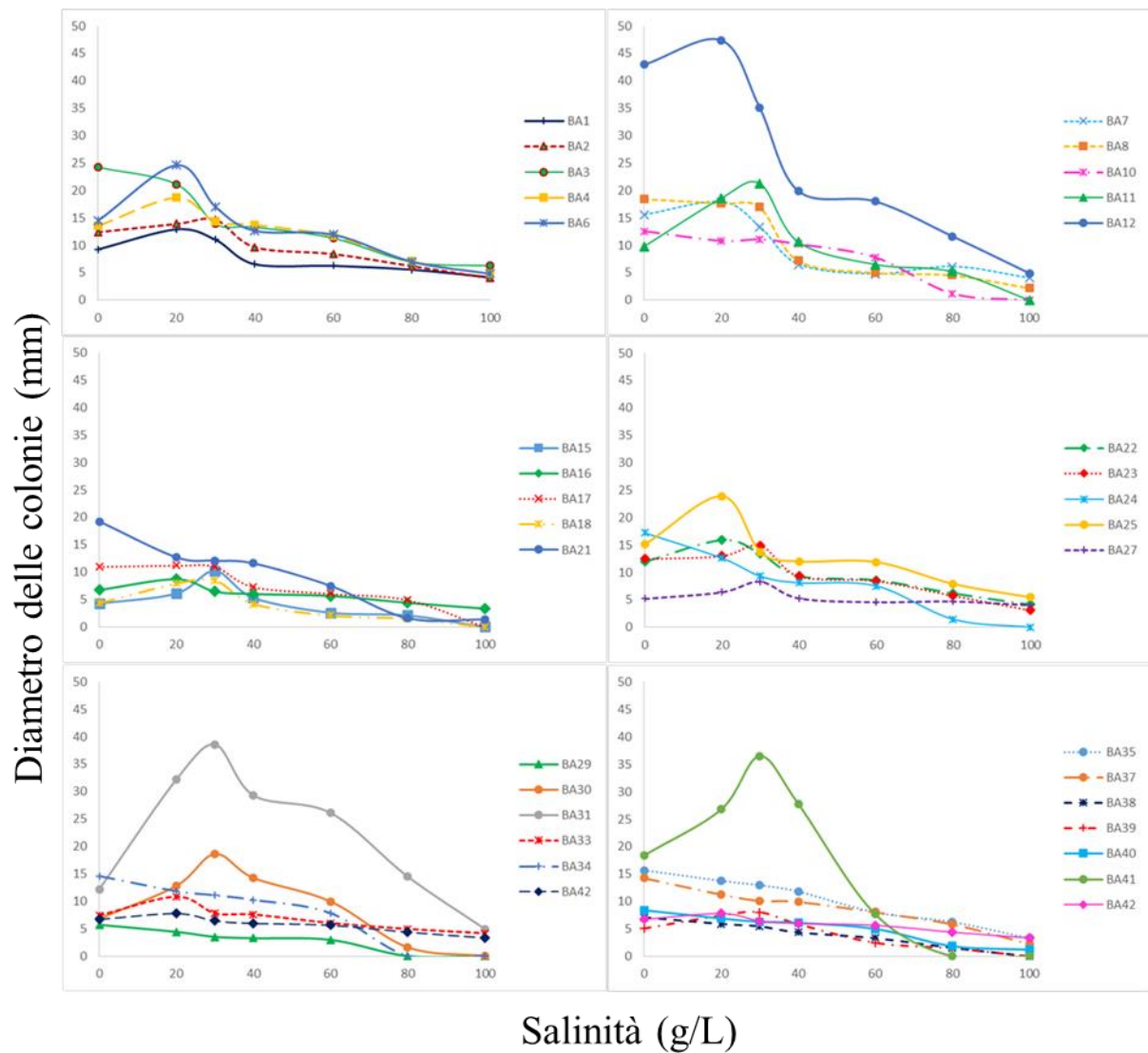


Fig.34. Curve di crescita a differenti concentrazioni saline (NaCl) dei ceppi BA coltivati su terreno PCA in un intervallo di salinità di 0-100 g/L. La crescita era determinata come valore medio di due duplicati e misurando l'incremento del diametro ogni 24 ore per 30 giorni. La deviazione standard era inferiore a 0.6 mm.

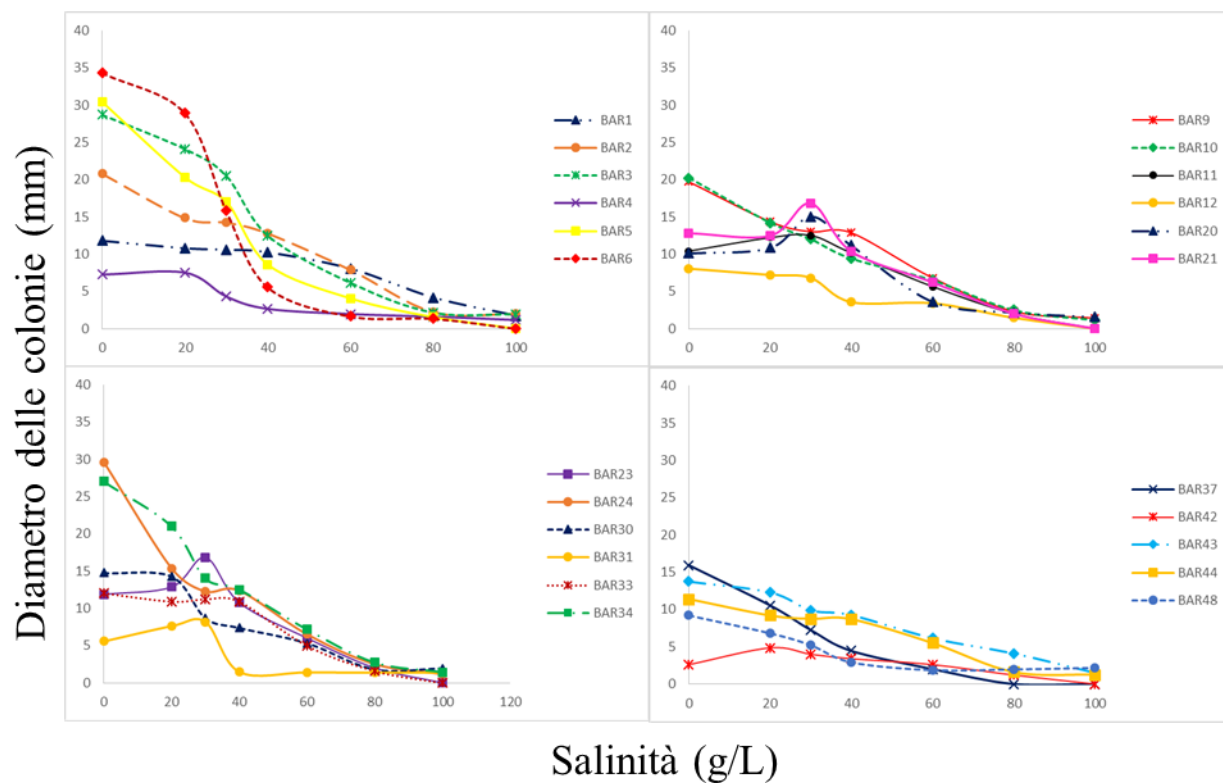


Fig.35. Curve di crescita a differenti concentrazioni saline (NaCl) dei ceppi BAR coltivati su terreno PCA in un intervallo di salinità di 0-100 g/L. La crescita era determinata come valore medio di due duplicati e misurando l'incremento del diametro ogni 24 ore per 30 giorni. La deviazione standard era inferiore a 0.6 mm.

Tabella 10. Confronto dei range di crescita e degli *optimum* di temperatura e salinità tra i ceppi BA e specie affini riportate in letteratura.

ceppo	affiliazione	BA Range Optimum di temperatura °C	letteratura Range Optimum di temperatura °C	BA Range Optimum di salinità ‰	letteratura Range Optimum di salinità ‰	bibliografia
BA1	<i>Microbacterium foliorum</i>	0-45 (15)	0-42 (25))	0-100 (20)	N.D (20)	Behrendt et al.,2011
BA2	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0-45 (15)	-10-30 (22)	0-100 (30)	0-100 (0)	Bakermans et al.,2006
BA3	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	0-45 (25)	5-35 (10-15)	0-100 (0)	0-130 (0-90)	Heuchert et al.,2004
BA4	<i>Psychrobacter fozii</i>	0-45 (15)	4-30 (N.D)	0-100 (20)	10-125 (N.D)	Bozal et al.,2003
BA6	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	0-45 (25)	5-35 (10-15)	0-100 (20)	0-130 (0-90)	Heuchert et al.,2004
BA7	<i>Psychrobacter</i> sp.	0-45 (20)		0-100 (20)		
BA8	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0-45 (20)	-10-30(22)	0-100 (30)	0-100 (0)	Bakermans et al.,2006
BA10	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0-30(15)	-10-30(22)	0-80(0)	0-100 (0)	Bakermans et al.,2006
BA11	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0-45(15)	-10-30(22)	0-80(30)	0-100 (0)	Bakermans et al.,2006
BA12	<i>Psychrobacter namhaensis</i>	0-45(25)	4-37 (N.D)	0-100 (20)	0-130 (20-30)	Yoon et al.,2005
BA15	<i>Psychrobacter</i> sp.	0-45(5)		0-80 (20)		
BA16	<i>Psychrobacter</i> sp.	0-45(20)		0-100 (20)		
BA17	<i>Psychrobacter namhaensis</i>	0-45(15)	4-37 (N.D)	0-80(20)	0-130 (20-30)	Yoon et al.,2005
BA18	<i>Psychrobacter fozii</i>	0-45(15)	4-30 (N.D)	0-80(30)	10-125 (N.D)	Bozal et al.,2003
BA21	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0-25(15)	-10-30(22)	0-100 (0)	0-100 (0)	Bakermans et al.,2006
BA22	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0-40(25)	-10-30(22)	0-100 (20)	0-100 (0)	Bakermans et al.,2006
BA23	<i>Psychrobacter</i> sp.	0-40(20)		0-100 (0)		
BA24	<i>Dietzia maris</i>	0-40(20)	N.D	0-80(0)	N.D	Raney et al.,1995
BA25	Uncultured <i>Psychrobacter</i> sp.	0-45(25)		0-100 (20)		
BA27	Uncultured bacterium	0-45(10)		0-100 (30)		
BA29	<i>Microbacterium oxydans</i>	0-45(25)	20-37 (30)	0-80(0)	N.D	Schumann et al.,1999
BA30	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0-40(25)	-10-30(22)	0-80(30)	0-100 (0)	Bakermans et al.,2006
BA31	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0-35(20)	-10-30(22)	0-100 (30)	0-100 (0)	Bakermans et al.,2006
BA33	<i>Psychrobacter glacincola</i>	0-45(25)	-18-22 (13-15)	0-100 (20)	0-120 (N.D)	Bowman et al.,1997
BA34	<i>Microbacterium oxydans</i>	0-45(25)	20-37 (30)	0-60(0)	N.D	Schumann et al.,1999
BA35	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	0-45(20)	-10-30(22)	0-100 (0)	0-100 (0)	Bakermans et al.,2006
BA37	<i>Marisediminicola antarctica</i>	0-45(20)	0-26 (18-23)	0-100 (0)	0-60 (20-40)	Li et al.,2010
BA38	<i>Marisediminicola antarctica</i>	0-45(20)	0-26 (18-23)	0-80 (0)	0-60 (20-40)	Li et al.,2010
BA39	<i>Psychrobacter namhaensis</i>	0-25(10)	4-37 (N.D)	0-80 (30)	0-130 (20-30)	Yoon et al.,2005
BA40	<i>Bacillus psychrodurans</i>	0-40 (20)	2-40 (N.D)	0-100(0)	0-50 (30)	El-Rahman et al.,2002
BA41	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0-40(30)	0-40 (15)	0-60(30)	0-150 (N.D)	Schleifer et Kloos,1975
BA42	<i>Psychrobacter</i> sp.	0-40 (25)		0-100(20)		

Tabella. 11. Confronto dei range di crescita e degli *optimum* di temperatura e salinità tra i ceppi BAR e specie affini riportate in letteratura.

ceppo	affiliazione	BAR Range Optimum di temperatura °C	letteratura Range Optimum di temperatura °C	BAR Range Optimum di salinità ‰	letteratura Range Optimum di salinità ‰	bibliografia
BAR1	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	0-45 (25)	26-50 (32)	0-100(0)	20-90(N.D)	Janarthine et al.,2012
BAR2	<i>Arthrobacter</i> sp.	0-45 (20)		0-100(20)		
BAR3	<i>Bacillus megaterium</i>	0-40 (30)	N.D	0-100(0)	N.D	
BAR4	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	0-45(20)	4-30 (N.D)	0-100(20)	0-50 (N.D)	Tvrzova´ et al.,2005
BAR5	<i>Pseudomonas lini</i>	0-40(25)	4-36 (N.D)	0-80(0)	N.D	Delorme et al.,2002
BAR6	<i>Pseudomonas</i> sp.	0-40(25)		0-80(0)		
BAR9	<i>Arthrobacter</i> sp.	0-45 (20)		0-100(0)		
BAR10	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	0-45 (20)	N.D	0-100(20)	N.D	
BAR11	<i>Pseudomonas lini</i>	0-45 (25)	4-36 (N.D)	0-80(30)	N.D	Delorme et al.,2002
BAR12	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	0-45 (20)	4-30 (N.D)	0-80(0)	0-50 (N.D)	Tvrzova´ et al.,2005
BAR20	<i>Pseudomonas lini</i>	0-40 (15)	4-36 (N.D)	0-100(30)	N.D	Delorme et al.,2002
BAR21	<i>Pseudomonas lini</i>	0-40 (20)	4-36 (N.D)	0-80(30)	N.D	Delorme et al.,2003
BAR23	<i>Pseudomonas lini</i>	0-40 (20)	4-36 (N.D)	0-80(30)	N.D	Delorme et al.,2004
BAR24	<i>Arthrobacter</i> sp.	0-40 (20)		0-100(0)		
BAR30	<i>Arthrobacter oxydans</i>	0-45 (25)	N.D	0-100(0)	N.D	
BAR31	<i>Friedmanniella lacustris</i>	0-40 (25)	3-43,5 (26)	0-100(30)	0-60 (40)	Lawson et al.,2000
BAR33	Uncultured bacterium	0-40 (15)		0-80(0)		
BAR34	<i>Arthrobacter</i> sp.	0-40 (20)		0-100(0)		
BAR37	<i>Brevundimonas diminuta</i>	0-40 (25)	(35)	0-80(0)	N.D	Leifson et Hugh,1954
BAR42	<i>Frondihabitans</i> sp.	0-40 (15)		0-80(20)		
BAR43	<i>Psychrobacter</i> sp.	0-40 (15)		0-100(0)		
BAR44	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	0-40 (20)	20-40 (N.D)	0-100(0)	N.D	Laffineur et al.,2003
BAR48	<i>Brevundimonas diminuta</i>	0-40 (25)	(35)	0-60(0)	N.D	Leifson et Hugh,1954

4.2 Studio della comunità batterica mediante PCR-DGGE fingerprinting

Le relazioni esistenti tra i microrganismi ed alcune delle principali variabili ecologiche possono essere comprese mediante lo studio della biodiversità. A causa dell'immenso numero di microrganismi presenti sulla Terra e dell'ampio spettro di habitat che occupano, la variabilità che essi hanno è probabilmente più grande di qualsiasi altro gruppo di organismi (Morris et al., 2003; Selama et al., 2013).

Oggi la comunità scientifica ritiene che circa il 99% dei microrganismi presenti in natura, non può essere isolato in colture pure e ciò principalmente a causa della mancanza di conoscenza delle condizioni reali in cui i batteri crescono nel loro habitat naturale. Quindi, per comprendere meglio la diversità microbica e il ruolo che essa ha nel mantenimento dell'ecosistema, sono necessarie ulteriori tecniche che completano e complementano l'approccio delle tecniche colturali. Comprendere la biodiversità microbica è essenziale per capire la relazione tra i parametri ambientali e la funzione degli ecosistemi (Hugenholtz et al, 1998; Webster et al, 2000; Lewis et al., 2007).

Le Tecniche di Fingerprinting consentono un confronto diretto del DNA di comunità microbiche provenienti da diversi campioni e sono considerate strumenti importanti per valutare rapidamente i cambiamenti della struttura delle comunità nel tempo e nello spazio (Yannarell et al., 2003; Eiler e Bertilsson, 2007).

La strategia generale di queste tecniche prevede l'estrazione del DNA, l'amplificazione di un target molecolare e l'analisi dei prodotti di PCR. Il gene batterico comunemente utilizzato in questi studi è il 16S rDNA, il quale con le sue regioni altamente conservate e altre ipervariabili (Guttell et al., 1994; Van de Peer et al., 1996), rappresenta un mezzo utile per analizzare le relazioni filogenetiche tra gli organismi e comparare le loro sequenze genetiche.

Una tra le più comuni tecniche di fingerprinting molecolare è la DGGE *Denaturing gradient gel electrophoresis*, la quale si basa sull'elettroforesi di frammenti di DNA, comunemente la regione ipervariabile V3 del 16S rDNA, precedentemente amplificati mediante PCR, su un gel di poliacrilammide contenente un gradiente crescente di sostanze denaturanti, urea e formammide.

La DGGE, nonostante alcuni limiti risolutivi tipici di tutte le tecniche di fingerprinting molecolare, permette di ottenere una visione d'insieme della comunità batterica totale e utilizzando opportune strategie di amplificazione è possibile stimare la presenza di specifici gruppi all'interno della stessa comunità. Inoltre, attraverso l'excisione delle bande dal gel, la loro ri-amplificazione e sequenziamento è possibile risalire ai generi e in alcuni casi alle specie presenti nei campioni e

consentire ad esempio un'analisi filogenetica. Pertanto, l'applicazione di queste tecniche può essere utile per ottenere interessanti informazioni ecologiche sulle comunità microbiche ambientali (Muyzer e Smalla, 1998, Muyzer, 1999, Nicolaisen e Ramsing, 2002).

La DGGE fornisce informazioni qualitative e semi-quantitative sulla comunità studiata, permettendo di comprendere quali siano le specie più abbondanti, a cui corrisponderanno le bande più intense e quante specie siano presenti in funzione del numero di bande osservate. Nell'analizzare un gel di DGGE si assume in genere che ad ogni banda corrisponda una sola specie, anche se ciò non è necessariamente vero, in quanto bande diverse appartenenti a specie differenti potrebbero avere la stessa mobilità elettroforetica (Sekiguchi et al., 2001). Inoltre una stessa specie potrebbe essere rappresentata da più di una banda, dato che una specie può contenere più copie di un gene all'interno del genoma (Nübel et al., 1997; Sekiguchi et al., 2001). L'immagine che si ottiene della comunità generalmente descrive solo le sue componenti dominanti ma, ciò nonostante queste metodiche offrono un ottimo compromesso tra il numero dei campioni da analizzare e l'informazione ottenuta risultando fondamentali in situazioni in cui si conosce poco o nulla della comunità stessa.

In questo lavoro di tesi, le comunità microbiche presenti nei campioni marini e rocciosi sono state studiate attraverso l'utilizzo della tecnica molecolare di fingerprinting PCR-DGGE.

4.2.1 Studio della comunità batterica di campioni di acque marine

4.2.1.1 Analisi d'immagine del gel DGGE

Mediante la tecnica DGGE è stata condotta un'analisi delle comunità batteriche presenti in campioni marini provenienti da quattro differenti siti del mare di Ross e campionati in tre differenti tempi (fig. 36). Dopo l'estrazione del DNA genomico, sono state effettuate due reazioni di PCR per l'amplificazione del target genico scelto, la regione ipervariabile V3 del 16S rDNA, seguite dalla misurazione della concentrazione del DNA genomico e degli ampliconi (tab.12).

Tabella 12. Valori di concentrazione del DNA ottenuti mediante fluorimetro Qubit.

Codice	Campione	Genomico ng/μl	16S rDNA ng/μl	V3 ng/μl
A ₁	Faraglione 26/12/2010	0,77	9,34	38,40
B ₁	Santa Maria Novella 28/12/2010	1,04	60,60	>120
C ₁	Portofino 27/12/2010	0,87	87,00	>120
D ₁	T. Bay 15/12/2010 *	0,47	62,10	>120
A ₂	Faraglione 04/01/2011	0,91	11,90	57,00
B ₂	Santa Maria Novella 06/01/2011	1,67	11,40	45,00
C ₂	Portofino 06/01/2011	2,02	24,10	75,20
D ₂	T. Bay 20/12/2010 *	4,40	>120	>120
A ₃	Faraglione 25/01/2011	0,43	59,80	>120
B ₃	Santa Maria Novella 20/01/2011	0,94	11,50	61,20
C ₃	Portofino 20/01/2011	0,20	10,90	47,00
D ₃	T. Bay 20/01/2011	0,27	8,20	33,20

(*) campioni raccolti in presenza di ghiaccio

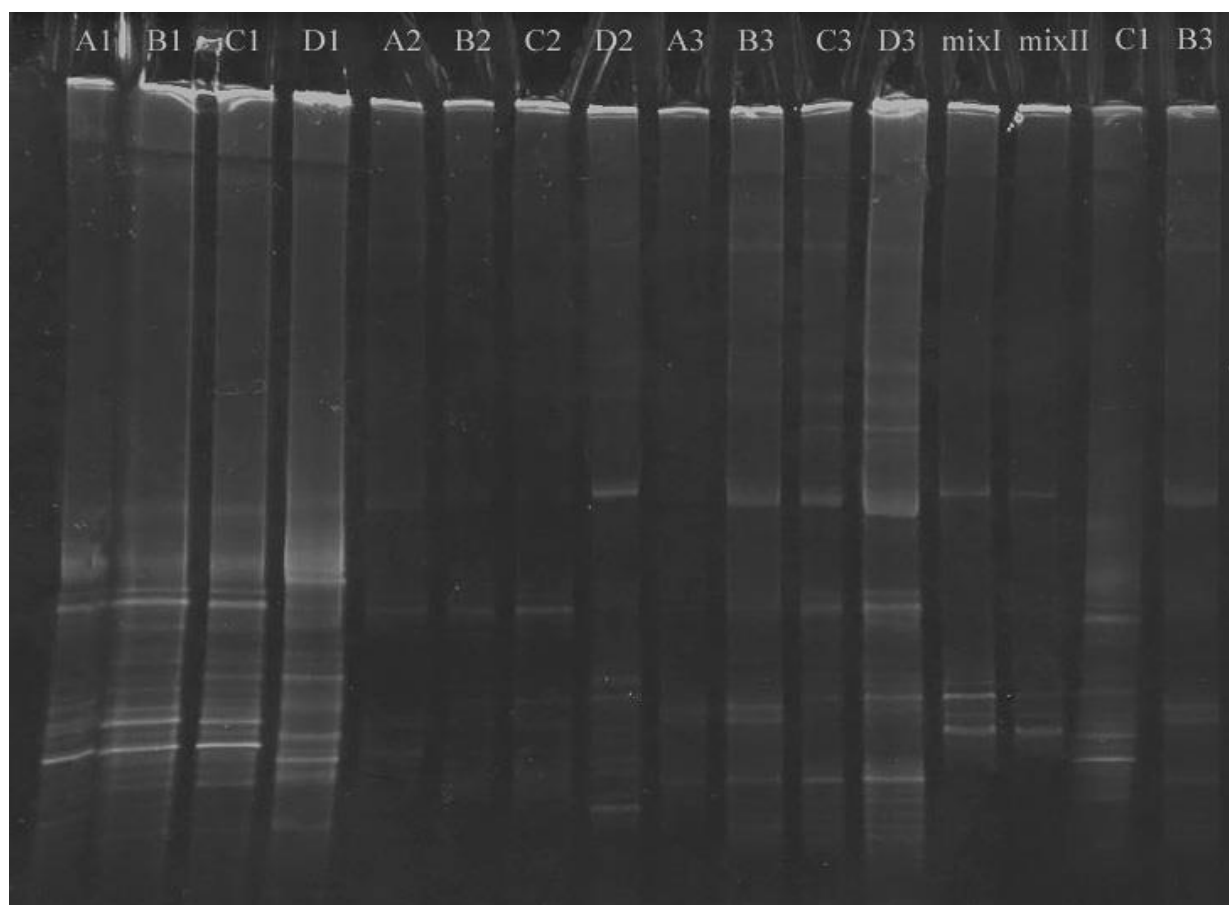


Fig. 36. Profilo di DGGE della biodiversità dei campioni marini (A=Faraglione, B=Santa Maria Novella, C= Portofino, D= Tethys bay). Mix I e Mix II sono i marker molecolari utilizzati per testare la ripetibilità della tecnica.

Per valutare la struttura della comunità batterica e condurre un'analisi di clusterizzazione dei profili dei differenti campioni sono stati usati due software di analisi d'immagine: Quantity One 1-D e Phoretix 1-D.

Mediante alcuni coefficienti di correlazione noti in bibliografia (Teixeira et al., 2010; Kim et al., 2014; Williams et al., 2014; Barghini et al., 2014; Teo e Wang, 2014) è stata condotta un'analisi di cluster, la quale ha permesso di confrontare tutti i campioni utilizzando sia un indice di similitudine basato sul coefficiente di correlazione di Dice, sia un indice basato sul coefficiente di Pearson.

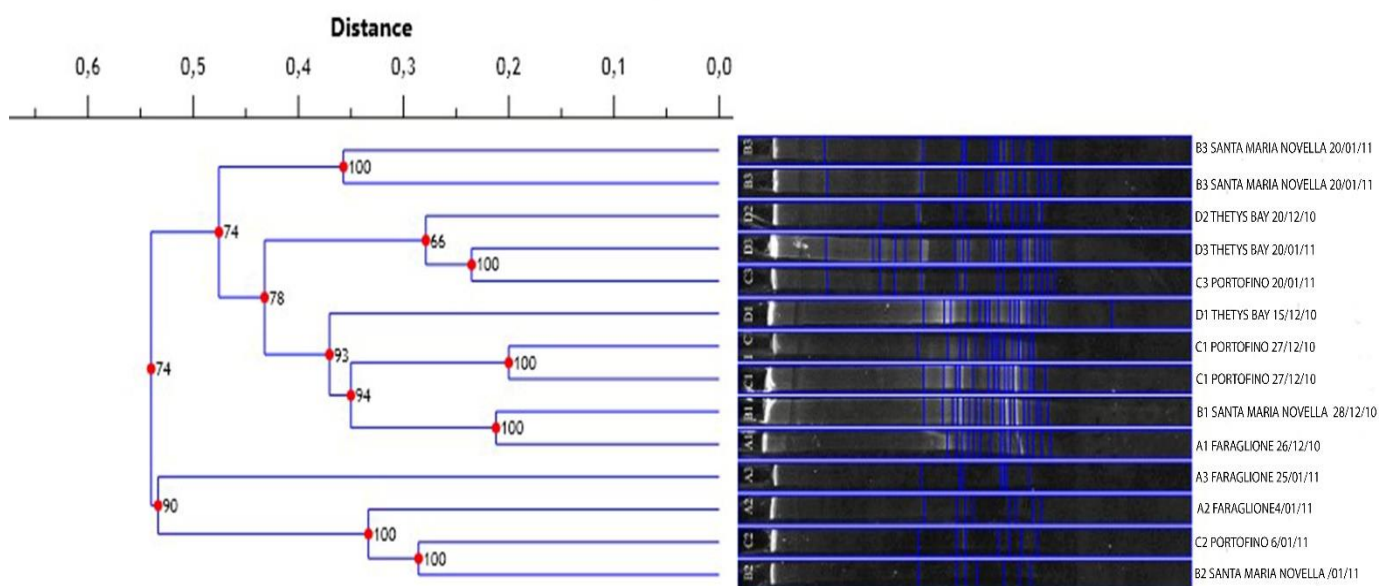
Nell'analisi basata sul *coefficiente di Dice* viene stabilita la similitudine dei profili tenendo conto della posizione relativa delle bande. L'indice statistico si basa sulla presenza o assenza e non sull'intensità relativa delle bande in ogni profilo. Quindi, ciò che si ottiene è un'informazione quantitativa della biodiversità in cui è possibile correlare ad ogni banda una determinata specie o/e genere.

Il *coefficiente di Pearson* attraverso le curve densiometriche ottenute per ciascun campione, fornisce informazioni sulla similitudine dei vari profili in funzione dell'abbondanza (intensità) relativa e della posizione di ogni singola banda e quindi di ogni specie presente.

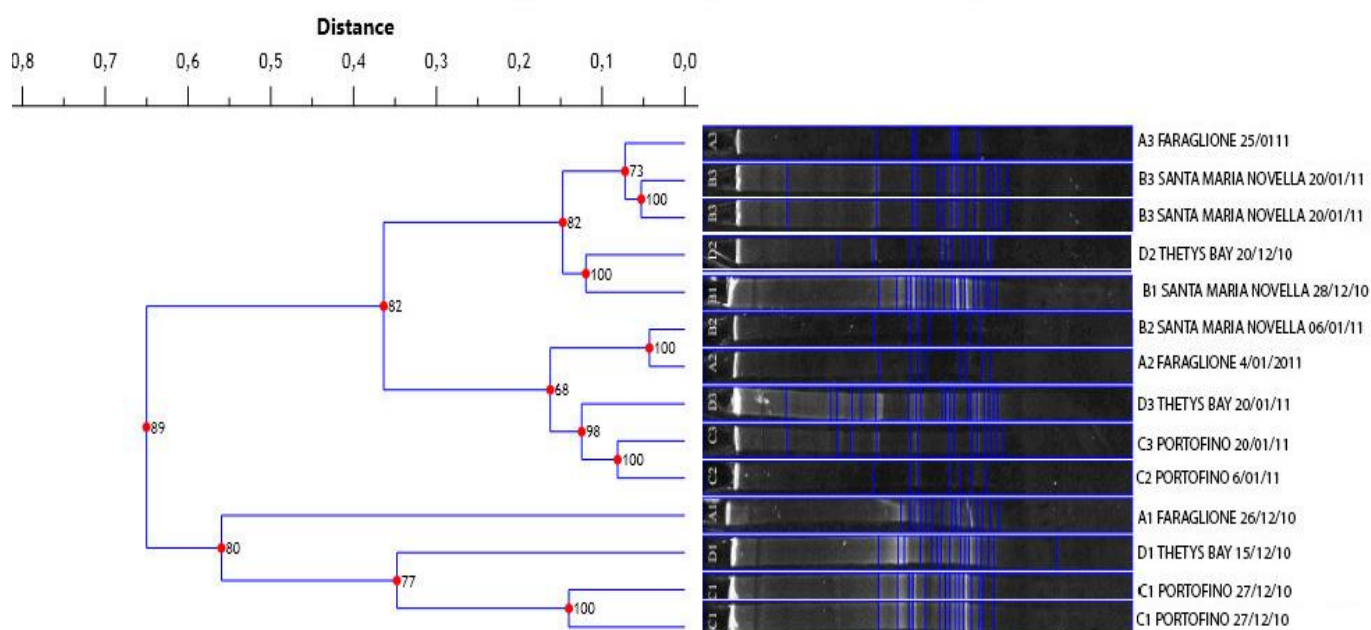
I dendrogrammi (fig. 37 a, b) che correlano le similitudini dei profili delle bande sono stati costruiti applicando il metodo UPGMA (Underweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) e la riproducibilità dell'analisi è stata determinata tramite il confronto tra due ripetizioni di uno stesso campione (B3 e C1).

Entrambi i dendrogrammi rispecchiano l'elevata eterogeneità che caratterizza i campioni studiati evidenziando come non ci sia una netta correlazione fra di loro, né a livello di siti, né in base ai tempi di campionamento. All'interno degli alberi i campioni prelevati nello stesso sito, ma in tempi differenti non raggruppano insieme confermando ulteriormente la loro diversità. Fanno eccezione i campioni Faraglione A2 e Faraglione A3, i quali all'interno dell'albero costruito con il coefficiente di Dice clusterizzano nello stesso gruppo seppur su due rami piuttosto lunghi. Inoltre, anche all'interno dell'albero basato sul coefficiente di Pearson due campioni: Portofino C2 e Portofino C3 clusterizzano insieme. I risultati ottenuti, nonostante il numero dei campioni analizzati non sia particolarmente cospicuo, sono comunque in grado di descrivere l'eterogeneità esistente e le possibili fluttuazioni che si hanno nella composizione della comunità batterica.

Numerosi studi riportano come le acque marine antartiche, soprattutto all'interno del mare di Ross, siano soggette a repentini cambiamenti dovuti principalmente a fenomeni atmosferici come tempeste che spostano i ghiacci e permettono la formazione di aree libere, che favoriscono una ridistribuzione della comunità microbica come ad esempio la fioritura di microscopiche alghe (Delille e Rosiers, 1995; Ducklow et al., 2000; Archer et al., 2014; Richter et al., 2014; Thiele et al., 2014).



(a)



(b)

Fig.37. Comparazione dei profili di DGGE mediante il coefficiente di similitudine di Dice (a) il coefficiente di Pearson (b). Nella costruzione del dendrogramma non sono riportati i marker. I dendrogrammi sono stati costruiti applicando il metodo UPGMA (Underweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean).

4.2.1.2 Affiliazione tassonomica e studio filogenetico

Per ottenere una visione più dettagliata delle specie predominanti presenti nei campioni del mare di Ross, alcune bande sono state excise dal gel, ri-amplificate, sequenziate e confrontate con le sequenze depositate in banca dati NCBI GenBank (tabella 13). Inoltre è stato realizzato un albero filogenetico per comprendere le relazioni fra le sequenze ottenute.

Le informazioni derivanti dal confronto in banca dati evidenziano come alcune delle sequenze che fornivano valori più alti di “*query coverage*” e “*massima identità*”, erano generi e/o specie provenienti da ambienti marini, in alcuni casi proprio dall’oceano Antartico o da altri ambienti marini freddi.

Il confronto in banca dati mostra come il 67% delle sequenze identificate siano appartenenti a specie non ancora classificate o non coltivabili, derivanti nella maggior parte dei casi da studi di fingerprinting molecolare. Questi risultati evidenziano come le conoscenze sulla biodiversità microbica in ambienti poco conosciuti ed estremi, come l’Antartide, siano ancora molto limitate e quante specie e generi debbano ancora essere scoperte e studiate (Murray e Grzymiski, 2007). Inoltre, l’elevato numero di microrganismi non coltivabili tra le sequenze depositate in banca dati confermano come le tecniche molecolari abbiano acquisito in questi ultimi anni grande rilevanza, affiancandosi sempre più alle tecniche coltura-dipendenti, nelle indagini sulla diversità microbica.

In tutte le aree in cui sono stati effettuati i campionamenti sono stati individuati ceppi appartenenti al genere *Polaribacter*.

Polaribacter appartiene alla classe dei *Bacteroidetes*, distribuiti prevalentemente in ambienti marini (Gonzales et al., 2008). È stato osservato che specie appartenenti a questo genere si trovano all’interno di comunità batteriche che vivono nel ghiaccio sia nel continente artico che in quello antartico (Brinkmeyer et al., 2003). Nel campione B1 (Santa Maria Novella) sono presenti due bande che rappresentano la specie *Polaribacter glomeratus*.

P. glomeratus è stata affiliata al genere *Polaribacter* solo nel 1998; precedentemente era classificato come *Flectobacillus* (Gosink et al., 1998). Ciò conferma ulteriormente come le conoscenze nell’ambito dell’ecologia microbica e della biodiversità batterica in Antartide siano ancora piuttosto scarse, spesso non precise e ancora in fase di elaborazione (Murray e Grzymiski, 2007).

Nel campione D1 (Tethys Bay) è stato identificato un ceppo appartenente al genere *Shewanella*, la cui presenza nelle acque dell’Oceano Antartico era già stata documentata da numerosi studi (Bowman et al., 1997; Lo Giudice et al., 2012). La presenza di questo genere è stata, inoltre, rilevata anche nell’Oceano Artico (Brinkmeyer et al., 2003; Tian et al., 2009; Pesciaroli et al., 2012), ad ulteriore

dimostrazione dell'adattamento del genere agli ambienti freddi, come le acque dei mari Artici e Antartici.

Nello stesso campione è presente un ceppo affine alla specie *Glaciacola punicea*. Il genere *Glaciacola*, che significa abitante del ghiaccio, è stato recentemente classificato come appartenente alla sottoclasse dei γ -*Proteobacteria* del phylum *Proteobacteria*. Molte specie del genere *Glaciacola* sono batteri psicrofili e la specie *G. punicea*, isolata spesso dal ghiaccio marino antartico, ha un optimum di crescita a 15°C e un massimo approssimativamente a 20-25°C (Bowman et al., 1998; Qin et al., 2012).

In alcuni casi, l'affiliazione tassonomica ha evidenziato valori relativamente bassi di “query coverage” e “massima identità”. Ciò potrebbe essere spiegato dalle caratteristiche asperime dell'ambiente antartico che fanno sì che i microrganismi che qui vivono abbiano sviluppato un corredo genetico diverso da altri individui appartenenti alla stessa specie, ma adattati a vivere in ambienti meno estremi. Inoltre, l'affiliazione condotta su un totale di sole 200 paia di basi potrebbe non permettere l'ottenimento di un risultato chiaro e risolutivo.

L'albero filogenetico è stato costruito mediante il criterio Maximum Likelihood con il software Mega 6.0 sulla base della sequenza delle bande estratte dal gel DGGE, (Fig.38). L'analisi filogenetica è stata realizzata allineando le regioni ipervariabili V3 del gene 16s rDNA (200 bp) e l'albero è stato radicato utilizzando la sequenza della regione V3 della specie *Thermoproteus tenax* (outgroup) ottenuta dalla banca dati NCBI GenBank.

Nel dendrogramma sono visibili due cluster principali: un primo costituito da più sottogruppi e un secondo che comprende solo *Thalassobacter*, indicando evidenti differenze a livello genetico tra questo genere e le altre specie e gruppi identificati.

Le sequenze riconducibili a *Polaribacter* clusterizzano insieme all'interno di un gruppo separato. Inoltre all'interno del cluster dei *Polaribacter*, le bande 9, 34, 8 e 19 sembrano appartenere alla stessa specie.

Anche le sequenze delle bande 6 e 17 e 15 e 24 clusterizzano rispettivamente insieme facendo ipotizzare che si possa trattare della stessa specie.

Purtroppo la costruzione di un albero filogenetico basato su un multi-allineamento di soli 200 pb, se pur di un tratto ipervariabile, potrebbe non consentire l'ottenimento di una risoluzione efficiente delle distanze filogenetiche tra i gruppi identificati (Muyzer e Smalla, 1998).

Confrontando i risultati ottenuti, in termini di generi e specie, dall'analisi di DGGE hanno rilevato risultati differenti con i risultati dei ceppi batterici ottenuti dall'isolamento. Questo potrebbe essere spiegato da vari fattori. Prima di tutto, vanno considerati i limiti della tecnica DGGE. Come già discusso questa tecnica è in grado di rilevare solo le specie che rappresentino almeno l'1% della

comunità totale. Inoltre, la stessa PCR potrebbe aver amplificato dei DNA preferenziali rispetto alla totalità presente nei campioni. Da contro, l'isolamento pur essendo stato condotto su tutti i campioni potrebbe aver rivelato solo quelle specie che possono essere isolate e coltivate in laboratorio. Come precedentemente detto, circa il 99% dei microrganismi ambientali non è coltivabile in laboratorio (Lewis, 2007) perché i terreni e le condizioni colturali permettendo tipicamente la crescita solo di una piccola frazione di microrganismi. Inoltre, non è facile riprodurre in laboratorio le nicchie ecologiche e le interazioni simbiotiche presenti in ambienti naturali complessi, come l'Antartide, e ciò può svantaggiare una specie a dispetto di un'altra (Nocker et al. 2007).

Ciò nonostante, la possibilità di integrare e complementare i risultati ottenuti da entrambi gli approcci permette di avere una visione più ampia e vasta della comunità batterica presente nel mare di Ross. Il quadro generale che si ottiene evidenzia una comunità batterica estremamente varia, formata da numerosi individui appartenenti a un'ampia molteplicità di generi e famiglie con caratteristiche biologiche, fisiologiche, fenotipiche e genetiche molto differenti.

Tabella 13. Bande excise dal gel di DGGE e comparazione con le sequenze depositate in NCBI GenBank.

Banda	Specie	Accession number	Query coverage	max identity
1	Uncultured <i>Polaribacter</i> sp.	JQ859563	89%	93%
2	Uncultured bacterium	JF789503	89%	88%
4	Uncultured bacterium	AB583757	92%	81%
6	Uncultured bacterium	GU637048	81%	99%
7	Unidentified marine bacterium	AF007939	100%	95%
8	<i>Polaribacter glomeratus</i>	EU000227	92%	97%
9	<i>Polaribacter glomeratus</i>	AY771729	91%	99%
15	Uncultured bacterium	GU200327	96%	96%
17	Unidentified marine bacterium	AF007939	96%	94%
19	<i>Polaribacter</i> sp.	JQ800223	85%	92%
20	Uncultured bacterium	GU637048	91%	95%
22	Uncultured bacterium	AB779851	91%	89%
23	Unidentified marine bacterium	AF007939	100%	93%
24	Uncultured bacterium	JN865905	78%	100%
25	Uncultured bacterium	FN807389	80%	89%
26	Bacteroidetes bacterium	AY167327	89%	96%
28	Uncultured <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	HQ836392	66%	89%
29	<i>Shewanella</i> sp.	HQ876207	61%	90%
30	<i>Glaciecola punicea</i>	U85851	76%	88%
32	Uncultured bacterium	KC109847	77%	91%
33	Uncultured bacterium	JF709744	60%	96%
34	<i>Polaribacter</i> sp.	JX863360	91%	99%
35	Uncultured bacterium	FN813383	91%	94%
36	Uncultured organism	JN532946	74%	87%
38	<i>Polaribacter</i> sp.	JX863360	91%	97%
39	Uncultured bacterium	JQ734412	80%	89%
40	<i>Thalassobacter</i> sp.	JQ800054	91%	100%

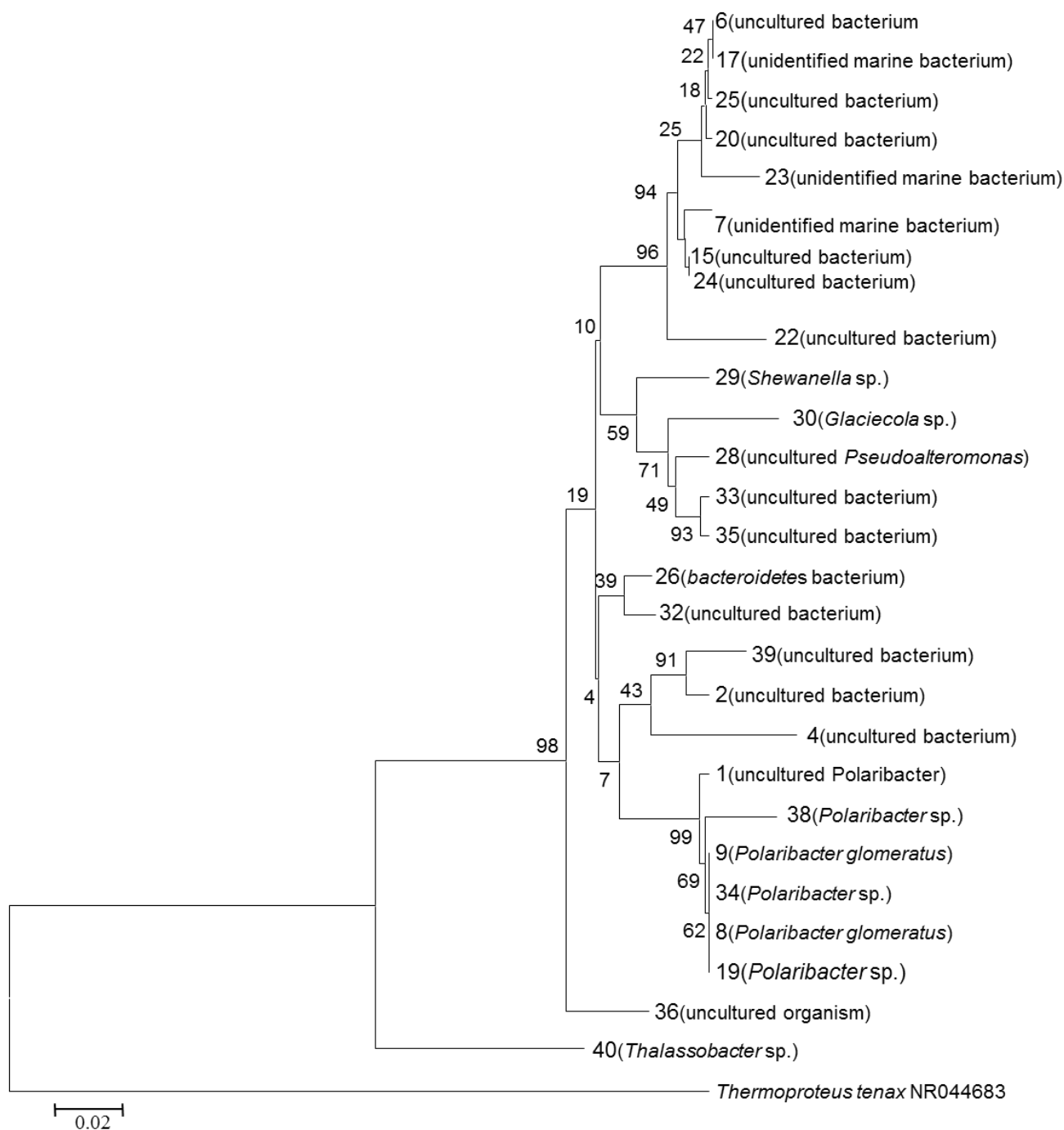


Fig.38. Dendrogramma raffigurante i rapporti filogenetici tra le sequenze ottenute dalle bande excise dal gel di DGGE dei campioni marini.

4.2.1.3 Analisi della comunità: indici di diversità

L'analisi d'immagine elaborata con il software Quantity One 1-D ha permesso di individuare un totale di 155 bande e calcolare per tutte le lanes (profili) l'intensità di ogni banda così da avere informazioni sull'abbondanza relativa delle specie.

La biodiversità nei diversi campioni è stata stimata attraverso l'utilizzo di diversi indici (tab.14).

Il numero di bande (*Ricchezza*) per ogni campione era relativamente eterogeneo. Tra i siti quello che presentava il maggior numero medio di bande era Thetys bay (fig. 38), il quale aveva anche il numero massimo di bande (21) per il campione D3.

Thetys bay è una profonda insenatura all'interno di Baia Terra Nova. E' un sito non particolarmente esposto alle avverse condizioni che colpiscono il mare di Ross e che possono causare forti fluttuazioni all'interno delle comunità batteriche. Inoltre, questa relativa tranquillità potrebbe favorire l'accumulo di sostanze nutritive che favoriscono lo sviluppo di una diversificata comunità batterica che non è presente negli altri siti campionati. Thetys bay presenta un ambiente più stabile dal punto di vista meteorologico; è frequentemente ghiacciata e funge da riparo per numerosi animali come pinguini e foche che qui stazionano periodicamente.

Ciò è ulteriormente confermato se si osserva il secondo campionamento dove per tutti i siti si ha una diminuzione nel numero di bande, forse dovuto a un peggioramento delle condizioni meteorologiche. Ciò è però meno marcato proprio per Thetys bay. In questo periodo si potrebbe essere creata una situazione sfavorevole per la comunità batterica causandone una sua momentanea diminuzione.

La ricchezza è un parametro che misura il numero di specie in una comunità; una banda una specie, ma non è preso in considerazione il numero di individui (abbondanza) che appartengono a quella specie. Quindi l'indice di ricchezza, inteso come solo il numero di bande in un profilo, non è sufficiente a descrivere la biodiversità della comunità che si sta studiando.

Gli *indici di Simpson* e *Shannon* permettono di ottenere informazioni sulla diversità della comunità batterica considerando non solo il numero di specie presenti nel profilo, ma anche il numero (abbondanza) di individui che appartengono a quella stessa specie.

Attraverso l'indice di Simpson è possibile avere un valore di diversità tenendo conto sia della ricchezza (n° di bande) sia dell'evenness cioè dell'uniformità della comunità.

Nel nostro caso, gli indici di Simpson per i campioni marini hanno valori relativamente alti, essendo quasi tutti prossimi a 1 e ciò indica l'esistenza di una buona biodiversità all'interno dei siti campionati.

Anche l'indice di Shannon permette di avere interessanti informazioni sulla biodiversità. L'indice di Shannon avrà un valore tanto più alto non solo quando saranno presenti più bande nel profilo, ma anche quando vi sarà una distribuzione omogenea degli individui fra le specie (Garbeva, 2007).

Paragonando i risultati ottenuti con Shannon con quelli ottenuti con Simpson si nota che D3 Thetys bay, è nuovamente il campione con i più alti valori a conferma dei risultati ottenuti anche per la ricchezza.

Gli *indici di Pielou's evenness, Margalef e di Stabilità* permettono di descrivere l'uniformità, la ricchezza e la stabilità rispettivamente di una comunità batterica. Attraverso l'indice di Pielou's evenness è possibile comprendere i cambiamenti nelle dominanze fra le specie. Una comunità dominata da poche specie abbondanti è considerato meno diversificata rispetto a quella che mostra più specie, ma meno abbondanti. Attraverso l'indice di Margalef viene descritta la ricchezza facendo però riferimento all'abbondanza assoluta della specie. L'indice di Stabilità descrive la stabilità della comunità in relazione al numero e all'abbondanza delle specie che la compongono.

Osservando i valori di evenness il campione che presenta una maggiore uniformità nella struttura della comunità batterica è il B1 SMN 28/12/10. Questo campione ha anche il valore più alto di stabilità indicando una possibile correlazione tra questi due parametri.

Per l'indice di Margalef il campione D3 Thetys bay presenta la maggiore ricchezza.

L'*indice di ricchezza ponderata* è comunemente utilizzato per stimare la diversità microbica in relazione alla sua distribuzione. La si calcola sul numero totale di bande in un determinato gradiente, nel nostro caso chimico, tra la prima e l'ultima banda del profilo. La distribuzione delle bande verrà correlata con il gradiente chimico denaturante del gel di DGGE. Ciò che si otterrà sarà che se l'ambiente di campionamento era ospitale, si avrà una distribuzione più ampia delle bande sul gel, mentre se l'ambiente era inospitale, le bande si distribuiranno in un range più ristretto descrivendo una minore ricchezza di specie nel campione.

Dei nostri campioni, 8 (A1, B1, C1, D1, D2, B3, C3, D3) avevano valori di ricchezza ponderata superiori a 30 indicando che la comunità batterica era stata campionata in un'ambiente ospitale e con un'ampia capacità. I restanti 4 campioni avevano un valore compreso tra 10 e 30, indicando un ambiente con caratteristiche intermedie per la sopravvivenza e lo sviluppo di una comunità diversificata.

Tabella 14. Indici di biodiversità e ricchezza calcolati per i campioni di acqua raccolti nel mare di Ross, Antartide.

campione	n°	Rr	S	E	H	Si	D_1
Faraglione 26/12/10	15	54	0,56	0,97	2,64	0,92	1,84
SMN 28/12/10	18	84,24	0,75	0,99	2,86	0,94	2,17
Portofino 27/12/10	15	58,5	0,46	0,96	2,61	0,91	1,84
Thetys bay 14/12/10	15	58,5	0,67	0,98	2,66	0,92	1,82
Faraglione 4/01/11	8	16,64	0,57	0,97	2,01	0,85	1,01
SMN 7/01/11	7	14,7	0,67	0,98	1,91	0,84	0,9
Portofino 6/01/11	7	13,72	0,45	0,91	1,77	0,84	0,9
Thetys bay 20/12/10	13	57,46	0,5	0,96	2,47	0,9	1,63
Faraglione 26/01/11	7	11,76	0,62	0,97	1,89	0,84	0,9
SMN 28/01/11	14	94,08	0,49	0,92	2,43	0,93	1,77
Portofino 20/01/11	15	108	0,69	0,98	2,66	0,92	1,84
Thetys bay 20/01/11	21	211,68	0,55	0,97	2,95	0,94	2,52

Leggenda:

n° = numero di bande; **Rr** = ricchezza ponderata; **S** = indice di stabilità; **E** = indice di Pielou's evenness; **H** = indice di Shannon; **Si** = indice di Simpson; **D_1** = indice di Margalef.

* **SMN**= Santa Maria Novella.

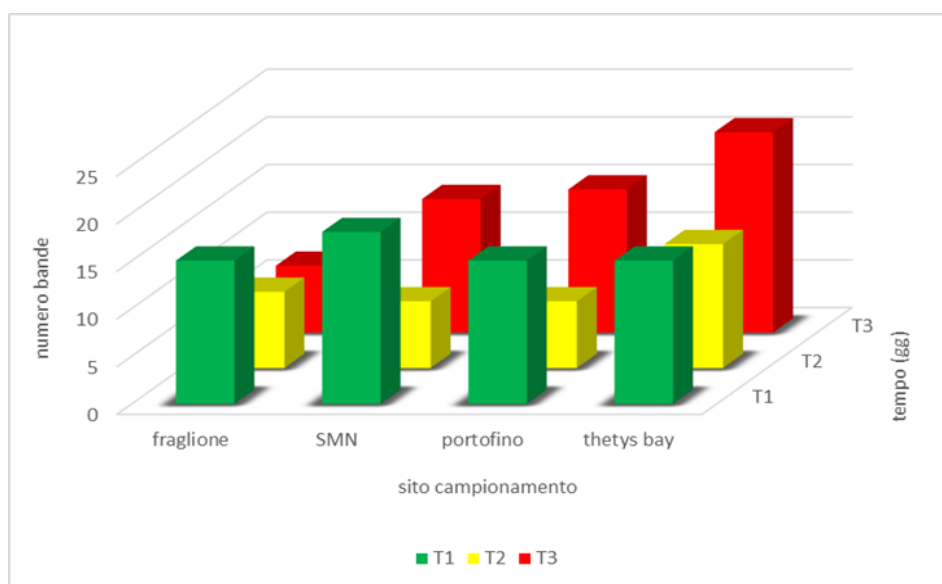


Fig.38. Istogramma raffigurante il numero di bande dei quattro siti nei tre differenti tempi di campionamento.

L'organizzazione funzionale (Fo) di una comunità microbica è la capacità di questa di organizzarsi in modo da avere un'adeguata distribuzione di microrganismi dominanti e microrganismi resilienti (microrganismi capaci di recuperare la loro integrità strutturale e funzionale tornando ad un nuovo equilibrio dinamico dopo che si è verificato un evento di disturbo), così da assicurare alla comunità la capacità di resistere a possibili stress o cambiamenti (Marzorati et al., 2008). La funzionalità di una comunità microbica è il risultato dell'azione dei microrganismi più adattati che diventano dominanti all'interno della struttura della comunità (Gómez-Silván et al, 2010; Kim et al., 2011) e la sua stabilità è assicurata dalla flessibilità della stessa dove microrganismi minoritari possono divenire dominanti per brevi periodi successivi a perturbazioni (Fernandez et al., 1999).

La funzionalità della comunità può essere rappresentata attraverso l'utilizzo delle curve di Pareto-Lorenz (Lorenz, 1905). Il grafico che descrive le curve applicate allo studio della DGGE preve che sull'ascissa venga riportato il numero cumulativo normalizzato delle bande del gel di DGGE e in ordinata le rispettive intensità cumulative normalizzate (Wittebolle et al., 2008). L'interpretazione numerica delle curve fa riferimento alla proiezione del valore dell'ordinata nel punto in cui le intensità corrispondono alla verticale del 20% sull'asse dell'ascisse. Ciò si riferisce alla legge dell'*80/20 di Pareto* secondo la quale ad un'intensità cumulativa dell'80% corrisponde in ascissa a un valore prossimo al 20%. Questo significa che il 20% del totale delle bande nel gel rappresenta da solo l'80% delle intensità e in corrispondenza di questo verranno a trovarsi le specie numericamente maggioritarie.

In figura 39 sono mostrate le curve di Pareto-Lorenz che descrivono l'organizzazione funzionale delle comunità batteriche relative ai profili dei campioni marini. Nel grafico le curve intersecano la verticale del 20% in un intervallo compreso tra 25 e 40% ottenendo quindi un valore medio del 30%. Secondo Marzorati et al. (2008) le comunità microbiche possono essere suddivise in tre tipologie sulla base della loro capacità di ottimizzare e conservare la loro funzionalità. Comunità con valori prossimi al 25%, come nel nostro caso, presentano alta uniformità risultante dall'assenza di pressione selettiva. La comunità non ha una struttura interna ben definita; non ci sono specie particolarmente dominanti con un alto numero di individui e ciò fa sì che necessitino di periodi più lunghi per reagire a episodi di stress. Queste comunità hanno curve prossime alla Perfect evenness indicando una stabile uniformità nella loro struttura comunitaria. Comunità con valori vicino al 45% sono caratterizzate da una struttura in cui le specie più adattate sono dominanti e presenti in alto numero, mentre la maggior parte delle altre specie (80% nell'asse x) è presente ma in quantità minori. Infine, comunità prossime e oltre l'80% sono caratterizzate da poche specie dominanti e altre specie presenti ma in bassissimo numero, con una grande differenza tra i due gruppi.

Le curve di Pareto-Lorenz confermano ulteriormente i risultati ottenuti dagli altri indici, permettendo di affermare che la comunità batterica del mare di Ross è caratterizzata da una buona biodiversità in cui non sono presenti specie particolarmente dominanti. Inoltre, i risultati ottenuti permettono di ipotizzare come la comunità riesca a mantenersi stabile nella sua struttura e funzionalità nonostante possa subire cambiamenti a causa di stress ambientali che sono caratteristici delle acque antartiche.

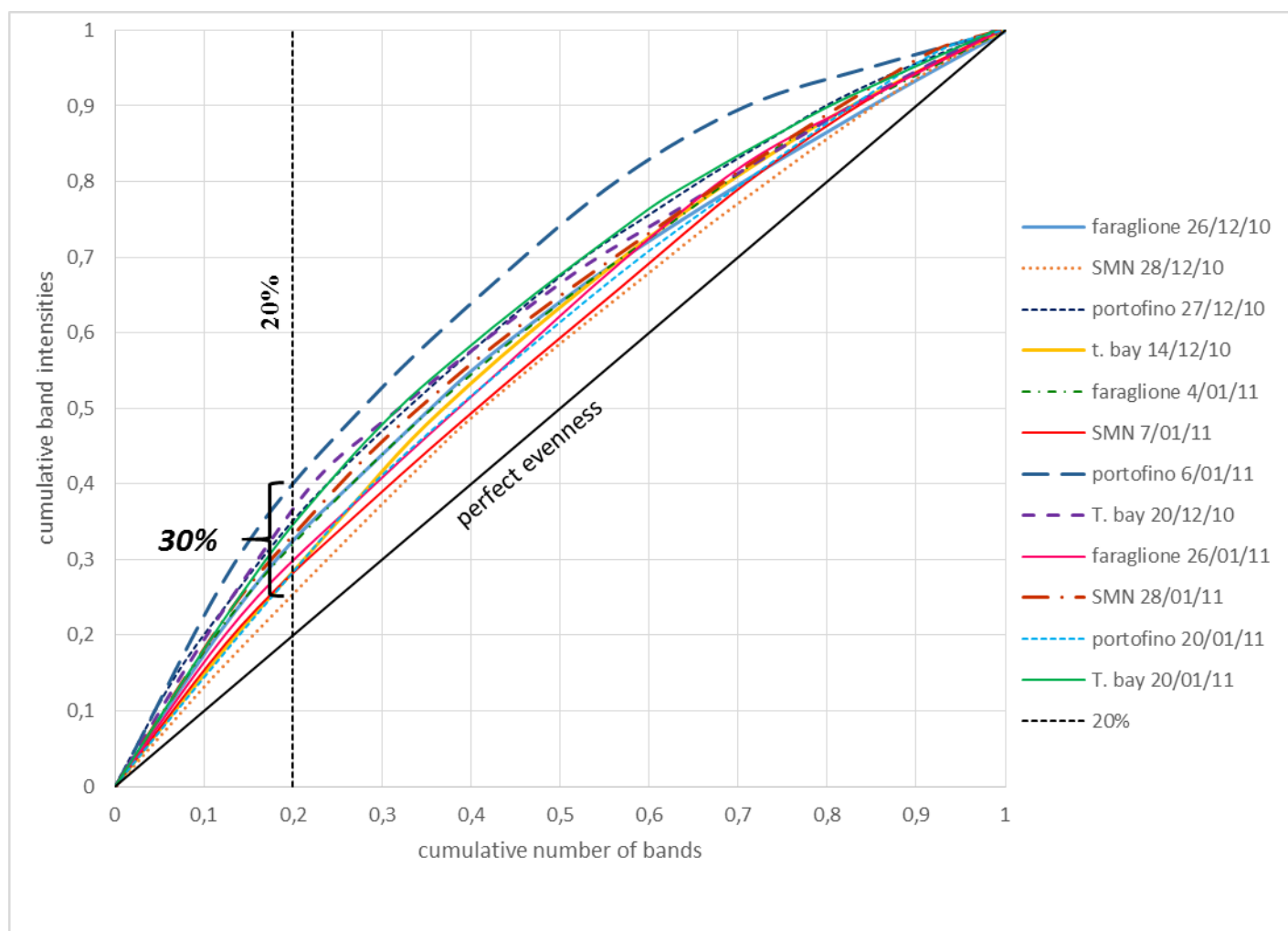


Fig.39. Distribuzione delle curve di Pareto-Lorenz della comunità batterica del mare di Ross. In ascissa sono riportate le intensità cumulative normalizzate e in ordinata il numero delle bande cumulative normalizzate.

4.2.1.4 Analisi statistica multivariata

Per comprendere l'effetto delle variabili ambientali, temperatura dell'acqua durante il campionamento, presenza o assenza di ghiaccio e distanza dalla costa, sulla struttura delle comunità microbiche si è scelto di applicare agli indici calcolati sui profili di DGGE la tecnica di orientamento NMDS (Non metric Multi Dimensional Scaling), la quale ha permesso di evidenziare se e come le componenti abiotiche fossero correlate positivamente o negativamente con la ricchezza e biodiversità dei campioni.

L'NMDS a differenza di altre analisi multivariate, non presuppone l'esistenza di una relazione lineare tra le variabili e quindi può basarsi su una qualunque matrice di dissimilarità o distanza simmetrica. Nell'NMDS le differenze tra i valori di distanza, utilizzate per valutare il rispetto o meno degli assiomi metrici, vengono completamente ignorate mentre viene considerato solo l'ordine di rango delle distanze. L'analisi viene rappresentata in un grafico bidimensionale, nel quale sono descritte solo le variabili ambientali e i campioni.

In figura 40 sono riportati i risultati dell'analisi multivariata NMDS basata sulla matrice di similarità di Bray-Curtis (Bray e Curtis, 1957). Per ogni campione, la proiezione del punto su ognuno degli assi rappresenta la posizione del campione lungo quel gradiente ambientale.

I risultati ottenuti presentano un valore di stress di 0.014.

Lo stress è una misura che descrive la bontà dell'ordinamento. Lo si ottiene partendo da ordinamenti iniziali casuali fino ad ottenere il migliore possibile per i dati oggetto di studio. Valori di stress compresi tra 0.05 e 0.1 indicano un orientamento eccellente dell'analisi NMDS, valori compresi tra 0.1 e 0.2 descrivono una discreta analisi statistica, valori superiori a 0.3 esprimono un'analisi NMDS poco rappresentativa (Wickelmaier, 2003).

All'interno del grafico bidimensionale è possibile osservare come le variabili presenza o assenza di ghiaccio (pack) e distanza dal mare siano correlati positivamente con il gruppo α , comprendente D3 e C3, e il gruppo β formato da A1, B1, B3, D1, C1, D2. Il vettore pack sembrerebbe avere una maggiore correlazione rispetto all'altra variabile essendo rappresentato da un vettore con una maggiore lunghezza e un minore angolo rispetto all'asse 1. Inoltre, i campioni Thetys bay D1 e D2, distribuiti sul gradiente di orientamento del vettore pack subiscono una maggiore influenza di questa variabile rispetto alle altre. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che i due campioni sono gli unici ad essere stati raccolti in presenza di ghiaccio, indicando quindi una correlazione tra biodiversità e ricchezza con la presenza o meno di ghiaccio.

Il vettore temperatura risulta essere inversamente correlato alla distanza dalla costa e alla presenza di ghiaccio, trovandosi sul quadrante diametralmente opposto.

La temperatura sembrerebbe essere positivamente correlata al gruppo γ (A2, B2, A3, C2) e correlata negativamente ai gruppi α e β .

All'interno del gruppo γ , i campioni B2 e C2 sono quelli che durante il campionamento hanno permesso di misurare la maggiore temperatura. Ciò però non è confermato dal campione B1, il quale pur avendo registrato una temperatura relativamente alta, si trova sul quadrante opposto indicando una correlazione negativa con questa variabile. Questo potrebbe essere spiegato ipotizzando che B1 potrebbe essere maggiormente influenzato dalle variabili distanza dalla costa e pack o dalla loro combinazione piuttosto che dalla singola temperatura.

Purtroppo i risultati ottenuti non riescono a descrivere con chiarezza se e come le variabili testate influenzino in modo univoco le comunità microbiche presenti all'interno dei campioni marini. La possibilità di ampliare lo studio con un maggior numero di campioni, raccolti anche in tempi relativamente più distanti tra loro, insieme all'analisi di più variabili ambientali potrebbe aiutare nella comprensione di quali fattori, sia ambientali che non possano influenzare la distribuzione della biodiversità nelle acque marine antartiche.

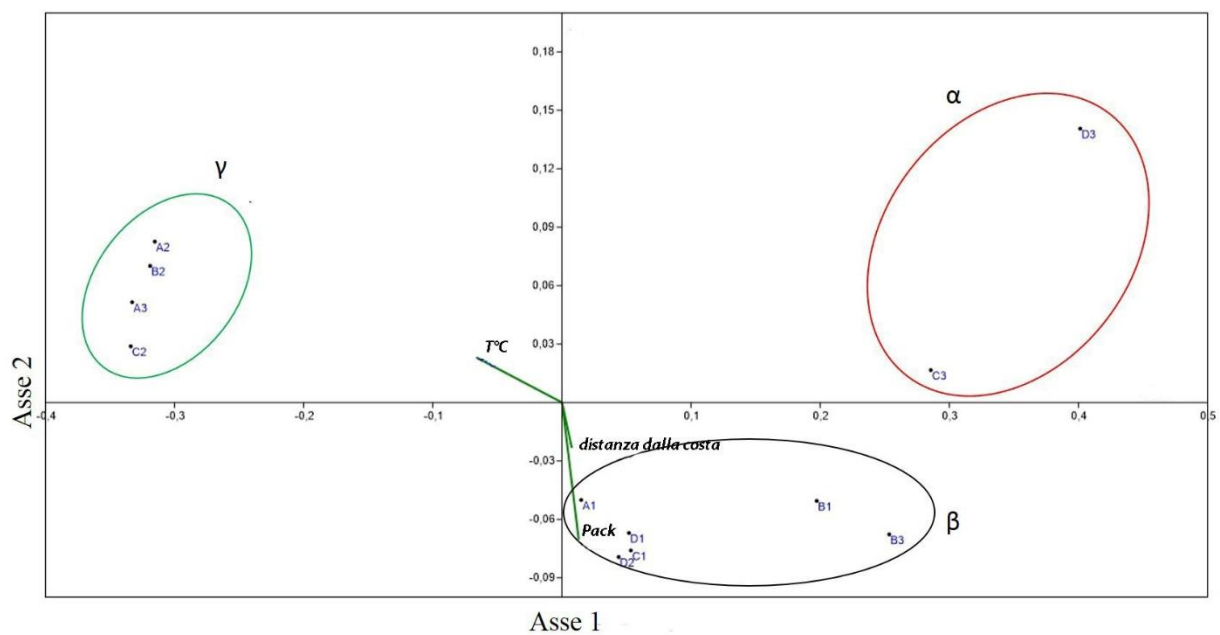


Fig.40. Orientazione NMDS basata sulla matrice di similarità di Bray-Curtis delle variabili ambientali e degli indici di biodiversità dei campioni marini. Le tre ellissi rappresentano i raggruppamenti dei campioni: α =D3, C3; β =B1, B3, D2, C1, D1, A1; γ =A2, B2, A3, C2.

4.2.2 Studio della comunità batterica endolitica

Il paesaggio delle Valli Secche è dominato da un'alternanza di catene rocciose e valli glaciali. Queste catene sono formate da depositi sedimentari di formazione geologica risalente al periodo compreso tra Devoniano e Triassico, *Beacon Supergroup*, che giacciono su rocce intrusive e metamorfiche, principalmente graniti e doleriti (Nienow e Friedmann, 1993). Il panorama mostra tutte le tipiche caratteristiche geomorfologiche del deserto: scogliere, sporgenze e piattaforme di nuda roccia, ripidi pendii, suolo grossolano a coprire il pavimento del deserto ed aree di sabbia mobile. Sulla superficie le rocce sono coperte da una crosta silicea spessa circa un millimetro, che facilita la colonizzazione microbica stabilizzando la superficie stessa e limitando l'erosione per opera del vento. Questa crosta si forma per l'accumularsi di polvere portata dal vento che è gradualmente incorporata in strati, inferiori ai 100 μm di spessore, a coprire la struttura dei granuli che compongono la roccia (Friedmann e Weed, 1987; Nienow e Friedmann, 1993). La colonizzazione microbica lascia su queste rocce segni inconfondibili sotto forma di un tipico mosaico dovuto all'erosione biogena. Nelle comunità dominate da licheni questo mosaico è formato da colori che vanno dal bianco all'arancione, al marrone, su una superficie a "scalini", dovuti all'esfoliazione della superficie crostosa per opera dell'attività microbica che riduce la coesione tra i granuli di sabbia dello strato superiore (Friedmann, 1982; Nienow e Friedmann, 1993).

In questo lavoro la comunità batterica endolitica presente nelle rocce raccolte nelle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria, è stata analizzata mediante la tecnica di fingerprinting molecolare PCR-DGGE.

La biodiversità batterica totale è stata studiata a due differenti livelli: una prima analisi ha permesso lo studio della comunità batterica totale presente nei campioni raccolti nelle 57 località analizzando anche rocce di differente tipologia proveniente da uno stesso sito.

Una seconda analisi ha permesso di investigare se e come la biodiversità batterica cambi all'interno del micro e macro ambiente roccioso. Per studiare la comunità batterica due campioni di rocce provenienti da uno stesso sito sono stati processati mediante DGGE, sia separatamente che uniti insieme. Inoltre, da una delle due rocce sono stati ricavati tre sotto campioni, identificati come A, B, C, processati separatamente per comprendere come la biodiversità cambi all'interno del micro habitat roccioso.

L'estrazione del DNA dalla matrice rocciosa ha richiesto una serie di ottimizzazioni per determinare quale protocollo e kit di estrazione permettesse di ottenere il miglior risultato principalmente in funzione del numero di bande ottenute mediante DGGE, ma anche in relazione ai costi per poter realizzare il lavoro. Un'approfondito studio bibliografico ha evidenziato l'utilizzo di numerosi kit

per l'estrazione del DNA da suolo, ma per quanto riguarda le rocce purtroppo le informazioni non sono numerose e spesso non viene riportato un kit commerciale specifico per questo tipo di matrice. A fronte delle poche informazioni si è deciso di verificare la possibilità di impiegare per l'estrazione del DNA tre kit precedentemente utilizzati e consigliati per numerose matrici ambientali.

In tabella 15 sono riportate tutte le procedure testate, la concentrazione del DNA genomico estratto e il numero di bande ottenuto mediante DGGE. Come è possibile osservare i tre kit di estrazione presi in considerazione, Maxwell, NucleoSpin e EurX, oltre ad essere stati utilizzati secondo la procedura standard riportata nel manuale, sono stati modificati in alcuni punti per cercare di ottenere una resa migliore. Le varianti che sono state introdotte ai protocolli originali sono associate alla quantità iniziale di polvere rocciosa utilizzata per l'estrazione e la quantità e il tipo di buffer di lisi utilizzato negli step iniziali per permettere la separazione delle cellule microbiche dalle particelle rocciose.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come tutti e tre i kit abbiano una buona capacità di estrazione; in particolare il kit EurX, campione 6 e 8, permette di ottenere i valori più alti di DNA genomico. Successivamente all'amplificazione del 16S e della regione ipervariabile V3 però, se si osserva il numero di bande ottenuto mediante DGGE per ogni campione, i kit che ottengono una maggiore resa sono Maxwell e NucleoSpin. Questo è spiegato dal fatto che nell'estratto si trova il DNA di tutti i microrganismi della comunità litica e non solo DNA batterico per cui la maggiore quantità di DNA misurato e il minor numero di bande nei profili è da attribuire ad una minore presenza di DNA batterico rispetto agli altri componenti della comunità. Dall'osservazione dei profili di DGGE sembrerebbe che i kit Maxwell e NucleoSpin permettano di ottenere il maggior numero di bande; in particolare i campioni 1 e 4, in cui si è scelto di utilizzare 0.5g di polvere rocciosa e di seguire il protocollo standard. Avendo ottenuto gli stessi risultati con entrambi la scelta del kit da utilizzare è stata determinata dai costi necessari per permettere lo svolgimento del lavoro. Infatti, la metodica Maxwell richiede dei costi piuttosto elevati e questo ha spinto ad indirizzare il lavoro verso l'utilizzo del kit NucleoSpin, il quale pur non essendo caratterizzato da costi particolarmente bassi, rappresenta comunque un buon compromesso tra i risultati che si vogliono ottenere e i costi per poterli realizzare.

Tabella 15. Prove di estrazione del DNA batterico da matrice rocciosa mediante i kit Maxwell, NucleoSpin e EurX

	TIPO DI ESTRAZIONE	DNAestratto (ng/μl)	n° bande dgge
1	MAXWELL 0,5g standard	0,456 $\pm$ 0.08	16 $\pm$ 1
2	MAXWELL 0,05g + 1ml buffer lisi	0,16 $\pm$ 0.08	15 $\pm$ 2
3	MAXWELL 0,05g + 1ml sol.salina (0,9% NaCl)	0,209 $\pm$ 0.03	15 $\pm$ 2
4	KIT NUCLEOSPIN PLANT 0,5g standard	0,072 $\pm$ 0.02	16 $\pm$ 2
5	KIT NUCLEOSPIN PLANT 1g standard	0,147 $\pm$ 0.05	4 $\pm$ 3
6	KIT EURX 0,5g standard	1,97 $\pm$ 0.02	11 $\pm$ 1
7	KIT EURX 0,5g + 2X buffer lisi	0,334 $\pm$ 0.06	10 $\pm$ 2
8	KIT EURX 0,5g + 1,5ml acqua, centr, pellet in buffer	1,94 $\pm$ 0.01	14 $\pm$ 2
9	MAXWELL kit sperimentale1	0,225 $\pm$ 0.02	12 $\pm$ 1
10	MAXWELL kit sperimentale2	0,948 $\pm$ 0.03	15 $\pm$ 1

4.2.2.1 Analisi d'immagine dei gel DGGE dei campioni rocciosi

In figura 41 sono riportate le immagini dei gel di DGGE dei campioni di roccia, i quali sono stati raccolti seguendo un transetto longitudinale e altitudinale a crescente distanza dal mare in differenti località delle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria.

Dopo l'estrazione del DNA genomico, del quale è stata misurata la concentrazione mediante fluorimetro Qubit (tab. 15), si è proceduto all'amplificazione del target genico scelto, la regione ipervariabile V3 del gene 16S rDNA.

Dei 70 campioni di roccia analizzati, i campioni *MecLea Nunatak* 30 e *Anderson Riage* 24 non presentano nessuna banda nonostante l'analisi di questi campioni è stata ripetuta più volte e la misurazione della concentrazione del DNA non risultasse nulla. Come precedentemente detto, ciò potrebbe essere spiegato considerando che il DNA estratto è un DNA genomico totale, che comprendere non solo DNA batterico, ma anche DNA fungino, di Archeobatteri e alghe. E' solo grazie all'amplificazione del gene 16S rDNA e alla successiva amplificazione della regione ipervariabile V3 che è possibile discriminare il DNA batterico da tutto il resto.

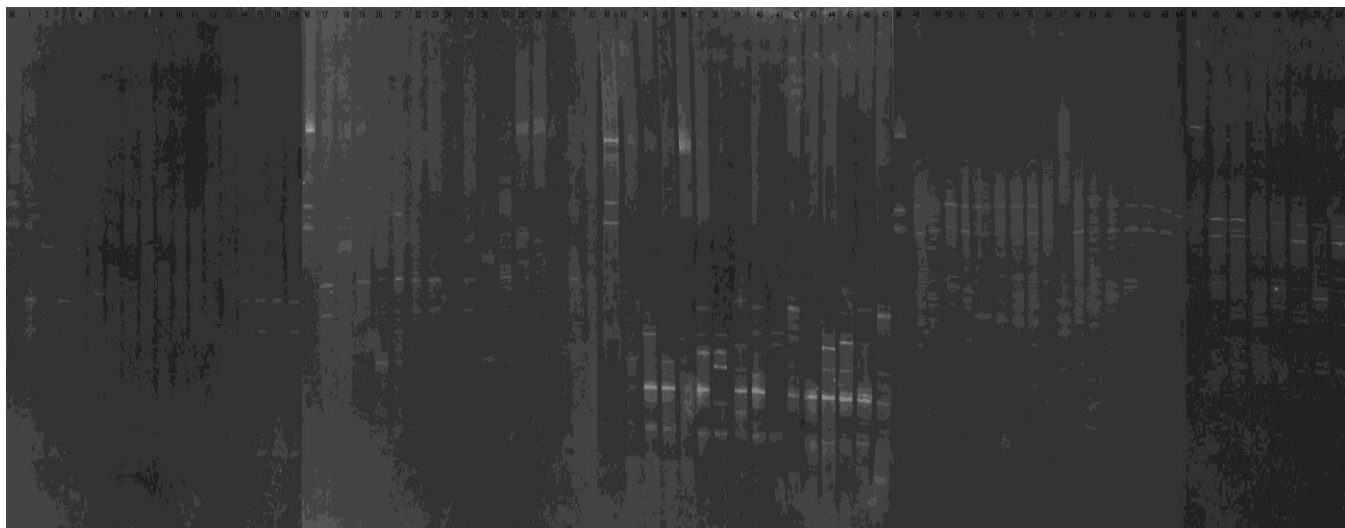


Fig.41. Profilo dei 5 gel di DGGE raffiguranti la biodiversità batterica dei campioni di roccia campionati nei 57 siti delle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria.

Tabella 15. Valori di concentrazione del DNA genomico ottenuti mediante fluorimetro Qubit, codice di identificativo e numero di bande ottenuto per ogni campione.

(*) A= arenaria, CA= conglomerato arenaria, G=granito, D= dolerite, Q= quarzo.

<i>campione</i>	<i>codice</i>	<i>[DNA] estratto (ng/μl)</i>	<i>bande n°</i>	<i>roccia*</i>
Campo Icaro	1	<0,05	9	G
Vegetation Island	2	0,122	12	G
Pudding buttle	3	0,056	8	CA
Harrow peak	4	0,073	6	G
Ambalada peak	5	<0,05	9	CA
Mt. Haward	6	0,058	11	CA
Mt.larsen	7	0,068	10	G
Random hills	8	0,051	12	G
Timber peak	9	0,052	15	CA
Mt. New zeland	10	0,059	10	A
Thern promontory	11	0,059	14	A
Mt. Haward	12	<0,05	6	CA
Prior Island	13	0,083	7	G
Mt.Mc Gee	14	<0,05	4	G
Mt. Billing	15	<0,05	8	CA
Bobby rock	16	0,21	7	A
Mt. Bowen	17	0,205	10	A
Mt. Dickason	18	0,076	15	G
Ford peak	19	<0,05	10	CA
Timber peak	20	<0,05	11	CA
Trio nunatak	21	<0,05	10	A
Ricker hills	22	0,052	7	A
Archamboult	23	<0,05	5	CA

Anderson Riage	24	0,245	0	G
Shafer peak	25	0,307	5	CA
Battleship promontory	26	<0,05	3	A
Mt. Burrows	27	<0,05	13	G
Mt. Nansen	28	0,399	7	G
Starr nunatak	29	0,863	6	G
MecLea nunatak	30	0,2195	0	A
MecLea nunatak	31	0,82	8	D
Trio nunatak	32	<0,05	7	A
Inexp. Island	33	<0,05	7	Q
(Olson nunatak)	34	<0,05	12	A
Archambault Ridge	35	<0,05	10	CA
Kay island	36	0,328	14	Q
Mt. Nansen	37	<0,05	11	A
Inexp. island	38	<0,05	8	G
Richard nunatak	39	<0,05	15	CA
Pudding Buttle	40	<0,05	11	A
Mt. Kainath	41	0,4875	6	G
Archambault Ridge	42	<0,05	12	G
Mt. Haward	43	<0,05	7	CA
Richard nunatak	44	<0,05	10	A
Stewart Heights	45	<0,05	11	CA
Mt. Adamson	46	0,63	9	A
Stewart Heights	47	<0,05	11	G
Ricker Hills	48	<0,06	12	A
Mt. Nansen	49	<0,07	11	CA
Chisholm hills	50	<0,05	11	A
Chishlom hills	51	<0,05	11	D
Pinkard table	52	<0,05	13	G
Bier point	53	<0,05	13	G
Mt. Meister	54	<0,05	12	G
Eskimo point	55	<0,05	17	Q
Wishbone ridge	56	0,06	9	G
Campo icaro	57	0,73	8	Q
Reed Nunatak	58	<0,05	14	G
Olson Nunatak	59	<0,05	11	G
Mt. Howard	60	<0,05	13	D
Mt. Howard	61	<0,05	12	Q
Prior Island	62	<0,05	14	Q
Mt. Stephen	63	<0,05	10	G
Mt. Billing	64	<0,05	9	D
Bobby Rocks	65	<0,05	11	D
Unnamed site	66	<0,05	12	A
Tinker glacier	67	<0,05	14	G
Mt McGee	68	<0,05	11	G
Shafer peak	69	<0,05	15	G
Mt Dickason	70	<0,05	17	G

Per valutare la struttura delle comunità batteriche endolitiche e realizzare un'analisi di clusterizzazione dei profili dei differenti campioni sono stati usati due software di analisi d'immagine: Quantity One 1-D e Phoretix 1-D.

L'analisi di cluster si è basata sul coefficiente di correlazione di Dice, il quale stabilisce una relazione tra i profili tenendo conto della posizione relativa delle bande, e sul coefficiente di Pearson, il quale fornisce informazioni sulla similitudine dei vari profili in funzione dell'intensità relativa e della posizione di ogni singola banda.

In figura 42 sono riportati i dendrogrammi calcolati con l'utilizzo del coefficiente di Dice (a) e Pearson (b) che correlano i profili di tutte le rocce campionate. I dendrogrammi sono stati costruiti applicando il metodo UPGMA (Underweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) e la riproducibilità dell'analisi è stata determinata tramite il confronto tra due ripetizioni di uno stesso campione (campione 15).

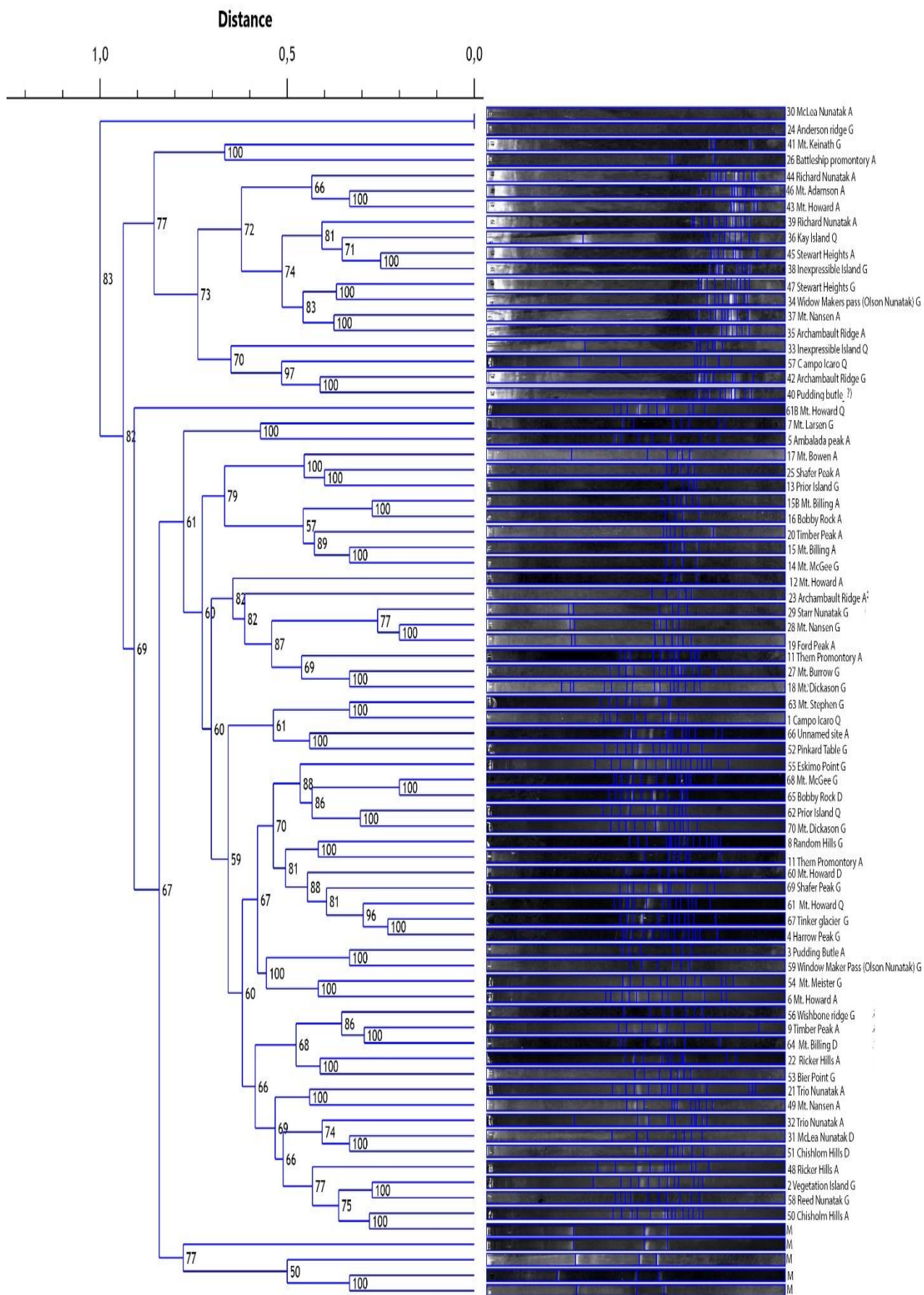
Il dendrogramma ottenuto dal coefficiente di Dice è composto da due gruppi principali, nel primo si trovano i due campioni, MecLea Nunatak 30 e Anderson Riage 24 che non hanno riportato la presenza di bande, mentre nel secondo cluster si trovano tutti gli altri campioni. Questo secondo gruppo è ulteriormente suddiviso in due sottogruppi principali all'interno dei quali si distribuiscono senza un'apparente correlazione tra di loro tutti i campioni.

Il dendrogramma costruito mediante il coefficiente di Pearson risulta essere suddiviso in due distinti cluster all'interno del quale si distribuiscono tutti i campioni. Anche in questo caso non è possibile individuare una relazione tra tutti i campioni analizzati e la posizione del sito in cui sono stati campionati.

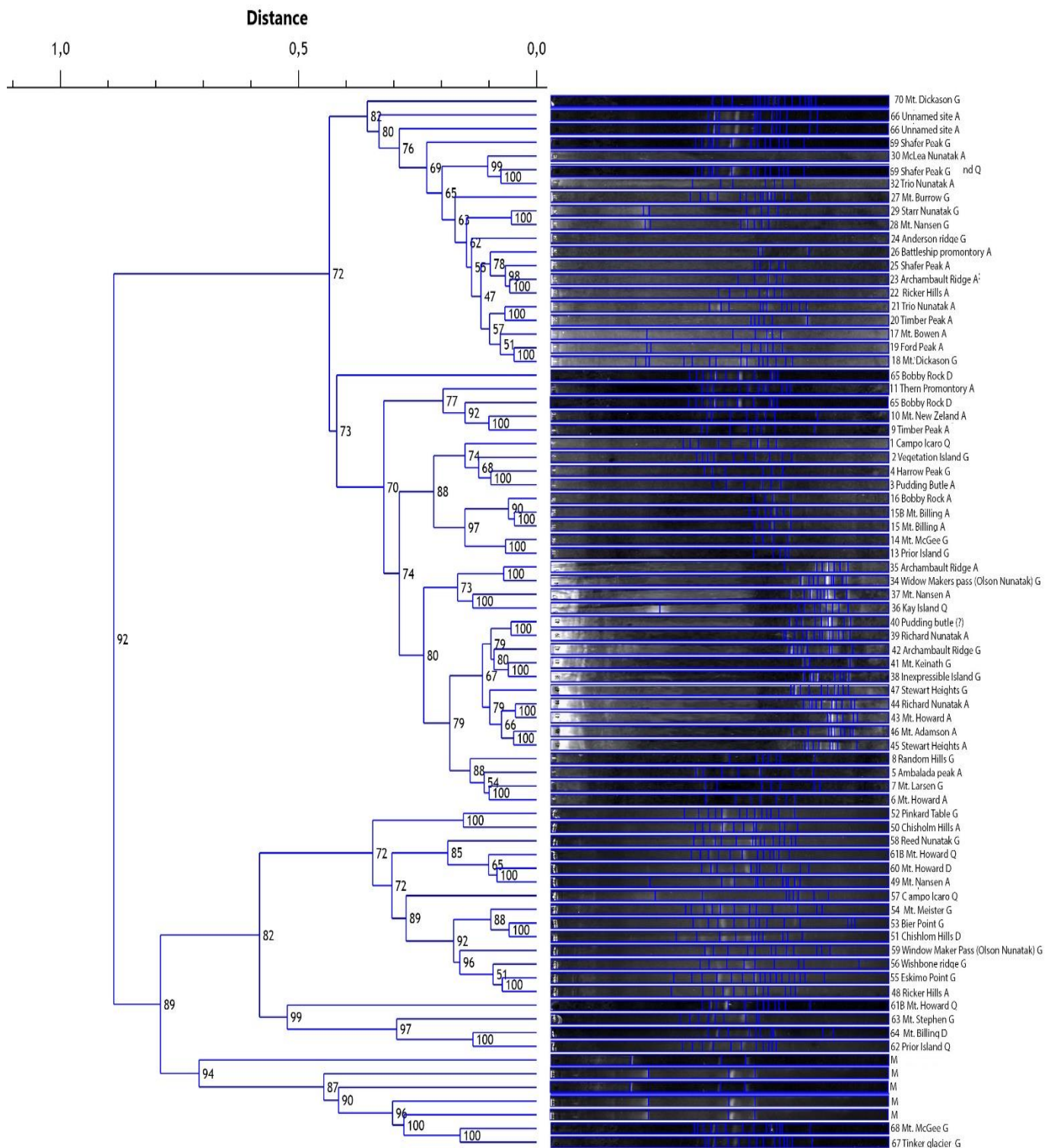
Entrambi i coefficienti descrivono la forte eterogeneità che si ha tra i campioni rocciosi mostrando come non ci sia una netta relazione fra di loro. Si è inoltre tentato di individuare una correlazione tra la distribuzione dei profili all'interno del dendrogramma e la tipologia e la posizione dei siti da cui i campioni provengono. È risultato evidente che non è possibile descrivere una correlazione che rispecchi la distribuzione della comunità microbica lungo il transetto longitudinale e altitudinale secondo cui è avvenuto il campionamento.

Gli studi sulle comunità batteriche endolitiche antartiche non sono molto numerosi e questo limita la possibilità di comprendere al meglio le relazioni esistenti tra l'ambiente in cui esse si trovano e quali siano le variabili che maggiormente influenzano il loro sviluppo. La nicchia endolitica viene sfruttata dalle comunità microbiche in modo differente e i fattori ambientali che regolano l'insediamento, la crescita e la struttura della comunità all'interno della roccia sono molteplici. Quindi nell'investigare le relazioni esistenti tra le comunità microbiche e gli ambienti da cui derivano è fondamentale non

solo la conoscenza della tipologia di roccia e della posizione del sito di campionamento, ma anche apprendere altri fattori come la temperatura, l'umidità, le radiazioni UV, l'esposizione. Queste variabili generano notevoli differenze nello sviluppo della comunità e delle specie che in ogni microhabitat roccioso è possibile individuare.



(a)



(b)

Fig.42. Comparazione delle bande del gel di DGGE mediante il coefficiente di similitudine di Dice (a) e il coefficiente di Pearson (b). I dendrogrammi sono stati costruiti applicando il metodo UPGMA (Underweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean). Nella costruzione dei dendrogrammi sono riportati i marker. I campioni sono identificati con il codice con il quale è stata condotta la DGGE e il nome del sito di provenienza.

4.2.2.2 Analisi d'immagine del gel DGGE del micro e macro habitat roccioso

Le Valli Secche di McMurdo rappresentano l'ambiente terrestre deglaciato più estremo della Terra, caratterizzato da una combinazione di condizioni quali basse temperature, forti escursioni termiche, bassa umidità relativa, cicli di congelamento-scongelo, alta incidenza di radiazione ultravioletta, bassa disponibilità di nutrienti, elevata aridità dovuta alle scarse precipitazioni annuali e all'alta sublimazione. Nonostante queste condizioni, esistono degli organismi che vivono in questi ambienti, colonizzando gli spazi interstiziali e le porosità delle rocce formando delle vere e proprie comunità endolitiche (Nienow e Friedmann, 1993; De la Torre et al., 2003; Yung et al., 2014). I micro habitat che si sviluppano all'interno della roccia sono influenzati da numerosi fattori come la posizione, l'esposizione, l'orientamento, l'altitudine, la permanenza della copertura nevosa. Questi sono aspetti significativi nella scelta da parte dei microrganismi della posizione e della porzione nella quale avverrà la colonizzazione. Ciò fa sì che all'interno della roccia si generino numerosi micro habitat che potrebbero avere caratteristiche differenti e che orienteranno il tipo di comunità microbica che qui si andrà ad insediare (Wessels e Büdel, 1995; Ascaso et al., 2003; Gadd et al., 2005).

In figura 43 sono riportati i profili di DGGE dei campioni sui quali è stato condotto uno studio per comprendere se e come cambia la comunità batterica all'interno del micro e macro ambiente roccioso. I siti scelti per lo studio sono stati *Richard Nunatak*, *Vegetation Island* e *Mt. Howard*. Per ognuno di questi sono stati presi in considerazione due differenti frammenti di roccia: *Richard Nunatak*, 39 e 44, *Mt. Howard* 6 e 43, *Vegetation Island* 2 e 72.

Per un campione roccioso di ciascun sito sono stati ricavati tre sotto campioni:

- per *Richard Nunatak* si è scelto il campione 39 ottenendo 39A, 39B, 39C;
- per *Vegetation Island* si è scelto la roccia 72 ottenendo 72A, 72B, 72C;
- per *Mt. Howard* si è scelto il campione 6 ottenendo 6A, 6B, 6C.

Inoltre, è stato realizzato un ulteriore campione ottenuto dal mescolamento delle due rocce di ogni sito: *Richard Nunatak* 39+44, *Vegetation Island* 2+72 e *Mt. Howard* 6+43.

Dopo l'estrazione del DNA genomico, del quale è stata misurata la concentrazione mediante fluorimetro Qubit (tab.16), si è proceduto all'amplificazione del target genico scelto, la regione ipervariabile V3 del gene 16S rDNA.

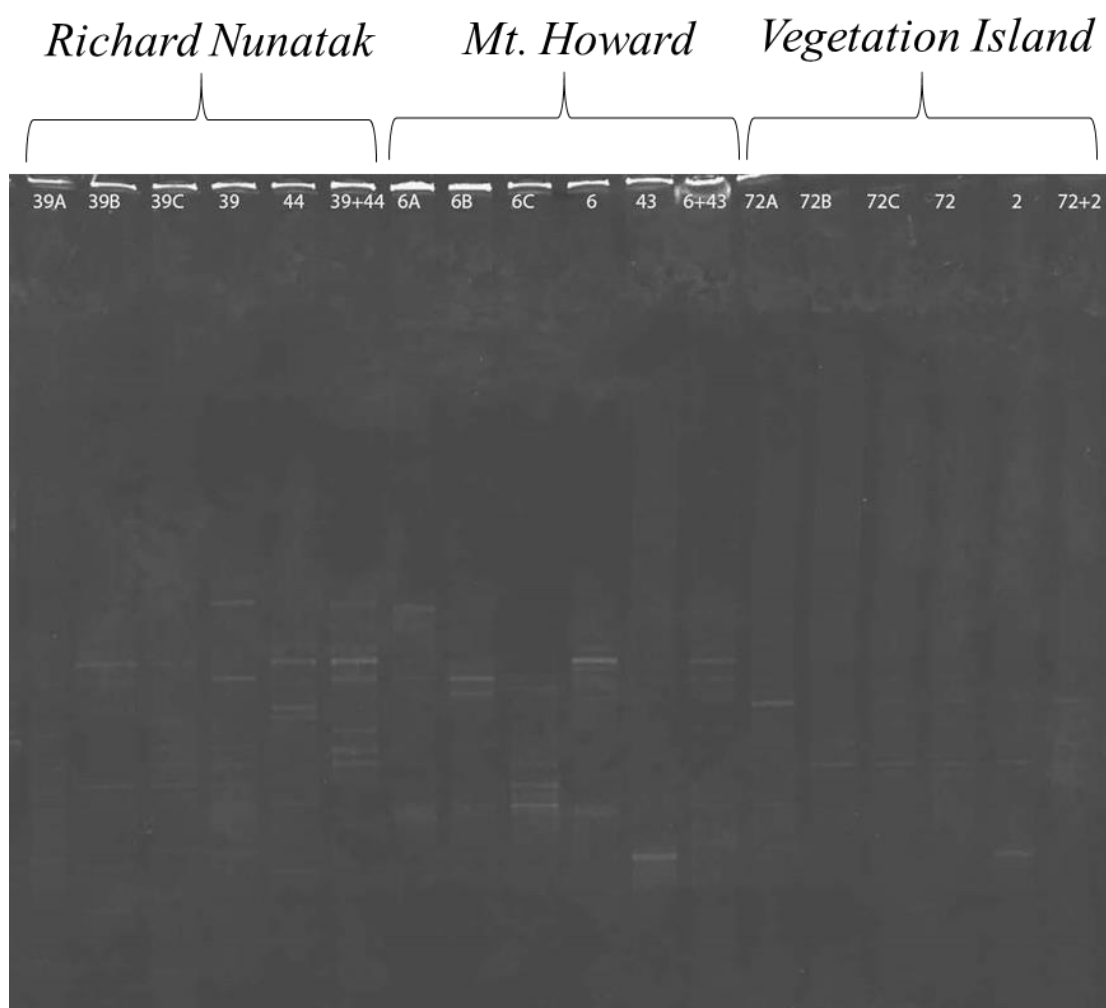


Fig.43. Profilo di DGGE della biodiversità dei campioni di roccia, Richard Nunatak, Mt Howard e Vegetation Island, rappresentanti il micro e macro ambiente roccioso. Con le lettere A, B, C si identificano i tre sotto campioni ottenuti da una delle due rocce campionate nello stesso sito.

Tabella 16. Valori di concentrazione del DNA genomico ottenuti mediante fluorimetro Qubit, codice di identificativo e numero di bande ottenuto per ogni campione.

(*) A= arenaria, CA= conglomerato arenaria, G= granito

<i>campione</i>	<i>codice</i>	[DNA] estratto (ng/μl)	<i>bande n°</i>	<i>roccia*</i>
Richard nunatak	44 (sito3 camp1)	<0,05	11	A
Richard nunatak	39 (sito3 camp2)	<0,05	13	CA
Richard nunatak	39A	<0,05	11	CA
Richard nunatak	39B	<0,05	11	CA
Richard nunatak	39C	<0,05	14	CA

Richard nunatak	44+39	<0,05	13	A+CA
Mt. Howard	6 (sito2 camp1)	<0,05	11	CA
Mt. Howard	43 (sito2 camp8)	0,058	5	CA
Mt. Howard	6A	<0,05	9	CA
Mt. Howard	6B	<0,05	11	CA
Mt. Howard	6C	<0,05	7	CA
Mt. Howard	43+6	<0,05	8	CA+CA
Vegetation Island	2 (camp 4)	0,25	6	G
Vegetation Island	72 (camp1)	<0,05	7	G
Vegetation Island	72A	0,089	9	G
Vegetation Island	72B	0,099	8	G
Vegetation Island	72C	0,082	5	G
Vegetation Island	2+72	0,087	6	G+G

Mediante i dendrogrammi basati sul coefficiente di Dice (a) e Pearson (b) (Fig.44) si è studiata la biodiversità e le relazioni esistenti di rocce campionate all'interno di uno stesso sito. Inoltre si è cercato di comprendere se e come all'interno di una stessa roccia esistano più microhabitat con una differente distribuzione della comunità batterica.

Il dendrogramma del coefficiente di Dice risulta suddiviso in due cluster principali. Nel primo si trovano tutti i campioni derivanti dal sito *Mt. Howard*, i quali clusterizzando insieme confermano la somiglianza nella struttura della comunità batterica. All'interno di questo gruppo solo il campione 43 clasterizza in posizione più esterna su un ramo piuttosto lungo lasciando ipotizzare che presenti una maggiore differenza rispetto agli altri campioni derivanti da *Mt. Howard*.

Nel secondo cluster si trovano tutti gli altri campioni. I profili ottenuti dai campioni 2 e 72, *Vegetation Island*, clusterizzano in un ulteriore sottogruppo. Fa eccezione il solo campione 72A il quale si trova all'interno di un altro sottogruppo, piuttosto distante. Ciò potrebbe essere spiegato con la presenza di una comunità batterica differente all'interno di questo che non riflette il profilo che invece si osserva in tutti gli altri sotto campioni e campioni derivanti da *Vegetation Island*. Anche i profili ottenuti per *Richard Nunatak* clusterizzano insieme.

Il dendrogramma ottenuto con il coefficiente di Pearson riflette le differenze che si osservano all'interno dei tre siti studiati.

I campioni derivanti da *Vegetation Island* sono quelli maggiormente diversificati, clusterizzando in un gruppo separato rispetto agli altri due siti. Ciò potrebbe dipendere dalla posizione del sito. *Vegetation Island* è un'isola prossima alla costa la quale durante il periodo estivo è priva di copertura

nevosa e parte della sua superficie è ricoperta da licheni epilitici. Quindi, queste condizioni meno estreme potrebbero favorire lo sviluppo di una comunità microbica maggiormente differenziata.

I risultati ottenuti mostrano come la struttura delle comunità batteriche sia caratteristica per ogni sito e come all'interno di ognuno e dei sottogruppi A, B, C non ci siano differenze rilevanti che fanno sì che i loro profili possano clusterizzare in posizioni differenti dal gruppo a cui appartengono.

Per comprendere se e come la comunità batterica cambi all'interno del micro ambiente roccioso sono stati analizzati separatamente i profili di DGGE di ogni sito confrontando i risultati ottenuti dalle due differenti rocce campionate nella stessa località, il profilo ottenuto dall'unione dei due e i profili dei tre sottogruppi, A, B, C.

In figura 45 a, b, c sono riportate le foto del gel di DGGE per ogni sito elaborate mediante il software Quantity One il quale ha confrontato i profili permettendo di indicare le bande comuni a tutti e quelle presenti solo in alcuni. Le bande evidenziate dal colore verde, *standard*, sono quelle che fanno da riferimento e permettono il confronto o match con le altre. Le bande che si troveranno nella stessa posizione verranno contrassegnate automaticamente con lo stesso numero e avranno colore rosso. Ciò ad indicare che rappresentano la stessa banda e potrebbero essere la stessa specie.

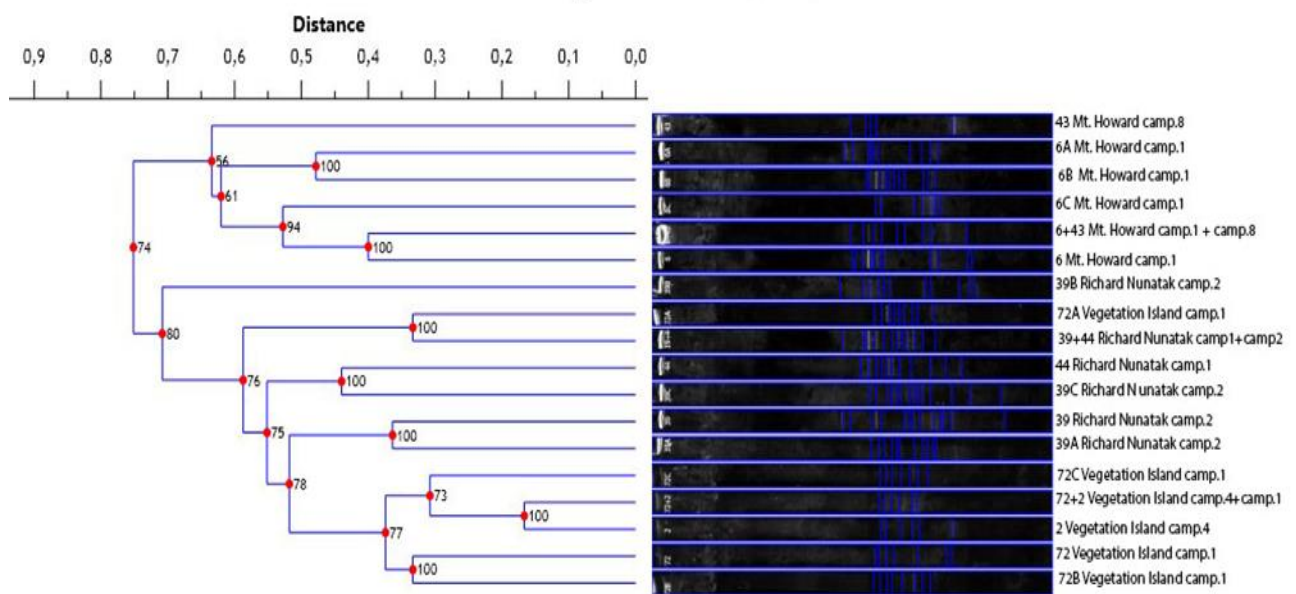
I risultati ottenuti mostrano come i campioni rocciosi siano caratterizzati da profili differenti e quindi caratterizzati da comunità batteriche diverse.

Richard Nunatak (a) presenta bande comuni a più profili, ma nessuna la si ritrova contemporaneamente in tutti e sei i campioni del sito. Anche i tre sotto campioni A, B, C, pur avendo profili molto simili, sono caratterizzati da piccole differenze. Questo risultato lo si osserva anche per gli altri siti, *Mt Howard* e *Vegetation Island*.

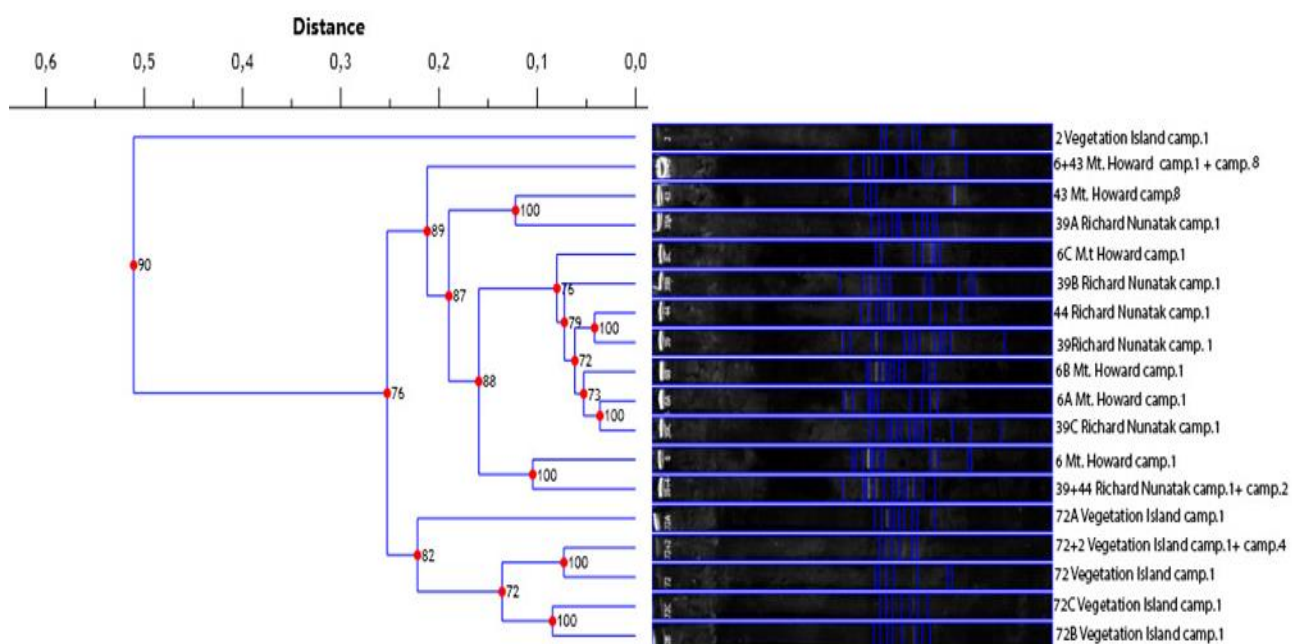
Il sito *Vegetation Island* (c) mostra un'elevata eterogeneità all'interno dei profili rivelando come non compaiono bande comuni a tutti i campioni. Ad esempio le bande 9 e 17 compaiono in tutti i profili fatta eccezione per il campione 2.

Il sito *Mt. Howard* (b) è quello caratterizzato da una comunità con una distribuzione più simile all'interno dei 6 campioni. Alcune bande, come ad esempio la 1, 8, 11, 20, sono presenti in quasi tutti i campioni indicando la presenza di specie uguali in tutti i micro ambienti rocciosi del sito.

I risultati ottenuti sembrerebbero descrivere la roccia antartica come un ambiente caratterizzato da numerosi micro habitat all'interno dei quali si sviluppano numerose comunità batteriche particolari. Quindi le estreme condizioni che caratterizzano il continente Antartide fanno sì che anche piccole differenze nell'esposizione e nell'inclinazione della roccia definiscano se e come la roccia venga colonizzata.



(a)



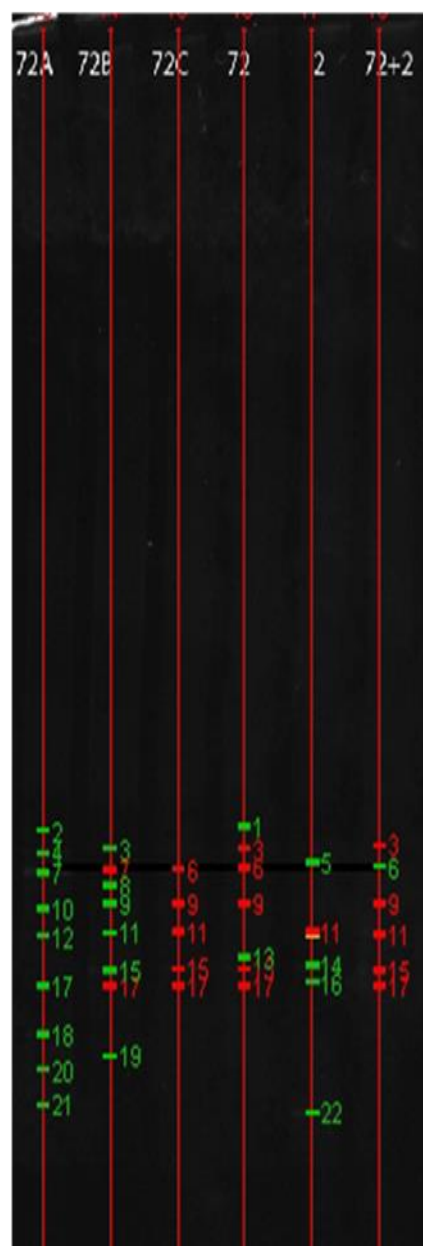
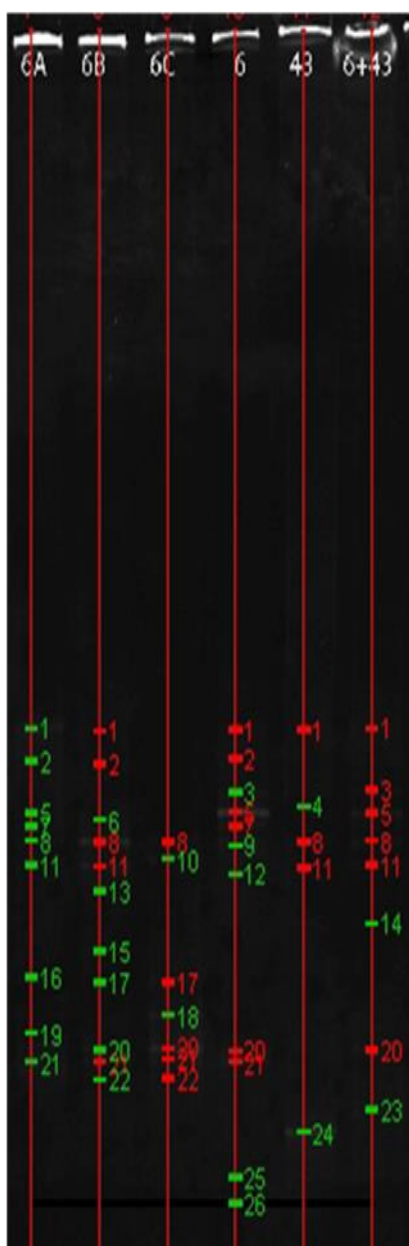
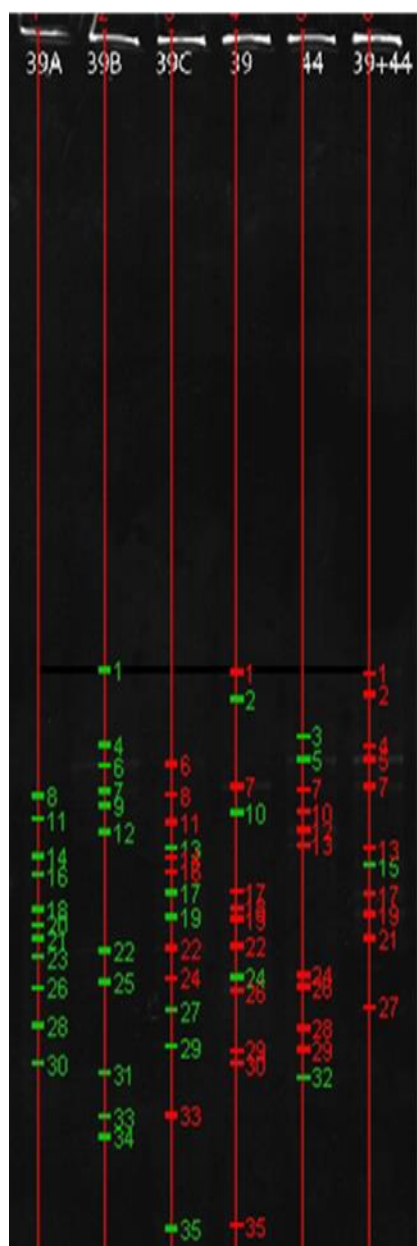
(b)

Fig. 44. Comparazione delle bande del gel di DGGE mediante il coefficiente di similitudine di Dice (a) e il coefficiente di Pearson (b). I dendrogrammi sono stati costruiti applicando il metodo UPGMA (Underweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean). Nella costruzione del dendrogramma non sono riportati i marker. I campioni sono identificati con il codice con il quale è stata condotta la DGGE e il nome del sito di provenienza.

Richard Nunatak

Mt. Howard

Vegetation Island



(a)

(b)

(c)

Fig.45. Profili di DGGE con match tra le bande dei siti Richard Nunatak (a), Mt.Howard (b) e Vegetation Island (c) in cui è stata osservata la comunità nel micro e macro ambiente roccioso.

4.2.2.3 Analisi della comunità: indici di diversità del micro e macro ambiente roccioso

Gli indici di biodiversità e ricchezza calcolati per i siti *Richard Nunatak*, *Mt.Howard* e *Vegetation Island* evidenziano dei campioni caratterizzati da un'elevata diversità confermando i risultati ottenuti dall'analisi del confronto dei profili di uno stesso sito attraverso il software Quantity One.

In tabella 17 sono riportati i valori dei differenti indici per ogni sito e per i sotto campioni. Ogni micro ambiente è caratterizzato da valori notevoli di biodiversità e ricchezza confermando che non è possibile descrivere una comunità batterica uguale per nessun sotto campione o nelle due rocce derivanti dallo stesso sito.

Nel sito *Richard Nunatak* i valori più alti per la Ricchezza e di Ricchezza ponderata sono registrati nel campione 39C e 39 rispettivamente e non per il campione ottenuto dalla somma delle due rocce 39+44, come ci si sarebbe aspettati. Inoltre, anche per gli indici che descrivono la biodiversità i risultati più alti si ottengono nei sotto campioni e non per il campione dato dalla somma delle due rocce. Questi risultati si osservano anche per gli altri due siti evidenziando che non esiste una corrispondenza tra il numero di specie presenti nei vari profili e il tipo di campione. Inoltre, i valori ottenuti mostrano che nel campione derivante dall'unione delle due rocce (39+44; 2+72; 6+43) non necessariamente si registra il profilo più ricco e diversificato.

In figura 46 sono riportati gli istogrammi che rappresentano la Ricchezza (numero di bande) di ognuno dei 6 micro ambienti che caratterizzano i siti studiati. I tre grafici mostrano come ogni micro habitat sia caratterizzato da un numero differente di bande e che non ci sia uniformità all'interno di uno stesso sito.

Questi risultati rafforzano l'ipotesi che gli ambienti rocciosi antartici siano l'insieme di numerosi micro habitat e che la roccia rappresenti un complesso ecosistema in cui osservare numerose e differenti comunità batteriche.

Tabella 17. Indici di biodiversità e ricchezza calcolati per i campioni rocciosi dei siti Richard Nunatak, Mt. Howard e Vegetation Island rappresentanti il micro e macro ambiente roccioso.

<i>codice</i>	<i>sito di campionamento</i>	<i>n°</i>	<i>Rr</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>Si</i>	<i>D₁</i>
39A	Richard Nunatak sito3 camp.2	11	24,2	0,64	0,98	2,35	0,9	1,14
39B	Richard Nunatak sito3 camp.2	11	43,56	0,74	0,99	2,37	0,9	1,13
39C	Richard Nunatak sito3 camp.2	14	62,72	0,61	0,94	2,48	0,92	1,44
39	Richard Nunatak sito3 camp.2	13	67,6	0,74	0,99	2,54	0,92	1,33
44	Richard Nunatak sito3 camp.1	11	29,04	0,57	0,98	2,35	0,9	1,14
39+44	Richard Nunatak sito3 camp.2+ camp.1	13	40,56	0,58	0,98	2,53	0,91	1,33
6A	Mt. Howard sito2 camp.1	9	17,82	0,45	0,93	2,04	0,85	0,93
6B	Mt. Howard sito2 camp.1	11	29,04	0,55	0,97	2,32	0,89	1,14
6C	Mt. Howard sito2 camp.1	7	17,64	0,61	0,97	1,89	0,84	0,71
6	Mt. Howard sito2 camp.1	11	38,72	0,76	0,99	2,3	0,9	1,08
43	Mt. Howard sito2 camp.8	5	8,5	0,94	0,96	1,52	0,77	0,49
6+43	Mt. Howard sito2 camp.8 + camp.1	8	16,64	0,64	0,97	2,03	0,86	0,83
72A	Vegetation Island camp.1	9	14,58	0,71	0,98	2,16	0,88	0,86
72B	Vegetation Island camp.1	8	10,24	0,54	0,98	2,04	0,86	0,73
72C	Vegetation Island camp.1	5	1,5	0,77	0,98	1,58	0,79	0,54
72	Vegetation Island camp.1	7	4,9	0,78	0,99	1,93	0,85	0,72
2	Vegetation Island camp.4	6	5,76	0,76	0,98	1,76	0,82	0,61
72+2	Vegetation Island camp.4 + camp.1	6	4,32	0,7	0,98	1,76	0,82	0,6

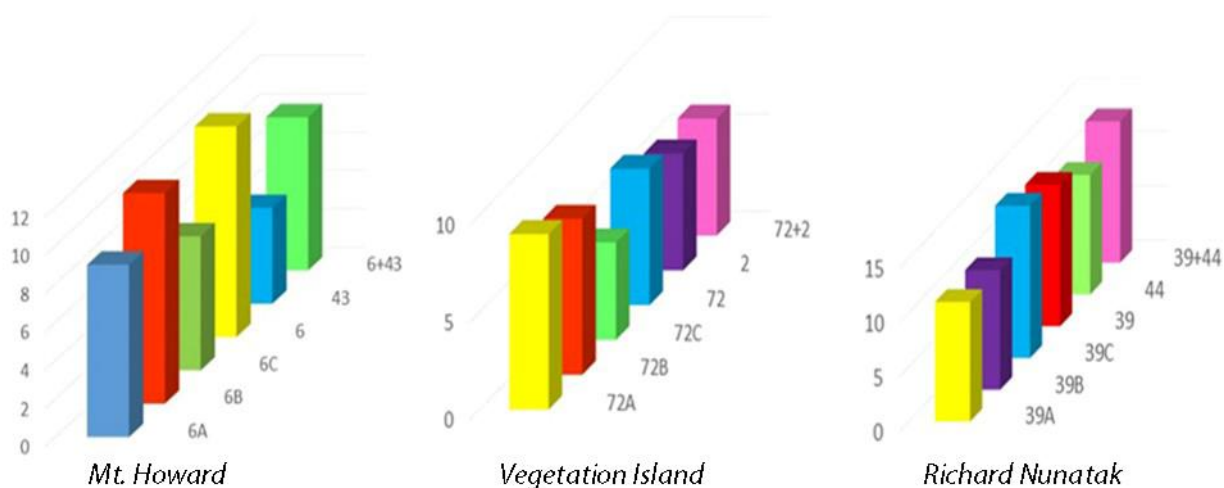


Fig.46. Rappresentazione grafica dell'indice di ricchezza dei siti, Mt. Howard, Vegetation Island e Richard Nunatak per i quali è stato condotto uno studio sul micro e macro ambiente roccioso.

4.2.2.4 Affiliazione tassonomica e studio filogenetico

L'analisi mediante DGGE dei 70 campioni rocciosi ha evidenziato profili con numerose bande e di queste 61 sono state excise dal gel, ri-amplificate e i prodotti di PCR sono stati sequenziati. Le sequenze sono state confrontate con quelle depositate in banca dati NCBI GenBank (tabella 18) e utilizzate per l'analisi filogenetica.

I risultati ottenuti hanno mostrato come l'84% delle sequenze non presentava similitudine con specie e/o generi noti. In particolare, il 46% erano simili a sequenze depositate in banca dati come "Uncultured bacterium", il 25% presentano maggiore similarità con sequenze di specie non coltivabili appartenenti a generi conosciuti e il 13% non mostravano alcuna similarità con sequenze depositate e questo non permetteva l'attribuzione ad alcuna specie nota.

Solo il 16% delle sequenze era riconducibile a generi e/o specie note.

Questi risultati possono essere spiegati considerando che molte delle sequenze depositate derivano da studi di fengerprinting molecolare che si basano sullo studio di target genici altamente variabili, ma non particolarmente lunghi, come la regione ipervariabile V3 lunga 200 pb. Questi target potrebbero in alcuni casi non permettere né un'attribuzione delle sequenze né consentire di ottenere alti valori di similarità con le specie note. Inoltre, ad oggi, le conoscenze sulla biodiversità presente nelle comunità endolitiche antartiche e in particolare quella batterica sono ancora molto limitate e numerose generi e specie ancora non sono state scoperte, studiate e classificate (Murray e Grzymski, 2007).

Il sequenziamento e l'identificazione delle bande ha permesso di svolgere un'analisi filogenetica così da mostrare se e quali siano i rapporti esistenti tra i vari ceppi presenti nei campioni rocciosi. L'albero filogenetico (Fig.47) è stato costruito allineando le 61 sequenze e utilizzando il criterio del Maximum Likelihood.

Il dendrogramma è caratterizzato dalla presenza di due cluster fondamentali. Nel primo sono presenti la maggior parte delle sequenze, mentre nel secondo cluster si trovano solo le sequenze B01, B04 e B25 affini a sequenze depositate in banca dati come batteri non coltivabili.

All'interno del primo cluster è possibile individuare due differenti gruppi di cui uno costituito solo da una sequenza, B02, con la quale non è stato possibile ottenere nessuna affiliazione in GenBank. La sequenza potrebbe essere attribuita ad un genere completamente nuovo che non presenta nessuna similitudine con quelli fino ad ora scoperti e depositati.

All'interno del cluster più grande si trovano le sequenze B08 e B09 le quali mostrano la maggiore similarità con il genere *Friedmaniella*. Il genere *Friedmaniella* fu introdotto per la prima volta da

Schumann et al. nel 1997 e comprende specie isolate in Antartide (Schumann et al., 1997; Lawson et al., 2000), in campioni di fango (Maszenan et al., 1999), tele di ragno (Iwai et al., 2010) e suolo (Zhang et al., 2013).

All'interno del gruppo dei *Friedmaniella* si trovano anche due bande, B58, la quale non presenta affinità con nessuna sequenza depositata e B55, la quale ha una maggiore similarità con la sequenza di un batterio non coltivabile. Ognuno di essi si trova su un ramo a se indicando che pur trovandosi nello stesso sottogruppo presentano delle evidenti differenze. Come per molte altre bande si potrebbe trattare di sequenze appartenenti a batteri non ancora classificati tassonomicamente.

Le bande B41, B42, B43, B45, B46, le quali presentano la maggiore similarità con la sequenza di un batterio non coltivabile, JN909514, clusterizzano nello stesso sottogruppo con un valore di bootstrap significativo, 99. Questo lascia ipotizzare che si tratti di sequenze uguali affiliabili allo stesso batterio non ancora identificato.

B53 e B57 sono sequenze che mostrano una maggiore similarità con il genere *Brevundimonas*, il quale è stato ampiamente descritto in numerosi lavori che delineano le comunità batteriche del suolo antartico (Saul et al., 2005; Smith et al., 2006; Aislabie et al., 2006; Aislabie et al., 2008).

Tra le sequenze analizzate è presente anche la specie *Pseudomonas geniculata*, B05. Questa raggruppa insieme alla sequenza, B25, la quale mostra la maggiore similarità con un batterio non coltivabile. Quest'ultima trovandosi nel gruppo di *P. geniculata* potrebbe appartenere al genere *Pseudomonas* e rappresentare una specie non ancora descritta.

Le sequenze B18 e B29, le quali clusterizzano all'interno di uno stesso sottogruppo, presentano la maggiore similarità con due sequenze depositate in GenBank come appartenenti al genere *Bradyrhizobium*. Numerosi studi riportano la presenza del genere *Bradyrhizobium* nei suoli antartici (Hirsch et al., 2004; Anitori et al., 2011; Strauss et al., 2012). All'interno dell'albero quattro sequenze, B15, B16, B17, B23, presentano la maggiore similarità con sequenze appartenenti a specie non coltivabili del genere *Rhodopseudomonas*. Le sequenze si trovano all'interno di un unico sottogruppo nel quale la sequenza B15 clusterizza su un ramo leggermente più lungo. Le specie appartenenti al genere *Rhodopseudomonas* sono caratterizzate da una scarsa correlazione fenotipica e genotipica che molto spesso ostacola il riconoscimento tra specie affini e l'attribuzione di nuovi ceppi a questo genere (Okamura et al., 2009; Kumar et al., 2013). Questo potrebbe spiegare la loro distribuzione nell'albero.

Nel primo cluster si trovano anche due sequenze riconducibili al genere *Stenotrophomonas*, B12 e B36. Le due sequenze clusterizzano all'interno dello stesso sottogruppo pur distribuendosi su rami differenti facendo ipotizzare che si tratti di specie differenti appartenenti allo stesso genere. Il genere *Stenotrophomonas* precedentemente descritto come *Xanthomonas* (Hasan-Beikdashti et al., 2012),

comprende specie ampiamente distribuite in numerosi habitat del suolo e dell'acqua (Roder et al., 2005; Hasan-Beikdashti et al., 2012). La sequenza B36 mostra un'elevata similarità a sequenze della specie *S. maltophilia*, la quale è descritta in numerosi studi (Zhang e Yuen 2000; Guan et al. 2008; Lee et al., 2014, Hagiya et al., 2014).

La presenza di una percentuale così alta di sequenze affini a specie non coltivabili non permette di capire con chiarezza quali siano i principali rappresentanti delle comunità endolitiche antartiche. D'altro canto una quantità così elevata di sequenze riconducibili a batteri non coltivabili lascia intendere come le conoscenze su questa tipologia di comunità siano ancora molto scarse e insufficienti per delineare un quadro generale chiaro e dettagliato. I risultati ottenuti descrivono tre situazioni differenti. In un primo caso sono presenti sequenze riconducibili a specie non coltivabili, ma generi noti indicando che con buona probabilità si tratti di specie nuove ancora non caratterizzate. Una seconda circostanza descrive sequenze che mostrano una maggiore omologia con ceppi le cui sequenze sono affini a batteri non coltivabili. In questo caso si potrebbe parlare non solo di nuove specie, ma anche di nuovi generi. Infine, le sequenze che non mostrano alcuna similarità in banca dati sono probabilmente sequenze di batteri che fino ad ora non sono mai state individuate e con cui non è possibile fare un raffronto in banca dati.

In passato, i primi studi di diversità batterica di terreni antartici erano ostacolati dal fatto che molte tecniche risultavano inappropriate nel descrivere la biodiversità complessiva. Oggi la disponibilità di metodi coltura-indipendenti come numerose tecniche di fingerprinting molecolare aiutano nell'analisi permettendo di ottenere innumerevoli sequenze che arricchiscono le conoscenze che si hanno su quest'ambiente. Se si confrontano studi condotti sulla biodiversità batterica delle regioni costiere delle Valli Secche basati su tecniche coltura indipendenti e tecniche colturali si osserva come nel primo caso si ottengano risultati molto più diversificati che indicano una biodiversità molto più ampia ed eterogenea (Saul et al., 2005; Smith et al., 2006; Aislabie et al., 2006; Aislabie et al., 2007). Ciò conferma la necessità di rafforzare e di ampliare ulteriormente le informazioni che fino ad ora sono presenti in letteratura per permettere di ottenere un quadro molto più dettagliato di ciò che è la biodiversità all'interno delle comunità endolitiche antartiche.

I risultati ottenuti descrivono le comunità endolitiche antartiche non necessariamente rappresentate solo da batteri endemici, ma anche da generi noti isolati da altri ambienti. Sicuramente questi batteri pur essendo riconducibili a generi classificati presentano delle caratteristiche che li discostano dalle specie mesofile soprattutto per la capacità di essersi adattati a condizioni che per altri organismi rappresenterebbero la morte.

Ciò nonostante la componente più abbondante delle comunità litiche batteriche è rappresentata da un numero piuttosto elevato di individui che risultano essere completamente nuovi, non ancora

identificati e classificati. Probabilmente molte di queste specie e generi sono endemiche e studi successivi potrebbero confermare la loro presenza solo in ambiente antartico e permettere una loro identificazione.

Tabella 18. Bande excise dal gel di DGGE dei 70 campioni di roccia delle Valli Secche e comparazione con le sequenze depositate in NCBI GenBank.

<i>Banda</i>	<i>Specie</i>	<i>Accession number</i>	<i>Query coverage %</i>	<i>max identity %</i>
1	Uncultured bacterium	AY811159	98	100
2	no similarity			
3	Uncultured bacterium	AJ295641	87	82
4	Uncultured bacterium	AB810804	99	100
5	Pseudomonas geniculata	KC707530	98	99
6	Uncultured bacterium	JQ190426	95	86
7	Uncultured bacterium	JF137199	94	87
8	Friedmanniella sp.	JQ977409	79	89
9	Friedmanniella sp.	JQ977410	85	90
10	Uncultured Bacteroidetes bacterium	EF220145	97	99
11	no similarity			
12	Stenotrophomonas sp.	EU374947	87	92
13	Ochrobactrum anthropi	KC195785	100	99
14	Uncultured bacterium	HM734339	91	97
15	Uncultured Rhodopseudomonas sp.	KF509566	98	98
16	Uncultured Rhodopseudomonas sp.	KF509567	97	99
17	Uncultured Rhodopseudomonas sp.	KF509568	96	98
18	Bradyrhizobium sp.	AY526226	100	97
19	Uncultured bacterium	JX810282	95	99
20	no similarity			
21	Uncultured bacterium	KF633429	93	97
22	no similarity			
23	Uncultured Rhodopseudomonas sp.	KF509566	96	93
24	Uncultured bacterium	JX810282	97	97
25	Uncultured bacterium	KC764186	95	94
26	Uncultured bacterium	HM278520	97	97
27	Uncultured bacterium	GQ476540	87	93
28	Uncultured Stenotrophomonas sp.	EU097213	100	99
29	Uncultured Bradyrhizobium sp.	FJ447944	97	98
30	Uncultured bacterium	HM663322	99	96
31	Uncultured bacterium	JX810282	92	99

32	Uncultured bacterium	HM716607	96	99
33	Uncultured bacterium	GQ115261	82	86
34	Uncultured bacterium	HM716607	96	99
35	Uncultured Bacteroidales bacterium	EF695876	78	85
36	Stenotrophomonas maltophilia	KF254518	97	96
37	Uncultured Stenotrophomonas sp.	EU112388	97	93
38	Uncultured bacterium	JN509723	61	88
39	Uncultured Bacteroidales bacterium	EF220145	96	98
40	Uncultured Hymenobacter sp.	KF507457	97	95
41	Uncultured microorganism	JN909514	95	98
42	Uncultured microorganism	JN909515	95	98
43	Uncultured microorganism	JN909516	95	98
44	Uncultured alpha proteobacterium	HM136562	99	99
45	Uncultured microorganism	JN909516	95	98
46	Uncultured microorganism	JN909516	95	98
47	Uncultured bacterium	JX855634	95	96
48	Uncultured bacterium	JX855634	91	89
49	no similarity			
50	Uncultured bacterium	JX855636	91	89
51	no similarity			
52	Uncultured Acidobacteria bacterium	GQ351378	69	84
53	Uncultured Brevundimonas sp.	KF509597	98	93
54	Uncultured Flavobacteriaceae bacterium	KF419697	76	83
55	Uncultured bacterium	HE984745	89	86
56	Uncultured bacterium	HE984746	89	86
57	Brevundimonas sp.	KF220434	100	97
58	no similarity			
59	no similarity			
60	Uncultured bacterium	HM719678	99	99
61	Uncultured bacterium	JQ781310	93	96

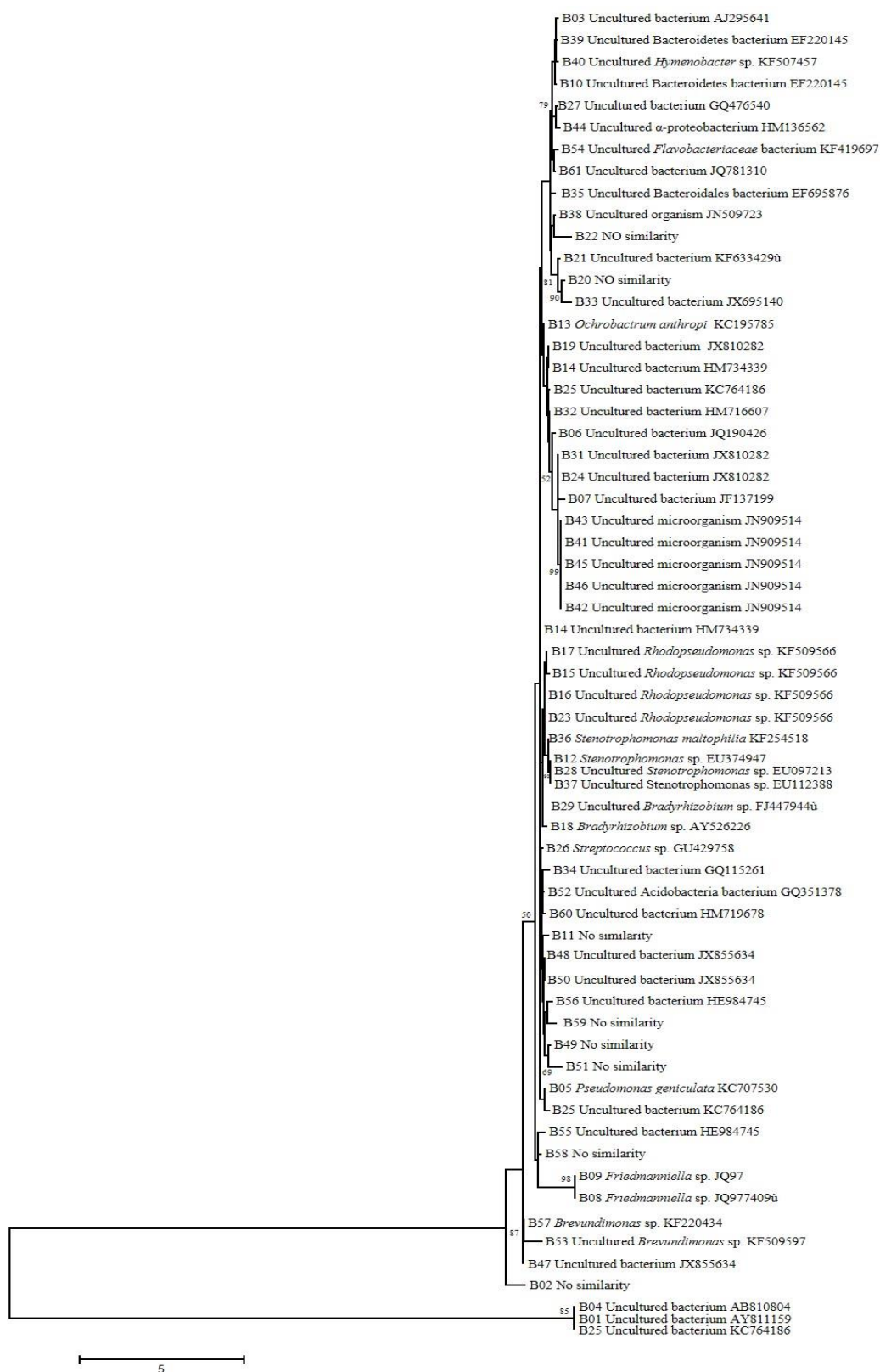


Fig.47. Albero filogenetico raffigurante i rapporti tra le sequenze delle bande excise dal gel di DGGE delle 70 rocce campionate nelle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria. L'albero filogenetico è stato costruito allineando le 61 sequenze e utilizzando il criterio del Maximum Likelihood.

4.2.2.5 Analisi della comunità batterica endolitiche: indici di diversità

In ecologia esistono numerose definizioni di Biodiversità, ma una particolarmente nota fu introdotta da Legendre nel 1983 che descrive la Biodiversità come una misura dell'importanza delle diverse specie in un ecosistema in termini di abbondanza relativa. Quindi, la Biodiversità è il risultato della reciproca influenza di due elementi fondamentali: la ricchezza specifica o varietà e l'uniformità o evenness.

Anche per i campioni rocciosi, come nel caso dei campioni marini, sono stati calcolati sette differenti indici: Ricchezza, Ricchezza ponderata, indice di Shannon, di Simpson, di Evenness, di Stabilità e di Margalef. Inoltre, per i profili di DGGE sono state utilizzate le curve di Pareto-Lorenz per lo studio dell'organizzazione funzionale delle comunità batteriche.

Il software Quantity One ha permesso l'individuazione di 623 bande nei 5 gel di DGGE delle 70 rocce totali antartiche ed è stato possibile registrare per ogni banda un valore di intensità relativa. In tabella 19 sono riportati tutti i risultati ottenuti dai vari indici calcolati.

La *Ricchezza* rappresentata dal numero di bande di un profilo e la *Ricchezza ponderata* (R_r), calcolata sul numero totale di bande all'interno del gradiente chimico denaturante presente tra la prima e l'ultima banda del profilo, permettono di ottenere, attraverso approcci differenti, informazioni quantitative sui campioni studiati. Come mostrato in figura 48, in cui sono raffigurati graficamente i due indici di ricchezza, si nota che il campione *Eskimo Point* (55) presenta il più alto valore non solo nel numero di bande, 17, ma anche per la Ricchezza ponderata, 115.1. Anche *Mt. Dickason* (70) presenta un numero elevato di bande nel profilo di DGGE, ma il suo valore di R_r non è tra i più alti, riflettendo una minore eterogeneità nelle specie batteriche. *Kay Island* al contrario, presenta 14 bande lungo il profilo con un valore di R_r di 101.92. Questi risultati sono spiegati dal fatto che la ricchezza è il semplice numero di bande in un profilo e non considera altri fattori come invece fa la Ricchezza ponderata che valuta non solo il numero di bande ma anche l'intervallo in cui si distribuiscono. L' R_r permette di correlare il gradiente chimico denaturante con la distribuzione delle bande esprimendo come un intervallo più ampio di distribuzione delle bande all'interno del gel delini un ambiente maggiormente favorevole allo sviluppo della comunità batterica (Marzorati et al., 2008). Considerando i valori di R_r per tutti i siti e in particolare *Mt. Dickason*, e *Kay Island*, il primo un campione prelevato da un ambiente montuoso e l'altro da una regione costiera, non si può ipotizzare una relazione tra la Ricchezza e la posizione geografica. Inoltre, osservando i campioni che presentano il maggior numero di bande, non sembra esserci una correlazione tra tipologia di roccia e Ricchezza nella comunità batterica colonizzante.

L'indice di *Margalef* è un indice di ricchezza, il quale ha differenza degli altri indici di ricchezza che considerano l'intensità relativa della banda lungo il profilo di DGGE, fa riferimento all'intensità assoluta. Anche per questo indice i siti *Mt. Dickason* 70 e *Eskimo Point* 55 presentano i valori più alti confermando i risultati precedenti descrivendo questi due siti come quelli caratterizzati dalla maggiore ricchezza e biodiversità se confrontati con gli altri 70 campioni.

Gli indici di *Shannon* e *Simpson* consentono di ottenere informazioni sulla biodiversità microbica riflettendo non solo quante specie sono presenti nel profilo, ma anche il numero, come abbondanza relativa, di individui che appartengono alla stessa specie.

Tutti i campioni rocciosi sono caratterizzati da valori alti sia per l'indice di Shannon che Simpson descrivendo quindi un'elevata diversità. In particolare, la maggiore biodiversità si osserva per i campioni *Mt Nansen* 28, *Wishbone ridge* 56, *Olson Nunatak* 59, *Mt McGee* 68 e *Mt Dickason* 70.

Gli indici di *Pielou's evenness* e di *Stabilità* descrivono rispettivamente l'uniformità e la stabilità di una comunità microbica.

Il 74% dei siti presenta valori di uniformità (*evenness*) superiori allo 0.90 esprimendo così comunità batteriche ben equiripartite e diversificate in cui sono presenti poche specie dominanti. Inoltre, otto siti: *Stewart Heights* 45, *Mt. Howard* 43, *Mt keinath* 41, *Pudding butle* 40, *Inexpressible island* 38, *Mt Nansen* 28, *Battleship promontory* 26, *Mt. Larsen* 7, registrano il massimo valore di *evenness*, 1. Anche per l'indice di stabilità la maggior parte dei siti, 87%, registra dei valori superiori allo 0.50 descrivendo comunità batteriche stabili. Questi risultati rafforzano le conclusioni a cui si è giunti attraverso l'indice di uniformità secondo il quale le comunità batteriche endolitiche studiate sono comunità stabili, ben organizzate nell'ambiente in cui si trovano a vivere.

Tabella 19. Indici di biodiversità e ricchezza calcolati per i campioni rocciosi raccolti nelle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria.

<i>codice</i>	<i>sito campionamento</i>	<i>n°</i>	<i>Rr</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>Si</i>	<i>D₁</i>
1	Campo Icaro	9	25,92	0,58	0,95	2,01	0,86	14,42
2	Vegetation island	10	34,56	0,72	0,98	2,23	0,89	15,42
3	Putting Butte	6	8,96	0,52	0,92	1,66	0,78	10,85
4	Harrow peak	6	6,48	0,81	0,98	1,76	0,82	10,87
5	Ambalada peak	9	19,44	0,51	0,95	2,09	0,86	14,26
6	Mt. Howard	7	26,62	0,81	0,98	1,92	0,84	11,96
7	Mt. Larsen	6	18	0,67	1	1,92	0,81	10,79
8	Random hills	7	37,44	0,83	0,99	1,93	0,85	11,13
9	Timber peak	8	72	0,66	0,98	2,03	0,86	12,97
10	Mt. New-Zeland	8	34	0,8	0,99	2,05	0,87	13,1
11	Thern promontory	11	54,88	0,59	0,86	2,06	0,91	16,41
12	Mt. Haward	4	4,32	0,92	0,97	1,35	0,73	8,43
13	Prior Island	5	6,86	0,63	0,94	1,52	0,76	9,64
14	Mt. McGee	4	2,56	0,78	0,97	1,34	0,73	8,48
15	Mt. Billing	6	21,76	0,66	0,96	1,72	0,81	10,93
16	Bobby Rock	5	15,68	0,6	0,95	1,53	0,76	9,7
17	Mt. Bowen	8	34	0,43	0,93	1,94	0,83	13,21
18	Mt. Dickason	7	81	0,75	0,98	1,91	0,84	12,38
19	Ford peak	14	32	0,72	0,99	2,61	0,92	19,99
20	Timber Peak	8	33,88	0,57	0,96	2	0,85	13,41
21	Trio Nunatak	6	28	0,59	0,95	1,71	0,8	11,07
22	Ricker Hills	10	6,86	0,64	0,98	2,25	0,89	15,67
23	Archambault Ridge	7	2,5	0,69	0,96	1,87	0,83	12,23
24	Anderson ridge	0	0	0	0	0	0	0
25	Shafer peak	5	14,5	0,62	0,93	1,5	0,76	9,8
26	Battleship promontory	3	1,8	0,72	1	1,58	0,79	7,33
27	Mt. Burrows	14	54,08	0,73	0,4	1,06	0,64	19,82
28	Mt Nansen	7	13,72	0,73	1	2,59	0,92	12,24
29	Starr Nunatak	6	10,8	0,38	0,98	1,76	0,79	11,04
30	McLea nunatak	0	0	0	0	0	0	0
31	McLea nunatak	8	23,04	0,66	0,83	1,73	0,81	13,38
32	Trio nunatak	8	11,76	0,67	0,97	2,01	0,86	14,02
33	Inexpressible island	8	23,5	0,51	0,95	1,99	0,85	13,32
34	Widow Makers pass	9	23,04	0,51	0,85	1,86	0,85	14,68
35	Archambault Ridge	8	24	0,41	0,98	2,05	0,85	13,49

36	Kay Island	9	101,92	0,54	0,89	1,96	0,84	14,48
37	Mt Nansen	9	29,04	0,4	0,89	1,97	0,83	14,61
38	Inexpressible island	7	11,52	0,53	1	2,09	0,86	12,31
39	Richard Nunatak	11	58,5	0,61	0,78	1,88	0,83	16,72
40	Pudding butle	9	26,62	0,51	1	2,26	0,88	14,57
41	Mt keinath	3	6,48	0,69	1	2,04	0,85	7,3
42	Archambault Ridge	8	37,44	0,7	0,5	1,04	0,63	13,41
43	Mt. Howard	6	5,88	0,53	1	1,98	0,85	11,28
44	Richard Nunatak	10	20	0,44	0,71	1,64	0,78	14,74
45	Stewart Heights	7	24,2	0,43	1	2,18	0,87	12,49
46	Mt. Adamson	8	29,4	0,67	0,91	1,9	0,84	13,55
47	Stewart Hights	12	36,3	0,53	0,81	2,01	0,85	17,73
48	Ricker Hills	12	57,46	0,52	0,97	2,42	0,9	17,71
49	Mt. Nansen	11	29,04	0,69	1	2,43	0,9	16,63
50	Chisholm hills	11	26,62	0,68	0,97	2,33	0,9	16,66
51	Chishlom hills	11	38,72	0,58	0,98	2,35	0,89	16,71
52	Pinkard table	13	60,84	0,62	0,9	2,31	0,9	18,74
53	Bier point	12	81,12	0,56	1	2,5	0,91	17,72
54	Mt. Meister	12	48,96	0,61	0,97	2,41	0,9	17,72
55	Eskimo point	17	115,6	0,66	0,85	2,43	0,9	23,05
56	Wishbone ridge	9	42,12	0,6	1	2,99	0,93	14,4
57	Campo icaro	8	37,12	0,65	1	2,17	0,88	13,25
58	Reed Nunatak	14	54,88	0,42	0,73	1,94	0,83	19,7
59	Olson Nunatak	11	48,4	0,7	1	2,59	0,92	16,6
60	Mt. Howard	13	67,6	0,73	0,92	2,37	0,9	18,77
61	Mt. Howard	12	43,2	0,67	1	2,52	0,91	17,67
62	Prior Island	13	50,96	0,58	0,95	2,44	0,9	18,69
63	Mt. Stephen	10	12	0,75	1	2,53	0,91	15,43
64	Mt. Billing	9	29,16	0,71	1	2,26	0,89	14,26
65	Bobby Rocks	11	19,36	0,6	0,89	2,13	0,87	16,56
66	Unnamed site	12	40,32	0,59	0,94	2,35	0,9	17,59
67	Tinker glacier	14	58,8	0,63	0,91	2,41	0,9	19,64
68	Mt McGee	11	21,78	0,58	1	2,59	0,92	16,28
69	Shafer peak	14	67,5	0,58	0,88	2,34	0,89	19,65
70	Mt Dickason	17	75,14	0,52	0,91	2,58	0,91	22,7

Leggenda:

n°= numero di bande; Rr= ricchezza ponderata; S= indice di stabilità; E= indice di Pielou's evenness; H= indice di Shannon; Si= indice di Simpson; D1= indice di Margalef.

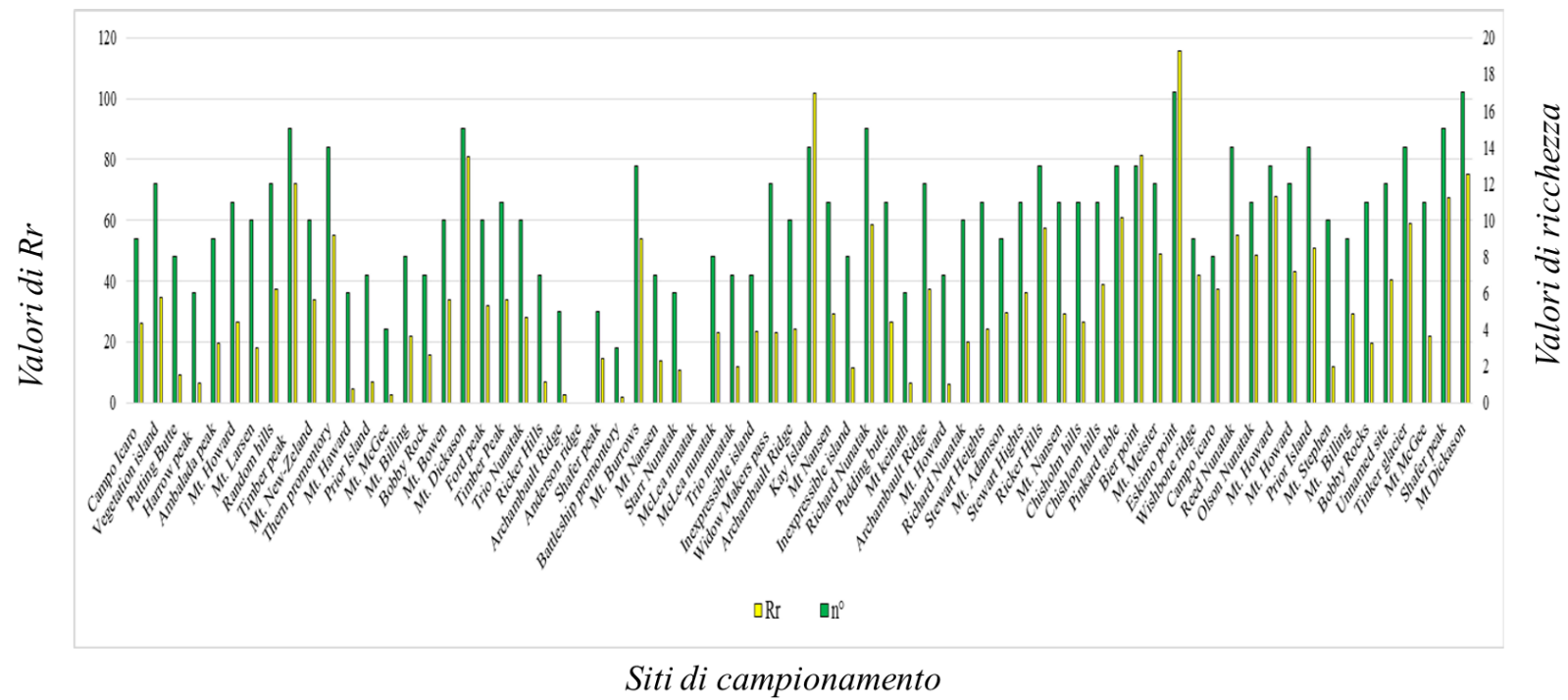


Fig.48. Grafico rappresentante la Ricchezza e la Ricchezza ponderata (Rr) delle 70 rocce antartiche campionate nei 57 siti.

Un'ulteriore indice che permette di comprendere la struttura di una comunità microbica è l'*organizzazione funzionale* (Fo). Come descritto precedentemente, Fo la si ricava tramite la costruzione di specifiche curve in cui si considera l'intensità e in numero di bande cumulative lungo un profilo di DGGE. In figura 49 sono riportate le curve di Pareto-Lorenz, suddivise per tipologia di roccia, calcolate per tutti i campioni. Inoltre all'interno del grafico è riportata anche la percentuale ricavata come valore medio delle curve che intersecano la verticale del 20%. Per i campioni di arenaria il valore medio è 32, per i graniti 36, per i quarziti 30, per i conglomerati di arenaria 25 e per le doleriti 30 ottenendo un valore medio di Fo di 30,6. Come precedentemente descritto, valori di organizzazione funzionale prossimi al 25% esprimono comunità con un'alta uniformità risultante dall'assenza di pressione selettiva. La comunità potrebbe necessitare di periodi piuttosto lunghi per reagire a possibili perturbazioni a causa dell'assenza di specie particolarmente dominanti.

I risultati ottenuti dal calcolo degli indici di biodiversità sembrerebbero descrivere delle comunità batteriche non particolarmente influenzate dalla posizione geografica del sito di raccolta né dalla tipologia di roccia. Le rocce campionate in siti più vicini alla costa, probabilmente contraddistinte da condizioni climatiche meno asperime, non sembrerebbero rappresentare un'habitat più ospitale per le comunità batteriche se confrontate con quelle raccolte in siti più interni. Ciò è confermato dall'esempio di *Mt. Dickason*, e *Kay Island*. Questo rafforza i risultati ottenuti anche dall'indice di Pielou's evenness che descrive queste comunità endolitiche come particolarmente uniformi e differenziate.

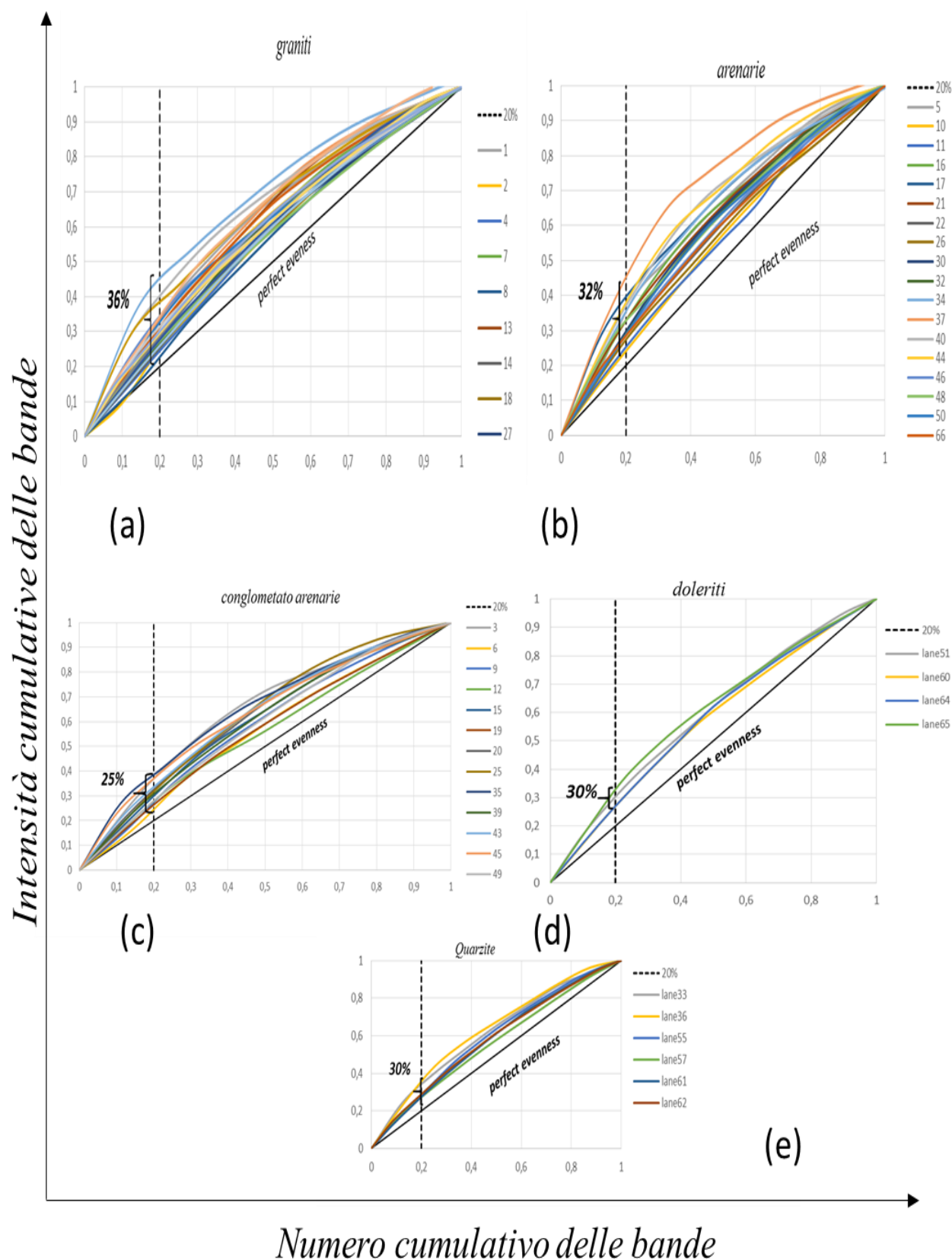


Fig.49. Rappresentazione delle curve di Pareto-Lorenz delle comunità batteriche dei campioni rocciosi delle Valli Secche, Terra Vittoria. (a) campioni di granito; (b) campioni di arenaria; (c) campioni di conglomerato di arenaria; (d) campioni di dolerite; (e) campioni di quarzite.

4.2.2.6 Analisi statistica multivariata dei campioni rocciosi

Al fine di comprendere come la ricchezza e la biodiversità calcolate per le comunità batteriche che colonizzano le 70 rocce studiate possano essere correlati ad alcuni fattori, è stata utilizzata l'analisi di orientamento NMDS (Non-Metric Multidimensional Scaling), la quale permette di produrre ordinamenti bidimensionali a carattere multivariato delle similarità tra campioni. L'analisi multivariata ha correlato le due variabili ambientali, distanza dal mare (km) e altitudine (m), al tipo di colonizzazione, alla porosità e al tipo di roccia.

In un precedente lavoro Zucconi et. al. (2014) hanno condotto uno studio di classificazione delle 70 rocce raccolte nelle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria durante la campagna 2010-2011 del progetto PNRA, nel quale è stato riportato non solo il tipo, ma anche la porosità della roccia e la tipologia di colonizzazione da parte delle comunità litiche.

In fig 49 sono riportati i risultati dell'analisi multivariata NMDS basata sulla matrice di similarità di Bray-Curtis (Bray e Curtis, 1957). Per ogni campione, la proiezione del punto su ognuno degli assi rappresenta la posizione del campione lungo quel gradiente ambientale. I risultati ottenuti presentano un valore di stress di 0.04.

L'analisi NMDS mostra come i due parametri ambientali, distanza dal mare e altitudine siano caratterizzati da vettori inversamente correlati tra loro, trovandosi su quadranti opposti. I campioni sembrano avere una distribuzione assolutamente casuale all'interno del grafico bidimensionale.

Le posizioni dei campioni all'interno del biplot non presentano un orientamento definito in cui è possibile individuare dei gruppi ben risolti, ma ogni campione risponde alle variabili in modo indipendente. I campioni 1, 37, 34, 46, 20, 10, 42, 8, 56, 9, 18, 53, 36 sembrerebbero essere influenzati positivamente dall'altitudine e negativamente dalla distanza dal mare. Osservando però in dettaglio le caratteristiche dei siti non sembrerebbero esserci elementi in comune. Ad esempio, il campione 1, *Campo Icaro* si trova a 0.1 km dal mare e a 60 m di altitudine; al contrario, il campione 42 *Archambauld Ridge* è stato campionato a 80 km dalla costa ad un'altitudine di 2725 m.

Al contrario, i campioni che si trovano nel quadrante in cui è posizionato il vettore distanza dal mare sembrerebbero essere influenzati positivamente da questa variabile e negativamente dall'altitudine. Anche in questo caso non è possibile descrivere una relazione chiara fra questo risultato e le coordinate del sito di campionamento.

Il 57% dei campioni si distribuiscono nel primo e secondo quadrante indicando quindi una correlazione positiva con la porosità, il tipo di roccia e la distanza dal mare, mentre subiranno un'influenza negativa da parte dell'altitudine e della colonizzazione.

I campioni 44 *Richard Nunatak*, 63 *Mt. Stephen* e 22 *Ricker Hills* sono distribuiti sul gradiente di orientamento del vettore distanza dal mare quindi saranno soggetti ad una maggiore influenza rispetto a tutti gli altri campioni. Il campione 34 *Olson Nunatak* è posizionato lungo il gradiente direzionale del vettore porosità descrivendo come sia maggiormente influenzato da questa variabile. Confrontando questo risultato con le informazioni contenute nel lavoro di Zucconi et al. (2014) il campione 34 è caratterizzato da un'elevata porosità a conferma del risultato ottenuto dall'analisi multivariata.

La colonizzazione influenza positivamente i campioni posizionati nel terzo e quarto quadrante. Dall'analisi condotta non è stato possibile delineare un quadro chiaro e risolto delle rocce antartiche e quali dei fattori presi in considerazione influenzino principalmente la distribuzione delle comunità batteriche endolitiche.

Ciò è dovuto al fatto che il campionamento condotto, pur essendo stato pianificato, nel momento in cui è avvenuta la raccolta delle rocce ha subito delle variazioni a causa delle complesse ed estreme condizioni che caratterizzano le terre antartiche. Ciò non ha permesso di rispettare quanto era stato deciso precedentemente e non è stato possibile rilevare le caratteristiche chimiche, fisiche, geologiche e biologiche dei vari siti di campionamento.

I risultati ottenuti descrivono un ambiente in cui numerose variabili e la combinazione di essi determinano la biodiversità e la ricchezza delle comunità. Risulta evidente come ogni campione sia correlato in modo differente alle variabili prese in considerazione lasciando supporre che non esista una suddivisione netta tra ciò che favorisce la colonizzazione e cosa no piuttosto ogni sito avrà una circostanza e un intervallo di variabili che lo contraddistinguono in modo specifico. Inoltre, è opportuno sottolineare il fatto che l'Antartide a differenza di numerosi altri ambienti presenta delle caratteristiche uniche in cui anche una variabile che in altri ambienti potrebbe risultare trascurabile in questo rappresenta un fattore limitante.

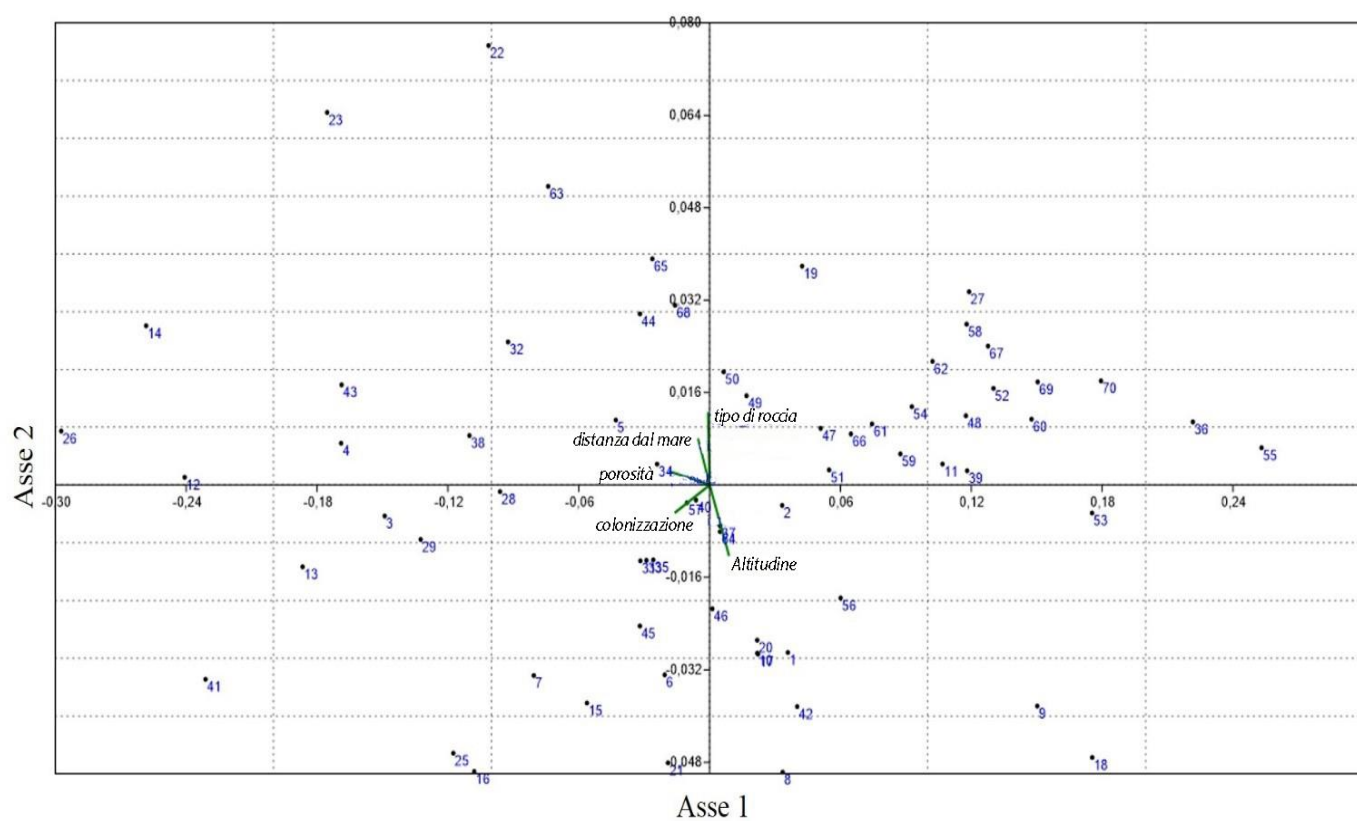


Fig.49. Orientazione NMDS basata sulla matrice di similarità di Bray-Curtis delle variabili distanza dal mare, altitudine, del tipo di colonizzazione, della porosità, del tipo di roccia e degli indici di biodiversità dei campioni rocciosi. I campioni sono rappresentati dal numero di DGGE (corrispondenza pag.128, tab. 15).

Capitolo V

CONCLUSIONI

L'Antartide è il più isolato dei continenti, si trova a 950 Km dal Sudamerica, 2300 Km dalla Tasmania, 2200 Km dalla Nuova Zelanda e 3600 Km dall'Africa. La superficie continentale è quasi completamente oltre il 60° parallelo e si estende per 13,9 milioni di km².

Il paesaggio antartico è percepito come remoto e distaccato non solo per il gelo, il candore, le tempeste, l'isolamento geografico, le luci crepuscolari, le aurore australi, ma soprattutto per la percezione di estraneità spaziale e temporale dei suoi paesaggi glaciali (Manzoni, 2001). L'Antartide è coperto dalla più grande calotta glaciale della terra la quale occupa il 98% del continente. La superficie rocciosa rimane nascosta sotto il ghiaccio e forma una topografia sepolta che comprende vasti bacini depressi e alte montagne di cui solo le cime più alte emergono come isole in mezzo al mare ghiacciato, i *Nunatak*. La calotta antartica si estende oltre le coste andando a coprire anche buona parte dei mari più interni galleggiandovi sopra per decine di chilometri.

I territori liberi dai ghiacci sono poco più del 2% della superficie complessiva e sono rappresentati principalmente da tratti costieri dell'estrema Penisola Antartica e dalle Valli secche di McMurdo all'interno di Terra Vittoria. Il paesaggio delle regioni deglacciate è fatto di rocce modellate dal ghiaccio o di terreni detritici in cui talvolta è possibile scorgere piccoli ruscelli parzialmente ghiacciati.

Il continente Antartide è circondato dall'oceano Antartico, l'unico oceano la cui estensione non è limitata da masse di terra continentale, bensì da masse d'acqua di diversa densità, salinità e temperatura. Le acque antartiche sono caratterizzate da basse temperature, alti valori di densità e ossigeno disciolto. Questi fattori, che hanno portato allo sviluppo di condizioni fisiche ed ecosistemi marini peculiari, sono determinate dal fenomeno della Convergenza Antartica. Questa è spesso definita come il vero confine dell'Antartide, soprattutto in relazione ai fenomeni oceanografici e biologici, essendo una linea di confine molto più realistica di quella del circolo antartico. Il limitato mescolamento fra le acque fredde interne alla Convergenza Antartica e quelle relativamente temperate esterne, rende il continente antartico sostanzialmente "isolato" e costituisce una barriera insormontabile per molti organismi marini, soprattutto di minori dimensioni. E' per questo motivo che a Sud della stessa si è formato un sistema di vita vegetale e animale del tutto particolare. Gran parte degli esseri viventi dell'Antartide sono endemici e non vivono in nessun altro posto del pianeta (O'Loughlin, 2011). Le terre emerse rappresentano un ambiente molto più ostile rispetto a quello

marino ed è per questo che il continente è quasi completamente privo di organismi viventi superiori e quasi completamente spoglio di vegetazione.

Le condizioni ostili date dalla povertà del suolo e la scarsa disponibilità di acqua allo stato liquido permettono la vita vegetale solo nei tratti costieri liberi dai ghiacci, così man mano che aumenta la latitudine e le condizioni climatiche diventano più avverse si assiste ad un declino della diversità delle specie osservabili. Nella vegetazione antartica prevalgono, così, quasi esclusivamente, muschi, licheni, epatiche e funghi. I suoli non sono evoluti ed ospitano una primitiva vegetazione che solo nell'estremità della Penisola comprende due specie di piante superiori, *Colobanthus quitensis* e *Deschampsia antarctica*.

La natura estrema dell'ambiente ha portato in passato a descrivere l'Antartide come un continente in cui la vita era quasi del tutto inesistente; oggi è noto che oltre agli organismi superiori, esiste un'abbondante vita microbica anche in quegli ambienti antartici più estremi in cui non si osservano altre forme di vita (Aislabie et al., 2006).

La colonizzazione del territorio antartico dipende dall'efficienza con la quale i microrganismi possono raggiungere il continente e quindi disperdersi ed adattarsi. Per far questo si possono avvalere di mezzi di dispersione per numero e variabilità più numerosi rispetto a quelli che hanno a disposizione gli organismi di maggiori dimensioni. La circolazione atmosferica, che opera attraverso gli scambi aerei legati al vento, quella oceanica, che dipende dalla corrente circumpolare e costiera antartica, gli animali, per la migrazione di uccelli, pesci e mammiferi marini, ed anche gli umani, la cui presenza sembra averne accelerato il tasso di trasferimento, sono tra i mezzi principali con i quali i microrganismi arrivano e si disperdono.

Ciò nonostante le condizioni climatiche estreme che caratterizzano l'Antartide hanno portato all'apparente ritiro della vita in microambienti maggiormente protetti come ad esempio pietre e rocce (Wierzchos et al., 2011).

Nelle Valli Secche di McMurdo, funghi e alghe lichenizzati, funghi neri meristemati, batteri, cianobatteri ed alghe sono in grado di sopravvivere all'interno delle porosità delle rocce formando comunità endolitiche (Friedmann, 1982). I fattori ambientali che regolano l'insediamento, la crescita e la struttura della comunità microbica all'interno della roccia sono molteplici come la temperatura, l'umidità, le radiazioni UV, l'esposizione e generano notevoli differenze nelle condizioni microclimatiche. Queste caratteristiche ambientali costringono le comunità a periodi di inattività metabolica seguiti da rapidi risvegli non appena si presentano condizioni favorevoli.

Questo lavoro di tesi ha permesso di comprendere e approfondire le conoscenze sulla biodiversità batterica che caratterizza le comunità batteriche delle acque e delle rocce antartiche. Il lavoro è stato suddiviso in due parti principali in cui da un lato si è valutata la biodiversità mediante metodi colturali,

dall'altro invece è stata analizzata con metodi coltura indipendente basati su una tecnica di fingerprinting molecolare.

I campioni marini e rocciosi hanno permesso di isolare 100 ceppi batterici appartenenti a 4 phyla principali: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Deinococcus-Thermus*. Numerosi isolati sono stati identificati a livello di specie, per altri è stato possibile risalire al solo genere. L'opportunità di isolare e coltivare questi organismi in laboratorio ha permesso di approfondire numerose informazioni sulla loro morfologia cellulare, su quella delle colonie e sulla loro capacità di crescere a differenti temperature e concentrazioni saline così da poter stimare il grado di adattamento all'ambiente in cui sono stati isolati. Un aspetto particolarmente interessante è la capacità di molti ceppi di avere *optima* di temperatura che non coincidono con le temperatura dell'ambiente in cui sono stati isolati. Questo potrebbe essere spiegato dall'ampia flessibilità che caratterizza questi batteri e dalla loro elevata adattabilità. La capacità di sopravvivere e svilupparsi in ambienti asprissimi li ha spinti ad adattarsi anche alle peggiori condizioni che l'ambiente può presentare, ma da contro, nel momento in cui si vengono a trovare in una situazione più favorevole, come ad esempio una temperatura più alta sono in grado non solo di sopravvivere, ma svilupparsi al meglio. I batteri isolati dall'ambiente roccioso sono sicuramente i principali protagonisti di questi adattamenti. Le rocce antartiche sono caratterizzate da variazioni di temperatura che dipendono non solo dalla loro esposizione e posizione, ma anche dall'alternanza delle stagioni. Infatti durante l'estate australe, in cui si registrano temperature più elevate rispetto all'inverno, in cui l'inclinazione della terra permette una maggiore esposizione ai raggi solari e si può avere una minore copertura nevosa, le rocce possono raggiungere temperature anche molto più elevate rispetto a quelle dell'aria. Ciò spinge le comunità endolitiche ad adattarsi a queste flessioni termiche e sviluppare importanti strategie per sopravvivere a cambiamenti spesso repentini.

I campioni analizzati mediante la tecnica di fingerprinting molecolare DGGE hanno evidenziato una biodiversità non solo molto più ampia, ma anche diversa rispetto al precedente lavoro di isolamento permettendo di descrivere una comunità batterica molto differenziata e caratteristica.

I campioni marini pur non essendo numerosi e l'intervallo temporale in cui sono stati campionati non è particolarmente ampio permettono comunque di descrivere in modo approfondito la comunità batterica marina. I risultati ottenuti evidenziano una popolazione molto diversificata e nessuno dei quattro siti studiati è caratterizzato da una comunità batterica che rimane uguale a se stessa e costante nel tempo.

E' evidente l'eterogeneità che caratterizza le acque antartiche e come la composizione della comunità batterica sia fortemente influenzata dalle continue fluttuazioni causate dalle tempeste, dai forti venti e dagli spostamenti dei ghiacci. Questo non permette lo sviluppo di un ambiente con caratteristiche

stazionarie e le comunità microbiche che qui vivono sono continuamente sottoposte a tutti questi cambiamenti.

Dallo studio dei campioni rocciosi risulta chiaro che le comunità batteriche endolitiche presentano una composizione unica che non permette nessun confronto con altre comunità batteriche ambientali come ad esempio le comunità batteriche dei suoli e delle acque.

L'analisi delle sequenze ottenute dalle bande dei profili di DGGE mostrano come l'84% dei batteri non sia riconducibile a specie e/o generi noti lasciando supporre quanto poco si sappia delle comunità che vivono all'interno delle rocce antartiche.

Inoltre, molte delle sequenze ottenute non hanno ottenuto valori di massima identità alti con le sequenze depositate in banca dati. Ciò potrebbe derivare dall'eventualità che tali ceppi per poter vivere in un ambiente complesso e con caratteristiche estreme come l'Antartide abbiano sviluppato dei forti adattamenti che si riflettono sul loro corredo genetico.

Derivando le rocce da un campionamento condotto secondo un transetto longitudinale e altitudinale a crescente distanza dal mare, ci si sarebbe aspettati una diminuzione della biodiversità man mano che ci si spostava verso regioni più interne con caratteristiche più estreme, ma questo non è stato osservato.

Una possibile spiegazione a questo risultato potrebbe derivare dal fatto che la distribuzione e la ricchezza delle comunità endolitiche non dipende solo da alcuni fattori come l'altitudine e la distanza dalla costa, ma da una serie di variabili e dalla loro possibile combinazione.

I numerosi variazioni a cui va incontro ogni porzione di una roccia in base alla sua posizione, l'esposizione, la copertura nevosa e l'orientamento sono determinanti per la scelta da parte di una comunità microbica del lato e della posizione su cui avviare una colonizzazione. Quindi una roccia se pur posizionata ad una maggiore distanza dalla costa potrebbe comunque costituire un habitat più favorevole rispetto ad una collocata sulla costa, la quale potrebbe invece presentare condizioni meno favorevoli ed essere maggiormente esposta a fenomeni che non favoriscono la colonizzazione.

Inoltre, lo studio condotto sul micro e macro ambiente roccioso conferma ulteriormente questa tesi. In una roccia è possibile osservare numerosi micro habitat all'interno dei quali differenti microrganismi si insediano sviluppando comunità e popolazioni differenti e caratteristiche. Anche in questo caso la posizione della roccia andrà ad incidere determinando se e come una porzione rocciosa possa essere colonizzata.

La biodiversità e la ricchezza che contraddistingue gli habitat rocciosi è comunque estremamente alta. I risultati ottenuti sottolineano come sia necessario incrementare le conoscenze fino ad ora raccolte e ampliare ulteriormente gli studi sulle comunità batteriche endolitiche dell'Antartide.

Ulteriori analisi, le quali potrebbero essere condotte mediante altre tecniche di fingerprinting molecolare o con le più innovative tecniche GNS (new generation sequencing), potrebbero essere utili per approfondire e estendere le informazioni ottenute sulle comunità batteriche antartiche. Purtroppo le informazioni oggi presenti in bibliografia sulle comunità endolitiche antartiche non sono numerose e lo studio condotto in questo lavoro di tesi può rappresentare un interessante inizio che insieme alle informazioni già disponibili potrà porre le basi per una più chiara descrizione delle comunità batteriche litiche permettendo di comprendere sia quali siano i generi già noti meglio adattati a tali condizioni e quali siano ancora da scoprire e classificare.

Inoltre, essendo le rocce antartiche un habitat in cui si sviluppano comunità eterogenee e differenziate potrebbe risultare interessante estendere e approfondire lo studio anche ad altri gruppi microbici quali Archea, Cianobatteri, funghi ed alghe.

Alcune di queste attività di ricerca sono già in corso.

BIBLIOGRAFIA

Abee T., Van Schaik W., Siezen R.J., (2004). Impact of genomics on microbial food safety. Trends Biotechnol. 22:653-60.

Adams BJ., Bardgett RD., Ayres E., Wall DH., Aislabie J., Bamforth S., Bargagli R., Cary C., Cavacini P., Connell L., Convey P., Fell J., Frati F., Hogg I., Newsham N., O'Donnell A., Russell N., Seppelt R., Stevens MI., (2006). Diversity and distribution of Victoria Land biota. Soil Biol Biochem 38:3003–3018.

Aislabie j., Chhour K.L., Saul D.J., Miyauchi S., Ayton J., Paetzold R.F., Balks M.R., (2006). Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. Soil Biology and Biochemistry 38:3041-3056.

Aislabie JM., Lau A., Dsouza M., Shepherd C., Rhodes P., Turner SJ, (2013). Bacterial composition of soils of the Lake Wellman area, Darwin Mountains, Antarctica. Extremophiles 17:775–786.

Aislabie JM., Ryburn J., Gutierrez-Zamora ML., Rhodes P., Hunter D., et al. (2012). Hexadecane mineralization activity in hydrocarbon-contaminated soils of Ross Sea region, Antarctica may require nutrients and inoculation. Soil Biology & Biochemistry 45: 49-60.

Altschul SF., Madden TL., Schäffer AA., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman DJ., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389-3402.

Amann R., Ludwig W., Schleifer K., (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59: 143–169.

Balvanera P., Pisterer A., Buchmann N., He J.S., Nakashizuka T., Raffaelli D., Schmid B., (2006). Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. Ecol Lett 9:1146–1156.

Barbieri P., Bestetti G., Galli E., Zannoni D., (2008). *Microbiologia ambientale ed elementi di ecologia microbica*. Casa Ed. Ambrosiana pp. 281-299.

- Bartelt-Ryser J., Joshi J., Schmid B., Brandl H., Balser T., (2005). Soil feedbacks of plant-diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspective in Plant Ecology & Systematics* 7: 27-49.
- Bell EM., (2012). Life at extremes: Environmental organism and strategies for survival(ed. E.M. Bell).
- Berner T., Evenari M., (1978) .The influence of temperature and light penetration on the abundance
- Bouasria A., Mustafa T., De Bello F., Zinger L., Lemperiere G., Geremia RA., Choler P., (2012). Changes in root-associated microbial communities are determined by species-specific plant growth responses to stress and disturbance. *Eur J Soil Biol* 52:49–66.
- Bowman JP., McCammon S., Brown MV., Nichols D.S., Mc Meekin T., (1997). *Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3068-3078.
- Bowman JP., Rea SM., Brown MV., McCamman S A., Smith MC., McMeekin TA., (2000). Community structure and psychrophily in Antarctic microbial ecosystems. *Microbial biosystems: new frontiers*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, 287-292.
- Boyd WL., Staley JT., Boyd JW., (1966). Ecology of soil microorganisms of Antarctica. *Antarct Res Ser* 8:125-159.
- Brinkmann M., Pearce DA., Convey P., Ott S., (2007).The cyanobacterial community of polygon soils at an inland Antarctic nunatak. *Polar Biology*, 30(11), 1505-1511.
- Brinkmeyer R., Knittel K., Ju J., Weyland H., Amann R., Helmke E., (2003). Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Appl Env Microiol* 69: 6610–6619.
- Buchan A., Gonzàles JM., Moran MA., (2005). Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5665-5677.
- Buckley, DH., Schmidt, TM., (2001). Exploring the diversity of soil: a microbial rainforest. In *Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere*. Staley, J.T., and Reysenbach A.L. (eds). New York, NY, USA: Wiley-Liss, pp. 183–208.

Bullini L., Pignatti S., Virzo De Santo A., (1998). *Ecologia generale*. UTET pp. 371-388.

Burkins MB., Virginia, RA., Wall, DH., (2001). Organic carbon cycling in Taylor Valley, Antarctica: quantifying soil reservoirs and soil respiration. *Global Change Biology* 7, 113-125.

Carr MH., Anderson TW., Hixon MA., (2002). Bio-diversity, population regulation, and the stability of coralreef fish communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11241– 11245.

Cary SC., McDonald IR., Barrett JE., Cowan DA., (2010). On the rocks: the microbiology of Antarctic dry valley soils. *Nat Rev Microbiol* 8: 129–138.

Casamayor EO., Schäfer H., Baneras L., Pedros–Alio C., Muyzer G., (2000). Identification of and spatio–temporal differences between microbial assemblages from two neighbouring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2): 499–508.

Chen M., Xiao X., Wang P., Zeng X., Wang F., (2005). *Arthrobacter ardleyensis* sp. nov., isolated from Antarctic lake sediment and deepsea sediment. *Arch Microbiol* 183, 301–305.

Clark, JS., McLachlan JS., (2003). Stability of forest biodiversity. *Nature* 423, 635–638.

Clarke A., Barnes DKA., Bracegirdle TJ., Ducklow HW., King JC., Meredith MP., Murphy EJ., Peck LS., (2012). The impact of regional climate change on the marine ecosystem of the Western Antarctic Peninsula. In: Rogers AD, Johnston NM, Murphy EJ, Clarke A (eds) *Antarctic ecosystems: an extreme environment in a changing world*. Blackwell Publishing Ltd, Hoboken, pp 93–120.

Clarke A., Barnes DA., Hodgson, DA., (2005). How isolated is Antarctica? *Trends in Ecology and Evolution* 20, 1–3.

Clarke A., Griffiths HJ., Linse K., Barnes DKA., Crame JA., (2007) How well do we know the Antarctic marine fauna? A preliminary study of macroecological and biogeographic patterns in Southern Ocean gastropod and bivalve molluscs. *Diversity and Distributions*, 13, 620–632.

Clarke A., Murphy EJ., Meredith MP., King JC., Peck LS., Barnes DKA., Smith RC., (2007). Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. *Phil. Trans. R. Soc. B* 362, 149–166. doi:10.1098/rstb.2006.1958.

Cockell CS., Stokes MD., (2004). Widespread colonization by polar hypoliths. *Nature* 431 414–415.

Cockell CS., Córdoba-Jabonero C., (2004). Coupling of climate change and biotic UV exposure through changing snow–ice covers in terrestrial micro-habitats. *Photochem. Photobiol.* 79, 26–31.

Cockell CS., Lee P., Osinski G., Horneck G., Broady P., (2002). Impact-induced microbial endolithic habitats. *Meteorit. Planet. Sci.* 37, 1287.

Cockell CS., Stokes MD., (2004). Widespread colonization by polar hypoliths. *Nature* 431: 414.

Colquhoun JA., Heald SC., Li L., Tamaoka J., Kato C., Horikoshi K., Bull, AT., (1998). Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. *Extremophiles* 2, 269–277. *culturali*. Franco Angeli Ed., Milano, 201 pp.

Cook AJ., Fox AJ., Vaughan DG., Ferrigno JG., (2005). Retreating glacier fronts on the Antarctic Peninsula over the past half-century, *Science*, 308, 541–544.

Cook GM., Rothenberger JP., Sikaroodi M., Gillevet PM., Peters EC., et al. (2013). A comparison of culture-dependent and culture-independent techniques used to characterize bacterial communities on healthy and white plague-diseased corals of the *Montastraea annularis* species complex. *Coral Reefs* 32: 375–388. doi: 10.1007/s00338-012-0989-6.

Cook AJ., Fox AJ., Vaughan DG., Ferrigno JG., (2005). Retreating glacier fronts on the Antarctic Peninsula over the past half-century.

Coppola S., Blaiotta G., Ercolini D., Moschetti G., (2001). Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* 90:414–20.

Cowan DA., Tow AL., (2004). Endangered Antarctic environments. *Annual Review of Microbiology* 58, 649–690.

- Cox MM., Battista JR., (2005). *Deinococcus radiodurans*—the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol* 3:882-892.
- Crease J., (1964). The Antarctic Circumpolar Current and convergence. *Proc. Roy. Soc. London*, 281A, 14–21.
- D’Amico G., Garcia-Tsao G., Pagliaro L., (2006). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis. A systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-231.
- Dadheech N., (2010). Desiccation tolerance in cyanobacteria. *Afr J Microbiol Res*, 4, 1584-1593.
- Dalluge JJ., Hamamoto T., Horikoshi K., Morita RY., Stetter KO., McCloskey JA., (1997). Post transcriptional modification of tRNA in psychrophilic bacteria. *J Bacteriol* 179: 1918-1923.
- De la Torre J., Goebel BM., Friedmann EI., Pace NR., (2003). Microbial diversity of crytoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3858–3867.
- De los Rios A., Wierzchos J., Sancho LG., Ascaso C., (2004). Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy. *FEMS Microbiol Ecol* 50:143-152.
- Defendi V., (2004). Variabilità climatica: analisi di serie temporali lunghe e di un nuovo set di dati antartici.
- Degens BP., Schipper LA., Sparling GP., Vojvodic–Vukovic M., (2000). Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 32 (2): 189–196.
- Delille D., (1992). Marine bacterioplankton at the Weddell Sea ice edge, distribution of psychrophilic and psychrotrophic populations. *Polar Biology* 12: 205-210.
- Delille D., Rosiers C., (1995). Seasonal changes of Antarctic marine bacterioplankton and sea ice bacterial assemblages. *Polar Biol* 16: 27-34.

Delille D., (1995) Seasonal-changes of sub-Antarctic benthic bacterial communities.

DeLong EF., Wu KY., Prezelin BB., Jovine RVM., (1994). High abundance of Archea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* 371: 695-697.

DeLong DC., (1996). Defining biodiversity. *Wildl. Soc. Bull.* 24, 738-749.

Deuerling KM., Lyons WB., Welch SA., Welch KA., (2014). The characterization and role of aeolian deposition on water quality, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Aeolian Res.*

Doval MD., Álvarez-Salgado XA., Castro CG., Pérez FF., (2002). Dissolved organic carbon distributions in the Bransfield and Gerlache Straits, Antarctica. *Deep-Sea Research II* 49, 663–674.

Ducklow H., Carlson C., Church M., Kirchman D., Smith D., Steward G., (2001). The seasonal development of the bacterioplankton bloom in the Ross Sea, Antarctica, 1994-1997. *Deep-Sea Research II* 48: 4199-4221. *Ecology*, 6 (1): 3–16.

Eiler A., Bertilsson S., (2007). Flavobacteria blooms in four eutrophic lakes: Linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3511-3518.

Errington J., (2013). L-form bacteria, cell walls and the origins of life. *Open Biol.* 3, 120143.

Eveland W., Gooseff MN., Lampkin DJ, Barrett JE., Takacs-Vesbach C D., (2013). Seasonal controls on snow distribution and aerial ablation at the snow-patch and landscape scales, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *The Cryosphere*, 7, 917-931.

Felsenstein J., (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Journal Name: Evolution; (United States); Journal Volume: 39:4; Medium: X; Size: Pages: 783-791.*

Fisher CR., (1990). Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Aquatic Sciences* 2: 399-436.

- Fisher MM., Triplett EW., (1999). Automated approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 65: 4630-4636.
- Friedmann EI., (1982). Endolithic microorganisms in the antarctic cold desert. *Science* 215: 1045–1053.
- Friedmann EI., Hua MS., Ocampo-Friedmann R., (1988) .Cryptoendolithic lichen and cyanobacterial communities of the Ross Desert, Antarctica. *Polarforschung* 58:251-260.
- Friedmann EI., Ocampo-Paus R., (1976). Endolithic blue-green algae in the Dry Valley: primary producers in the Antarctic Desert ecosystem. *Science*, 193: 1247–1249.
- Garrrity GM., Holt JG., (2001). Phylum BIV. “Deinococcus–Thermus”. In: Boone D, Castenholz R (eds) *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, 2nd edn, vol 1. Springer, New York, pp 395-420.
- Ghateea MA., Sharifib I., Kuhlsc K., Kanannejadd Z., Harandie MF., Almeidaf ME., Hatamg G., Mirhendih H., (2014). Heterogeneity of the internal transcribed spacer region in *Leishmania tropica* isolates from southern Iran. *Experimental Parasitology* Vol. 144, Pages 44–51.
- Giller KE., Beare MH., Lavelle P., Izac AMN., Swift MJ., (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, 6 (1): 3–16.
- Giraffa G., (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 88:215-22.
- Giraffa, G., and E. Neviani. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int J Food Microbiol.* 67(1-2):19-34.
- Glenn TC., (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 759–769.
- González JM., Fernàndez-Gòmez B., Fernàndez-Guerra A., Gòmez-Consarnau L., Sànchez O., Coll-Lladò M., del Campo J., Escudero L., Rodríguez-Martínez R., Alonso-Sàez L., Latasa M., Paulsen I., Nedashkovskaya O., Lekunberri I., Pinhassi J., Pedròs-Aliò C., (2008). Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (*Flavobacteria*). *PNAS* 105: 8724-8729.

Gorbushina AA., (2007). Life on the rocks. *Environmental Microbiology*, 9: 1613- 1631.

Gosink JJ., Woese CR., Staley JT., (1998). *Polaribacter* gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. Nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolated polar marine bacteria of the Citophaga-Flavobacterium-Bacteroides group and reclassification of '*Flectobacillus glomeratus*' as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 223-235.

Gosink JJ., Herwig RP., Staley JT. (1997). *Octadecabacter arcticus* gen. nov., sp. nov. and *O. antarcticus*, sp. nov., nonpigmented, psychrophilic gas vacuolate bacteria from polar sea ice and water. *Syst. Appl. Microbiol.* 1997, 20: 356-365.

Gray ND., Miskin IP., Kornilova O., Curtis TP., Head IM., (2002). Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology* 4: 158-168.

Grossmann S., Dieckmann GS., (1994). Bacterial standing stock, activity, and carbon production during formation and growth of sea ice in the Weddel Sea, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2746-2753.

Gurtler V.,Stanisich VA. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3-16.

Hairston NG., Allen JD., Colwell RK., Futuyma DJ., Howell J., Lubin MD., Mathias J., Vandermeer JH., (1968). The relationship between species diversity and stability: an experimental approach with Protozoa and bacteria. *Ecology* 49: 1091-1101.

Halebian S., Harris B., Finegold SM., Rolfe RD., (1981). Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 13(3): 444-448.

Helmke E., Weyland H., (2004). Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria - Occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. *Cell Mol Biol* 50: 553-561.

Helmke E., Wayland H., (1995). Bacteria sea ice and underlying water of the eastern Weddel Sea in midwinter. *Marine Ecology-Progress Series* 117: 269-287.

Hemming AD., (2014). Antarctic treaty regime- Essential concepts of global environmental governance. Earthscan-from Routledge.

Hemming SR., Thompson SN., Reiners PW., Formica A., Pierce EL., (2013). Characterizing the ice-covered geology and erosion history of East Antarctica from multiple detrital thermochronometers. American Geophysical Union, Fall Meeting 2013, abstract T12A-07 Publication Date:12/2013.

Heuer H., Smalla K., (1997). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas J.D., Wellington E.M.H., Trevors J.T. (Eds.), Modern soil microbiology. Dekker, New York, pp 353– 373.

Heuer H. and Smalla K., 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas J.D., Wellington E.M.H., Trevors J.T. (Eds.), Modern soil microbiology. Dekker, New York, pp 353–373.

Holmes B., Willcox W.R., Lapage S.P., (1978). Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. Journal of Clinical Pathology 31: 22-30.

Hongoh Y., Yuzawa H., Ohkuma M., Kudo T., (2003). Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. FEMS Microbiol Lett 221: 299-304.

Hooper DU., Chapin FS., Ewel JJ., Hector A., Inchausti P., Lavorel S., Lawton JH., Hori, T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y., (2006). Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. J. Microbiol. Methods 66 (1), 165–169.

Horikoshi K., (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev 1999, 63:735-750.

Hsu FF., Lobasso S., Turk J., Corcelli A., (2013). Structural studies on archaeal phytanyl-ether lipids isolated from membranes of extreme halophiles by linear ion-trap multiple-stage tandem mass spectrometry with electrospray ionization, Anal. Chim. Acta 771 (2013) 73–85.

Hughes KA., Lawley B., (2003). A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts. *Environmental Microbiology* 5: 555–565.

Ibekwe AM., Kennedy AC., (1999). Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. *Plant Soil*, 206 (2): 151–161.

Irlinger F., Bimet F., Delettre J., Lefe`vre M., Grimont PAD., (2005). *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 457–462.

Zhou J., Xia B., Huang H. et al., (2003). “Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils,” *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 35, no. 7, pp. 915–924, 2003.

Jacobs SS., Hartmut H., (1996). Antarctic ice sheet melting in the Southeast Pacific. *GEOPHYSICAL RESEARCH LETTERS*, VOL. 23, NO. 9, PAGES 957-960, MAY 1.

Jakosky BM., Nealson KH., Bakermans C., Ley RE., Mellon MT., (2003). Subfreezing activity of microorganisms and the potential habitability of Mars’ polar regions. *Astrobiology* 3:343–350.

Janssen PH., (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72: 1719–1728.

Jeanmougin F., Thompson JD., Gouy M., Higgins DG., Gibson TJ., (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23: 403-405.

Jungel K., John J , Hoppe H., Staley JT., (1998). *Arthrobacter*, *Brachybacterium* and *Planococcus* Isolates Identified from Antarctic Sea Ice Brine. Description of *Planococcus mcmeekinii*, sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* 21, 306-314 (1998).

Kageyama A., Morisaki K., O⁻ mura S., Takahashi Y. (2008). *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 53–56.

Karl DM.,(1993). Microbial processes in the southern oceans. In: *Antarctic Microbiology*. Friedmann, E.I., Ed. pp. 1-63.

Kelly JJ., Favila E., Hundal L.S., Marlin J.C., (2007). Assessment of soil microbial communities in surface applied mixtures of Illinois River sediments and biosolids. *Applied Soil Ecology*, 36 (2–3): 176–183.

Kerry I., (1990). Effects of temperature on growth rates of fungi from sub-Antarctic Macquarie Island and Casey, Antarctica. *Polar Biol* 10:293-299.

Kesmen Z., Yetiman AE., Gulluce A., Kacmaz N., Sagdic O., Cetin B., et al. (2012). Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 428–435.

Khan N., Tu Yn M., Sta Vord W., Cary C., Lacap DC., Pointing SB., Cowan D., (2011). Hypolithic microbial communities of quartz rocks from Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Polar Biol* (2011) 34:1657–1668 DOI 10.1007/s00300-011-1061-7.

Kircher M., Kelso J., (2010). High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations. *BioEssays* 2010, 32:524-536.

Knox GA., (2006). *Biology of the Southern Ocean*. CRC press- Taylor and Francis group. L09501, doi:10.1029/2005GL025588.

Kovacs N., (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the Oxidase Reaction. *Nature* 178: 703-703.

Kroken S., Taylor JW., (2000). Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist*, 103: 645-660.

Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K., (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.

Le Romancer M., Gaillard M., Geslin C., Prieur D., (2007). Viruses in extreme environmental. *Rev environ Sci Biotechnol* (2007). 6:17-31. DOI 10.1007/s11157-006-0011-2.

Le Romancer M., Treilleux I., Leconte N., Robin-Lespinasse Y., Sentis S., Bouchekioua-Bouzaghoul K., Goddard S., Gobert-Gosse S., Corbo, L. (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation.

Lefe`vre CT., Frankel RB., Po´ sfai M., Prozorov T., Bazylinski DA., (2011). Isolation of obligately alkaliphilic magnetotactic bacteria from extremely alkaline environments. *Environ Microbiol* 13: 2342–2350.

Lévique E., Haye B., Belarbi A., (2000). Cloning and expression of an alphaamylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiol Lett* 2000, 186:67-71.

Lewis K., (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Micro* 5: 48-56.

Li HR., Yu Y., Luo W., et al.(2010). *Marisediminicola antarctica* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from the Antarctic. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 60(Pt 11): 2535-2539.

Lindo-Atichati D., Paris CB., Le Hénaff M., Schedler M., Valladares Juárez A.G., Muller R. (2014). Simulating the effects of droplet size, high-pressure biodegradation, and variable flow rate on the subsea evolution of deep plumes from the Macondo blowout. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr*, 10.1016/j.dsr.2014.1001.1011.

Lo Giudice A., Caruso C., Mangano S., Bruni V., De Domenico M., Michaud L., (2012). Marine bacterioplankton diversity and community composition in an Antarctic coastal environment. *Microb. Ecol.* 63: 210-223.

Lodge DM., Loreau M., Naeem S., Schmid B., Seta H., Symstad AJ., Vandermeer J., Wardle DA., (2005). Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75, 3-35.

Long MC., (2010). Upper ocean physical and ecological dynamics in the Ross sea, Antarctica.

Loreau M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., Grime J., Hector A., Hooper D., Huston M., Raffaelli D., Schmid B., Tilman D. and Wardle D., (2001). molecular comparisons. *Biodivers. Conserv.* 5, 1295–1305.

Madigan MT., Martinko JM., (2007). *Brock: Biologia dei microrganismi*. Casa Editrice Ambrosiana. (Volume 1) pp.153-154.

Manzoni M., (2005). *La natura dell'Antartide*. Springer-Verlag (Italia).

Mardis ER.,(2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9:387{402, 2008.

Margalef R., (1994). Diversity and biodiversity - their possible meaning in relation with the wish for sustainable development. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 66: 3- 14.

Margesin R., Feller G., (2010). Biotechnological applications of psychrophiles. *Environ Technol* 31: 835-844.

Margesin R., Schumann P., Spro C., Gounot AM., (2004). *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2067–2072.

Margulies M., Egholm M., Altman WE., Attiya S., Bader JS., Bembien LA., Berka J., Braverman MS., Chen Y.-J., Chen Z., et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380.

Marti JA., (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Centre for Research on Ecological Impacts of Coastal Cities, Marine Ecology Laboratories A11, University of Sydney, New South Wales 2006, Australia. *Aust. Ecol.* 26: 32-46.

Marti JA., (2005). PERMANOVA. Permutational multivariate analysis of variance. A computer program. Department of Statistics. University of Auckland.

- Martínez-Rosales C., Fullana N., Musto H., Castro-Sowinski S., (2012). Antarctic DNA moving forward: genomic plasticity and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Letters* Volume 331, 1–9.
- Marzorati M., Wittebolle L., Boon N., Daffonchio D., Verstraete W., (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* 10: 1571–1581.
- Mateos M., Markow TA., (2005). Ribosomal intergenic spacer (IGS) length variation across the *Drosophilinae* (Diptera: Drosophilidae). *BMC Evol Biol* 5: 46–59.
- Mayer P., (2006) Biodiversity: the appreciation of different thought styles and values helps to clarify the term. *Restor Ecol* 14:105–111.
- McNamara CJ., Perry TD., Bearce KA., Hernandez- Duque G., Mitchell R., (2006) .Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microb Ecol* 51: 51–64.
- Meredith M P., Renfrew IA., Clarke A., King JC., Brandon MA. (2004). Impact of the 1997/98 ENSO on the upper waters of Marguerite Bay, western Antarctic Peninsula, *J. Geophys. Res.*, 109, C09013, doi:10.1029/2003JC001784.
- Mertens B., Boon N., Verstraete W. (2005). Stereospecific effect of hexachlorocyclohexane on activity and structure of soil methanotrophic communities. *Environ Microbiol* , 7: 660–669.
- Michaud L., Di Cello F., Brilli M., Fani R., Lo Giudice A., Bruni V., (2004). Biodiversity of cultivable psychrotrophic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *FEMS Microbiology Letters* 230: 63–71.
- Mieczan T., Gońniak D., Aleksander S ´wia., Zdanowski M., Tarkowska-Kukuryk M., (2013). The distribution of ciliates on Ecology Glacier (King George Island, Antarctica): relationships between species assemblages and environmental parameters. *Polar Biol* (2013) 36:249–258 DOI 10.1007/s00300-012-1256-6.

Miller JR., (2006). Restoration, reconciliation, and reconnecting with nature. *Biological Conservation* 127:356–361.

Mnif S., Zayen A., Karray F., Bru-Adan V., Loukil S., Godon J., Sayadi S., (2012). Microbial population changes in anaerobic membrane bioreactor treating landfill leachate monitored by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rDNA gene fragments. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 73:50-59.

Molina-Muñoz M, Poyatos JM, Sánchez-Peinado M, Hontoria E, González-López J, Rodelas B (2009) Microbial community structure and dynamics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor aerobically treating domestic wastewater under real operation conditions. *Science of The Total Environment* 407: 3994-4003.

Moran MA., Torsvik VL., Torsvik T., Hodson RE., (1993). Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies, *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (3): 915–918.

Morita R., (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev* 39: 144–167.

Morris EM., Vaughan DG., (2003) Spatial and temporal variation of surface temperature on the Antarctic Peninsula and the limit of viability of ice shelves. In: Domack E, Leventer A, Burnett A, Bindschadler R, Convey P, Kirby M (eds) *Antarctic peninsula climate variability: historical and paleoenvironmental perspectives*. Antarctic Research Series, 79. Antarctic Research Series, 79. AGU, Washington, DC, pp 61–68.

Mulvaney R., et al. (2012). Recent Antarctic Peninsula warming relative to Holocene climate and ice-shelf history. *Nature* 489, 141–144. doi:10.1038/ nature11391.

Munn C., (2011). *Marine Microbiology, ecology and applications*. 2nd Edition. GS Garland Science.

Murray AE., Grzymski JJ., (2007). Diversity and genomics of Antarctic marine micro-organisms. *Phil. Trans. R. Soc. B* 362: 2259-2271.

Murray AE., Grzymski JJ., (2007). Diversity and genomics of Antarctic marine micro-organisms. *Phil. Trans. R. Soc. B* 362: 2259-2271.

Murray AE., Preston CM., Massana R., Taylor LT., Blakis A., Wu K., DeLong EF., (1998). Seasonal and spatial variability of bacterial and archeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2585-2595.

Mutz K., Heilkenbrinker A., Lönne M., et al (2013). Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 24: 1–9.

Muyzer G., Smalla K., (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

Muyzer G., Smalla K., (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

Muyzer G., (1999). *DGGE/TGGE* a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322.

Muyzer G., (1999). Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives. In: *Microbial Biosystem: New frontiers. Proceeding of the 8th international symposium on Microbial Ecology*. Halifax, Canada. Edited by Bell C.R., Brylinsky M., Johnson-Green P. Halifax, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.

Muyzer G., de Waal EC., Uitterlinden AG., (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.

Myers RM., Fisher SG., Lerman LS., Maniatis T., (1985). Nearly all single base substitution in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13: 3131-3145.

Nadkarni MA., Martin FE., Hunter N., Jacques NA., (2009). Methods for optimizing DNA extraction before quantifying oral bacterial numbers by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 296:45-51.

Nicolaisen MH., Ramsing NB., (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 50: 189-203.

Nicolaisen MH., Ramsing NB., (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 50: 189-203.

Nienow JA., Friedmann EI., (1993). Terrestrial lithophytic (rock) communities. In: Friedmann EI (ed) *Antarctic microbiology*. Wiley, New York, pp 343-412.

Nocker A., Burr M., Camper K., (2007). Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*. 54: 276-289.

Noffke N., Beukes N., Gutzmer J., Hazen R., (2006). Spatial and temporal distribution of microbially induced sedimentary structures: a case study from siliciclastic storm deposits of the 2.9 Ga Witwatersrand Supergroup, South Africa. *Precambrian Research*.

Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G., (1997). PCR Primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63: 3327-3332.

O'Loughlin PM., Paulay G., Davey N., Michonneau F., (2011). The Antarctic region as a marine biodiversity hotspot for chelicerates: diversity and diversification of sea cucumbers. *Deep-Sea Res. Pt. II-Top. Stud. Oceanogr.* 58:264–275.

Olsen GJ., Lane DJ., Giovannoni SJ., Pace NR., (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 337-365.

Omelchenko MV, Wolf YI, Gaidamakova EK, et al. (2005) Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evol Biol* 5:57.

Onofri, S., Selbmann L., Zucconi L, Pagano, S.. (2004). Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planet. Space Sci.* 52:229–237.

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., and Sekiya T., (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766-2770.

Østerhus S., Darelius E., (2013). Long term observations of the Ice Shelf Water outflow from the Filchner-Ronne Ice shelf in the Southern Weddell Sea, Antarctica. *Geophysical Research Abstracts* Vol. 15, EGU2013-11627.

Øvreås L., Jensen S., Daae F.L., Torsvik V., (1998). Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (7): 2739–2742.

Pan SY., Tan GYA., Convey P., Pearce AD., Tan IKP., (2013). Diversity and bioactivity of actinomycetes from Signy Island terrestrial soils, maritime Antarctic *Advances in Polar Science* journal.polar.gov.doi: 10.3724/SP.J.1085.2013.00208 December 2013 Vol. 24 No. 4: 208-212.

Panikov NS., Flanagan PW., Oechel WC., Mastepanov MA., Christensen TR., (2006). Microbial activity in soils frozen to below 39°C. *Soil Biol. Biochem.* 38:785–794.

Parker MA., (2008). Symbiotic relationships of legumes and nodule bacteria on Barro Colorado Island, Panama: a review. *Microb Ecol* 55:662–672.

Patterson H., Laybourn-Parry J., (2012). Sea ice microbial dynamics over an annual ice cycle in Prydz Bay Antarctica. *Polar Biol* 35:993-1002.

Pearce DA., et al. (2009). Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* 69:143–157.

Peck LS., Webb KE., Bailey DM., (2004). Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species, *Functional Ecol.*, 18, 625– 630.

Pereira P., Ibáñez F., Rosenblueth M., Etcheverry M., Martínez-Romero E., (2011). Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. *ISRN Ecol.* 2011:938546. doi:10.5402/2011/ 938546.

Pesciaroli C., Cupini F., Selbmann L., Barghini P., Fenice M. (2012). Temperature preferences of bacteria isolated from seawater collected in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia. *Polar Biol* (2012) 35:435–445 DOI 10.1007/s00300-011-1091-1.

Philips K., Zaidan F., Elizondo OR., Lowe KL., (2012). Phenotypic characterization and 16S rDNA identification of culturable non-obligate halophilic bacterial communities from a hypersaline lake, LaSal del Rey, in extreme South Texas (USA). *Aquatic Biosystems* 8: 5.

Pielou E., (1975). *Ecological Diversity*. John Wiley, New York. N.Y. 165.

Pohlou E., Fandino O. A., Marxsen J., (2013). Bacterial Community Composition and Extracellular Enzyme Activity in Temperate Streambed Sediment during Drying and Rewetting. *Plos one* Vol. 8- Issue 12.e83365.

Pointing SB., Chan Y., Lacap DC., Lau M CY., Jurgens JA., Farrell RL. (2009). Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19964–19969.

Priscu JC., Christner BC., (2004). Earth's icy biosphere, p. 130–145. In T. A. Bull (ed.), *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington, DC.

Qin Q., Xie B., Shu Y., Rong J., Zhao D., Zhang X., Chen X., Zhou B., Zhang Y., (2012). Genome Sequence of Proteorhodopsin-Containing Sea Ice Bacterium *Glaciecola punicea* ACAM 61. *Journal of Bacteriology* 194(12): 3267.

Rainey FA., Klatte S., Kroppenstedt RM., Stackebrandt E., (1995). *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *Int J Syst Bacteriol* 45, 32±36.

Ranjard L., Brothier E., Nazaret S., (2000). Sequencing bands of RISA fingerprints for the characterization and the microscale distribution of soil bacterial populations responding to mercury spiking. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5334-5339.

Ranjard L., Poly F., Nazaret S., (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* 151: 167-177.

Reddy GS., Rajagopalan G., Shivaji S., (1994). Thermolabile ribonucleases from Antarctic psychrotrophic bacteria: Detection of the enzyme in various bacteria and purification from *Pseudomonas fluorescens*; FEMS Microbiol. Lett. 122 211–216.

Rivkina EM., Friedmann EI., McKay CP., Gilichinsky DA., (2000). Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. Appl. Environ. Microbiol. 66:3230–3233.

Rivkina, E., Friedmann, E.I., McKay, C.P., Gilichinsky, D.A., (2000). Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. Applied and Environmental Microbiology 66, 3230–3233.

Roder A., Hoffmann E., Hagemann M., Berg G.,(2005). Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. FEMS Microbiol Lett 2005;243:219–26.

Roose Amsaleg CL., Garnier Sillam E., Harry M., (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. Applied Soil Ecology 18 (1): 47–60.

Rothberg JM., Hinz W., Rearick TM., Schultz J., Mileski W., Davey M., Leamon JH., Johnson K., Milgrew J., Edwards M., Hoon J., Simons J.F., Marran D., Myers JW., Davidson JF., Branting A., Nobile, J.R., Puc, B.P., Light, D., Clark, T.A., Huber, M., Branciforte, J.T., Stoner, I.B., Cawley, S.E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J.A., Namsaraev, E., McKernan, K.J., Williams, A., Roth, G.T., Bustillo, J., (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 475, 348–352.

Russo R., Riccio A., Di Prisco G., Verde C., Giordano D., (2010). Molecular adaptations in Antarctic fish and bacteria. Polar Science 4: 245-256.

Russo R., Riccio A., Di Prisco G., Verde C., Giordano D., (2010). Molecular adaptations in Antarctic fish and bacteria. Polar Science 4: 245-256.

Ryu E., (1940). A simple method of differentiating between Gram-positive and Gram-negative organism without staining. Kitasato arch. Exp. Med. 17: 58-63.

Saitou N., Nei M., (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Schlesinger WH., Pippen JS., Wallenstein MD., Hofmockel KS., Klepeis DM., Mahall BE., (2003). Community composition and photosynthesis by photoautotrophs under quartz pebbles, Southern Mojave Desert. *Ecology* 84:3222–3231.

Schmalenberger A., Tebbe CC., (2014). Profiling the Diversity of Microbial Communities with Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) *Methods Mol Biol* 2014: 1096: 71–83.

Schoch CL., Seifert KA., (2012). “Reply to Kiss: internal transcribed spacer (ITS) remains the best candidate as a universal DNA barcode marker for Fungi despite imperfections,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 27, article E1812, 2012.

Schofield O., Ducklow HW., Martinson DG., Meredith MP., Moline MA., Fraser WR., (2010). How do polar marine ecosystems respond to rapid climate change? *Science* 328:1520–23.

Schofield O., Ducklow HW., Martinson DG., Meredith MP., Moline MA., Fraser WR., (2010). How do polar marine ecosystems respond to rapid climate change? *Science* 328:1520–23.

Schumann P., Prauser H., Rainey FA., Stackebrandt E., Hirsch P. (1997). *Friedmanniella antarctica* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid containing actinomycetes from Antarctic sandstone. *Int J Syst Bacteriol* 47: 278±283.

Seckbach J., (2000). Journey to diverse microbial worlds: adaptation to exotic environments. *Science*, 308, 541– 544.

Seckbach J., Oren A., (2010). *Microbial Mats: Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Heidelberg: Springer Science.

Segers P., Vancanneyt M., Pot B., Torck U., Hoste B., Dewettinck D., (1994). Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. And

Brevundimonas vesicularis comb. nov., Respectively. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, July 1994, p. 499-510/20-7713/94. Vol. 44, No. 3.

Sekiguchi H., Tomioka N., Nakahara T., Uchiyama H., (2001). A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters* 23: 1205-1208.

Selama O., James P., Nateche F., Wellington EMH., Hacène H., (2013) "The world bacterial biogeography and biodiversity through databases: a case study of NCBI Nucleotide Database and GBIF Database," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 240175, 11 pages, 2013.

Shannon CE., (1948). A mathematical theory of communications. *Bell System technical Journal*, 27: 379-423, 623-656.

Sheffield VC., Beck JS., Stone EM., Myers RM., (1992). A simple and efficient method for attachment of a 40-base pair, GC-rich sequence to PCR-amplified DNA. *BioTechniques* 12: 386-387.

Sheffield VC., Cox DR., Myers RM., (1989). Attachment of a 40 bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 232-236.

Shokralla S., Spall JL., Gibson JF., Hajibabaei M., (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 2012, 21:1794-1805.

Simpson EH., (1949). Measurement of Diversity. *Nature* 163: 688-688.

Smalla K., Wachtendorf U., Heuer H., Liu W., (1998). Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4): 1220-1225.

Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G., (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10): 4742-4751.

Smith, W. O., Shields A.R., Peloquin J.A., Catalano G., Tozzi S., Dinniman M.S., Asper V.A., (2006), Interannual variations in nutrients, net community production, and biogeochemical cycles in the Ross Sea, *Deep. Soil Biol. Biochem.* 40:1322–1329.

Sokal R.R., Rohlf, F.J., (1962). The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11:33–40.

Srinivas T.N.R., Nageswara R., Vishnu Vardhan Reddy P., Pratibha M.S., Sailaja B., Kavya B., Hara Kishore K., Begum Z., Singh S.M., Shivaji S., (2009). Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active lipases, amylases and proteases, from culturable bacteria of Kongsfjorden and Ny-A°lesund, Svalbard. *Arctic. Curr. Microbiol.* 59, 537e547.

Steinbeiss S., Gleixner G., Antonietti M., (2009). Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry*, 41 (6): 1301–1310.

Stichel T., Frank M., Rickli J., Haley B.A., (2012). The hafnium and neodymium isotope composition of seawater in the Atlantic sector of the Southern Ocean. *Earth Planet. Sci. Lett.* 317–318, 212–294. structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis.

Sullivan C.W., Cota G.F., Krempin D.W., Smith Jr. W.O., (1990). Distribution and activity of the bacterioplankton in the marginal ice-zone of the Weddel Sea during austral spring. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63: 239-252.

Swift D.J.P., (1975). Barrier-island genesis: evidence from the central Atlantic shelf, eastern U.S.A. *Sedimentary Geology* 14, 1–43.

Swingland I.R., (2001). Biodiversity, definition of. Pages 377–391 in S. A. Levin, editor-in-chief. *Encyclopedia of biodiversity*. Volume 1. Academic Press, San Diego, California.

Takada-Hoshino Y., Matsumoto N., (2004). An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes and Environments*, 13 (1): 13–19.

Takami H., Inoue A., Fuji F., Horikoshi K., (1997). Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS Microbiol Lett* 152, 279±285.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Teixeira LC., Peixoto R S., Cury JC., Sul W J., Pellizari VH., Tiedje J., Rosado A S., (2010). Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. *The ISME journal*, 4(8), 989-1001.

Thomas DN., (2005). Photosynthetic microbes in freezing deserts. *Trends Microbiol* 13:87–88.

Thompson J., Gibson T., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D., (1997). The ClustalX windows interface: Xexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876–4882.

Thompson JF., Steinmann KE., (2007). Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system. *Curr Protoc Mol Biol*.

Tian F., Yu Y., Chen B., Li H., Yao Y., Guo X., (2009). Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as revealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis. *Polar Biol* 32: 93-103.

Tindall BJ., (2004). Prokaryotic diversity in the Antarctic: The tip of the iceberg. *Microb Ecol* 47: 271–283.

Tvrzová L., Schumann P., Sprock C., Sedláček I., Verburg S., Kroppenstedt R.M. and Pačová Z. (2005). Polyphasic taxonomic study of strain CCM 2783 resulting in the description of *Arthrobacter stackebrandtii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2005), 55, 805–808.

Van Elsas JD., Duarte GE., Rosado AS., Smalla K., (1998). Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *Journal of Microbiological Methods* 32: 133-54.

Van Verseveld HW., Röling WFM., (2004). Cluster analysis and statistical comparison of molecular community profile data. In: Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head, I.M., Akkermans, A.D.L., van

Elsas, J.D. , (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*, vol 1. second edn. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1–24.

Vasileva-Tonkova E., Gesheva V., (2007). Biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp during growth on hydrocarbons. *Curr Microbiol* 54:136–141.

Vaughan DG., Corr HFJ., Ferraccioli F., Frearson N., O'Hare A., Mach D., Holt JW., Blankenship DD., Morse DL., Young DA., (2006). New boundary conditions for the West Antarctic ice sheet: Subglacial topography beneath Pine Island Glacier, *Geophys. Res. Lett.*, 33. L09501, doi:10.1029/2005GL025588.

Verde C., Parisi E., Di Prisco G., (2006). The evolution of thermal adaptation in polar fish. *Gene* 385: 137-145.

Vincent WF., Bowman JP., Rankin LM., McMeekin TA., (2000). Phylogenetic diversity of picocyanobacteria in Arctic and Antarctic ecosystems, p. 317–322. In R. Bell, C. M. Brylinsky, and M. Johnson-Green (ed.), *Microbial biosystems: new frontiers*. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Halifax Canada. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Vincent WF., Quesada A., (1994). Ultraviolet radiation effects on cyanobacteria : implications for Antarctic microbial ecosystems. In *Ultraviolet Radiation in Antarctica : Measurements and Biological Effects* (Weiler, C.S. & Penhale, P.A., editors), 111±124. Antarctic Research Series vol. 62. American Geophysical Union, Washington, DC.

Vincent WF., (2000). Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion. *Curr Microbiol* 58:126–141-145.

Vishniac HS., (1993). The microbiology of Antarctic soils. In: Friedmann EI (ed) *Antarctic microbiology*. Wiley, New York, pp 297-341.

Wang F., Gai Y., Chen M., Xiao X., (2009). *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2759–2762.

- Ward BB., O'Mullan GD., (2002). Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceani*, a marine ammonia-oxidizing γ -Proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes. *Appl Environ Microbiol* 68: 4153-4157 .
- Watanabe K., Teramoto M., Futamata H., Harayama S., (1998). Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 64: 4396-4402.
- Watson SW., Novitsky TJ., Quinby HL., Valois FW., (1977). Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 33: 940-946.
- Watzinger A., S. Feichtmair et al., (2014). "Soil microbial communities responded to biochar application in temperate soils and slowly metabolized ¹³C-labelled biochar as revealed by ¹³C PLFA analyses: results from a short-term incubation and pot experiment." *European Journal of Soil Science* 65(1): 40–51.
- Westall F., (2005). Life on the early Earth: a sedimentary view. *Science* 308, 366–367. (doi:10.1126/science.1107227).
- Whiteley AS., Jenkins S., Waite I., Kresoje N., Payne H., et al. (2012). Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *J Microbiol Methods* 91: 80–88. doi: 10.1016/j.mimet.2012.07.008.
- Whittenbury R., (1964) .Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. *J Gen Microbiol* 35: 13-26.
- Wickelmaier F., (2003). An introduction to MDS. Sound Quality Research Unit, Aalborg University, Denmark.
- Widmer F., Fliessbach A., Laczko E., Schulze–Aurich J., Zeyer J., (2001). Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA, PLFA, and Biolog™ analyses. *Soil Biology & Biochemistry*, 33 (7– 8): 1029–1036.
- Wiegel J., (1990). Temperature spans for growth: Hypothesis and discussion. *FEMS Microbiol Lett* 75: 155-169.

- Wierzchos J., De los Rios A., Ascaso C., (2013). Microorganisms in desert rocks: the edge of life on earth. *Int Microbiol* 15:171–181.
- Wierzchos J., Camara B., De los Rios A., Davila AF., Sanchez Almazo IM., Aetieda O., Ascaso C., (2011). Microbial colonization of Ca-sulfate crusts in the hyperarid core of the Atacama Desert: implications for the search for life on Mars. *Geobiology*, 9(1), 44-60.
- Winding A., Hund–Rinke K., Rutgers M., (2005). The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62 (2): 230–248.
- Wingfield JC., Kelley J P., Angelier F., (2011). What are extreme environmental conditions and how do organisms cope with them? *Current Zoology*, 57, 363e374.
- Wittebolle L., Vervaeren H., Verstraete W. and Boon N. (2008). Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Appl Environ Microbiol* , 74: 286–293.
- Wynn-Williams DD., (1990). Ecological aspects of Antarctic microbiology. In: Marshall, K.C. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York, London. pp. 71±146.
- Xiao et Zhang (2014). Life in extreme environments: Approaches to study life-environment co-evolutionary strategies. *Nature*; 21.5-125-125.
- Yakimov MM., Golyshin PN., Lang S., Moore ER., Abraham WR., Lunsdorf H., Timmis KN., (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactantproducing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 48:339–348.
- Yannarell AC., AD., Kent GH., Lauster TK., Kratz EW., Triplett E., (2003). Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial Ecology*, 46: 391-405.
- Yumoto I., Hirota K., Sogabe Y., Nodasaka Y., Yokota Y., Hoshino T., (2003). *Psychrobacter okhotskensis* sp. nov., a lipaseproducing facultative psychrophile isolated from the coast of the Okhotsk Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1985–1989.

Yung CM., Chan Y., Lacap DC., Pe´rez-Ortega S., de Los Rios-Murillo A., Lee CK., Cary SC., Pointing SB., (2014). Characterization of chasmoendolithic community in Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Microb Ecol* 68:351–359.

Zhang L., Xu Z.H., 2008. Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments*, 8 (6): 379–388.

Zhang, DC., Schumann P., Liu HC., Xin YH., Zhou YG., Schinner F., Margesin R., (2010). *Arthrobacter alpinus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2149–2153.

Zucconi L., Pagano S., Fenice M., Selbmann L., Tosi S., Onofri S., (1996). Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica. *Polar Biol* 16: 53-61.

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare il Prof. Fenice Massimiliano per avermi dato l'opportunità di lavorare su un progetto così interessante e importante. Questo lavoro mi ha permesso di confermare ancora una volta quanto i batteri siano incredibili, come riescano nonostante tutto a sopravvivere e resistere anche se la natura li pone in condizioni ai limiti della vita. Sono sempre una sorpresa.

Desidero ringraziare Paolo, disponibile nel dare consigli e nel confrontarci, un collega e amico.

Un grazie ad Arianna, collega ed amica, sempre presente e fondamentale in questi tre anni.

Grazie al progetto PNRA e alle Prof. Zucconi L. e Selbmann L. per i campioni forniti.

Alla mia famiglia: Mamma, Babbo, Elena e Lucio, senza ogni loro singolo incoraggiamento e consiglio non sarei riuscita ad arrivare dove sono ora, Grazie per tutto.

