

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO



DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE (DEB)

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE

XXVII CICLO

Studio della diversità batterica delle Saline di Tarquinia: approcci colturali  
e coltura-indipendenti

Settore scientifico-disciplinare: BIO/19

Coordinatore: Prof. DANIELE CANESTRELLI

Tutor: Prof. MASSIMILIANO FENICE

Dottorando: ARIANNA AQUILANTI

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 GLI AMBIENTI MARINI DI TRANSIZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Caratteristiche chimico-fisiche.....	2
1.1.2 Caratteristiche ecologiche e biologiche.....	4
<b>1.2 LE SALINE MARINE.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 I MICRORGANISMI DEGLI AMBIENTI IPERALINI.....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Gli eucarioti.....	10
1.3.2 I procarioti.....	11
1.3.3 Adattamenti agli ambienti iperalini.....	14
<i>1.3.3.1 Strategie osmoregolative e morfostrutturali.....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.3.2 Diversità metabolica dei microrganismi alofili.....</i>	<i>18</i>
<b>1.4 TECNICHE DI INDAGINE DELLA DIVERSITÀ MICROBICA.....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Metodi colturali.....	21
1.4.2 Metodi coltura-indipendenti.....	25
<i>1.4.2.1 Le tecniche di fingerprinting.....</i>	<i>25</i>
<i>1.4.2.2 Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE e TGGE).....</i>	<i>27</i>
<i>1.4.2.3 NGS (Next Generation Sequencing).....</i>	<i>29</i>
<b>1.5 AREA DI STUDIO: LE SALINE DI TARQUINIA.....</b>	<b>31</b>
<b>1.5.1</b> Generalità e cenni storici.....	<b>31</b>
<b>1.5.2</b> Aspetti naturalistici.....	<b>33</b>

<b>1.6 LE SALINE DI TRAPANI E PACECO.....</b>	<b>35</b>
<b>2. SCOPO DEL LAVORO.....</b>	<b>36</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 CAMPIONAMENTO.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 STUDIO DEI BATTERI COLTIVABILI.....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Test preliminari.....	41
3.2.2 Identificazione degli isolati e filogenesi.....	42
3.2.2.1 Estrazione del DNA.....	42
3.2.2.2 PCR per l'amplificazione del gene 16S rDNA.....	43
3.2.2.3 Allineamento delle sequenze e costruzione dell'albero filogenetico.....	44
3.2.3 Determinazione dei profili di crescita a differenti concentrazioni di cloruro di sodio.....	44
3.2.4 Determinazione dei profili di crescita a differenti temperature.....	45
3.2.5 Studi di citometria di flusso.....	45
<b>3.3 STUDIO DELLE COMUNITÁ BATTERICHE MEDIANTE TECNICA DI FINGERPRINTING PCR-DGGE.....</b>	<b>47</b>
3.3.1 Estrazione del DNA.....	47
3.3.2 Amplificazione del gene 16S rDNA (I PCR).....	48
3.3.3 Amplificazione della regione ipervariabile V3 (II PCR).....	48
3.3.4 Concentrazione e purificazione dei prodotti PCR.....	50
3.3.5 Casting del gel di DGGE.....	50
3.3.6 Corsa elettroforetica.....	51
3.3.7 Analisi dei gel DGGE.....	52

<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1 STUDIO DEI BATTERI COLTIVABILI.....</b>	<b>56</b>
4.1.1 Test preliminari.....	56
4.1.2 Identificazione degli isolati.....	59
4.1.3 Costruzione dell'albero e filogenesi.....	62
4.1.4 Determinazione dell'optimum e del range di crescita a differenti temperature.....	70
4.1.5 Determinazione dell'optimum e del range di crescita a differenti concentrazioni saline.....	74
4.1.6 Risultati di citometria di flusso.....	81
<b>4.2 STUDIO DELLA COMUNITÀ BATTERICA DELLE SALINE DI TARQUINIA.....</b>	<b>87</b>
4.2.1 Analisi di clusterizzazione dei profili DGGE.....	87
4.2.2 Analisi statistica multivariata NMDS.....	103
4.2.3 Analisi statistica multivariata NMDS e indici di biodiversità.....	116
4.2.4 L'organizzazione funzionale delle comunità.....	121
4.2.5 Indice di dinamicità.....	127
4.2.6 Studio delle variazioni mensili.....	131
4.2.6.1 <i>Analisi di clusterizzazione dei profili DGGE.....</i>	<i>131</i>
4.2.6.2 <i>Indici di biodiversità e analisi statistica multivariata (NMDS).....</i>	<i>135</i>
4.2.6.3 <i>Analisi di clusterizzazione per i mesi di maggio e settembre.....</i>	<i>141</i>
<b>4.3 STUDIO PRELIMINARE DELLA COMUNITÀ BATTERICA DELLE SALINE DI TRAPANI E PACECO.....</b>	<b>145</b>
4.3.1 Analisi di clusterizzazione dei profili DGGE.....	145
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>150</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>152</b>

# CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

## 1.1 Gli ambienti marini di transizione

L'idrobiosfera può essere suddivisa in tre domini, ciascuno dei quali presenta specifici caratteri morfologici, sedimentari, geochimici e florofaunistici. In particolare si possono distinguere:

- Un “dominio continentale”;
- Un “dominio marino”;
- Un “dominio paralico”.

Sono ascrivibili al dominio paralico (dal greco παρά “vicino” e ἅλς “sale, mare”) tutti i corpi idrici ubicati lungo costa in corrispondenza dei quali si verificano l'incontro e il mescolamento di acque dolci provenienti dal drenaggio continentale e di acque marine. L'aggettivo “paralico” indica l'insieme delle caratteristiche derivanti dall'interazione di determinati ambienti con il dominio marino (Guelorget and Perthuisot, 1992).

Per gli ambienti paralici si utilizza una vasta terminologia (aree di transizione, zone di mescolamento, ambienti intermediari, aree a salinità variabile, zona di frangia costiera, ambienti salmastri...), a indicare il fatto che il dominio paralico comprende tutti gli ambienti costieri sia naturali che artificiali.

Gli ambienti paralici differiscono tra loro per caratteristiche morfologiche ed idrologiche ma possono comunque essere identificate delle peculiarità ricorrenti (Di maio, 2008):

- Ampie variazioni spazio-temporali di salinità;
- Elevata escursione termica stagionale;
- Ridotto idrodinamismo;
- Mescolamento verticale delle acque dovuto principalmente all'azione del vento;
- Apporto continuo di materiale detritico organico e inorganico;

- Grande sviluppo della zona sedimentaria rispetto al volume delle acque;
- Basse profondità;
- Sedimenti a granulometria fine;
- Abbondanza in materia organica;
- Elevate concentrazioni di nutrienti a rapido riciclo;
- Elevata produttività primaria;
- Tendenza a rapidi cambiamenti ambientali;
- Biota variabile.

### **1.1.1 Caratteristiche chimico-fisiche**

Negli ambienti paralici i valori di salinità e temperatura sono soggetti ad una estrema variabilità dovuta alle caratteristiche conformazionali di tali ambienti; altri parametri la cui conoscenza è essenziale per la categorizzazione di questi ambienti sono: densità, ossigeno disciolto (OD), materiali in sospensione, trasporto solido, caratteristiche geochimiche dei sedimenti, etc. etc. Di seguito vengono elencati i principali parametri chimici e chimico-fisici:

#### 1) Salinità:

“La salinità è la percentuale di sali totali in acqua, dopo che tutta la materia organica è stata ossidata, i carbonati sono convertiti in ossidi e bromuri e ioduri sono stati sostituiti da cloruri” (ANPA, 1999).

I valori di salinità dipendono dal regime idraulico del bacino, dalle diverse situazioni di deflusso e dalle caratteristiche microclimatiche. Le variazioni di salinità invece sono legate all'evaporazione, alle precipitazioni ed al mescolamento delle acque. La salinità è uno dei principali parametri che consentono la classificazione ed il monitoraggio delle acque di transizione.

## 2) Temperatura:

Nelle acque di transizione, la temperatura varia stagionalmente sia orizzontalmente che lungo la colonna d'acqua. Durante l'estate si raggiungono condizioni di ridottissimo idrodinamismo: ciò si traduce nell'instaurarsi di una ben definita variazione termica in funzione della profondità, quindi di un termocline e nell'instaurarsi di una più complessa stratificazione termoalina.

## 3) Ossigeno disciolto (OD):

La quantità di ossigeno disciolto in acqua è funzione della salinità e della temperatura: in particolare l'OD diminuisce all'aumentare di temperatura e salinità. L'OD è uno dei parametri che influenza la distribuzione e la composizione delle comunità microbiche. Il tenore di OD di una massa d'acqua dipende anche dal carico organico presente in acqua, dallo stato trofico (produzione fotosintetica) e dagli scambi gassosi che avvengono alla zona dell'interfaccia aria-acqua (Bettinetti *et al.*, 2007).

## 4) Materiali in sospensione:

I materiali in sospensione, di natura sia organica che inorganica, includono sostanze particolate, indissolte e di natura colloidale ed influiscono sulla trasparenza delle acque. La conoscenza dei valori di torbidità (che nelle acque di transizione sono in genere molto maggiori rispetto a quelli delle acque costiere) è importante in quanto, il grado di torbidità influenza la penetrazione della luce (quindi la produttività primaria), la temperatura delle acque, la disponibilità di ossigeno e determina la possibilità di adsorbimento sulla superficie delle particelle che la costituiscono, di potenziali molecole inquinanti (ANPA, 2000).

## 5) Caratteristiche geochimiche dei sedimenti:

I sedimenti degli ambienti con acque di transizione presentano una geochimica diversa da quella del mare. Inoltre, esiste una diversità geochimica anche tra gli stessi ambienti di transizione, conseguente ad una variabilità delle condizioni morfologiche, idrologiche e climatiche (ANPA, 2000). In generale, nei bacini o nelle porzioni di bacino separate dal mare, prevalgono una fase biogenica (organica e biochimica) ed una geochimica moderatamente differente da quella marina; nelle porzioni di bacino più lontane dal mare, la fase abiogenica diventa preponderante ed è rappresentata prevalentemente da depositi evaporitici nei sistemi iperalini e da depositi terrigeni, associati o meno a materiale vegetale in decomposizione, nei sistemi ipoalini quasi dulciacquicoli (Guelorget and Perthuisot, 1992).

## 1.1.2 Caratteristiche ecologiche e biologiche

La struttura della comunità di ambienti paralici è indubbiamente espressione dei parametri chimico-fisici precedentemente elencati, nonché delle caratteristiche morfologiche degli ambienti; la variabilità stagionale (che ha un'importanza preponderante) di tali parametri si riflette in variazioni nella composizione di tali comunità. Indubbiamente la componente più studiata è costituita dai macroinvertebrati bentonici, visto anche l'inquadramento a livello normativo del loro ruolo per biomonitorare la qualità ecologica di questi ambienti.

Di seguito sono elencate molto sinteticamente le principali classi che vanno a costituire il biota paralico mediterraneo.

### 1) Comunità vegetali

- Piante vascolari e macroalghe: le specie alofite fronteggiano abitualmente lo stress da sali, esse crescono su suoli aridi ad elevato contenuto in sali (salinità costituzionale e/o di adsorbimento) o in saline: un caso particolare è rappresentato dalle alofite obbligate che non sopravvivono se non in presenza di forti quantità di sali di sodio. A causa del basso potenziale osmotico del suolo ( $\Psi < -5$  MPa), le alofite sono costrette a mantenere il proprio potenziale idrico interno a valori inferiori rispetto a quelli presenti all'esterno. Le alofite tendono ad accumulare soluti nelle foglie, in particolare nei vacuoli: quindi, per evitare la disidratazione del citoplasma, in esso dovrà essere mantenuto, grazie alla elevata componente matriciale del potenziale idrico, un potenziale prossimo a quello del vacuolo. La strategia utilizzata sarebbe quella di accumulare attivamente soluti compatibili, in particolare prolina, betaina, colina in *Atriplex spongiosa* e *Suaeda monoica*; questi soluti, specialmente i composti di ammonio quaternario, anche ad elevate concentrazioni, non sembrano esercitare influenza alcuna sull'attività di un gran numero di enzimi (da cui il nome di soluti "compatibili"). È interessante notare che gli stessi soluti compatibili compaiono nelle glicofite tolleranti lo stress idrico e sembrano quindi rappresentare il denominatore comune della tolleranza a stress da concentrazione di soluti. Molte alofite adottano la succulenza come mezzo per trattenere l'acqua interna (*Juncus gerardii*); altre estrudono i soluti tramite le ghiandole del sale (*Limonium* sp.). Le alofite occasionali, in genere, fronteggiano lo stress osmotico estrudendo i soluti (Avena *et al.*, 2000).

Nelle aree parzialmente o periodicamente sommerse predominano associazioni di fanerogame alofite comprendenti i generi *Juncus*, *Phragmites*, *Puccinellia* e *Spartina*. Nelle zone direttamente

influenzate dal mare possono essere ritrovati insediamenti di *Cymodocea* e *Posidonia*. In ambienti salmastri possono essere ritrovate aptofite ancorate a substrati rigidi, ad esempio, le macroalghe *Enteromorpha* e *Blidingia*, rizofite su fondali mobili, *Ruppia*, *Zostera* e *Vaucheria*, pleustofite galleggianti o su fondale tra le quali *Enteromorpha*, *Ulva*, *Cladophora*, *Chaetomorpha* *Gracilaria* e *Valonia* (Avena *et al.*, 2000).

-Fitoplancton: La componente più rappresentativa è costituita da membri del phylum Bacillariophyta, eventualmente associati a membri appartenenti ai seguenti phyla algali: Dinophyta, Euglenophyta, Criptophyta e cianobatteri. Ne sono rappresentanti i generi *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Coscinudiscus*, e *Rhizosolenia*: tra le Dinofitee, i generi *Prorocentrum*, *Peridinium*, e *Proto-peridinium*. Occorre sottolineare come la produttività primaria sia limitata in questo caso dalla limitata altezza della colonna d'acqua e dall'eventuale elevata torbidità.

## 2) Macrofauna invertebrata

In moltissimi ambienti paralici esiste una zonazione orizzontale macrobentonica dalle zone di collegamento a mare verso le zone interne; in questi ambienti possono essere distinte:

- i. Una regione dominata da molluschi pelecipodi e alcuni echinodermi;
- ii. Una zona di transizione in cui scompaiono gli echinodermi ma ancora non prevalgono le specie tipicamente paraliche;
- iii. Una zona tipicamente paralica in cui abbondano: *Cerastoderma glaucum*, *Abra ovata*, *Hydrobia acuta*, *Nereis diversicolor*, *Gammarus insensibilis*, *G. locusta*, *G. aequicauda*, *Corophium insidiosum*, *Sphaeroma hookeri*, *Chironomidae*;
- iv. Una quarta regione tipica degli ecosistemi iperalini caratterizzata da agglomerati mono - oligospecifici di cianobatteri, associati ad un piccolo numero di specie animali come *Hydrobia acuta*, *Sphaeroma rugicauda*, *Pirenella conica*, *Ammonia beccarii* var. *tepida*).

Il benthos si può suddividere in macrobenthos e meiobenthos.

- Per macrobenthos si intendono quegli invertebrati che abitano i fondali acquatici con dimensioni superiori a 0,5 mm (ANPA, 2000); al macrobenthos appartengono i seguenti gruppi: Insetti, Crostacei, Molluschi, Oligocheti, Irudinei, Platelminti e più raramente Poriferi, Celenterati e Briozoi.

- Per meiobenthos si intende la totalità degli organismi trattenuti da setacci con maglie di 40-100 µm: ad essi appartengono Nematodi, Protozoi, Rotiferi, Tardigradi e Ostracodi. Le caratteristiche granulometriche del sedimento sono i principali responsabili della composizione in specie delle comunità meiobentoniche.

### 3) Zooplancton

Si ritiene che i parametri di struttura e dinamica delle biocenosi zooplanctoniche siano descrittori ricchi di contenuto informativo, fondamentale per la caratterizzazione ecologica dei domini paralici. E' stata talvolta evidenziata l'esistenza di ben definiti gradienti idrochimici parallelamente a variazioni nella struttura delle biocenosi zooplanctoniche, che si sovrappongono in larga misura alle variazioni granulometriche e chimiche dei sedimenti e alle variazioni strutturali delle biocenosi bentoniche (Colombo *et al.*, 1984).

In tutti gli ambienti più o meno chiusi, con idrodinamismo ridotto le comunità zooplanctoniche presentano, tranne rare eccezioni, le stesse specie dominanti. Tra queste, le più diffuse sono *Acartia clausi*, *Paracalanus parvus* e *Penilia avirostris*.

## 1.2 Le saline marine

Le saline sono ambienti di transizione separati dal mare da cordoni sabbiosi, ghiaiosi o da scogliere. Caratterizzate da una serie di vasche interconnesse nelle quali la concentrazione di sale aumenta progressivamente, sono ambienti seminaturali che riproducono in un'area relativamente limitata le condizioni di un ambiente umido costiero iperalino.

La condizione di iperalinità viene a realizzarsi a causa della maggiore entità dell'evaporazione rispetto agli apporti idrici (sia sotterranei, che ipodermici o per diretto afflusso meteorico): a sua volta tale condizione è determinata dalla morfologia di tali bacini, in particolare dal loro confinamento rispetto al mare e dalle ridotte profondità (appositamente realizzate per scopi produttivi). Il contatto con le acque marine è di solito realizzato tramite canali naturali o artificiali la cui apertura/chiusura può essere controllata. Frequentemente sono presenti delle pompe idrovore, ivi ubicate al fine di modulare la captazione di acqua marina: tali opere di presa sono in genere costituite da una camera di aspirazione e da condotte di aspirazione con possibilità di regolamento delle portate.

La struttura delle saline attive è più o meno regolare e comprende due tipologie di vasche: le evaporanti e le salanti. Nelle prime avviene la concentrazione dei sali e nelle seconde la loro

precipitazione. Le vasche sono realizzate in modo tale che la profondità decresca dalle zone di contatto col mare verso l'interno e ciò determina il gradiente di salinità crescente verso l'interno (Di Maio, 2008; Bramucci, 2010). Si tratta quindi di ambienti caratterizzati da condizioni estreme per il forte grado di confinamento, l'alto tenore salino raggiunto nelle acque e nei terreni, ma anche per l'elevata variabilità di parametri chimico-fisici come la temperatura e la salinità, che sono soggetti a forti fluttuazioni (Oren 2002c; Ventosa *et al.* 1998).

Le saline sono luoghi di grande interesse naturalistico e le loro vasche sono parte integrante del paesaggio (Takekawa *et al.*, 2006). Esse ricoprono un importante ruolo ecologico quali zone umide da proteggere e conservare: sebbene strutturalmente diverse rispetto ai luoghi naturali, hanno la loro stessa funzione come aree per la conservazione della natura (Crisman, 1999) e rappresentano luoghi di riproduzione e sorgenti di nutrimento per una gran quantità di uccelli migratori.

Nonostante i particolari parametri chimico-fisici, le saline ospitano sia produttori primari che consumatori primari e secondari; tuttavia l'ecosistema risulta semplificato ad ogni livello trofico con un basso numero di specie e un alto numero di individui (Ferronato *et al.*, 2000), inoltre si è osservato che, all'aumentare della salinità, diminuisce la biodiversità (Iberite, 1992), poiché sempre meno specie possono adattarsi a condizioni via via più estreme. Nelle vasche con le salinità più elevate sono presenti prevalentemente o esclusivamente comunità di microrganismi (Pedrós-Alió *et al.*, 2000). Per tale ragione le saline rappresentano un ecosistema molto interessante per lo studio della diversità e produttività microbica (Joint *et al.*, 2002).



**Figura 1.1**

Da sinistra in alto: vedute aeree delle saline della Baia di San Francisco (il colore rossastro è dovuto a blooming di microrganismi alofili tra cui, presumibilmente, Archaea appartenenti al genere

*Halobacterium*), delle Saline di Santa Pola (Alicante, Spagna), delle Saline di Tarquinia (Viterbo, Lazio) e delle Saline di Trapani e Paceco (Trapani, Sicilia).

### **1.3 I microrganismi degli ambienti iperalini**

Gli ambienti iperalini sono diffusi in tutti i continenti; ne esistono due tipologie fondamentali: quelli in prossimità del mare (inclusi nei più generici ambienti paralici), in cui il sale predominante è il cloruro di sodio (NaCl), e quelli che si sono sviluppati nell'entroterra da fonti idriche non marine: questi contengono diversi tipi di sali, i più comuni sono i sali di potassio, magnesio e sodio; quest'ultima condizione è quella che caratterizza i laghi alcalini, in cui l'anione dominante è il carbonato. I primi ambienti sono detti talassoalini (salinità di origine marina), i secondi, atalassoalini (salinità di origine non marina). La composizione in sali condiziona in modo specifico la componente biotica presente in questi ambienti (Dobson and Frid, 2009).

Le saline sono ambienti iperalini riconducibili alla prima tipologia e, a causa del gradiente di salinità che vi si instaura, sono considerati ambienti estremi caratterizzati da una biologia piuttosto ristretta. Microrganismi in grado di crescere in presenza di sale sono stati rilevati in tutti e tre i domini: Archaea, Bacteria, e Eukarya.

I microrganismi non alofili in grado di crescere sia in assenza, sia in presenza di sale sono definiti alotolleranti. Tra questi, quelli in grado di crescere a concentrazioni superiori a 150‰ di NaCl sono considerati alofili estremi (Margesin and Schinner, 2001).

I microrganismi che richiedono sale per la crescita vengono indicati come alofili. Secondo la definizione di Kushner (1978), che è quella tuttora più utilizzata, si possono distinguere in:

- alofili deboli (molti organismi marini), con un optimum intorno a 30‰ di NaCl;
- alofili moderati, con un optimum di crescita tra il 30 ed il 150‰;
- alofili estremi, con un optimum di crescita intorno ai 250‰ (tra i quali sono compresi gli alofili estremi borderline, che richiedono almeno 120‰ di NaCl per la crescita) (Margesin and Schinner, 2001).

Elevate concentrazioni saline, determinano ambienti ipertonici, nei quali, i microrganismi non adattati, tendono a disidratarsi per osmosi. Oltre a ciò, l'elevata salinità può determinare la denaturazione delle proteine (denaturazione da salinità). Per tali ragioni un numero relativamente ridotto di specie è in grado di crescere in acque ad elevata salinità.

### 1.3.1 Gli eucarioti

Tra gli eucarioti, gli alofili sono scarsi. Tuttavia questi contribuiscono significativamente al biota di ambienti iperalini. L'alga verde del genere *Dunaliella* è il principale o il solo produttore primario in questi ambienti.

Le specie isolate a più alte concentrazioni saline sono: *Dunaliella salina*, *D. bardawil* e le alghe più piccole *D. viridis* e *D. parva* (Oren, 2002b).

Il genere *Dunaliella* manca di una parete cellulare rigida e accumula nell'ambiente intracellulare, grandi quantità di glicerolo per raggiungere l'equilibrio osmotico.

Un'altra interessante alga verde alofila recentemente scoperta è *Picocystis salinarum*. Questo piccolo (circa 2 µm) organismo è stato il primo isolato dalle vasche di evaporazione (con salinità pari a 100 ‰ NaCl) delle Saline di San Francisco Bay (Lewin *et al.*, 2000).

Le diatomee possono essere trovate a concentrazioni saline di circa 150‰. Uno studio sulla tolleranza alla salinità delle diatomee presenti nelle saline in California mostrava che la maggior parte delle diatomee alofile ha l'optimum salino al di sotto di 75‰, solo una minoranza può crescere a 125-150‰ e nessuna cresce a 175‰. La maggior parte dei ceppi isolati erano due specie non identificate del genere *Amphora*, *Nitzschia fusiformis* e *Entomoneis* sp. (Clavero *et al.*, 2000).

Anche i protozoi sono stati isolati da saline e laghi iperalini. Diverse specie di ciliati sono state comunemente isolate da ambienti iperalini come *Fabrea salina*, *Euplotes* spp. e *Ciliophyra* spp.

*Ciliophyra utahensis* è stato isolato dalle acque del lago di Hutt in Australia, dal Gran Lago Salato e dal Mar Morto (Flowers and Evans, 1966; Post *et al.*, 1983).

*F. salina* è stato isolato dal lago di Hutt (Post *et al.*, 1983), dalle acque iperaline del lago Salton in California e dalle saline del Messico (Javor, 1983) e il genere dei ciliati *Euplotes* è stato isolato da sei habitats iperalini nel mondo (Davis, 1978; flowers and Evans, 1966; Post *et al.*, 1983; Wilbert, 1995,...).

Anche gli ameboflagellati sono comuni in ambienti iperalini. Tra questi, il genere *Tetramitus*, isolato da acque iperaline in Australia (Ruinen 1938), dal Gran Lago Salato (Flowers and Evans, 1966; Post, 1977) e da saline in Jamaica (Golubic, 1980) e *Paratetramitus*, isolato dal lago Salton in California (Rogerson and Hauer, 2002) e dalle saline di Eilat, Israele.

Tra gli eucarioti, anche i funghi sono stati isolati da ambienti iperalini, ma solo recentemente. Per questa ragione il loro ruolo in tali ambienti non è ancora ben chiaro (Gunde-Cimerman *et al.* 2004).

La maggior parte degli studi è stata eseguita in Russia e nel Mar Morto (Gunde-Cimerman *et al.* 2004, Kis-Papo *et al.* 2001, 2003, Buchalo *et al.* 1998). Butinar *et al.* (2005a, b) descrivono funghi

isolati da vari ambienti iperalini naturali e artificiali in Francia, Namibia, Portogallo, Slovenia, Spagna e Repubblica Dominicana.

Tra questi, la specie *Trimmatostroma salinum*, isolata per la prima volta da una salina sulla costa adriatica (Zalar *et al.*, 1999), il lievito nero *Hortaea werneckii* isolato dalle Saline di Cabo Rojo, Puerto Rico (Díaz-Munoz and Montalvo-Rodríguez 2005, Cantrell *et al.*, 2006) e varie specie del genere *Cladosporium* isolate da ambienti marini ed iperalini (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000; Masuma *et al.*, 2001; Butinar *et al.*, 2005b; Qi *et al.*, 2009; Pasqualetti *et al.*, 2014).

### 1.3.2 I procarioti

La maggior parte degli organismi che vive in ambienti estremi appartiene ai procarioti.

Diversi studi sulla microbiologia di ambienti iperalini hanno dimostrato che Archea alofili sono dominanti in tali ambienti (Ochsenreiter *et al.*, 2002; Ovreas *et al.*, 2003), ma è stato evidenziato che anche i batteri giocano un ruolo molto importante (Antón *et al.*, 2000, Tsiamis *et al.*, 2008).

La presenza di membri appartenenti al dominio Bacteria negli ambienti iperalini, è però una scoperta relativamente recente: tali ambienti erano stati persino definiti “colture monospecifiche di Archaea alofili” e, l’identificazione *Archaea - ambienti estremi*, *Bacteria – ambienti “moderati”*, ha costituito per lungo tempo quasi un assunto. I dati ottenuti utilizzando tecniche molecolari hanno però messo in risalto la comune presenza di Archea in ambienti precedentemente considerati “tipici” per gli eubatteri e, viceversa, la presenza di batteri in ambienti caratterizzati da elevate temperature e salinità, considerati invece “tipici” per gli archea (Antón *et al.*, 2000; Litchfield and Gillevet, 2002). Gli alofili sono distribuiti all’interno di tutti i phyla e gli ordini del dominio Bacteria. Inoltre questi variano ampiamente dal punto di vista delle proprietà fisiologiche: troviamo chemioeterotrofi anaerobi, fotoautotrofi e fotoeterotrofi, così come chemiolitotrofi.

Tra i batteri fotosintetici, i cianobatteri sono abbondantemente presenti in laghi iperalini e in vasche di evaporazione con salinità fino a 200-250‰ di NaCl.

La descrizione del genere *Halospirulina* con la specie *Halospirulina tapeticola* (Nübel *et al.*, 2000) rappresenta la prima descrizione formale di una specie di cianobatterio alofilo.

Studi tassonomici comparativi sono stati anche pubblicati per la specie cosmopolita *Microcoleus chthonoplastes* e per il cluster *Halothece*, un gruppo di cianobatteri da ambienti iperalini.

Tra i batteri gram positivi alofili appartenenti al Phylum *Firmicutes* sono inclusi sia aerobi (*Bacillus* e altri gruppi) sia anaerobi.

L'ordine *Halanaerobiales*, costituito da due famiglie (*Halanaerobiaceae* e *Halobacteroidaceae*), comprende unicamente microrganismi alofili anaerobi (Rainey *et al.*, 1995; Oren, 2001).

In generale, si può affermare che la maggior parte degli alofili all'interno del dominio Bacteria sono moderati e non alofili estremi (Oren *et al.*, 2002b). Tuttavia, ci sono alcune specie che somigliano agli archea alofili della famiglia *Halobacteriaceae* per quanto riguarda la necessità di sale e l'alolleranza. Ne sono un esempio i batteri fotosintetici del genere *Halorhodospira* ( $\gamma$ -Proteobacteria), l'attinomicete *Actinopolyspora halophila*, e l'alofigo estremo *Salinibacter ruber* (Antón *et al.*, 2002).

Tra i batteri Gram-negativi isolati da habitat iperalini inoltre, ricorrono i generi *Salinivibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ed *Alteromonas*; tra i Gram-positivi, sono comunemente rappresentati i generi *Bacillus* e *Micrococcus*: in particolare, tra i cocci, *Marinococcus halophilus*, *M. Albus*, *M. hispanicus*, *Micrococcus halophilus* e *Sporosarcina halophila*.

I seguenti Gram-negativi anaerobi obbligati, abitano vari ambienti caratterizzati da diversi valori di salinità e sono di recente descrizione: *Haloanaerobium prevalens*, *Halobacteroides halobius*, *Halothermothrix orenii* (il primo rappresentante Gram-negativo del phylum *Firmicutes* e anche il primo termoalofigo il cui genoma sia stato completamente sequenziato), *Sporohalobacter lortetii*, *S. marismortui* (da sedimenti) e *Halobacteroides acetoethylicus*, *H. lacunaris*, *Haloanaerobacter chitinovorans*, *Haloicola saccharolytica*, *Acetohalobium arabaticum* e *Halocella cellulolytica* (da acque con salinità fra il 30 e il 260‰ circa) (Zahran, 1997; Oren, 2002b).

All'interno del dominio Archea i microrganismi alofili sono compresi in tre famiglie: *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* e *Methanosarcinaceae*.

*Methanospirillaceae* e *Methanosarcinaceae* comprendono membri non alofili così come organismi che sono adattati alla salinità di mare e a condizioni iperaline. Alcuni di questi possono crescere a concentrazioni saline fino a 300‰.

L'ordine *Halobacteriales* con la sola famiglia *Halobacteriaceae* comprende esclusivamente alofili. I membri di tale famiglia possono essere considerati gli alofili per eccellenza a causa della loro stretta dipendenza ad elevate concentrazioni saline per la crescita (Oren, 2002b). Essi rappresentano la componente principale della biomassa microbica di ambienti quali il Mar Morto, i grandi laghi alcalini e le vasche di cristallizzazione delle saline.

Un caso particolare di archea ritrovati in ambienti iperalini è costituito dai cosiddetti "batteri quadrati di Walsby". Descritti per la prima da Walsby nel 1980 in una sabkha nella penisola del Sinai, furono riconosciuti come procarioti, per la presenza di vescicole gassose. In seguito alla loro descrizione, questi batteri furono ritrovati e riconosciuti in altri ambienti iperalini caratterizzati da salinità superiori a 200 – 250‰.

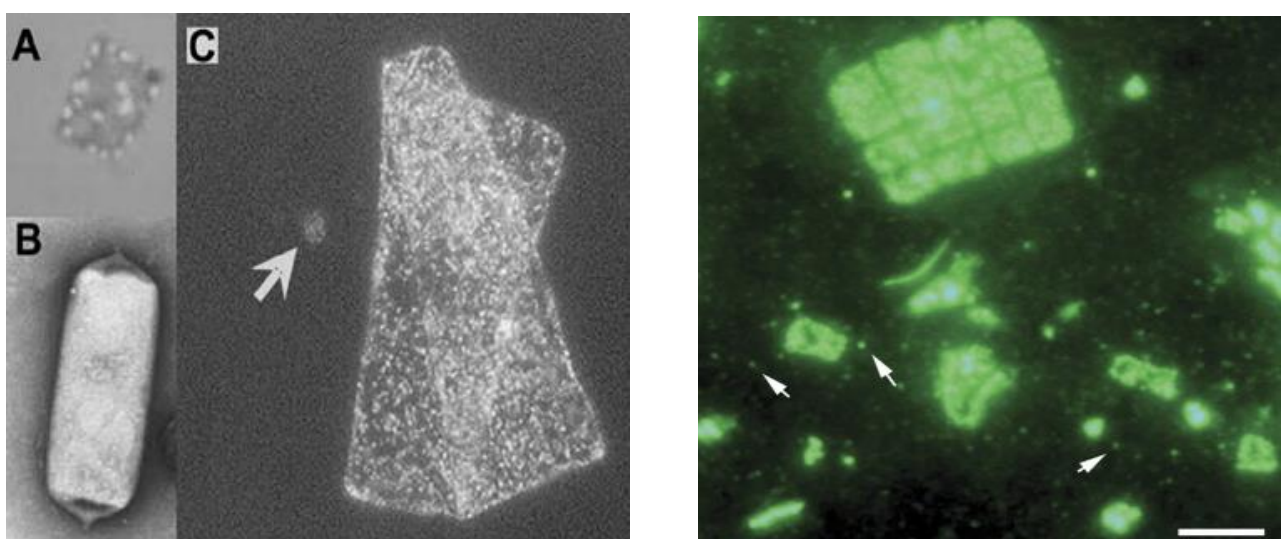
Per le cellule la cui morfologia è determinata e stabilizzata dalle elevate pressioni di turgore esercitate dal citoplasma sulla membrana cellulare, l'assunzione di una forma quadrata e "piatta", è preclusa dalla pressione idrostatica interna (generatasi osmoticamente); negli archea alofili estremi più comuni invece, le elevate concentrazioni citoplasmatiche di sali (principalmente KCl) necessarie per bilanciare la salinità dell'ambiente esterno, determinano la mancanza di una pressione di turgore rilevante, rendendo plausibile l'assunzione di forme così peculiari (Oren, 1999b). Le vescicole gassose giocano un ruolo primario nel galleggiamento delle cellule, consentendo loro di raggiungere zone superficiali della colonna d'acqua e quindi di ottenere ossigeno.

Anche la presenza di pompe protoniche fotodipendenti (batteriorodopsine) negli archea quadrati, potrebbe rappresentare un ulteriore incentivo per queste cellule a raggiungere zone superficiali, dov'è maggiore la disponibilità di luce.

Negli anni '80, Parks e Walsby proposero il nome *Quadra* e Stoeckenius, il nome *Arcula*, ma la loro definitiva assegnazione ad un "nuovo" genere o ad uno già esistente non fu possibile.

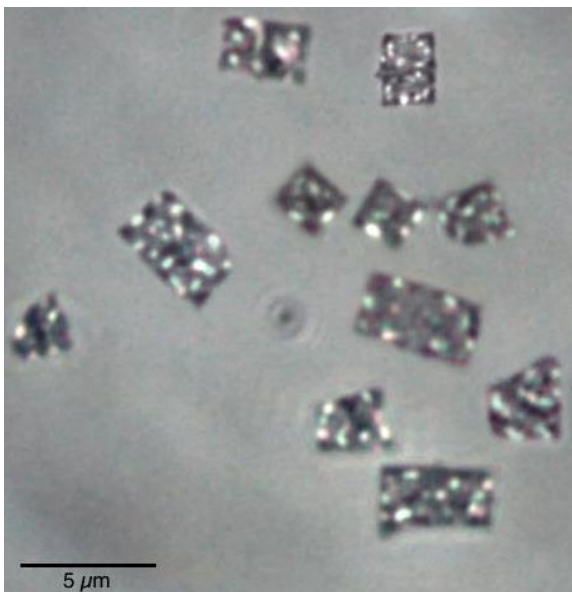
Una loro affiliazione tassonomica e filogenetica e il successo colturale furono possibili solo nel 2004, quando vennero identificati in un ceppo denominato HBSQ001 e fu per loro proposto il nome *Haloquadratum walsbyi* (Oren, 1999b; Walsby, 2005).

I "batteri di Walsby" non sono gli unici ad essere contraddistinti da questa singolare morfologia: esistono infatti anche archea pleomorfi in grado di dar luogo a forme quadrate in coltura, ascrivibili ai generi *Haloarcula* ed *Haloferax* (*Haloarcula quadrata* fu descritta per la prima volta nel 1999 da Oren *et al.*).



**Figura 1.2** **A:** immagine da microscopia in contrasto di fase di una cellula quadrata (*Haloquadratum walsbyi*) contenente vescicole gassose; **B:** micrografia elettronica di una vescicola

gassosa; C: micrografia in campo scuro di grosse cellule appartenenti al ceppo HBSQ001 (la freccia indica una cellula quadrata di normali dimensioni: 5 x 5  $\mu\text{m}$ ). A destra: immagine ottenuta tramite microscopia a fluorescenza con olio ad immersione di cellule appartenenti quasi certamente al genere *Haloquadratum* da una vasca di cristallizzazione dalle Cheetham Salt Works, Australia; le frecce indicano probabili particelle virali (la barra corrisponde a 5  $\mu\text{m}$ ) (da Bolhuis *et al.*, 2004).



**Figura 1.3** *Haloarcula quadrata*

### 1.3.3 Adattamenti agli ambienti iperalini

#### 1.3.3.1 Strategie osmoregolative e morfostrutturali

I microrganismi hanno evoluto diverse strategie sia per conservare l'appropriato turgore cellulare durante fasi di variazione della salinità ambientale (pressioni di turgore adeguate, sono necessarie per la vitalità e per la crescita cellulare) sia per contrastare le modificazioni biochimiche indotte da elevate concentrazioni saline, che comporterebbero la perdita di funzionalità di macromolecole importanti (proteine enzimatiche e strutturali, lipidi di membrana etc.).

Le strategie adottate possono consistere in attività osmoregolative, in modificazioni della composizione chimica e biochimica delle membrane o in modificazioni nei processi di sintesi proteica, lipidica e polisaccaridica: più semplicemente, tutte queste strategie, possono essere ricondotte a due importanti tipologie di adattamenti: quelli di tipo osmoregolativo e quelli di tipo morfostrutturale.

Esiste una notevole diversità nei meccanismi che gli alofili e gli alotolleranti utilizzano per resistere alla grande pressione osmotica esercitata dall'ambiente salino circostante al fine di conservare l'appropriato turgore cellulare.

Tutti i microrganismi alofili possiedono meccanismi di trasporto potenti, generalmente basati su antiporto  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , per espellere ioni sodio dall'interno della cellula (Oren, 1999a).

Diversi gruppi di microrganismi, per ottenere una elevata pressione osmotica nel citoplasma, mantengono bassa la concentrazione di  $\text{Na}^+$  e accumulano ioni  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ .

Questo meccanismo è utilizzato da un numero limitato di alofili. Gli Archea aerobi alofili dell'ordine *Halobacteriales* accumulano KCl a concentrazioni pari a quelle dell'NaCl nell'ambiente circostante. All'interno del dominio Bacteria, questa strategia è stata finora mostrata solo nell'ordine *Halanaerobiales*. La presenza di elevate concentrazioni di KCl nel citoplasma però richiede particolari adattamenti per permettere ai sistemi enzimatici intracellulari di essere attivi ad alta concentrazione salina.

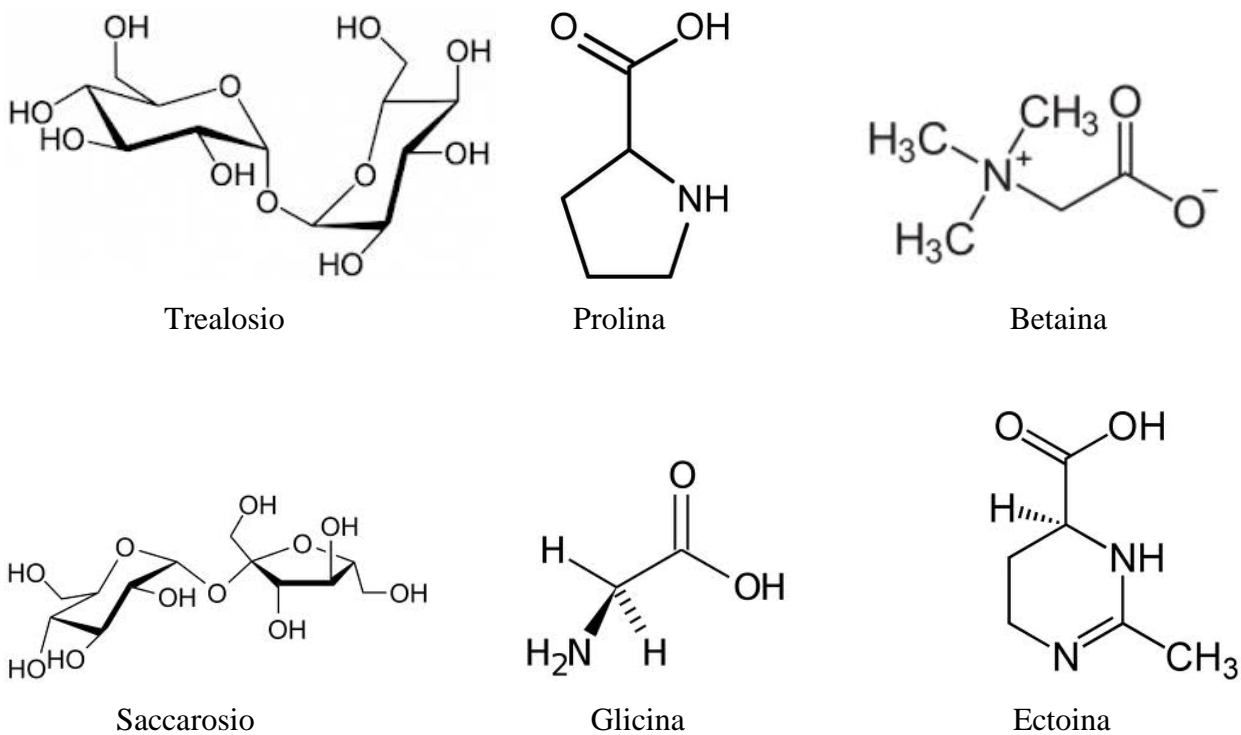
La seconda strategia di adattamento osmotico è quella di eliminare sali dal citoplasma quanto possibile, e accumulare soluti organici per garantire l'equilibrio osmotico.

Una varietà di composti viene utilizzata a tale scopo: il glicerolo e altri polialcoli, amminoacidi e derivati come la glicina, la betaina, l'ectoina (2-metil-1,4,5,6-tetraidropirimidine-4-acido carbossilico) e il suo 5-idrossi derivato e zuccheri semplici come ad esempio il saccarosio e il trealosio (Galinski, 1995).

Questa strategia è ampiamente usata in tutti e tre i domini. L'alga *Dunaliella*, ad esempio, può contenere concentrazioni intracellulari di glicerolo (Ben-Amotz and Avron, 1981; Oren, 2002a).

I soluti osmotici più diffusi all'interno del dominio Bacteria sembrano essere l'ectoina (sintetizzata da una grande varietà di organismi) e la glicina betaina (sintetizzata quasi esclusivamente da procarioti fotosintetici, ma accumulata da molti batteri eterotrofi). Anche gli Archea producono soluti osmotici organici: i metanogeni alofili oltre a tali soluti, utilizzano anche un osmolita organico, il 2-solfotrealosio (Desmarais *et al.*, 1997; Oren 2002a).

Questa strategia è stata rilevata in *Natronococcus occultus*, *Natronobacterium gregoryi*, *Natrialba magadii*, e *Pharaonis Natronomonas*, tutti i membri dell'ordine *Halobacteriales*. (Oren, 2002a).



**Figura 1.4** Alcune molecole utilizzate dai batteri come soluti compatibili.

Per quanto riguarda gli adattamenti morfostrutturali invece, i batteri che vivono e crescono in ambienti non salini, possono mostrare modificazioni sostanziali quando sottoposti ad elevate concentrazioni saline. Rigonfiamento, allungamento e contrazione (diminuzione del volume cellulare), sono tutti eventi caratterizzanti la risposta allo stress osmotico in batteri alosensibili.

Le cellule dei Gram-negativi possono andare incontro ad allungamento, in mezzi con contenuto in NaCl tra il 100 e il 200‰.

I Gram-positivi, rispondono a concentrazioni saline elevate allungandosi e assottigliandosi o accrescendosi in forma streptobacillare in terreni con contenuto in NaCl pari a circa 100‰.

In specie del genere *Bacillus*, i processi di sporulazione, in genere controllati prevalentemente dalla disponibilità dei nutrienti e dalle condizioni colturali, possono (in condizioni peculiari) essere influenzati dall'alcalinità e dallo stress osmotico (Zahran, 1997).

Uno degli aspetti più importanti tra gli adattamenti strutturali, è il cambiamento in termini di composizione chimica e biochimica del sacco mureinico (che contribuisce a determinare la struttura della parete dei procarioti) e delle membrane (Zahran, 1997).

I cambiamenti nella composizione delle membrane batteriche, che possono essere causati da cambiamenti ambientali, possono rappresentare una risposta adattativa volta a mantenere la stabilità e la funzionalità delle membrane.

Le membrane plasmatiche dei membri del dominio Bacteria sono in genere costituite da fosfolipidi che tendono a formare il tipico doppio strato. La struttura generale della membrana è stabilizzata da interazioni idrofobiche e da cationi bivalenti (come ioni calcio e magnesio), che stabiliscono interazioni ioniche con le cariche negative dei fosfolipidi. Nei fosfolipidi batterici, il grado di saturazione degli acidi grassi può variare in risposta a stimoli ambientali (un maggior grado di saturazione degli acidi grassi determina un maggior numero di interazioni idrofobiche e quindi una minor fluidità delle membrane); nelle membrane sono presenti anche molecole note come opanoidi (p.e. diploptene), dalla struttura simile a quella degli steroli, anch'essi con funzione regolativa della fluidità delle membrane.

I batteri possono mostrare solo lievi modificazioni cellulari oppure profondi cambiamenti, a seconda della salinità del mezzo, della specie batterica e delle caratteristiche metaboliche intrinseche. Elettromicrografie di batteri anaerobi come *Halobacteroides halobius* e *H. acetoethylicus*, non hanno messo in evidenza particolari cambiamenti ultrastrutturali nelle loro membrane. Le due specie del genere *Halobacteroides* summenzionate, presentano la tipica parete dei Gram-negativi ma, la parete di *H. acetoethylicus*, include insolite strutture cristalline dalla funzione sconosciuta (Rengpipat *et al.*, 1988 a,b; Lowe *et al.*, 1993).

Le proprietà delle membrane batteriche dipendono primariamente dalla loro composizione lipidica; per esempio, in *Ectothiorhodospira*, l'aumento dei fosfolipidi di membrana carichi negativamente è correlato con l'aumento di salinità del mezzo; *Halomonas elongata*, che è in grado di vivere in ambienti caratterizzati da ingenti variazioni di salinità (NaCl tra 0,05 e 3,4 M), è anch'essa in grado di alterare la propria fisiologia in modo da incrementare la quantità di lipidi di membrana carichi negativamente, stabilizzando ulteriormente la parete cellulare; questa risposta all'incremento di salinità è una tra le più comuni tra i batteri (Vreeland, 1991).

I batteri alofili come *Haloanaerobium prevaleans*, non presentano modulazione del contenuto lipidico delle membrane sotto stress osmotico, ma diversi oligosaccaridi a basso peso molecolare derivanti dalla membrana, accumulandosi nello spazio periplasmico dei Gram negativi, giocano un ruolo nelle modificazioni cellulari sotto stress osmotico (Zahran, 1997).

### 1.3.3.2 Diversità metabolica dei microrganismi alofili

La diversità metabolica dei microrganismi alofili in natura è grande quanto la loro diversità filogenetica (Oren, 2002a). La maggior parte dei processi microbici che si verificano a basse concentrazioni di sale, continuano ad avvenire anche a concentrazioni saline piuttosto elevate, spesso fino alla saturazione. In tabella 1.1 sono elencati alcuni processi comuni noti nel mondo alofilo procariotico e le concentrazioni saline massime a cui sono stati osservati in coltura.

Ci sono poi dei processi metabolici che non sembrano verificarsi a concentrazioni saline superiori a 100-150‰. Tra questi vi sono (Oren 2002a):

- La nitrificazione autotrofa (sia l'ossidazione dell'ammonio a nitrito che quella dei nitriti a nitrati);
- La metanogenesi basata sulla riduzione della CO<sub>2</sub> con H<sub>2</sub> donatore di elettroni;
- La metanogenesi a partire da acetato;
- L'ossidazione dell'acetato da parte di batteri solforiduttori.

I seguenti processi metabolici sono invece stati osservati anche ad elevate concentrazioni saline (Oren, 2002a):

- Processi fotosintetici;
- Processi di dissimilazione in cui sono generate grandi quantità di energia: in tal caso, la sintesi di osmoliti organici compatibili o l'accumulo di KCl, non esaurisce l'energia disponibile per la crescita;
- Qualunque processo metabolico proprio di quegli organismi che utilizzano sali (KCl) per bilanciare la salinità del mezzo, anche se la quantità d'energia generata nel corso del processo metabolico specifico è piccola (in effetti i processi che rendono poca energia, non sono compatibili con l'elevato dispendio energetico necessario per la sintesi di soluti organici compatibili).

Processi come la nitrificazione, la solfato-riduzione con ossidazione dell'acetato e la scissione dell'acetato con formazione di metano, non generano grandi quantità di energia: tali processi metabolici sono frequentemente riscontrati sia nei *Proteobacteria* che negli archea metanogeni, i quali però, utilizzano la strategia dell'accumulo di soluti compatibili per realizzare il bilancio osmotico (Oren, 2002a).

Apporti energetici scarsi sono anche caratteristici dei processi di fermentazione ma esistono batteri fermentanti che crescono anche a concentrazioni saline pari o superiori a 250‰. La spiegazione a ciò può essere cercata nel modo in cui tali alofili fermentanti fanno fronte allo stress da salinità: gli alofili fermentanti anaerobi noti, sono tutti membri dell'ordine *Halanaerobiales* e, i rappresentanti finora esaminati, sono soliti accumulare KCl nell'ambiente intracellulare e la formazione o l'accumulo di soluti organici non è mai stato documentato.

La capacità di *Halobacterium salinarum* di crescere anaerobicamente tramite fermentazione della L-arginina con la formazione di una molecola di ATP per ogni arginina consumata, può essere spiegata solo dall'accumulo di sali come adattamento osmotico energeticamente favorevole (Bickel-Sandkötter *et al.*, 1996; Oren, 2002a).

Un altro esempio interessante è quello degli idrogenotrofi metanogeni e degli omoacetogeni; la riduzione della CO<sub>2</sub> con H<sub>2</sub> donatore di elettroni, non sembra funzionare a concentrazioni saline superiori a 120‰ mentre, la riduzione di CO<sub>2</sub> per formare acetato, può procedere a concentrazioni elevate (fino a 250‰), come dimostra il caso di *Acetohalobium arabaticum* (Pusheva and Detkova, 1996). La quantità di energia generata nella reazione acetogenica è leggermente inferiore rispetto a quella generata nella reazione metanogenica. La spiegazione può, al solito, essere cercata nelle modalità di adattamento osmotico utilizzate; è probabile che i metanogeni producano osmoliti organici compatibili ad un considerevole costo energetico, mentre, la posizione filogenetica di *Acetohalobium* quale membro dell'ordine *Halanaerobiales*, fa supporre che esso utilizzi ioni inorganici per la stabilizzazione osmotica (Oren, 2002a).

<b>Processo metabolico</b>	<b>Rappresentante</b>	<b>Salinità massima per il processo in coltura ([NaCl])</b>
<b>Fotosintesi</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fotosintesi ossigenica</li> <li>• Fotosintesi anossigenica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Dunaliella salina</i> (Eucarya)</li> <li>• <i>Halorhodospira halophila</i> (Bacteria)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Saturazione</li> <li>• Saturazione</li> </ul>
<b>Respirazione</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Respirazione aerobica</li> <li>• Denitrificazione</li> <li>• Solfato-riduzione (ossidanti completi)</li> <li>• Solfato-riduzione (ossidanti incompleti)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Halobacterium salinarum</i> (Archaea)</li> <li>• <i>Haloarcula marismortui</i> (A.)</li> <li>• <i>Desulfobacter halotolerans</i> (B.)</li> <li>• <i>Desulfovibrio retbaense</i> (B.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Saturazione</li> <li>• 250 - 300‰</li> <li>• 130‰</li> <li>• 240‰</li> </ul>
<b>Fermentazione</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fermentazione della L-arginina</li> <li>• Fermentazione di carboidrati</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Halobacterium salinarum</i> (A.)</li> <li>• <i>Halanaerobium</i> sp. (B.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Saturazione</li> <li>• 250 - 300‰ o più</li> </ul>
<b>Metanogenesi e metabolismo omoacetogenico</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formazione di metano da H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub></li> <li>• Formazione di metano da acetato</li> <li>• Formazione di metano da ammine metilate o metanolo</li> <li>• Formazione di acetato da H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Methanocalculus halotolerans</i> (A.)</li> <li>• <i>Methanosarcina acetivorans</i> (A.)</li> <li>• <i>Methanohalobium evestigatum</i> (A.)</li> <li>• <i>Acetohalobium arabaticum</i> (B.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 120‰</li> <li>• 60‰</li> <li>• 250‰</li> <li>• 250‰</li> </ul>
<b>Chemioautotrofi e metanotrofi aerobi</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ossidazione autotrofa dell'ammoniaca</li> <li>• Ossidazione autotrofa dei solfuri</li> <li>• Ossidazione aerobica del metano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Nitrosococcus halophilus</i> (B.)</li> <li>• <i>Halothiobacillus halophilus</i> (B.)</li> <li>• <i>Methylobacter modestohalophilus</i> (B.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 94‰</li> <li>• 240‰</li> <li>• 90‰</li> </ul>

**Tabella 1.1** Limite massimo di concentrazione salina per processi di generazione energetica in coltura da parte dei microrganismi citati (Zhilina and Zavarzin, 1987; Koops and Möller, 1992;

Pusheva and Detkova, 1996; Bickel-Sandkötter *et al.*, 1996; Brandt and Ingvorsen, 1997; Oren, 2000, 2002a).

## **1.4 Tecniche di indagine della diversità microbica**

La diversità delle comunità microbiche è una realtà molto elusiva (Pedrós-Alió 1993) e, nonostante l'importanza che rivestono, molto poco si conosce sulle specie che le compongono, soprattutto perché per lungo tempo la loro indagine si è basata su metodi colturali. Numerosi studi evidenziano infatti che la maggior parte dei microrganismi ambientali non è coltivabile con i metodi tradizionalmente utilizzati in laboratorio. Conseguentemente, qualunque metodo di analisi che preveda la coltivazione dei microrganismi opera di fatto una selezione e permette di analizzare solo quella frazione in grado di svilupparsi nelle condizioni adottate.

Lo studio della diversità microbica in ambienti naturali quindi è avanzato significativamente in seguito all'introduzione delle tecniche molecolari coltura-indipendenti che hanno portato alla scoperta di numerosi taxa microbici. Questi nuovi metodi, affiancando quelli colturali, hanno consentito così una visione più completa della composizione delle comunità microbiche.

### **1.4.1 Metodi colturali**

Tradizionalmente la diversità microbica è sempre stata determinata attraverso l'utilizzo di metodi colturali, dipendenti quindi dalla coltivazione dei microrganismi in laboratorio e dalla capacità di questi di moltiplicarsi e formare colonie, una volta incubati in condizioni e tempi definiti, in appositi substrati.

I metodi colturali tradizionali in combinazione con analisi fenotipiche (fisiologiche e biochimiche) e genotipiche (PCR per l'amplificazione di uno specifico target genico) permettono l'identificazione e la tipizzazione dei microrganismi.

Una volta ottenuti gli isolati si può procedere con la determinazione delle caratteristiche morfologiche della colonia (colore, forma, margine, superficie e profilo) e della morfologia e della dimensione della cellula batterica mediante osservazione al microscopio ottico con l'utilizzo di un oculare micrometrico provvisto di una scala graduata e tarato con un vetrino micrometrico.

Si può procedere quindi con l'esecuzione di alcuni test preliminari quali: la colorazione di Gram e il metodo del KOH (Ryu, 1940) per l'identificazione dei Gram-positivi e Gram-negativi, il test dell'ossidasi e il test della catalasi.

Per una caratterizzazione metabolica si può procedere alla determinazione del profilo delle fonti di carbonio utilizzate (Sole Source Carbon utilization: SSCU).

Questo approccio sperimentale è stato sviluppato da Garland e Mills (1991) e si basa sull'utilizzo di sistemi in grado di fornire un profilo metabolico dei microrganismi esaminati. Tra questi vi è il sistema Biolog (Hayward, CA, USA, [www.biolog.com](http://www.biolog.com)) che misura la capacità dei batteri di utilizzare (ossidare) differenti fonti di carbonio. Tale sistema utilizza apposite piastre costituite da 96 pozzetti, 95 di questi contenenti differenti substrati ed un colorante: il violetto di tetrazolio. Questo colorante utilizzato come indicatore redox consente di visualizzare colorimetricamente l'utilizzo della fonte di carbonio. Dopo circa 24 ore dall'incubazione la micropiastre viene letta allo spettrofotometro. Questo sistema consente di individuare un profilo metabolico inerente l'uso dei vari substrati. Confrontando questo profilo con quello di una specifica banca dati è possibile ottenere informazioni tassonomiche del microrganismo in esame.

Simile al Biolog, nel principio base, è il sistema API (Merieux, Francia) che contiene una notevole varietà di fonti di carbonio per misurare le diversità funzionali dei microrganismi analizzati. Il limite di questi metodi è di essere sensibili alla quantità di inoculo utilizzata e di riflettere solo le potenziali capacità metaboliche, e non quelle in-situ, dei microrganismi analizzati (Garland and Mills, 1991). Quindi, una particolare specie, che in-situ può non essere attiva o comunque essere poco rappresentativa, nelle condizioni di crescita utilizzate per questo tipo di analisi può avere dei vantaggi competitivi e quindi nell'elaborazione finale dei risultati si avrà una sovrastima del reale contributo della stessa all'interno della comunità.

Biolog ed API nascono per l'identificazione tassonomica e si basano quindi sull'identificazione di una data specie in funzione delle sue caratteristiche metaboliche. Il limite di questo approccio però è dato dal fatto che, microrganismi molto simili filogeneticamente, possano presentare anche enormi differenze metaboliche (Pesciaroli *et al.*, dati non pubblicati).

Oltre ad una caratterizzazione biochimica e metabolica dei ceppi isolati, si può procedere all'identificazione degli stessi mediante amplificazione, sequenziamento e confronto in banca dati di specifici target genici. Il marcatore molecolare maggiormente utilizzato per l'identificazione dei procarioti è il gene codificante l'rRNA 16S. Gli rRNA rappresentano molecole essenziali poiché la loro funzione è quella di fornire un meccanismo per la decodifica del RNA messaggero in amminoacidi e di interagire con l'rRNA transfert, provvedendo all'attività della peptidil-transferasi. Queste molecole sono perciò presenti in tutte le cellule, tanto da considerarsi molecole "universali" e di origine antichissima. Per questa ragione il 16S rDNA è diventato il marcatore ideale per l'identificazione di ceppi incogniti e ciò ha spinto i ricercatori a depositare un numero enorme di sequenze di tale gene in banche dati. In particolare, il gene codificante il 16S rRNA, è costituito da

circa 1500 bp e contiene regioni altamente conservate interspaziate da regioni ipervariabili. La presenza di regioni altamente conservate permette la sua amplificazione mediante PCR, attraverso l'utilizzo di diverse coppie di primers "universali" che sono stati sviluppati ed ampiamente utilizzati negli ultimi anni.

Un altro metodo di identificazione e classificazione dei microrganismi recentemente introdotto e dipendente dalla loro coltivazione è la spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight mass spectrometry*). Si tratta di una tecnica analitica che consente di misurare in maniera estremamente accurata il peso molecolare di macromolecole di interesse biologico e di determinare la loro identità in base al rapporto massa/carica. La tecnica prevede che un campione batterico costituito da  $10^4$ - $10^6$  cellule, venga deposto al centro di uno spot di un "target plate" monouso in policarbonato con l'aggiunta di 2 µl di matrice di acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico in grado di fungere da fonte di protoni necessari alla ionizzazione dell'analita in esame. Quando il "target plate" viene introdotto nello strumento, un fascio laser pulsato con frequenza nell'ultravioletto bombarda la matrice in più punti e ne provoca la disgregazione in numerosissimi frammenti con carica unitaria positiva (cationi monovalenti) costituiti ognuno da porzioni oligopeptidiche associate a porzioni di matrice organica. I frammenti, dopo essere stati vaporizzati (desorbimento), migrano in senso lineare attraverso il cosiddetto "tubo di volo" accelerati da un campo elettromagnetico adiacente per raggiungere e colpire una membrana che rileverà e registrerà le masse ionizzate impattanti in tempi differenti in base alla massa stessa degli ioni.

Gli ioni impattanti vengono misurati da un rilevatore in base al loro rapporto massa/carica (m/z) potendo così risalire al peso molecolare della molecola analizzata. Lo strumento viene calibrato utilizzando come standard un ceppo di *Escherichia coli* ATCC 8739 che dà origine nello spettro di massa a segnali noti. Il tempo richiesto per la lettura di un singolo "target plate" completo e la trasmissione dei risultati è di circa 50-60 minuti.

Lo strumento è collegato ad un software in grado di acquisire i dati in arrivo, elaborarli in spettri di massa e confrontarli con spettri di riferimento presenti nel database interno. Ogni spettro di massa è acquisito sommando 100 spettri (30 è il numero minimo richiesto) in modo da assicurare una media più che significativa e affidabile degli spettri acquisiti in vari punti della colonia. La banca dati del software contiene spettri di riferimento di specie/sottospecie di batteri, micobatteri, lieviti e funghi.

Il grado di corrispondenza con lo spettro di ogni microrganismo presente nel database determina l'attribuzione di un cosiddetto Valore di Confidenza, quindi il grado di certezza con cui viene proposta l'identificazione per la specie in esame. Una corrispondenza perfetta fornisce una probabilità percentuale del 99,9%. Nel caso di una singola specie proposta, se l'intervallo delle

probabilità percentuali è compreso tra 60 e 99%, il livello di identificazione viene giudicato Buono. Valori percentuali <60% non sono giudicati attendibili per l'identificazione del microrganismo.

La spettrometria di massa MALDI-TOF è stata recentemente utilizzata in alcuni studi sull'ambiente delle saline per la classificazione di isolati batterici (Munoz *et al.*, 2011; Antón *et al.*, 2013).

Tale tecnica offre la possibilità di un'accurata, rapida ed economica identificazione di batteri, funghi e micobatteri. La procedura per la preparazione del campione e l'analisi, sono tecnicamente semplici e riproducibili. Un attuale limite della tecnica è dato dal fatto che i database permettono soprattutto l'identificazione di organismi di interesse clinico. In futuro si prevede che i database saranno ampliati per risolvere questo problema (Murray, 2012).

Nonostante l'importanza che tuttora rivestono i metodi colturali nell'ambito della microbiologia, uno dei loro limiti è la difficoltà nel riprodurre le condizioni di crescita naturale in laboratorio a causa della mancanza di conoscenza sulla fisiologia del ceppo o sulle strategie di adattamento ad ambienti particolari (Amann *et al.*, 1995). Inoltre, in seguito a crescita su terreni colturali, la microflora originariamente presente nel campione subisce delle forti modificazioni dovute alla capacità di determinati microrganismi di crescere più velocemente e prendere il sopravvento su altri. Per questo motivo le popolazioni numericamente meno importanti o in condizioni stressate saranno molto difficilmente rilevate ed identificate (Cocolin *et al.*, 2008). Ad esempio, la maggior parte dei terreni di coltura sono fonti estremamente ricche di carbonio e questo potrebbe influenzare la composizione della comunità microbica coltivata verso i copiotrofi (microorganismi che crescono in presenza di elevati livelli di fattori nutritivi) (Nocker *et al.*, 2006). Infine, in ecosistemi microbici complessi, la capacità di alcuni batteri con deficit metabolici di moltiplicarsi in condizioni naturali 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). I terreni di coltura non sono in grado di riprodurre le nicchie ecologiche e le interazioni simbiotiche presenti in ambienti naturali complessi. Nonostante questi limiti però dobbiamo considerare che molto di quanto conosciamo delle attività metaboliche dei microrganismi è emerso dallo studio di colture di laboratorio. Tali metodiche consentono inoltre di conoscere, attraverso la opportuna manipolazione dei parametri di interesse, i reali limiti metabolici delle singole specie.

## 1.4.2 Metodi coltura-indipendenti

Le tecniche molecolari coltura-indipendenti che si basano sull'estrazione degli acidi nucleici da una molteplicità di campioni ambientali (He *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2008) hanno permesso di superare i problemi legati alle tecniche di coltivazione dei microrganismi. La loro applicazione ha implementato notevolmente le conoscenze relative alla struttura e alla dinamica delle comunità microbiche, nonché ha permesso di valutarne l'evoluzione nel tempo e nello spazio.

Le informazioni filogenetiche che si ottengono con i metodi coltura-indipendenti sono quasi sempre diverse da quelle ottenute con i metodi colturali: i phyla *Proteobacteria*, *Cytophagales*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* sono ad esempio ben rappresentati dagli organismi coltivati e da soli, questi quattro phyla, rappresentano circa il 90% di tutti i batteri coltivati caratterizzati mediante le sequenze del 16S rDNA. Alcuni phyla invece come *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia* sono poco rappresentati dalle sequenze degli organismi coltivati (Zhang *et al.*, 2008).

### 1.4.2.1 Le tecniche di fingerprinting

Tra i metodi coltura-indipendenti, le tecniche di fingerprinting, basate sulla PCR a partire dal DNA totale estratto da campioni ambientali, ci danno informazioni sui cambiamenti nella composizione della comunità e su parametri quali: la diversità, la ricchezza, l'uniformità e la composizione della comunità (Torsvik *et al.*, 2002).

Solitamente queste tecniche si basano sulla diversità dei geni che codificano per l'rRNA ribosomiale. I geni 16S e 23S rDNA vengono impiegati per studi su batteri ed archea, mentre il gene 18S rDNA viene utilizzato per i funghi. Anche gli spaziatori ribosomiali trascritti (ITS, Intergenic Transcribed Spacers) tra i geni 16S e 23S possono essere impiegati per gli stessi scopi (de Oliveira *et al.*, 2006).

Diverse tecniche di fingerprinting sono state sviluppate negli ultimi anni e sono state ampiamente utilizzate per lo studio della biodiversità microbica. Tra esse vi sono: la Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA), la Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), la Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA), la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) e la Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE).

- Il polimorfismo dei frammenti di restrizione (ARDRA; RFLP/T-RFLP):

L'ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) è una semplice procedura in cui un'analisi di restrizione viene condotta su prodotti di PCR dei geni codificanti gli rRNA. Si tratta

quindi di una variante della RFLP (restriction fragment length polymorphism) o della T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), le quali possono essere invece applicate anche allo studio di altri tipi di geni. Tutte queste metodiche si basano comunque sulla digestione dei prodotti di PCR seguita dalla separazione elettroforetica dei frammenti ottenuti, su un gel ad alta concentrazione di agarosio, su un gel di poliacrilamide oppure, nel caso si utilizzino primers marcati con fluorocromi, attraverso l'utilizzo di gel capillari collegati a rilevatori laser. In tal caso i dati vengono convertiti in un elettroferogramma nel quale ogni picco rappresenta un frammento, e quindi una singola specie, e l'area sottostante ogni picco indica, invece, l'abbondanza relativa di ogni specie nell'intera comunità analizzata. Generalmente è necessario eseguire le digestioni utilizzando più enzimi di restrizione contemporaneamente al fine di ottenere la migliore risoluzione del profilo genotipico della popolazione che si intende analizzare. Infatti, enzimi differenti possono produrre profili diversi. Un altro limite della tecnica è dato dal fatto che l'incompleta digestione può portare ad una sovrastima della biodiversità (Osborn *et al.*, 2000).

Oltre alla scelta del numero e del tipo di enzimi di restrizione utilizzati (Engebretson and Moyer, 2003), un'importanza notevole è rivestita anche dalla scelta della giusta coppia di primers al fine di ottenere un'accurata valutazione della diversità microbica (Lueders and Friedrich, 2003).

Nonostante il limite di risoluzione di questa tecnica sia maggiore rispetto a quello di altre metodiche (0,5%), Engebretson e Moyer (2003) hanno dimostrato che la T-RFLP risulta particolarmente efficace nella stima della biodiversità di comunità microbiche caratterizzate da un numero medio o basso di specie mentre non è adatta per lo studio di comunità molto complesse. Nonostante queste limitazioni, la T-RFLP è diventata un metodo valido per comparare rapidamente comunità batteriche ambientali data anche la possibilità di confronto simultaneo di molti campioni e l'ottenimento di risultati in modo piuttosto veloce e senza la necessità di informazioni dirette derivate dal sequenziamento.

- L'analisi dello spaziatore intergenico (RISA/ARISA):

L'analisi dello spaziatore intergenico (Ribosomal RNA intergenic spacer analysis) è stata sviluppata da Bornerman e Triplett (1997) e implica l'amplificazione della regione compresa tra i geni ribosomiali 16S e 23S detta regione spaziatrice (Internal Spacer Region, ITS). I primers utilizzati in questo caso sono stati disegnati in corrispondenza delle regioni conservate. Sono disponibili sia primers "universali", impiegati ad esempio nel caso si vogliano confrontare popolazioni derivate da diverse campioni, oppure primers specifici che permettono, invece, di amplificare la regione ITS di specifici gruppi filogenetici e quindi di focalizzare l'analisi solo su particolari popolazioni batteriche all'interno di una comunità (Salles *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2003). La regione ITS è

estremamente variabile per quanto riguarda sia la lunghezza (da 50bp a 1,5 Kb) che la sequenza nucleotidica ed entrambi questi tipi di variazioni la rendono utile nella tipizzazione di ceppi batterici o specie batteriche strettamente correlate nel caso in cui altre tecniche non forniscano un'adeguata risoluzione del fingerprint molecolare (Fisher and Triplett, 1999). La versione automatizzata di questo tipo di analisi, detta appunto Automated Ribosomal RNA Intergenic Spacer Analysis (ARISA), è stata sviluppata utilizzando, per l'amplificazione della regione ITS, primers marcati con fluorocromi (Fisher and Triplett, 1999). I frammenti generati vengono separati, in base alla loro dimensione, attraverso un sistema elettroforetico automatizzato su capillare, collegato ad un rilevatore laser. Sicuramente, si tratta di una tecnica semplice (non richiede ad esempio l'utilizzo di gel denaturanti), rapida (non sono necessari tempi lunghi per le corse elettroforetiche e non prevede digestioni enzimatiche) ed altamente riproducibile. D'altro canto però, ci sono problemi legati all'impiego di questa analisi. Ad esempio è stato dimostrato che spesso si ha la preferenziale amplificazione dei frammenti di DNA di dimensioni minori: le regioni ITS più lunghe vengono amplificate con minore efficienza portando ad una sottostima della reale biodiversità del campione analizzato (Fisher and Triplett, 1999). Inoltre, anche in questo caso, come in altre tecniche che prevedono lo studio dei geni ribosomiali, la presenza di copie multiple, nei diversi organismi, causa problemi di sovrastima della biodiversità dato che ogni organismo può contribuire con più bande (RISA) o picchi (ARISA) a seconda della variante di analisi utilizzata.

#### **1.4.2.2 Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE e TGGE)**

Introdotta da Muyzer e collaboratori (Muyzer *et al.*, 1993), la DGGE, in particolare, è stata largamente utilizzata in diversi studi di caratterizzazione di comunità batteriche sia in campioni di suolo che di acque (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer and Smalla, 1998; Nakatsu *et al.*, 2000; Kleikemper *et al.*, 2002; Benlloch *et al.*, 2002; El-Latif Hesham *et al.*, 2006). Nelle analisi condotte mediante DGGE o TGGE si ottiene la separazione di piccoli frammenti di DNA (200-700 bp), amplificati tramite PCR, della stessa lunghezza ma di differente sequenza. La separazione avviene su gel di poliacrilamide e si basa sulla diminuzione della mobilità elettroforetica dei prodotti di PCR a doppio filamento che vengono parzialmente denaturati dal gradiente chimico (una miscela di urea e formammide), nel caso della DGGE, o termico, nel caso della TGGE.

Temperatura e concentrazione di denaturante a cui si verifica la separazione dei due filamenti, dipendono fortemente dalla sequenza del frammento stesso. In particolare, i fattori determinanti

sono: quantità di legami idrogeno che si instaurano tra basi complementari e il tipo di interazioni che si stabiliscono tra basi adiacenti sullo stesso filamento (stacking interaction).

Sperimentalmente, la completa denaturazione dei due filamenti di DNA viene ostacolata mediante introduzione, all'estremità di ciascun filamento, di domini caratterizzati da alto contenuto in G+C ed alte temperature di melting. Ciò è reso possibile dall'utilizzo di primers caratterizzati da una sequenza di circa 30-40 GC all'estremità 5'. La regione di dsDNA così ottenuta impedisce la dissociazione completa dei frammenti in ssDNA poiché la formazione di 3 legami a idrogeno in una coppia di basi GC, a differenza dei 2 presenti in una coppia AT, implica la necessità di raggiungere una temperatura o una concentrazione di denaturante chimico più elevata per ottenere la rottura di tali legami.

Tali tecniche consentono di valutare le differenze spaziali e temporali nelle comunità microbiche o monitorare variazioni nella struttura che occorrono in risposta a perturbazioni ambientali. Inoltre, bande ben separate, possono essere tagliate dal gel e sequenziate. Confrontando tali sequenze con quelle di banche dati si riesce ad ottenere informazioni sui taxa presenti nella comunità studiata.

Oltre ai vantaggi, però anche diverse limitazioni sono legate all'impiego di tali procedure come ad esempio la scelta della coppia dei primers utilizzata per l'amplificazione del target genico di interesse e l'ottimizzazione del gradiente. Il profilo ottenuto, infatti, dipende strettamente dalla coppia di primers utilizzati e la selettività nell'amplificazione PCR dei geni 16S rDNA può influenzare i risultati ottenuti nelle misure della biodiversità utilizzando i metodi molecolari (Head *et al.*, 1998). Piccole differenze nella sequenza delle regioni conservate possono infatti provocare l'amplificazione selettiva di alcune specie, considerando anche che l'universalità dei primers comunemente utilizzati non è assoluta (Ben-Dov *et al.*, 2006).

Il numero e l'intensità delle bande in un gel di DGGE inoltre, non necessariamente forniscono un quadro preciso della comunità microbica. Infatti, come in tutte le tecniche legate all'amplificazione dei geni ribosomiali, una singola banda non corrisponde necessariamente ad una singola specie batterica e ciò è dovuto a due motivi principali: bande derivate da specie diverse possono avere la stessa mobilità elettroforetica oppure, una singola specie può essere rappresentata da bande multiple, dato che praticamente tutti gli organismi possiedono più copie per i geni ribosomiali (Nubel *et al.*, 1997) (il numero di copie di geni per l' rRNA all'interno di genomi di diversi organismi può variare da 1 a 14; Head *et al.*, 1998).

Il limite di risoluzione è circa l'1%, quindi, solo DNA derivati da organismi che rappresentano più dell'1% nella comunità studiata possono essere visualizzati (Muyzer *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 1998). Nonostante i limiti però, l'elettroforesi su gel a gradiente denaturante è una delle tecniche

più comunemente utilizzate in microbiologia molecolare per la caratterizzazione della struttura e lo studio della dinamica di popolazioni microbiche in campioni ambientali.

La DGGE e le altre tecniche di fingerprinting descritte nel precedente paragrafo sono state utilizzate in vari studi sull'ambiente delle saline per la rilevazione della biodiversità procariotica presente (Benlloch *et al.*, 2002; Casamayor *et al.*, 2002; Ovreas *et al.*, 2003; Tsiam *et al.*, 2008), ma ci sono pochi studi riguardanti il monitoraggio a medio-lungo termine delle comunità procariotiche in questi ambienti così peculiari (Elloumi *et al.*, 2009; Boujelben *et al.*, 2012).

### **1.4.2.3 NGS (*Next Generation Sequencing*)**

Le tecniche di fingerprinting permettono di trattare contemporaneamente molti campioni, ma sono inadeguate per l'identificazione tassonomica e soffrono di una mancanza di risoluzione (Zinger *et al.*, 2012).

Per tali ragioni, la ricerca per la caratterizzazione delle comunità microbiche ha ormai raggiunto una nuova fase con lo sviluppo di tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS *next-generation sequencing*), che hanno portato ad un livello superiore di dettaglio nella descrizione del mondo microbico (MacLean *et al.*, 2009) ed hanno dimostrato un grande potenziale per la valutazione della diversità microbica (MacLean *et al.*, 2009; Shendure and Ji, 2008)

Si tratta dell'ultimo sviluppo nell'analisi delle sequenze dei genomi. E' una procedura che rende estremamente rapido il lavoro di sequenziamento aumentando la velocità di esecuzione di 3-4 ordini di grandezza rispetto al procedimento Sanger.

Le piattaforme NGS producono milioni di brevi sequenze, che variano in lunghezza da decine di paia di basi (bp) a 800 bp. Anche se negli ultimi anni si è assistito ad un aumento nella lunghezza delle sequenze lette, queste sono ancora piuttosto brevi rispetto a quelle ottenute con il metodo Sanger tradizionale (1000 bp).

Tra i sequenziatori NGS vi sono: il sequenziatore 454 di Roche e l'Illumina Genome Analyzer. Esistono poi sistemi di sequenziamento di terza generazione come ad esempio Ion Torrent.

Il sequenziatore 454 è stato il primo metodo di sequenziamento di nuova generazione (2005) e attualmente, è stato il più ampiamente utilizzato per la caratterizzazione della diversità microbica.

I campioni che devono essere sequenziati vengono dapprima ridotti, tramite nebulizzazione, in frammenti più piccoli, di 300-800 bp. Successivamente i frammenti vengono trasferiti a nano-sfere del diametro di 28 µm immobilizzate su un vetrino. Ad ogni sfera va a legarsi solo un frammento di DNA. Le sfere legate al filamento vengono quindi messe, assieme ad enzimi amplificatori, nella

fase acquosa di un'emulsione di acqua in olio per far avvenire l'amplificazione (PCR a emulsione). Il sequenziamento avviene parallelamente alla formazione della catena complementare, ad opera della DNA polimerasi.

L'innovazione del sistema 454-Roche sta nel fatto che con questa tecnica non vengono più utilizzati nucleotidi fluorescenti ma si sfrutta il pirofosfato inorganico (PPi), prodotto di scarto della DNA polimerasi. Il pirofosfato inorganico è il substrato dell'enzima sulfuriptasi che produce ATP a partire da PPi e AMP. A sua volta l'ATP viene prelevato dalla luciferasi che lo utilizza per ossidare la luciferina (Margulies *et al.*, 2005; Mardis, 2008). Grazie a questa ultima reazione si produce un segnale luminoso che viene rilevato da un fotodetector.

Esistono poi altre tecnologie di neosequenziamento come ad esempio l'Illumina Genome Analyzer. Nell'Illumina Genome Analyzer, la preparazione dei campioni prevede la denaturazione della doppia elica e l'aggiunta di adattatori (adapters), ottenendo un filamento stampo della sequenza da sequenziare.

Le piastre di sequenziamento o flow-cell di Genome Analyzer sono composte da otto lanes indipendenti, sulle cui superfici sono immobilizzati due diversi oligonucleotidi. I frammenti sono immessi sulla piastra di sequenziamento permettendo l'ibridazione tra i loro adattatori e i complementari oligonucleotidi della piastra.

Il legame si forma in entrambe le estremità dei frammenti, che sono così immobilizzati sulla superficie della flow-cell, assumendo una forma "a ponte" e tramite una polimerasi può avvenire l'amplificazione del frammento (Mardis, 2008). In seguito si effettua la denaturazione delle molecole prodotte e può quindi iniziare il sequenziamento: ogni ciclo di sequenziamento coinvolge una DNA polimerasi e i quattro dNTP a cui viene incorporato un marcatore fluorescente che ne permette l'identificazione e aggiunto un terminatore reversibile (Bentley *et al.*, 2008). Il terminatore blocca il gruppo ossidrilico impedendo l'ulteriore sintesi finché non viene dissociato chimicamente; ciò viene effettuato in seguito all'identificazione del nucleotide presente in quella posizione grazie alla fluorescenza prodotta (Mardis, 2008).

Ion Torrent infine, sfrutta la tecnologia dei semiconduttori (Rothberg *et al.*, 2012).

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. La tecnologia del Ion Torrent è incentrata sull'impiego di un 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 pHmetro presente nel pozzetto. 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.

## **1.5 Area di studio: le Saline di Tarquinia**

### **1.5.1 Generalità e cenni storici**

Le Saline di Tarquinia sono ubicate lungo il litorale laziale, nel territorio del Comune di Tarquinia e a valle di una vasta piana alluvionale delimitata a nord-ovest dalla foce del fiume Marta e a sud-est dalla foce del fiume Mignone.

Le saline si estendono su una superficie di circa 190 ettari. Si tratta di un'area spesso battuta da venti tesi provenienti dal mare, che rendono il sito ideale per la produzione di sale.

La salina ha forma triangolare, con il lato maggiore rivolto verso il Mar Tirreno, da cui è separata da un cordone sabbioso di modeste dimensioni. La comunicazione con il mare è assicurata da due foci: la Foce di Ponente permette oggi l'ingresso dell'acqua marina nell'impianto attraverso una pompa idrovora, mentre in passato l'acqua entrava per gravità (la salina presenta un'elevazione mediamente inferiore di 1 metro rispetto al livello del mare) secondo i ritmi delle maree, passando attraverso una paratoia azionata manualmente. Il secondo punto di comunicazione con il mare è la Foce di Levante, attraverso la quale in passato, uscivano le acque di scarto del processo di estrazione del sale.

L'impianto comprende circa 100 vasche a pianta più o meno rettangolare, delimitati da argini in pietra e legno; la loro profondità è modesta (circa 30-80 cm) e va riducendosi così come la loro estensione superficiale, passando dalle vasche evaporanti a quelle di cristallizzazione. Il passaggio dell'acqua da una vasca all'altra è garantito da una serie di chiuse in legno e dai canali laterali che li circondano (Allavena and Zapparoli, 1992a).

I bacini sono suddivisi in diversi gruppi in base alla funzione che avevano durante il processo estrattivo: ci sono le vasche di prima, seconda e terza evaporazione, poi le servitrici ed infine le vasche salanti da cui veniva estratto il cloruro di sodio.

Le vasche di prima evaporazione, denominate “Sterro”, “Piscine”, “Riserva Grande”, “Vasca Passoni” e “Giochi di Mare”, sono di dimensioni e numero maggiore delle altre. Qui avveniva l’iniziale concentrazione del cloruro di sodio, la precipitazione delle particelle in sospensione nell’acqua marina e dei sali meno solubili.

In queste prime vasche, la concentrazione salina poteva raggiungere il 90‰. L’acqua, in seguito, veniva trasferita nelle stazioni di seconda e terza evaporazione che comprendevano il gruppo di vasche denominato “Partite alte” e “Prima sezione”. In queste vasche avveniva un successivo aumento della salinità sino a valori di circa 160-170‰. Da queste, poi, l’acqua passava nelle vasche dette “Servitrici”, la cui funzione era di aumentare la densità dell’acqua e in queste vasche si ottenevano valori di salinità pari a 180-190‰. Da ultimo, l’acqua era convogliata in bacini salanti, “Riserve”, dove avveniva la precipitazione del sale attorno a valori di 300‰ e la raccolta.

Le Saline di Tarquinia sino a pochi anni fa rappresentavano uno tra i pochi siti lungo la costa Tirrenica dove veniva praticata l’arte di produzione del sale.

La costruzione dell’impianto si ebbe nel 1805, quando il cardinale Alessandro Lante, tesoriere generale della Camera Apostolica dello Stato Pontificio, intraprese, per consiglio e con l’opera di Giuseppe Lipari di Trapani e il benestare di Papa Pio VII Chiaramonti, i primi lavori di una salina nel territorio di Corneto (Tarquinia).

L’idea di costruire l’impianto nacque dalla necessità da parte dello Stato Pontificio di sopperire alla chiusura delle Saline di Ostia, entrate in crisi alla fine del XVIII secolo e che costringevano ad importare sale da Trapani, dalla Sardegna e dalla Francia con ingenti costi. La costruzione della salina durò un quarantennio, poiché i lavori vennero continuamente disturbati dalle guerre napoleoniche. Tra il 1805 e il 1815, venne ultimato il canale circondariale ed i bacini della prima e seconda sezione. Nel 1816, il Conte Pianciani, intraprese il taglio della terza sezione e solo nel 1825 incominciò l’escavazione delle vasche delle Piscine e dello Sterro.

Ceduta inizialmente in gestione privata, con scarso risultato tecnico ed economico, lo Stato ne assunse direttamente l’amministrazione, ma poi nel 1845 la dette in appalto al Principe di Torlonia e nel 1857, l’appalto fu concesso ai Fratelli Dol.

Dopo la Seconda Guerra Mondiale, la salina venne di molto ampliata, sino ad ottenere un profilo simile a quello che conserva attualmente con i suoi 190 ettari di estensione, di cui il 70% occupato dall’impianto per la produzione di sale. Nel 1987, una forte alluvione colpì l’area provocando gravi danni all’impianto delle saline. Tutte le vasche furono inondate da un’enorme quantità di acqua e fango esondati dal Fosso Circondariale. Circa 16 ettari della salina furono interrati e mai più ripristinati. Nella maggior parte delle vasche, sedimentò fango che non venne più rimosso,

compromettendo notevolmente la funzionalità dell'impianto. Inoltre, molte strutture, tra chiuse e canali, vennero completamente distrutte.

I danni prodotti dall'alluvione del 1987, la minore redditività, la limitata estensione, la difficoltà nell'adattare i nuovi processi di lavorazione a tale impianto, in aggiunta all'importazione di sale sottocosto da altri paesi, indussero i Monopoli di Stato a dismettere l'impianto di produzione ed impacchettamento del sale delle Saline di Tarquinia.

L'abbandono delle attività ha portato con il tempo ad un generale degrado, sia delle aree delle vasche, sia delle strutture produttive. Con la dismissione dell'attività di produzione è venuta meno la manutenzione ordinaria e straordinaria, così da compromettere anche la funzionalità ecologica dell'intero sistema.

Le Saline di Tarquinia hanno oggi una valenza esclusivamente naturalistica essendo state sottoposte a vincolo di tutela ambientale dal 1980 con l'istituzione della Riserva Naturale di Popolamento Animale "Saline di Tarquinia" (D.M. 25/01/1980 del Ministero dell'Agricoltura); inoltre sono SIC (Sito di Importanza Comunitaria-IT6010025) e ZPS (Zona a Protezione Speciale-IT6010026) in base alla Direttiva Habitat e alla Direttiva Uccelli. Nel Luglio 1997 l'attività produttiva è cessata in modo definitivo.

### **1.5.3 Aspetti naturalistici**

La Saline di Tarquinia rappresentano una zona per il mantenimento della biodiversità animale, in particolar modo della fauna ornitica, titolo solitamente riconosciuto alle lagune costiere di origine naturale. Infatti le saline in generale rappresentano un ecosistema di elevato valore soprattutto per gli spostamenti stagionali di moltissime specie di uccelli (Thiery and Puente, 2002; Takekawa *et al.*, 2006). Da un punto di vista ornitologico rivestono un ruolo estremamente significativo, sia come luogo di svernamento, sia come punto di sosta durante i flussi migratori primaverili ed autunnali (Allavena and Zapparoli, 1992b), poiché assicurano agli uccelli che sostano nelle vasche l'aumento ponderale necessario a proseguire gli spostamenti.

Le specie di uccelli fino ad ora censite all'interno delle Saline di Tarquinia sono 56 e tra queste le più importanti sono il cavaliere d'Italia (*Himantopus himantopus*, Linnaeus, 1758), la garzetta (*Egretta garzetta*, Linnaeus, 1766), l'airone bianco (*Ardea alba*, Linnaeus 1758), l'airone cenerino (*Ardea cinerea*, Linnaeus, 1758), l'avocetta (*Recurvirostra avosetta*, Linnaeus, 1758), il beccapesci (*Sterna sandvicensis*, Latham, 1878), il fraticello (*Sterna albifrons*, Pallas, 1764), la sterna maggiore (*Sterna caspia*, Pallas, 1770), il mignattino (*Chlidonias niger*, Linnaeus, 1758), più un

nutrito gruppo di fenicotteri (*Phoenicopterus ruber*, Linnaeus, 1758) (Allavena and Zapparoli, 1992b; Lanzuisi, 2008). Le comunità biologiche direttamente legate all'acqua libera ricordano, grosso modo, quelle di altre saline italiane ed, in genere, del Mediterraneo, grazie alla struttura dell'impianto, ai parametri chimico fisici delle vasche ed al clima. Si segnala la presenza di specie ittiche come *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821), un ciprinodontide di ambienti salmastri che tollera ampie variazioni di salinità, fino a valori prossimi ai 100‰ (Angeletti, 2006) e che è stato oggetto di diversi studi sulla struttura genetica (Angeletti, 2006; Polesi, 2005; Gagliardi, 2008). Nelle vasche della zona "Sterro" e "Piscine", caratterizzate da salinità più basse e vicine a valori marini, si trova il latterino *Atherina boyeri* (Risso, 1810), specie che abita acque marino-costiere. Si trovano, inoltre, gobidi di acqua dolce, in particolare il ghiozzetto di laguna, (*Knipowitschia panizzae*, Verga 1841), il capitone (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758) e poi varie specie marine costiere adattabili alla vita in acque lagunari, come muggini, spigole, orate e sogliole (Nascetti *et al.*, 1998).

La vegetazione è caratterizzata da specie adattate ad ambienti iperalini, quali *Salicornia europaea* L. e *Sarcocornia perennis* (Miller) Scott. Lungo i bordi delle vasche e sui terrapieni è possibile osservare specie vegetali ormai rare nel resto della regione, *Sarcocornia fruticosa* (Linnaeus) Scott e *Arthrocnemum macrostachyum* (Morric.) Moris, specie alofite che formano la cintura di vegetazione a stretto contatto con l'acqua delle vasche.

La comunità algale presente nei bacini, varia al variare della salinità: nella zona Nord, a minor salinità, la specie dominante è la *Cladophora vagabunda* L. che in primavera – estate si stacca dal fondo e forma estesi tappeti galleggianti. Tra le alghe unicellulari dominano le Diatomee, che, dai pochi dati disponibili in letteratura (Iberite, 1992; Alfinito *et al.*, 1990), sono il gruppo predominante, con 89 taxa identificati, fino a salinità del 110 ‰. Nelle vasche a salinità maggiori prevalgono Cianofitiche e Diatomee. Inoltre, nelle vasche ad alta salinità è presente *Dunaliella salina*, alla quale si deve la colorazione rossastra assunta dalle acque, dovuta all'alto contenuto di  $\beta$ -carotene (Iberite, 1992).

Per quanto riguarda la fauna bentonica, essa risulta costituita da specie salmastre, tipiche di ambienti confinati, marine ed opportuniste; tra tutte si ricorda *Hydrobia* spp., *Cerastoderma glaucum*, le larve di Chironomidi e *Corophium insidiosum* (Bramucci, 2009).

## 1.6 Le Saline di Trapani e Paceco

Le Saline di Trapani e Paceco sono state istituite riserva dalla Regionale Sicilia nel 1995 ed affidate in gestione al WWF, si estendono su quasi mille ettari.

Si tratta di saline ben conservate per la produzione di sale. Il sito costituisce una delle ultime ed importanti aree umide costiere siciliane; caratterizzato in gran parte da saline coltivate in maniera tradizionale, pantani e campi coltivati, presenta innumerevoli valenze naturalistiche, oltre che paesaggistiche, etno-antropologiche, architettoniche e storiche.

Nel 2011 sono state dichiarate “sito di importanza internazionale” ai sensi della “Convenzione di Ramsar”, relativa alla protezione delle zone umide. Fanno parte della Rete Natura 2000 identificate S.I.C. ITA010007 “Saline di Trapani” ai sensi della Direttiva Habitat 92/43/CEE e Z.P.S. ITA010028 “Stagnone di Marsala e Saline di Trapani – Area Marina e Terrestre” ai sensi della Direttiva Uccelli 79/409/CEE.

Le Saline di Trapani rappresentano l'ultimo baluardo per gli uccelli migratori che stagionalmente migrano verso l'Africa attraversando il canale di Sicilia e la prima area umida da essi incontrata durante il viaggio di ritorno primaverile. All'interno della Riserva sono stati censiti ben 208 specie di uccelli, molte delle quali in pericolo di estinzione. Tra questi è possibile osservare Spatole (*Platalea leucorodia*), Fenicotteri (*Phoenicopterus ruber*), Aironi bianchi maggiori (*Egretta alba*), Volpoche (*Tadorna tadorna*), Avocette (*Recurvirostra avocetta*), Cavalieri d'Italia (*Himantopus himantopus*), Sgarze ciuffetto (*Ardeola ralloides*) e migliaia di anatre.

All'interno della Riserva Naturale Orientata delle Saline di Trapani e Paceco vive inoltre un'ampia diversità di Anfibi, tra cui il Rospo smeraldino (*Bufo viridis*) e il Discoglossa dipinto (*Discoglossus pictus*) nonché di rettili come la Lucertola campestre (*Podarcis sicula*), il Gongilo (*Chalcides ocellatus*) e la *Podarcis wagleriana*, specie endemica della Sicilia.

Per quanto riguarda la vegetazione, è possibile osservare piante succulente, vaste distese di salicornieti e praterie costiere salmastre mediterranee dominate da erbe perenni (alofite) di grosse dimensioni che trovano il loro optimum sui suoli salati e salmastri come la Calendula (*Calendula marittima*), piante sommerse radicate, tipiche delle acque salmastre litorali come i canneti ed i tamerici ed infine la splendida vegetazione delle piante psammofile perfettamente adattate a vivere su depositi di sabbia come il *Pancreatium maritimum*.

## CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO

Gli ecosistemi iperalini sono tra i più estremi sulla terra e le saline ne sono un esempio. La loro caratteristica principale è l'iperlinità, dovuta allo scarso idrodinamismo, all'elevato grado di confinamento dei bacini, alle basse profondità e al fatto che gli apporti di acqua dolce non compensano mai l'evaporazione. Per tali ragioni questi ecosistemi costituiscono sistemi modello per investigarne la diversità e la produttività microbica (Joint *et al.*, 2002).

Le comunità di tali ambienti rappresentano una preziosa risorsa naturale in termini di biodiversità (Oren, 1994; Manikandan *et al.*, 2009) e i microrganismi che ne fanno parte hanno un potenziale biotecnologico per la produzione di prodotti ad elevato valore aggiunto come ad esempio enzimi idrolitici attivi in condizioni estreme, esopolisaccaridi, pigmenti carotenoidi,...(Sardar and Pathak, 2014).

Se in passato questi ecosistemi erano stati considerati come aventi una struttura semplice e caratterizzati da microrganismi con una ridotta diversità, i dati accumulati grazie all'introduzione dei metodi molecolari hanno fornito le prove che tali ecosistemi non sono così "semplici" come si riteneva in passato (Oren, 2002c).

Nelle Saline di Tarquinia sono stati eseguiti vari studi relativi agli organismi eucarioti che popolano tale ambiente (Bellisario *et al.*, 2010; Angeletti *et al.*, 2010; Tempesta *et al.*, 2010,...), ma non sono mai state studiate finora le comunità batteriche presenti. In un nostro lavoro precedente (Barghini *et al.*, 2014) sono stati evidenziati risultati preliminari relativi a tali comunità che hanno posto le basi per uno studio più dettagliato. Obiettivo di questa attività di ricerca è stato quindi quello di contribuire a studiare la biodiversità batterica presente nelle acque delle Saline di Tarquinia attraverso metodi colturali e non e monitorare nel tempo i cambiamenti nella composizione di tale comunità in funzione delle variazioni stagionali, climatiche, nutrizionali, ...

Tale obiettivo è stato raggiunto attraverso l'isolamento, l'identificazione e la caratterizzazione di batteri coltivabili e attraverso l'applicazione della tecnica di fingerprinting PCR-DGGE, la quale si è dimostrata essere un potente mezzo per la stima e la comparazione della diversità microbica (Burns *et al.* 2004; Ovreas *et al.* 2003; Baati *et al.*, 2008), nonché per valutarne i cambiamenti spaziali e temporali.

Si è proceduto infine ad uno studio preliminare sulle comunità batteriche presenti nelle Saline di Trapani e Paceco al fine di poter eseguire un confronto nella composizione delle comunità tra saline attive nella produzione di sale e non attive.

## CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

### 3.1 Campionamento

Al fine di studiare la biodiversità batterica presente nelle acque delle Saline di Tarquinia, è stata eseguita una campagna triennale di campionamenti, a cadenza mensile per i primi due anni, a partire dal mese di maggio 2012 e, durante il terzo anno si è proceduto con campionamenti a cadenza settimanale per tre mesi significativi a livello stagionale (maggio 2014, settembre 2014, febbraio 2015). Tale campagna triennale ha previsto il prelievo di campioni di acqua da 14 vasche, secondo un gradiente di salinità, e dal mare limitrofo per un totale di 15 campioni (mare, 1, 5, 8, 19, 21, 24, 27, 34, 35, 37, 44A, 44B, lago e vascone) (Fig.3.1). Questi rappresentano la media di tre sottocampioni prelevati da tre punti significativi in ciascun sito (Reboleiro Rivas *et al.*, 2013).

Per ogni campione di acqua sono stati mensilmente rilevati: temperatura, ossigeno disciolto e conducibilità mediante l'utilizzo dell'ossimetro da campo Handy Polaris (OxyGuard International A/S, Denmark), pH, salinità attraverso un refrattometro manuale e BOD<sub>5</sub> mediante il BOD Sensor System (VELP SCIENTIFICA, Italy).

È stata determinata inoltre, in modo indiretto, la biomassa fototrofa attraverso la stima di clorofeopigmenti, Chl a, chl b e chl c1+c2 procedendo come segue: l'acqua è stata filtrata su filtri in microfibra di vetro con porosità 0,7 µm (VWR international, Italy) e si è proceduto quindi alla determinazione spettrofotometrica a partire dagli estratti in acetone al 90% (ISPRA, 2010) e all'esecuzione degli spettri di tali estratti entro il range 320-900 nm. Le analisi sono state eseguite su campioni in triplicato.

Per ogni campione sono state effettuate conte procariotiche totali e vitali a partire da campioni di acqua incubati con 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) e ioduro di propidio come riportato da Boulus *et al.*, 1999. Le conte sono state eseguite utilizzando il microscopio a fluorescenza Dialux 22eb (Leitz- Wetzlar, Germany). Anche in questo caso le misurazioni sono state eseguite su campioni in triplicato.

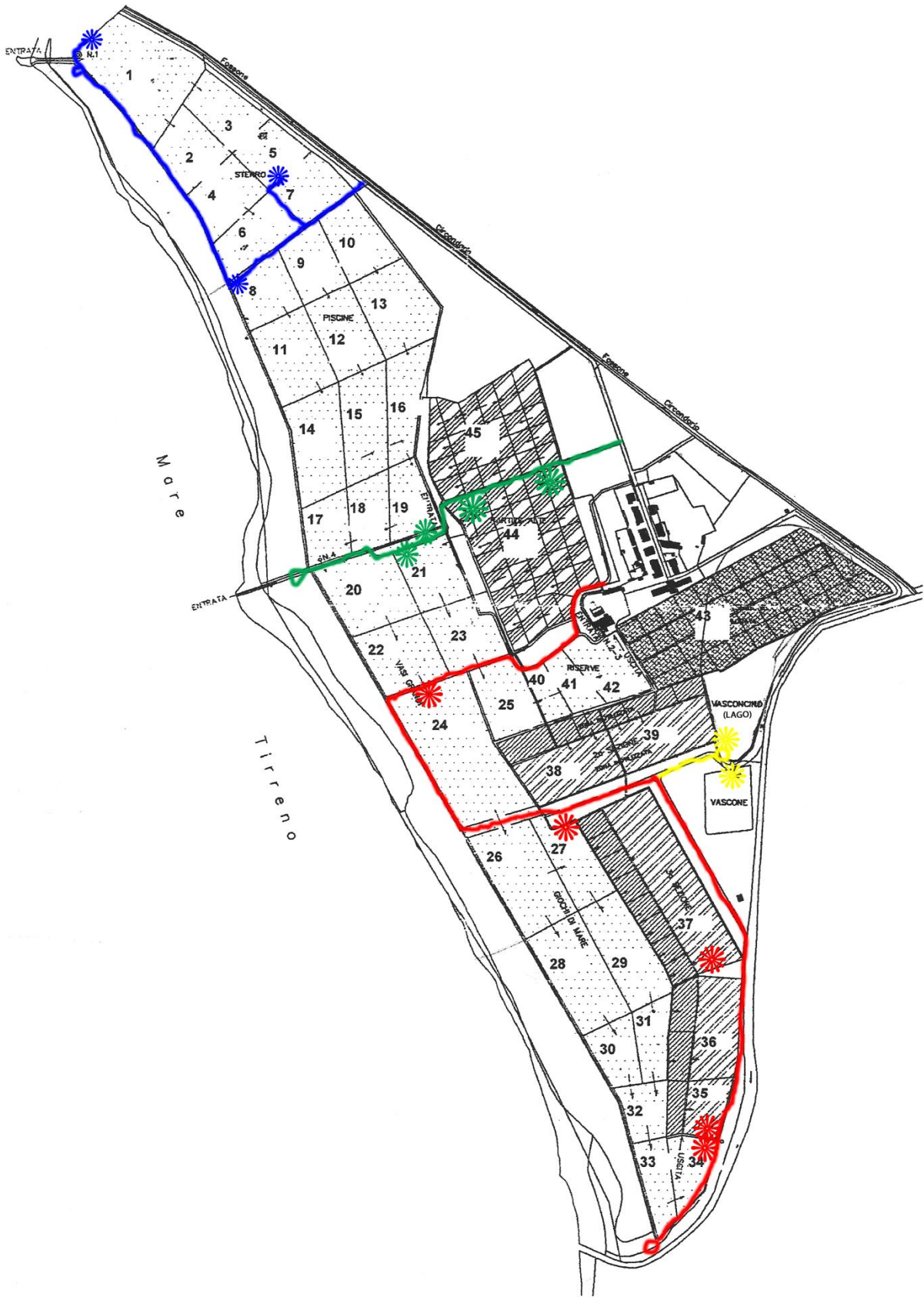
I campioni in triplicato di vari mesi (settembre, ottobre 2012; gennaio, febbraio 2013 e maggio, luglio 2013) inoltre sono stati inviati presso "Área de Tecnologías del medio ambiente, Departamento Ingeniería Civil E.T.S." dell'Università di Granada (Spagna) dove si è eseguita l'analisi di alcuni dei parametri chimici quali: nitriti, nitrati, fosfati,...

Allo scopo di studiare la biodiversità batterica presente nelle vasche, campioni di acqua sono stati filtrati su membrane sterili (filtri di nitrato di cellulosa da 0,45µm, Sartorius Stedim Biotech) allo

scopo di ottenere sia colture pure sia DNA per lo studio delle comunità batteriche utilizzando la tecnica PCR-DGGE.

Le colture batteriche sono state ottenute dividendo le membrane in 4 parti uguali, in condizioni sterili. Ogni quarto di membrana veniva posto su piastre di terreno PCA con differenti concentrazioni di sale (scelte in un range compreso tra 0 e 250‰ di NaCl con steps di 50‰) per lo sviluppo di batteri coltivabili. Le membrane usate per l'estrazione del DNA totale invece, venivano conservate in tubi sterili, contenenti silica gel, a 4°C per evitare contaminazioni.

Nei mesi di settembre 2013 e settembre 2014 inoltre, è stato effettuato un campionamento presso la salina attiva “Chiusicella”, all'interno del complesso delle Saline di Trapani e Paceco, da dieci vasche secondo un gradiente di salinità (1, 3, 1R, 3R, 5C, 7C, 8C, 10C, 11C, VC), al fine di poter eseguire una comparazione preliminare con i dati rilevati finora presso le Saline di Tarquinia.



**Fig. 3.1** Piantina delle Saline di Tarquinia: numerazione delle vasche.



**Fig. 3.2** Mappa di Salina Chiusicella all'interno della riserva "Saline di Trapani e Paceco": le vasche campionate.

## **3.2 Studio dei batteri coltivabili**

### **3.2.1 Test preliminari**

In seguito all'isolamento di ceppi coltivabili, si è proceduto alla determinazione delle caratteristiche morfologiche delle colonie e/o delle cellule (forma, colore, morfologia, aspetto e dimensione), all'esecuzione di test biochimici preliminari (produzione di catalasi e ossidasi) e alla colorazione di

Gram al fine di avere una caratterizzazione almeno preliminare degli isolati ed eliminare eventuali replicati.

La misurazione delle cellule batteriche è stata effettuata al microscopio ottico tramite l'utilizzo di un oculare micrometrico provvisto di una scala graduata, tarato con un vetrino micrometrico (Leitz Wetzlar Germany): ogni tacca della scala corrispondeva a una lunghezza pari a 1,11  $\mu\text{m}$  per l'obiettivo ad immersione 100x.

I test per catalasi ed ossidasi sono stati eseguiti come descritto di seguito (Kovacs, 1956; Whittenbury, 1964). Per il test dell'ossidasi, il reattivo di Kovacs (1% of N,N,N,N tetrametil-p-phenylenediamine in water) è stato aggiunto alla colonia fresca. Dopo 60 sec. lo sviluppo di colore viola indica reazione positiva. Per il test della catalasi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%) è stata aggiunta alla colonia fresca: la formazione di bolle durante il rilascio di ossigeno indica una reazione positiva.

La colorazione di Gram infine, è stata eseguita con l'utilizzo di un kit commerciale (Merck, Germany) seguendo le istruzioni riportate dall'azienda produttrice.

### **3.2.2 Identificazione degli isolati e filogenesi**

Tutti i ceppi isolati sono stati identificati mediante analisi delle sequenze del gene codificante per il 16S rRNA. Il DNA genomico batterico è stato estratto secondo protocollo dello shock termico e utilizzato come stampo per l'amplificazione del gene di interesse. I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati e le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate nella banca dati on-line NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information) utilizzando BLASTN.

#### **3.2.2.1 Estrazione del DNA**

Il protocollo dello shock termico (Selbmann *et al.*, 2010) prevede i seguenti passaggi:

1. Trasferire una singola colonia batterica (~2 mm) in una eppendorf (0,5 ml) contenente 40  $\mu\text{l}$  di acqua deionizzata sterile;
2. Sospendere la coltura batterica in acqua;
3. Trattare la sospensione in un thermal cycler a 100°C per 5 min. e raffreddare immediatamente in ghiaccio;
4. Centrifugare a 6000 rpm (4000 g) per 2-3 min.;
5. Prelevare il surnatante e trasferirlo in una nuova eppendorf.

### 3.2.2.2 PCR per l'amplificazione del gene 16S rDNA

Le amplificazioni sono state eseguite preparando miscele di reazione con volume finale di 25 µl e costituite da: 12 µl di Mastermix (VWR, Taq 2X Master Mix, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl di ciascuno dei primers riportati in tabella 3.1 con concentrazione pari a 5 pmol/µl, 1 µl di DNA e acqua deionizzata sterile per portare a volume.

Per l'amplificazione è stato utilizzato il seguente programma:

- 1) denaturazione a 95°C per 5 min.
  - 2) denaturazione a 95°C per 45 sec.
  - 3) annealing dei primers a 61°C per 1 min.
  - 4) estensione della catena a 72°C per 1min. e 30 sec.
  - 5) estensione a 72°C per 5 min.
  - 6) mantenimento a 4°C.
- } X30

Gli amplificati prodotti sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,5%) preparato con agarosio (Agarose-IBI-Shelton Scientific, INC. 230 Long Hill Cross Road, Shelton, CT 06484) sciolto in soluzione tampone TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0 della Brinkmann Instrument, INC-NY) a cui è stato aggiunto GelRed (10,000x, Biotium, USA).

Per gli amplificati sono stati caricati in ogni pozzetto: 5 µl di DNA miscelato con 1 µl di Loading Buffer 6X (tampone di caricamento al 25% di blu di bromofenolo e 40% w/v di saccarosio in acqua). Nel primo pozzetto è stato caricato 1 µl di marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas) da usare come confronto per la determinazione della dimensione degli amplificati, 1 µl di Loading Buffer e 4 µl di acqua deionizzata sterile).

I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati purificati direttamente dalla miscela di PCR, allo scopo di rimuovere residui di primers, sali e nucleotidi ancora presenti, utilizzando il GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK).

I prodotti di PCR purificati sono stati utilizzati per le reazioni di sequenziamento.

Le reazioni di sequenziamento sono state effettuate con il metodo Sanger *et al.*, (1977) da Macrogen Inc. (Seoul, Korea) (<http://www.macrogen.com>).

Per la ricostruzione e l'analisi delle sequenze è stato utilizzato il programma ChromasPro 1.5 (Conor McCarthy School of Health Science, Griffith University, Southport, Queensland, Australia), che permette la visualizzazione della sequenza nucleotidica sotto forma di elettroferogramma, dove ad ogni picco corrisponde un nucleotide.

Le sequenze, una volta ricostruite, sono state confrontate con quelle depositate nella banca dati online NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information), utilizzando BLASTN (Basic Alignment Search Tool Nucleotide, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

<b>Primers</b>	<b>Sequenza (5'-3')</b>
63f	CAGGCCTAACACATGCAAGTC
1389r	ACGGGCGGTGTGTACAAG

**Tabella 3.1** Primers utilizzati per l'amplificazione del gene 16S rDNA (Hongoh *et al.*, 2003).

### **3.2.2.3 Allineamento delle sequenze e costruzione dell'albero filogenetico**

Tutte le sequenze di interesse e l'outgroup opportuno, sono stati allineati automaticamente, utilizzando il programma ClustalX (Thompson *et al.*, 1997); l'allineamento è stato poi migliorato manualmente con il software Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura *et al.*, 2013). Sono state eliminate le porzioni iniziali e terminali delle sequenze allineate in modo da comparare frammenti della medesima lunghezza.

L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il metodo della massima verosimiglianza (ML, Maximum Likelihood).

La validità dell'inferenza filogenetica è stata stimata con l'analisi di bootstrap (Felsenstein, 1985) calcolata su 1000 pseudoreplicati generati ed analizzati con Mega 6.

### **3.2.3 Determinazione dei profili di crescita a differenti concentrazioni di cloruro di sodio**

Per la determinazione dei profili di crescita a differenti concentrazioni saline, i microrganismi isolati sono stati inoculati su piastre di PCA con aggiunta di NaCl in concentrazioni crescenti da 0 a 320‰ con steps di 40‰. Tutte le piastre, sono state inoculate con inoculo puntiforme (diametro di 1 mm). L'esperimento è stato condotto in triplicato.

La crescita microbica è stata valutata tramite la misurazione dell'incremento del diametro della colonia a 25°C, mediante l'utilizzo di un calibro. Le misurazioni, sono state effettuate ogni 24 ore, per la durata complessiva di 30 giorni.

### **3.2.4 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°C, su piastre di PCA (Plate Count Agar) con concentrazione salina pari all'optimum per gli isolati testati.

I ceppi sono stati seminati su piastre (diametro 90 mm), con 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. Le piastre sono state monitorate ogni 24 ore, per una durata totale di 30 giorni.

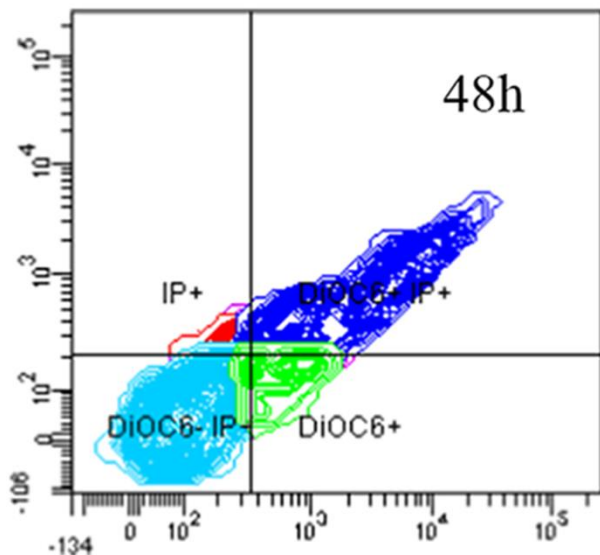
### **3.2.5 Studi di citometria di flusso**

Tra i ceppi testati, 4 sono stati scelti, sulla base dei risultati ottenuti dalle prove di crescita su piastra, per l'esecuzione di esperimenti di citometria di flusso al fine di verificare lo stato fisiologico delle cellule a diverse concentrazioni saline in terreno liquido LB (Luria Bertani Broth, Difco, USA) da 0 a 280‰ di NaCl (con steps di 40‰). Gli esperimenti sono stati condotti presso il "Servicio de Biología Fundamental, Centro de Instrumentación Científica", dell'università di Granada, Spagna usando il citometro FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Il citometro è dotato di 3 sets di laser (405, 488, and 625 nm) e rilevatori per otto coloranti fluorescenti. L'acquisizione e l'analisi dei dati è stata fatta mediante il software FACSDiva v6.1.3 (Becton Dickinson).

I ceppi sono stati fatti crescere per 24-48 h a 28°C su piastre con LBA (LB Agar), contenenti l'optimum di concentrazione salina per i microrganismi oggetto di studio. Le cellule sono state poi prelevate e sospese in acqua deionizzata sterile con la medesima concentrazione salina e da queste sospensioni il necessario quantitativo di cellule è stato prelevato e risospeso in LB con concentrazioni da 0 a 280‰ di NaCl (con steps di 40‰) per raggiungere una concentrazione finale di  $10^6$  cell/ml.

Le varie sospensioni sono state incubate in uno shaker orbitale (28°C e 180 rpm) per 72 h. Aliquote dei campioni prelevate dopo 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 h, sono stati incubati con ioduro di propidio (PI) e ioduro 3,3-dihexylocarbocyanine (DiOC6) o fluoresceina diacetato (FDA) per raggiungere la concentrazione finale di 1, 0,005, 2 µg/ml, rispettivamente. Dopo 15 min di incubazione a 28°C i campioni sono stati analizzati con il citometro.

Lo stato fisiologico delle singole cellule batteriche è stato caratterizzato aggiungendo diverse combinazioni dei coloranti fluorogenici. La presenza di una membrana citoplasmatica polarizzata intatta e di un sistema di trasporto attivo, essenziale per una piena funzionalità cellulare, sono stati testati con l'aggiunta di PI e DiOC6. Il PI si lega al DNA, ma non può attraversare una membrana citoplasmatica intatta, e il DiOC6 si accumula nelle cellule quando le membrane sono polarizzate o iperpolarizzate (Juárez-Jiménez *et al.*, 2010, Müller *et al.*, 1999, Reis *et al.*, 2005). Inoltre, la vitalità cellulare è stata testata utilizzando la combinazione di PI e FDA (Xiao *et al.*, 2011). L' FDA è attivamente trasportato all'interno delle cellule vive e viene convertito dalle esterasi di membrana in un composto fluorogenico (emissione a 530 nm): cellule che hanno una buona omeostasi (viabilità) sono fluorescenti. Il PI invece entra nella cellula attraverso la membrana danneggiata evidenziando quindi le cellule morte.



**Fig. 3.3** Esempio di grafico di citometria di flusso elaborato dal software FACSDiva v6.1.3. Lo spot verde rappresenta le cellule colorate con DiOC6, Lo spot celeste indica le cellule che sono in uno stato di latenza e lo spot blu invece indica una colorazione sia con DiOC6 sia con PI. Quindi le cellule iniziano a perdere la polarizzazione di membrana e ad acquisire PI. Lo spot rosso indica infine le cellule morte (Silvi *et al.*, 2013).

## **3.3 Studio delle comunità batteriche mediante tecnica di fingerprinting PCR-DGGE**

### **3.3.1 Estrazione del DNA**

Le membrane sono state inserite in falcon sterili contenenti ciascuna 1,5 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata sterile. Sono state frantumate così da portare le cellule in sospensione. In seguito la soluzione è stata trasferita in una eppendorf da 1,5 ml.

L'estrazione del DNA è stata realizzata tramite il kit commerciale GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx Ltd., Poland).

Gli steps effettuati per l'estrazione sono:

- Centrifugare il campione a 7500 rpm per 10 min;
- Eliminare il surnatante e sospendere il pellet in 300 µl di buffer LYSE BG;
- Aggiungere 50 µl di BUFFER BL e 2 µl di RNAsi A alla sospensione cellulare e vortexare per 3 sec.;
- Incubare il campione a 37°C per 15 min.;
- Aggiungere 15 µl di PROTEINASI K e vortexare per 3 sec.;
- Incubare il campione a 55°C per 30 min.;
- Aggiungere 350 µl di buffer SOL BG e vortexare per 3 sec.;
- Incubare il campione a 55°C per 5 min.;
- Vortexare il campione per 15 sec.;
- Centrifugare il lisato per 2 min. a 13000 rpm;
- Trasferire il surnatante in una colonnina (Spin-column) e quindi inserire la colonnina in un "collection tube";
- Centrifugare per 1 min. a 13000 rpm;
- Scartare il liquido di filtrazione e reinserire la colonnina nel tubo;
- Aggiungere 600 µl di buffer WASH BGX;
- Centrifugare per 1 min. a 13000 rpm;
- Scartare il liquido di filtrazione e reinserire la colonnina nel tubo;
- Aggiungere 300 µl di buffer WASH BGX;
- Centrifugare per 2 min. a 13000 rpm;
- Scartare il liquido di filtrazione e trasferire la colonnina su una Eppendorf da 1,5 ml;

- Aggiungere 100 µl di ELUTION BUFFER precedentemente riscaldato a 80°C;
- Incubare a temperatura ambiente per 2 min.;
- Centrifugare per 1 min. a 13000 rpm.

Il DNA estratto è stato utilizzato per lo studio della diversità batterica presente nei campioni. Sono state condotte due PCR, una per l'amplificazione del gene 16S rDNA e una successiva, nested-PCR, per l'amplificazione della regione interna ipervariabile V3 (Gray *et al.*, 2002; Molina-Muñoz *et al.*, 2009).

### 3.3.2 Amplificazione del gene 16S rDNA (I PCR)

L'amplificazione del gene 16S rDNA è stata eseguita con i primers universali 63f e 1389r (Tabella 3.1). Le reazioni di PCR sono state effettuate come descritto da Vinuesa *et al.* nel 1998, applicando solo piccole modifiche.

Per ogni campione è stata preparata una soluzione di 25 µl contenente: 1 µl di estratto di DNA, 12 µl di miscela Mastermix (VWR, Taq 2X Master Mix, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl di ciascun primer (alla concentrazione di 5 pmol/µl) e acqua deionizzata sterile, per portare a volume.

Per l'amplificazione è stato utilizzato il termociclatore Q-SAT 24 (Hain Lifescience, UK).

I cicli termici eseguiti per la reazione sono stati:

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
- } X 30

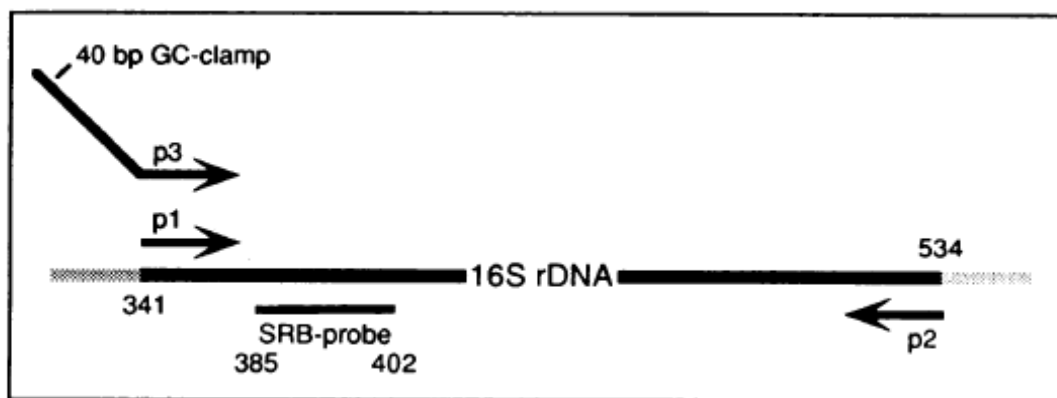
Dopo la verifica dell'avvenuta amplificazione tramite corsa su gel di agarosio all'1,5%, gli ampliconi sono stati utilizzati come stampo per la seconda reazione di PCR.

### 3.3.3 Amplificazione della regione ipervariabile V3 (II PCR)

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 riportati in tabella 3.2.

Primer	Sequenza (5'-3')
GC-341f	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGATC CCTACGGGAGGCAGCAG
534r	ATTACCGCGGCTGCTGG

**Tabella 3.2** Primers utilizzati per l'amplificazione della regione ipervariabile V3 (Muyzer et al., 1993).



**Fig. 3.4** Meccanismo di amplificazione della regione ipervariabile V3.

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 and Smalla, 1998).

Le reazioni di PCR per l'amplificazione del V3 rDNA sono state effettuate su un volume totale di 100 µl contenente: 50 µl di Mastermix (VWR, Taq 2X Master Mix, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>), 4 µl di ciascun primer (concentrato 5 pmol/µl), 4 µl di DNA stampo e acqua deionizzata sterile per portare a volume. Le condizioni di reazione, la temperatura ed i cicli del programma seguiti sono una modificazione della tecnica touch down descritta da Watanabe *et al.* (1998). Le reazioni di PCR sono state effettuate utilizzando l'apparecchio Q-SAT 24 (Hain Lifescience, UK) ed il seguente programma di amplificazione:

1. Denaturazione 94°C per 7 min.
2. Denaturazione 94°C per 1 min.
3. Annealing da 65°C a 55°C per 1 min. con una riduzione di 0,5°C per ciclo.
4. Estensione 72°C per 2 min.
5. Estensione finale 72°C per 10 min.

## 6. Mantenimento 4°C

Gli steps 2,3 e 4 sono stati ripetuti per 20 cicli e per ulteriori 10 cicli mantenendo la temperatura di annealing costante a 55°C.

Alla fine del processo di amplificazione è stata effettuata una corsa in gel di agarosio all'1,5% per verificare la presenza di bande amplificate della grandezza desiderata.

### **3.3.4 Concentrazione e purificazione dei prodotti PCR**

Tutti i prodotti finali di PCR sono stati purificati e concentrati circa 5 volte, utilizzando il GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK). I passaggi previsti dal protocollo sono i seguenti:

1. Miscelare 5 volumi di buffer Type 3 ad un volume del prodotto ottenuto dalla reazione di PCR;
2. Trasferire il campione in una GFX MicroSpin column assemblata ad un collection tube;
3. centrifugare per 30 sec. a 13000 rpm. Scartare l'eluito.
4. Aggiungere 500 µl di Wash buffer type 1;
5. Centrifugare per 30 sec. a 13000 rpm. Scartare l'eluito e ripetere la centrifugazione;
6. Trasferire la GFX MicroSpin column su una eppendorf da 1.5 ml;
7. Aggiungere 20 µl di Elution buffer type 4;
8. Incubare per 1 min. a temperatura ambiente;
9. centrifugare per 1 min. a 13000 rpm;
10. Recuperare il DNA concentrato e purificato.

### **3.3.5 Casting del gel di DGGE**

Le elettroforesi su gel a gradiente chimico denaturante sono state eseguite con il sistema DGGE-1 (ELETTROFOR, Scientific Instruments). Per la separazione dei frammenti, è stato utilizzato un gel di poliacrilamide al 7,5% con gradiente denaturante lineare composto da urea e formammide nel range 20% - 70%.

E' stata preparata, inoltre, una soluzione priva di agenti denaturanti per la formazione dello stacking gel, il quale permette al DNA di distribuirsi all'interno dei pozzetti e iniziare in modo omogeneo la corsa. I gel sono stati preparati 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 3.3.

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.

I gel sono stati preparati secondo il seguente protocollo:

1. Pulire i due vetri con etanolo al 70%;
2. 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 gli appositi fermi 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 genererà un gradiente lineare (si prelevano 23 ml per ogni soluzione e ad ognuna si aggiungono 120 µl di APS e 10 µl di TEMED);
5. Ad avvenuta solidificazione del gel inserire lo stacking (gel di poliacrilamide al 7,5% privo di gradiente denaturante) con una siringa e quindi il pettine per la formazione dei pozzetti;
6. Attendere quindi che il gel polimerizzi, la polimerizzazione del gel richiederà circa 12 ore.

Reagenti	Sol. 20%	Sol. 70%	Stacking Gel
<b>Acrilamide:bis-acrilamide 37.5:1 40%</b>	18,8 ml	18,8 ml	18,8 ml
<b>TAE 50X</b>	2 ml	2 ml	2 ml
<b>Urea</b>	8,4 g	29,4 g	0 g
<b>Formammide</b>	8 ml	28 ml	0 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Fino a 100 ml	Fino a 100 ml	Fino a 100 ml

**Tabella 3.3** Reagenti utilizzati per la preparazione delle soluzioni denaturanti.

### 3.3.6 Corsa elettroforetica

Il gel viene immerso nell'apparato per DGGE contenente buffer di corsa TAE 1X preriscaldato fino alla temperatura di 60°C. In ogni pozzetto sono stati caricati 20 µl di DNA campione, 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.

Oltre ai campioni, in ciascun gel è stato caricato un marker prodotto dall'amplificazione della regione V3 rDNA di colture pure conservate in collezione in laboratorio. L'elettroforesi è stata quindi condotta per 5 ore a 60 °C e 200 V.

Terminata la corsa il gel viene prelevato dall'apparato per DGGE ed immerso per 40 min. in una soluzione di GelRed (GelRed Nucleic Acid Stain, 10000X in Water, Biotium) costituita da: 1,34 g di NaCl, 66,7 µl di GelRed e 200ml di H<sub>2</sub>O.

L'acquisizione delle immagini è avvenuta con l'utilizzo del sistema automatizzato di rilevamento immagine ChemiDoc™ XRS System (BIO-RAD, USA).

### 3.3.7 Analisi dei gel DGGE

Le foto dei gel sono state elaborate tramite il programma Adobe Photoshop CS5 e successivamente si è proceduto all'analisi di immagine mediante i software "Quantity One 1-D versione 4.6.3" (BIO-RAD) e "Phoretix 1D versione 12.0" (TotalLab Ltd, UK).

Mediante questi software possono essere individuate sia manualmente sia automaticamente le lanes nel gel e le bande presenti in esse, rilevando anche l'intensità assoluta di ogni singola banda o rapportandola alla sua lane (intensità relativa).

I profili sono stati comparati utilizzando sia il coefficiente di correlazione di Pearson, sia il coefficiente di Dice.

Il coefficiente di correlazione di Pearson utilizza le curve densitometriche, prendendo in considerazione l'intensità delle bande, mentre il coefficiente di Dice è basato esclusivamente sulla presenza/assenza di bande.

Nella fase di matching tra le bande delle diverse lanes è stata utilizzata una percentuale di tolleranza compresa tra l'1,5% e il 2,5%. La tolleranza indica l'altezza della lane massima consentita affinché due bande di lanes diverse possano essere considerate identiche. Essa è espressa come percentuale dell'altezza della lane. È possibile immettere un valore compreso tra 0,2 e 10%, ma se le bande sono molto ravvicinate, è consigliabile immettere un valore pari o inferiore al 2,5%.

I dendrogrammi relativi alla similarità dei patterns di bande sono stati calcolati automaticamente utilizzando sia il coefficiente di Dice, sia il coefficiente di Pearson e l'algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

Per testare la riproducibilità dei profili di DGGE, sono state analizzate reazioni di PCR caricate in replicato nei gel.

La diversità batterica dei campioni studiati è stata misurata utilizzando indici basati sui profili di fingerprinting ottenuti. Questi sono stati calcolati utilizzando il numero e l'intensità delle bande in

ogni profilo, rappresentanti il numero e l'abbondanza relativa delle differenti specie in ogni campione.

Per valutare la diversità tra i campioni sono stati calcolati: la richness, l'indice di Simpson, l'indice di Shannon-Weaver e la evenness (o indice di Pielou).

La richness rappresenta il numero di bande presenti in ogni profilo di fingerprinting (Ampe and Miambi, 2000).

L'indice di diversità di Simpson (Simpson 1949) misura la probabilità che due individui selezionati random da un campione, facciano parte della stessa specie. Esso può essere calcolato utilizzando la seguente formula:

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

Dove  $p_i$  rappresenta l'intensità della banda relativa alla somma di tutte le intensità delle bande del profilo. Il valore 1-D è compreso tra 0 e 1. Più alto è il valore di 1-D, più alta è la diversità presente.

L'indice di Shannon è calcolato con la formula:

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

dove: S è il numero delle bande presenti nel profilo e  $p_i$  la relativa intensità di ogni banda.

L'indice di Pielou ( $J'$ ), noto anche come indice di omogeneità, di equiripartizione o evenness, è compreso in un intervallo che va da zero ad uno, i valori prossimi allo zero identificano comunità caratterizzate da taxa dominanti, mentre i valori prossimi (o uguali) a uno sono tipici di comunità equiripartite.

La formula per il calcolo di tale indice è:

$$J' = H' / \ln S$$

Dove  $H'$  è l'indice di Shannon e S è il numero totale delle bande nel profilo.

Tali indici sono stati utilizzati, insieme ai parametri ambientali rilevati, per verificare, per ogni sito campionato e per tutti i mesi di campionamento, se e in che modo le variazioni della biodiversità potrebbero essere correlate alle variazioni dei dati ambientali rilevati (salinità, ossigeno disciolto, temperatura, pH, concentrazione di clorofeopigmenti e BOD<sub>5</sub>). Per eseguire l'analisi i dati ambientali sono stati preventivamente normalizzati dividendo i valori ottenuti per ciascuna variabile con il massimo valore rilevato per essa.

È stata eseguita quindi, con l'utilizzo del programma PAST, l'analisi NMDS (*Nonmetric multidimensional scaling*), utilizzando l'indice di similarità Bray-Curtis.

Con il software Phoretix 1D, è stata eseguita inoltre un'analisi comparativa dei profili di uno stesso campione nel corso dei vari mesi di campionamento. I patterns delle bande sono stati standardizzati con l'utilizzo di un profilo di riferimento presente in tutti i gel (marker). È stata quindi generata una

matrice delle lanes comparate, in cui ogni banda viene descritta dalla sua posizione e dalla sua intensità relativa nel profilo.

Questa matrice, insieme ai valori di richness e ai valori medi delle conte totali e vitali, è stata utilizzata, insieme ai parametri ambientali rilevati e normalizzati (salinità, ossigeno disciolto, temperatura, pH, concentrazione di clorofeopigmenti e BOD5), per verificare se e in che modo le variazioni osservate tra i differenti patterns di bande potrebbero essere in qualche modo associate alle variazioni dei dati ambientali.

Anche in questo caso è stata applicata la tecnica NMDS (Nonmetric multidimensional scaling) e l'indice di similarità Bray-Curtis, utilizzando il programma PAST.

L' NMDS genera un ordinamento degli oggetti basato su un algoritmo iterativo che tende a rendere minimo lo scarto (stress) tra le distanze tra oggetti, ottenute dai valori originali, e le distanze tra oggetti generate dall'ordinamento. L'obiettivo dell'NMDS è quindi di ottenere un ordinamento degli oggetti che preservi l'ordine (rango) delle distanze originali.

Alcuni autori suggeriscono l'utilizzo dell'NMDS rispetto al metric-MDS nell'analisi multivariata di matrici di dati biologici, che sono spesso caratterizzati da relazioni di tipo non lineare e sui quali risulta quindi preferibile l'applicazione di metodi di analisi non parametrici o basati sui ranghi (Montanari, 2012).

Il risultato dell'ordinamento NMDS, analogamente al MDS metrico, è un plot bidimensionale su cui vengono proiettati gli oggetti (unità di campionamento), che tendono a posizionarsi tanto più vicini tra loro quanto più simili sono tra loro sulla base delle variabili rilevate. Oggetti descritti da variabili con comportamento molto differente si collocano lontani sul piano di ordinamento.

Allo scopo di determinare l'organizzazione funzionale delle comunità sono state utilizzate le curve di distribuzione di Pareto-Lorenz (Wittebolle *et al.*, 2008), le quali sono state calcolate per 3 mesi significativi a livello stagionale, maggio 2012, agosto 2012, marzo 2013, che presentavano rispettivamente valori di salinità intermedia, massima e minima durante la campagna di campionamento. Le curve di Pareto-Lorenz sono state calcolate inoltre per i primi due anni di campionamento, per il sito vascone, che ha presentato sempre il più elevato valore di salinità. Per ogni profilo di DGGE, le rispettive bande sono state ordinate in base alla loro intensità, dal valore più alto al valore più basso. La curva viene disegnata in un grafico in cui in ascissa è riportato il numero cumulativo normalizzato di bande e in ordinata le rispettive intensità cumulative normalizzate. 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 (Marzorati *et al.*, 2008) (vedi Fig. 3.5).

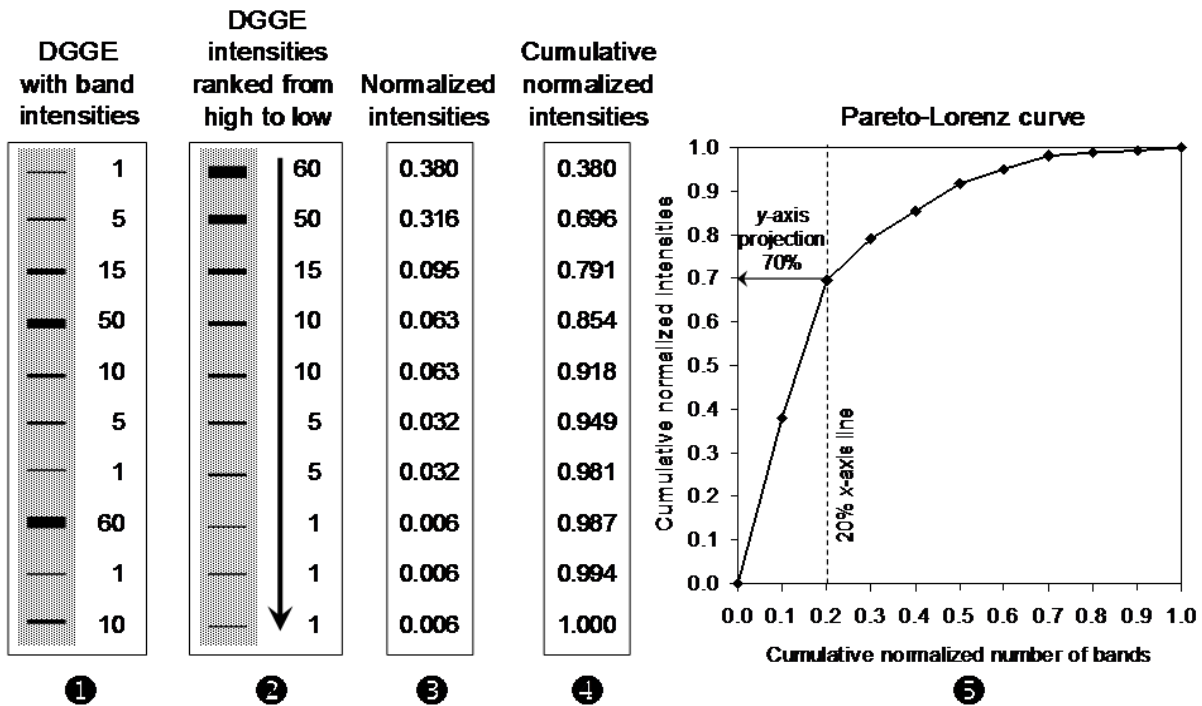


Fig. 3.5 Costruzione delle curve di distribuzione di Pareto-Lorenz.

Si è proceduto infine al calcolo dell'indice di dinamicità, il quale indica la stabilità di una comunità microbica nel tempo. Questo indice è basato sul tasso di cambiamento tra profili di DGGE consecutivi in un dato intervallo di tempo ed è determinato utilizzando le matrici di similarità delle curve densitometriche dei patterns di DGGE basate sul coefficiente di correlazione di Pearson come descritto da Marzorati *et al.*, 2008.

I valori percentuali di similarità possono essere utilizzati per il calcolo della percentuale di cambiamento, basandosi sulla seguente formula:

$$\% \text{ di cambiamento} = 100 - \% \text{ di similarità.}$$

La matrice dei valori di % di cambiamento è usata per eseguire una Moving Window Analysis (MWA) riportando i valori calcolati tra punti consecutivi di campionamento (ad esempio giorno X e giorno X - 7). Di conseguenza, il valore del tasso di cambiamento ( $\Delta t$ ) può essere calcolato come la media dei punti dati della curva. Più alto è il cambiamento tra profili di DGGE di due punti di campionamento consecutivi, più alti saranno i corrispondenti punti della curva e, di conseguenza, più alti i valori  $\Delta t$  (Marzorati *et al.*, 2008).

## CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Studio dei batteri coltivabili

#### 4.1.1 Test preliminari

Allo scopo di eseguire una caratterizzazione almeno preliminare degli isolati ed eliminare eventuali replicati dello stesso ceppo, tutte le colture pure sono state sottoposte a test preliminari, ottenendo 39 isolati diversi che sono stati mantenuti in collezione ed utilizzati per ulteriori studi (tabelle 4.1 e 4.2). I ceppi con nomenclatura BS- sono stati isolati da campioni d'acqua prelevati durante una campagna preliminare esplorativa, da quattro vasche secondo un gradiente di salinità (V1, V2, V3, V4) e da una vasca del centro ittigenico delle Saline di Tarquinia (VP). Le colture pure di questi isolati erano ottenute su PCA (*Plate Count Agar*) senza l'aggiunta di cloruro di sodio (Barghini *et al.*, 2014). I ceppi S- invece sono stati isolati durante la campagna triennale di campionamento secondo le modalità precedentemente descritte (cap. 3 par. 3.1).

La maggioranza degli isolati è risultata Gram negativa (77% ca.). Già dai primi studi nell'ambito della microbiologia marina è stato evidenziato che la maggior parte dei procarioti (ca. 95%) è composta da Gram negativi (Watson *et al.*, 1977; Delille, 1992). Una spiegazione della prevalenza dei gram negativi è legata alla struttura della loro parete cellulare. I nutrienti a bassa concentrazione possono attraversare la membrana esterna, attraverso porine, e lo spazio periplasmatico grazie a specifiche proteine. I batteri oligotrofi devono avere sistemi di trasporto molto efficienti per garantire che le sostanze possano entrare nella cellula anche a concentrazioni molto basse (Munn, 2011). Per questa ragione i Gram negativi sarebbero avvantaggiati in un ambiente oligotrofico come l'acqua di mare.

Per i test di catalasi ed ossidasi, i ceppi positivi sono risultati rispettivamente il 100% e il 69%.

La maggior parte degli isolati presentava forma bastoncellare (79%).

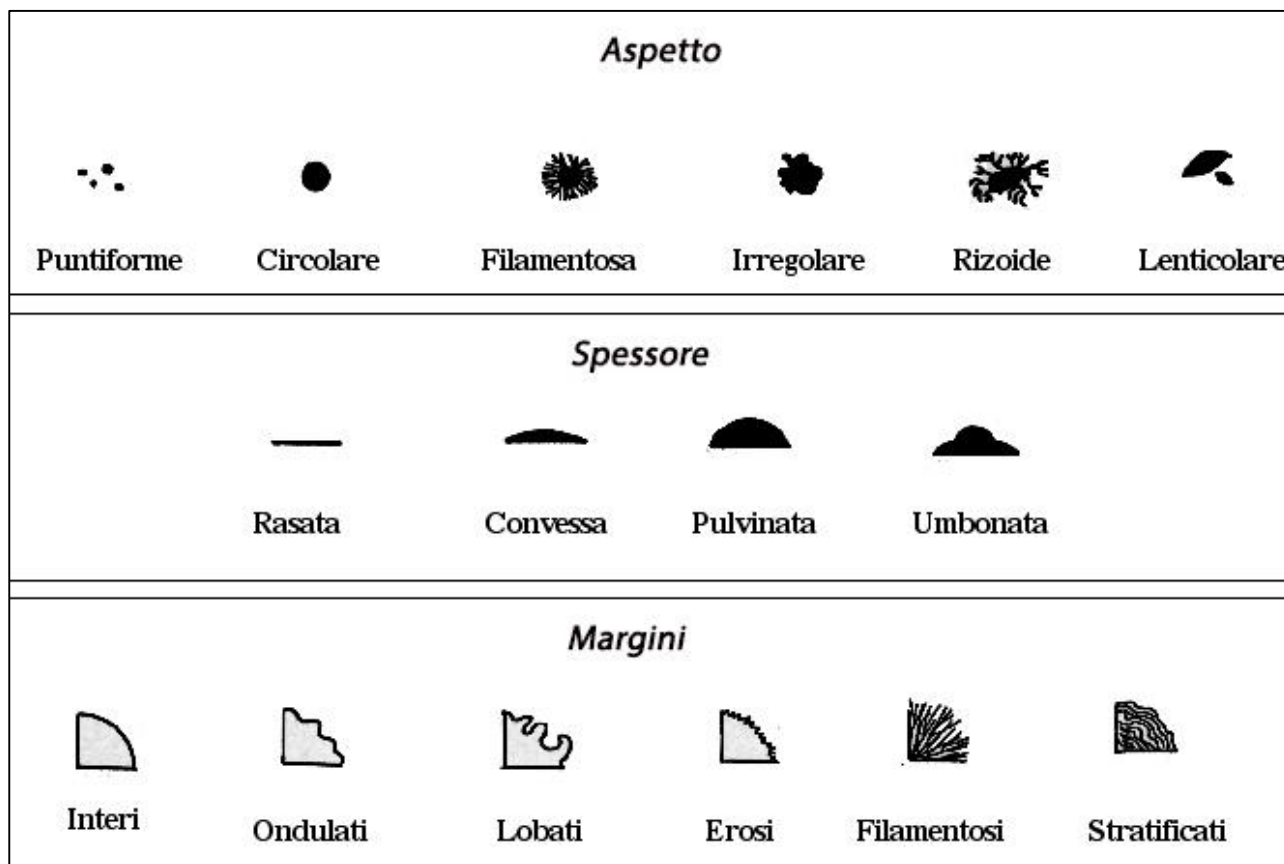
<b>CEPPO</b>	<b>SITO DI CAMPIONAMENTO</b>	<b>SALINITÁ (%)</b>	<b>TEMP. ARIA/ACQUA (°C)</b>
BS1b	V2	38	16/ND
BS6	LAGO	12	16/ND
BS15	V22	90	16/ND
BS21	VASCONE	170	16/ND
BS22	VASCONE	170	16/ND
BS23a	VASCONE	170	16/ND
BS32	VASCONE	170	16/ND
BS34	VP	35	16/ND
BS35	VASCONE	170	16/ND
S1	V35	142	18/21,5
S3	V21	98	18/18
S5	V44B	140	18/18,2
S8	V44A	120	18/18,3
S9	V37	180	18/22
S10	VASCONE	230	18/22
S14	V34	140	18/22
S17	V44A	120	18/18,3
S19	V44B	140	18/18,2
S23	V27	130	18/21
S27	V44B	140	18/18,2
S28	VASCONE	230	18/22
S31	V44A	232	25,6/30,7
S32	V37	210	25,6/31,3
S33	V44A	232	25,6/30,7
S34	LAGO	6	16/15
S35	LAGO	6	16/15
S36	MARE	38	16/16
S37	VASCONE	158	16/20
S38	VASCONE	148	13,5/17,8
S39	VASCONE	148	13,5/17,8
S45	7C	142	29,3/33,2
S46	VC	360	29,3/36,8
S47	3R	120	29,3/32
S48	1R	88	29,3/30,5
S50	10C	320	29,3/34,5
S51	8C	172	29,3/32,7
S52	cristalli di sale	-	29,3/ND
S53	VASCONE	240	7/9,2
S54	3	72	29,3/29,6

**Tabella 4.1** Isolati batterici durante i campionamenti.

CEPPO	GRAM	CAT	OX	DIMENSIONI ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	ASPETTO COLONIA <sup>b</sup> (colore, forma, margine, superficie, elevazione)
BS1b	-	+	+	b 0,8 $\pm$ 0,1/2,5 $\pm$ 0,2	B/C/I/L/E
BS6	-	+	-	b 0,7 $\pm$ 0,1/2 $\pm$ 0,2	B/I/I/L/P
BS15	-	+	+	b 1 $\pm$ 0,1/3 $\pm$ 0,3	T/C/I/L/P
BS21	+	+	+	b 1 $\pm$ 0,1/4 $\pm$ 0,5	B/C/I/R/P
BS22	-	+	+	b 0,7 $\pm$ 0,1/2 $\pm$ 0,2	G/C/I/R/P
BS23a	-	+	+	b 0,7 $\pm$ 0,1/2,5 $\pm$ 0,2	G/C/I/R/P
BS32	+	+	+	c 0,9 $\pm$ 0,3	R/C/I/L/C
BS34	-	+	+	cb 0,9 $\pm$ 0,2/1,3 $\pm$ 0,3	B/C/I/L/C
BS35	+	+	-	b 0,8 $\pm$ 0,2/2,3 $\pm$ 0,2	A/C/I/L/E
S1	+	+	-	c 1 $\pm$ 0,1	G/C/I/O/C
S3	+	+	+	c 0,9 $\pm$ 0,2	R/C/I/L/C
S5	-	+	+	b 0,8 $\pm$ 0,1/2 $\pm$ 0,2	C/C/I/L/C
S8	+	+	-	b 0,9 $\pm$ 0,1/1,5 $\pm$ 0,4	G/C/I/L/C
S9	-	+	-	c 0,8 $\pm$ 0,2	R/C/I/L/E
S10	-	+	+	b 0,5 $\pm$ 0,1/3,2 $\pm$ 0,3	R/C/I/O/E
S14	-	+	+	b 0,8 $\pm$ 0,1/2 $\pm$ 0,2	C/C/I/L/C
S17	-	+	+	b 0,5 $\pm$ 0,1/1 $\pm$ 0,2	B/C/I/L/C
S19	-	+	+	b 0,5 $\pm$ 0,1/1,1 $\pm$ 0,2	B/C/I/L/C
S23	-	+	-	b 0,8 $\pm$ 0,2/2,5 $\pm$ 0,3	B/C/I/L/C
S27	-	+	-	b 0,8 $\pm$ 0,1/1,1 $\pm$ 0,2	A/I/I/L/C
S28	-	+	-	b 1,2 $\pm$ 0,1/3 $\pm$ 0,2	G/C/I/L/C
S31	-	+	-	b 0,6 $\pm$ 0,2/2 $\pm$ 0,4	C/C/I/L/E
S32	-	+	+	b 0,5 $\pm$ 0,1/1 $\pm$ 0,3	B/C/I/L/C
S33	-	+	+	b 0,9 $\pm$ 0,1/3 $\pm$ 0,5	B/C/I/L/C
S34	-	+	+	b 1 $\pm$ 0,1/1,5 $\pm$ 0,3	B/C/I/L/E
S35	+	+	+	b 1 $\pm$ 0,1/3,5 $\pm$ 0,5	R/C/I/L/E
S36	-	+	-	b 0,8 $\pm$ 0,1/1,1 $\pm$ 0,2	A/I/I/L/C
S37	-	+	-	b 1,2 $\pm$ 0,1/3 $\pm$ 0,2	G/C/I/L/C
S38	-	+	+	b 1 $\pm$ 0,2/3 $\pm$ 0,2	C/C/I/O/C
S39	-	+	+	b 1 $\pm$ 0,1/2,5 $\pm$ 0,1	C/C/I/L/C
S45	-	+	+	b 0,8 $\pm$ 0,1/2 $\pm$ 0,2	C/C/I/L/C
S46	+	+	+	c 0,8 $\pm$ 0,2	A/C/I/O/C
S47	-	+	+	c 0,8 $\pm$ 0,1/2 $\pm$ 0,2	C/C/I/L/C
S48	+	+	+	c 1,2 $\pm$ 0,2	A/C/I/L/C
S50	-	+	+	b 0,4 $\pm$ 0,1/0,8 $\pm$ 0,2	C/C/I/L/E
S51	-	+	+	b 0,8 $\pm$ 0,1/2 $\pm$ 0,2	C/C/I/L/C
S52	-	+	+	b 0,8 $\pm$ 0,2/1,3 $\pm$ 0,3	B/C/I/L/E
S53	-	+	+	b 0,4 $\pm$ 0,1/1,8 $\pm$ 0,2	B/C/I/L/E
S54	-	+	-	b 1,4 $\pm$ 0,2/2 $\pm$ 0,2	C/C/O/L/E

**Tabella 4.2** Legenda: Cat = catalasi; Ox = ossidasi; a= valore medio tra 10 misurazioni (Dev.St. < 10%), b=bacilli, c=cocchi, cb=coccobacilli; b: colore: B= bianco T= trasparente G= giallo R= rosa

C= crema A= arancione; forma: C = circolare I = irregolare; margine: I = intero O= ondulato; superficie: L= liscia R= ruvida O= opaca; elevazione: P= piatta E= elevata C= convessa.



**Figura 4.1** Descrizione delle caratteristiche morfologiche delle colonie batteriche.

#### 4.1.2 Identificazione degli isolati

Le sequenze del gene 16S rDNA degli isolati batterici sono state analizzate ed essi sono stati affiliati ai seguenti generi: *Nesterenkonia*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Yersinia*, *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinicola*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Psychrobacter*, *Microbacterium*, *Ruegeria*, *Marinococcus*, *Planococcus* ed *Idiomarina*. Tutte le sequenze sono state confrontate con quelle depositate in banca dati (NCBI-GenBank), e sono risultati valori di identità (max identity) compresi tra il 96% e il 100%.

Nella tabella 4.3 sono riportati gli accession numbers relativi alle sequenze dei 16S rDNA degli isolati depositate in banca dati NCBI GenBank e le specie con la più elevata percentuale di similarità.

29 ceppi su un totale di 39 (ca. 77%) sono stati identificati a livello di specie e 26 di questi hanno mostrato un valore di identità compreso tra 99 e 100%.

29 ceppi, su un totale di 39, appartengono alla classe  $\gamma$ -*Proteobacteria* e tra questi 14 appartengono all'ordine *Oceanospirillales* (Fig. 4.2). Questo dato conferma i risultati ottenuti da precedenti lavori su saline del Mediterraneo in cui il gruppo dei  $\gamma$ -*Proteobacteria* risultava essere dominante (Benlloch *et al.*, 2002; Pedrós-Alió, 2005; Castritsi-Catharios, 1992; Baati *et al.*, 2008; Tkavc *et al.*, 2011).

Tra i membri di tale classe, i generi *Halomonas* e *Salinivibrio* risultano essere predominanti (11 e 7 isolati rispettivamente). In particolare, all'interno del genere *Halomonas* sono state identificate 7 diverse specie.

I generi moderatamente alofili *Salinivibrio* e *Halomonas* sono in grado di colonizzare sia ambienti marini che iperalini e quindi di tollerare significative variazioni della concentrazione salina (de la Haba *et al.*, 2010).

Sono stati isolati inoltre ceppi appartenenti agli ordini *Enterobacteriales* (generi *Yersinia* ed *Erwinia*) e *Pseudomonadales*. Quest'ultimo comprende, oltre al genere *Pseudomonas*, anche il batterio psicotollerante *Psychrobacter piscatorii* spesso presente in allevamenti ittici e in impianti di trasformazione del pesce (Yumoto *et al.*, 2010).

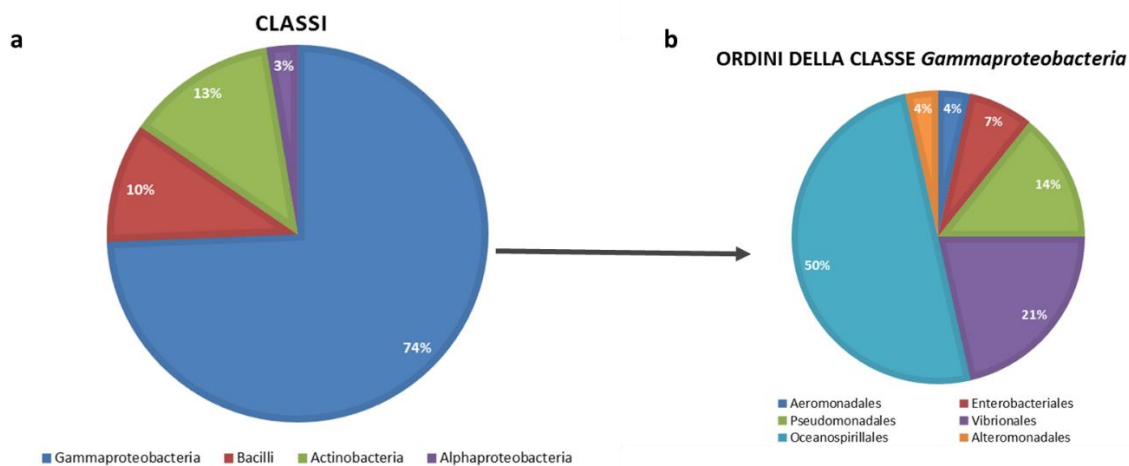
Un'altra specie tipica di ambienti iperalini è *Salinicola halophilus*, isolata anche nelle saline a Cabo de Gata in Spagna (Aguilera, 2007).

Nelle vasche con concentrazioni saline poco superiori a quella del mare (38‰), sono stati isolati anche microrganismi appartenenti a generi diffusi in ambienti marini, come *Aeromonas* sp. (Szczyka *et al.*, 2004).

Sono stati rilevati infine ceppi appartenenti alla classe *Bacilli* (generi *Bacillus*, *Planococcus* e *Marinococcus*), trovati frequentemente in ambienti iperalini (Marquez *et al.*, 1987; Yeon *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2010), e diversi generi appartenenti alla classe *Actinobacteria*.

CEPPO	ACCESSION NUMBER <sup>a</sup>	AFFILIAZIONE	M.I. <sup>b</sup> (%)	Q.C. <sup>c</sup> (%)
BS1b	KP715888	<i>Aeromonas</i> sp.	99	100
BS6	KP715889	<i>Yersinia bercovieri</i>	99	100
BS15	KP756685	<i>Pseudomonas jessenii</i>	98	100
BS21	KP756686	<i>Bacillus</i> sp.	98	100
BS22	KP715890	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	100
BS23a	KP715891	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	100
BS32	KP756687	<i>Arthrobacter</i> sp.	96	99
BS34	KP715892	<i>Psychrobacter piscatorii</i>	99	100
BS35	KP715893	<i>Rhodococcus</i> sp.	99	100
S1	KP715894	<i>Nesterenkonia halotolerans</i>	99	100
S3	KP715895	<i>Arthrobacter</i> sp.	99	100
S5	KP715896	<i>Salinivibrio costicola</i>	99	100
S8	KP715897	<i>Microbacterium oxydans</i>	99	100
S9	KP715898	<i>Erwinia persicina</i>	99	100
S10	KP715899	<i>S. costicola</i> subsp. <i>Alcaliphilus</i>	99	100
S14	KP715900	<i>S. costicola</i>	99	100
S17	KP715901	<i>Halomonas</i> sp.	99	99
S19	KP715902	<i>H. halmophila</i>	100	100
S23	KP715903	<i>Chromohalobacter canadensis</i>	100	100
S27	KP715904	<i>Halomonas indalinina</i>	99	100
S28	KP715905	<i>Salinicola halophilus</i>	99	100
S31	KP715906	<i>H. gomseomensis</i>	99	100
S32	KP715907	<i>H. halmophila</i>	99	100
S33	KP715908	<i>Halomonas</i> sp.	100	100
S34	KP715909	<i>Ruegeria scottomollicae</i>	99	100
S35	KP715910	<i>Bacillus</i> sp.	98	100
S36	KP715911	<i>H. indalinina</i>	99	100
S37	KP715912	<i>S. halophilus</i>	100	100
S38	KP715913	<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i>	98	100
S39	KP715914	<i>H. neptunia</i>	99	100
S45	KP715915	<i>S. costicola</i>	99	100
S46	KP715916	<i>Marinococcus luteus</i>	98	98
S47	KP715917	<i>S. costicola</i>	99	100
S48	KP715918	<i>Planococcus rifietoensis</i>	99	100
S50	KP715919	<i>Idiomarina loihiensis</i>	99	100
S51	KP715920	<i>S. costicola</i>	99	100
S52	KP715921	<i>Halomonas alimentaria</i>	99	100
S53	KP715922	<i>Halomonas venusta</i>	100	99
S54	KP715923	<i>Halomonas smyrnensis</i>	99	100

**Tabella 4.3** Identificazione degli isolati basata sull'analisi del 16S rDNA. **a)** Accession number assegnato da GenBank; **b)** Valore percentuale di “Max Identity”; **c)** Valore percentuale di “Query Coverage”.



**Figura 4.2 a)** Diagramma circolare rappresentante le classi a cui appartengono i ceppi batterici isolati; **b)** Diagramma circolare rappresentante gli ordini della classe *Gammaproteobacteria* a cui appartengono i ceppi batterici isolati.

### 4.1.3 Costruzione dell'albero e filogenesi

#### *Analisi filogenetica sulla totalità degli isolati (Fig. 4.3)*

L'analisi filogenetica basata sull'allineamento delle sequenze 16S rDNA e condotta sulla totalità dei ceppi oggetto di studio ha permesso di ottenere informazioni sulle relazioni esistenti tra le specie isolate. L'albero filogenetico è stato generato in seguito all'allineamento automatico di 40 sequenze utilizzando il programma ClustaX. L'allineamento è stato poi migliorato con il software Mega 6, eliminando le porzioni iniziali e terminali delle sequenze, in modo da comparare frammenti della stessa lunghezza.

L'albero è stato generato utilizzando il metodo Maximum Likelihood ed è stato radicato con una sequenza di 16S rDNA dell'archeobatterio *Thermococcus litoralis*.

La validità dell'inferenza statistica è stata stimata con l'analisi di bootstrap calcolata su 1000 pseudoreplicati.

Tutti gli ordini analizzati clusterizzano in gruppi ben supportati con valori di bootstrap pari o superiori al 91%. In particolare gli ordini *Oceanospirillales*, *Pseudomonadales*, *Alteromonadales*, *Enterobacteriales*, *Aeromonadales* e *Vibrionales* sono chiaramente distinguibili, mentre gli ordini *Rhodobacterales*, *Actinomycetales* e *Bacillales* clusterizzano in posizioni esterne. Il gruppo *Oceanospirillales* è quello che comprende il maggior numero di taxa.

All'interno dell'ordine *Bacillales*, il ceppo BS21 (*Bacillus* sp.) clusterizza con S48 (*Planococcus rifietoensis*), mentre il ceppo S35, pur risultando appartenere al medesimo genere, clusterizza in posizione esterna. Questo potrebbe dipendere dal fatto che *Bacillus* e *Planococcus* sono due generi filogeneticamente molto vicini tra loro come riportato anche in letteratura (Farrow *et al.*, 1992; Claus *et al.*, 1992).

#### ***Analisi filogenetica sull'ordine Oceanospirillales (Fig.4.4)***

L'albero è stato generato sulla base dell'allineamento di 44 sequenze, compresa quella dell'outgroup opportuno (*Marinococcus luteus* dell'ordine *Bacillales*) secondo le modalità precedentemente descritte. Anche in questo caso l'albero è stato costruito con il principio della massima verosimiglianza e la validità dell'inferenza statistica è stata stimata con l'analisi di bootstrap calcolata su 1000 pseudoreplicati. Nell'albero possiamo individuare quattro raggruppamenti (a, b, c, d). I gruppi b e d sono ben supportati, con valori di bootstrap pari al 100%. I gruppi a, b e d comprendono tutte specie appartenenti al genere *Halomonas*. È importante notare che le sequenze con accession number KF359966, NR\_025094 e JF820663 sono state depositate come appartenenti al genere *Kushneria*, poiché esiste una proposta di riclassificazione di alcune specie di *Halomonas* all'interno di questo nuovo genere (Sánchez-Porro *et al.*, 2009). Questo ci fa capire come in realtà si tratti di taxa descritti in tempi relativamente recenti e quindi soggetti tuttora a riclassificazione. Il gruppo c infine comprende i due generi *Chromohalobacter* e *Salinicola*. Si tratta di due generi filogeneticamente vicini come già evidenziato in studi precedenti (de la Haba *et al.*, 2010).

All'interno di tutti i gruppi, le specie erano ben risolte. Ci sono però dei cladi sostenuti da bassi valori di bootstrap (<50%). Questo può essere una conseguenza del gene bersaglio utilizzato. Alcuni autori infatti affermano che il grado di risoluzione ottenuto dall'analisi del 16S rDNA non sia sufficientemente discriminatorio per permettere la risoluzione di relazioni intergeniche a causa del suo lento tasso di evoluzione (Ait Tayeb *et al.*, 2005, Mulet *et al.*, 2009).

La sequenza 16S rDNA del ceppo S17 dimostrava, nel confronto in banca dati NCBI, pari valori di massima identità con varie sequenze di specie non identificate del genere *Halomonas* e con la specie *Halomonas taeanensis*. Dall'analisi filogenetica però non risulterebbe appartenere a tale specie poiché clusterizza in posizione esterna. Per questa ragione possiamo concludere che al momento il ceppo S17 non possa essere affiliato ad una specie nota.

Ci sono ceppi che nell'analisi filogenetica non vengono distinti. I ceppi S19 e S32 ad esempio sono stati affiliati entrambi alla specie *Halomonas halmophila*. Si tratta di ceppi isolati da vasche diverse:

S19 è stato isolato nel mese di maggio 2012 dalla vasca 44B, con salinità pari a 140‰ e il ceppo S32 è stato isolato nel mese di luglio 2012 dalla vasca 37, con salinità pari a 210‰. Lo stesso vale per i ceppi S36 e S27, il primo isolato dal mare limitrofo alle saline nel mese di luglio 2012 e il secondo dalla vasca 44B nel mese di maggio 2012. Questo può essere spiegato dal fatto che le vasche delle saline sono interconnesse e la stessa specie può essere isolata da acque con caratteristiche chimico-fisiche anche molto diverse tra loro. È necessario poi capire se il microrganismo sia in realtà ben adattato alle condizioni chimico-fisiche in cui è stato rilevato oppure se si sia trovato lì accidentalmente, ma non sia in realtà adattato a quelle particolari condizioni. I ceppi S36 e S27 sono stati identificati come *Halomonas indalinina* con valori di identità pari al 99% ma, dal confronto in banca dati, essi risultavano avere lo stesso valore di identità anche con la specie *H. marisflavi*. La prima specie menzionata è stata isolata anche dalle acque delle saline di Cabo de Gata in Spagna (Cabrera *et al.*, 2007) e la seconda dalle acque del mar Giallo in Korea (Yoon *et al.*, 2001). In realtà dal dendrogramma, i due ceppi risulterebbero più vicini alla prima specie.

Il ceppo S33 è stato affiliato alla specie *H. gomseomensis* con un valore di massima identità relativamente alto (99%). Si tratta di una specie isolata dalle acque salate dell'isola Anmyeondo in Korea (Kim *et al.*, 2007). Dall'analisi filogenetica però l'isolato risulta clusterizzare esternamente rispetto a tale specie. Potrebbe essere quindi auspicabile il sequenziamento di ulteriori target genici per confermare o meno la sua affiliazione. Il ceppo S33 è stato affiliato al genere *Halomonas*, con un valore di identità pari al 100%. L'unica specie più vicina dal confronto in banca dati risulta essere *H. gomseomensis*, con un valore di identità pari al 99%. Anche in questo caso però il ceppo in esame risulta clusterizzare esternamente rispetto a tale specie quindi sarebbe auspicabile il sequenziamento di ulteriori target genici.

Il ceppo S39, anche se supportato da un valore di bootstrap di solo il 69%, clusterizza all'interno di un gruppo costituito esclusivamente da *H. neptunia* e dal confronto in banca dati risulta essere assegnato a tale specie con una identità del 99%.

I ceppi S23, S28, S37, S52, S53, S54 infine, clusterizzano, con valori di bootstrap piuttosto alti, con le specie loro affiliate e potrebbero quindi essere identificati come tali.

#### ***Analisi filogenetica sugli altri ordini (Fig. 4.5)***

L'albero è stato generato sulla base dell'allineamento di 88 sequenze, compresa quella dell'outgroup opportuno (archeobatterio *Pyrococcus furiosus*) secondo le modalità precedentemente descritte. Anche in questo caso l'albero è stato costruito con il principio della massima

verosimiglianza e la validità dell'inferenza statistica è stata stimata con l'analisi di bootstrap calcolata su 1000 pseudoreplicati.

Nell'albero possiamo notare che i vari ordini clusterizzano in gruppi ben supportati. I gruppi *Aeromonadales*, *Rhodobacterales*, *Vibrionales* e *Actinomycetales* presentano valori di bootstrap piuttosto elevati (99% e 100%). All'interno di tutti i gruppi, le specie erano ben risolte. Ci sono però dei cladi sostenuti da bassi valori di bootstrap (<50%). Anche in questo caso potrebbe trattarsi di una conseguenza del gene bersaglio utilizzato.

I ceppi BS6, BS34, S1, S3, S8, S9, S34, S48 e S50 clusterizzano, con valori di bootstrap piuttosto elevati, con le specie loro affiliate e potrebbero quindi essere identificati come tali.

I ceppi appartenenti alla specie *Salinivibrio costicola*, risultano clusterizzare tutti nel medesimo raggruppamento ma, dal punto di vista filogenetico non è così chiaro il rapporto tra le varie sottospecie. Infatti il ceppo S14, identificato come *S. costicola* subsp. *costicola*, clusterizza con il ceppo S38, che non risulta identificato come tale sottospecie. Inoltre i ceppi S5, S45 e S51, identificati come *Salinivibrio costicola* con un valore di massima identità pari al 99%, risultano clusterizzare esternamente rispetto agli altri ceppi identificati come appartenenti alla medesima specie. Anche il ceppo S47 risulta clusterizzare esternamente rispetto agli altri. C'è da considerare comunque che i valori di bootstrap all'interno di questo raggruppamento non sono particolarmente alti.

I risultati ottenuti dall'analisi filogenetica, così come la descrizione di diverse sottospecie in letteratura, ci fa capire quanto tale gruppo sia eterogeneo e ulteriori studi tassonomici sarebbero auspicabili per chiarire la loro affiliazione.

Il ceppo BS1b, dal confronto in banca dati, risulta avere un valore di massima identità del 99% con varie specie non identificate del genere *Aeromonas* e con la specie *Aeromonas salmonicida*. Dall'analisi filogenetica però non possiamo dare una affiliazione certa a tale specie.

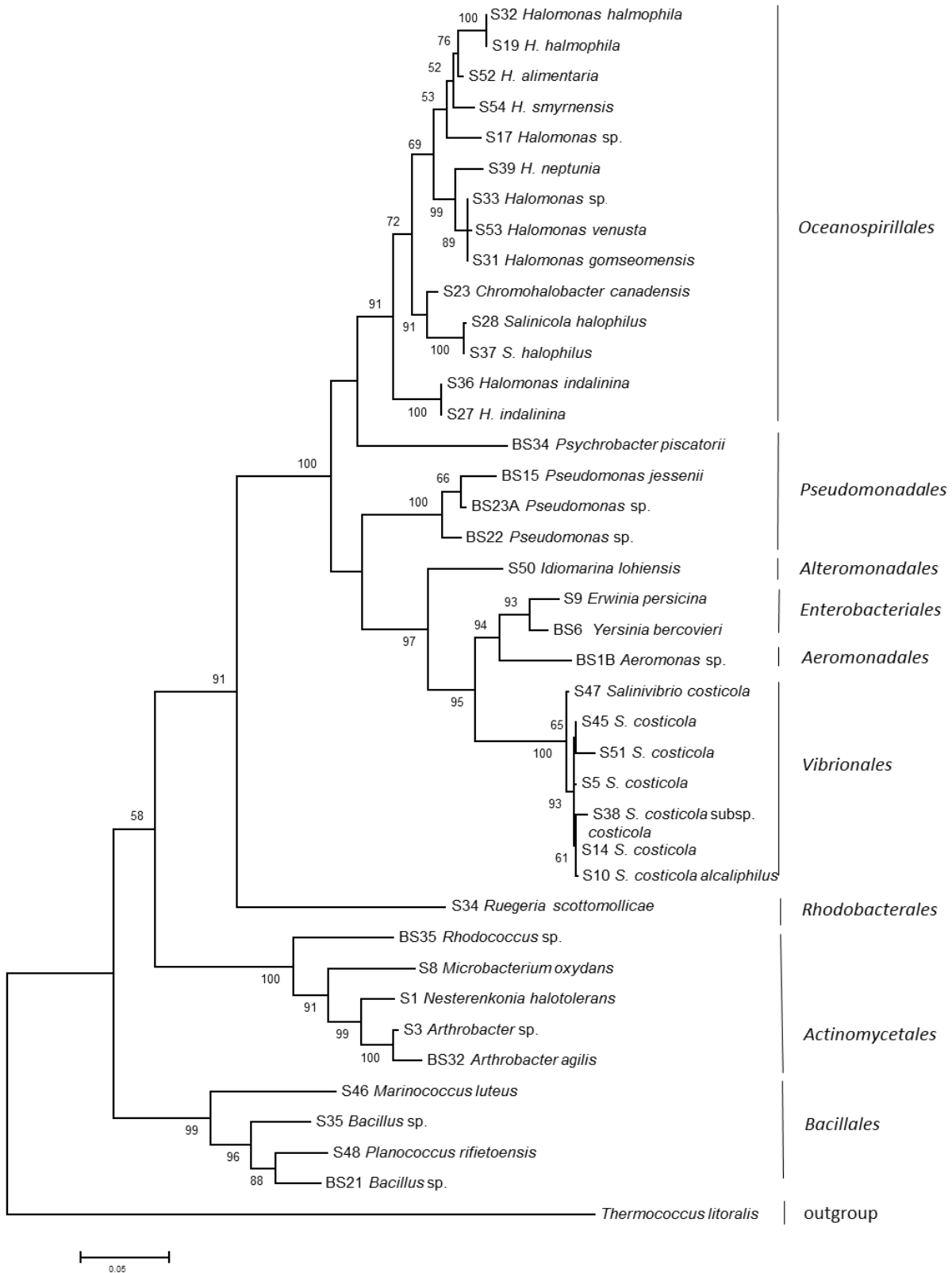
Il ceppo BS22, dal confronto in banca dati, risulta essere affiliato a varie specie del genere *Pseudomonas*, con una similarità del 99%. Quindi anche in questo caso non possiamo dare una affiliazione certa ad alcuna specie nota.

Per i ceppi BS21, BS23a, BS32, BS35, e S35 è stata possibile un'identificazione solo a livello di genere. In modo particolare il ceppo BS32 presenta bassa similarità in GenBank (96%) ed è localizzato in una posizione isolata nel raggruppamento. Quindi potrebbe appartenere ad una specie non ancora descritta.

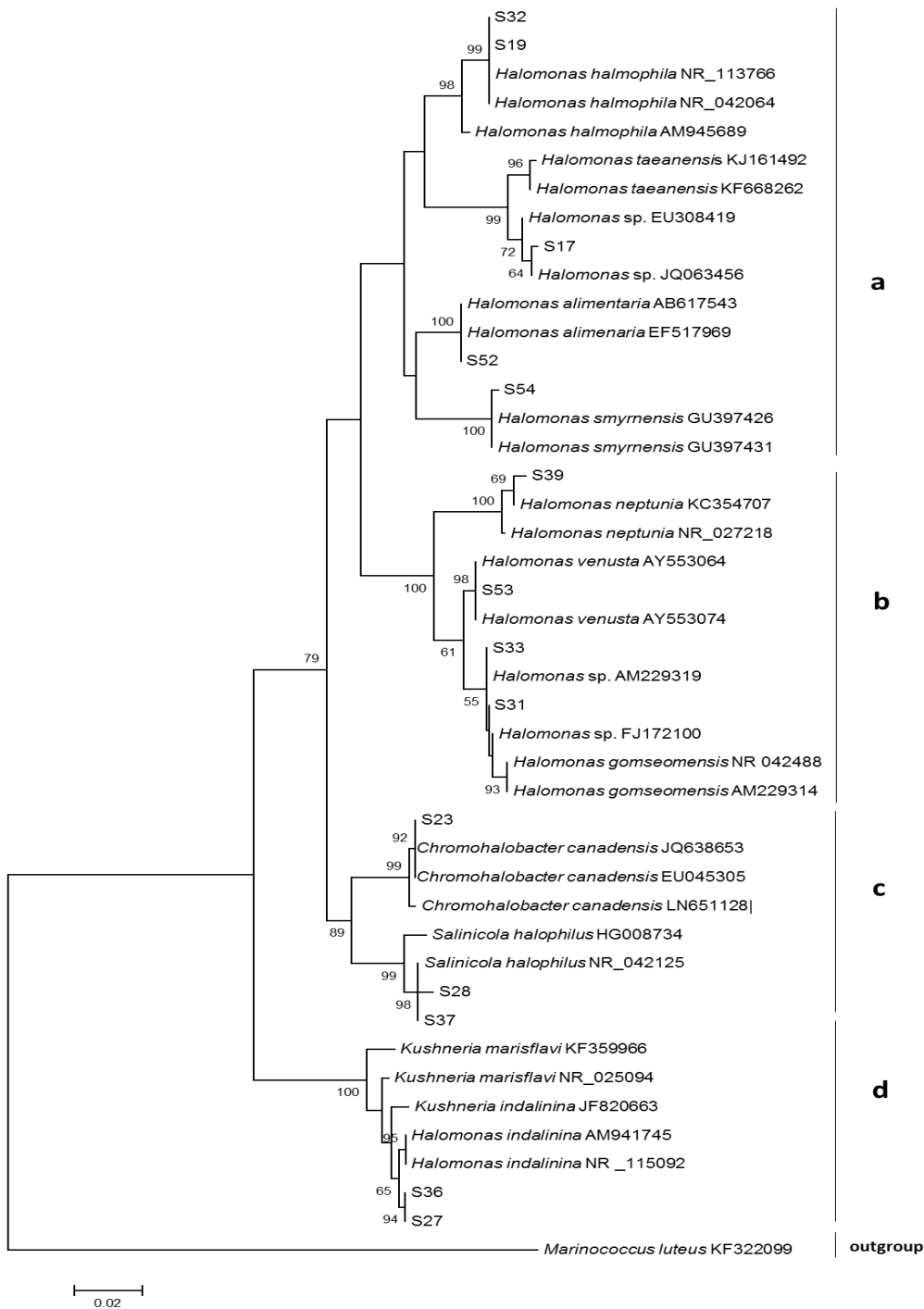
I ceppi BS15 e S46 infine, presentano una similarità in GenBank pari al 98% con le specie *Pseudomonas jessenii* e *Marinococcus luteus* rispettivamente. La prima è una specie isolata anche da altri ambienti marini, come ad esempio dalla superficie di un'alga bruna nelle isole norvegesi

dell'arcipelago Svalbard (Lee *et al.*, 2005). La seconda è stata isolata invece dalle acque del lago salato di Barkol nel nord-ovest della Cina (Wang *et al.*, 2009). Nell'albero filogenetico i due ceppi si trovano su rami piuttosto lunghi, ma la caratterizzazione morfologica e biochimica sembrerebbe confermare l'appartenenza a tali specie. Anche in questo caso quindi sarebbe auspicabile l'amplificazione di ulteriori target genici per confermare o meno i risultati ottenuti.

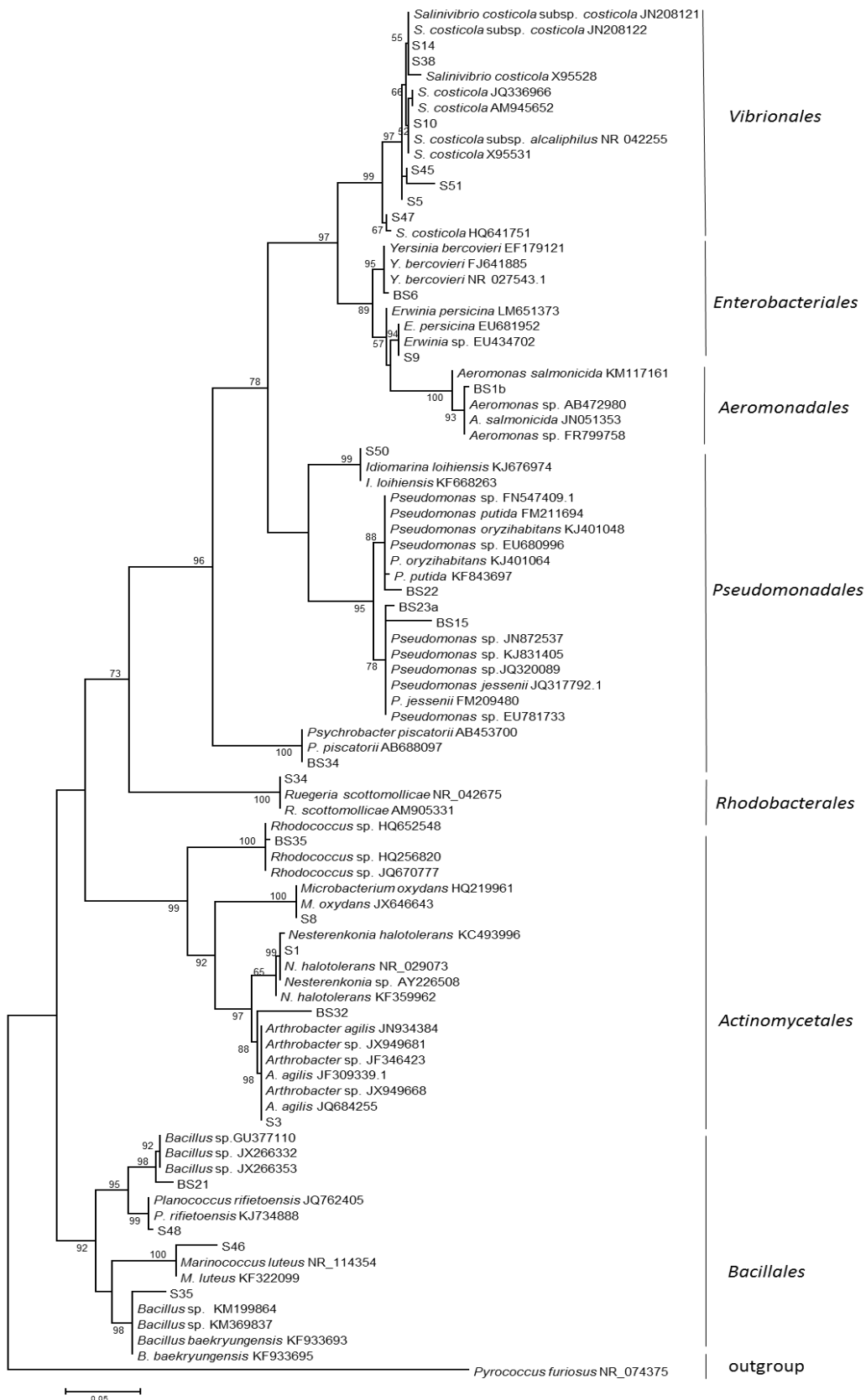
In conclusione, l'analisi filogenetica è stata utile per confermare l'identificazione di alcuni ceppi a livello di specie e per supportare che altri, a causa del fatto che si posizionano su rami lunghi, sono probabilmente riconducibili a specie nuove. Per tutti questi ceppi, l'identificazione è stata possibile solo a livello di genere. In molti casi questo potrebbe essere dovuto allo scarso potere informativo del gene target utilizzato per discernere le relazioni al di sotto del livello di genere.



**Fig. 4.3** Filogenesi molecolare dei ceppi isolati basata sul 16S rDNA. L'albero, basato sull'allineamento di 40 sequenze e 1231 bp, è stato costruito utilizzando il criterio Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati: valori al di sotto del 50% non sono mostrati nell'albero.



**Fig. 4.4** Filogenesi molecolare dell'ordine *Oceanospirillales* basata sul 16S rDNA. L'albero, basato sull'allineamento di 44 sequenze e 1291 bp, è stato costruito utilizzando il criterio Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati: valori al di sotto del 50% non sono mostrati nell'albero.



**Fig. 4.5** Filogenesi molecolare degli altri ordini basata sul 16S rDNA. L'albero, basato sull'allineamento di 88 sequenze e 1251 bp, è stato costruito utilizzando il criterio Maximum

Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati: valori al di sotto del 50% non sono mostrati nell'albero.

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

La tabella 4.4 mostra il range e l'optimum di crescita dei vari isolati a differenti temperature e, per le specie identificate, anche i valori riportati in bibliografia. La figura 4.6 mostra invece i profili di crescita degli isolati alle differenti temperature testate. Il diametro delle colonie in corrispondenza del valore di optimum era in un range compreso tra 8 e 60 mm.

La maggior parte dei ceppi (ca. 54%) mostra un optimum di crescita a 30°C. Inoltre la maggior parte di loro è in grado di crescere in un range di temperatura piuttosto ampio. L'optimum più basso è stato registrato per due ceppi (S8 e S34) ed è pari a 20°C. Nessuno presenta un optimum superiore ai 35°C.

Il 26% circa dei ceppi è in grado di crescere anche a 0°C. Soltanto un ceppo risulta in grado di crescere a 45°C (S54 *Halomonas smyrnensis*).

In letteratura, i microrganismi sono raggruppati sulla base del range e dell'optimum di crescita (Wiegel, 1990). Tradizionalmente gli psicrofili sono definiti come quegli organismi aventi un optimum di crescita a 15°C, un massimo a 20°C ed un minimo a 0°C o sotto (Morita, 1975). I microrganismi abili a crescere a 0°C, ma aventi un optimum pari o superiore ai 20°C sono considerati psicrotrofi (l'optimum non è menzionato) (Morita, 1975; Gounot, 1991; Dalluge *et al.*, 1997) o psicrotolleranti (Gounot, 1991; Rothschild and Mancinelli, 2001; Helmke and Weyland 2004) e quelli in grado di crescere nel range 10-50°C (Russell and Fukunaga, 1990; Wiegel, 1990) e aventi l'optimum tra 30 e 40°C sono invece definiti mesofili.

Le definizioni correnti però non sono sempre soddisfacenti per spiegare la grande variabilità microbica e, a causa della crescente attenzione per gli ambienti estremi e della conseguente scoperta di microrganismi con profili di crescita molto peculiari, la questione è diventata progressivamente più cruciale ed è tuttora ampiamente dibattuta (Gounot, 1991; Rothschild and Mancinelli, 2001; Helmke and Weyland, 2004).

Il 64% ca. dei ceppi studiati ad esempio, pur mostrando l'optimum nel range mesofilo, cresce anche a 0-5°C. Questi organismi possono quindi essere definiti come mesofili-psicrotolleranti (Helmke and Weyland, 2004, Pesciaroli *et al.*, 2012). Si potrebbero infatti considerare come mesofili psicrotolleranti quei batteri abili a crescere a 0-5°C e aventi il loro optimum nel range 25-40°C, anche se le definizioni non sono mai esaustive nel descrivere la vasta variabilità microbica.

Il 3% ca. dei ceppi presenta l'optimum a 20°C e cresce nel range 5-35°C. Questi possono essere definiti psicrotrofi o psicrotolleranti.

Il resto degli isolati (33% ca.) infine cresce a partire da temperature pari o superiori ai 10°C e con un optimum pari a 30-35°C. Per tale ragione possono essere definiti mesofili.

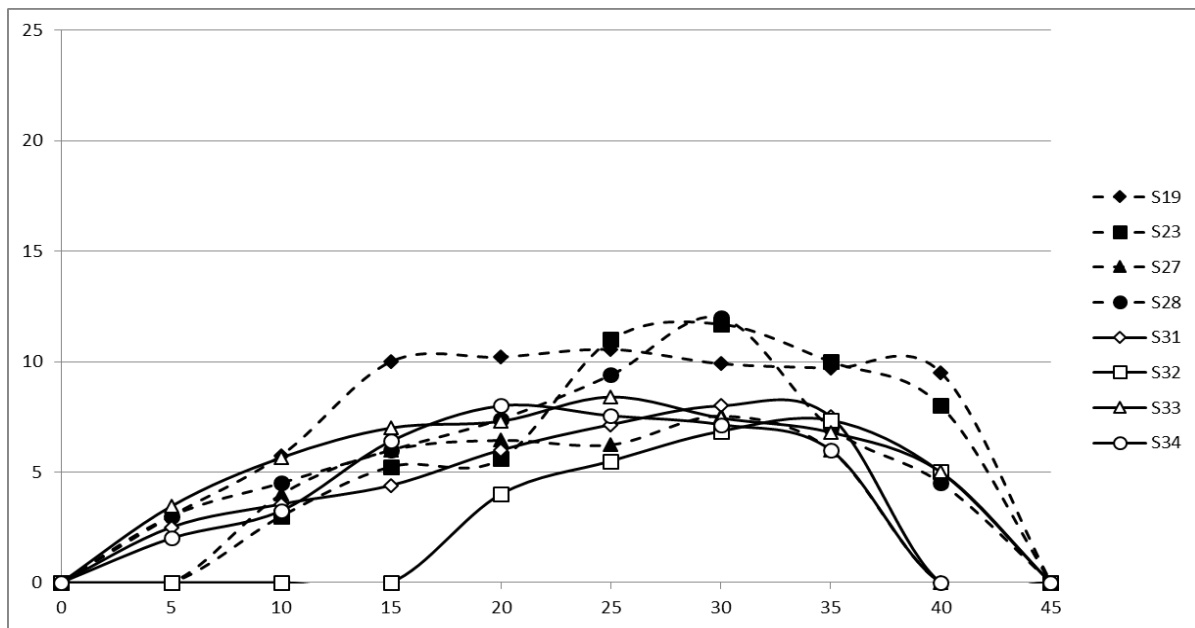
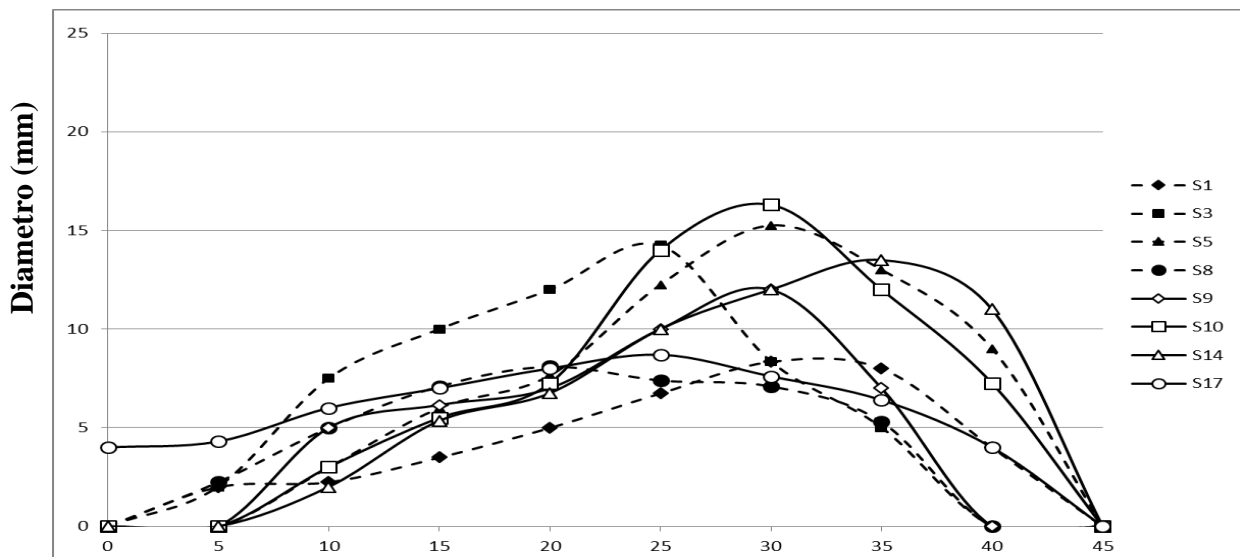
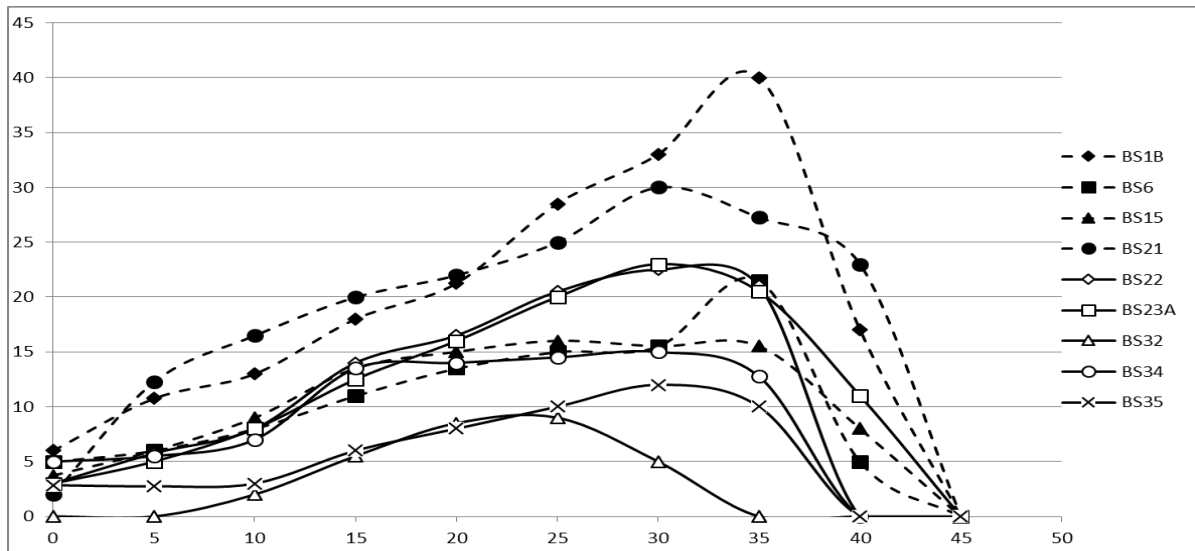
È anche importante sapere qual è l'intervallo di temperatura più ampio entro cui un microrganismo può crescere. Un intervallo più ampio di temperature rende un organismo più versatile di fronte ai cambiamenti ambientali e consente ad esso di utilizzare una gamma più ampia di nicchie ecologiche (Wiegel, 1990). Generalmente organismi in grado di crescere in un'ampia gamma di temperature sono definiti come euritermi.

Quasi tutti i ceppi testati possono essere considerati come euritermi indicando un adattamento alle ampie variazioni di temperatura tipiche di un ambiente come quello delle saline (Gianguzza *et al.*, 2001).

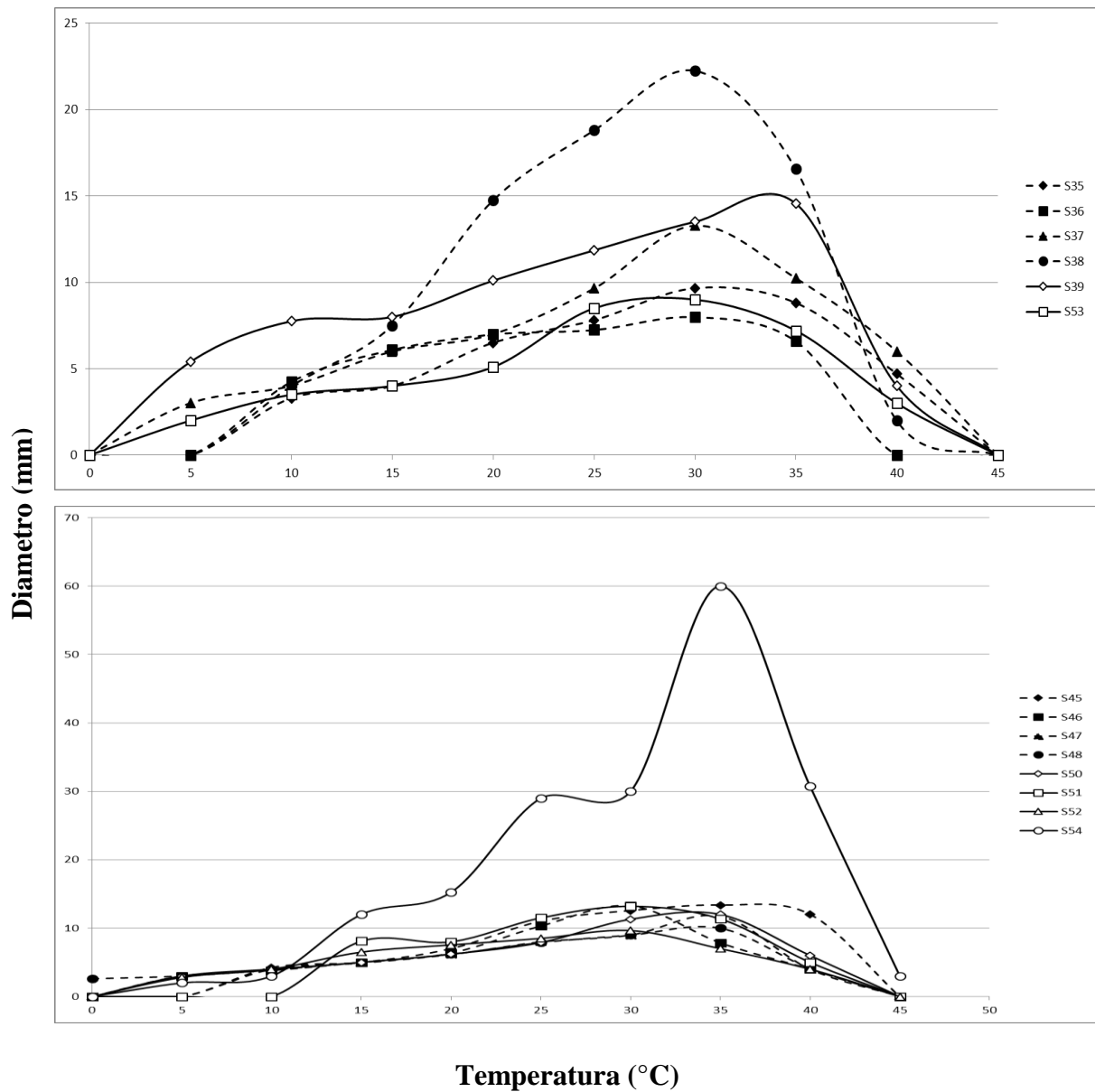
Un'altra questione importante è il profilo della curva di crescita. Normalmente, le curve sono caratterizzate da una forma asimmetrica: la pendenza oltre l'optimum è maggiore rispetto a quella che lo precede. In effetti, un aumento di temperatura di appena 5°C sopra quella ottimale è spesso sufficiente per una forte inibizione della crescita e un ulteriore aumento di 5°C potrebbe portare alla morte. Per contro, sotto l'optimum, i microrganismi possono sopravvivere bene anche con una diminuzione di 20-30°C.

Alcuni ceppi mostrano il classico profilo sopra descritto, mentre altri mostrano curve piane e larghe: presentano quindi una crescita limitata, anche in corrispondenza del valore ottimale, ma entro un range piuttosto ampio. Ad esempio S48 *Planococcus rifietoensis* mostrava crescita tra 0 e 40°C ma il massimo diametro della colonia era soltanto 10 mm ca.

Come già detto i range di crescita alle diverse temperature sono piuttosto ampi. Se comparati con le stesse specie descritte in letteratura, i ceppi testati manifestano un range di crescita spostato verso temperature più basse. Per quanto riguarda gli optima, dall'analisi dei dati disponibili in letteratura sembrerebbe esserci una buona corrispondenza. È importante però notare che studi relativi alla preferenza di temperatura di ceppi batterici non sono molto comuni, soprattutto per specie alofile, pochi dati sono disponibili e spesso, pur essendo riportati i range di crescita, non vengono riportati gli optima.



Temperatura (°C)



**Figura 4.6** Profili di temperatura dei ceppi coltivati su terreno PCA con concentrazione salina pari all'optimum per i ceppi testati, nel range 0-45°C. La crescita è stata misurata come valore medio dell'incremento del diametro della colonia. I dati rappresentano la media di 3 replicati. La Dev. St. è inferiore al 10%. Le piastre sono state monitorate ogni 24 ore, per una durata totale di 30 giorni.

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

La tabella 4.4 mostra il range e l'optimum di crescita dei vari isolati a differenti concentrazioni saline e i valori riportati in bibliografia. Le prove di crescita hanno permesso di evidenziare che il 46% circa dei ceppi presenta un optimum di crescita a 40‰ di NaCl e circa il 23% presenta l'optimum a 80‰. La maggior parte di questi ceppi (ca. 81%) non è in grado di crescere in assenza di NaCl e per il 22% ca. si rileva crescita in presenza di concentrazioni saline pari o superiori a 240‰. Secondo la definizione di Kushner, tali ceppi potrebbero essere definiti alofili moderati, poichè presentano un optimum tra 30‰ e 150‰ (Kushner, 1978). Inoltre per gli alofili moderati il comune denominatore è la necessità di sale per la crescita e l'abilità a tollerare alte concentrazioni saline, seppur la richiesta di NaCl e la tolleranza siano due parametri altamente variabili tra specie differenti (Ventosa *et al.*, 1998).

Come da definizione, "alofilo" è un organismo che ha bisogno di sale per la crescita. Le distinzioni tra le diverse tipologie di alofili (deboli, moderati ed estremi) sono fatte sulla base del loro livello di richiesta di NaCl e tolleranza e sono stati proposti negli anni diversi schemi di classificazione (Vreeland, 1987; Ramos-Cormenzana, 1989; Marquez *et al.*, 1987; Oren, 2000).

Tali distinzioni sono però necessariamente arbitrarie. Ci sono infatti diversi fattori che potrebbero rendere la classificazione arbitraria, ad esempio la richiesta di sale e la tolleranza per molte specie, varia al variare delle condizioni di crescita, come la temperatura o la composizione del terreno.

Ad esempio *Marinococcus halophilus* cresce a concentrazioni saline pari a 0,01 M a 20°C, ma richiede almeno 0,5 M a 25°C (Ventosa *et al.*, 1998).

Infine anche la composizione del terreno di coltura potrebbe determinare in quale misura la crescita sia dipendente o stimolata dal sale (Vreeland and Hochstein, 1992).

Tra i ceppi che presentano l'optimum di crescita a 40‰ di NaCl, ci sono alcuni (BS34, S1, S39, S46 e S48) che riescono a crescere bene anche in assenza di sale. Questi presentano delle curve di crescita particolari. Infatti non possono essere definiti alofili in senso stretto poiché non hanno bisogno di sale per poter crescere, ma allo stesso tempo non possono essere definiti nemmeno alotolleranti poiché non presentano l'optimum di crescita in assenza di NaCl. Potremmo quindi definirli come alofili moderati normotolleranti. In figura 4.8 sono state riportate le curve di crescita di quattro ceppi, BS34, S10, S35 e BS6 che possono essere definiti tipicamente: alofilo moderato normotollerante, alofilo moderato, alotollerante e non alofilo rispettivamente.

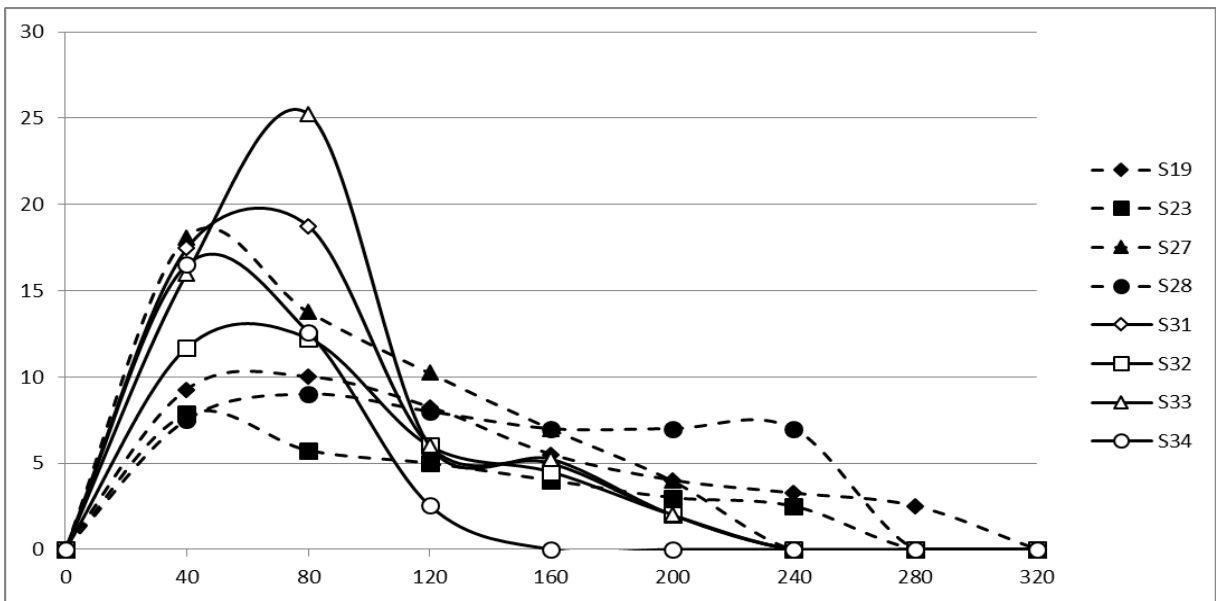
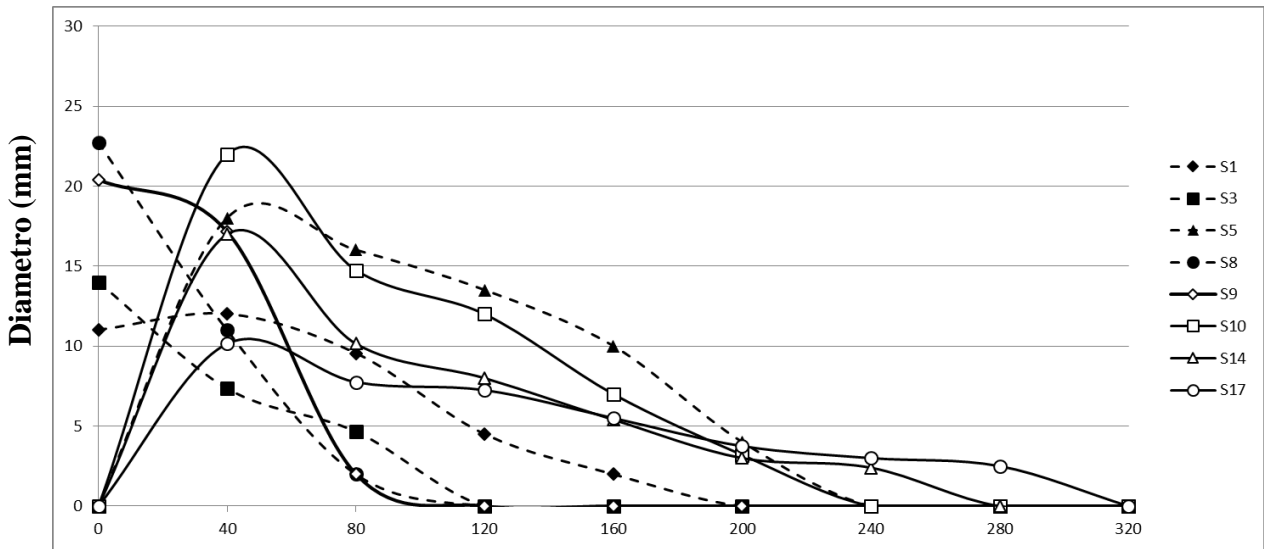
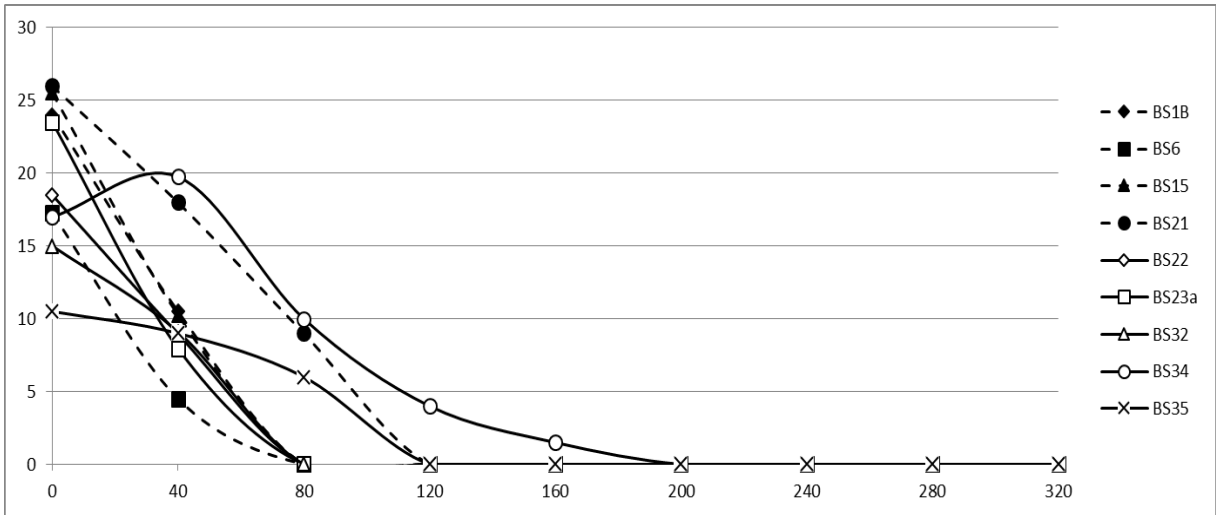
Per quanto riguarda i ceppi BS- (fatta eccezione per BS34) e i ceppi S3, S8, S9 e S35, essi presentano tutti l'optimum a 0‰, ma riescono a tollerare anche concentrazioni saline relativamente alte. Tali microrganismi rientrano quindi nella categoria degli alotolleranti (Kushner, 1978).

La figura 4.7 mostra i profili di crescita degli isolati a differenti salinità. Il diametro delle colonie in corrispondenza del valore di optimum era in un range compreso tra 7 e 35 mm. È interessante notare che, a differenza della temperatura, il profilo delle curve di crescita tende ad avere maggiore pendenza per i valori che precedono il punto di optimum.

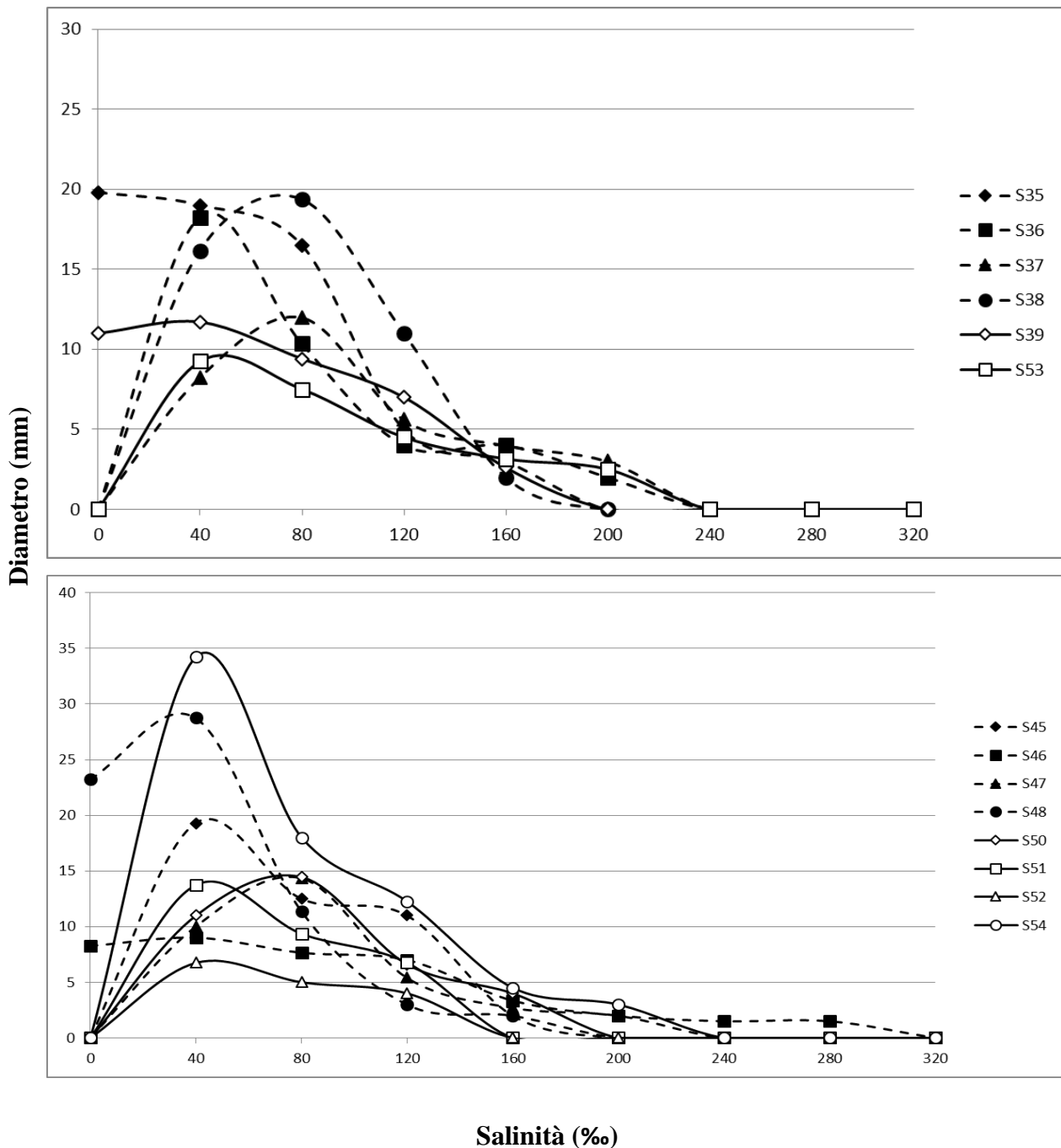
La maggior parte dei ceppi mostra il profilo sopra descritto, mentre altri presentano curve piane e larghe: hanno quindi una crescita limitata, anche in corrispondenza del valore ottimale, ma entro un range di salinità piuttosto ampio. Un esempio particolare è rappresentato dal ceppo S46 *Marinococcus luteus* che mostrava crescita da 0 fino a 280‰, ma il massimo diametro della colonia era soltanto 9 mm ca.

La maggior parte dei ceppi inoltre, può essere considerata eurialina, poiché in grado di crescere in un range piuttosto ampio di salinità. Questo fa sì che l'organismo sia in grado di adattarsi all'elevata variabilità tipica di un ambiente come quello delle saline, in cui la salinità, così come la temperatura, sono soggette a forti fluttuazioni (Oren, 2002c).

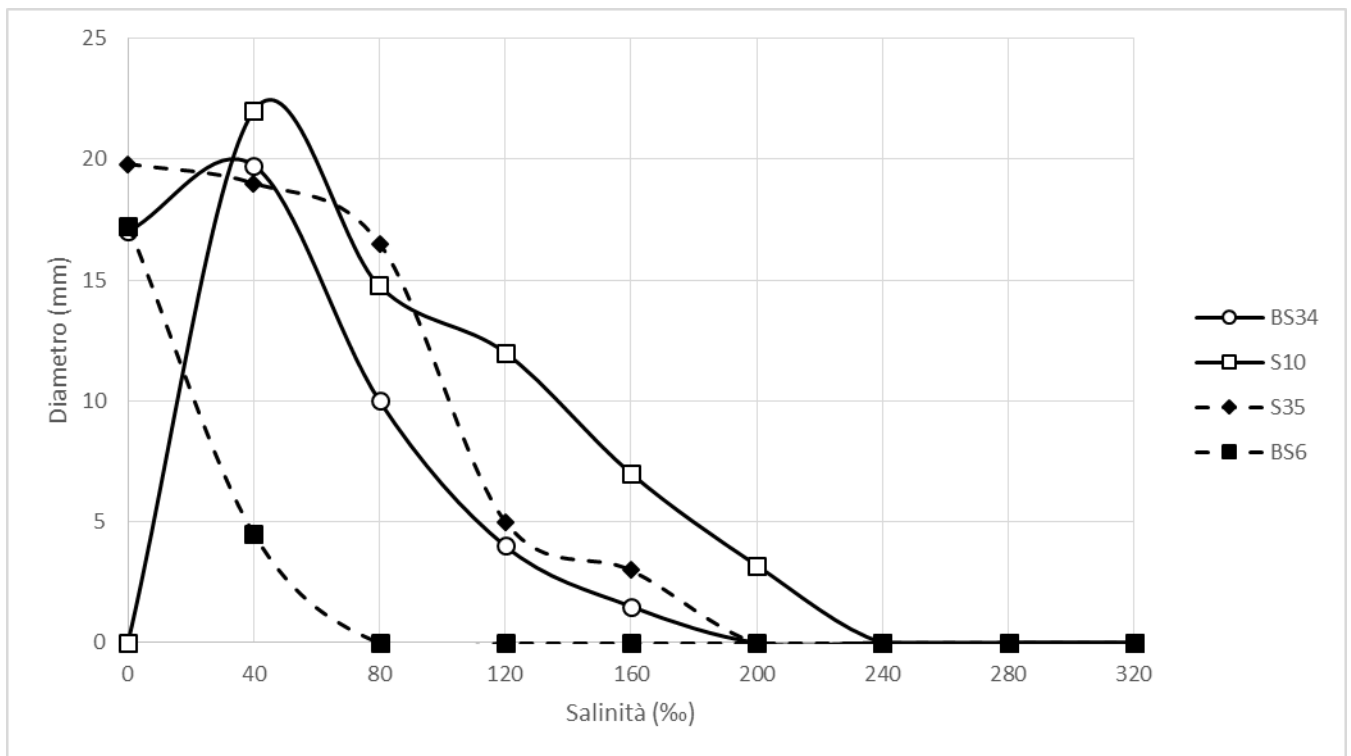
Se comparati però con le stesse specie descritte in letteratura, i ceppi testati manifestano un range di crescita meno ampio. Per quanto riguarda gli optima sembrerebbe esserci una buona corrispondenza con i pochi dati disponibili in bibliografia. Infatti spesso, anche in questo caso, pur essendo riportati i range di crescita, non sempre vengono riportati gli optima.



Salinit  (%o)



**Figura 4.7** Profili di salinità dei ceppi coltivati su terreno PCA nel range 0-320‰. La crescita è stata misurata come valore medio dell'incremento del diametro della colonia. I dati rappresentano la media di 3 replicati. La Dev. St. è inferiore al 10%. Le piastre sono state monitorate ogni 24 ore, per una durata totale di 30 giorni.



**Figura 4.8** Grafico rappresentante varie tipologie caratteristiche di curve di crescita a differenti concentrazioni saline. Il ceppo BS34 può essere definito alofilo moderato normotollerante; il ceppo S10 un alofilo moderato; il ceppo S35 un alotollerante e il ceppo BS6 un non alofilo.

Ceppo	Affiliazione	Ceppi Saline	Letteratura	Ceppi Saline	Letteratura	Citazione
		Range e optimum di temp. (°C)	Range e optimum di temp. (°C)	Range e optimum di Salinità (‰)	Range e optimum di Salinità (‰)	
BS1b	<i>Aeromonas</i> sp.	0-40 (35)		0-40 (0)		
BS6	<i>Yersinia bercovieri</i>	0-40 (35)	ND (25)	0-40 (0)	ND (ND)	Wauters <i>et al.</i> , 1988
BS15	<i>Pseudomonas jessenii</i>	0-40 (25)	4-40 (ND)	0-40 (0)	ND (ND)	Verhille <i>et al.</i> , 1999
BS21	<i>Bacillus</i> sp.	0-40 (30)		0-80 (0)		
BS22	<i>Pseudomonas</i> sp.	0-35 (30)		0-40 (0)		
BS23 A	<i>Pseudomonas</i> sp.	0-40 (30)		0-40 (0)		
BS32	<i>Arthrobacter</i> sp.	5-30 (25)		0-40 (0)		
BS34	<i>Psychrobacter piscatorii</i>	0-35 (30)	0-30 (24-26)	0-160 (40)	0-150 (ND)	Yumoto <i>et al.</i> , 2010
BS35	<i>Rhodococcus</i> sp.	0-35 (30)		0-80 (0)		
S1	<i>Nesterenkonia halotolerans</i>	5-40 (30)	4-40 (ND)	0-160 (40)	0-250 (ND)	Li <i>et al.</i> , 2004
S3	<i>Arthrobacter</i> sp.	5-35 (25)		0-80 (0)		
S5	<i>Salinivibrio costicola</i>	10-40 (30)	5-50 (ND)	40-240 (40)	0-200 (ND)	Huang <i>et al.</i> , 2000
S8	<i>Microbacterium oxydans</i>	5-35 (20)	ND (30)	0-80 (0)	ND	Schumann <i>et al.</i> , 1999
S9	<i>Erwinia persicina</i>	10-35 (30)	6-40 (25-30)	0-80 (0)	ND	Hao <i>et al.</i> , 1990
S10	<i>S.costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i>	10-40 (30)	10-40 (30)	40-200 (40)	20-250 (ND)	Romano <i>et al.</i> , 2005
S14	<i>S. costicola</i>	10-40 (30-35)	5-50 (ND)	40-240 (40)	0-200 (ND)	Huang <i>et al.</i> , 2000
S17	<i>Halomonas</i> sp.	0-40 (25)		40-280 (40)		
S19	<i>Halomonas halmophila</i>	5-40 (25)	20-45 (37)	40-280 (80)	5-200 (ND)	Duckworth <i>et al.</i> , 2000; Bouchotroch <i>et al.</i> , 2001
S23	<i>Chromohalobacter canadensis</i>	10-40 (30)	15-45 (ND)	40-240 (40)	30-250 (80)	Arahal <i>et al.</i> , 2001
S27	<i>Halomonas indalinina</i>	10-35 (30)	15-40 (ND)	40-200 (40)	30-250 (75-100)	Cabrera <i>et al.</i> , 2007
S28	<i>Salinicola halophilus</i>	5-40 (30)	15-45 (35)	40-240 (80)	30-250 (70-100)	de la Haba <i>et al.</i> , 2010
S31	<i>Halomonas gomseomensis</i>	5-35 (30)	5-45 (ND)	40-200 (80)	10-200 (ND)	Kim <i>et al.</i> , 2007
S32	<i>H. halmophila</i>	20-40 (35)	20-45 (37)	40-200 (80)	5-200 (ND)	Duckworth <i>et al.</i> , 2000; Bouchotroch <i>et al.</i> , 2001

Ceppo	Affiliazione	Ceppi Saline	Letteratura	Ceppi Saline	Letteratura	Citazione
		Range e optimum di temp (°C)	Range e optimum di temp (°C)	Range e optimum di Salinità (‰)	Range e optimum di Salinità (‰)	
S33	<i>Halomonas</i> sp.	5-40 (25)		40-200 (80)		
S34	<i>Ruegeria scottomollicae</i>	5-35 (20)	4-40 (ND)	40-120 (40)	10-150 (ND)	Vandecandel aere, 2008
S35	<i>Bacillus</i> sp.	10-40 (30)		0-160 (0)		
S36	<i>H. indalinina</i>	10-35 (30)	15-40 (ND)	40-200 (40)	30-250 (75-100)	Cabrera <i>et al.</i> , 2007
S37	<i>S. halophilus</i>	5-40 (30)	15-45 (35)	40-200 (80)	30-250 (70-100)	de la Haba <i>et al.</i> , 2010
S38	<i>S. costicola</i> subsp. <i>costicola</i>	10-40 (30)	5-45 (37)	40-160 (80)	5-200 (100)	Huang <i>et al.</i> , 2000
S39	<i>Halomonas neptunia</i>	5-40 (35)	0-35 (30)	0-160 (40)	5-270 (20-30)	Kaye <i>et al.</i> , 2004
S45	<i>S. costicola</i>	10-40 (35)	5-50 (ND)	40-160 (40)	0-200 (ND)	Huang <i>et al.</i> , 2000
S46	<i>Marinococcus luteus</i>	5-40 (30)	4-45 (30)	0-280 (40)	10-250 (ND)	Zang <i>et al.</i> , 2007
S47	<i>S. costicola</i>	10-40 (35)	5-50 (ND)	40-200 (80)	0-200 (ND)	Huang <i>et al.</i> , 2000
S48	<i>Planococcus rifietoensis</i>	0-40 (35)	5-42 (37)	0-160 (40)	0-150 (ND)	Romano <i>et al.</i> , 2003
S50	<i>Idiomarina loihiensis</i>	5-40 (35)	4-46 (ND)	40-160 (80)	5-200 (75-100)	Donachie <i>et al.</i> , 2003
S51	<i>S. costicola</i>	15-40 (30)	5-50 (ND)	40-120 (40)	0-200 (ND)	Huang <i>et al.</i> , 2000
S52	<i>Halomonas alimentaria</i>	5-40 (30)	4-45 (30)	40-120 (40)	5-230 (10-130)	Ben Ali Gam <i>et al.</i> , 2007
S53	<i>Halomonas venusta</i>	5-40 (30)	4-45 (28)	40-200 (40)	0-200 (5-70)	Romano <i>et al.</i> , 2006
S54	<i>Halomonas smyrnensis</i>	5-45 (35)	5-40 (ND)	40-200 (40)	30-250 (100)	Poli <i>et al.</i> , 2013

**Tabella 4.4** Range ottenuti dalle prove di crescita a differenti temperature e salinità per i ceppi oggetto di studio e comparazione con i ceppi della stessa specie riportati in letteratura. Tra parentesi sono riportati gli optima di crescita.

#### 4.1.6 Risultati di citometria di flusso

Informazioni più dettagliate sull'omeostasi e sullo stato fisiologico delle cellule batteriche, quando sottoposte a differenti condizioni di salinità, sono state ottenute, per quattro ceppi di interesse (BS6, S17, S19 e S28), da studi di citometria di flusso nel range 0-280‰. Le figure 4.9-4.12 riportano lo stato fisiologico delle cellule alle differenti salinità e tempi di incubazione, in termini di polarizzazione di membrana e rapporto tra cellule vive e morte, come evidenziato dalla differente colorazione con DiOC6 e PI, rispettivamente. Le cellule evidenziate dallo spot celeste, con bassa polarizzazione di membrana, sono in uno stato di latenza (PI e DiOC6 negativi), mentre quelle con membrane ben polarizzate e attive e stabili condizioni fisiologiche (forte DiOC6) sono rappresentate dallo spot verde. Se le cellule sono coltivate in condizioni favorevoli dal punto di vista nutrizionale e dei parametri chimico-fisici, esse passano dalla latenza allo stato attivo iniziando le loro attività metaboliche. Questa situazione, evidenziata con la colorazione con DiOC6, persiste fino a quando vengono mantenute le condizioni favorevoli di crescita. Se le condizioni favorevoli non sono stabili o si esauriscono i nutrienti, le cellule vitali passano ad uno stato latente, perdendo la polarizzazione di membrana, prima di iniziare a morire. Tali cellule perdono quindi la colorazione con DiOC6 ed iniziano ad assumere PI.

Per i ceppi oggetto di studio, sono state registrate differenze notevoli nel corso dell'esperimento, in relazione alla salinità.

Per il ceppo BS6 *Yersinia bercovieri*, i risultati ottenuti dalla citometria di flusso sembrano confermare quelli ottenuti con la prova di crescita su piastra. Non sono però riportati in letteratura dati che possano confermare o meno questi risultati. Esso infatti cresce fino a 40‰ di NaCl con un optimum in assenza di NaCl (Fig. 4.9 a-b). Ad 80‰ la sofferenza delle cellule era evidente già a 24 h di incubazione (Fig. 4.9 c). Il microrganismo quindi può essere definito alotollerante. La specie cui è stato affiliato infatti non è tipica marina, ma è stata isolata soprattutto in ambienti terrestri, ad esempio da suolo o da vegetali (Wauters *et al.*, 1988). Il ceppo BS6 è stato isolato dalle acque del lago, con concentrazione salina pari a 12‰ di NaCl.

Il ceppo S17 *Halomonas* sp. non cresce in assenza di sale e tale caratteristica è considerata il comune denominatore per gli organismi alofili (fig. 4.10 a). A 40‰ e 80‰ sembra crescere bene fino a 48 h di incubazione, senza evidenti differenze nelle due diverse condizioni (fig. 4.10 b-c). La crescita però, si arresta repentinamente a 120‰, mostrando segni di sofferenza già dalle prime ore di incubazione (Fig. 4.10 d-e). Tale situazione non conferma i risultati ottenuti dalla prova su piastra, in cui è stata evidenziata crescita fino a 280‰, seppur limitata a partire dai 200‰ (fig. 4.7). Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che, come già precedentemente detto, la richiesta e la

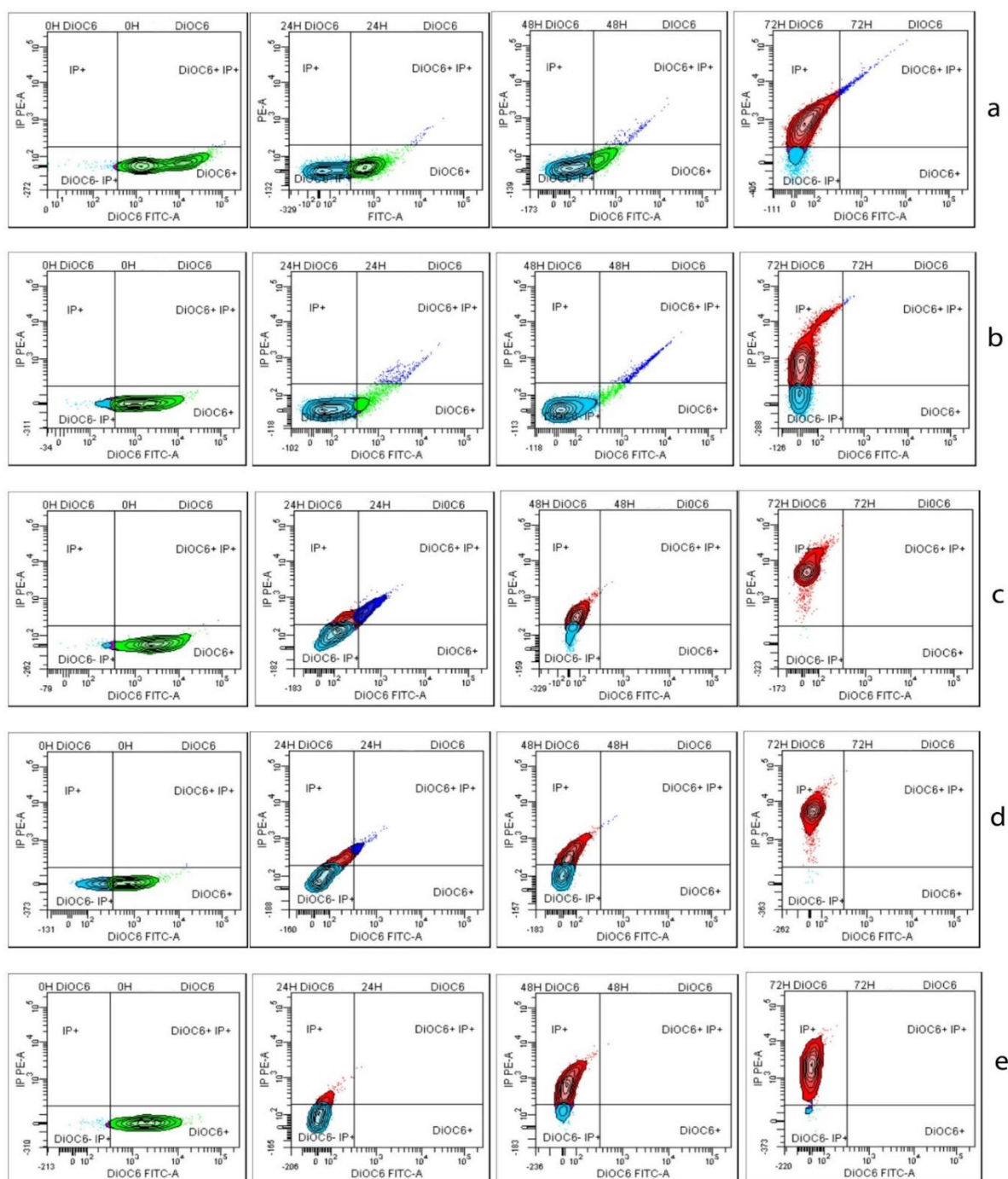
tolleranza di sale per molte specie, varia al variare delle condizioni di crescita, come ad esempio la temperatura o la composizione del terreno (Ventosa *et al.*, 1998; Vreeland and Hochstein, 1992). Inoltre la prova di citometria di flusso è stata condotta in terreno liquido, quindi ci possono essere differenze che influiscono sulla crescita del microrganismo. Una delle più rilevanti è la diversa disponibilità di ossigeno a cui il batterio è sottoposto rispetto ad una crescita su terreno solido in piastra.

Il ceppo S19 *Halomonas halmophila* non manifesta crescita in assenza di sale (fig. 4.11 a) e, a 40‰ e 80‰ cresce bene anche fino a 48 h di incubazione (fig. 4.11 b). La crescita viene manifestata fino a 200‰ anche se, all'aumento progressivo della salinità, è possibile notare un aumento proporzionale della sofferenza cellulare (fig. 4.11 c-e). Anche in questo caso, tale situazione non conferma i risultati ottenuti dalla prova su piastra, in cui è stata evidenziata crescita fino a 280‰.

Il ceppo S28 *Salinicola halophilus* è quello che, tra i ceppi testati, manifesta il più ampio range di crescita alle differenti salinità. Esso non è in grado di crescere in assenza di NaCl (dato non mostrato) e a 48 h di incubazione le cellule crescono in condizioni favorevoli da 40‰ fino a 200‰ (fig. 4.12 a-c). Si manifesta crescita anche a 240‰ e a 280‰, ma alla 48esima h si assiste ad una drastica riduzione delle cellule vive a 240‰ e alla presenza di tutte cellule in stato di latenza a 280‰ (Fig. 4.12 d-e). Questi risultati confermano quelli ottenuti dalla prova di crescita su piastra e i dati riportati in letteratura per tale specie.

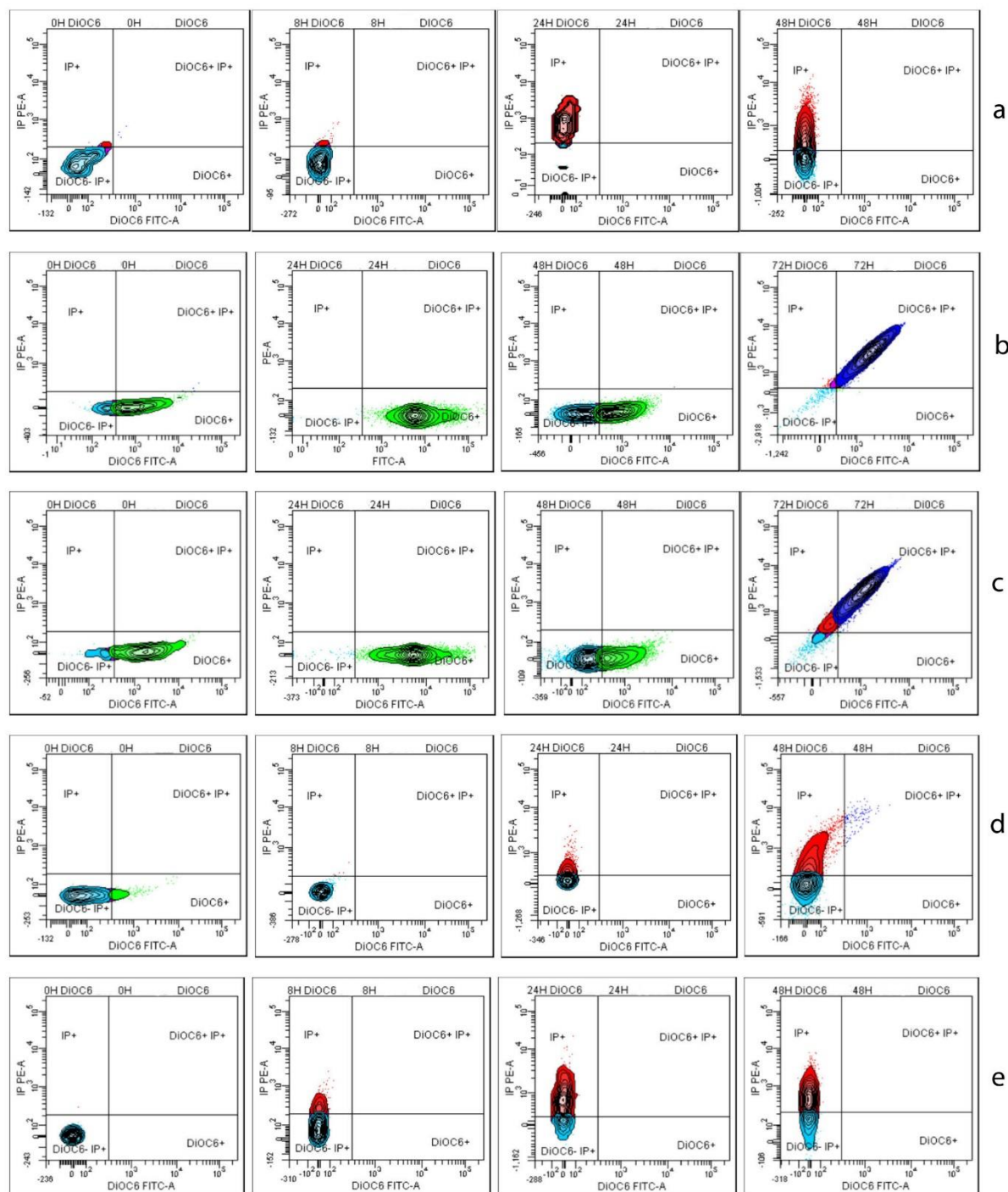
I dati ottenuti per i ceppi S17, S19 e S28 sono supportati dai dati riportati in letteratura. Questi ceppi infatti appartengono a generi (*Salinicola* e *Halomonas*) che comprendono esclusivamente alofili moderati e sono in grado di colonizzare sia ambienti marini che iperalini e quindi di tollerare significative variazioni della concentrazione salina (de la Haba *et al.*, 2010).

## Ceppo BS6



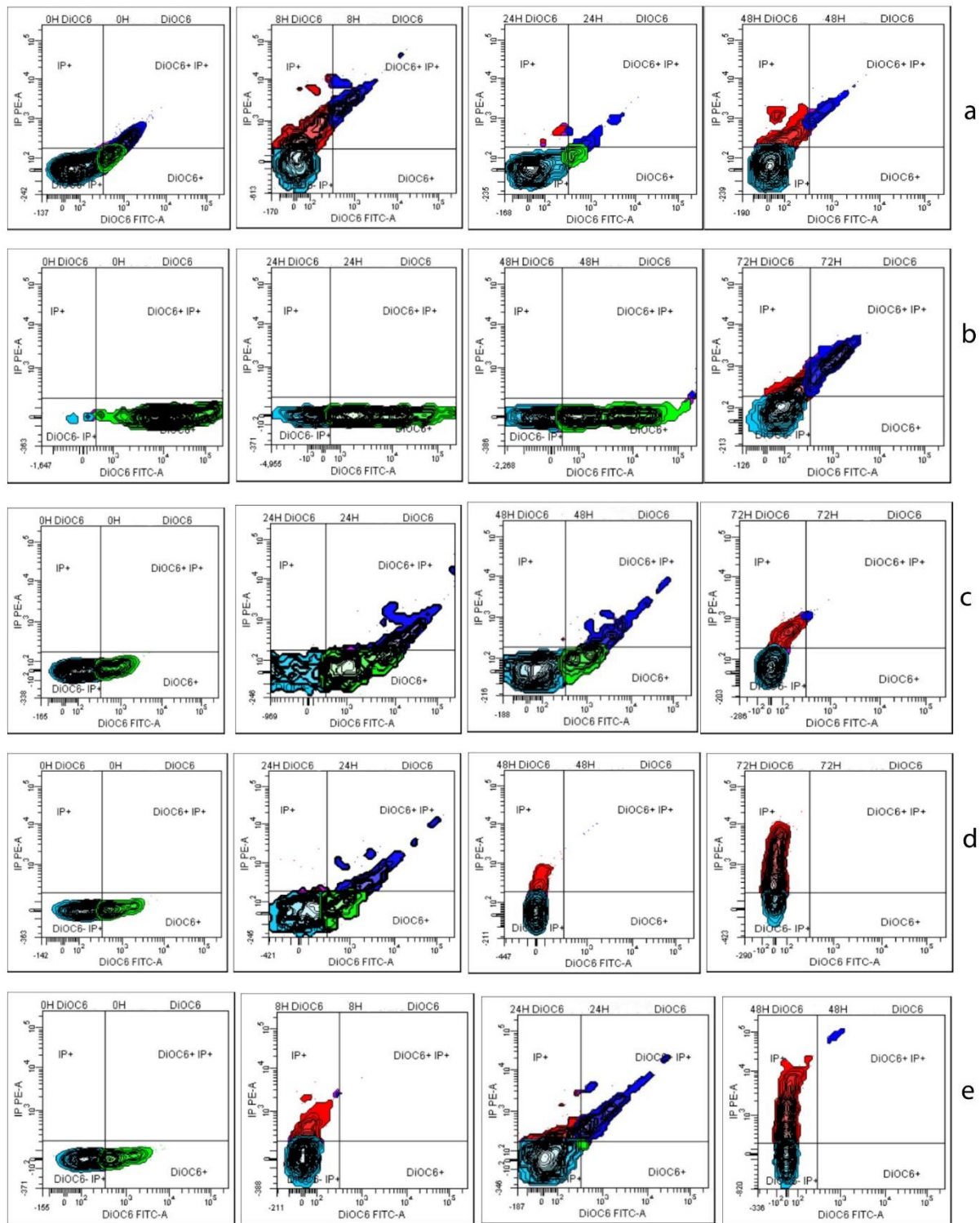
**Fig. 4.9** Citometria di flusso della crescita del ceppo BS6 per 72 h su LB contenente differenti concentrazioni di NaCl 0% (a), 40% (b) 80% (c), 120% (d), 160% (e). Per ciascuna concentrazione i grafici si riferiscono ai tempi: 0, 24, 48, 72 h. I coloranti utilizzati sono DiOC6 e Ioduro di propidio (PI). Sono stati inseriti solo i campioni più rappresentativi.

## Ceppo S17



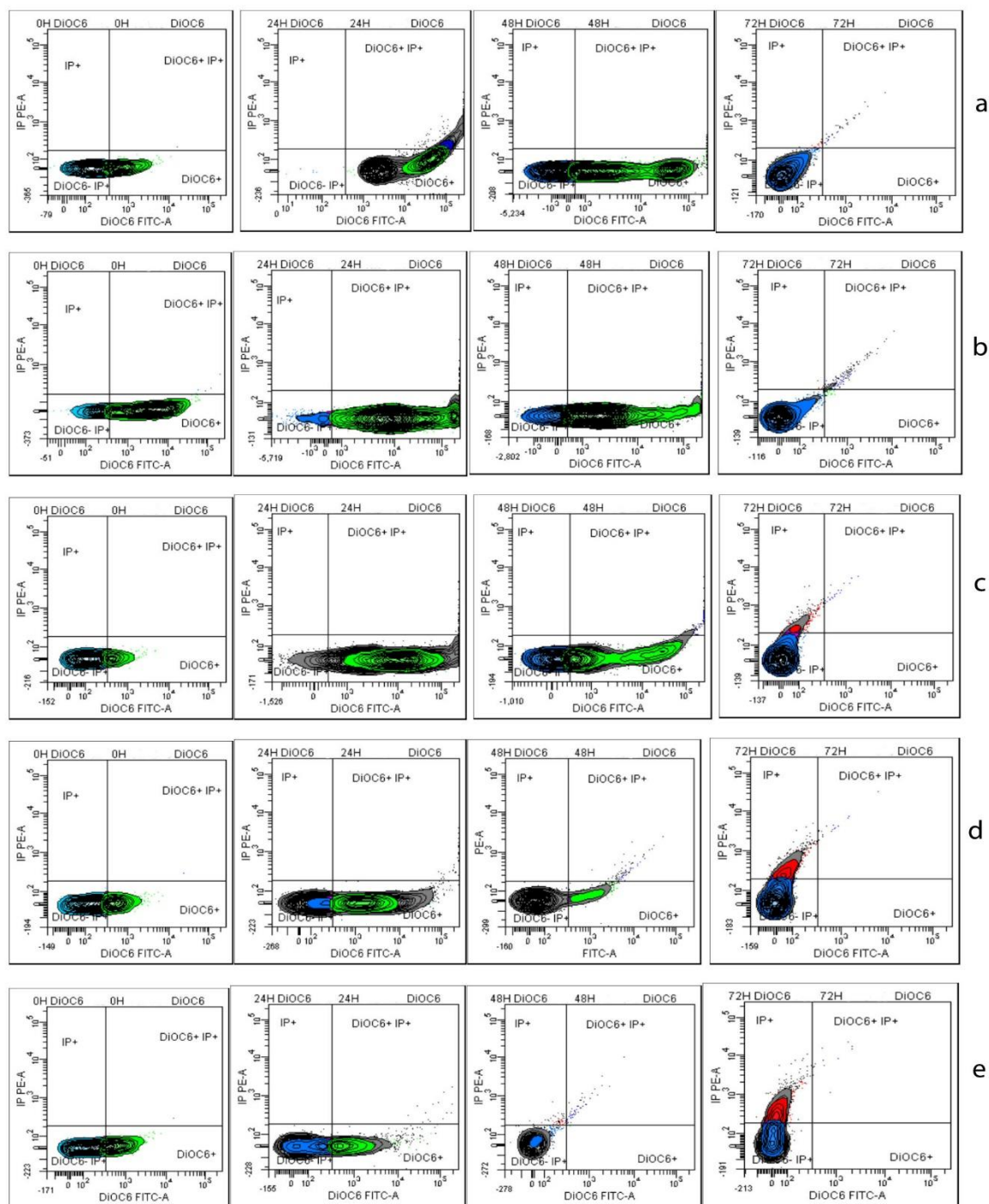
**Fig. 4.10** Citometria di flusso della crescita del ceppo S17 per 72 h su LB contenente differenti concentrazioni di NaCl: (a) 0‰ nei tempi 0, 8, 24, 48 h; (b) 40‰ nei tempi 0, 24, 48, 72 h; (c) 80‰ nei tempi 0, 24, 48, 72 h; (d) 120‰ nei tempi 0, 8, 24, 48 h; (e) 200‰ nei tempi 0, 8, 24, 48 h. I coloranti utilizzati sono DiOC6 e Ioduro di propidio (PI). Sono stati inseriti solo i campioni più rappresentativi.

Ceppo S19



**Fig. 4.11** Citometria di flusso della crescita del ceppo S19 per 72 h su LB contenente differenti concentrazioni di NaCl: (a) 0‰ nei tempi 0, 8, 24, 48 h; (b) 40‰ nei tempi 0, 24, 48, 72 h; (c) 120‰ nei tempi 0, 24, 48, 72 h; (d) 200‰ nei tempi 0, 24, 48, 72 h; (e) 240‰ nei tempi 0, 8, 24, 48 h. I coloranti utilizzati sono DiOC6 e Ioduro di propidio (PI). Sono stati inseriti solo i campioni più rappresentativi.

## Ceppo S28



**Fig. 4.12** Citometria di flusso della crescita del ceppo S28 per 72 h su LB contenente differenti concentrazioni di NaCl: (a) 40% nei tempi 0, 8, 24, 48 h; (b) 120% nei tempi 0, 24, 48, 72 h; (c) 200% nei tempi 0, 24, 48, 72 h; (d) 240% nei tempi 0, 24, 48, 72 h; (e) 280% nei tempi 0, 24, 48, 72 h. I coloranti utilizzati sono DiOC6 e Ioduro di propidio (PI). Sono stati inseriti solo i campioni più rappresentativi.

## 4.2 Studio della comunità batterica delle Saline di Tarquinia

### 4.2.1 Analisi di clusterizzazione dei profili DGGE

L'elaborazione delle immagini DGGE ha permesso l'analisi dei profili di fingerprinting generati dalla separazione delle regioni geniche ipervariabili V3 del 16S rDNA delle comunità batteriche studiate.

Per valutare la struttura di tali comunità e le relazioni tra esse, è stata condotta un'analisi di clusterizzazione usando i software "Quantity-One" versione 4.6.3 e "Phoretix 1D" versione 12.0.

Le analisi di cluster sono state eseguite utilizzando il metodo UPGMA ed i coefficienti di Dice e Pearson.

Il coefficiente di Dice permette di determinare la similarità tra i campioni basandosi sulla presenza/assenza di ciascuna banda nel profilo. Quindi l'informazione ottenuta è correlata alla biodiversità presente nei campioni studiati. Il coefficiente di correlazione di Pearson utilizza le curve densitometriche, prendendo in considerazione anche l'intensità delle bande.

Tali analisi forniscono informazioni importanti, infatti, gli studi ecologici presso gli ambienti delle saline sono stati limitati per lungo tempo all'isolamento e alla descrizione di microrganismi alofili e alotolleranti, con un'attenzione ai loro ranges di sopravvivenza a differenti salinità (Rodríguez-Valera *et al.*, 1981; Galinski *et al.*, 1992; Litchfield *et al.*, 1999), ma ci sono pochi studi riguardanti la quantificazione ed il monitoraggio a medio-lungo termine della biodiversità batterica presente in questi ambienti così peculiari (Elloumi *et al.*, 2009; Boujelben *et al.*, 2012). Comprendere la diversità e la composizione delle comunità batteriche associate a gradienti ambientali è fondamentale infatti per poter formulare previsioni su come le comunità batteriche potrebbero rispondere alle mutevoli condizioni ambientali.

In figura 4.14 sono stati riportati tutti i dendrogrammi relativi ai gel di DGGE eseguiti nel corso di due anni di campionamento (da maggio 2012 ad aprile 2014) basati sul coefficiente di Dice ed il metodo UPGMA e per alcuni mesi sono stati riportati anche i dendrogrammi basati sul coefficiente di Pearson ed il metodo UPGMA (Figg. 4.15-4.17).

È stata eseguita inoltre un'analisi di clusterizzazione per il vascone basata sulla similarità dei profili di DGGE ottenuti nel corso dei primi due anni di campionamento utilizzando il metodo UPGMA ed i coefficienti di Dice e Pearson (Figg. 4.18-4.19).

Dalle analisi dei gel è stato possibile riscontrare una notevole variabilità nei profili di fingerprinting, che non risultano omogenei né nel numero di bande né nella distribuzione di quest'ultime

all'interno del gel. Questo risultato emerge sia dal confronto dei profili di fingerprinting ottenuti per le varie vasche in uno stesso tempo di campionamento, sia nel confronto dei profili ottenuti per una singola vasca nel corso dei vari mesi. In tabella 4.5 sono riportati i valori di salinità (‰) dei siti nel corso di due anni di campionamento ed il numero di bande rilevate nei profili DGGE.

Questi risultati permettono quindi di rilevare una elevata eterogeneità nella composizione delle comunità batteriche sia tra i diversi siti sia all'interno di uno stesso sito nel corso del tempo e di evidenziare quindi l'elevata complessità nella composizione e nelle dinamiche di tali comunità.

La composizione delle comunità batteriche nei vari siti può essere influenzata da vari fattori tra i quali ad esempio la notevole variabilità dei parametri chimico-fisici e biologici rilevata nel corso dell'intera campagna di campionamento. Ci sono però anche altri fattori che potrebbero giocare un ruolo importante in questo senso, tra cui: le condizioni meteorologiche del giorno del prelievo e dei giorni precedenti, l'azionamento o meno delle pompe al fine di modulare la captazione di acqua marina e l'ingresso di essa nelle vasche e la presenza di uccelli nelle vasche campionate. Gli uccelli in modo particolare, con le loro deiezioni e lo spostarsi all'interno delle vasche, potrebbero causare una variazione nella struttura delle comunità batteriche presenti in esse e rappresentano un fattore che potrebbe incidere in maniera rilevante in un ambiente come quello delle Saline di Tarquinia, in cui la presenza degli uccelli non è condizionata dalle attività di raccolta del sale come nel caso di saline ancora attive nella produzione.

Un altro dato interessante che emerge dalle analisi di clusterizzazione è il fatto che, il vascone, che rappresenta il sito in cui si sono registrati sempre i valori di salinità più elevati, non presenta nella maggior parte dei casi un numero di bande inferiore rispetto agli altri siti nel corso dei campionamenti effettuati. Il fatto che non ci sia una riduzione nel numero di bande nei profili DGGE all'aumentare della salinità emerge anche in altri studi sulle comunità batteriche presenti in varie saline (Casamayor *et al.*, 2002; Boujelben *et al.*, 2012). C'è però da sottolineare che il numero di bande in un profilo di fingerprinting ci dà un'informazione della diversità presente in un dato campione, ma non ci dà alcuna informazione riguardo l'abbondanza relativa di una data specie nella comunità considerata. In modo particolare nelle analisi di clusterizzazione, il coefficiente di Pearson si basa sia sulla presenza/assenza delle bande nei profili, sia sull'intensità relativa di ogni singola banda nel profilo e quindi prende in considerazione anche l'abbondanza relativa delle specie in una data comunità.

In diversi studi viene affermato che la biodiversità batterica si riduce all'aumentare della salinità delle vasche e aumenta invece la presenza di membri alofili del dominio Archea (Benlloch *et al.*, 2002; Tsiamis *et al.*, 2008; Baati *et al.*, 2008), in altri si evidenzia invece una rilevante presenza di archea in vasche caratterizzate da salinità prossime a quelle marine e quella di batteri in vasche

servitrici e salanti (caratterizzate da concentrazioni saline prossime alla saturazione) (Sørensen *et al.*, 2005; Antón *et al.*, 2000). Questo conferma la complessità della variazione della struttura delle comunità procariotiche lungo il gradiente di salinità, che porta ad escludere qualsiasi conclusione netta riguardo all'andamento del numero di OTU al variare della salinità in questi ambienti e infine suggeriscono di rivalutare il ruolo dei batteri negli ambienti "estremi".

Un'altra informazione importante che si evince dalle analisi di clusterizzazione è il fatto che, in generale, nel corso dei vari mesi di campionamento, i raggruppamenti all'interno dei dendrogrammi non sembrano correlati alla salinità delle vasche campionate. Questo risultato è stato confermato anche per i mesi estivi, in cui sono state rilevate le differenze più marcate tra i valori di salinità delle varie vasche (fig. 4.21). Questo potrebbe dipendere dal fatto che, nelle Saline di Tarquinia, come è stato rilevato nel corso della campagna di campionamento, le vasche a salinità intermedia ed elevata sono state caratterizzate da elevate variazioni nei valori di salinità. Questo potrebbe determinare, nel tempo, una maggior variabilità nella composizione delle comunità batteriche presenti e quindi anche cambiamenti nelle relazioni di similarità tra i profili delle varie vasche campionate. Nonostante le elevate variazioni, un gradiente di salinità tra le vasche scelte per il campionamento è in genere mantenuto e i profili relativi alla salinità, nel tempo, hanno un andamento piuttosto simile tra le varie vasche campionate come è possibile osservare dal grafico in figura 4.21, nel quale sono riportati i valori di salinità (‰) per ogni singola vasca rilevati in due anni di campionamento.

L'elevata variazione dei valori di salinità rilevati può essere spiegata dal fatto che le Saline di Tarquinia costituiscono un ex impianto di produzione del sale dismesso dal 1997 e, non essendo più produttive, la salinità di ogni vasca non deve essere più mantenuta entro ristretti limiti essenzialmente costanti come nel caso di saline produttive, nelle quali ogni vasca può essere considerata in una condizione di equilibrio e il biota in ognuna di esse è ben adattato per quella particolare salinità (Pedrós-Alió *et al.*, 2000).

Ci sono dei casi in cui, dall'analisi di clusterizzazione basata sul coefficiente di Dice, siti di campionamento con valori di salinità molto diversi tra loro clusterizzano insieme perché si sono rilevate bande comuni, ma all'interno del dendrogramma basato sul coefficiente di Pearson questo non è confermato. Quindi benchè ci siano bande comuni tra i profili, le varie specie in condizioni diverse hanno diverse abbondanze e proliferano anche in modo diverso. Un esempio è dato dai siti di campionamento lago e V44b per il mese di novembre 2013 (fig. 4.17).

Dai dendrogrammi ottenuti con il coefficiente di Dice, nel corso dei mesi, le vasche che clusterizzano spesso nel medesimo raggruppamento sono le vasche 1 e 5 e le vasche 19 e 21, salvo alcune eccezioni. Le vasche 1 e 5 e 19 e 21 sono tra loro piuttosto vicine e nel corso della campagna

di campionamento hanno presentato sempre valori analoghi o piuttosto simili di salinità come si può notare dal grafico in figura 4.20 a, b.

Dai dendrogrammi ottenuti con il coefficiente di Pearson anche le vasche 44 a e 44 b clusterizzano spesso nel medesimo raggruppamento (Figg. 4.15-4.17). Anche in questo caso si tratta di vasche vicine tra loro. Tali vasche inoltre sono state caratterizzate da elevate fluttuazioni nei valori di salinità rilevati nel corso della campagna di campionamento e ciò potrebbe aver determinato la presenza di comunità batteriche adattate a tali condizioni e quindi più simili tra loro nella composizione piuttosto che le comunità presenti negli altri siti di campionamento (fig. 4.20 c).

Un altro dato interessante che emerge dalle analisi di clusterizzazione è il fatto che il vascone, che ha presentato sempre il valore più alto di salinità nel corso dei campionamenti, nella maggior parte dei casi clusterizza in posizione esterna rispetto agli altri campioni indicando quindi la presenza di una comunità batterica caratteristica, che non presenta similarità con quelle presenti negli altri siti. In modo particolare questo dato, per i mesi di maggio 2012 e agosto 2012, è confermato sia dai dendrogrammi basati sul coefficiente di Dice, sia da quelli basati sul coefficiente di Pearson. Il mese di agosto 2012 è stato quello in cui il vascone ha registrato il valore di salinità più elevato rilevato nel corso della campagna di campionamento (400‰). Quindi tale condizione potrebbe spiegare la presenza di una comunità batterica dalla composizione molto differente rispetto alle altre.

Il mese in cui si è registrato il minor numero di bande per i vari profili è stato aprile 2014. Questo dato però sembrerebbe non essere correlato ai dati chimico-fisici e biologici rilevati.

La vasca che nel corso dei due anni di campionamento ha registrato il minor numero di bande è stata la vasca 44B, con un minimo di due bande nei mesi di gennaio 2013 e aprile 2014 e un massimo di 10 bande nei mesi di febbraio e aprile 2013. Questo potrebbe dipendere dal fatto che la vasca 44B è stata caratterizzata da una elevata variabilità dal punto di vista della salinità nel corso della campagna di campionamento. Si passa infatti da un minimo di 44‰ rilevato nel mese di marzo 2013 ad un massimo di 340‰ nel mese di luglio 2012. Al contrario, la vasca che ha registrato il maggior numero di bande è stata la vasca 5, con un minimo di 4 bande nel mese di aprile 2014 e un massimo di 19 bande nel mese di gennaio 2013. La vasca 5, insieme al mare, al lago e alla vasca 1, è caratterizzata da valori di salinità (intorno ai 38‰) che si sono mantenuti sempre pressoché costanti nel corso della campagna di campionamento.

Dall'analisi di clusterizzazione per il vascone basata sulla similarità dei profili di DGGE ottenuti nel corso dei primi due anni di campionamento, emerge che i profili ottenuti per lo stesso mese nei due anni non clusterizzano all'interno dello stesso raggruppamento salvo rare eccezioni (gennaio e

maggio nel dendrogramma basato sul coefficiente di Dice e ottobre in quello basato sul coefficiente di Pearson).

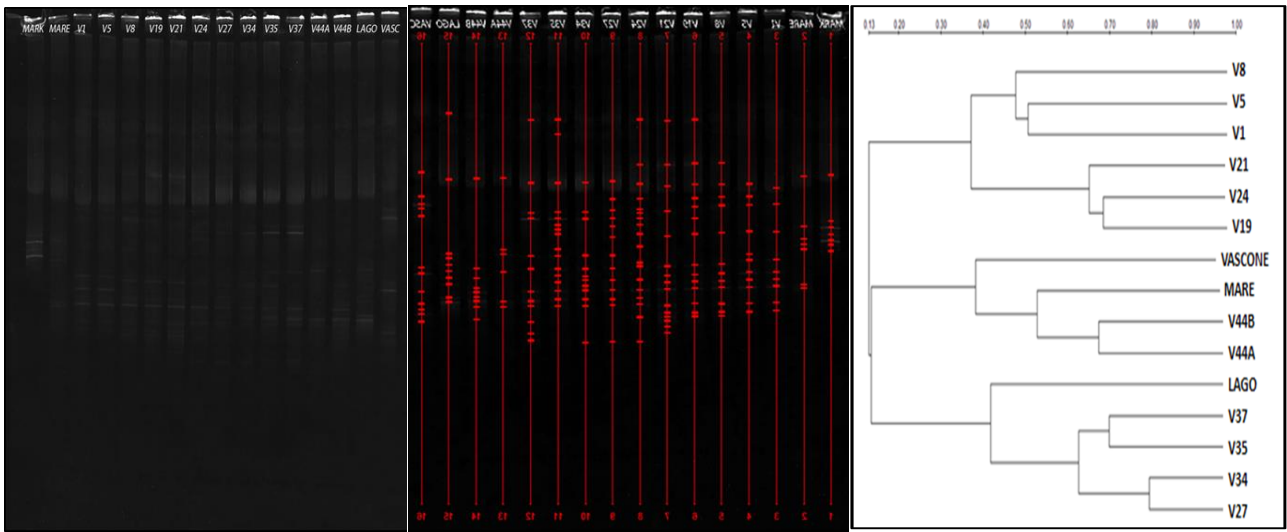
In generale inoltre, non emerge una suddivisione dei raggruppamenti in relazione alle quattro stagioni.

Dall'analisi del dendrogramma basato sul coefficiente di Dice emerge che i profili più simili tra loro sono quelli ottenuti nei mesi di aprile e maggio 2013, indicando quindi una scarsa variazione nella composizione della comunità batterica presente nel vascone tra questi due mesi. Il profilo ottenuto nel mese di settembre 2012, essendo caratterizzato da una sola banda, clusterizza in posizione esterna rispetto a tutti gli altri.

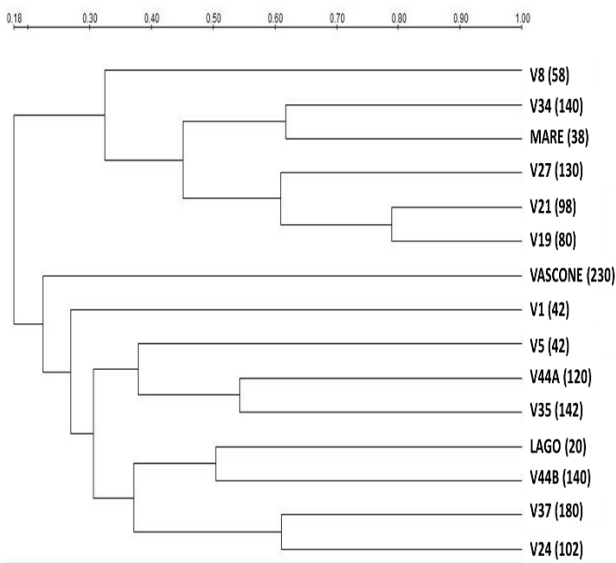
Dall'analisi del dendrogramma basato sul coefficiente di Pearson invece, i profili più simili tra loro risultano essere quelli ottenuti nei mesi di ottobre e novembre 2012. I profili ottenuti nei mesi di maggio e agosto 2012 invece clusterizzano in posizioni esterne nell'albero, indicando quindi una scarsa similarità della comunità batterica rilevata rispetto agli altri mesi di campionamento.

	MARE		V1		V5		V8		V19		V21		V24		V27		V34		V35		V37		V44A		V44B		VASCONE		LAGO	
	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>	S. (%) <sup>a</sup>	Rich. <sup>b</sup>
mag-12	38	7	42	4	42	8	58	3	80	11	98	14	102	13	130	8	140	11	142	5	180	8	120	5	140	8	230	8	20	11
giu-12	38	12	41	15	42	6	57	3	81	6	95	2	122	14	148	13	200	11	214	2	304	2	150	9	210	4	340	6	20	9
lug-12	38	12	40	9	42	11	48	9	62	13	66	15	98	14	172	16	184	14	276	12	210	10	232	9	340	9	360	4	10	12
ago-12	38	6	38	6	46	9	50	4	58	8	78	5	102	3	186	10	190	11	238	2	316	11	238	7	320	8	400	4	8	9
set-12	38	8	38	12	40	14	44	7	74	2	84	18	140	3	174	13	200	15	256	5	272	11	178	13	304	7	296	1	16	7
ott-12	38	15	40	7	40	11	54	11	74	10	108	12	144	13	174	11	178	11	174	9	180	5	158	6	260	5	276	3	10	6
nov-12	40	7	34	12	42	7	48	13	54	15	66	15	80	13	88	10	98	16	98	7	84	16	84	14	134	3	158	6	6	11
dic-12	38	10	28	14	30	16	34	10	46	16	50	5	72	7	80	7	74	4	74	5	58	6	62	8	100	8	186	9	4	6
gen-13	38	13	30	16	30	19	34	14	42	17	54	16	58	10	62	6	62	8	52	7	42	9	44	5	74	2	150	4	10	3
feb-13	38	3	24	11	24	10	28	8	34	7	38	9	48	6	48	8	40	12	40	11	35	7	38	8	60	10	140	9	6	9
mar-13	38	9	20	12	20	10	24	13	28	10	32	7	38	8	38	7	36	6	36	8	38	9	36	8	44	9	120	11	6	10
apr-13	38	11	24	10	24	18	28	8	34	9	36	7	42	10	44	3	44	3	44	4	44	10	54	5	82	10	148	13	6	12
mag-13	38	7	26	9	26	11	34	12	46	14	46	15	50	18	56	13	58	12	58	16	76	12	140	6	144	9	184	12	6	10
giu-13	38	7	38	9	38	13	42	15	48	14	42	13	70	11	72	18	82	14	84	11	146	11	-	-	-	-	208	12	8	14
lug-13	38	8	40	9	42	10	46	2	52	11	54	6	78	11	94	5	112	5	154	10	248	6	60	7	172	5	272	4	8	6
ago-13	38	3	40	4	44	7	44	10	54	6	56	6	78	8	112	6	124	4	180	4	170	3	134	5	-	-	284	5	10	9
set-13	38	7	40	8	48	10	50	7	66	9	68	6	106	4	140	9	166	3	-	-	336	11	-	-	264	5	366	7	8	9
ott-13	38	8	40	8	42	8	48	8	62	7	66	7	92	5	114	9	124	7	142	7	168	7	104	7	154	10	238	7	8	4
nov-13	40	8	42	10	44	11	50	11	72	10	68	8	86	8	104	13	102	10	104	13	110	2	70	7	122	5	240	6	8	6
dic-13	40	7	42	6	42	8	54	6	60	6	70	7	84	5	108	10	104	11	104	5	100	4	86	7	132	4	274	6	8	5
gen-14	38	6	42	6	42	8	50	6	52	6	66	6	78	4	82	2	80	3	80	5	68	3	48	2	80	4	132	3	10	5
feb-14	38	6	40	7	40	10	38	6	38	5	40	6	54	5	54	4	48	2	48	2	40	4	38	5	50	5	104	5	8	8
mar-14	40	6	32	8	32	8	36	9	40	8	42	7	54	9	56	6	50	8	50	6	46	6	46	3	54	6	114	6	10	5
apr-14	38	3	34	3	34	4	38	4	46	3	46	3	58	5	62	3	62	2	64	3	66	2	64	2	100	2	154	4	10	2
mag-14	40	7	40	10	40	9	44	9	52	5	56	5	72	6	76	11	88	2	94	7	120	6	116	3	124	4	220	10	10	6

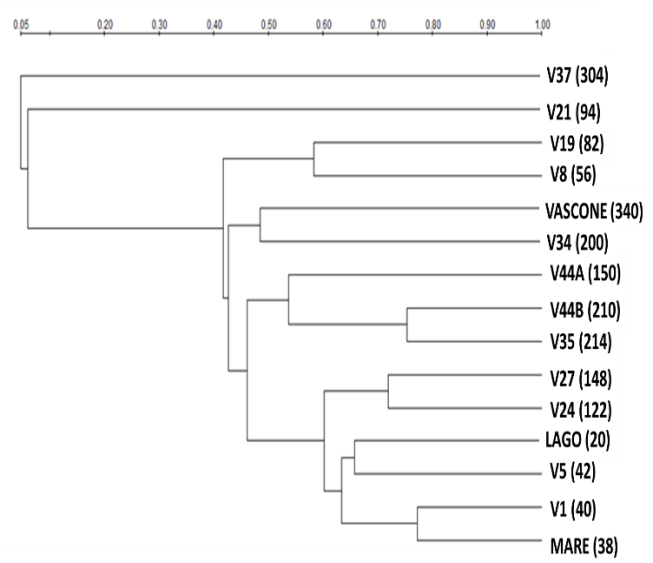
**Tabella 4.5 a)** Valori di salinità (‰) rilevati per ogni sito nel corso di 2 anni di campionamento; **b)** Numero di bande rilevate nei profili DGGE. I valori non determinati sono in corrispondenza di mesi in cui le vasche erano asciutte.



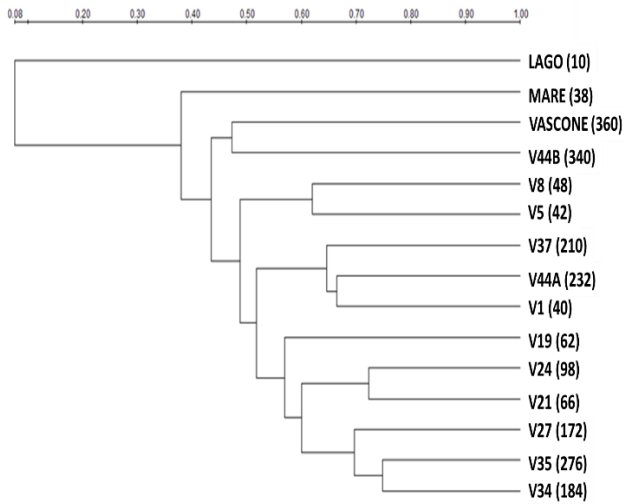
**Fig 4.13** Analisi del Gel di DGGE relativo al mese di maggio 2013. Dendrogramma basato sul coefficiente di Dice.



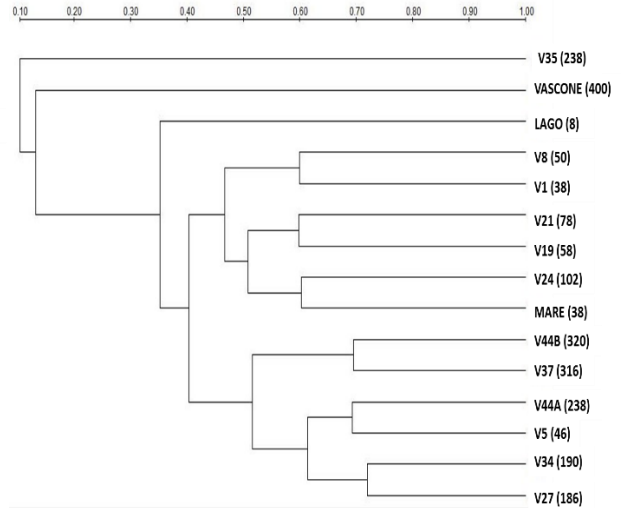
**Maggio 2012**



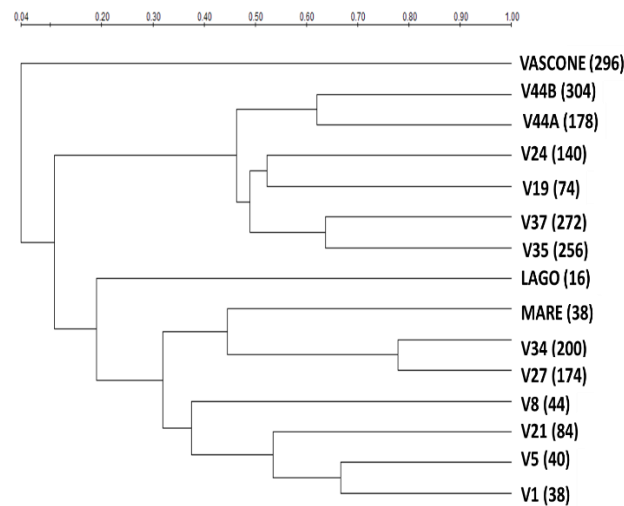
**Giugno 2012**



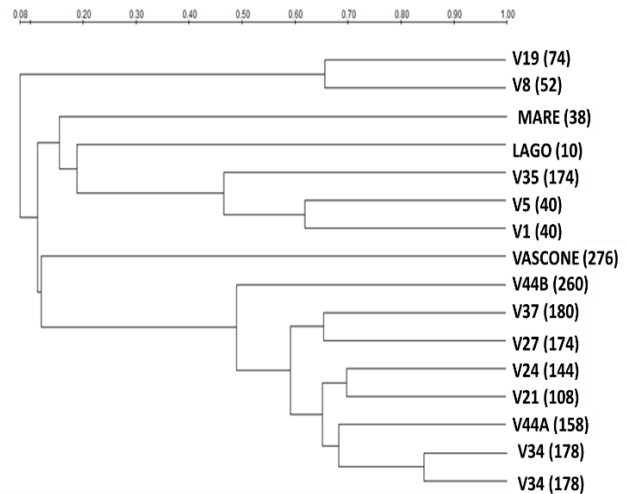
**Luglio 2012**



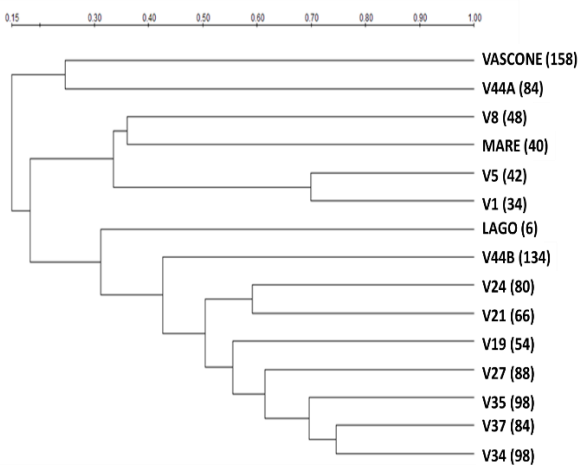
**Agosto 2012**



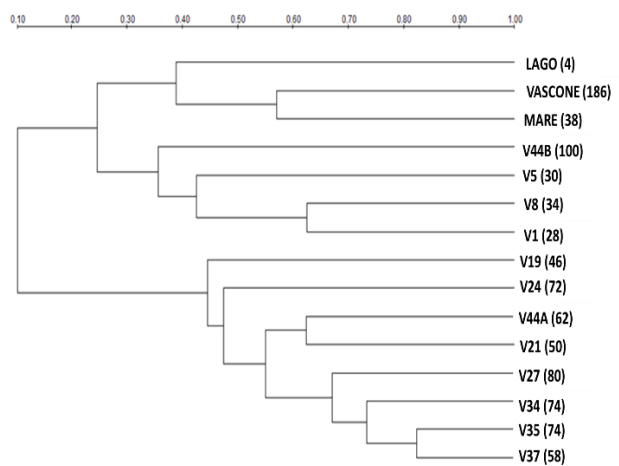
**Settembre 2012**



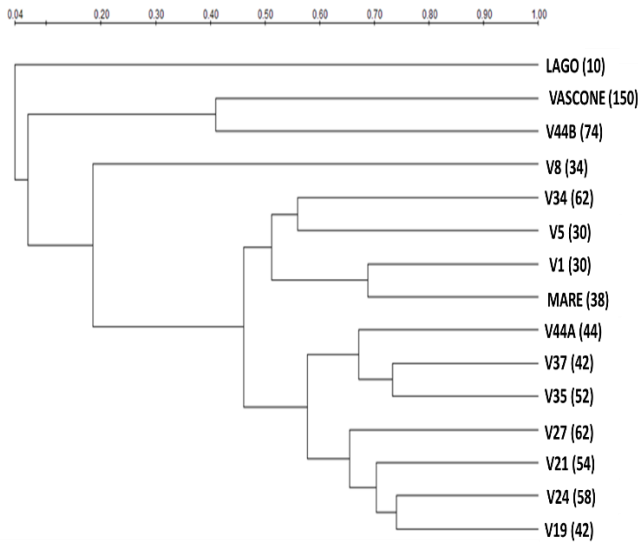
**Ottobre 2012**



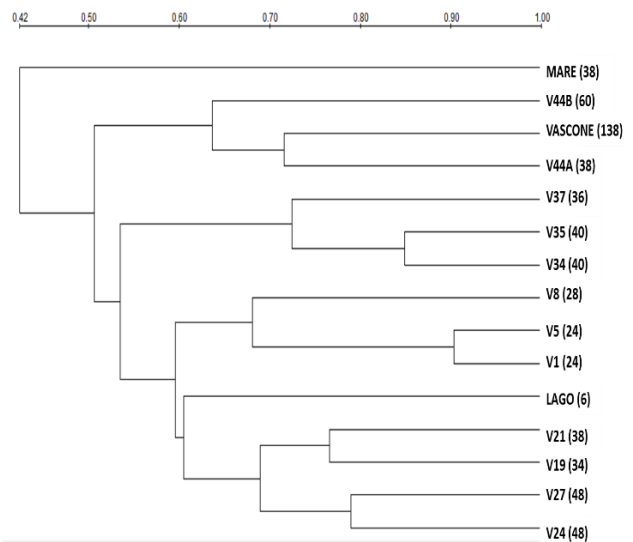
**Novembre 2012**



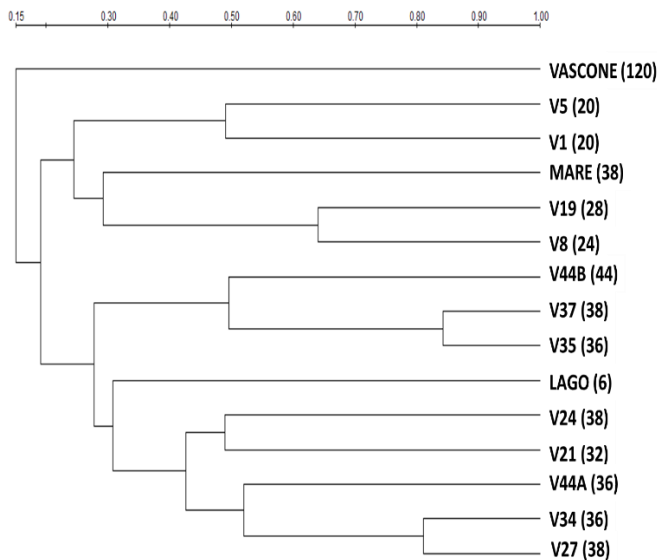
**Dicembre 2012**



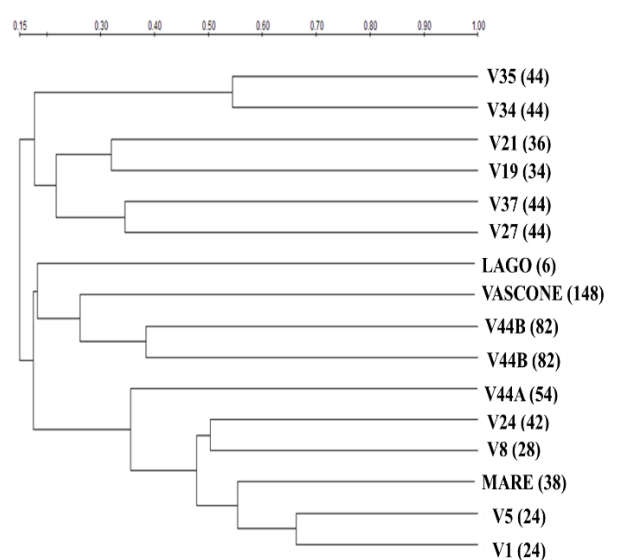
**Gennaio 2013**



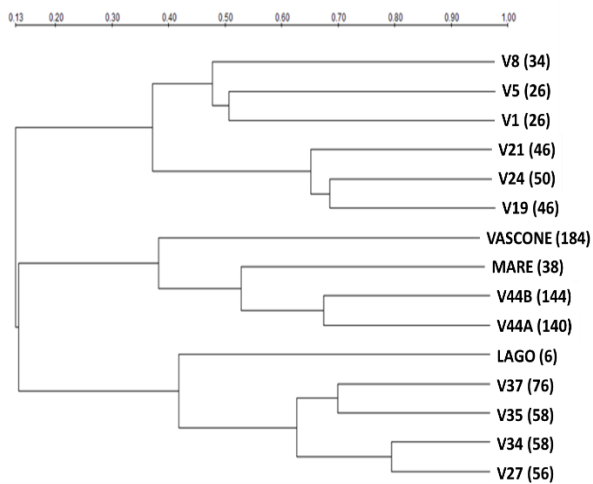
**Febbraio 2013**



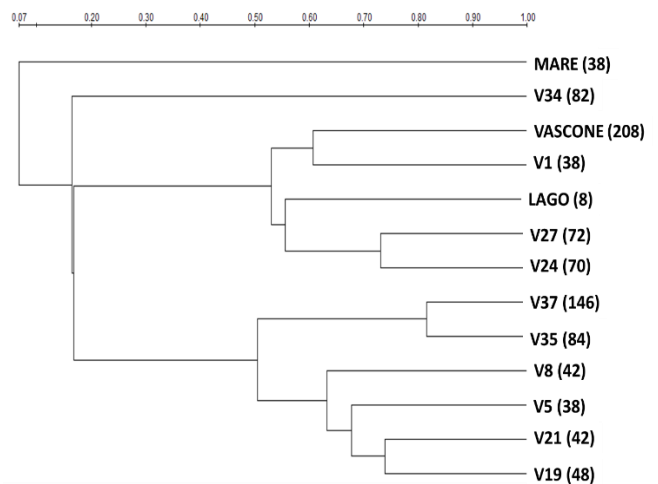
**Marzo 2013**



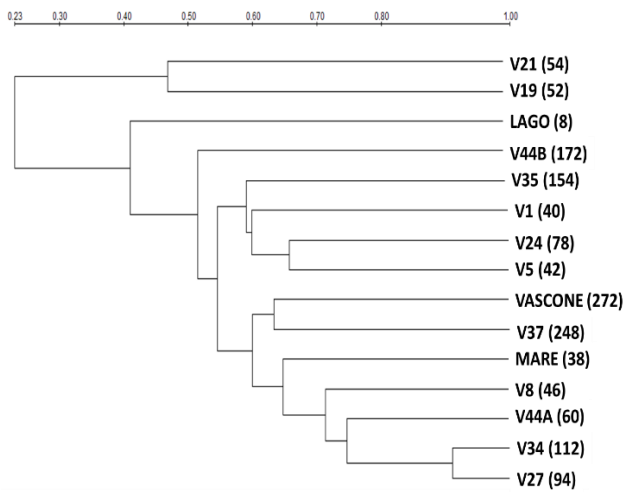
**Aprile 2013**



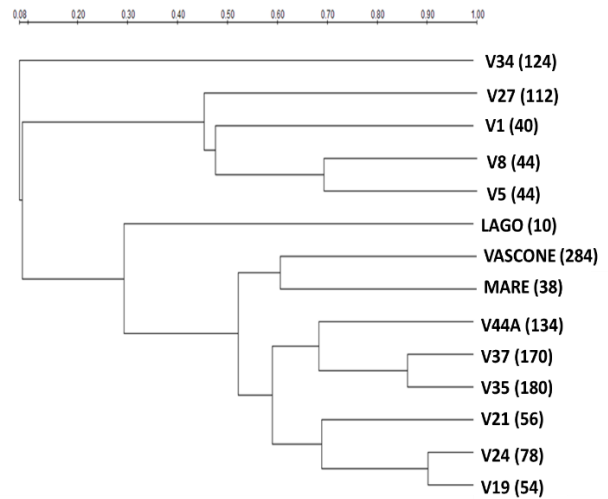
**Maggio 2013**



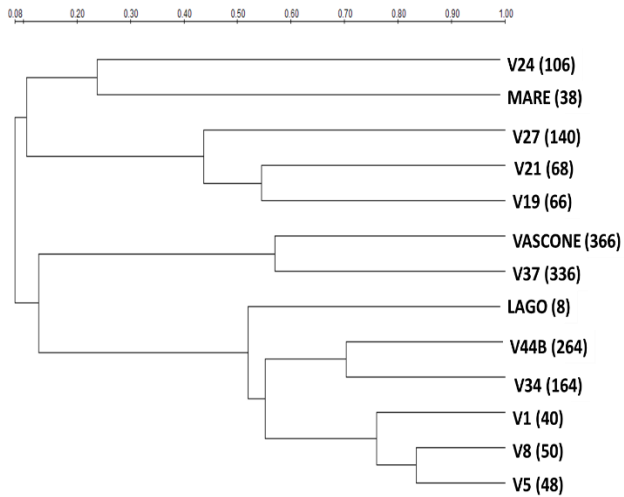
**Giugno 2013**



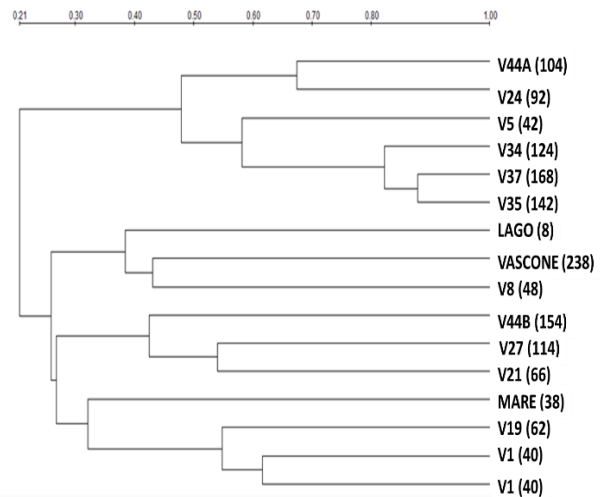
**Luglio 2013**



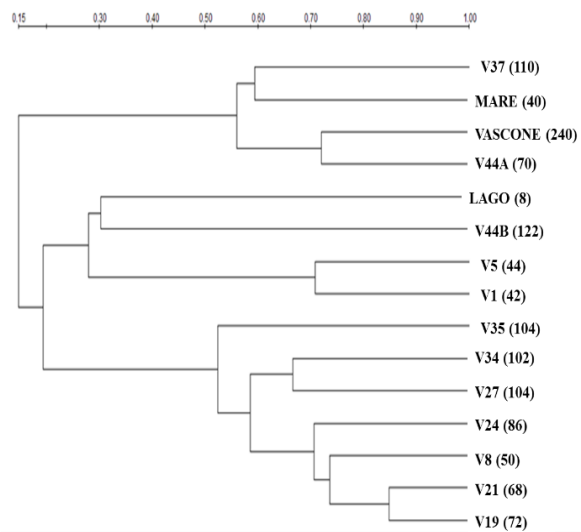
**Agosto 2013**



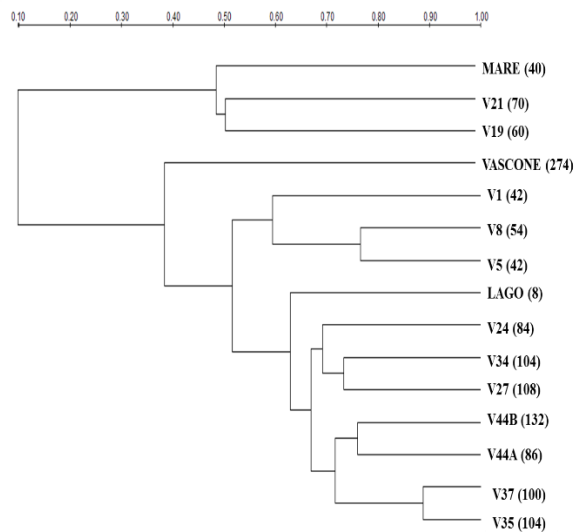
**Settembre 2013**



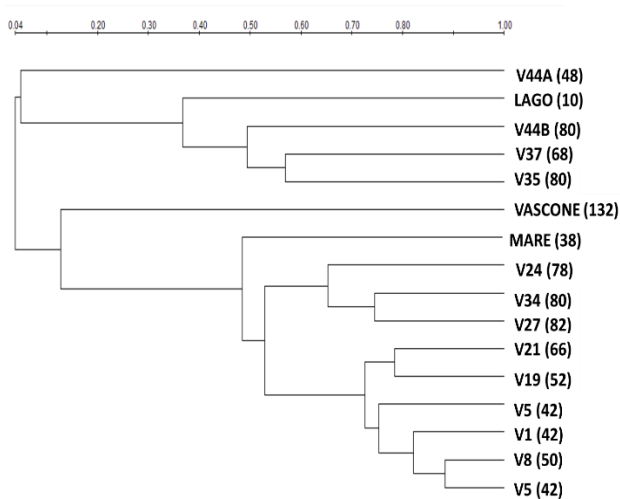
**Ottobre 2013**



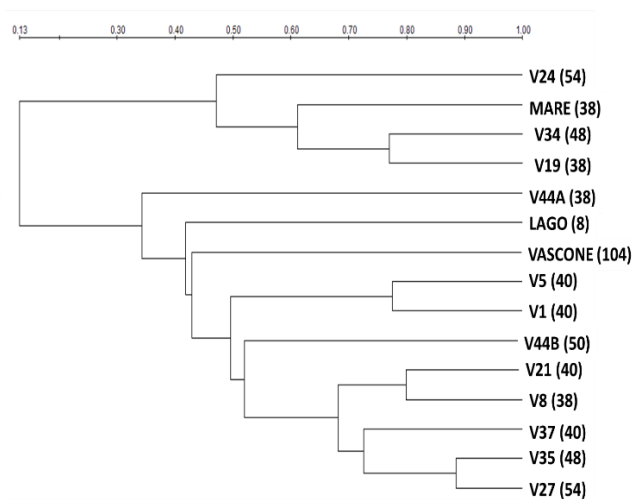
**Novembre 2013**



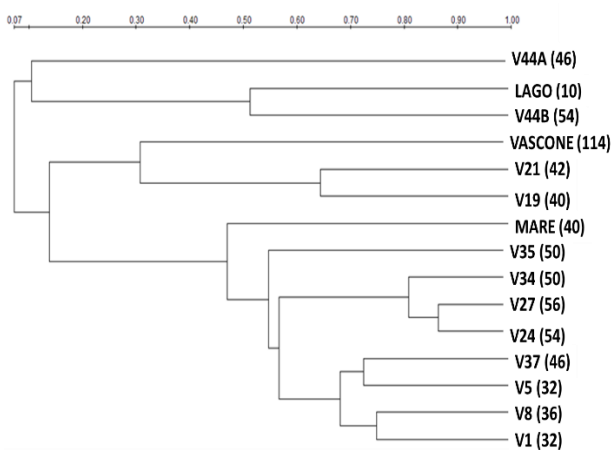
**Dicembre 2013**



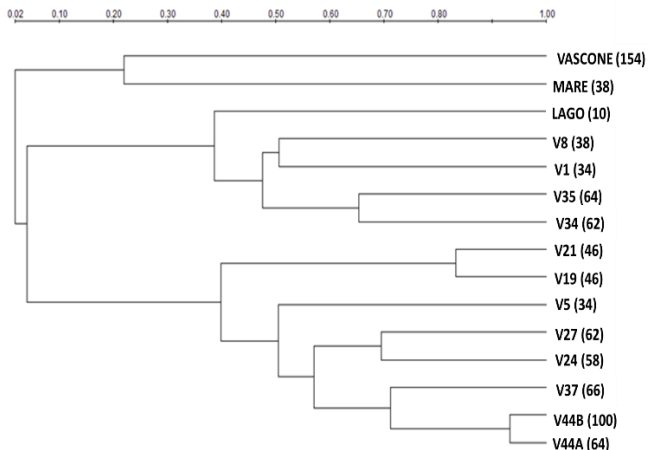
**Gennaio 2014**



**Febbraio 2014**

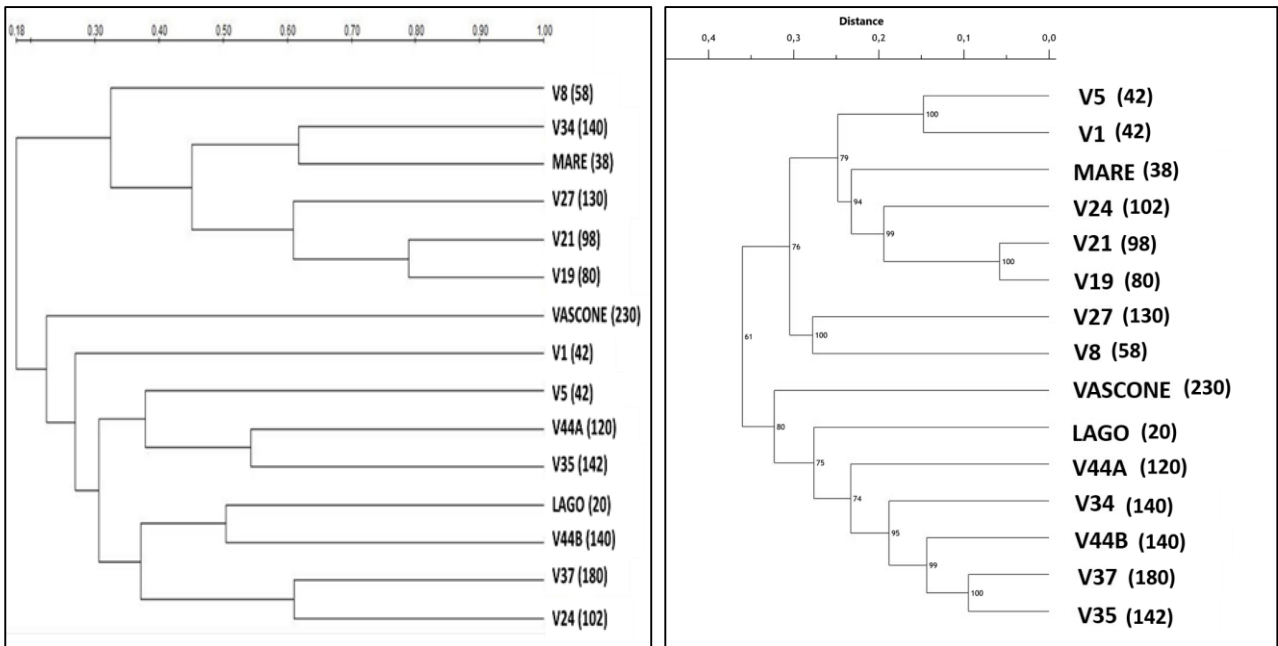


**Marzo 2014**



**Aprile 2014**

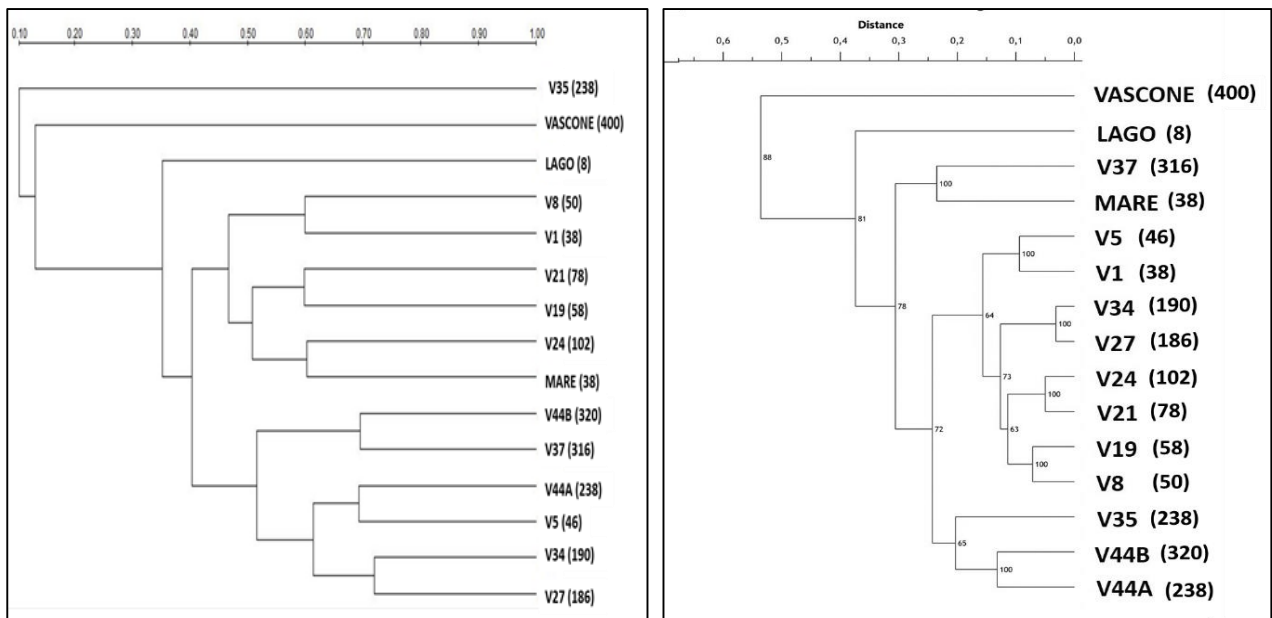
**Fig. 4.14** Dendrogrammi basati sul coefficiente di Dice per 24 mesi di campionamento (Maggio 2012-Aprile 2014). Tra parentesi sono riportati i valori di salinità in ‰ dei siti campionati.



**(a)**

**(b)**

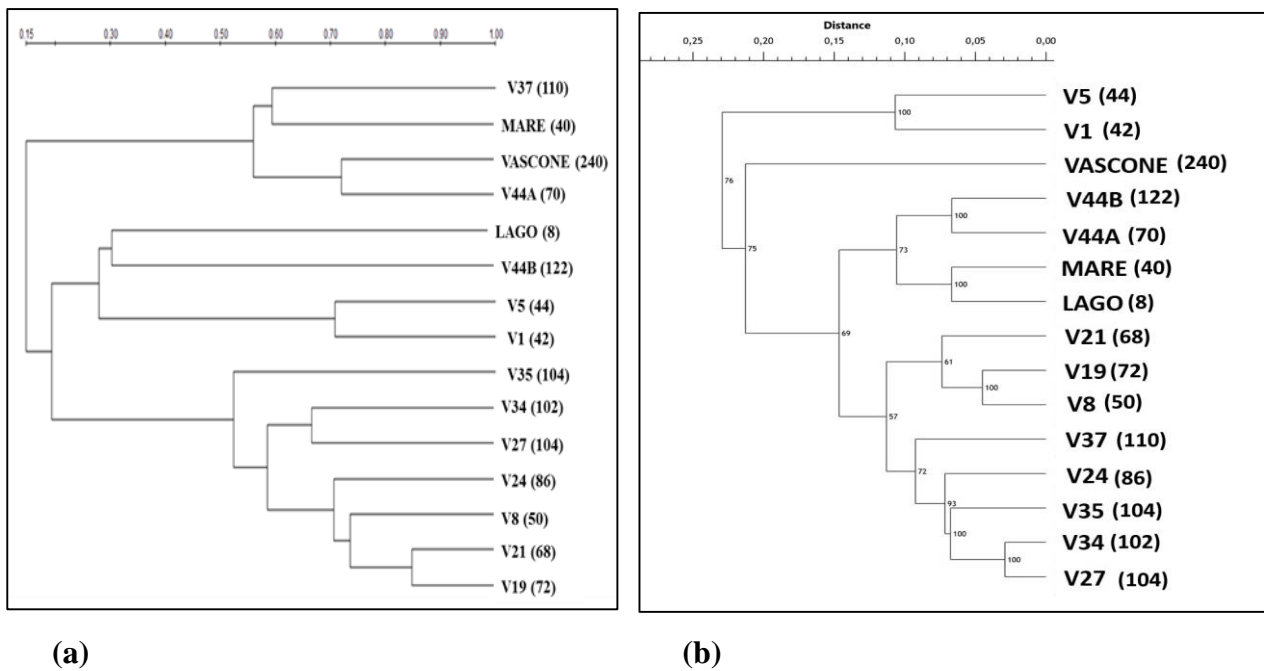
**Fig. 4.15** Dendrogrammi relativi al gel di DGGE del mese di MAGGIO 2012 calcolati utilizzando il coefficiente di Dice **(a)** ed il coefficiente di Pearson **(b)**. Tra parentesi sono riportati i valori di salinità in ‰ dei siti campionati.



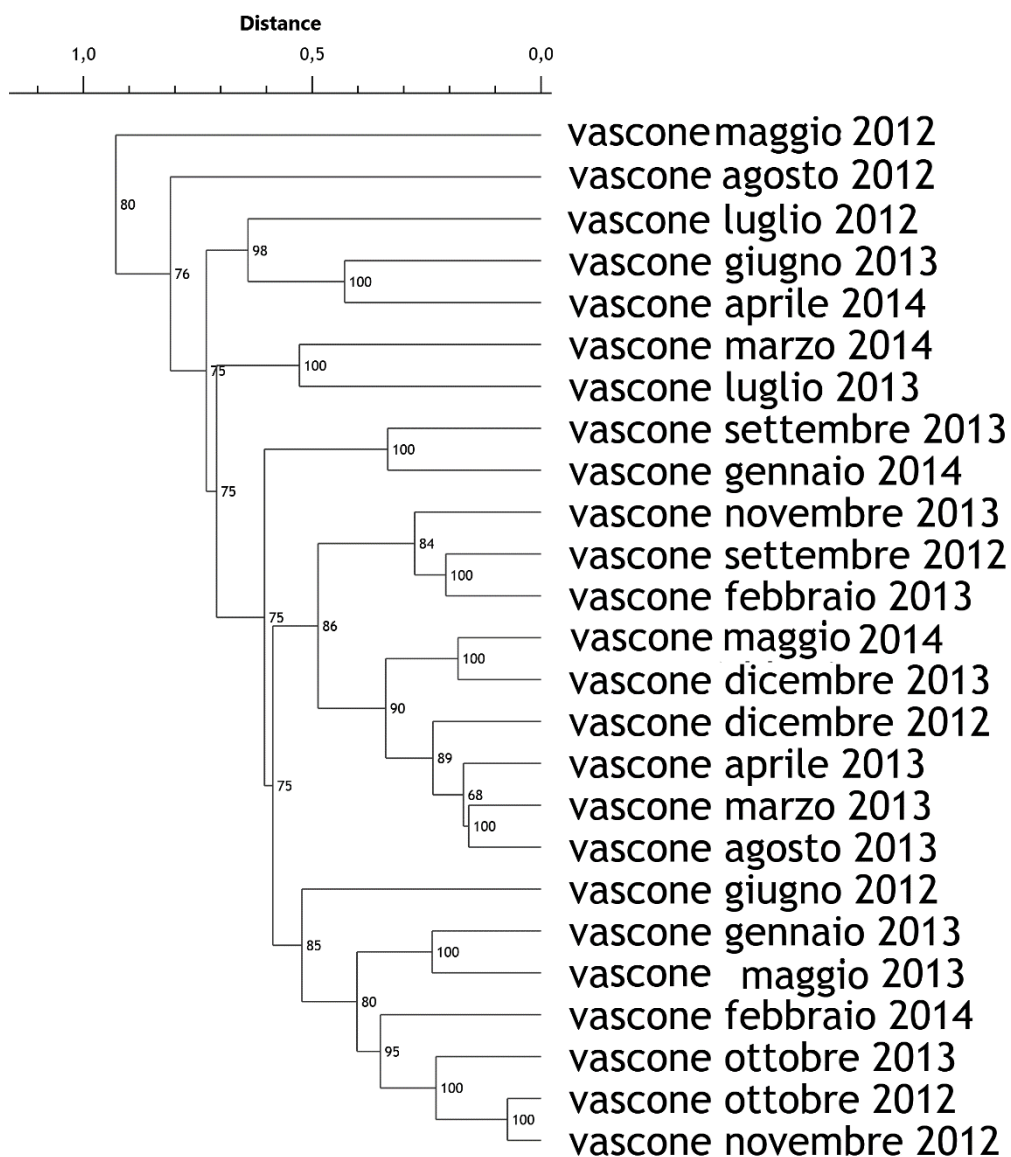
**(a)**

**(b)**

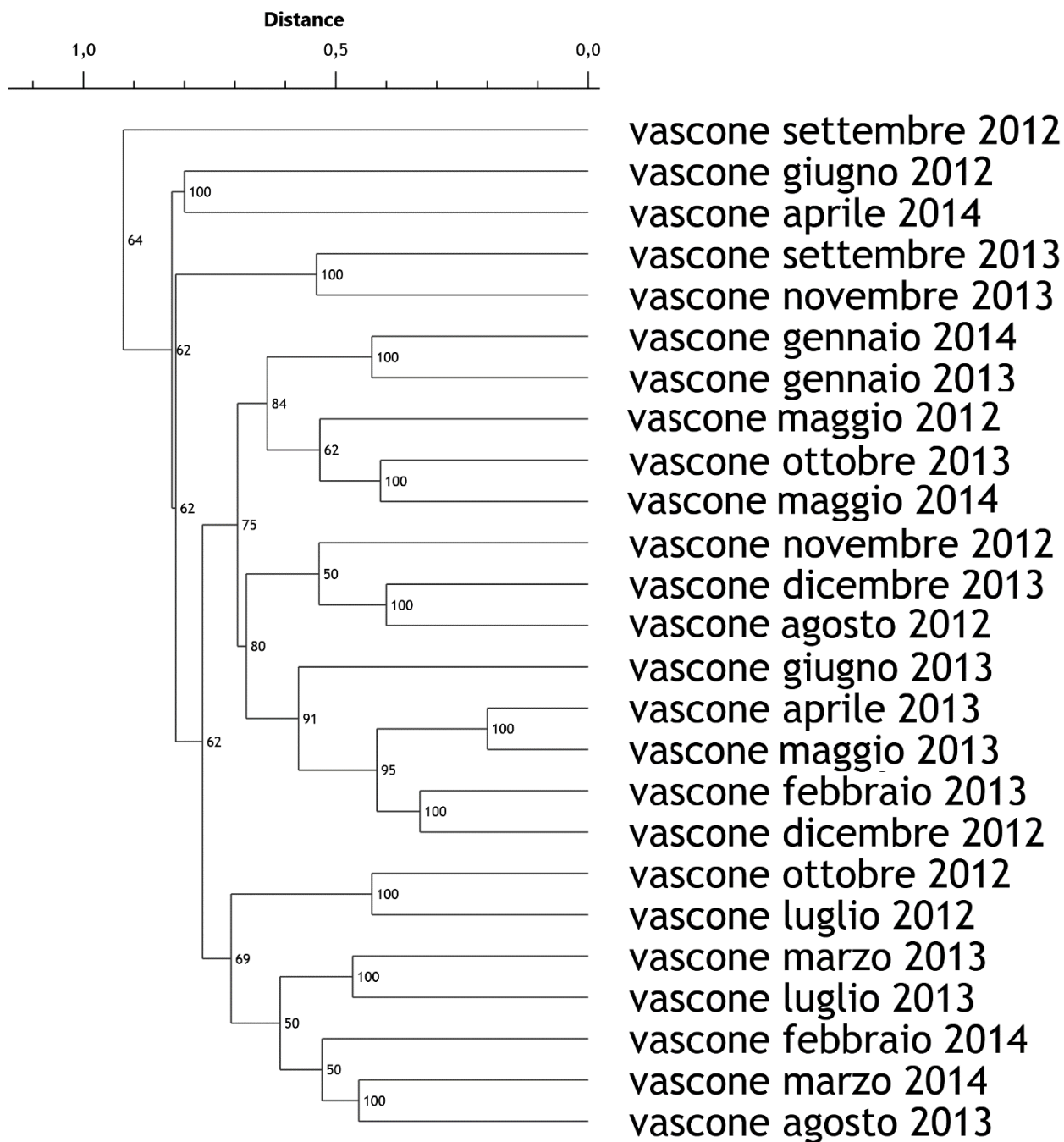
**Fig. 4.16** Dendrogrammi relativi al gel di DGGE del mese di AGOSTO 2012 calcolati utilizzando il coefficiente di Dice **(a)** ed il coefficiente di Pearson **(b)**. Tra parentesi sono riportati i valori di salinità in ‰ dei siti campionati.



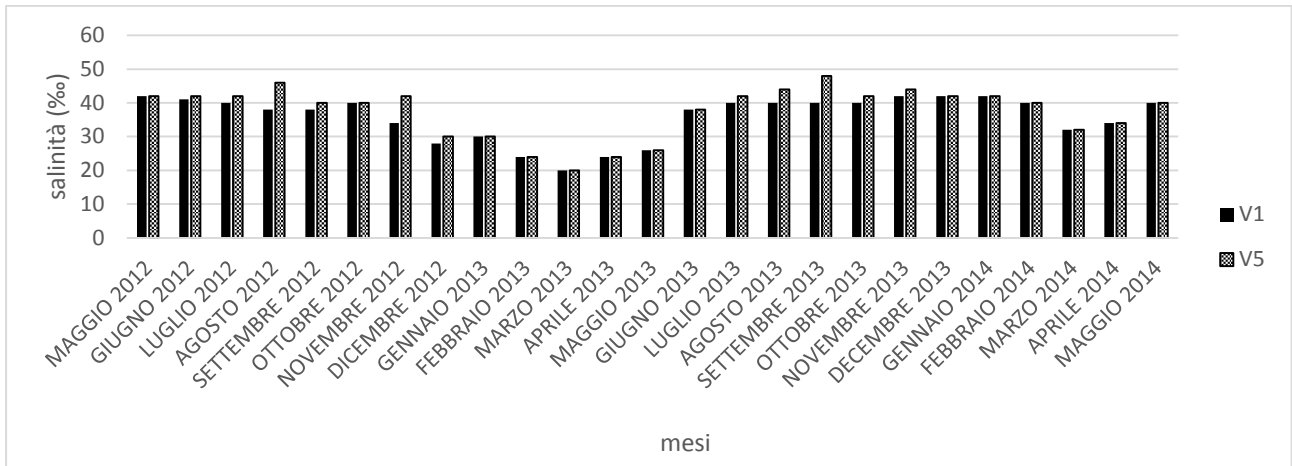
**Fig. 4.17** Dendrogrammi relativi al gel di DGGE del mese di NOVEMBRE 2013 calcolati utilizzando il coefficiente di Dice **(a)** ed il coefficiente di Pearson **(b)**. Tra parentesi sono riportati i valori di salinità in ‰ dei siti campionati.



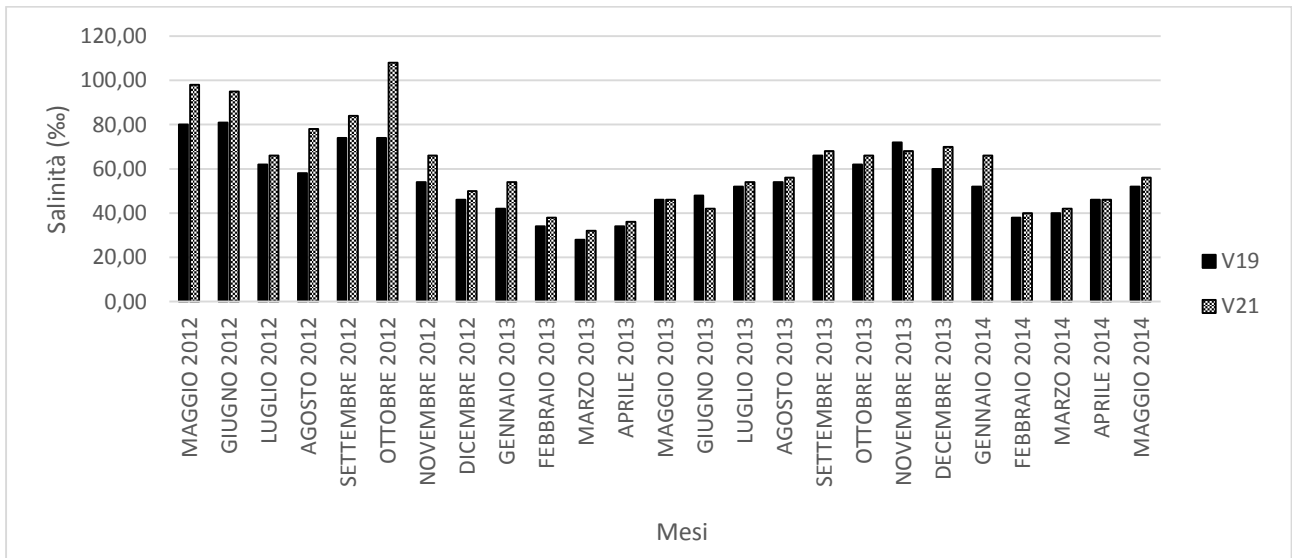
**Fig. 4.18** Analisi di clusterizzazione relativa alla similarità dei profili di fingerprinting ottenuti per il vascone nei primi due anni di campionamento. Il dendrogramma è stato calcolato utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Pearson.



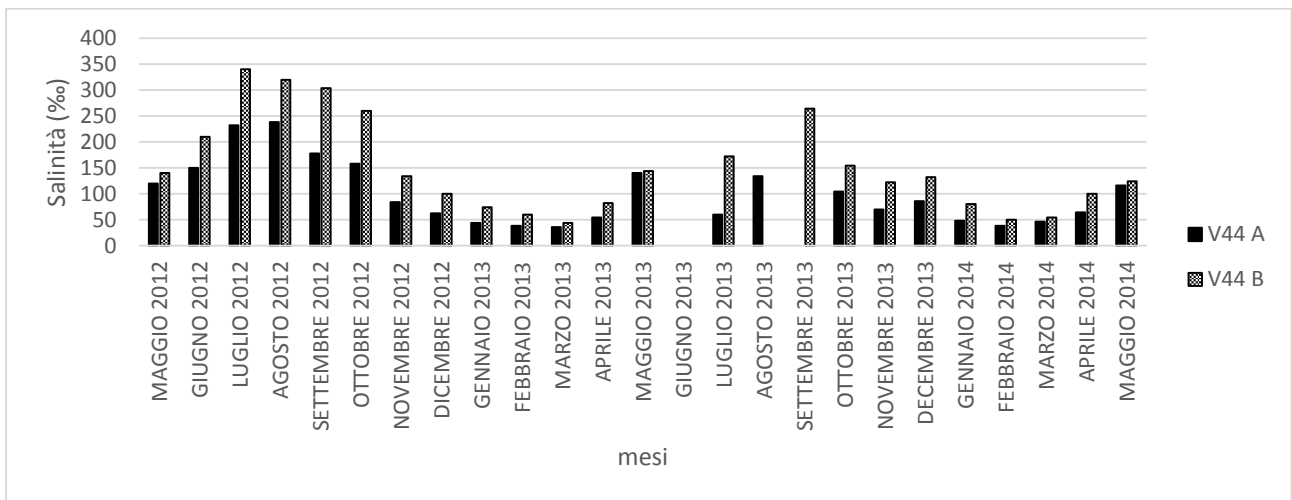
**Fig. 4.19** Analisi di clusterizzazione relativa alla similarità dei profili di fingerprinting ottenuti per il vascone nei primi due anni di campionamento. Il dendrogramma è stato calcolato utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Dice.



(a)



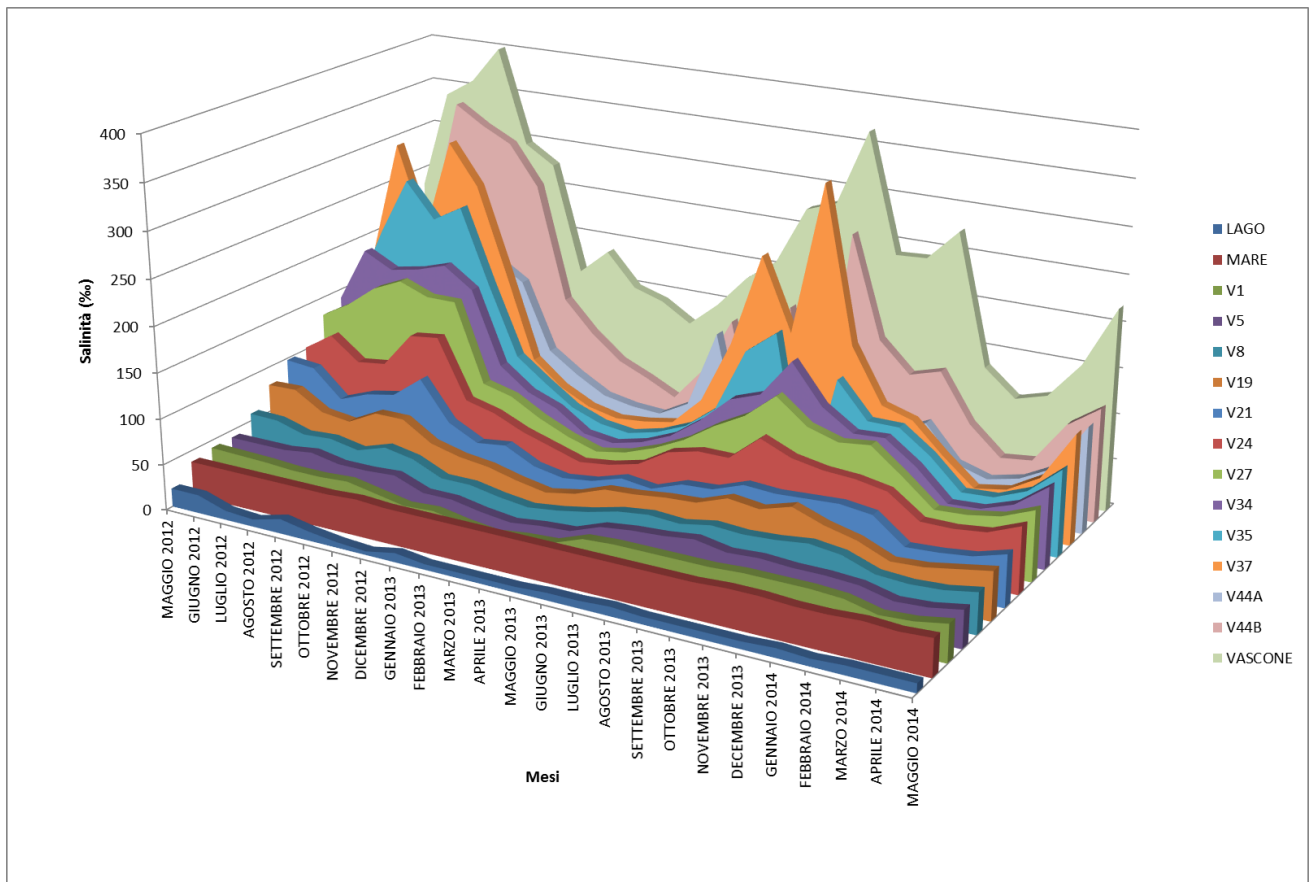
(b)



(c)

**Fig 4.20 a)** Valori di salinità (%) delle vasche 1 e 5; **b)** Valori di salinità (%) delle vasche 19 e 21; **c)** Valori di salinità (%) delle vasche 44 a e 44 b nel corso di due anni di campionamento (la vasca

44 a era asciutta nei mesi di giugno e settembre 2013 e la vasca 44 b nei mesi di giugno e agosto 2013).



**Fig. 4.21** Valori di salinità (‰) di tutti i siti nel corso di due anni di campionamento.

#### 4.2.2 Analisi Statistica multivariata NMDS

La tecnica PCR-DGGE è stata estensivamente utilizzata per monitorare le comunità batteriche nello spazio e nel tempo (Murray *et al.*, 1998; Nübel *et al.*, 1999b; van der Gucht *et al.*, 2001). Attualmente un numero crescente di studi propone l'analisi statistica dei patterns di bande. Un esempio di analisi in questo senso è stata proposto da Rademaker *et al.*, 1999 e prevede che i patterns delle bande vengano prima standardizzati con un pattern di riferimento inserito in tutti i gel (marker). Ogni banda è quindi descritta dalla sua posizione e dalla sua intensità relativa nel profilo, generando così una matrice delle bande.

Tale matrice può essere utilizzata per un'analisi congiunta con l'insieme dei dati ambientali rilevati.

La questione rilevante è quella di sapere se le variazioni osservate tra i diversi patterns potrebbero essere associate alle variazioni delle variabili ambientali misurate. Per raggiungere tale obiettivo possono essere utilizzati i metodi di ordinamento multivariato.

Per i dati ottenuti da questo studio, si è proceduto inizialmente a verificare la presenza o meno di una correlazione lineare tra le variabili con l'utilizzo del programma PAST versione 3.05 e l'applicazione del modello Linear Multivariate Multiple. Poiché i valori di  $p$  risultavano elevati ( $p > 0,05$ ) e non vi era quindi correlazione lineare tra le variabili utilizzate, si è proceduto all'applicazione del metodo NMDS (Non-Metric Multidimensional Scaling), che è libero da qualunque assunzione sulla linearità nella relazione tra le variabili.

In tale studio, l'NMDS è stato eseguito, per ogni sito campionato e per tutti i mesi di campionamento, per la ricerca dei rapporti tra il set di dati biologici (variabili dipendenti) e i dati ambientali rilevati (variabili indipendenti). I dati biologici analizzati erano: la matrice delle bande, ottenuta da un'analisi comparativa dei gel di DGGE attraverso il software Phoretix 1D versione 12.0; il numero totale delle bande di DGGE in ogni profilo di fingerprinting (richness) e le conte vitali e totali. Le variabili ambientali utilizzate erano le seguenti: salinità, ossigeno disciolto, temperatura, pH, concentrazione di clorofeopigmenti e BOD<sub>5</sub>.

Per eseguire le analisi, i dati sono stati preventivamente normalizzati dividendo i valori ottenuti per ciascuna variabile con il massimo valore rilevato per essa e i diagrammi di ordinamento sono stati generati utilizzando il coefficiente di similarità Bray-Curtis. Nelle figure sottostanti sono riportati i diagrammi relativi alle vasche 1, 8, 27, 34, 44 a, vascone e lago (Figg. 4.22-4.24; 4.26-4.29), caratterizzate da valori di salinità sempre piuttosto diversi tra loro. Osservando i diagrammi ottenuti è possibile notare che essi descrivono uno schema di ordinamento caratteristico per ciascuna delle vasche campionate. Ossigeno disciolto e temperatura sono rappresentati da vettori che procedono in direzione opposta. Questa situazione emerge in tutti i diagrammi, fatta eccezione per i campioni vasca 1 e lago (Figg. 4.22 e 4.29), che sono rappresentati da valori di salinità sempre pressoché costanti e sono inoltre le vasche caratterizzate da maggiore profondità. Quindi le loro acque sono anche meno soggette ad escursione termica rispetto alle altre. In termini quantitativi l'ossigeno disciolto è influenzato infatti dalla temperatura e della salinità. Basse temperature determinano un incremento della solubilità dell'ossigeno, mentre l'alta salinità ne provoca una riduzione.

Clorofeopigmenti e BOD<sub>5</sub> invece risultano positivamente correlati per tutte le vasche, fatta eccezione per il vascone (Fig. 4.28). I clorofeopigmenti infatti, rappresentano la produzione primaria nel sito di campionamento considerato. All'aumentare della produzione primaria, aumenta la sostanza organica e aumenta quindi anche la quantità di ossigeno necessaria ai microrganismi per la decomposizione di quest'ultima.

Per quanto riguarda la vasca 1 (Fig. 4.22), dal diagramma è possibile notare che la salinità e la temperatura sono correlate positivamente alle conte totali e vitali e alla diversità batterica rilevate durante i mesi estivi ed invernali (dicembre 13, gennaio 14, febbraio 14, agosto 12 e agosto 13). L'ossigeno disciolto è positivamente correlato alle variabili dipendenti soprattutto nei mesi di gennaio e febbraio 2013, per i quali sono stati rilevati valori piuttosto elevati di ossigeno disciolto per le vasche campionate e si è registrato per la vasca 1 anche un numero piuttosto elevato di bande nei profili fingerprinting se paragonati agli altri mesi. In modo particolare, nel mese di gennaio 2013 è stato rilevato il più alto numero di bande nell'arco dei due anni di campionamento (Fig. 4.30 a). Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che i mesi freddi sono generalmente caratterizzati da una minor salinità, temperature più basse e quindi una maggior concentrazione dell'ossigeno disciolto e ciò potrebbe essere positivamente correlato alla biodiversità batterica.

I Clorofeopigmenti sembrerebbero essere positivamente correlati alle variabili dipendenti soprattutto nei mesi primaverili ed estivi, in cui la concentrazione della biomassa fototrofa è risultata essere maggiore rispetto ai mesi invernali ed autunnali. In modo particolare nel mese di ottobre 2012, in cui si è registrata la maggior concentrazione di clorofeopigmenti per la vasca 1, è stato registrato anche il valore più alto per le conte totali e vitali nei due anni di campionamento (Fig. 4.31 a). Le variabili dipendenti rilevate nei mesi di luglio 2012 e gennaio, febbraio, settembre e ottobre 2013 risultano essere negativamente correlate con il BOD. Si tratta di mesi in cui si sono registrati valori piuttosto bassi per tale parametro.

Le variabili dipendenti relative nei mesi di dicembre 2012 e settembre 2013 si collocano in posizione piuttosto isolata nel diagramma. Si tratta dei mesi in cui si sono rilevati i più bassi valori di conte procariotiche totali e vitali (Fig. 4.31 a).

I vettori relativi a ossigeno disciolto e BOD risultano avere andamento opposto. Questo dipende dal fatto che il BOD è la domanda biologica di ossigeno, cioè la quantità di ossigeno (in mg/L) necessaria ai microrganismi per decomporre le sostanze organiche presenti in un litro di acqua. Un basso valore di BOD corrisponde ad uno scarso consumo di ossigeno dipendente da una bassa concentrazione di sostanze organiche nel campione d'acqua. Un'elevata concentrazione di sostanze organiche comporta un elevato consumo di ossigeno da parte dei microrganismi presenti. Se il consumo è molto intenso (cioè il BOD è molto alto) si può verificare una riduzione della disponibilità di ossigeno disciolto.

Per quanto riguarda la vasca 8, come è possibile osservare dal diagramma (Fig. 4.23), l'ossigeno è correlato positivamente alle variabili dipendenti analizzate soprattutto nei mesi invernali ed in modo particolare nel mese di febbraio 2013. Le variabili dipendenti, nel corso dei mesi estivi, sono positivamente correlate soprattutto a clorofeopigmenti, temperatura, salinità, BOD<sub>5</sub> e pH. In modo

particolare, dal grafico sembrerebbe che esse siano più strettamente correlate alla concentrazione dei clorofeopigmenti nei mesi di luglio di entrambi gli anni di campionamento. Durante il mese di luglio 2013 ad esempio si è registrato il valore più elevato di clorofeopigmenti e anche uno dei valori più alti per quanto riguarda la conta procariotica totale e vitale (Fig. 4.31 a). Tale mese però è stato anche quello che ha registrato il minor numero di bande per tale vasca (Fig. 4.30 a), che quindi risulta essere caratterizzata da una scarsa diversità batterica, ma da un elevato numero di individui per le specie rilevate.

Un altro dato interessante che emerge dall'analisi del diagramma è il fatto che, in tutti i mesi in cui è stato rilevato il maggior numero di bande nei profili di fingerprinting (novembre 2012 e gennaio, marzo e giugno 2013) (Fig. 4.30 a), le variabili dipendenti presentano una correlazione positiva esclusivamente con l'ossigeno disciolto.

I mesi in cui sono stati rilevati i valori più elevati per le conte totali e vitali sono luglio e agosto 2013 e maggio 2014 (Fig. 4.31 a). Le variabili dipendenti in questi tre mesi mostrano una forte correlazione positiva soprattutto con clorofeopigmenti e BOD.

Osservando il diagramma relativo alla vasca 27 (Fig. 4.24), è possibile notare una forte correlazione positiva delle variabili dipendenti rilevate nei mesi di maggio, luglio e agosto 2013 con i clorofeopigmenti: sono i mesi in cui si sono registrati i più alti valori per tale parametro. In figura 4.25 sono stati riportati gli spettri degli estratti dei clorofeopigmenti in acetone al 90% entro il range 320-900 nm per la vasca 27 nei mesi suddetti. Il mese di agosto 2013 inoltre è stato anche quello che ha registrato il più alto valore per le conte totali e vitali (Fig. 4.31 a).

I mesi caratterizzati dal numero più elevato di bande nei profili DGGE sono stati luglio 2012 e giugno 2013 (Fig. 4.30 a). In questi mesi risulta esserci una correlazione positiva delle variabili dipendenti soprattutto con salinità e temperatura. Giugno 2013 inoltre è stato anche uno dei mesi in cui i valori per le conte totali e vitali sono risultati tra i più elevati per tale vasca (Fig. 4.31 a).

È interessante inoltre notare che, i mesi in cui sono stati rilevati i valori più elevati di bande nei profili e di conte, sono disposti tutti verso la parte positiva dell'asse di ordinamento verticale.

Per il mese di febbraio 2013 è possibile notare una forte correlazione negativa con la concentrazione di clorofeopigmenti ed il BOD. Questo infatti è stato il mese in cui è stato rilevato il più basso valore per tali parametri, e anche uno tra i più bassi valori di conte totali e vitali (Fig. 4.31 a).

Le variabili dipendenti per il mese di aprile di entrambi gli anni e per il mese di gennaio 2014, rappresentano degli outliers, cioè valori chiaramente distanti dalle altre osservazioni disponibili. Gli outliers sono indicativi di situazioni in cui le relazioni calcolate dal metodo non sono valide. In questo caso si tratta dei mesi in cui si è rilevato il numero minore di bande per i profili DGGE per

tale vasca (Fig. 4.30 a). Questo potrebbe essere dovuto all'elevata variabilità dei parametri chimico-fisici e biologici che caratterizza questo ambiente e che è stata rilevata anche nel corso della campagna di campionamento.

Nel caso della vasca 34 (Fig. 4.26), ossigeno e salinità risultano positivamente correlati ai valori delle conte e alla diversità batterica nella maggior parte dei mesi in cui è stato effettuato il campionamento. In modo particolare durante i mesi di luglio ed agosto 2013 si rileva una forte correlazione positiva con il BOD: si tratta dei mesi in cui sono stati registrati i valori più alti sia per tale parametro sia per le conte totali e vitali (Fig. 4.31 a). È interessante notare che, durante il mese di luglio 2013 si sono stati registrati valori medi piuttosto elevati anche per quanto riguarda i parametri chimici rilevati (Tabella 4.6).

Nei mesi luglio e agosto 2013 e maggio 2014 sono stati rilevati i valori più elevati per le conte totali e vitali e, in tutti e tre i mesi, le variabili dipendenti sono disposte all'interno dello stesso quadrante nel diagramma, mostrando una forte correlazione positiva con BOD, temperatura e clorofeopigmenti. I mesi in cui è stato rilevato il maggior numero di bande nei profili di fingerprinting sono invece luglio, settembre e novembre 2012 e giugno 2013 (Fig. 4.30 a). Anche in questo caso le variabili dipendenti rilevate occupano lo stesso quadrante all'interno del diagramma, mostrando una forte correlazione positiva con la salinità.

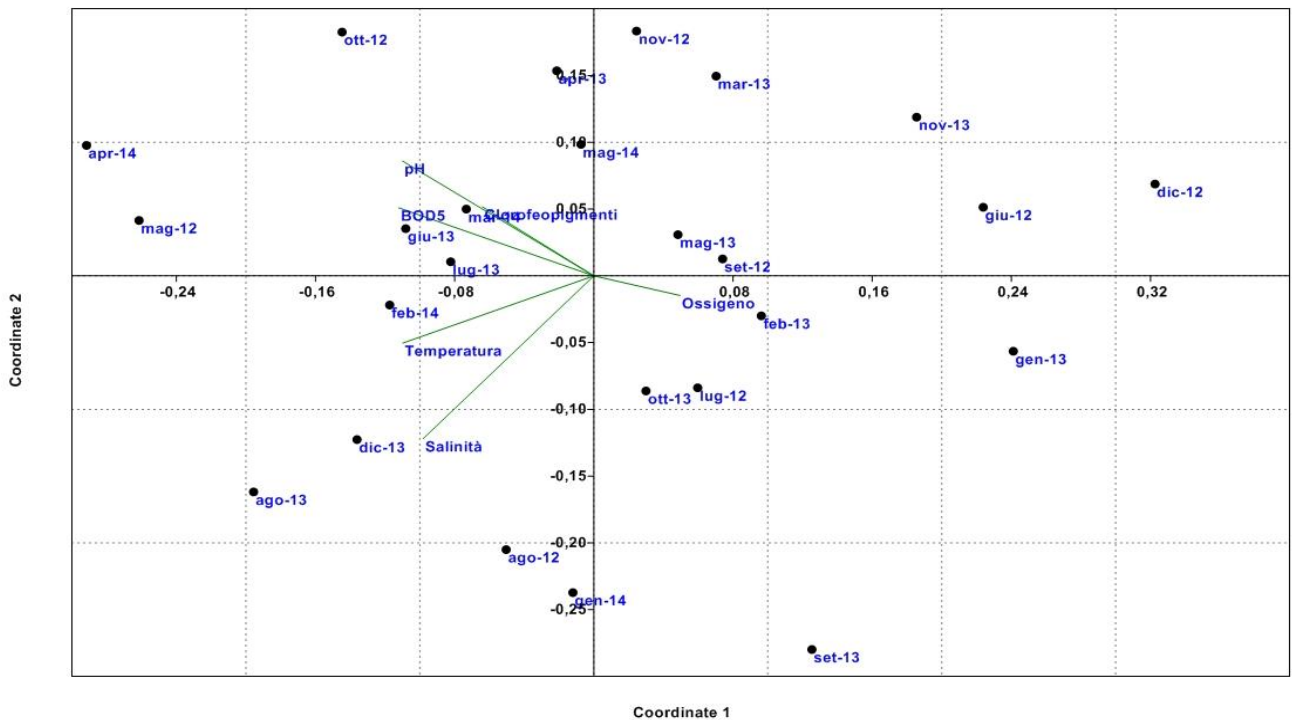
Per quanto riguarda la vasca 44 a (Fig. 4.27), le variabili biologiche rilevate per la maggior parte dei mesi sembrerebbero correlate positivamente a temperatura, salinità e pH. I parametri clorofeopigmenti, ossigeno disciolto e BOD, sono rappresentati da vettori che procedono in senso opposto e quindi risultano essere negativamente correlati sia alla composizione della comunità batterica sia ai valori delle conte. È interessante notare che, nonostante si tratti di una delle vasche caratterizzate da più elevata variabilità nei parametri ambientali rilevati, le variabili dipendenti sembrerebbero essere correlate in modo molto simile tra loro ai parametri ambientali rilevati nella maggior parte dei mesi di campionamento. A quanto detto fanno eccezione le variabili dipendenti rilevate nei mesi di gennaio, marzo e maggio 2014, che sono in una posizione isolata nel grafico e rappresentano degli outliers. Si tratta dei mesi in cui si è registrato il numero più basso di bande nei profili DGGE per tale vasca (Fig. 4.30 b).

Un risultato interessante emerge dall'analisi del diagramma relativo al vascone (Fig. 4.28), in cui i parametri ambientali rilevati risultano negativamente correlati alle conte e alla diversità batterica, fatta eccezione per l'ossigeno soprattutto durante i mesi invernali, i quali presentano concentrazioni più elevate se paragonati ai mesi estivi. Un'altra eccezione è rappresentata dai mesi di novembre 2013, ottobre 2012 e luglio 2013, in cui le variabili dipendenti sembrerebbero essere positivamente correlate alla concentrazione dei clorofeopigmenti, alla salinità e alla temperatura.

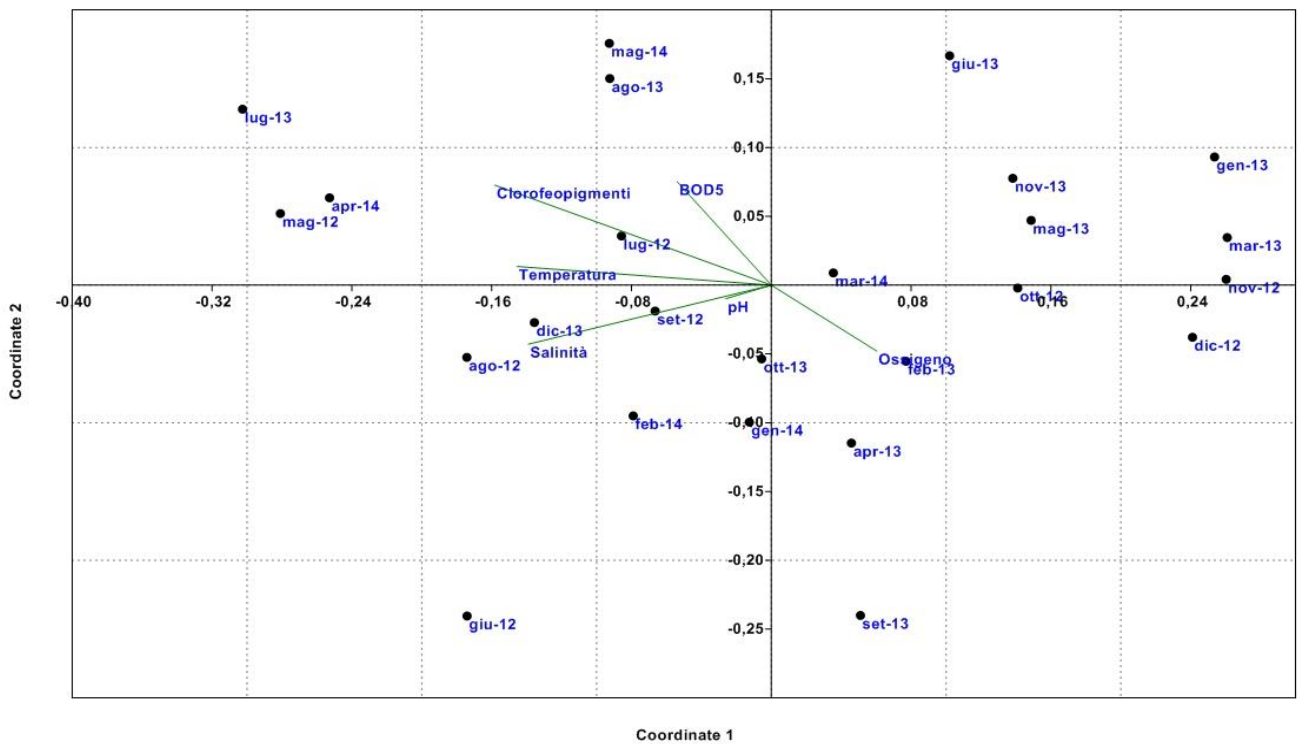
Anche in questo caso è presente un outlier rappresentato dalle variabili dipendenti rilevate nel mese di settembre 2012, in posizione piuttosto isolata rispetto agli altri. Una situazione analoga è osservabile per il campione lago, in cui l'outlier è rappresentato dalle variabili dipendenti nel mese di aprile 2014. Si tratta anche in questo caso di campioni che hanno mostrato un numero ridotto di bande nei profili DGGE (1 banda per il vascone a settembre 2012 e 2 per il lago ad aprile 2014) (Fig. 4.30 b).

Come possiamo notare per il lago infine (Fig. 4.29), il parametro che risulta essere il meno correlato alla diversità batterica e alle conte totali e vitali è rappresentato dalla salinità. Durante i due anni di campionamento infatti, tale parametro si è mantenuto entro un range ristretto e costante (valore medio di salinità 10‰ ca.) e potrebbe quindi aver poco influito sulla diversità batterica presente in quel sito. La concentrazione dei clorofeopigmenti è un parametro positivamente correlato alla diversità batterica soprattutto per i mesi di ottobre 2013 e gennaio 2014. Nel mese di marzo 2014 è possibile rilevare una forte correlazione delle variabili dipendenti soprattutto con i valori di BOD e clorofeopigmenti rilevati. Infatti, per il lago, questo è stato il mese in cui si sono registrati i valori più alti per tali parametri e anche per le conte totali e vitali (Fig. 4.31 b). Nel mese di giugno 2013 invece è possibile rilevare una forte correlazione positiva con la temperatura: si tratta del mese che ha registrato il numero più alto di bande nel profilo di fingerprinting nei due anni di campionamento per tale sito (Fig. 4.30 b). Quest'ultimo parametro mostra anche una forte correlazione positiva con le variabili dipendenti rilevate per la maggior parte dei mesi primaverili di campionamento.

Durante il mese di dicembre 2013 infine, è stato rilevato il valore più basso di ossigeno disciolto nei due anni di campionamento e dal diagramma le variabili dipendenti per tale mese risultano infatti essere caratterizzate da una forte correlazione negativa con tale parametro ambientale.

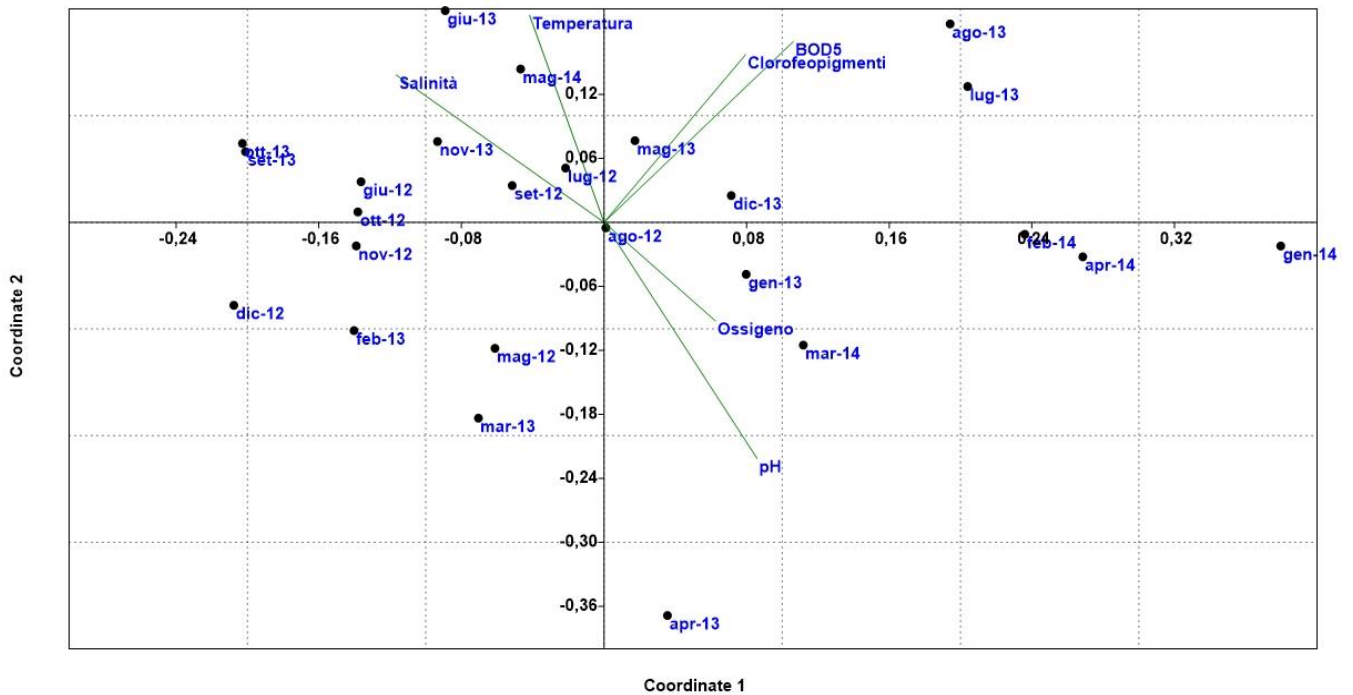


**Fig 4.22** Diagramma NMDS relativo alla **vasca 1**. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti (µg/L), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Variabili biologiche: conte totali e vitali (cell/ml); matrice delle bande per i profili DGGE, numero di bande DGGE.

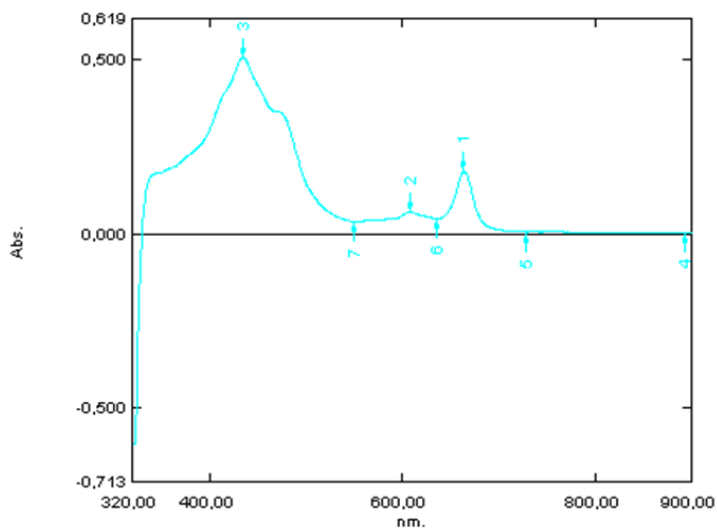


**Fig. 4.23** Diagramma NMDS relativo alla **vasca 8**. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti (µg/L), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Variabili

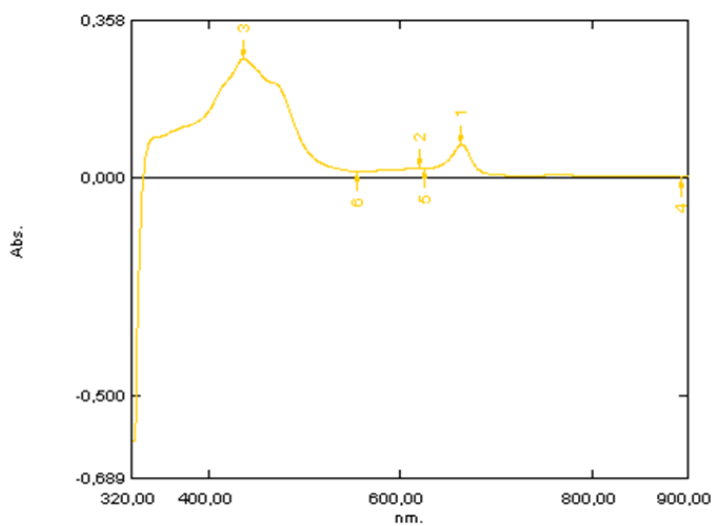
biologiche: conte totali e vitali (cell/ml); matrice delle bande per i profili DGGE, numero di bande DGGE.



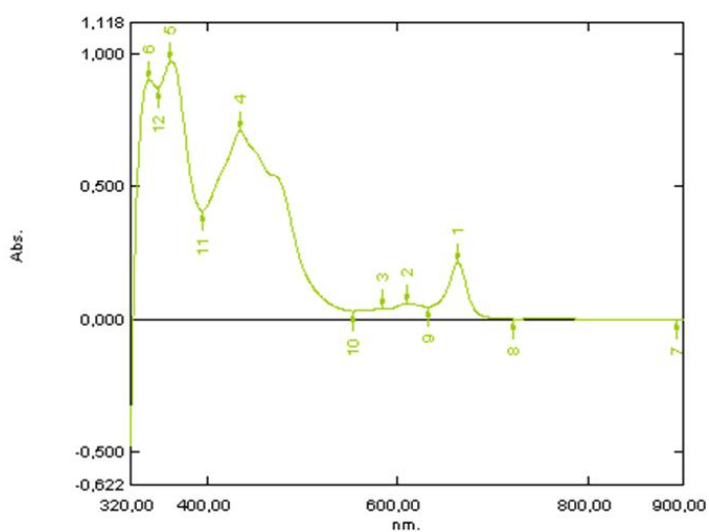
**Fig. 4.24** Diagramma NMDS relativo alla **vasca 27**. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Variabili biologiche: conte totali e vitali (cell/ml); matrice delle bande per i profili DGGE, numero di bande DGGE.



(a)

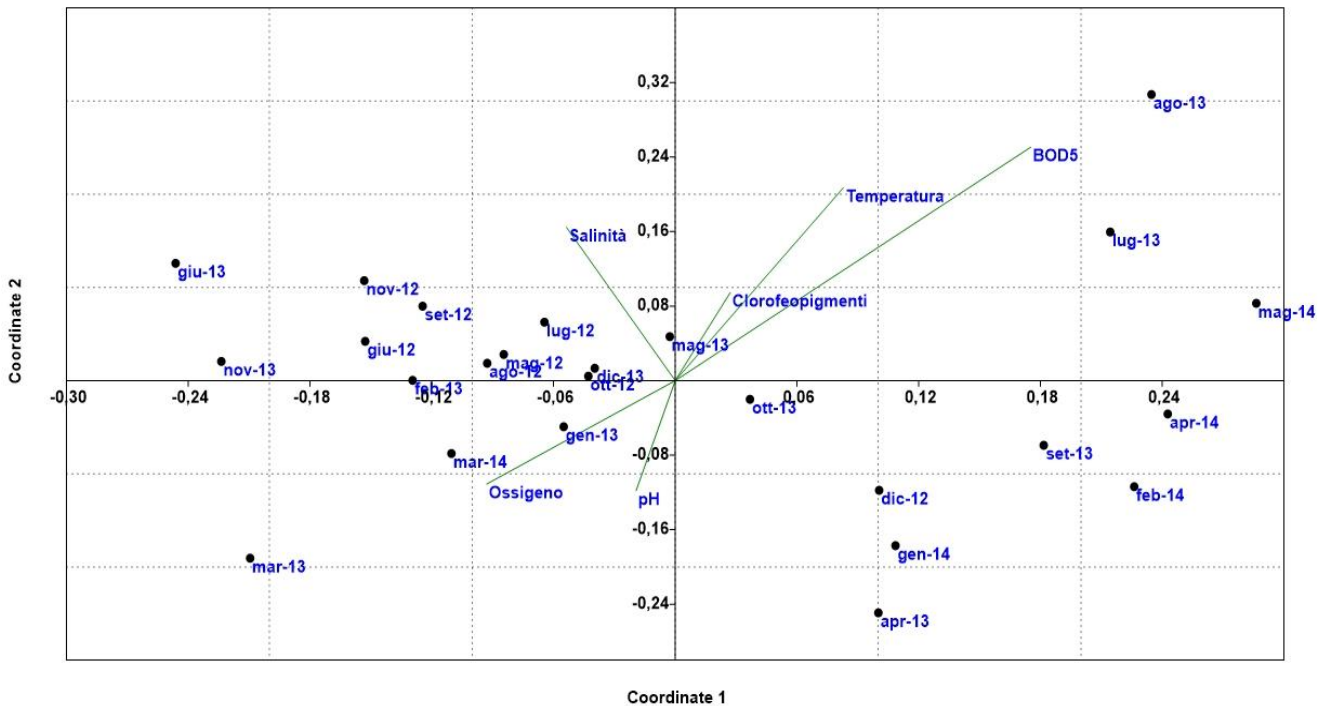


(b)

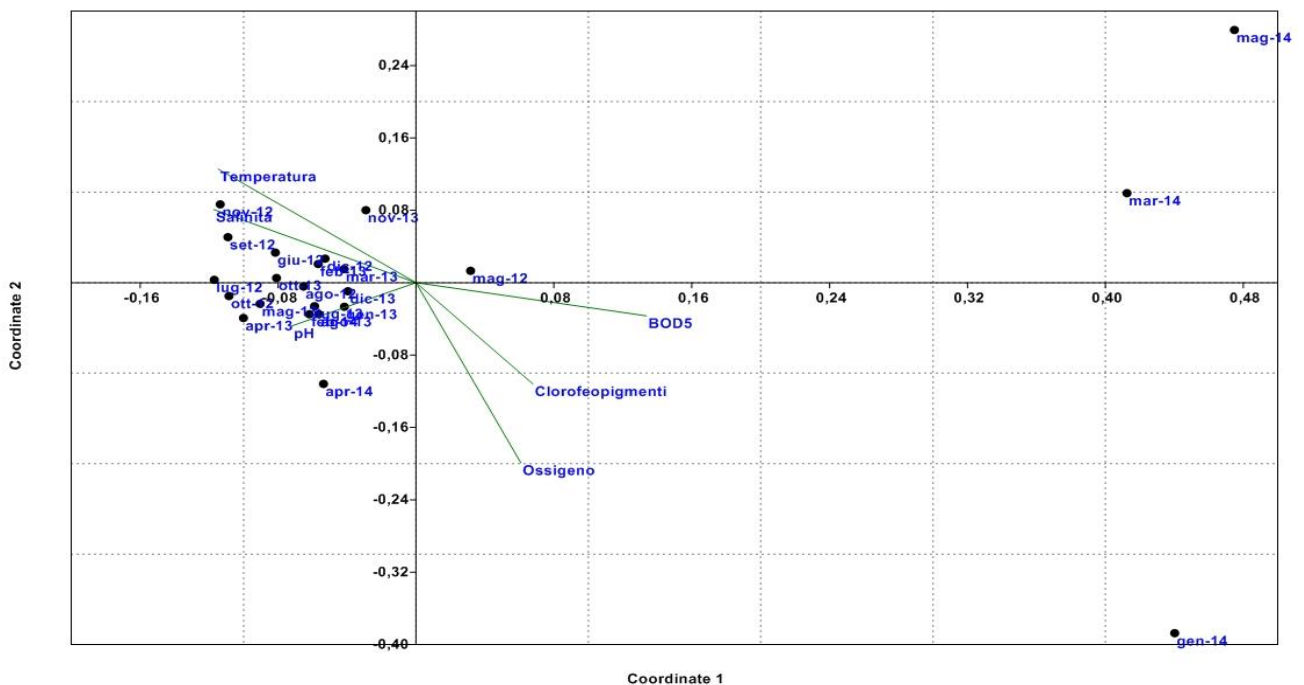


(c)

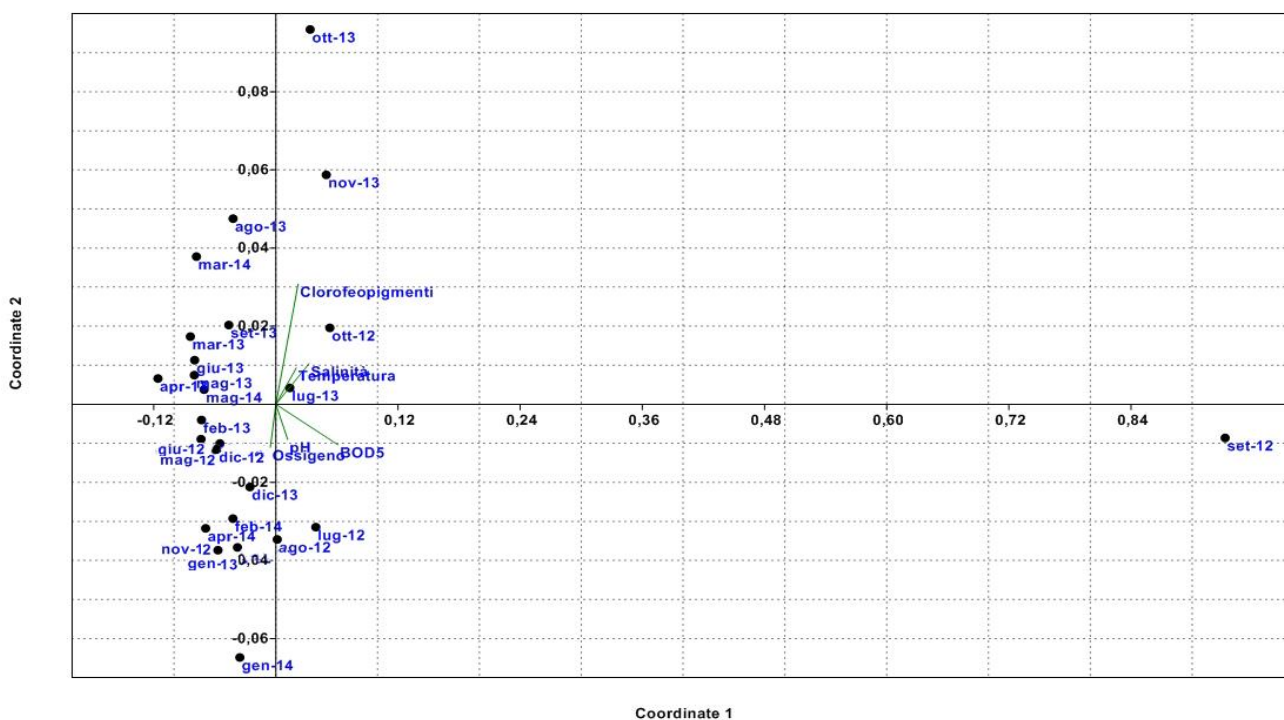
**Fig. 4.25** Spettri nel range 320-900 nm degli estratti dei clorofeopigmenti in acetone al 90% relativi ai mesi di maggio 2013 (a), luglio 2013 (b) e agosto 2013 (c) per la **vasca 27**.



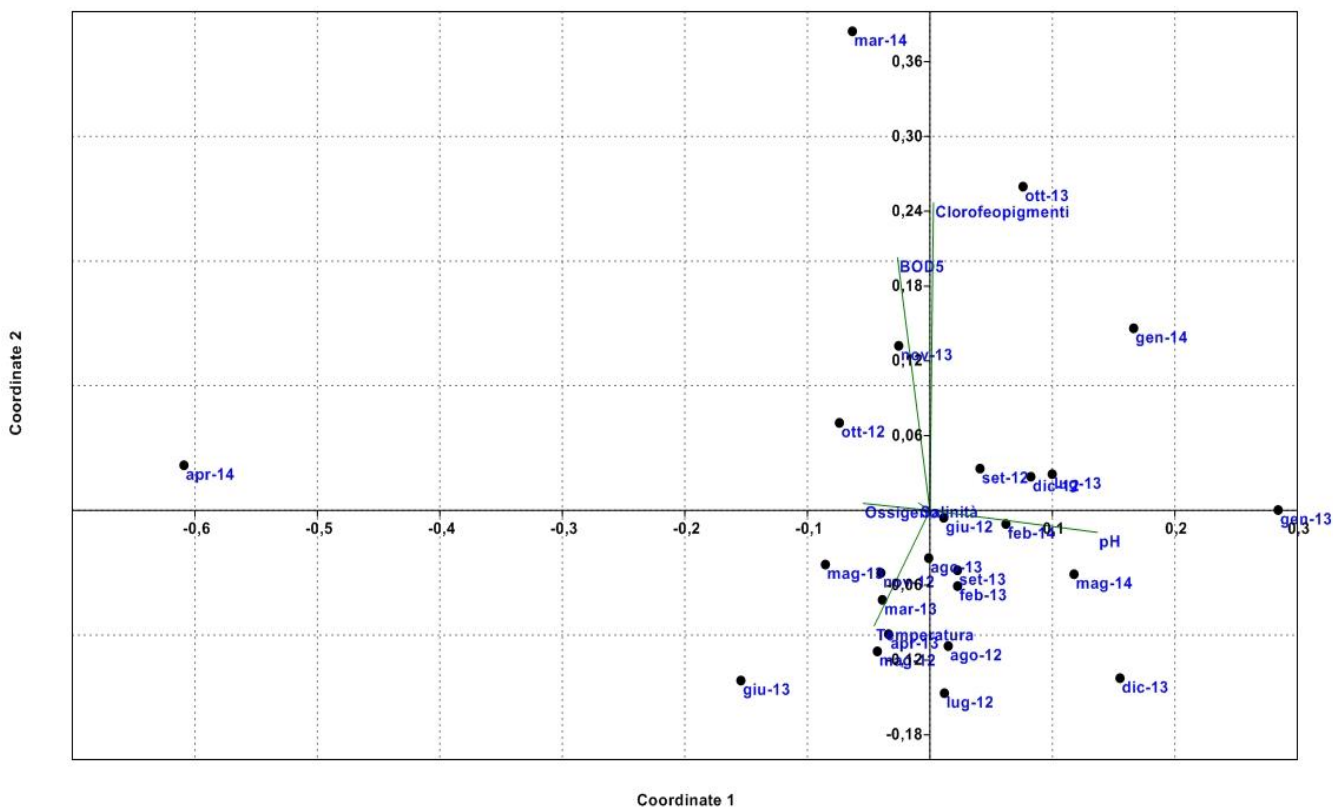
**Fig. 4.26** Diagramma NMDS relativo alla **vasca 34**. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ),  $\text{BOD}_5$  (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Variabili biologiche: conte totali e vitali (cell/ml); matrice delle bande per i profili DGGE, numero di bande DGGE.



**Fig. 4.27** Diagramma NMDS relativo alla **vasca 44 a**. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ),  $\text{BOD}_5$  (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Variabili biologiche: conte totali e vitali (cell/ml); matrice delle bande per i profili DGGE, numero di bande DGGE.

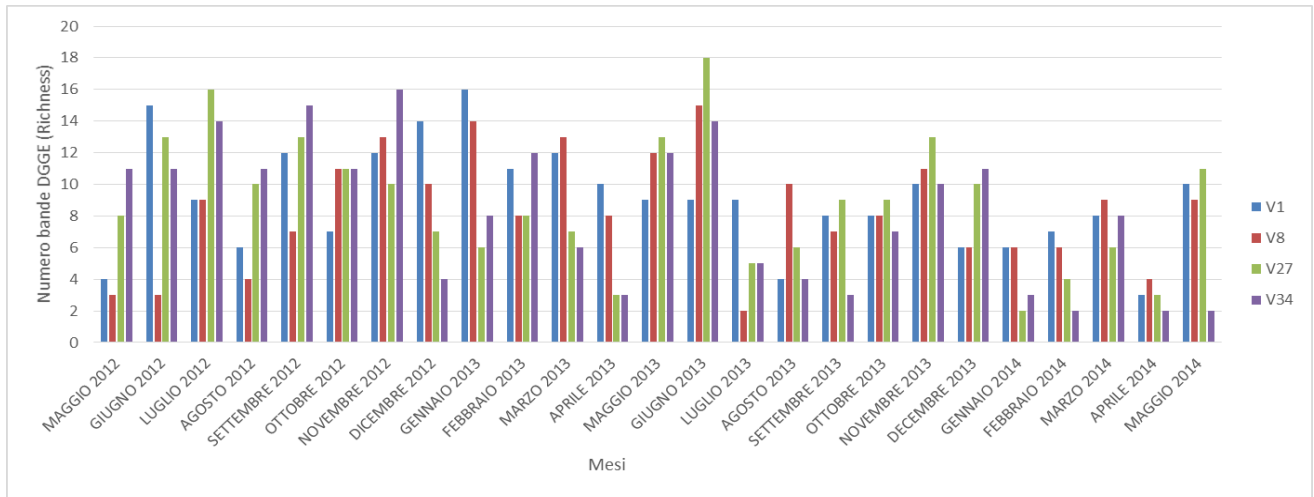


**Fig. 4.28** Diagramma NMDS relativo al **vascone**. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Variabili biologiche: conte totali e vitali (cell/ml); matrice delle bande per i profili DGGE, numero di bande DGGE.

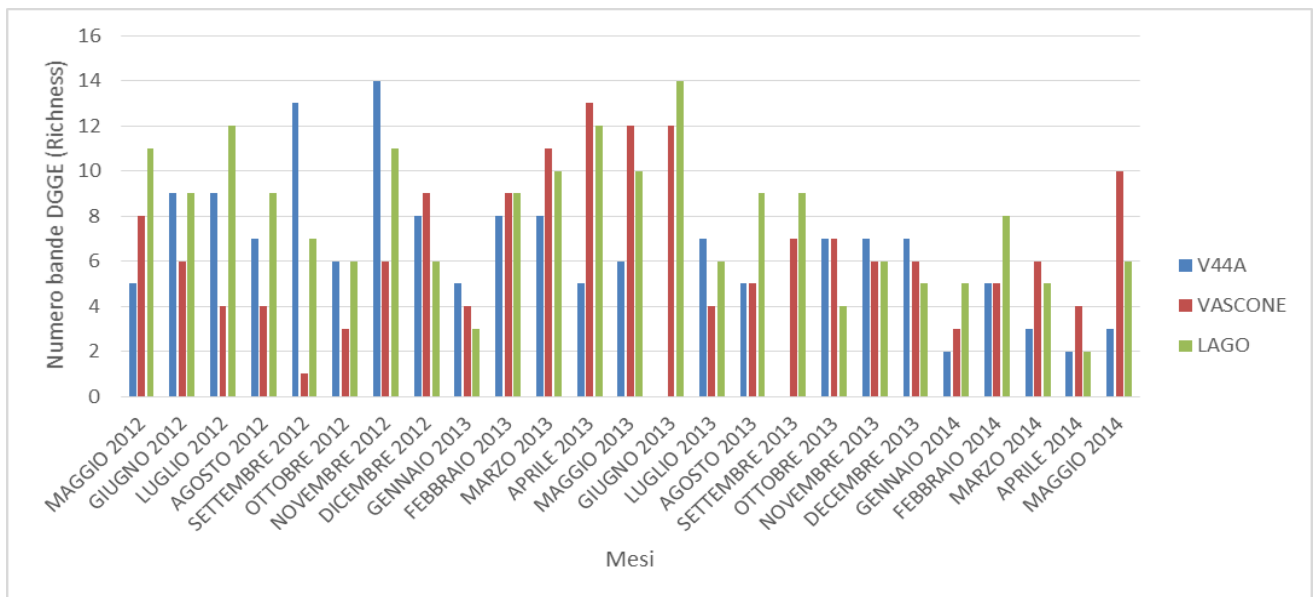


**Fig. 4.29** Diagramma NMDS relativo al campione **lago**. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Variabili biologiche: conte totali e vitali (cell/ml); matrice delle bande per i profili DGGE, numero di bande DGGE.

biologiche: conte totali e vitali (cell/ml); matrice delle bande per i profili DGGE, numero di bande DGGE.

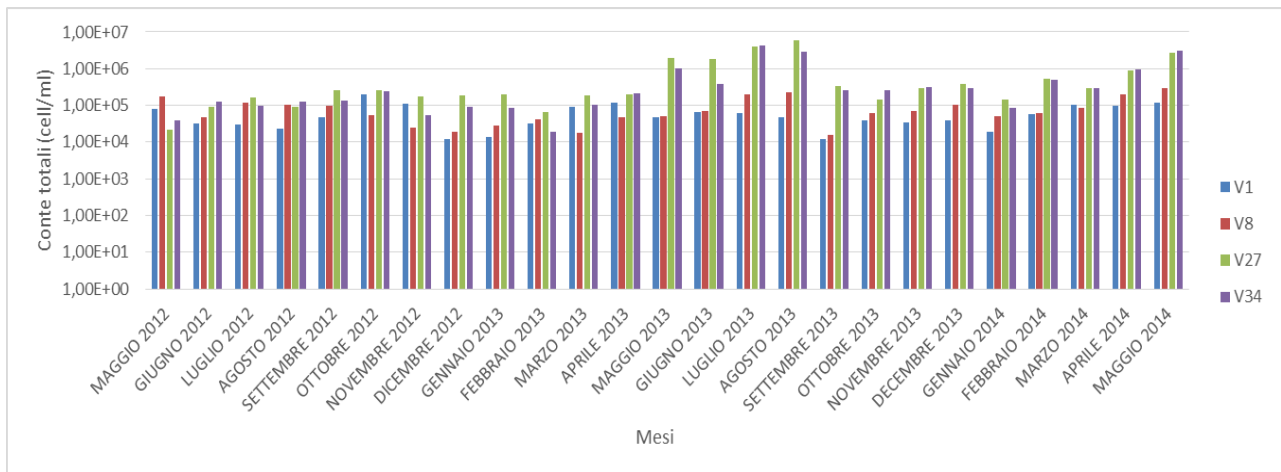


(a)

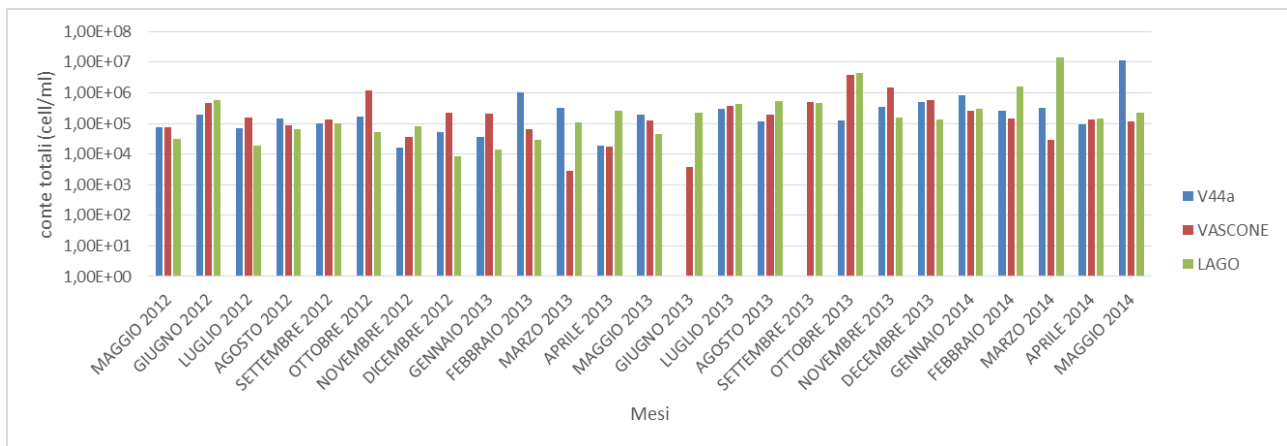


(b)

**Fig. 4.30** Numero di bande DGGE (richness) rilevato nel corso di due anni di campionamento per le vasche: V1, V8, V27, V34 (a); V44 a, vascone e lago (b).



(a)



(b)

**Fig. 4.31** Istogramma in scala logaritmica dei valori medi delle conte totali e vitali (cell/ml) rilevati nel corso di due anni di campionamento per le vasche: V1, V8, V27, V34 (a); V44 a, vascone e lago (b). La Dev. St. è inferiore al 10%.

Parametri chimici (mg/L)	V1	V8	V27	V34	V44A	VASCONE	LAGO
Cl <sup>-</sup>	11125,25	12710,27	16400,49	33138,53	10700,36	90597,73	93,70
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	12,66	8,95	21,86	22,85	ND	56,52	1,53
Br <sup>-</sup>	ND	17,01	17,64	25,14	ND	82,89	3,59
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	15,78	284,37	27,09	40,21	27,35	63,61	3,55
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	424,75	527,14	1000,21	1291,84	732,47	2898,44	85,38
Na <sup>+</sup>	14160,30	14163,02	22112,51	31824,97	22780,84	123766,04	616,52
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	348,36	ND	ND	1141,43	ND	ND	ND
K <sup>+</sup>	577,31	5017,62	5577,62	5111,74	3211,73	11464,13	355,95
Ca <sup>2+</sup>	ND	463,02	1505,82	567,69	446,08	867,87	47,48
Mg <sup>2+</sup>	ND	559,48	5089,88	6311,78	4191,53	11989,66	63,20

**Tabella 4.6** Valori medi dei parametri chimici (mg/L) di alcune vasche campionate nel mese di luglio 2013. La dev. St. è inferiore al 10%.

### 4.2.3 Analisi statistica multivariata NMDS e indici di biodiversità

L'NMDS è stato eseguito inoltre, per ogni sito campionato e per tutti i mesi di campionamento, per la ricerca dei rapporti tra gli indici di biodiversità calcolati a partire dai profili di fingerprinting e i dati ambientali rilevati. Gli indici di biodiversità utilizzati erano: la richness, gli indici di Shannon e Simpson e la evenness. Le variabili ambientali utilizzate erano, come per la precedente analisi NMDS, le seguenti: salinità, ossigeno disciolto, temperatura, pH, concentrazione di clorofeopigmenti e BOD<sub>5</sub>.

Per eseguire l'analisi, i dati ambientali sono stati preventivamente normalizzati dividendo i valori ottenuti per ciascuna variabile con il massimo valore rilevato per essa e i diagrammi di ordinamento sono stati generati utilizzando il coefficiente di similarità Bray-Curtis. Nelle figure sottostanti sono riportati i diagrammi relativi alle vasche 8, 27, 35, 44 a e vascone (Figg. 4.32-4.36).

Anche in questo caso, ossigeno e temperatura sono rappresentati da vettori opposti fatta eccezione per la vasca 8 (Fig. 4.32) che, come nel caso della vasca 1 e del lago per la precedente analisi, è caratterizzata da una minore escursione termica rispetto alle vasche con maggiore salinità e minore profondità. Nelle saline infatti, man mano che ci si allontana dai canali d'ingresso dell'acqua marina, la profondità va riducendosi per favorire l'evaporazione del cloruro di sodio, mentre la salinità cresce creando un tipico gradiente salino.

Per quanto riguarda la vasca 8 inoltre, per i mesi di febbraio, aprile e ottobre 2013 esiste una forte correlazione positiva tra la biodiversità e l'ossigeno disciolto. Per alcuni dei mesi invernali, è invece possibile notare una forte correlazione positiva con la salinità, il pH e la concentrazione di clorofeopigmenti.

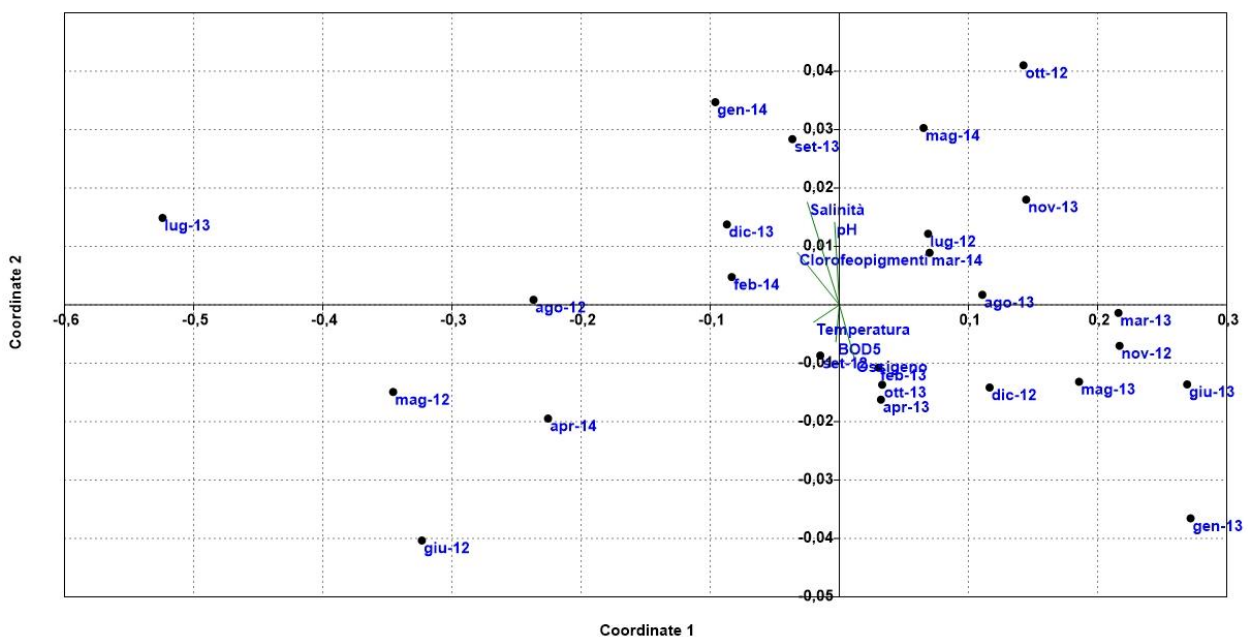
Per la vasca 27 (Fig. 4.33) la diversità è positivamente correlata soprattutto a clorofeopigmenti e temperatura. Si tratta di una vasca che ha registrato sempre una biomassa fototrofa piuttosto elevata se paragonata alle altre. Anche la temperatura risulta essere un parametro che incide sulla biodiversità, infatti le acque di tale sito sono state caratterizzate da notevoli differenze nella temperatura rilevata nel corso dei mesi come è possibile osservare dalla figura 4.37.

Per la maggior parte dei mesi di campionamento, il diagramma della vasca 35 (Fig. 4.34) mostra una correlazione positiva con gli indici di diversità soprattutto per ossigeno, pH, clorofeopigmenti e BOD<sub>5</sub>. Al contrario, salinità e temperatura sembrerebbero avere una minore influenza sui valori degli indici.

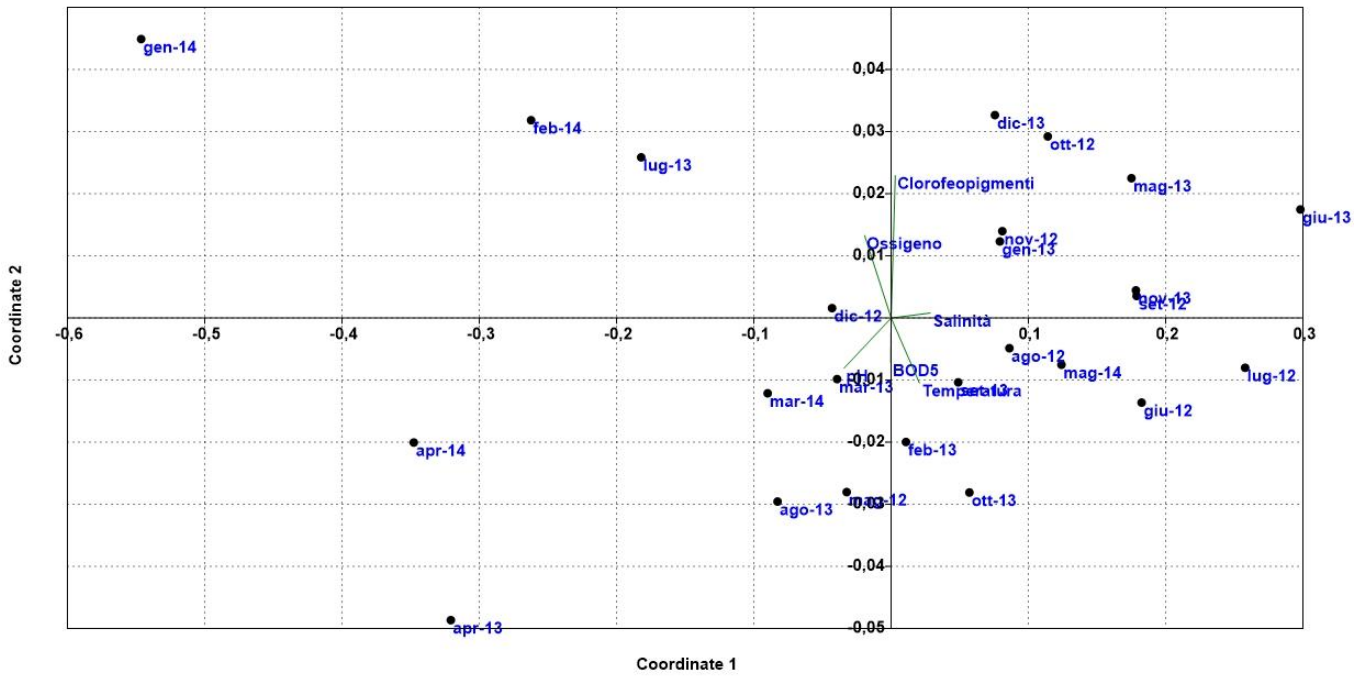
Per quanto riguarda la vasca 44 A (Fig. 4.35), i parametri maggiormente correlati alla biodiversità nella maggior parte dei mesi di campionamento, in modo particolare in quelli estivi ed invernali, sono la salinità e la temperatura. Si tratta infatti di un sito che nel corso della campagna di

campionamento ha mostrato differenze significative nei valori di salinità e temperatura rilevati come è possibile osservare dalle figure 4.38 e 4.39. Ossigeno, clorofeopigmenti, BOD<sub>5</sub> e pH sembrerebbero, al contrario, essere scarsamente correlati alla biodiversità batterica. Tale risultato emerge anche dal diagramma relativo al vascone (fig. 4.36).

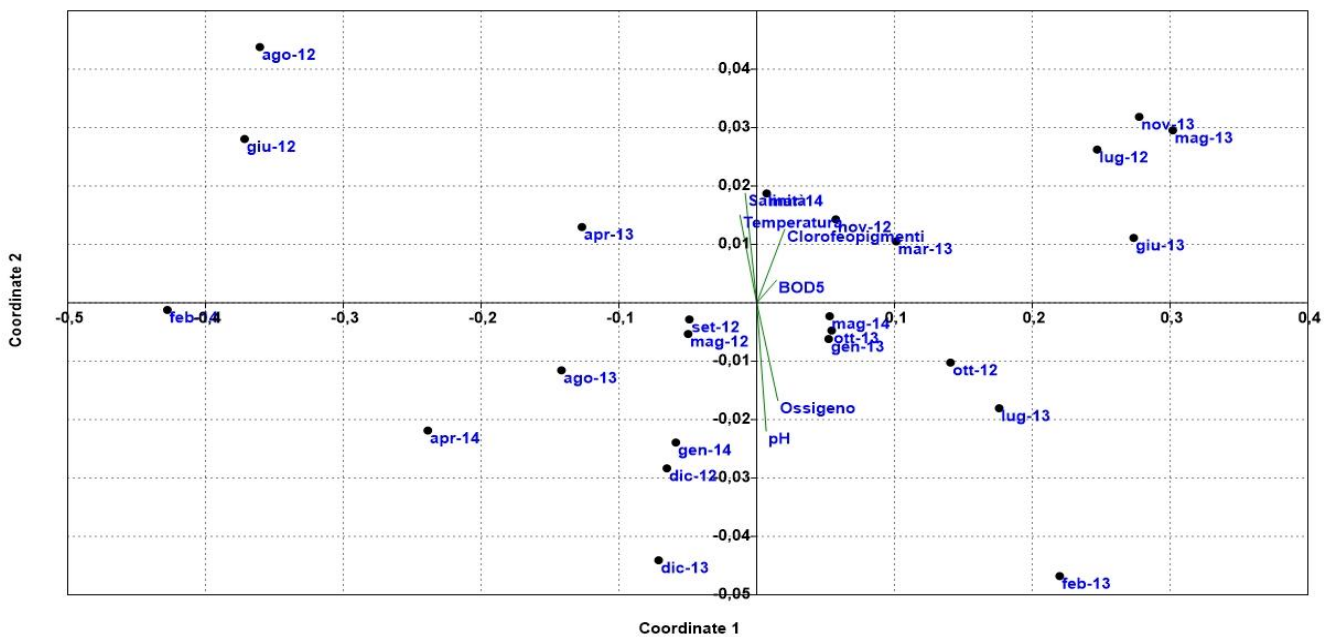
Per quest'ultimo sito inoltre, gli indici rilevati per i mesi che dal diagramma appaiono a sinistra del secondo asse di ordinamento (verticale), mostrano una correlazione positiva con la concentrazione dei clorofeopigmenti. In modo particolare, maggio 2012 e ottobre 2013 hanno registrato i valori più elevati di biomassa fototrofa rispetto ai due anni.



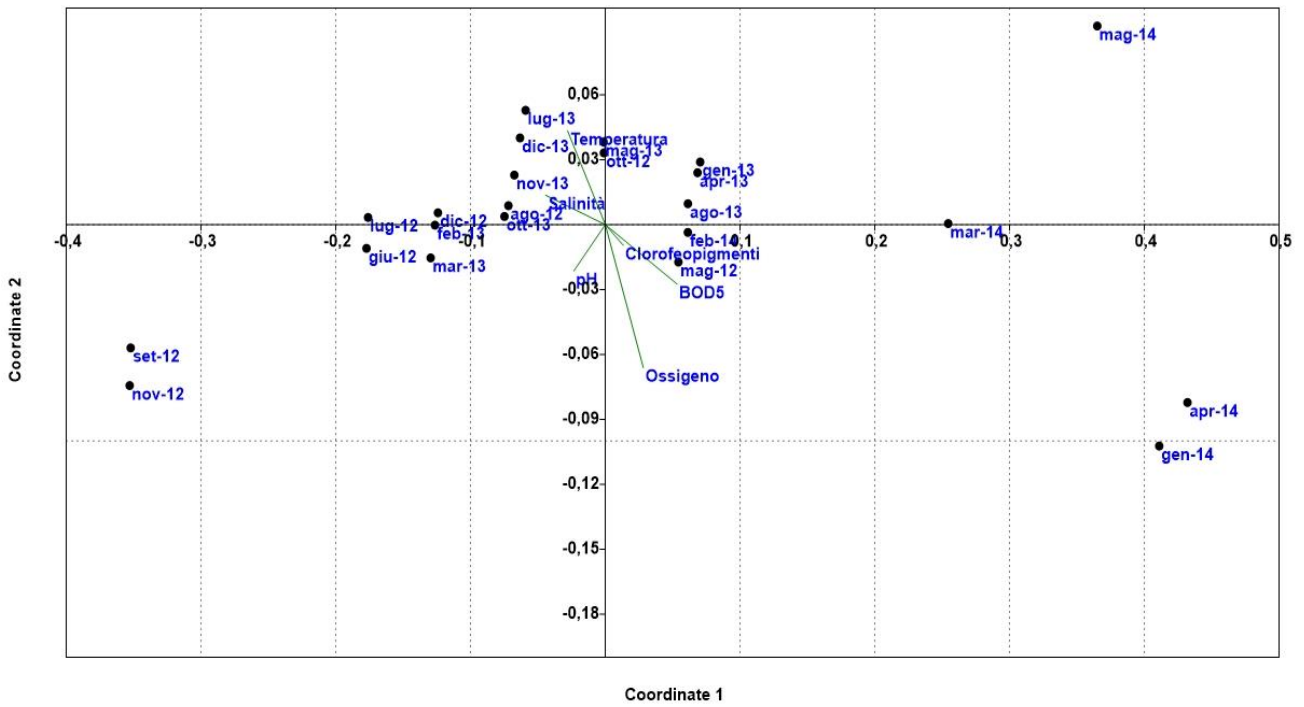
**Fig. 4.32** NMDS con indici di biodiversità per la VASCA 8. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti (µg/L), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Indici ecologici: richness, Shannon-Wiener, Simpson e evenness.



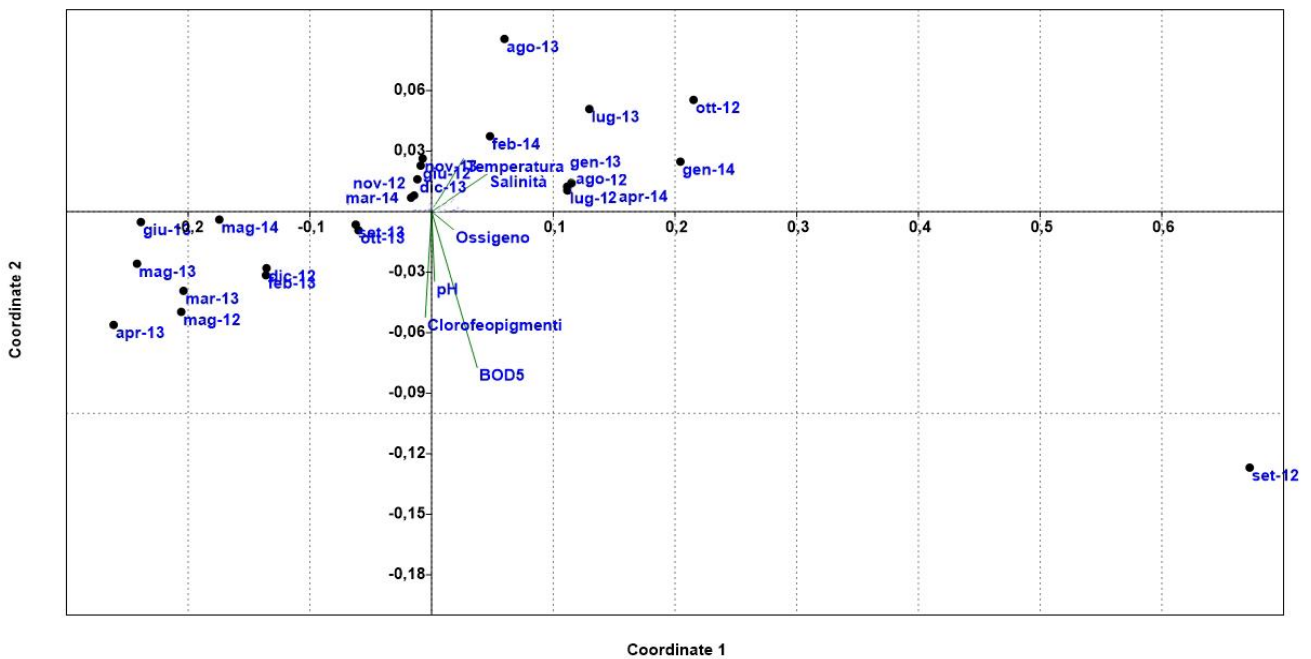
**Fig. 4.33** NMDS con indici di biodiversità per la VASCA 27. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Indici ecologici: richness, Shannon-Wiener, Simpson e evenness.



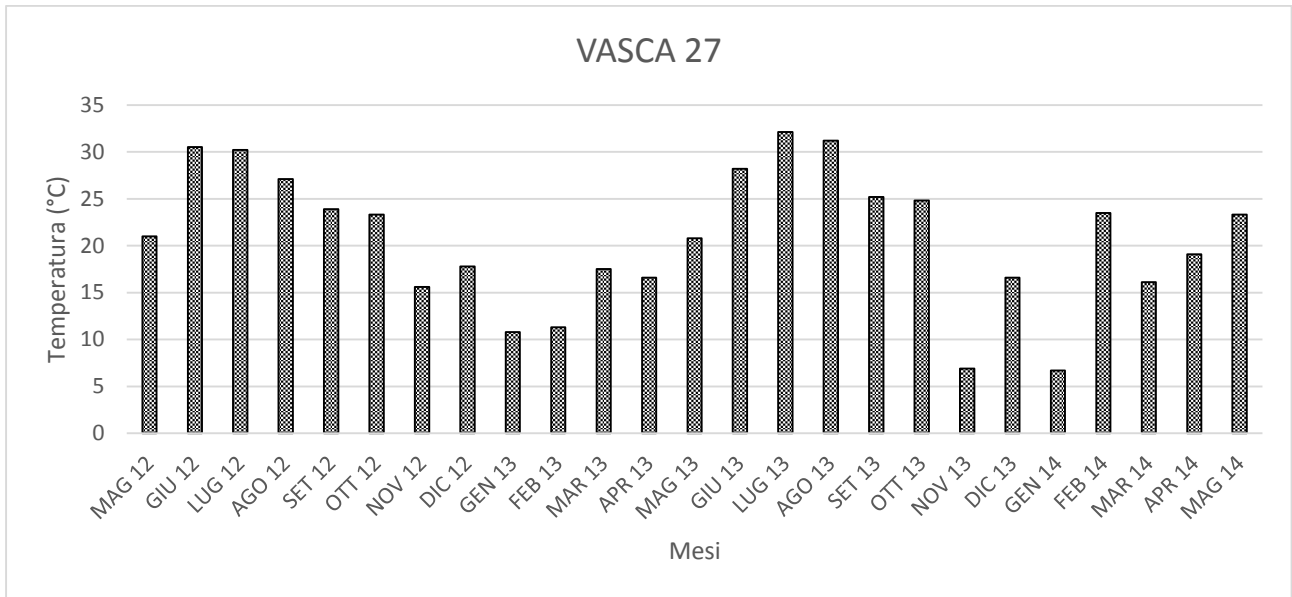
**Fig. 4.34** NMDS con indici di biodiversità per la VASCA 35. Parametri operazionali: Salinità (%), temperatura (°C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Indici ecologici: richness, Shannon-Wiener, Simpson e evenness.



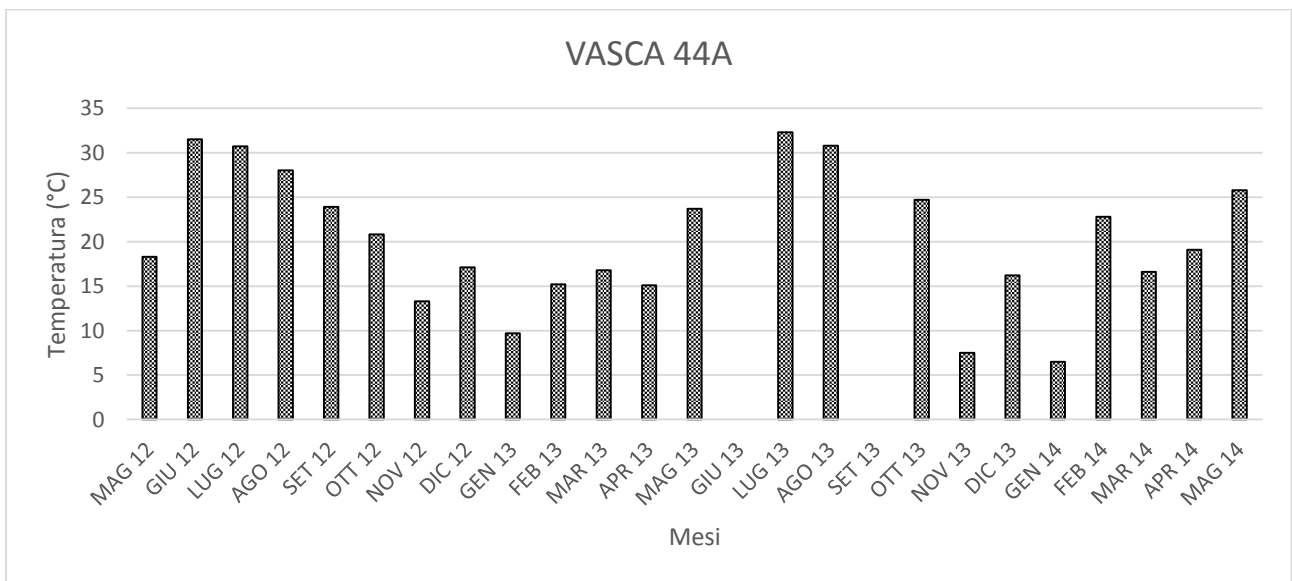
**Fig. 4.35** NMDS con indici di biodiversit  per la VASCA 44A. Parametri operazionali: Salinit  (%), temperatura ( C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Indici ecologici: richness, Shannon-Wiener, Simpson e evenness.



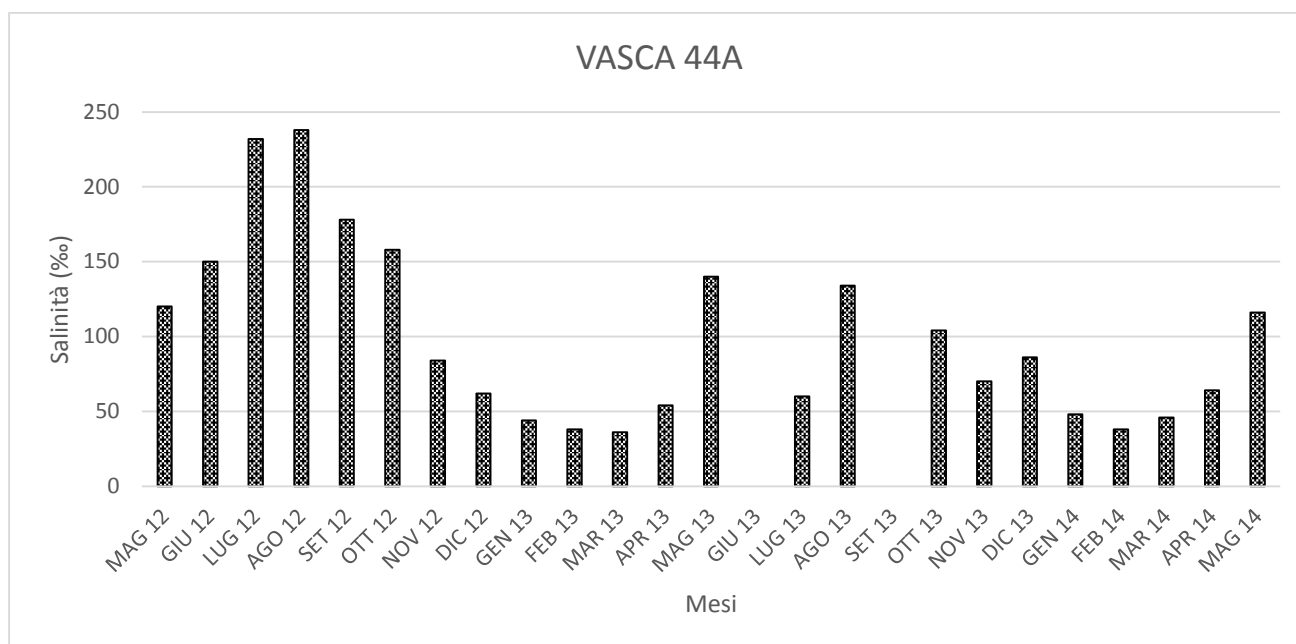
**Fig. 4.36** NMDS con indici di biodiversit  per il vascone. Parametri operazionali: Salinit  (%), temperatura ( C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Indici ecologici: richness, Shannon-Wiener, Simpson e evenness.



**Fig. 4.37** Temperatura dell'acqua (°C) rilevata nel corso dei due anni di campionamento per la vasca 27.



**Fig. 4.38** Temperatura dell'acqua (°C) rilevata nel corso dei due anni di campionamento per la vasca 44A (nei mesi di giugno e settembre 2013 la vasca è risultata asciutta).



**Fig. 4.39** Salinità (‰) rilevata nel corso dei due anni di campionamento per la vasca 44A (nei mesi di giugno e settembre 2013 la vasca è risultata asciutta).

#### 4.2.4 L'organizzazione funzionale delle comunità

L'organizzazione funzionale (*Fo*) di una comunità microbica è il risultato dell'azione dei microrganismi più adatti alle interazioni con l'ambiente, che tendono a diventare dominanti all'interno della struttura della comunità (Marzorati *et al.*, 2008; Gómez-Silván *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Il rapporto tra funzionalità e struttura di una comunità microbica è stato affermato da Fernandez *et al.* (1999). Questi autori hanno studiato il comportamento di differenti comunità microbiche in condizioni perturbate e suggeriscono che la conservazione di una data funzionalità è garantita da una comunità flessibile con una minoranza di membri che possono diventare dominanti in breve tempo dopo una perturbazione significativa.

Quindi, è possibile definire l'organizzazione funzionale come la capacità di una comunità di essere organizzata con una adeguata distribuzione tra microrganismi dominanti e resilienti. Questi ultimi rappresentano una minoranza, che può diventare dominante dopo una perturbazione ambientale. Questa condizione dovrebbe consentire di contrastare l'effetto di improvvise condizioni stressanti (Marzorati *et al.*, 2008).

La funzionalità della comunità può essere rappresentata graficamente dalle curve di Pareto-Lorenz (PL) (Lorenz, 1905), le quali sono state applicate ai profili di fingerprinting, come descritto precedentemente (vedi cap. 3, par. 3.3.7). L'interpretazione numerica delle curve si ottiene dopo aver eseguito una proiezione verticale e parallela all'asse y che intercetta il 20% dell'asse x (Wittebolle *et al.*, 2008). I valori  $F_o$  sono espressi come percentuale. La figura 4.40 riporta un grafico con i vari livelli di organizzazione funzionale. L'uniformità perfetta è rappresentata dai 45° diagonali, significa che tutte le specie della comunità hanno lo stesso numero di individui.

Valori bassi di  $F_o$  (intorno al 25%) indicano una comunità con alta uniformità, in cui il numero di individui in ogni specie è molto simile e non vi è una struttura interna ben definita in termini di specie dominanti. Poiché non ci sono specie presenti a concentrazioni elevate, potrebbe essere necessario un tempo relativamente lungo per contrastare gli effetti di un'esposizione ad uno stress improvviso.

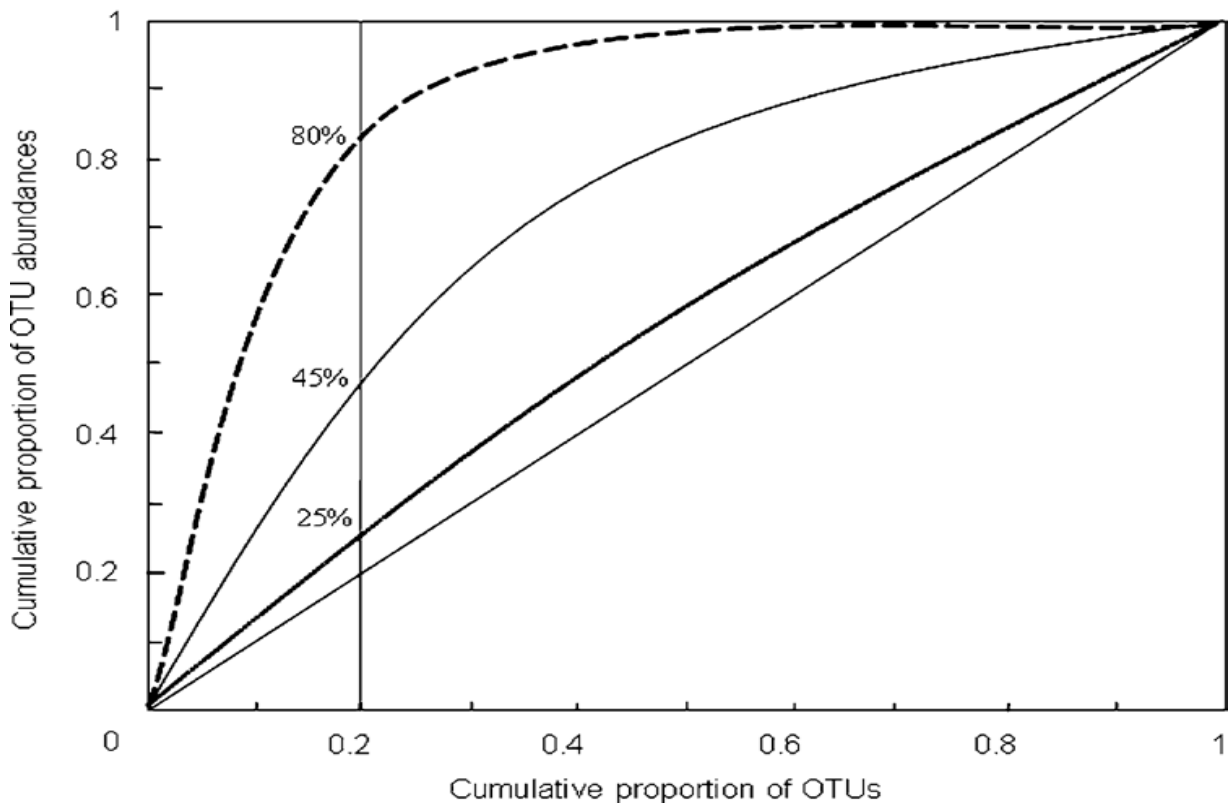
Al contrario, un valore medio di  $F_o$  (intorno al 45%) è tipico di una comunità con poche specie (20%) che sono dominanti e più adattate alle condizioni ambientali (Marzorati *et al.*, 2008). Tutte le altre specie (80%) sono numericamente inferiori. Tuttavia, a causa della elevata concentrazione di alcune specie, la comunità può potenzialmente affrontare mutevoli condizioni ambientali e preservarne la funzionalità. Infine, elevati valori di  $F_o$  (intorno all'80%) rappresentano una comunità molto specializzata in cui una piccola quantità di specie è dominante e tutti gli altri sono presenti in numero ridotto, con una grande differenza tra i due gruppi. Questa comunità può essere altamente organizzata; tuttavia, essendo vulnerabile ai cambiamenti esterni, potrebbero essere necessari tempi di recupero lunghi dopo intensi eventi perturbanti.

Nelle figure 4.41-4.43 sono riportate le curve di Pareto-Lorenz per le vasche campionate nei mesi di agosto 2012, marzo 2013 e maggio 2012, caratterizzati rispettivamente da salinità massima, minima e intermedia rispetto all'intero periodo di campionamento. Inoltre in ciascun grafico è riportato il valore medio di  $F_o$  calcolato tra i vari siti di campionamento. I valori medi di  $F_o$  per i mesi di agosto 2012 e maggio 2012 risultano essere rispettivamente del 35% e del 32%. Queste comunità quindi risultano avere una medio-bassa organizzazione funzionale. In termini ecologici rappresentano comunità con elevata evenness, in cui quindi non è presente una struttura interna ben definita in termini di specie dominanti e, allo stesso tempo, sono comunità in grado di reagire al mutare delle condizioni ambientali, preservando la loro funzionalità. Questi risultati sembrerebbero adattarsi all'ambiente delle saline, caratterizzato da elevata instabilità dei parametri ambientali a cui solo una comunità con queste caratteristiche sarebbe in grado di far fronte.

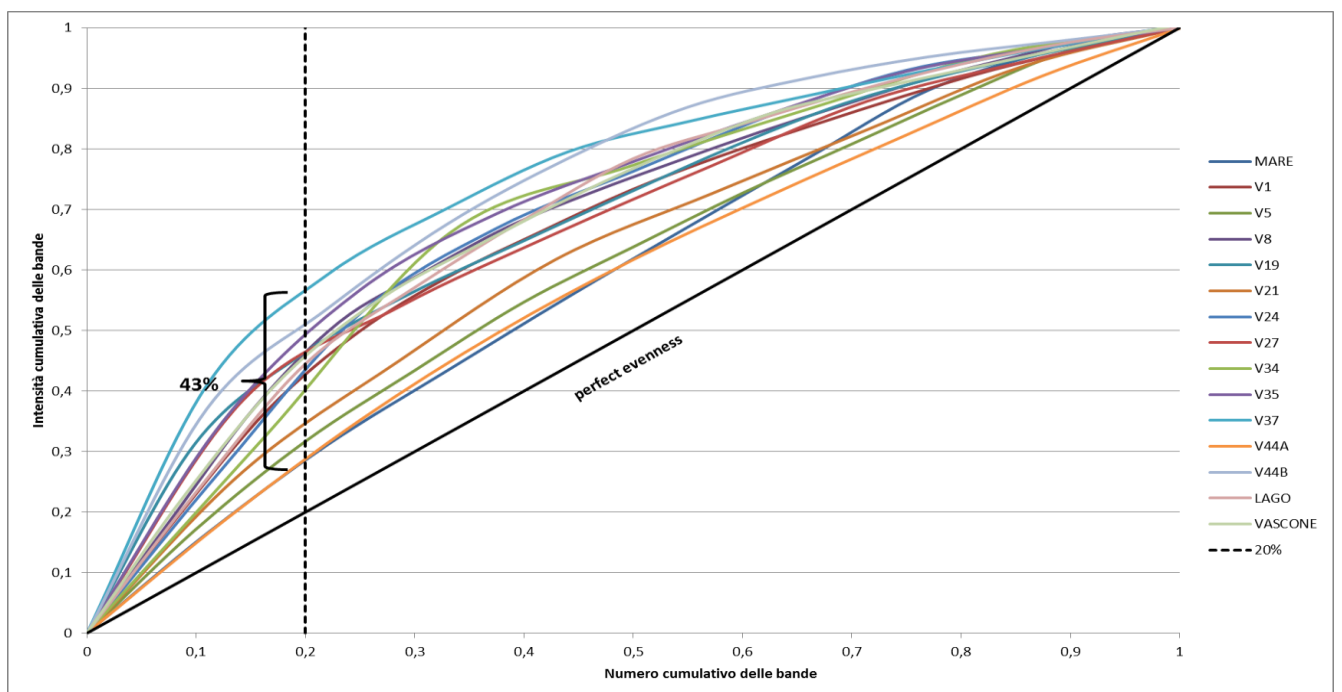
Per quanto riguarda il mese di marzo 2013 invece, il valore medio di  $F_o$  sale al 43%. Descrive quindi comunità con elevata concentrazione di poche specie e presenza di molte altre presenti con

minore concentrazione. Si tratta del mese in cui sono stati registrati i valori di salinità più bassi rispetto ai due anni di campionamento. In questo caso quindi, le condizioni ambientali diventano più permissive per la vita di ulteriori taxa microbici. A causa di un aumento delle potenzialità fisico-chimiche dei siti campionati, vi è quindi anche un aumento dell'organizzazione funzionale della comunità, che, per l'elevata concentrazione di alcune specie e la disponibilità di molte altre, può potenzialmente affrontare mutevoli condizioni ambientali e preservarne la funzionalità.

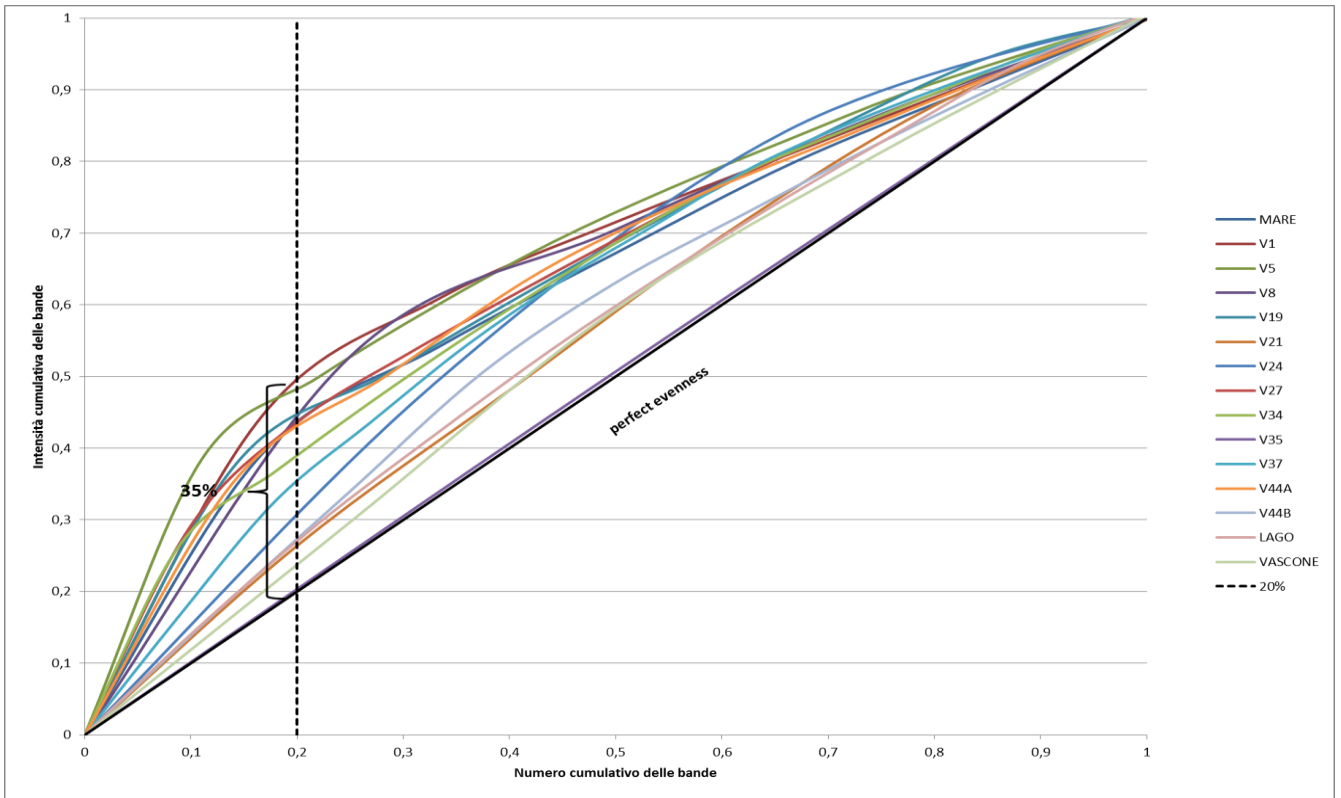
Nelle figure 4.44-4.45 sono riportate le curve di Pareto-Lorenz per il sito vascone nel corso dei primi due anni di campionamento. I valori di organizzazione funzionale più alti sono stati rilevati per i mesi di giugno ed agosto 2013 (intorno al 60%), indicando la presenza di comunità con una medio-alta organizzazione funzionale, in cui sono presenti poche specie dominanti e molte altre in minor concentrazione. Durante i mesi di dicembre 2012 e marzo, luglio e novembre 2013 si sono registrati valori intorno al 45%, descrivendo quindi comunità con poche specie dominanti e più adattate alle condizioni ambientali e molte altre numericamente inferiori. In questo caso, a causa della elevata concentrazione di alcune specie, la comunità può potenzialmente affrontare mutevoli condizioni ambientali e preservarne la funzionalità. Per 8 mesi nell'arco dei due anni (33% c.ca) sono stati rilevati valori vicini o pari a 25%, indicando quindi la presenza di comunità con elevata uniformità (evenness), in cui non è presente una struttura interna ben definita in termini di specie dominanti, e con una bassa organizzazione funzionale. Tali risultati ci permettono di evidenziare l'elevata variabilità nella struttura della comunità batterica presente nel vascone, che è stato caratterizzato, come già detto, anche da una notevole variabilità dei parametri chimico-fisici e biologici rilevati.



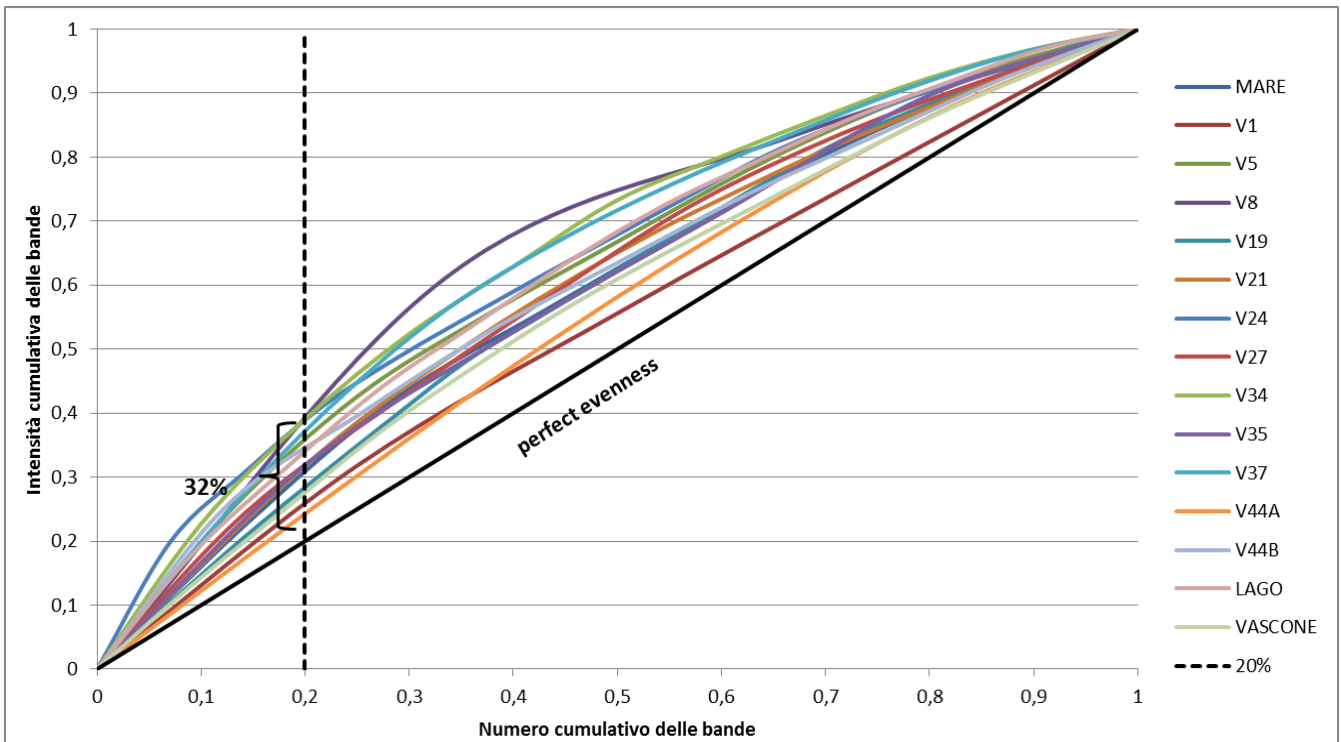
**Fig. 4.40** Curve di Pareto-Lorenz tipiche delle comunità microbiche, che mostrano differenti livelli di organizzazione funzionale (Marzorati *et al.*, 2008).



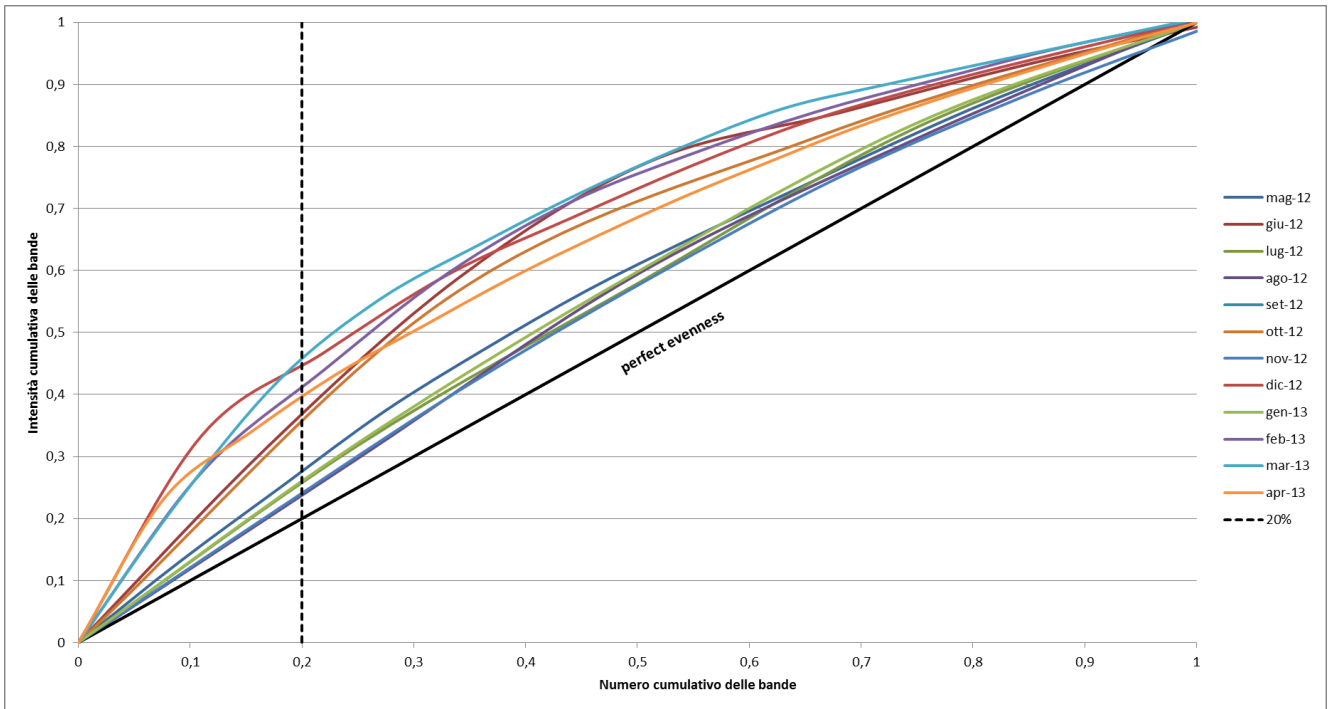
**Fig. 4.41** Curve di Pareto-Lorenz delle comunità batteriche per i siti campionati nel mese di marzo 2013.



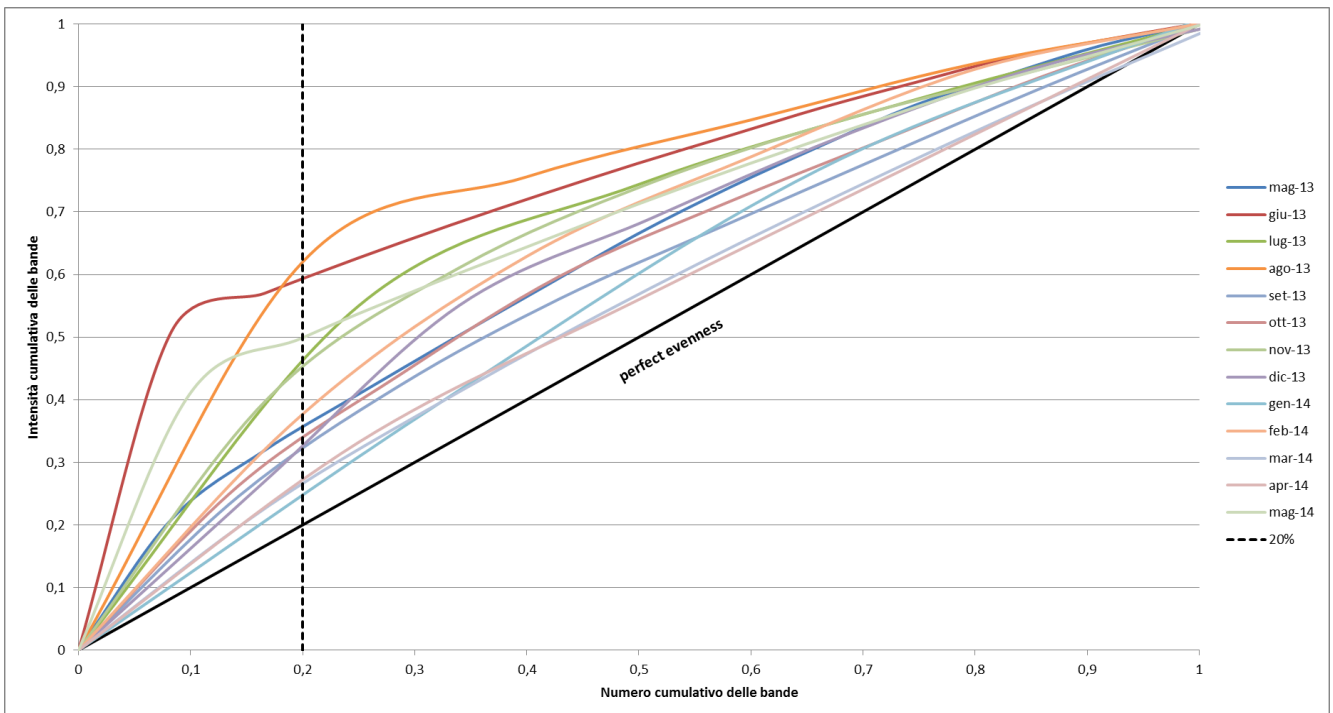
**Fig. 4.42** Curve di Pareto-Lorenz delle comunità batteriche per i siti campionati nel mese di agosto 2012.



**Fig. 4.43** Curve di Pareto-Lorenz delle comunità batteriche per i siti campionati nel mese di maggio 2012.



**Fig. 4.44** Curve di Pareto-Lorenz delle comunità batteriche presenti nel sito VASCONE nel corso del primo anno di campionamento.



**Fig. 4.45** Curve di Pareto-Lorenz delle comunità batteriche presenti nel sito VASCONE nel corso del secondo anno di campionamento.

## 4.2.5 Indice di dinamicità

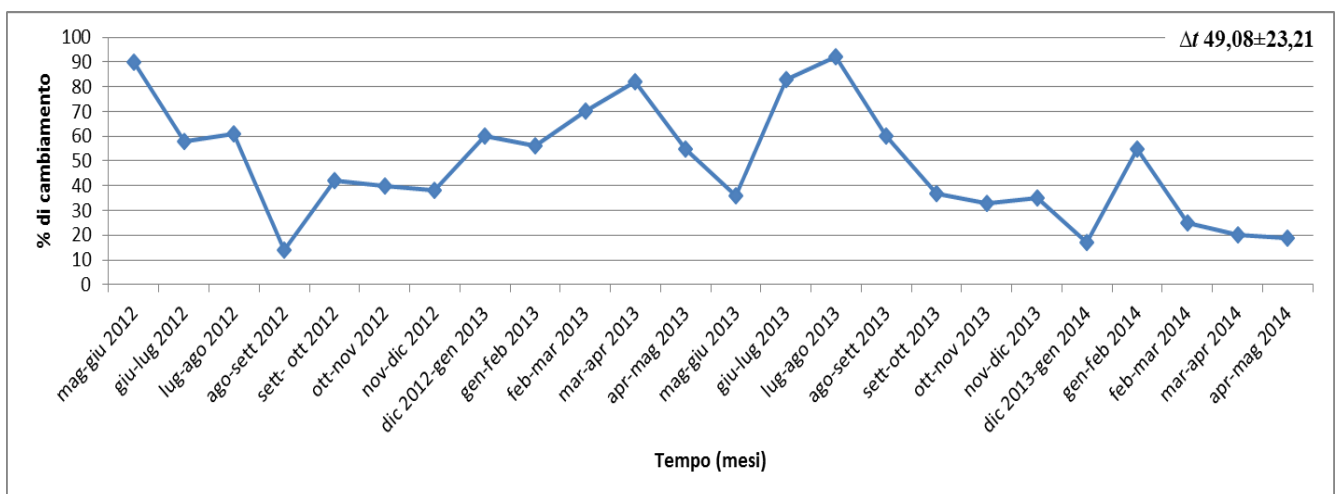
In letteratura sono disponibili dati rilevanti per quanto riguarda la diversità microbica di ambienti iperalini (Walsh *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2006; Clementino *et al.*, 2008; Tsiamis *et al.*, 2008; Pagaling *et al.*, 2009; Litchfield *et al.*, 1999), ma nella maggior parte dei casi si tratta di studi riguardanti l'isolamento e l'identificazione di coltivabili alofili e/o alotolleranti oppure riguardanti l'applicazione di metodi coltura-indipendenti su un solo campionamento. Soltanto un numero limitato di studi ha affrontato la variabilità e la dinamicità nel tempo delle comunità procariotiche presenti in tali ambienti (Koizumi *et al.*, 2004; Henriques *et al.*, 2006), che rappresentano un buon modello per lo studio dei cambiamenti della biodiversità, fornendoci informazioni su condizioni estreme per la vita (Mani *et al.*, 2014).

L'indice di dinamicità descritto da Marzorati *et al.*, (2008), descrive la stabilità di una comunità microbica nel tempo. Questo indice è basato sul tasso di cambiamento tra profili di DGGE consecutivi in un intervallo di tempo fissato e viene determinato usando la matrice di similarità delle curve densiometriche dei profili DGGE. Nelle figure 4.46 - 4.50 sono stati riportati alcuni dei grafici relativi alle Moving Window Analysis (MWA) eseguite per le vasche campionate con i rispettivi tassi di cambiamento ( $\Delta t$ ) al fine di valutare il livello di dinamicità delle comunità batteriche studiate. Questi ultimi sono stati calcolati come la media dei valori che costituiscono i punti della curva. Più elevate sono le variazioni tra i profili DGGE di due tempi di campionamento consecutivi e più elevati saranno i valori di  $\Delta t$ .

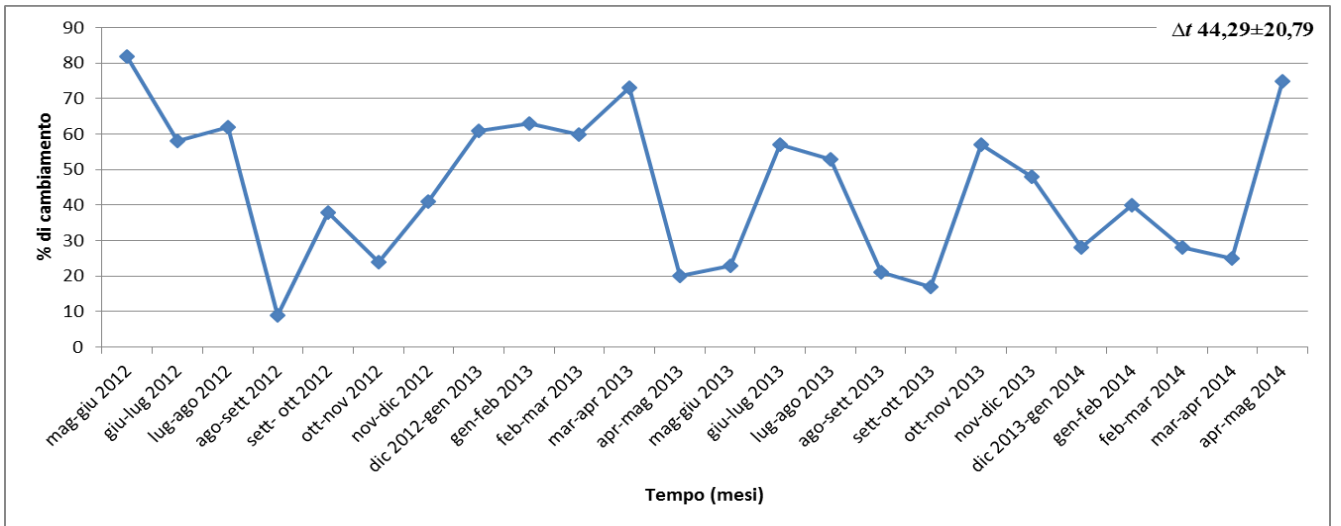
Dall'analisi dei grafici possiamo evincere che i valori dei tassi di cambiamento durante i primi due anni di campionamento sono piuttosto elevati. Per tutte le vasche è stata rilevata una elevata dinamicità nel tempo nella composizione delle comunità batteriche. Questa condizione potrebbe rappresentare una conseguenza alla variabilità delle condizioni ambientali a cui questi microrganismi sono sottoposti. I risultati ottenuti con il calcolo dell'indice di dinamicità rispecchiano quindi quelli ottenuti con le altre analisi. Il valore più elevato di  $\Delta t$  è stato registrato per il vascone ( $59,6 \pm 22,99$ ). Una possibile spiegazione potrebbe essere data dal fatto che è stato uno dei siti di campionamento che ha sempre registrato le più elevate fluttuazioni nei valori di salinità rilevati nel corso della campagna di campionamento. Ci sono però degli elementi comuni tra le curve relative ai campioni analizzati. Si registra infatti, per tutte le vasche, una percentuale di cambiamento molto elevata tra i mesi di maggio e giugno 2012 e giugno e luglio 2013. In corrispondenza di questi periodi si assiste quindi ad elevate variazioni nella composizione delle comunità microbiche presenti nelle vasche. Dall'analisi dei parametri ambientali rilevati, una possibile spiegazione per il primo arco di tempo menzionato potrebbe essere data dalla notevole

differenza di temperatura rilevata tra i due mesi (Fig. 4.51). Durante il secondo periodo citato invece le più marcate differenze si sono registrate relativamente alla presenza dei clorofeopigmenti (Fig. 4.52). Ci sono dei mesi in cui, al contrario, si assiste ad una riduzione della percentuale di cambiamento per tutte le vasche come ad esempio i mesi di ottobre e novembre 2012. In modo particolare la similarità delle comunità batteriche rilevata tra questi due mesi viene confermata anche dall'analisi di clusterizzazione relativa al vascone nel corso dei due anni di campionamento e basata sul coefficiente di correlazione di Pearson (vedi par. 4.2.1 fig. 4.18). Le percentuali più elevate di cambiamento sono state rilevate per il vascone tra i mesi di maggio e giugno 2012 (% di cambiamento pari al 100%) e tra marzo e aprile 2014 (% di cambiamento pari al 98%) (Fig. 4.50). Anche in questo caso il risultato viene confermato dall'analisi di clusterizzazione basata sul coefficiente di Pearson (par 4.2.1 fig. 4.18).

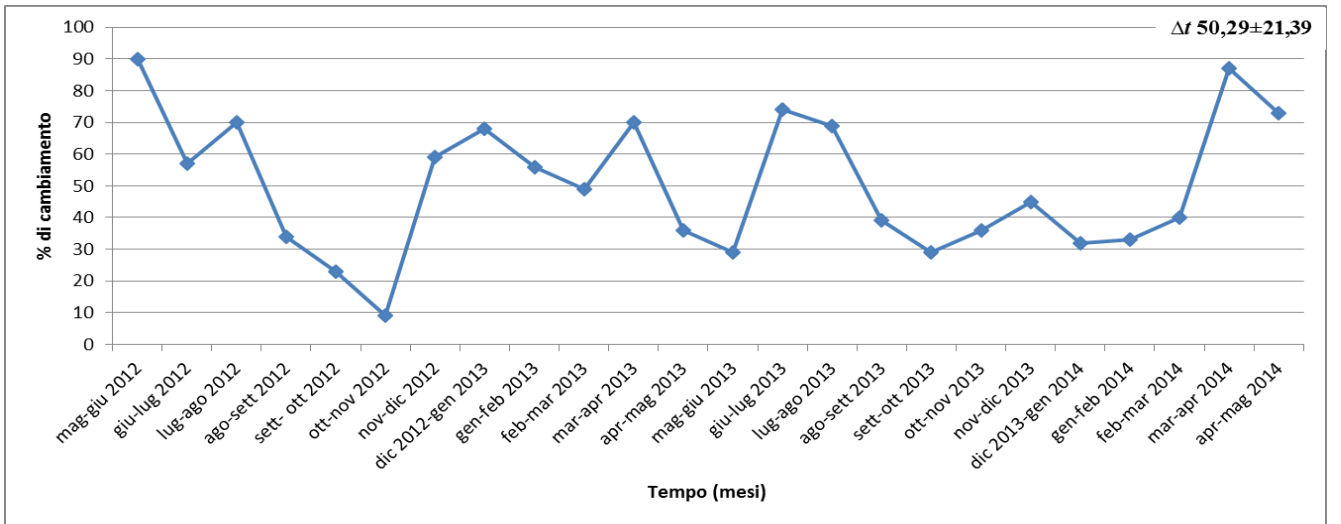
Va però sottolineato che intervalli di tempo mensili potrebbero non essere adatti per il monitoraggio di comunità microbiche che vivono in ambienti caratterizzati da così alta variabilità nei parametri che li caratterizzano. Per tale ragione sarebbe auspicabile in futuro applicare il calcolo di questo indice ai profili ottenuti per i campionamenti a cadenza settimanale.



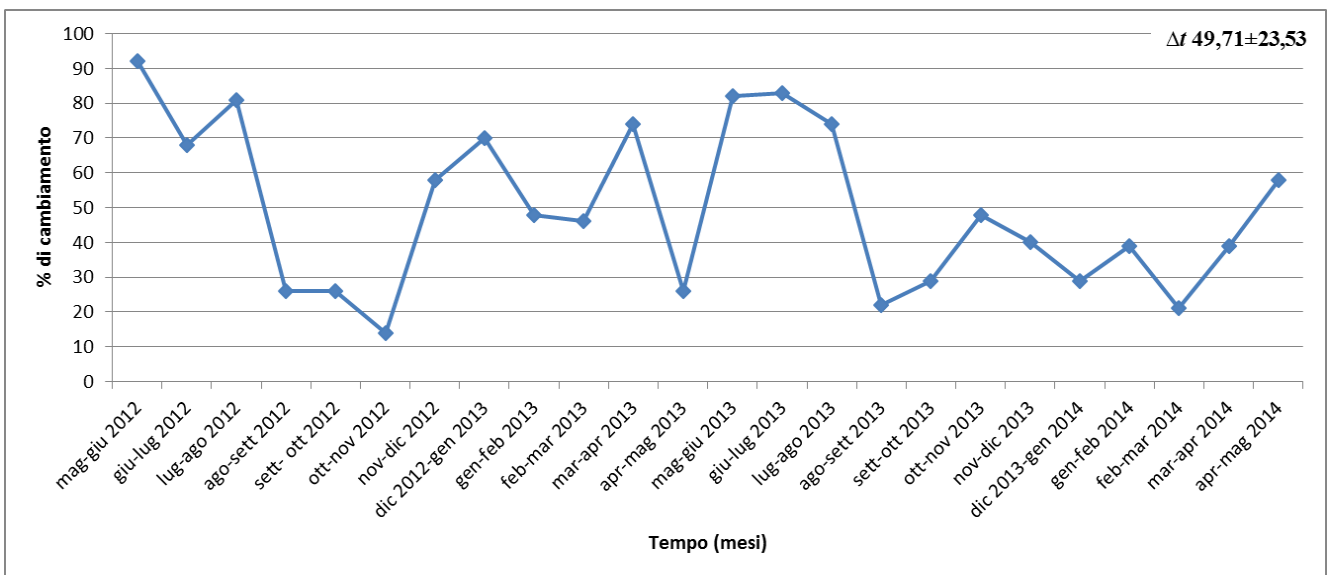
**Fig. 4.46** MWA vasca 1.



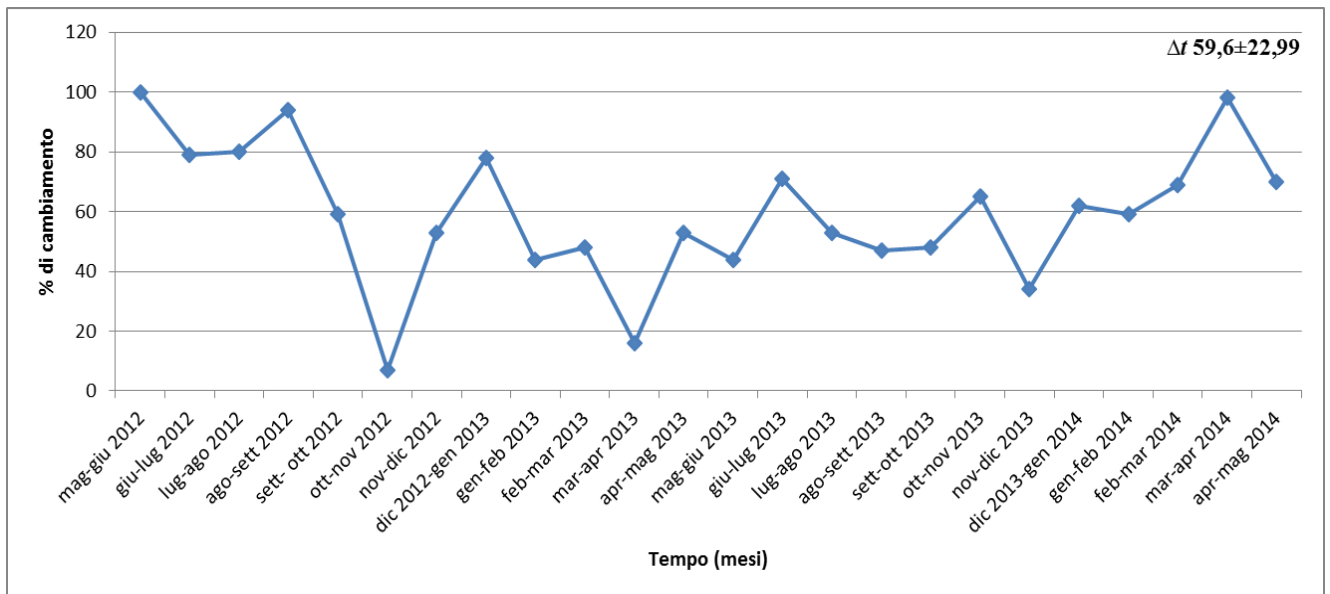
**Fig. 4.47 MWA Vasca 8.**



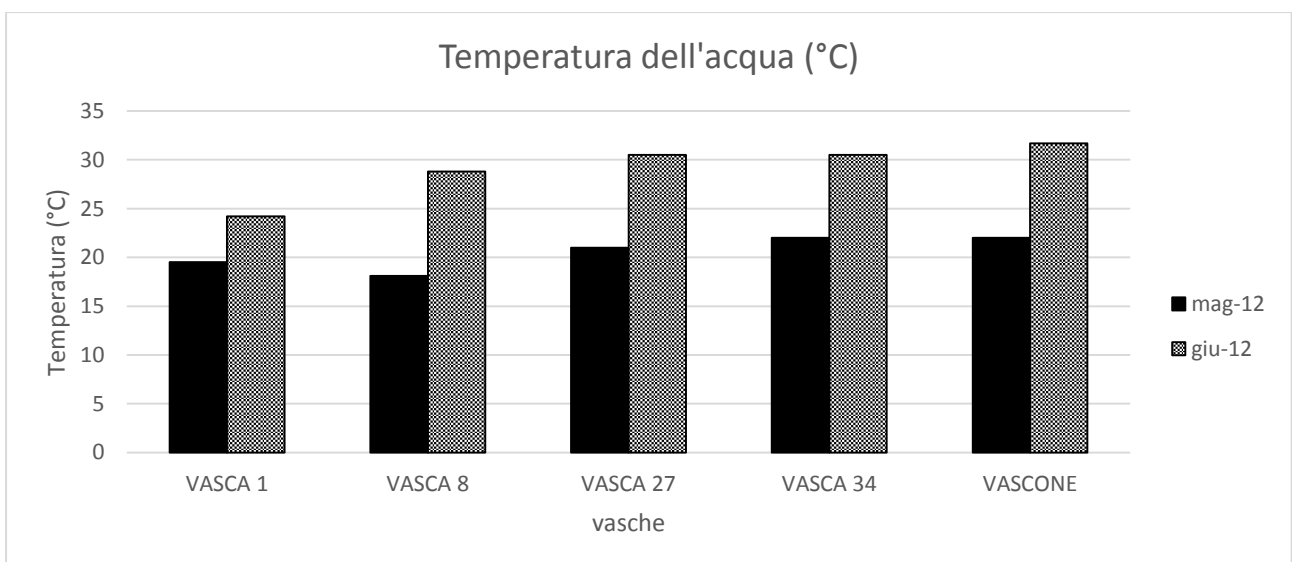
**Fig. 4.48 MWA vasca 27.**



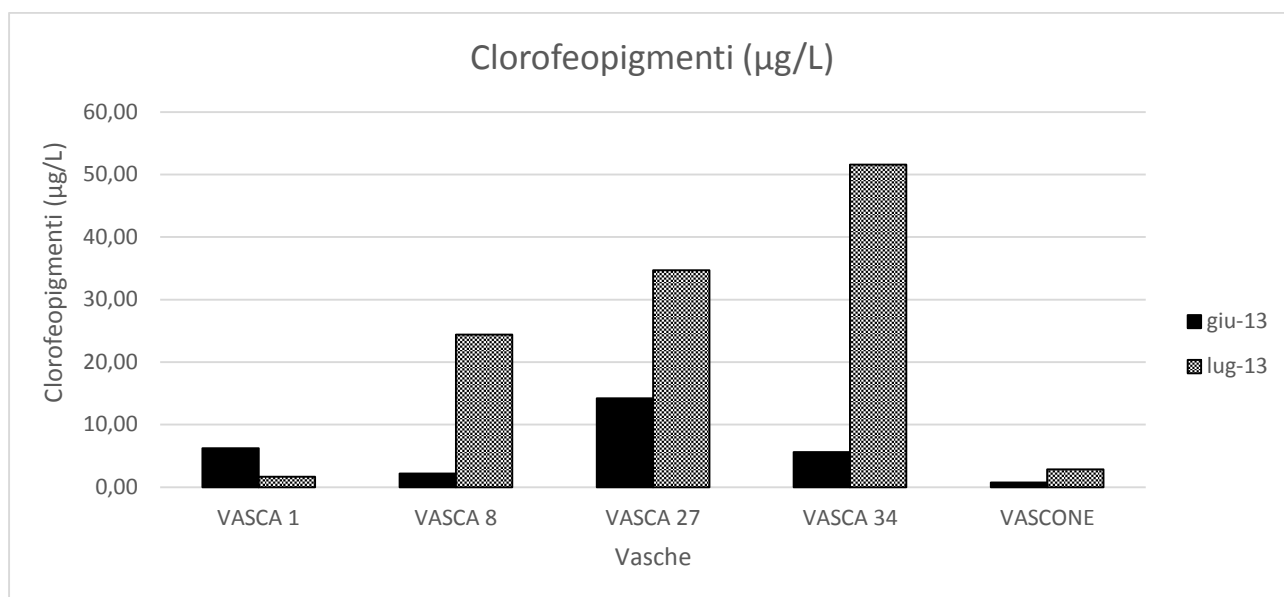
**Fig. 4.49 MWA vasca 34.**



**Fig. 4.50** MWA vascone.



**Fig. 4.51** Temperatura dell'acqua (in °C) per le vasche 1, 8, 27, 34 e vascone nei mesi di maggio e giugno 2012.



**Fig. 4.52** Valori medi di concentrazione dei clorofeopigmenti (in µg/L) per le vasche 1, 8, 27, 34 e vascone nei mesi di giugno e luglio 2013. La Dev. St. è inferiore al 5%.

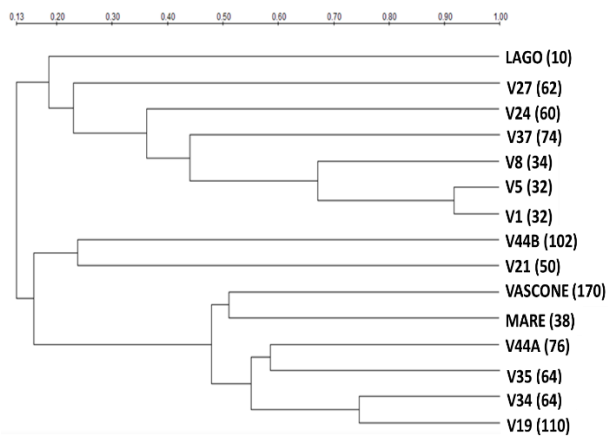
## 4.2.6 Studio delle variazioni mensili

### 4.2.6.1 Analisi di clusterizzazione dei profili DGGE

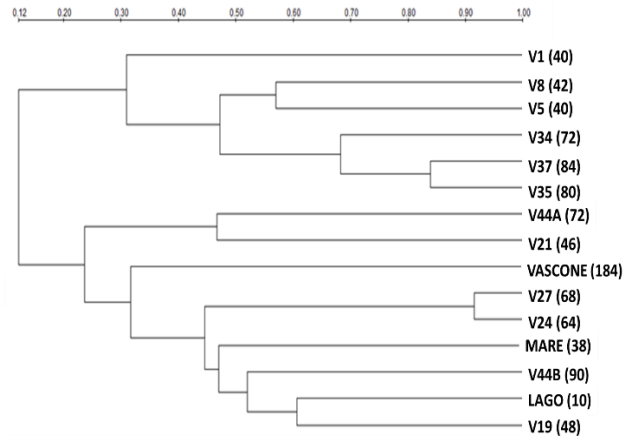
Al termine dell'attività mensile di campionamento e raccolta dati, si è proceduto con campionamenti a cadenza settimanale per tre mesi significativi a livello stagionale (maggio 2014, settembre 2014 e febbraio 2015). Non è stato scelto anche un mese autunnale in quanto è stato riscontrato, nel corso dei due anni di campionamento, che le variazioni primaverili ed autunnali sono analoghe. In questo modo è stato possibile ottenere un confronto su un ulteriore anno di campionamento almeno per alcuni mesi ed è stato possibile rilevare anche le variazioni mensili per questo ambiente. Le figure 4.53 e 4.54 riportano le analisi di clusterizzazione per i primi due mesi. I dati sono stati elaborati soltanto parzialmente e quelli relativi al campionamento del mese di febbraio 2014 sono ancora in fase di elaborazione.

I risultati confermano quelli ottenuti con la campagna di campionamento a cadenza mensile. I profili di fingerprinting per ciascun sito presentano infatti una elevata eterogeneità nel corso delle quattro settimane sia dal punto di vista del numero di bande sia della loro distribuzione nel gel. Come è possibile osservare dai dendrogrammi inoltre, vi è una grande variabilità nella

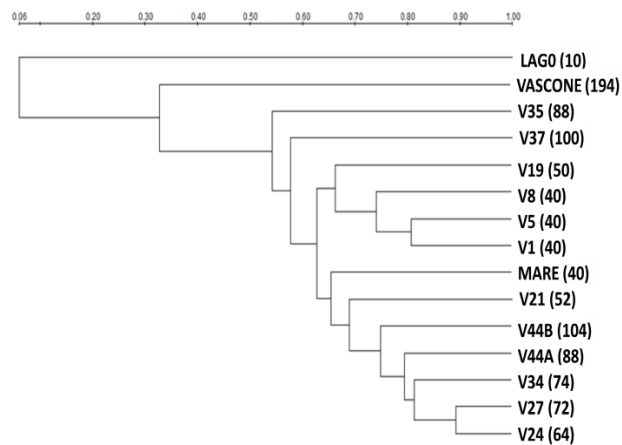
composizione delle comunità batteriche nel tempo e non è possibile, in generale, rilevare una suddivisione netta in diversi raggruppamenti, in relazione ai valori di salinità delle vasche campionate. Le Saline di Tarquinia però, come già precedentemente detto, non sono più attive nella produzione di sale, quindi i valori di salinità non devono più essere mantenuti entro range ristretti e specifici. Questo determina un aumento della variabilità nella composizione delle comunità batteriche nel tempo. Infatti le Saline di Tarquinia, dall'analisi dei valori di salinità rilevati, stanno perdendo la compartimentazione in vasche evaporanti, servitrici e salanti, tipica delle saline attive. Inoltre come già più volte spiegato, molti possono essere i fattori che influenzano la composizione della comunità microbica al momento del campionamento, tra cui: la presenza di uccelli nelle vasche campionate, le condizioni metereologiche e l'azionamento o meno delle pompe per l'ingresso di acqua marina.



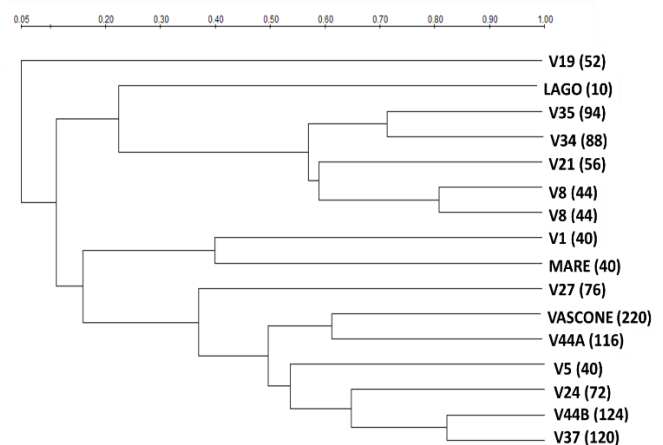
(a)



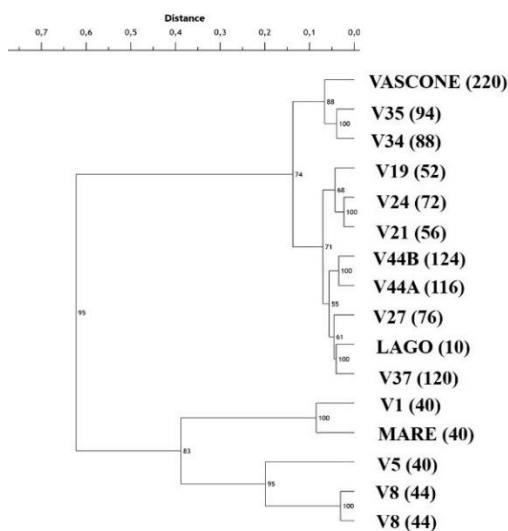
(b)



(c)



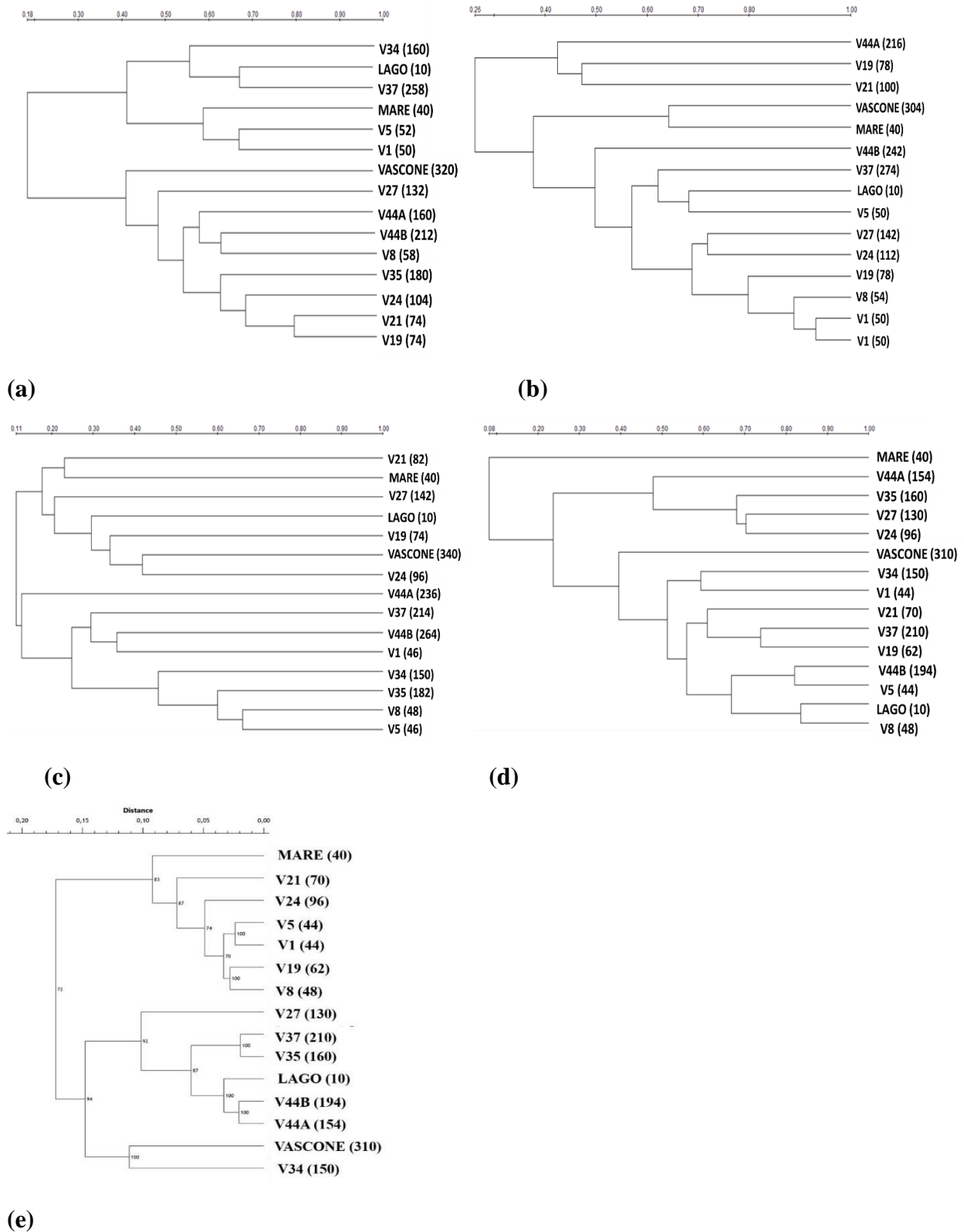
(d)



(e)

**Fig. 4.53** Analisi di clusterizzazione relativa ai gel di DGGE per lo studio delle variazioni mensili per il mese di maggio 2014 utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Dice. A) prima

settimana, B) seconda settimana, C) terza settimana, D) quarta settimana. E) Analisi di clusterizzazione per la quarta settimana di maggio 2014 utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Pearson. Tra parentesi sono riportati i valori di salinità in ‰ dei siti campionati.



**Fig. 4.54** Analisi di clusterizzazione relativa ai gel di DGGE per lo studio delle variazioni mensili per il mese di settembre 2014 utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Dice. A) prima

settimana, B) seconda settimana, C) terza settimana, D) quarta settimana. E) Analisi di clusterizzazione per la quarta settimana di settembre 2014 utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Pearson. Tra parentesi sono riportati i valori di salinità in ‰ dei siti campionati.

#### **4.2.6.2 Indici di biodiversità e analisi statistica multivariata (NMDS)**

Anche per i campionamenti a cadenza settimanale si è proceduto al calcolo degli indici di diversità: richness, Shannon-Wiener, Simpson ed evenness. Confrontando i valori di richness (Figg 4.55-4.56) nei due mesi di campionamento, non è possibile osservare una loro riduzione all'aumentare della salinità nonostante sia ben visibile dai grafici riportati nelle figure 4.59-4.60 la presenza di un gradiente salino tra le vasche campionate. In alcuni casi addirittura si rileva un aumento progressivo del numero di bande fino ad un certo valore di salinità, oltre il quale si registra nuovamente una riduzione. Questo risultato è stato confermato anche da ulteriori studi su ambienti delle saline. Ad esempio Pedrós-Alíó *et al.* nel 2000 effettuano uno studio presso le due saline attive: “La Trinitat” e “Bras del Port” in Spagna. Presso “Bras del Port” è emerso che all'aumentare della salinità vi è un incremento della biomassa di procarioti eterotrofi fino a valori di 250‰, oltre i quali si registra una riduzione e la massima attività del fito e del batterioplancton è stata rilevata per salinità intorno al 100‰, dove era massima anche la concentrazione di clorofeopigmenti.

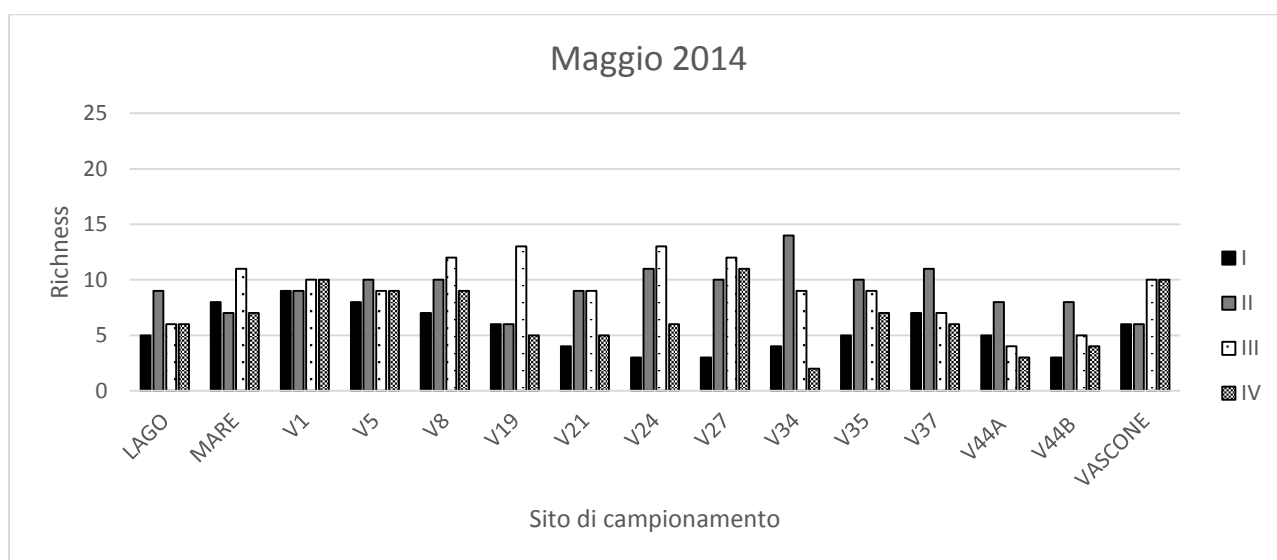
La ricchezza in specie (richness) è un però un parametro che misura esclusivamente il numero di specie in una particolare area (comunità): il numero di individui di ogni specie non è considerato. La richness quindi non è sufficiente a descrivere la biodiversità di una comunità che dipende anche dalla evenness. La evenness confronta la similarità della dimensione della popolazione per ogni specie (numero di individui) misurando quindi l'abbondanza relativa di specie diverse che contribuiscono alla richness della comunità. Una comunità dominata da poche specie abbondanti è considerata meno diversificata rispetto a quella che mostra diverse specie che hanno meno abbondanza. L'indice di diversità di Simpson è una misura della diversità che prende in considerazione sia la richness sia la evenness. Nel nostro caso, come è possibile osservare dalle figure 4.57 e 4.58, la maggior parte dei campioni ha mostrato un livello molto alto di diversità. Inoltre è possibile osservare una elevata eterogeneità nei valori calcolati tra i campioni in esame all'interno dello stesso campionamento, ma anche per ogni singolo campione nell'arco delle quattro settimane.

Dal confronto dei risultati ottenuti inoltre, è emerso un numero maggiore di bande all'interno dei profili di fingerprinting per il mese di settembre 2014 rispetto al mese di maggio dello stesso anno, nonostante si siano registrati valori di salinità più elevati. Questo risultato conferma ancora una

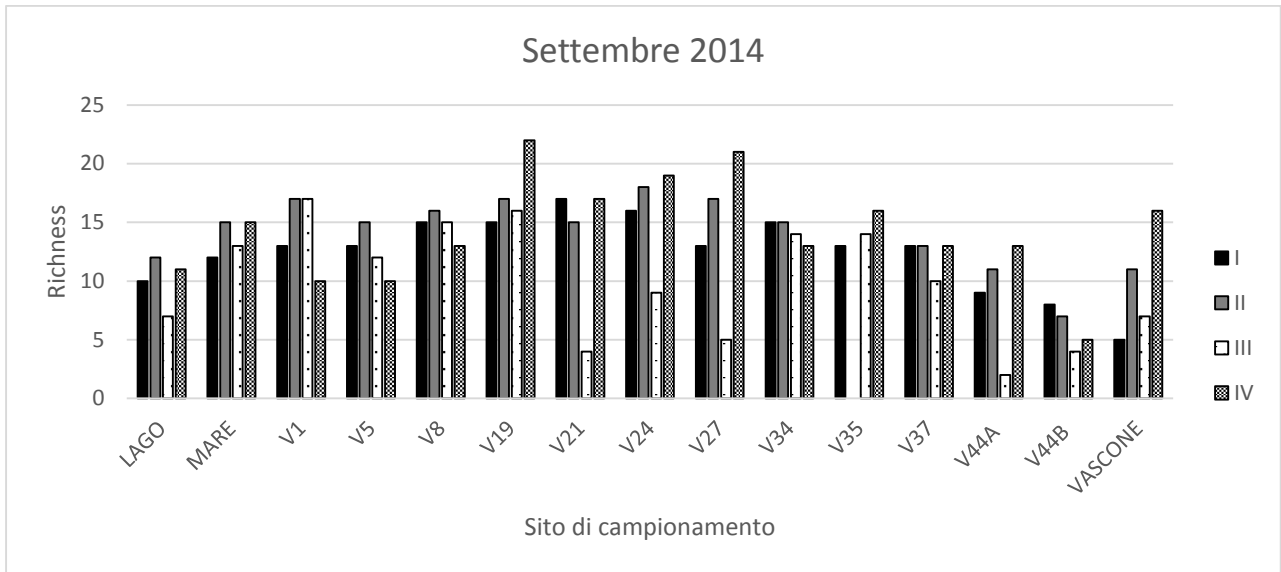
volta la complessità della variazione della biodiversità delle comunità procariotiche, portando ad escludere qualsiasi conclusione netta riguardo all'andamento del numero di OTU al variare della salinità in questi ambienti.

Al fine di poter confrontare i risultati ottenuti dai campionamenti a cadenza mensile con quelli a cadenza settimanale, è stata eseguita inoltre un'analisi NMDS utilizzando gli indici di diversità così come riportato nel paragrafo 4.2.3. Dai risultati ottenuti dai vari diagrammi, anche in questo caso, non è possibile individuare uno schema di ordinamento univoco per le varie vasche tra le variazioni degli indici e le variazioni delle variabili ambientali misurate. Ogni vasca risulta avere uno schema di ordinamento peculiare nel corso del tempo e rispetto agli altri siti di campionamento. Un risultato importante che emerge dai diagrammi è il fatto che, nel mese di maggio 2014, per 9 siti di campionamento su un totale di 15 (60% circa), l'NMDS tra gli indici di diversità e le variabili ambientali mostra ciascuna settimana disposta su un diverso quadrante del diagramma. Questo permette di rilevare ancora una volta l'elevata variabilità nella biodiversità delle comunità batteriche nel tempo per le varie vasche. Lo stesso risultato è emerso dai diagrammi relativi alle vasche 5, 19 e vascone per il mese di settembre 2014. Nelle figure sottostanti (Figg. 4.61-4.64) sono riportati ad esempio i diagrammi per le quattro settimane di maggio e settembre 2014 della vasca 8 e del vascone.

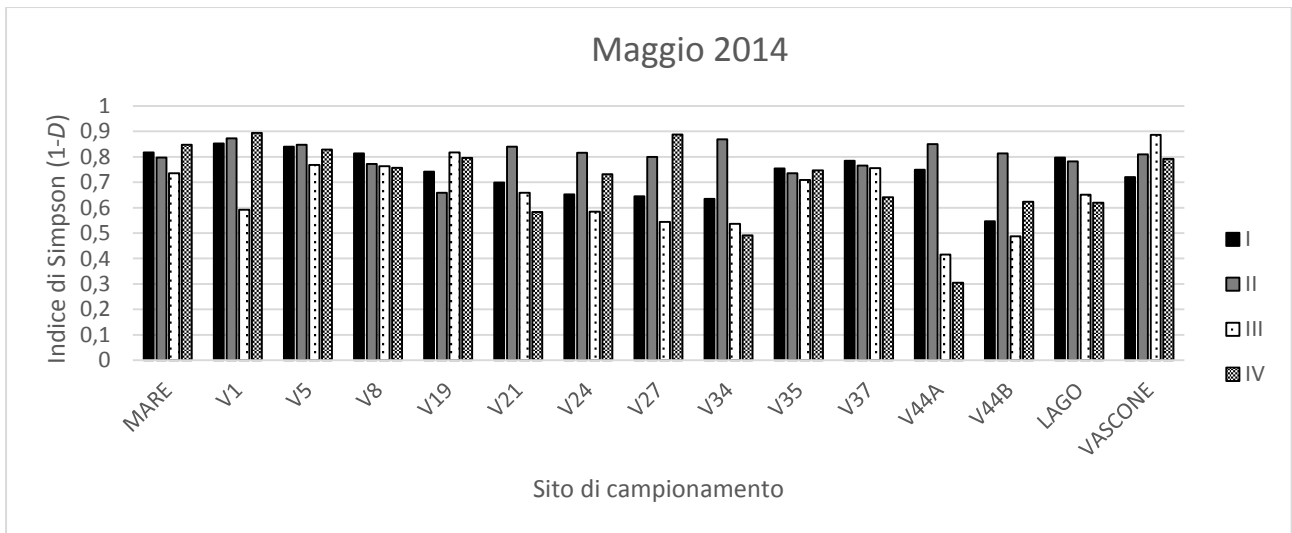
Tali dati sono stati elaborati soltanto parzialmente e quelli relativi al campionamento del mese di febbraio 2014 sono ancora in fase di elaborazione.



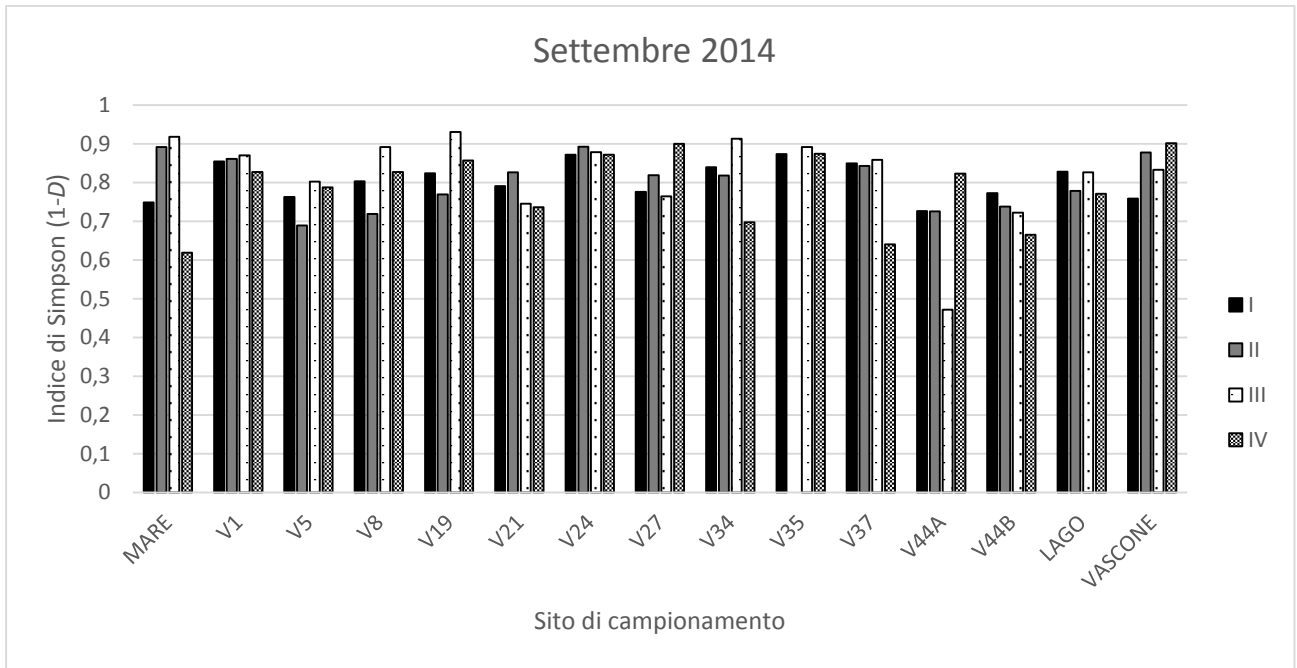
**Fig. 4.55** Valori di richness (numero di bande per ogni profilo di DGGE) rilevati per le vasche campionate per il mese di maggio 2014.



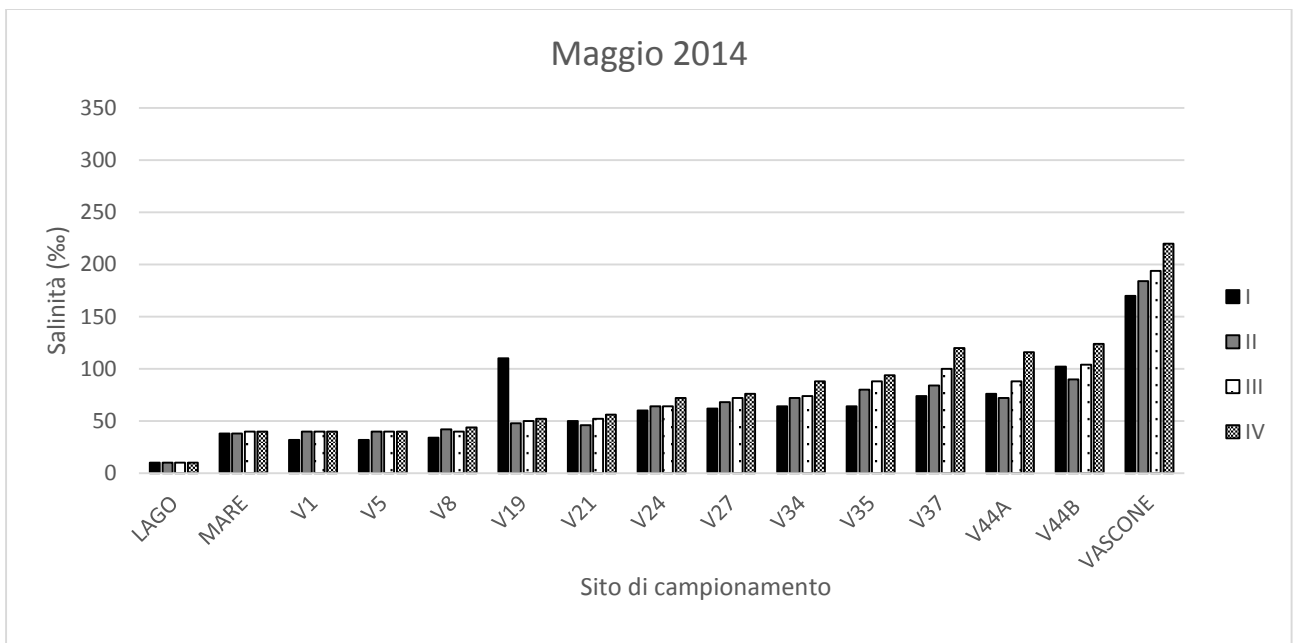
**Fig. 4.56** Valori di ricchezza (numero di bande per ogni profilo di DGGE) rilevati per le vasche campionate per il mese di settembre 2014.



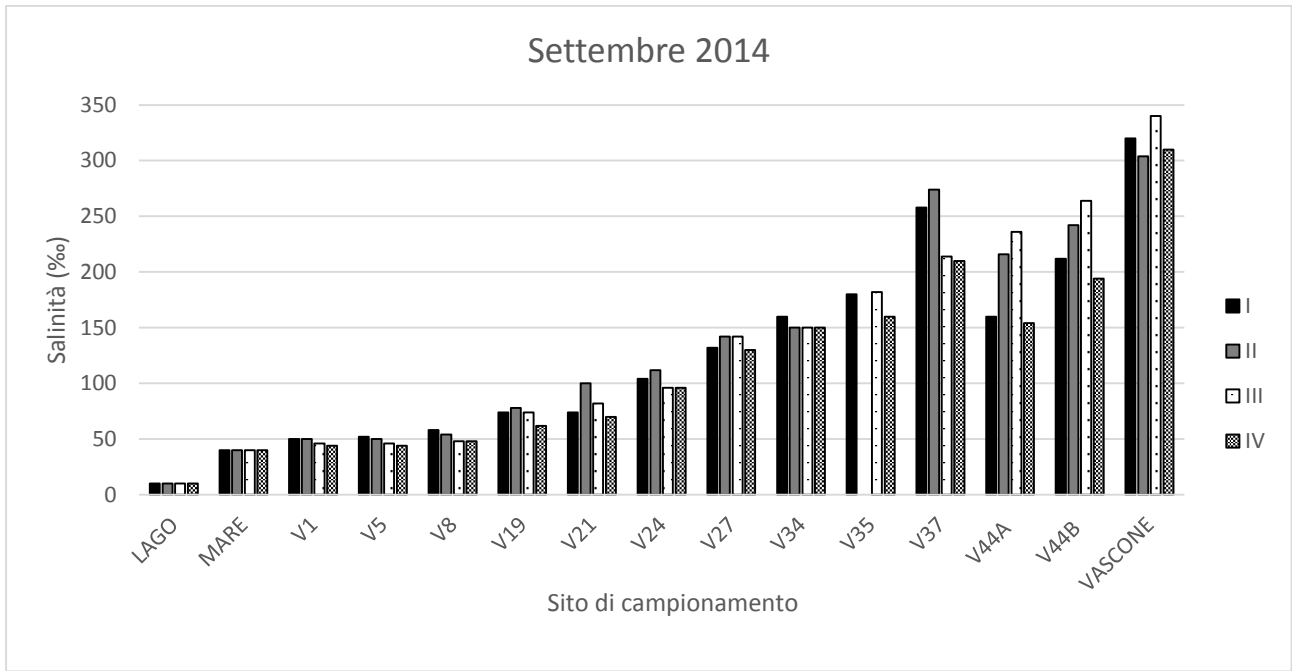
**Fig. 4.57** Indice di Simpson (1-D) calcolato per le vasche campionate nel mese di maggio 2014.



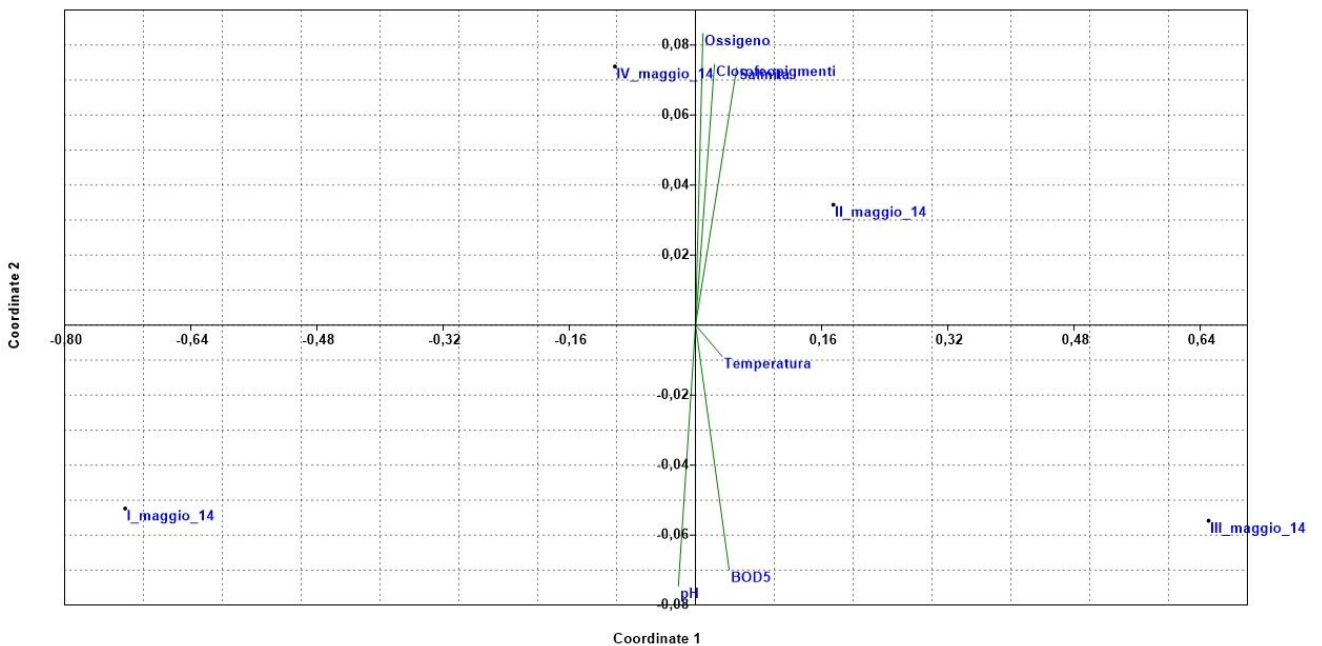
**Fig. 4.58** Indice di Simpson (1-D) calcolato per le vasche campionate nel mese di settembre 2014.



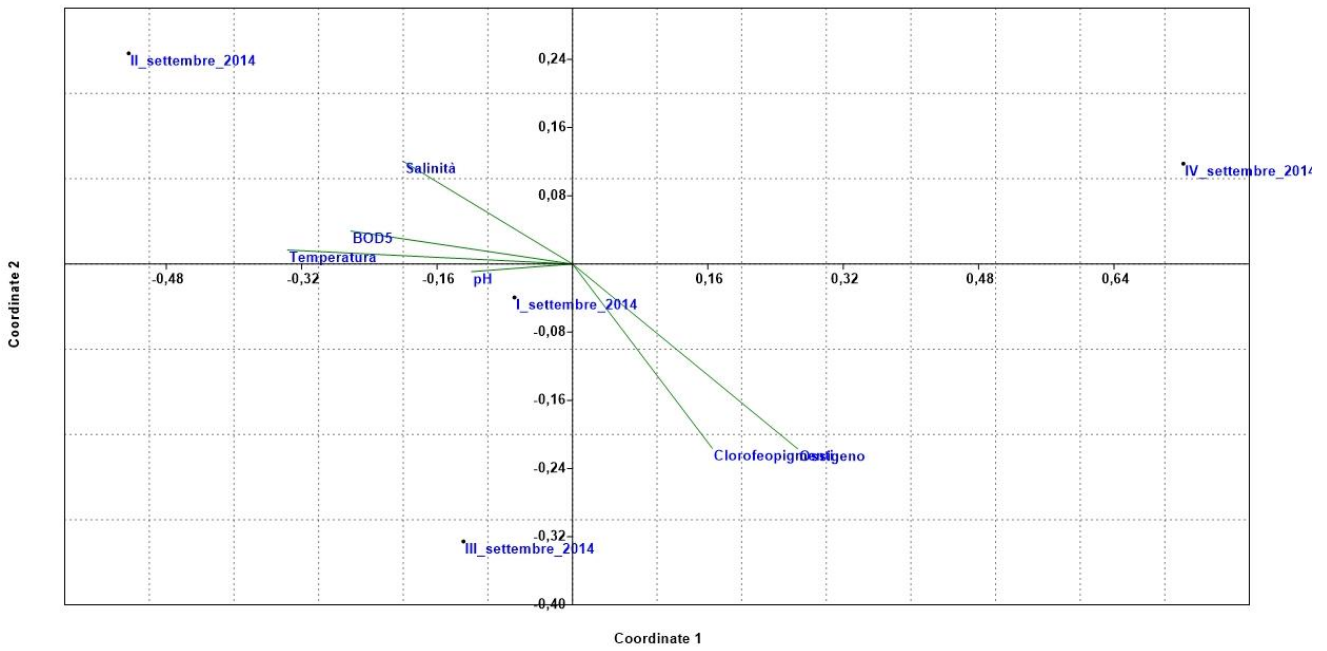
**Fig. 4.59** Valori di salinità (‰) rilevati per le vasche campionate durante i campionamenti a cadenza settimanale per il mese di maggio 2014.



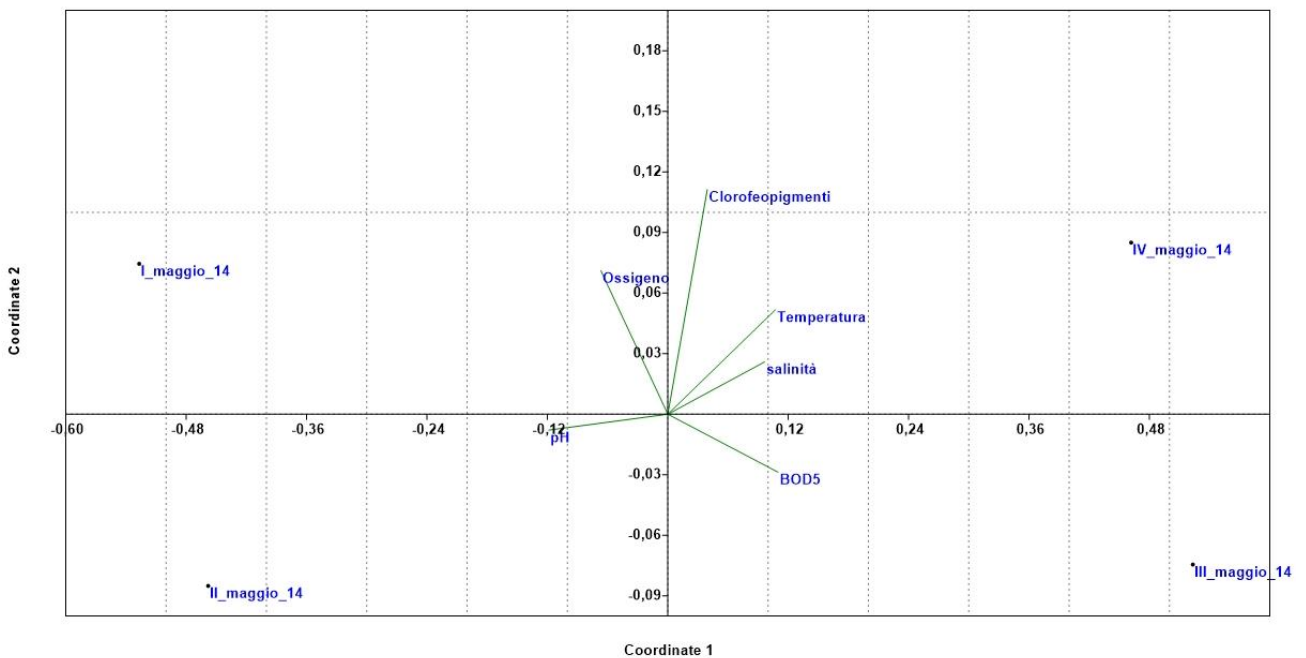
**Fig. 4.60** Valori di salinità (‰) rilevati per le vasche campionate durante i campionamenti a cadenza settimanale per il mese di settembre 2014.



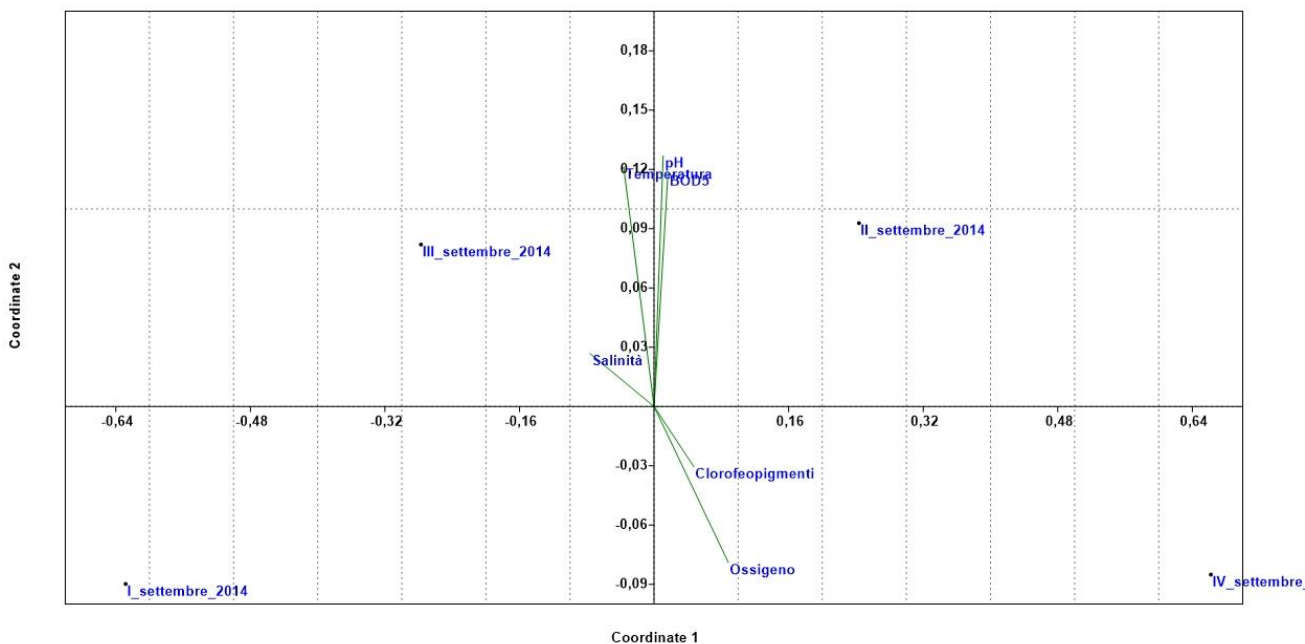
**Fig. 4.61** NMDS degli indici ecologici della VASCA 8 per i campionamenti a cadenza settimanale per il mese di maggio 2014. Parametri operazionali: Salinità (‰), temperatura (°C), Clorofeopigmenti ( $\mu\text{g/L}$ ), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Indici ecologici: richness, Shannon-Wiener, Simpson e evenness.



**Fig. 4.62** NMDS degli indici ecologici della VASCA 8 per i campionamenti a cadenza settimanale per il mese di settembre 2014. Parametri operazionali: Salinità (‰), temperatura (°C), Clorofeopigmenti (µg/L), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Indici ecologici: richness, Shannon-Wiener, Simpson e evenness.



**Fig. 4.63** NMDS degli indici ecologici del vascone per i campionamenti a cadenza settimanale per il mese di maggio 2014. Parametri operazionali: Salinità (‰), temperatura (°C), Clorofeopigmenti (µg/L), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Indici ecologici: richness, Shannon-Wiener, Simpson e evenness.



**Fig. 4.64** NMDS degli indici ecologici del vascone per i campionamenti a cadenza settimanale per il mese di settembre 2014. Parametri operazionali: Salinità (‰), temperatura (°C), Clorofeopigmenti (µg/L), BOD<sub>5</sub> (mg/L), pH, ossigeno disciolto (mg/L). Indici ecologici: richness, Shannon-Wiener, Simpson e evenness.

#### 4.2.6.3 Analisi di clusterizzazione per i mesi di maggio e settembre

Al fine di comprendere le relazioni esistenti tra le comunità batteriche di uno stesso mese nel corso dei vari campionamenti, è stata eseguita un'analisi combinata dei gel sia per il mese di maggio sia per quello di settembre. Per questi è stato possibile eseguire un raffronto per tutti e tre gli anni di campionamento.

L'analisi combinata è stata eseguita utilizzando il software Phoretix 1D version 12.0. I dendrogrammi relativi alla similarità dei patterns di bande sono stati calcolati utilizzando il coefficiente di Dice e l'algoritmo UPGMA (Figg. 4.65-4.66).

Osservando entrambi i dendrogrammi si può notare che, salvo alcune eccezioni, le vasche clusterizzano tra di loro in funzione della data di campionamento. Quindi i profili per le varie vasche, prelevate allo stesso tempo, risultano più simili tra loro di quanto non lo siano i profili ottenuti per la stessa vasca nel corso dei tre anni. La diversità nella composizione della comunità batterica all'interno di una singola vasca nel tempo potrebbe essere spiegata dalla elevata variabilità dei parametri chimico-fisici che caratterizzano le acque di tali ambienti e che determinano elevati cambiamenti anche nella composizione della comunità batterica presente come è stato possibile osservare anche dalle Moving Window Analysis (vedi par. 4.2.5). Questa elevata variabilità è

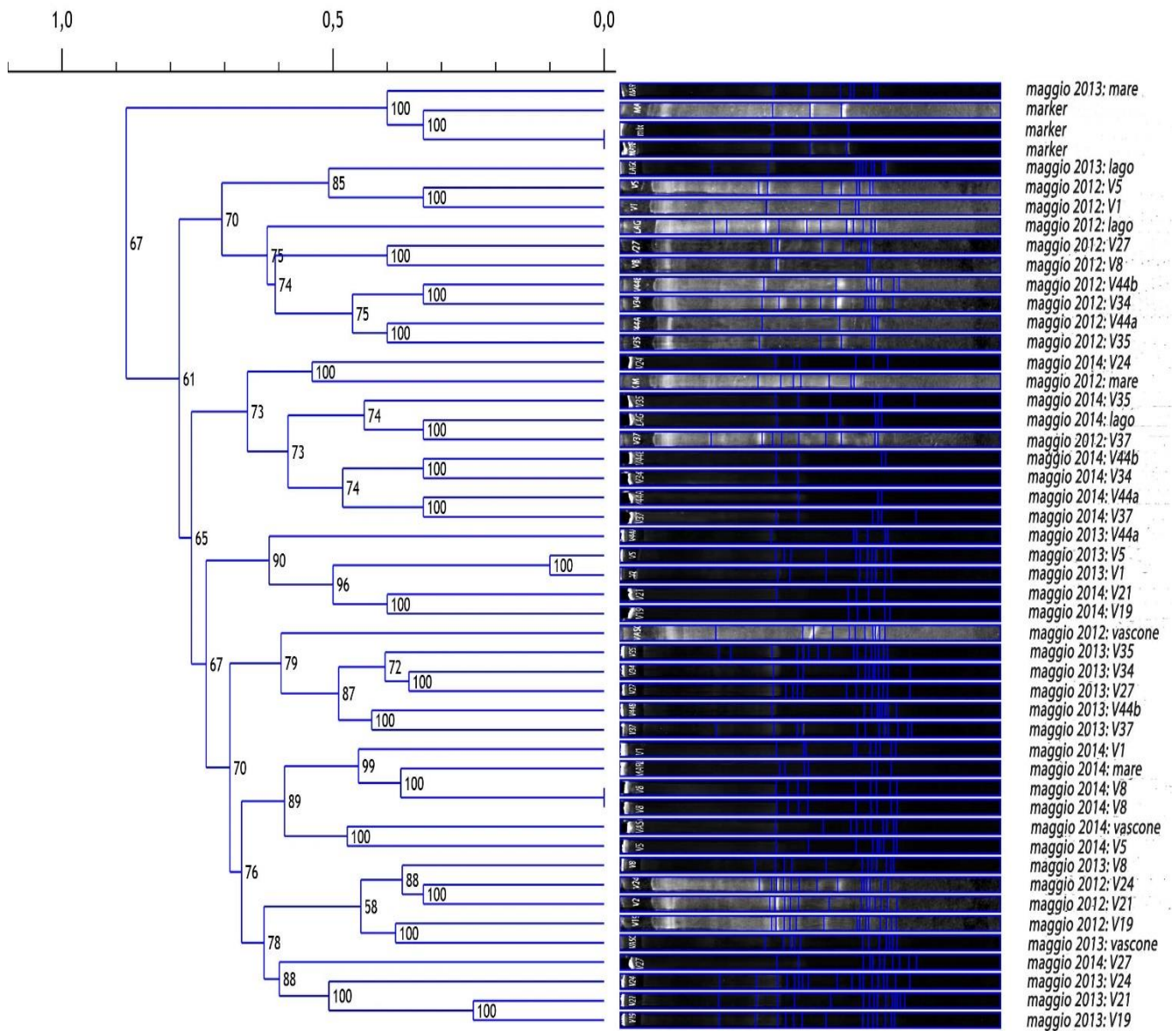
riscontrabile anche nei valori di salinità delle vasche, che come già detto, non essendo più utilizzate nella produzione di sale, non devono più essere caratterizzate da valori che rientrino in range ristretti e costanti. Questo risultato sottolinea ancora una volta la grande variabilità nella composizione delle comunità batteriche presenti nei vari siti di campionamento.

Le uniche eccezioni a quanto detto sono rappresentate dalla vasca V44B nei mesi di settembre 2013 e 2014 e dalla vasca 21 nei mesi di settembre 2012 e 2014. I profili di queste due vasche per tali tempi di campionamento risultano essere piuttosto simili tra loro e rientrano all'interno dello stesso raggruppamento nel dendrogramma.

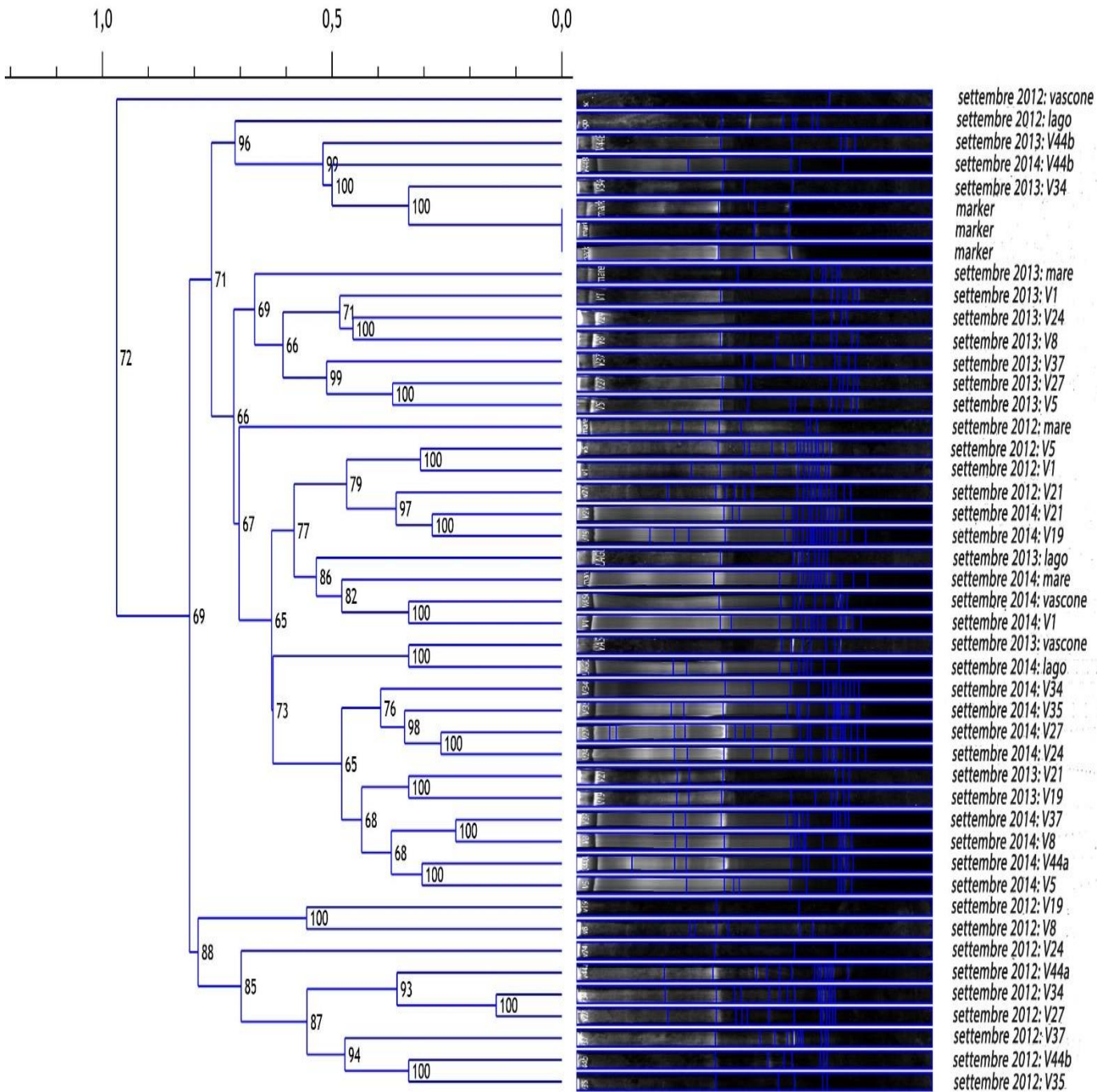
Un altro dato interessante riguarda le vasche V19 e V21. Dall'analisi di clusterizzazione è possibile osservare che tali campioni ricadono sempre nel medesimo raggruppamento, risultando quindi più simili tra di loro rispetto a tutti gli altri. Si tratta di due vasche vicine tra loro e caratterizzate da valori di salinità sempre piuttosto simili. Anche le vasche V1 e V5 clusterizzano sempre nel medesimo raggruppamento fatta eccezione per i mesi di settembre e maggio 2014. La stessa cosa può essere notata per le vasche 34 e 35, che sono tra loro adiacenti e clusterizzano sempre nel medesimo raggruppamento per entrambi i mesi.

Nel dendrogramma relativo al mese di settembre, vascone-settembre 2012 risulta clusterizzare in posizione esterna rispetto a tutti gli altri campioni. Si tratta di un mese in cui si è registrato un valore di salinità piuttosto elevato (296‰) ed il campione risulta caratterizzato da una sola banda nel profilo di DGGE.

Per quanto riguarda tutte le altre vasche, è possibile notare che non esiste una netta suddivisione dei raggruppamenti all'interno dei dendrogrammi in relazione alla salinità. Questo conferma quindi i risultati ottenuti dalle analisi di clusterizzazione descritte nei paragrafi precedenti.



**Fig. 4.65** Analisi di clusterizzazione comparata per i mesi di maggio dei tre anni di campionamento utilizzando il coefficiente di Dice.



**Fig. 4.66** Analisi di clusterizzazione comparata per i mesi di settembre dei tre anni di campionamento utilizzando il coefficiente di Dice.

## **4.3 Studio preliminare della comunità batterica delle saline di Trapani e Paceco**

### **4.3.1 Analisi di clusterizzazione dei profili DGGE**

Al fine di poter eseguire un confronto nella composizione delle comunità batteriche tra saline attive nella produzione di sale e non, si è proceduto ad uno studio preliminare sulle comunità presenti in “Salina Chiusicella” all’interno delle Saline di Trapani e Paceco. Tali saline infatti, pur essendo state istituite Riserva nel 1995, sono ancora attive nella produzione di sale e permettono quindi di operare un confronto, seppur preliminare, con i risultati ottenuti dai campionamenti presso le Saline di Tarquinia.

L’elaborazione delle immagini dei gel DGGE ha permesso, anche in questo caso, l’analisi dei profili di fingerprinting generati dalla separazione delle regioni geniche ipervariabili V3 del 16S rDNA delle comunità batteriche studiate.

Per valutare la struttura di tali comunità e le relazioni tra esse, è stata condotta un’analisi di clusterizzazione usando i software “Quantity-One” versione 4.6.3 e “Phoretix 1D” versione 12.0.

L’analisi di cluster è stata eseguita utilizzando il metodo UPGMA ed i coefficienti di Dice e Pearson.

Dall’analisi di clusterizzazione emerge una differenza sostanziale con i risultati ottenuti per le Saline di Tarquinia. Osservando l’analisi relativa al campionamento di settembre 2013 basata sul coefficiente di Dice (Fig. 4.67b) infatti, è possibile rilevare una suddivisione netta in diversi raggruppamenti, in relazione ai valori di salinità delle vasche campionate. Il gruppo a comprende infatti le vasche con i valori di salinità più bassi, il gruppo b quelle con salinità intermedia e comunemente definite “ruffiane” o “evaporanti”. All’interno di tale raggruppamento, A e B rappresentano campioni di sale prelevati presso la salina e sciolti preventivamente in acqua deionizzata creando soluzioni al 40%. Infine il gruppo c comprende le vasche con i valori di salinità più elevati, comunemente definite “caure” o “servitrici” e cristallizzanti.

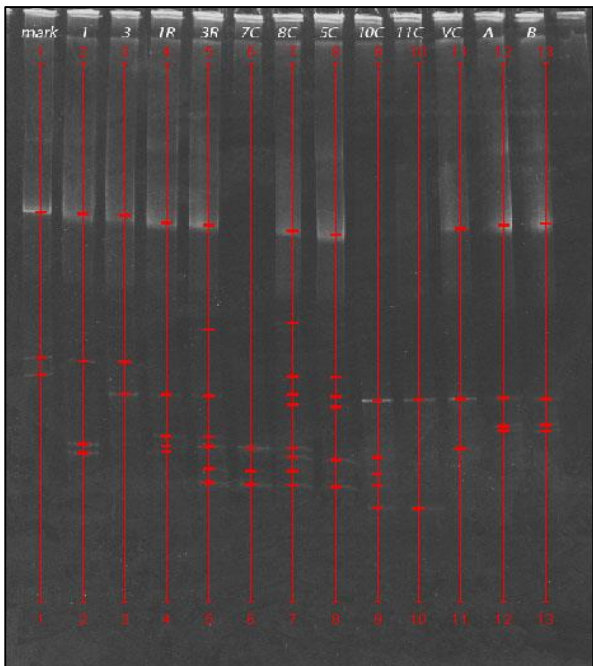
L’analisi di clusterizzazione eseguita con il metodo UPGMA ed il coefficiente di Pearson conferma la suddivisione netta in diversi raggruppamenti, in relazione ai valori di salinità delle vasche campionate (Fig. 4.67c).

Durante il secondo campionamento, effettuato nel mese di settembre 2014, per alcune vasche sono stati rilevati valori di salinità più elevati (Fig. 4.69). Le differenze più marcate sono state registrate per le vasche 1R, 7C e 5C. Le vasche 11C e 8C al contrario, hanno subito una riduzione dei valori di salinità rispetto al precedente anno. Per le vasche 3R e VC infine, è stato rilevato lo stesso valore di salinità.

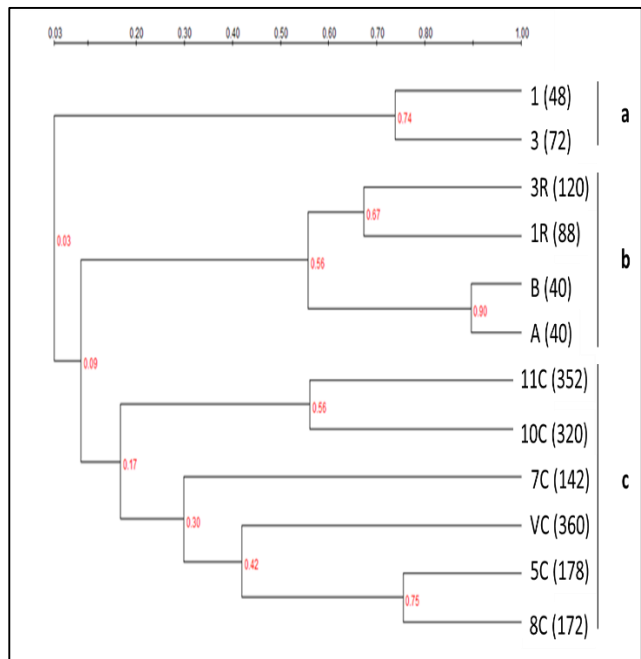
I risultati ottenuti con l'analisi di clusterizzazione confermano comunque la suddivisione dei raggruppamenti in relazione ai valori di salinità delle vasche campionate. Come è possibile infatti osservare dalla fig. 4.68b, relativa all'analisi di clusterizzazione basata sul coefficiente di Dice, il gruppo a comprende le vasche a salinità più elevata, il gruppo b comprende esclusivamente la vasca 7C, caratterizzata da una salinità pari a 460‰, la più elevata rilevata nel corso dei due campionamenti. Infine il gruppo c comprende le vasche a salinità più ridotta.

Anche in questo caso, l'analisi di clusterizzazione eseguita con il metodo UPGMA ed il coefficiente di Pearson conferma la suddivisione netta in diversi raggruppamenti, in relazione ai valori di salinità delle vasche campionate (Fig. 4.68c).

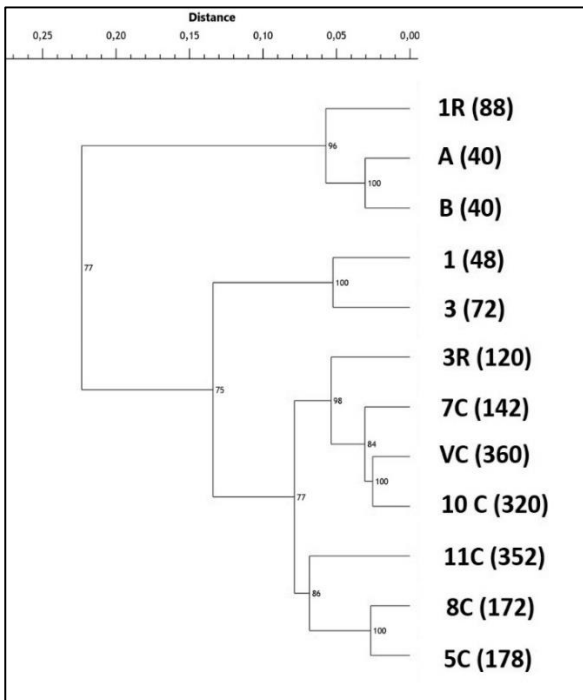
Nonostante nella maggior parte dei casi si siano rilevati valori di salinità superiori, durante il mese di settembre 2014 è stata evidenziata una maggior biodiversità come è possibile osservare dalla figura 4.70, che riporta i valori di richness rilevati per i due anni. L'ambiente delle saline però, come già detto, è soggetto ad alta variabilità dei parametri chimico-fisici ed è difficile fornire, a partire dai dati disponibili, una possibile spiegazione a tale risultato. Inoltre, nel caso di saline ancora attive nella produzione di sale, un altro fattore che potrebbe influire nella composizione della comunità microbica è la presenza antropica. Tale studio fornisce quindi informazioni preliminari, ma dovrebbero essere effettuati ulteriori campionamenti per chiarire la composizione della comunità microbica in tale ambiente e per comprendere come essa varia al variare delle condizioni climatiche, stagionali, nutrizionali, ...



(a)

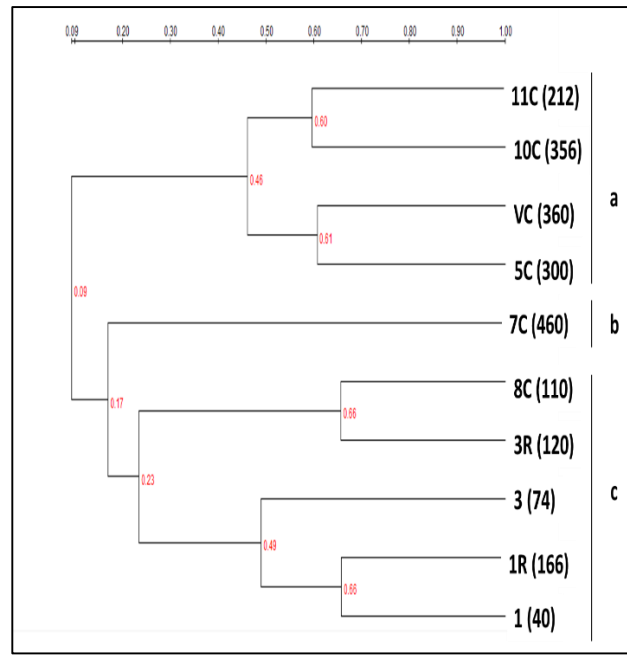
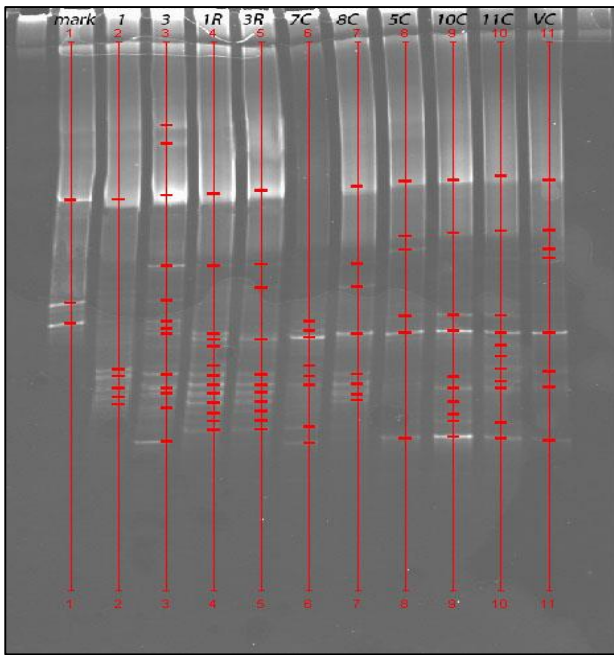


(b)



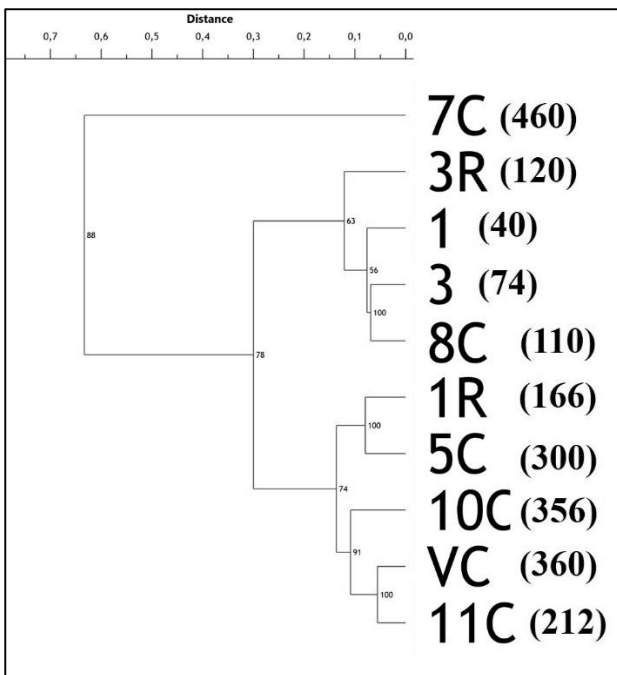
(c)

**Fig. 4.67** a) Gel di DGGE per il campionamento di settembre 2013 presso “Salina Chiusicella” della riserva naturale integrale “Saline di Trapani e Paceco”; b) Analisi di clusterizzazione eseguita utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Dice; c) Analisi di clusterizzazione eseguita utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Pearson. Tra parentesi sono riportati i valori di salinità in ‰ delle vasche campionate.



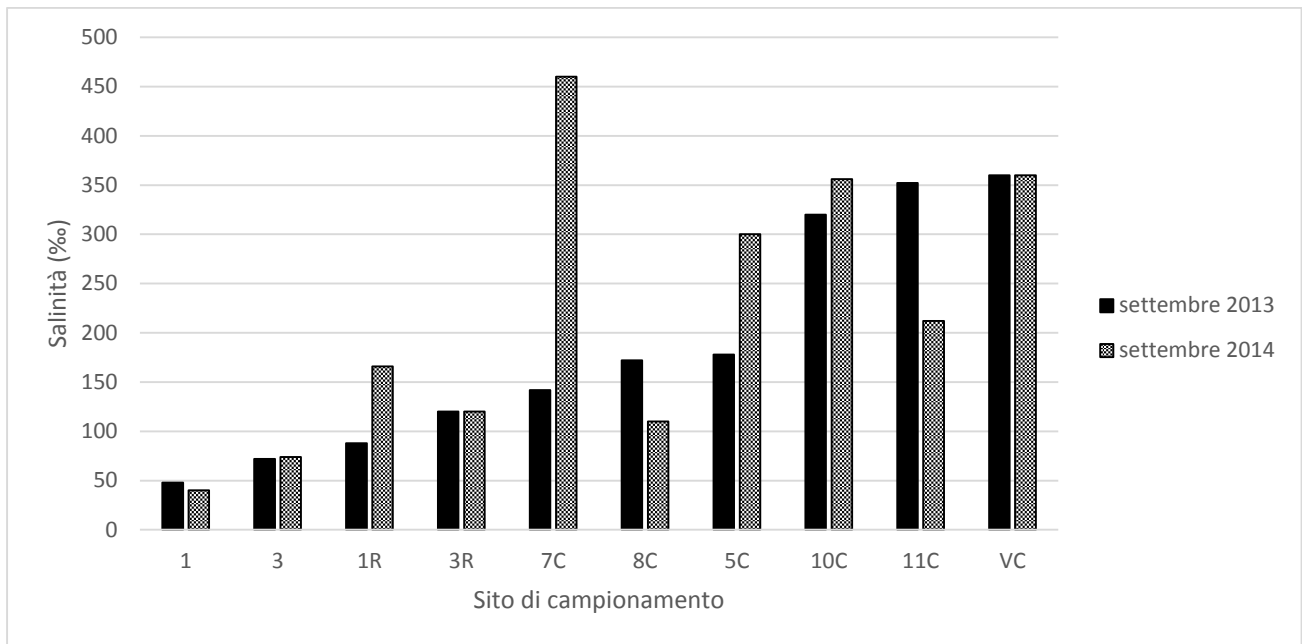
(a)

(b)

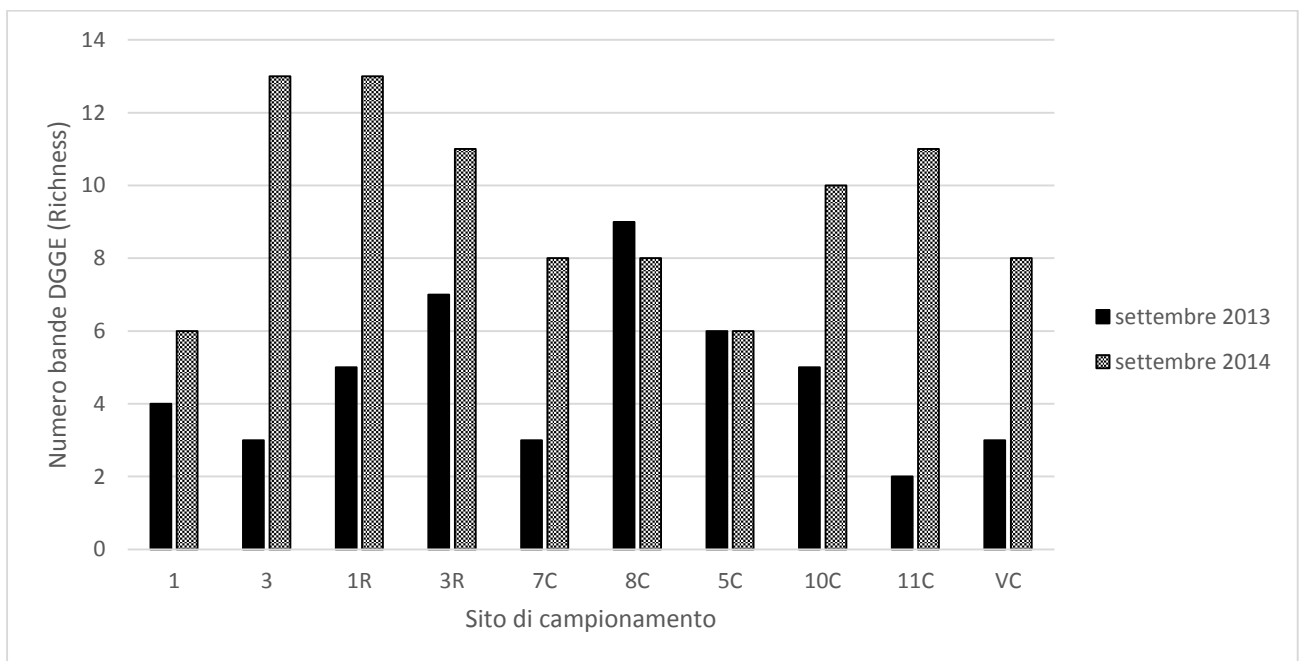


(c)

**Fig. 4.68** a) Gel di DGGE per il campionamento di settembre 2014 presso “Salina Chiusicella” della Riserva Naturale Orientata “Saline di Trapani e Paceco”; b) Analisi di clusterizzazione eseguita utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Dice; c) Analisi di clusterizzazione eseguita utilizzando il metodo UPGMA ed il coefficiente di Pearson. Tra parentesi sono riportati i valori di salinità in % delle vasche campionate.



**Fig. 4.69** Istogramma relativo ai valori di salinità (‰) rilevati per le vasche campionate presso “Salina Chiusicella” nei mesi di settembre 2013 e settembre 2014.



**Fig. 4.70** Istogramma relativo ai valori di richness rilevati per le vasche campionate presso “Salina Chiusicella” nei mesi di settembre 2013 e settembre 2014.

## CAPITOLO 5: CONCLUSIONI

Le saline sono ecosistemi estremamente complessi, caratterizzati e modellati dall'azione antropica e soggetti ad elevate variazioni dei parametri chimico-fisici delle acque e dei suoli limitrofi. Per tale ragione le loro comunità rappresentano una preziosa risorsa naturale in termini di biodiversità.

Nelle Saline di Tarquinia sono stati eseguiti vari studi relativi agli organismi eucarioti, ma non è mai stata studiata la biodiversità batterica che popola tale ambiente. Questo lavoro di tesi ha permesso di eseguire uno studio approfondito delle comunità batteriche presenti nelle acque di queste saline attraverso metodi colturali e non e di monitorare nel tempo i cambiamenti nella loro composizione in funzione di variazioni ambientali, stagionali, nutrizionali, ...

I risultati ottenuti da questo lavoro fanno emergere importanti aspetti, finora mai analizzati, relativi a comunità che vivono in questo ambiente così peculiare.

Il primo risultato notevole di questo studio riguarda le preferenze di salinità dei ceppi isolati. I nostri risultati hanno delineato risposte microbiche alle salinità e strategie di adattamento probabilmente legate alle ampie variazioni di salinità che caratterizzano tale ambiente. Alcuni dei batteri oggetto di studio hanno dimostrato infatti profili di crescita inusuali e differenti rispetto alle stesse specie note in letteratura e isolate da altri ambienti.

Dal punto di vista dell'isolamento e dell'identificazione di batteri coltivabili, in alcuni casi non è stata possibile un'identificazione a livello di specie, ma tutti gli isolati sono stati affiliati a generi noti in letteratura e isolati da vari ambienti iperalini e non. Sono state stabilite chiare relazioni filogenetiche tra i vari ceppi e sono state riconosciute alcune possibili nuove specie.

Per quanto riguarda la comunità batterica totale, dall'analisi dei gel è stato possibile riscontrare una notevole variabilità nei profili di fingerprinting tra i vari campioni studiati, che non risultano omogenei né nel numero di bande rilevate né nella loro distribuzione all'interno del gel, mostrando quindi una elevata eterogeneità nella composizione delle specie presenti nei diversi campioni. Dalle analisi di clusterizzazione e dalle MWA eseguite è stata riscontrata una elevata variabilità anche nella composizione della comunità batterica di una singola vasca nel corso del tempo. E dall'analisi multivariata è stato possibile evincere che esiste una certa eterogeneità, per le varie vasche, nel modo in cui le variabili ambientali sono correlate alle variabili dipendenti rilevate.

Un'altra informazione importante che si evince dall'analisi di clusterizzazione è il fatto che, in generale nel corso dei vari mesi di campionamento, i raggruppamenti all'interno dei dendrogrammi non sembrano correlati ai valori di salinità delle vasche campionate. Per le saline di Trapani invece,

che, al contrario delle Saline di Tarquinia, sono ancora attive nella produzione di sale, è stato possibile rilevare una suddivisione netta in diversi raggruppamenti, in relazione ai valori di salinità rilevati per le vasche campionate.

In entrambi i siti comunque non è stato possibile trarre una qualsiasi conclusione netta relativa all'andamento del numero di OTU al variare della salinità in questi ambienti. Questo conferma la complessità della variazione della struttura delle comunità batteriche lungo il gradiente di salinità e suggerisce di rivalutare il ruolo del dominio batteri negli ambienti "estremi".

Tale complessità è data dal fatto che tra i fattori che influenzano la composizione delle comunità batteriche, oltre ai parametri chimico-fisici e biologici, vi sono anche: le condizioni metereologiche del giorno stesso e dei giorni precedenti al campionamento, l'azionamento o meno delle pompe per l'ingresso di acqua marina e la presenza di uccelli nelle vasche campionate. Inoltre, per le saline ancora attive per la produzione di sale, un altro fattore da non sottovalutare nell'influenzare la biodiversità batterica è la presenza antropica.

In futuro si prevede di sottoporre alcuni dei campioni, che presentano profili di fingerprinting più interessanti, a tecniche di sequenziamento NGS, al fine di avere informazioni tassonomiche sugli OTU presenti. Inoltre potrebbe essere auspicabile l'applicazione di ulteriori tecniche di fingerprinting al fine di comparare i risultati ottenuti con la DGGE e utilizzare quest'ultima o altre tecniche di fingerprinting per lo studio delle comunità di archea presenti nei campioni al fine di operare un confronto con i dati raccolti per la determinazione ed il monitoraggio della biodiversità batterica.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Aguilera M, Cabrera A, Incerti C, Fuentes S, Russell NJ, Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sanchez M (2007) *Chromohalobacter salarius* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almería, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1238–1242.
- Alfinito S, Iberite M, Fumanti B (1990) The algal microflora of the Salt Works of Tarquinia (Italy). *Hydrobiologia* 203:137-146.
- Allavena S, Zapparoli M (1992a) Gestione e tutela della riserva naturale di popolamento animale Saline di Tarquinia. In: L'ambiente della Tuscia Laziale, a cura di Olmi M e Zapparoli M, 189-192.
- Allavena S, Zapparoli M (1992b) Aspetti faunistici della Riserva Naturale di Popolamento Animale Saline di Tarquinia ed aree adiacenti. In: L'ambiente della Tuscia Laziale, a cura di Olmi M e Zapparoli M, 209-216.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59: 143-169.
- Ampe F, Miambi E (2000) Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. *Int J Food Microbiol* 60: 91–97.
- Angeletti D (2006) Erosione genetica e relazioni genotipo-ambiente nella popolazione delle Saline di Tarquinia di *Aphanius fasciatus* (Teleostea). Tesi di Dottorato di Ricerca in Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche, XVIII Ciclo. Università della Tuscia, Viterbo.
- Angeletti D, Cimmaruta R, Nascetti G (2010) Genetic diversity of the killifish *Aphanius fasciatus* paralleling the environmental changes of Tarquinia salterns habitat. *Genetica* 138: 1011–1021.
- ANPA Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, ARPAT Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana, CTN AIM Centro Tematico Nazionale Acque Interne e Marino Costiere (2000) Elementi di Identificazione delle Acque di Transizione ([www.arpa.veneto.it](http://www.arpa.veneto.it)).

- ANPA Agenzia Nazionale per la Protezione dell’Ambiente, CTN AIM Centro Tematico Nazionale Acque Interne e Marino Costiere (1999) Manuale di elaborazione Indicatori e Indici ([www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)).
- Antón J, Lucio M, Peña A, Cifuentes A, Brito-Echeverria J, Moritz F, Tziotis D, López C, Urdiain M, Schmitt-Kopplin P, Rosselló-Móra R (2013) High metabolomic microdiversity within co-occurring Isolates of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. PLoS ONE 8: e64701.
- Antón J, Oren A, Benlloch S, Rodríguez-Valera F, Amann R, Rosselló-Mora R (2002) *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel extreme halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 485–491.
- Antón J, Rossello MR, Rodríguez-Valera F, Amann R (2000) Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* 66: 3052–3057.
- Arahal DR, García MT, Ludwig W, Schleifer KH, Ventosa A (2001) Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 1443–1448.
- Austin B (1998) Marine microbiology. Cambridge: Cambridge University Press.
- Avena G, Blasi C, Caporali F, Dall’Aglia M, De Lillis M, Dowgiallo G, Mazzoleni S, Nimis P, Pacini E, Paoletta A, Pedrotti F, Pignatti S, Piussi P, Salleo S, Venanzoni R, Virzo De Santo A (2000) Ecologia Vegetale, Torino: UTET.
- Baati H, Guermazi S, Amdouni R, Gharsallah N, Sghir A, Ammar E (2008) Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles* 12: 505–518.
- Barghini P, Silvi S, Aquilanti A, Marcelli M, Fenice M (2014) Bacteria from marine salterns as a model of microorganisms adapted to high environmental variations. *J Envir Protect Ecol* 75: 897-906.
- Bellisario B, Novelli C, Cerfolli F, Angeletti D, Cimmaruta R, Nascetti G (2010) The ecological restoration of the Tarquinia Salterns drives the temporal changes in the benthic community structure. *TWB, Trans Waters Bull*, 4: 3–62.
- Ben Ali Gam Z, Abdelkafi S, Casalot L, Tholozan JL, Oueslati R, Labat M (2007) *Modicisalibacter tunisiensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfieldwater injection sample, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989, emend. Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2307-2313.

- Ben-Amotz A, Avron M (1981) Glycerol and b-carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*: a model system for biosolar energy conversion. *Trends Biochem Sci* 6: 297–299.
- Ben-Dov E, Shapiro OH, Siboni N, Kushmaro A (2006) Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* 72: 6902–6906.
- Benlloch S, López-López A, Casamayor EO, Øvreas L, Goddard V, Daae FL, Smerdon G, Massana R, Joint I, Thingstad F, Pedrós-Alió C, Rodríguez-Valera F (2002) Prokaryotic Genetic Diversity throughout the Salinity Gradient of a Coastal Solar Saltern. *Environ Microbiol* 4: 349 – 360.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Liu X, Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Parkinson ML, Pratt MR, et al. (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456:53-59.
- Bettinetti R, Crosa G, Galassi S, (2007) *Ecologia delle Acque Interne*, Milano: Città studi
- Bickel-Sandkötter S, Gärtner W, Dane M (1996) Conversion of energy in halobacteria: ATP synthesis and phototaxis. *Arch Microbiol* 166:1–11.
- Bolhuis H, te Poele EM, Rodríguez-Valera F (2004) Isolation and Cultivation of Walsby's Square Archaeon. *Environ Microbiol* 6: 1287 – 1291.
- Bornemann J and Triplett EW (1997) Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* 63: 2647-2653.
- Bouchotroch S, Quesada E, Moral Del A, Llamas I, Bejar V (2001) *Halomonas maura* sp. nov., a new moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1625–1632.
- Boujelben I, Gomariz M, Martínez-García M, Santos F, Peña A, López C, Antón J, Maalej S (2012) Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia. *Antonie van Leeuwenhoek* 101: 845–857.
- Boulus L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R (1999) LIVE/DEAD\* BacLight™: Application of a New Rapid Staining Method for Direct Enumeration of Viable and Total Bacteria in Drinking Water. *J Microbiol Methods*, 37: 77-86.

- Bramucci S (2009) Analisi delle comunità macrozoobentonica e planctonica in un ambiente acquatico iperalino: le Saline di Tarquinia (Tesi di dottorato in Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche, 2009/2010, Università degli studi della Tuscia).
- Brandt KK, Ingvorsen K (1997) *Desulfobacter halotolerans* sp. nov., a halotolerant acetate-oxidizing sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of Great Salt Lake, Utah. *Syst Appl Microbiol* 20: 366–373.
- Brown MV, Philip GK, Bunge JA, Smith MC, Bisset A, Lauro FM, Fuhrman JA, Donachie SP (2009) Microbial community structure in the North Pacific ocean. *The ISME Journal*, 3: 1374–1386.
- Buchalo AS, Nevo E, Wasser SP, Oren A, Molitoris HP (1998) Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. *P Roy Soc Lond B Bio* 265: 1461–1465.
- Burns DG, Camakaris HM, Janssen PH, Dyall-Smith ML (2004) Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicate that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *App Environ Microbiol* 70:5258–5265.
- Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A, Gunde-Cimerman N (2005a) Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* 244: 229–234.
- Butinar L, Sonjak S, Zalar P, Plemenitaš A, Gunde-Cimerman N (2005b) Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Bot Mar* 48: 73–79.
- Cabrera A, Aguilera M, Fuentes S, Incerti C, Russell NJ, Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sánchez M (2007) *Halomonas indalinina* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almería, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 376–380.
- Cantrell AS, Casillas-Martínez I, Molina M (2006) Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycol res* 110: 962 – 970.
- Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Ovreas L, Diez B, Goddard V, Gasol JM, Joint I, Rodriguez-Valera F, Pedros-Alio C (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern scaling plots. *Environ Microbiol* 4: 338– 348.
- Castritsi-Catharios J, Wildlife at the Messolonghi Saltworks (Hellenic Saltworks S.A., 1992, Graphic's Factory, Athens).

- Claus D, Fritze D, Kocur M (1992) Genera related to the genus *Bacillus* – *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Planococcus*, *Filibacter* and *Caryophanon*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2nd edn, vol. 2, pp. 1769–1791. Edited by A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.
- Clavero E, Hernández- Mariné M, Grimalt JO, Garcia-Pichel F (2000) Salinity tolerance of diatoms from thalassic hypersaline environments. *J Phycol* 36: 1021-1034.
- Clementino MM, Vieira RP, Cardoso AM, Nascimento APA, Silveira CB, Riva TC, Gonzalez ASM, Paranhos R, Albano RM, Ventosa A, Martins OB (2008) Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. *Extremophiles* 12:595–604.
- Cocolin L, Dolci P, Rantsiou K (2008) Approcci molecolari per lo studio delle ecologie microbiche nelle fermentazioni enologiche Di.Va.P.R.A., sezione di Microbiologia agraria e Tecnologie alimentari.
- Colombo G, Ceccherelli V U, Ferrari I (1984) Lo Zooplancton delle Lagune. *Nova Thalassia*, Vol. 6 (suppl.): 185 – 200.
- Crisman TL (1999) Conservation of Mediterranean coastal saline ecosystems: the private sector role in maintaining ecological function. Symposium on “Saltwork: Preserving Saline Coastal Ecosystems”, Global Nest “Hellenic saltworks”.
- Da Silva KRA, Salles JF, Seldin L, van Elsas JD (2003) Application of a novel *Paenibacillus* specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *J Microbiol Methods* 54:213–23.
- Dalluge JJ, Hamamoto T, Horikoshi K, Morita RY, Stetter KO, McCloskey JA (1997) Posttranscriptional modification of tRNA in psychrophilic bacteria. *J Bacteriol* 179: 1918-1923.
- Davis JS (1978) Biological communities of a nutrient enriched salina. *Aquat Bot* 4: 23-42.
- de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa A (2010) Taxonomic study of the genus *Salinicola*: transfer of *Halomonas salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 963–971.
- de Oliveira VM, Manfio GP, da Costa Coutinho HL, Keijzer-Wolters AC, van Elsas JD (2006) A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. *J Microbiol Meth*, 64: 366–379.

- Delille D (1992) Marine bacterioplankton at the Weddell Sea ice edge, distribution of psychrophilic and psychrotrophic populations. *Polar Biol* 12: 205-210.
- Desmarais D, Jablonski PE, Fedarko NS, Roberts MF (1997) 2-Sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic Archaea. *J Bacteriol* 179:3146–3153.
- Di Maio A (2008) Campo idrodinamico nella salina di Tarquinia a supporto di studi ecologici e di soluzioni operative: applicazione di un modello numerico ad elementi finiti (Tesi di dottorato in Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche, 2007/2008, Università degli studi della Tuscia).
- Díaz-Munoz G, Montalvo-Rodríguez R (2005) Halophilic black yeasts *Hortaea werneckii* in the Cabo Rojo Solar Salterns: its first record for this extreme environment in P.R. *Caribb J Sci* 41: 360–365.
- Dobson M, Frid C (1998) Ecology of Aquatic Systems. Addison Wesley Longman Ltd., Harlow, 221 pp.
- Donachie SP, Hou S, Gregory TS, Malahoff A, Alam M (2003) *Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic  $\gamma$ -Proteobacterium from the Lo‘ihi submarine volcano, Hawai‘i. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1873–1879.
- Dong H, Zhang G, Jiang H, Yu B, Chapman LR, Lucas CR, Fields MW (2006) Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: linking geochemical controls to microbial diversity. *Microbiol Ecol* 51: 65–82.
- Duckworth AW, Grant WD, Jones BE, Meijer D, Márquez MC, Ventosa A (2000) *Halomonas magadii* sp. nov., a new member of the genus *Halomonas* isolated from a soda lake of the East African Rift Valley. *Extremophiles*, 4: 53–60.
- El-Latif Hesham A, Khan S, Liu X, Zhang Y, Wang Z, Yang M (2006) Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast* 23:879-887.
- Elloumi J, Carrias JF, Ayadi H, Sime-Ngando T, Bouaïn A (2009) Communities structure of the planktonic halophiles in the solar saltern of Sfax, Tunisia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 81: 19-26.
- Engebretson JJ, Moyer CL (2003) Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 69: 4823-4829.
- Farrow JAE, Ash C, Wallbanks S, and Collins MD (1992) Phylogenetic analysis of the genera *Planococcus*, *Marinococcus* and *Sporosarcina* and their relationships to members of the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol Lett* 93: 167–172.

- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fernandez A, Huang S, Seston S, Xing J, Hickey R, Criddle C, Tiedje J (1999) How Stable Is Stable? Function versus Community Composition. *Appl Environ Microbiol* 65: 3697-3704.
- Ferronato A, Lionello M, Ostoich M, Sanavio G (2000) Elementi di identificazione delle acque di transizione. ANPA, Centro tematico nazionale “Acque interne e marino costiere”. 65 pp.
- 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.
- Flowers S, Evans FK (1966) The Flora and Fauna of the Great Salt Lake Region, Utah, In: H. Boyko (ed.), Salinity and Aridity. New Approaches to Old Problems. W. Junk, the Hague, 367-393
- Gagliardi M (2008) Effetti delle fluttuazioni ambientali sulla struttura di comunità e specie target in habitat lagunari estremi. Tesi di laurea. Univ. degli Studi della Tuscia. A.A.2007 – 2008.
- Galinski EA (1995) Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* 37: 273– 328.
- Garland JL, Mills AL (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Appl Environ Microbiol* 57: 2351-2359.
- Gianguzza P, Chemello R e Riggio S, (2001). Composizione e struttura della malacofauna di una salina della Sicilia occidentale. *Società Italiana di Malacologia* 36 (9-12): 201 – 207.
- Golubic S (1980) Halophily and halotolerance in cyanophytes. *Origins of life* 10: 169-183.
- Gómez-Silván C, Molina-Muñoz M, Poyatos JM, Ramos A, Hontoria E, Rodelas B, González-López J (2010) Structure of archaeal communities in membrane-bioreactor and submerged-biofilter wastewater treatment plants. *Bioresource Technol* 101: 2096-2105.
- Gounot AM (1991) Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *J Appl Microbiol* 71: 386-397.
- Gray ND, Miskin IP, Kornilova O, Curtis TP, Head IM (2002) Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environ Microbiol* 4: 158-168.

- Guelorget O, Perthuisot JP, (1992) Morphologie, Organisation Hydrologique, Hydrochimie et Sédimentologie des Bassins Paraliques. *Vie et Milieu*, 42 (2): 93 – 109.
- Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog S, Plemenitas A (2000) Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeast. *FEMS Microbiol Ecol* 32: 235-240.
- Gunde-Cimerman N, Zalar P, Petrovič U, Turk M, Kogej T, de Hoog GS, Plemenitaš A (2004) Fungi in the Salterns. In: Ventosa A (ed), *Halophilic Microorganisms*. Springer-Verlag, Heidelberg, 103–113.
- Hao MV, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Kosako Y, Komagata K (1990) *Erwinia persicinus*, a new species isolated from plants. *Int J Syst Bacteriol* 40: 379-383.
- He JZ, Xu ZH, Hughes J (2006) Molecular bacterial diversity of a forest soil under residue management regimes in subtropical Australia. *FEMS Microbiol Ecol*, 55 (1): 38–47.
- Head IM, Saunders JR, Pickup RW (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol* 35: 1–21.
- Helmke E, Weyland H (2004) Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria - Occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. *Cell Mol Biol* 50: 553-561.
- Henriques IS, Alves A, Tação M, Almeida A, Cunha A, Correia A (2006) Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuar Coast Shelf Sci* 68: 139–148.
- 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.
- Huang CY, Garcia JL, Patel BKC, Cayol JL, Baresi L, Mah RA (2000) *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* subsp. nov., a halotolerant facultative anaerobe from Death Valley, and emended description of *Salinivibrio costicola*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 615-622.
- Iberite M (1992) La vegetazione macrofita e algale della Riserva Naturale di Popolamento animale Salina di Tarquinia. In: *L' ambiente nella Tuscia Laziale*, a cura di Olmi M. e Zapparoli M., 203-207.
- ISPRA - Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale (2010) Metodologie di studio del Plancton marino. [www.isprambiente.it](http://www.isprambiente.it).
- Javor BJ (1983) Planktonic standing crop and nutrients in a saltern ecosystem. *Limnol Oceanogr* 12: 1-7.

- Joint I, Henriksen P, Garde K, Riemann B (2002) Primary production, nutrient assimilation and microzooplankton grazing along a hypersaline gradient. *FEMS Microbiol Ecol* 39: 245–257.
- Juárez-Jiménez B, Manzanera M, Rodelas B, Martínez-Toledo MV, Gonzalez-López J, Crognale S, Pesciaroli C, Fenice M (2010) Metabolic characterization of a strain (BM90) of *Delftia tsuruhatensis* showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols. *Biodegradation* 21: 475–489.
- Kaye JZ, Márquez MC, Ventosa A, Barros JA (2004) *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 499–511.
- Kim J, Beecroft N, Varcoe J, Dinsdale R, Guwy A, Slade R, Thumser A, Avignone-Rossa C, Premier G (2011) Spatiotemporal development of the bacterial community in a tubular longitudinal microbial fuel cell. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 1179-1191.
- Kim KK, Jin L, Yang HC, Lee ST (2007) *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 675–681.
- Kis-Papo T, Grishkan I, Oren A, Wasser SP, Nevo E (2001) Spatiotemporal diversity of filamentous fungi hypersaline Dead Sea. *Mycol Res* 105: 749–756.
- Kis-Papo T, Oren A, Wasser SP, Nevo E (2003) Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 183–190.
- Kleikemper J, Schroth MH, Sigler WV, Schmucki M, Bernasconi SM, Zeyer J (2000) Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* 68: 1516-1523.
- Koizumi Y, Kojima H, Oguri K, Kitazato H, Fukui M (2004) Vertical and temporal shifts in microbial communities in the water column and sediment of saline meromictic lake Kaiike (Japan), as determined by 16S rDNA-based analysis, and related to physicochemical gradients. *Environ Microbiol* 6: 622–637.
- Koops HP, Möller U (1992) The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria, p. 2625–2638. In Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.

- Kovacs N (1956) Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the Oxidase Reaction. *Nature* 178: 703-703.
- Kushner DJ (1978) Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In *Microbial Life in Extreme Environments*, pp. 317-368. London: Academic Press.
- Lewin RA, Krienitz L, Goericke R, Takeda H, Hepperle D (2000). *Picocystis salinarum* gen. et sp. nov. (Chlorophyta) – a new picoplanktonic green alga. *Phycologia* 39: 560-565.
- Li WJ, Chen HH, Zhang YQ, Schumann P, Stackebrandt E, Xu LH, et al. (2004) *Nesterenkonia halotolerans* sp. nov. and *Nesterenkonia xinjiangensis* sp. nov., actinobacteria from saline soils in the west of China. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 837–41.
- Litchfield CD, Gillevet PM (2002) Microbial Diversity and Complexity in Hypersaline Environments: A Preliminary Assessment. *Ind Microbiol Biot* 28: 48 – 55.
- Lowe SE, Jain MK, Zeikus JG (1993) Biology, ecology and biotechnological application of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH salinity, or substrates. *Microbiol Rev* 57: 451–509.
- Lueders T, Friedrich MW (2003) Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol* 69: 320-326.
- MacLean D, Jones JDG, Studholme DJ (2009) Application of ‘next-generation’ sequencing technologies to microbial genetics. *Nature Reviews Microbiology* 7: 287–296.
- Mani K, Chandrasekaran S, Salgaonkar BB, Mutnuri S, Bragança JM (2014) Comparison of bacterial diversity from solar salterns and a simulated laboratory study. *Ann Microbiol* 14: 944-946.
- Manikandan M, Vijayaraghavan K, Lejla P (2009) Diversity of microorganisms in solar salterns of Tamil Nadu, India. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1007-1017.
- Marchetti R (1993) *Ecologia applicata*, Milano: Città Studi.
- Mardis ER (2008) Next-Generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 387-402.
- Margesin R, Schinner F (2001) Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5:73–83.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, K.B. Jirage KB,

- Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380.
- Marquez MC, Ventosa A, Ruiz - Berraquero F (1987) A Taxonomic Study of Heterotrophic Halophilic and Non-halophilic Bacteria from a Solar Saltern. *J Gen Microbiol*, 100: 45-56
  - Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D, Verstraete W (2008) How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ Microbiol* 10: 1571-1581.
  - Masuma R, Yamaguchi Y, Noumi M, Omura S, Namikoshi M (2001) Effect of sea water concentration on hyphal growth and antimicrobial metabolite production in marine fungi. *Mycoscience*, 42: 455–459.
  - 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. *Sci Total Environ* 407: 3994-4003.
  - Montanari M (2012) STATISTICA AMBIENTALE. Analisi Multivariata - Metodologie di Ordinamento. Versione 1.0 SISSAD snc, [www.logicalineare.com](http://www.logicalineare.com).
  - Morita R (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev* 39: 144–167.
  - Müller S, Bley T, Babel W (1999) Adaptive responses of *Ralstonia eutropha* to feast and famine conditions analysed by flow cytometry. *J Biotechnol* 75: 81–97.
  - Munn CB (2011) Marine Microbiology: Ecology and Applications. 2nd edn. Garland Science, New York.
  - Munoz R, López-López A, Urdiain M, Moore ERB, Rosselló-Móra R (2011) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight whole cell profiles for assessing the cultivable diversity of aerobic and moderately halophilic prokaryotes thriving in solar saltern sediments. *Syst Appl Microbiol* 34: 69–75.
  - Murray AE, Preston CM, Massana R, Taylor LT, Blakis A, Wu K, DeLong EF (1998) Seasonal and spatial variability of bacteria and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* 64: 2585-2595.
  - Murray PR (2012) What Is New in Clinical Microbiology—Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Mol Diagn* 14: 419-423.

- 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 coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- 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.
- 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.
- Nakatsu CH, Torsvik V, Øvreå L (2000) Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA chain reaction products. *Soil Sci Soc Am J* 64: 1382-1388.
- Nascetti G, Scardi M, Fresi E, Cimmaruta R, Bondanelli P, Gatti S, Blasi S, Serrano S, Meschini L, Plastina N, Valiante M, Vinci D (1998) Caratterizzazione ecologica delle Saline di Tarquinia al fine di un loro recupero e per lo sviluppo dell'acquacoltura. *Biol Mar Medit*, 5 (3): 1365-1374.
- Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63: 3327-3332.
- Nübel, U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (2000) The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina Turpin*) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov. sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1265–1277.
- Ochsenreiter T, Pfeifer F, Schleper C (2002) Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles* 6: 267–274.
- Oren A (1994) The ecology of extremely halophilic archaea. *FEMS microbiol* 13: 415-440.
- Oren A (1999a) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 334–348.
- Oren A (1999b) The Enigma of Square and Triangular Halophilic Archaea (Cellular Origin and Life in Extreme Habitats, 1: 337-355. *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*, Kluwer Academic Publishers).
- Oren A (2000) Life at High Salt Concentrations: Possibilities and Limitations (Cellular Origin and Life in Extreme Habitats) *Journey to Diverse Microbial Worlds, Adaptation to Exotic Environment*, Kluwer Academic Publishers, 2: 227 – 238.

- Oren A (2001) The order *Haloanaerobiales*, In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (Eds) The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 3<sup>rd</sup> ed. Springer-Verlag, New York (electronic publication).
- Oren A (2002a) Diversity of Halophilic Microorganisms: Environments, Phylogeny, Physiology and Applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 56–63.
- Oren A (2002b) Halophilic Microorganisms and their Environments (Cellular Origin and Life in Extreme Habitats, Vol. 5; Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments, Kluwer Academic Publishers).
- Oren A (2002c) Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 39: 1-7.
- Oren A, Ventosa A, Gutiérrez MC, Kamekura M (1999) *Haloarcula quadrata* sp. nov. A square, motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *Int J Syst Bacteriol.* 49 (3):1149-1155.
- Osborn AM, Moore ER, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2:39-50.
- Ovreas L, Daae FL, Torsvik V, Rodríguez-Valera F (2003) Characterization of microbial diversity in hypersaline environments by melting profiles and reassociation kinetics in combination with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microb Ecol* 46:291–301.
- Pagaling E, Wang H, Venables M, Wallace A, Grant WD, Cowan DA, Jones BE, Ma Y, Ventosa A, Heaphy S (2009) Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina. *Appl Environ Microbiol* 75: 5750–5760.
- Pasqualetti M, Paoletti M, Fenice M, Tempesta S (2014) Studi preliminari sulla biodiversità dei funghi marini isolati nell'area costiera dell'isola del Giglio. Convegno Gestione Sostenibile del Mediterraneo. Accademia Nazionale dei Lincei. Roma 21 marzo 2014.
- Pedrós-Alió C (1993) Bacterioplankton diversity. *Trends Ecol Evol* 8: 86-90.
- Pedrós-Alió C (2005) Diversity of Microbial Communities: the Case of Solar Salterns (Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, Vol. 9; Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya pp. 71 - 90).
- Pedrós-Alió C, Calderón-Paz JI, MacLean MH, Medina G, Marrase C, Gasol JM, Guixa-Boixereu N (2000) The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol Ecol* 32: 143–155.

- Pesciaroli C, Cupini F, Selbmann L, Barghini P and Fenice M (2012). Temperature preferences of bacteria isolated from seawater collected in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia. *Polar Biol* 35: 435-445.
- Polesi P (2005) Influenza delle fluttuazioni ambientali sulla struttura genetica di *Aphanius fasciatus* delle Saline di Tarquinia: dati preliminari. Univ. della Tuscia di Viterbo, Fac. di Scienze MM.FF.NN., Tesi di laurea A.A. 2004 -2005.
- Poli A, Nicolaus B, Denizci AA, Yavuzturk B, Kazan D (2013) *Halomonas smyrnensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium from Camalti Saltern area, Turkey. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 10–18.
- Post FJ (1977) The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb ecol* 3: 143-165.
- Post FJ, Borowitzka LJ, Borowitzka MA, Mackay B, Moulton T (1983) The protozoa of a western Australian hypersaline lagoon. *Hydrobiologia* 105: 95-113.
- Pusheva MA, Detkova EN (1996) Bioenergetic aspects of acetogenesis on various substrates by the extremely halophilic acetogenic bacterium *Acetohalobium arabaticum*. *Microbiologiya* 65: 516–520.
- Qi SH, Xu Y, Xiong HR, Qian PY, Zhang S (2009) Antifouling and antibacterial compounds from a marine fungus *Cladosporium* sp. F14. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 399–406.
- Rademaker JLW, Louws FJ, Rossbach U, Vinuesa P, De Bruijn F (1999) Computer-assisted analysis of molecular fingerprints and database construction. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Akkermans ADL, van Elsas JD and De Bruijn FJ (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, chapter. 7.1.3.
- Rainey FA, Zhilina TN, Boulygina ES, Stackebrandt E, Tourova TP, Zavarzin GA (1995) The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of *Halobacteriales* ord. nov. *Halobacteroidaceae* fam. Nov., *Orenia* gen.nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. *Anaerobe* 1: 185-199.
- Ramos-Cormenzana A (1989) Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms, p. 289–309. In Da Costa MS, Duarte JC, and Williams RAD (ed.), *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*. Elsevier Applied Science, London, United Kingdom.
- Reboleiro Rivas P, Juarez Jimenez B, Martinez Toledo MV, Rodelas M, Andrade L, Gonzalez Lopez J and Fenice M (2013) Bacterial communities structure in a high mountain

- lake during the ice-free season: cultural and PCR-TGGE investigations. *Int J Environ Res* 7:685–696.
- Reis A, Lopes da Silva T, Kent CA, Kosseva M, Roseiro JC, Hewitt CJ (2005) Monitoring population dynamics of the thermophilic *Bacillus licheniformis* CCMI 1034 in batch and continuous cultures using multi-parameter flow cytometry. *J Biotechnol* 115: 199–210.
  - Rengpipat S, Langworth TA, Zeikus JG (1988a) *Halobacteroides acetoethylicus* sp. nov., a new obligately anaerobic halophile isolated from deep subsurface hypersaline environments. *Syst Appl Microbiol* 11: 28–35.
  - Rengpipat S, Lowe SE, Zeikus JG (1988b) Effect of extreme salt concentrations on the physiology and biochemistry of *Halobacteroides acetoethylicus*. *J Bacteriol* 170: 3065–3071.
  - Rogerson A, Hauer G (2002) Naked amoeba (Protozoa) of the Salton Sea, California. *Hydrobiologia* 473: 161-177.
  - Romano I, Gambacorta A, Lama L, Nicolaus B, Giordano A (2005) *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* subsp. nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy). *Syst Appl Microbiol*, 28: 34–42.
  - Romano I, Giordano A, Lama L, Nicolaus B, Gambacorta A (2003) *Planococcus rifitensis* sp. nov, isolated from algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy). *Syst Appl Microbiol* 26: 357–366.
  - Romano I, Lama L, Nicolaus B, Poli A, Gambacorta A, Giordano A (2006) *Halomonas alkaliphila* sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy). *J Gen Appl Microbiol* 52: 339–348.
  - Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, et al (2011) An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475: 348–352.
  - Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092-1101.
  - Ruinen J (1938) Notizen über Salzflagellaten II. Über die Verbreitung der Salzflagellaten. *Arch f. Protistenkd* 90: 210-258.
  - Russell NJ, Fukunaga N (1990) A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 75: 171-182.
  - Ryu E (1940) A simple method of differentiating between Gram-positive and Gram-negative organism without staining. *Kitasato arch Exp Med* 17: 58-63.
  - Salles JF, De Souza FA, van Elsas JD (2002) Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 68: 1595-1603.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5463-5467.
- Sardar AG, Pathak AP (2014) Exploring the microbiota of solar saltern of Mulund, Mumbai, India. *Indian J Mar Sci* 43:634-641.
- Schumann P, Rainey FA, Burghardt J, Stackebrandt E, Weiss N (1999) Reclassification of *Brevibacterium oxydans* (Chatelain and Second 1966) as *Microbacterium oxydans* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49: 175-177.
- Selbmann L, Zucconi L, Ruisi S, Grube M, Cardinale M, Onofri S (2010) Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. *Polar Biol* 33: 71-83.
- Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zhang JB, He JZ (2008) Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammoniaoxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol* 10 (6): 1601–1611.
- Shendure J, Ji HL (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnol*, 26: 1135–1145.
- Silvi S, Barghini P, Aquilanti A, Juarez-Jimenez B, Fenice M (2013) Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharide. *Microb Cell Fact* 12:10.
- Szczuka E, Kaznowski A (2004) Typing of Clinical and Environmental *Aeromonas* sp. Strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR. *J Clin Microbiol* 42: 220–228.
- Takekawa JY, Miles AK, Schoellhamer DH, Athearn ND, Saiki MK, Duffy WD, Kleinschmidt S, Shellenbarger GG, Jannusch CA (2006) Trophic structure and avian communities across a salinity gradient in evaporation ponds of the San Francisco Bay estuary. *Hydrobiol* 567: 307-327.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Tempesta S, Paoletti M, Pasqualetti M (2010) Morphological and molecular identification of a strain of the unicellular green alga *Dunaliella* sp. isolated from Tarquinia Salterns. *TWB, Transit Waters Bull* 4: 60–70.
- Thiery A, Puente L (2002) Crustacean assemblage and environmental characteristics of a man-made solar saltwork in southern France, with emphasis on anostracan (Branchiopoda) population dynamics. *Hydrobiologia* 486: 191-200.

- 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.
- Tkavc R, Gostinčar C, Turk M, Visscher PT, Oren A, Gunde-Cimerman N (2011) Bacterial Communities in the ‘Petola’ Microbial Mat from the Sečovlje Salterns (Slovenia). *FEMS Microbiol Ecol*, 75: 48 – 62.
- Torsvik V and Øvreås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5(3): 240–245.
- Tsiamis G, Katsaveli K, Ntougias S, Kyrpides N, Andersen G, Piceno K, Bourtzis K (2008) Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern. *Res in Microbiol* 159: 609-627.
- Vandecandelaere I, Nercessian O, Segaert E, Achouak W, Faimali M, Vandamme P (2008) *Ruegeria scottomollicae* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2726–2733.
- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 504-544.
- Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Izard D, Leclerc H (1999) Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. And *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 22: 45-58.
- Vinuesa P, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Werner D, (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR genomic fingerprinting, and Partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* 64: 2096-2104.
- Vreeland RH (1987) Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 14: 311–356.
- Vreeland RH, Daigle SL, Fields ST, Hart DJ, Martin EL (1991) Physiology of *Halomonas elongata* in different NaCl concentrations. In: Rodriguez-Valera F (ed) General and applied aspects of halophilic microorganisms. Plenum Press, New York, pp 233–241.
- Vreeland RH, Hochstein LI (1992) The biology of halophilic bacteria, pp. 87-88. CRC press, Inc. USA.
- Walsby AE (2005) Archaea with Square Cells. *Trends in Microbiol*, 13 (5): 193- 195.

- Walsh DA, Papke RT, Doolittle WF (2005) Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance. *Environ Microbiol* 7:1655–1666.
- Wang Y, Cao LL, Tang SK, Lou K, Mao PH, Jin X, Jiang CL, Xu LH, Li WJ (2009) *Marinococcus luteus* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from a salt lake, and emended description of the genus *Marinococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2875–2879.
- Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, Harayama S (1998) Molecular detection, isolation, and physiological characterization of 80 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.
- Wauters GM, Janssens AG, Steigerwalt, Brenner DJ (1988) *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. *Int J Syst Bacteriol* 38: 424–429.
- Whittenbury R (1964) Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. *J Gen Microbiol* 35: 13-26.
- Wiegel J (1990) Temperature spans for growth: Hypothesis and discussion. *FEMS Microbiol Lett* 75: 155-169.
- Wilbert N (1995) Benthic ciliates of salt lakes. *Acta Protozool* 34: 271-288.
- Wittebolle L, Boon N, Vanparys B, Heylen K, De Vos P, Verstraete W (2005) Failure of the ammonia oxidation process in two pharmaceutical wastewater treatment plants is linked to shifts in the bacterial communities. *J Appl Microbiol* 99: 997–1006.
- Wittebolle L, Vervaeren H, Verstraete W, Boon N (2008) Quantifying Community Dynamics of Nitrifiers in Functionally Stable Reactors. *Appl Environ Microbiol* 74: 286-293.
- Xiao X, Han Z, Chen Y, Liang X, Li H, Qian Y (2011) Optimization of FDA–PI method using flow cytometry to measure metabolic activity of the cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa*. *Phys Chem Earth* 36: 424-429.
- Yeon SH, Jeong WJ, Park JS (2005) The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *J Microbiol* 43: 1–10.
- Yoon JH, Choi SH, Lee KC, Kho YH, Kang KH, Park YH (2001) *Halomonas marisflavae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1171–1177.

- Yoon JH, Kang SJ, Lee SY, Oh KH, Oh TK (2010) *Planococcus salinarum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern, and emended description of the genus *Planococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 754–758.
- Yumoto I, Hirota K, Kimoto H, Nodasaka Y, Matsuyama H, Yoshimune K (2010) *Psychrobacter piscatorii* sp. nov., a Psychrotolerant Bacterium Exhibiting High Catalase Activity Isolated from an Oxidative Environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 205-208.
- Zahran HH, Diversity, Adaptation and Activity of the Bacterial Flora in Saline Environments (1997) *Biol Fert Soils*, 25: 211 – 223.
- Zalar P, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N (1999) *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Studies Mycol* 43: 57-62.
- Zhang L, Xu ZH (2008) Assessing bacterial diversity in soil. *J Soil Sediment* 8 (6): 379–388.
- Zhang YQ, Yu LY, Liu HY, Zhang YQ, Xu, LH, Li WJ (2007) *Salinicoccus luteus* sp. nov., isolated from a desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1901–1905.
- Zhilina TN, Zavarzin GA (1987) *Methanohalobium evestigatum* gen. nov., sp. nov., extremely halophilic methane-producing archaeobacteria. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 293:464–468.
- Zinger L, Gobet A, Pommiers T (2012) Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Mol Ecol* 21: 1878–1896.

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare il prof. Massimiliano Fenice per le utili indicazioni e l'aiuto nella realizzazione di questo lavoro di tesi.

Ringrazio il dott. Paolo Barghini per i suoi preziosi consigli e la dott.ssa Silvia Silvi per il sostegno e l'affetto che mi ha sempre dimostrato.

Un ringraziamento particolare va al Corpo Forestale dello Stato per l'enorme disponibilità nel corso dell'intera campagna di campionamento presso le Saline di Tarquinia.

Ringrazio infine tutti coloro che hanno reso possibile il campionamento presso "Salina Chiusicella" all'interno delle Saline di Trapani e Paceco.