

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Indagini molecolari per
l'identificazione di batteri solfato
riduttori in una laguna costiera**

Tesi di laurea in Adattamenti degli animali all'ambiente
marino

Relatore

Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da

Nicoletta Cecchetti

Correlatore

Silvia Franzellitti

Il sessione

Anno Accademico 2012 - 2013

Indice

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	7
1.1 Zone umide costiere	9
1.1.1 Caratteristiche generali.....	9
1.1.2 Caratteristiche biologiche.....	13
1.1.3 Minacce e gestione.....	16
1.1.4 Lagune costiere.....	22
1.2 Sito di studio: Pialassa dei Piomboni	27
1.3 I microrganismi marini	35
1.3.1 La materia organica in ambiente marino.....	35
1.3.2 I sedimenti marini: ipossia e anossia.....	37
1.3.3 Comunità microbiche dei sedimenti e degradazione della materia organica.....	41
1.3.4 Ciclo dello zolfo.....	45
1.3.5 Il DMS e l'influenza sul clima.....	47
1.3.6 I batteri solfato-riduttori.....	49
1.3.7 La riduzione del solfato.....	52
1.3.8 I solfobatteri e l'ossidazione dei composti ridotti dello zolfo.....	54
 CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI	 57

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI	61
3.1 Campionamento	63
3.2 Analisi dei parametri chimico-fisici	65
3.1 Analisi molecolari per l'identificazione dei batteri solfato-riduttori	66
3.1.1 Estrazione del DNA	66
3.1.2 Amplificazione selettiva (PCR, Polymerase Chain Reaction).....	67
3.1.3 Elettroforesi e analisi d'immagine.....	70
3.4 Quantificazione relativa dei solfato-riduttori nei campioni positivi	71
CAPITOLO 4 – RISULTATI	73
4.1 Risultati relativi all'analisi chimica delle acque	75
4.1.1 Principali parametri chimico-fisici.....	75
4.1.2 Solfuri, solfati, nitrati, fosfati, clorofilla a.....	76
4.2 Risultati relativi all'analisi molecolari dei solfato-riduttori presenti nelle acque e nei sedimenti	78
4.2.1 Identificazione dei batteri solfato-riduttori.....	78
4.2.2 Quantificazione relativa dei solfato-riduttori nei campioni positivi.....	82
CAPITOLO 5 – DISCUSSIONE	85
CAPITOLO 6 – VALUTAZIONI FINALI	91
Bibliografia e Siti web	95
Siti web	114

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 Zone umide costiere

1.1.1 Caratteristiche generali

Le zone umide costiere (coastal wetlands) sono ambienti di transizione ovvero zone dove si realizza la transizione tra terra e mare con mescolamento di acque dolci e salate. Si tratta di ambienti di notevole complessità ed importanza, estremamente variabili e diversificati in termini di grandezza, morfologia, genesi, che sono determinate dalla diversa evoluzione geologica e dalle caratteristiche idrologiche; ma che presentano tuttavia una notevole affinità sia per quanto riguarda la grande variabilità dei parametri chimico-fisici, che per quanto riguarda le specie presenti e gli adattamenti che esse mettono in atto per far fronte a queste variabili condizioni ambientali.

Il concetto di zona umida oggi comunemente accettato, è stato definito in una conferenza internazionale tenutasi nel 1971 a Ramsar , in Iran e che dava la seguente definizione: *“Ai sensi della presente Convenzione si intendono per zone umide le paludi e gli acquitrini, le torbe oppure i bacini, naturali o artificiali, permanenti o temporanei, con acqua stagnante o corrente, dolce, salmastra, o salata, ivi comprese le distese di acqua marina la cui profondità, durante la bassa marea, non supera i sei metri. Ai sensi della presente convenzione si intendono per uccelli acquatici gli uccelli ecologicamente dipendenti dalle zone umide”* (Convenzione di Ramsar 1972).

Non esiste però una definizione univoca di zona umida. Ciò deriva dal fatto che si fa riferimento non ad un singolo ecosistema ma ad un insieme di ecosistemi, le cui caratteristiche naturali, condizionate dall'altitudine, dal clima, dalla geologia, e dall'idrologia sono estremamente variabili. In queste zone si possono infatti trovare diversi habitat quali canneti, estuari, stagni, lagune, isole sabbiose, boschi allagati, popolati da una varietà di forme di vita animale e vegetale.

Recentemente questa classificazione tradizionale delle acque salmastre è stata modificata dall'entrata in vigore della Direttiva Comunitaria Direttiva Acqua (WFD, 2000/60/EC) che con un solo termine “Acque di transizione” ha raggruppato tutti gli ecosistemi salmastri europei. Molte definizioni sono state attribuite alle “acque di transizione”; secondo la direttiva citata vengono definiti come: *“i corpi idrici superficiali in prossimità della foce di un fiume, che sono parzialmente di natura salina a causa della loro vicinanza alle acque costiere, ma sostanzialmente influenzati dai flussi di acqua dolce”* (Direttiva Acqua 2000). Tuttavia, mentre alcuni estuari e lagune

costiere rientrano nella definizione di acque di transizione della direttiva quadro europea, molte lagune costiere del Mediterraneo si trovano fuori questa definizione in quanto non ricevono nessun apporto di acqua dolce. Da qui la difficoltà nell'applicazione della direttiva quadro sulle acque.

In passato le zone umide erano considerate luoghi malsani, portatrici di malaria e altre malattie o anche una perdita di terreno prezioso. Proprio per questo, fin dall'epoca romana e all'inizio del Medioevo, iniziarono molte attività di bonifica che portarono alla perdita di diverse zone umide costiere. Oggi, è ormai ampiamente riconosciuto che esse forniscono, nonostante la loro spesso ridotta copertura, diverse funzioni e servizi essenziali quali: la protezione costiera, il controllo delle inondazioni, il miglioramento della qualità delle acque, la stabilizzazione del clima (ad esempio attraverso il sequestro di carbonio), le risorse ittiche, la decomposizione della materia organica, il ciclo e la produzione dei nutrienti, la regolazione del flusso di nutrienti, acqua, particelle e organismi, habitat per i pesci, molluschi, uccelli e altri animali e in molti casi offrono anche opportunità di svago per la popolazione umana. Per molte specie residenti o migratrici queste zone possono spesso servire come aree di alimentazione, di rifugio dai predatori, ma anche come zone di riproduzione, di nidificazione e di crescita. Sono stati condotti molti studi di valutazione delle zone umide e la gamma delle stime è rimarchevole. Molti autori hanno stimato che le zone umide contribuiscono fino al 40% dei servizi ecosistemici annuali globali.

La caratteristica principale di questi ambienti è l'instabilità dei parametri chimico-fisici. Essendo infatti zone di transizione tra terra e mare, spesso si verificano fluttuazioni estreme di parametri quali salinità, temperatura, livello di ossigeno disciolto, limitando il numero di specie presenti. Sono infatti poche le specie in grado di tollerare queste variazioni estreme, di conseguenza questi ambienti sono caratterizzati da una bassa biodiversità. In generale, per le acque di transizione, l'intervallo di variabilità di tali parametri, presenta un'ampiezza notevolmente superiore a quella delle acque marine.

In queste zone si realizza un mescolamento di acqua salata e di acqua dolce che è spazialmente e temporalmente complesso. Si tratta di ambienti costieri in cui la salinità, a causa di questo mescolamento, raggiunge valori minori di quelli riscontrati in ambiente marino. La salinità, che è assunta come parametro per la classificazione ed il monitoraggio delle acque di transizione, può quindi variare in relazione a tre fattori

principali: evaporazione, precipitazioni e mescolamento delle acque. Nella stagione estiva le alte temperature possono determinare un elevato grado di evaporazione quindi un aumento della salinità, mentre piogge abbondanti determinano un apporto di acque dolci che farà diminuire la salinità. Il mescolamento tra acqua dolce e salata spesso crea numerosi gradienti come quello salino con maggiore salinità verso il mare e minore risalendo verso l'interno; la variazione è poi più o meno accentuata a seconda della morfologia del bacino e della presenza o meno di fiumi e sbocchi al mare. Le principali fonti di acqua dolce sono rappresentate dall'afflusso fluviale, delle acque sotterranee, dalla precipitazione diretta. Tra i maggiori nutrienti associati a questi flussi di acqua dolce si ritrovano azoto e relativamente piccole concentrazioni di fosforo, i quali non risultano mai essere fattori limitanti in questi bacini, al contrario, spesso la loro eccessiva presenza crea problemi determinando elevatissime produzioni primarie. La quantità di particolato e di materia organica che entra nel sistema e la distribuzione di questi ingressi sono fattori fondamentali nella strutturazione delle comunità dei sedimenti. L'acqua salata invece, entra nel sistema guidata dalle maree, dal moto ondoso e dal vento, così come attraverso la percolazione nelle acque sotterranee. Le acque salmastre vengono spesso classificate in base ai valori di salinità, la cui variazione è molto più evidente e più facilmente misurabile rispetto a quella di altri parametri. Altro fattore fisico estremamente variabile negli ambienti salmastri è la temperatura. Le basse profondità rendono le acque esposte sia alle elevate temperature estive, sia alle basse temperature invernali. La temperatura dell'acqua presenta oscillazioni stagionali e giornaliere che risultano particolarmente alte a seconda dell'idrodinamismo e della profondità del sistema. Queste variazioni influenzano direttamente la concentrazione dell'ossigeno disciolto che ha un ruolo fondamentale per gli organismi aerobi, il quale determina la distribuzione e la composizione delle comunità bentoniche. L'ossigeno disciolto dipende dal carico organico presente nell'acqua, da quello proveniente dalla produzione fotosintetica (stato trofico) e dagli scambi gassosi tra aria e acqua. Viene utilizzato nella respirazione di alghe e animali presenti nella colonna d'acqua o in altri processi di ossidazione che hanno luogo nei sedimenti. L'elevata variabilità dei parametri chimico-fisici e le particolari caratteristiche che distinguono le zone umide costiere, le rendono ambienti imprevedibili e altamente selettivi, tanto da presentare analogie con gli ambienti inquinati. Inoltre, le frequenti fluttuazioni ambientali possono

agire come disturbo impedendo alle comunità naturali di stabilirsi in modo persistente. Mentre però gli effetti alle comunità dovuti al disturbo dipendono dalla frequenza e dall'intensità del disturbo, le risposte dipendono dalla resistenza intrinseca e dalla stabilità della comunità. Comunità instabili, come quelle che si ritrovano nelle zone umide, sono spesso le più resilienti perché contengono specie adattate a condizioni ambientali variabili; una serie di studi hanno dimostrato infatti, che le comunità instabili riescono a tornare prima alla loro precedente composizione e struttura a seguito di una qualche forma di disturbo rispetto alle comunità stabili.

Essendo zone separate dal mare, sono caratterizzate da un basso idrodinamismo che favorisce un'accentuata sedimentazione di materiale sia marino che terrestre. Anche le piante vascolari possono aumentare la deposizione di polveri sottili e di materiale organico sul fondo rallentando il flusso d'acqua. Circa il 90% delle particelle di materia organica che entrano nella zona umide costiere è trasferito nei sedimenti attraverso la flocculazione chimica o l'adsorbimento. Tutto ciò può portare, soprattutto durante la stagione estiva, quando si hanno alte temperature e ristagno delle acque per basso ricambio idrico, un forte accumulo di sostanza organica in decomposizione, e conseguenti crisi distrofiche che determinano un elevato consumo di ossigeno fino ad arrivare alla completa anossia nei sedimenti e poi nell'acqua, con produzione di metano, ammoniacca e idrogeno solforato. In alcuni casi il fenomeno può estendersi portando anche ad estese morie di organismi soprattutto bentonici. Nonostante ciò, tali ambienti mostrano una certa capacità di ritornare alle condizioni iniziali (resilienza) in tempi brevi anche dopo aver subito perturbazioni di notevole entità a patto che si ristabilisca un adeguato ricambio idrico. Il ricambio idrico infatti, rappresenta un fattore fondamentale, in quanto limita le variazioni dei parametri chimico-fisici, migliora la trasparenza, diluisce i cataboliti e le sostanze tossiche prodotte dagli organismi. I meccanismi coinvolti nella resilienza sono da ricercarsi soprattutto negli adattamenti delle diverse specie presenti.

Per questa accentuata sedimentazione, ma non solo, le zone umide costiere sono tra i sistemi naturali più produttivi al mondo e sostengono un'alta biomassa vegetale e animale. Sono ambienti alimentati da consistenti flussi di energia e materia, che se da una parte conferiscono loro importanza economica, dall'altra li rendono facilmente sottoposti a rischiose crisi distrofiche. Saline, praterie di fanerogame e foreste di

mangrovie producono grandi quantità di materiale vegetale morto (lettiera), gran parte del quale entra nel sistema come grandi particelle detritiche. In presenza di una notevole quantità di ossigeno, questo materiale viene degradato da batteri aerobi, con conseguente sviluppo di un'elevata biomassa algale e batterica nelle acque sovrastanti. La grande abbondanza di nutrimento richiama numerosi animali di interesse commerciale che compiono migrazioni trofiche stagionali, e rende inoltre questi ambienti particolarmente favorevoli come zone di accrescimento per giovanili dove poter crescere a riparo dai predatori in questa loro fase particolarmente vulnerabile.

L'insieme degli ambienti salmastri viene considerato da Remane (1940) come un dominio autonomo da lui definito ifalmirobio (paralitico, secondo una recente definizione di alcuni autori francesi), situato tra il dominio marino e quello delle acque dolci, costituito da una fauna comune la cui distribuzione è legata ad un insieme di fattori instabili. In realtà, essendo le zone umide costiere ambienti estremamente eterogenei, è difficile fornire un quadro unitario e sintetico delle loro caratteristiche biologiche e chimico-fisiche; questo può portare a conclusioni di carattere generale che possono essere valide per una situazione ma non per un'altra. Per cui, più che come un dominio autonomo l'ambiente salmastro va considerato come un complesso di ambienti di transizione fra mare e terra, ciascuno rappresentante un'entità a se stante, le cui condizioni non possono essere generalizzate.

1.1.2 Componente biologica

L'alta variabilità produce ricchezza e diversità di habitat e di specie, ma al tempo stesso richiede la necessità da parte degli organismi di sviluppare adattamenti fisiologici che permettano loro di affrontare cambiamenti repentini dei diversi parametri ambientali. Tali adattamenti comportano un elevato costo energetico che si riflette nei tassi di crescita e riproduzione. Ogni parametro, entro alcuni limiti, può rappresentare un fattore limitante per una data specie. In particolare, la salinità gioca il ruolo più importante, che è più evidente nelle grandi lagune o zone marine salmastre, dove la distribuzione degli organismi può essere stabilita in relazione alle isoline.

In questi ambienti si possono trovare diverse specie eurialine di acqua marina in grado di sopportare una notevole riduzione di salinità, e di specie d'acqua dolce capaci di sopportare un certo grado di salinità, ma anche un piccolo numero di specie "caratteristiche delle acque salmastre". Si tratta di specie che tollerano condizioni estremamente instabili e variabili. Il fenomeno è probabilmente dovuto alla presenza di genotipi con differente grado di adattabilità che attraverso la selezione hanno dato origine a popolazioni in grado di colonizzare questi ambienti. Peres e Picard (1964) parlando della biocenosi Lagunare Euriterma ed Eurialina, hanno affermato che: *"il popolamento di queste sabbie fangose o fanghi sabbiosi resta sensibilmente lo stesso sia quando l'acqua è costantemente meno salata dell'acqua di mare del largo, sia quando è costantemente più salata, sia ancora che presenti delle variazioni di salinità molto importanti durante l'anno"*. Questa componente biocenotica stabile, i cui organismi principalmente di origine marina, svolgono l'intero ciclo di vita in questo ambiente, è stata definita come "alolimnobica" da Bacci (1954). Da questi organismi si distinguono quelli definiti "alolimnofili", ovvero quelli che entrano in questi bacini a scopo nutrizionale e vi trascorrono periodi più o meno lunghi.

Le zone umide costiere sono, nel complesso, caratterizzate da una bassa diversità, ma da una maggior biomassa rispetto alle comunità marine. Come si può osservare nella figura sottostante, la diversità specifica tende a diminuire seguendo un gradiente di stress dal mare verso l'interno, come secondo l'ipotesi di Sanders (1968).

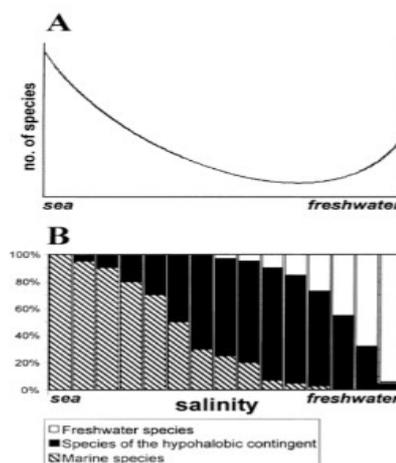


Figura 1. Schema della distribuzione delle specie nelle zone di transizione tra il mare e l'acqua dolce. (A) Relazione tra il numero di specie e la salinità. (B) Proporzione percentuale di specie marine, d'acqua dolce e specie caratteristiche di questi ambienti lungo un gradiente di salinità (da Cognetti G. e Maltagliati F., 2000).

Inoltre, ciascuna specie è solitamente rappresentata da un numero consistente di individui, perché la competizione è bassa e le specie presenti riescono a sfruttare al massimo le risorse disponibili, ma questo può dipendere anche dall'origine piuttosto recente dei bacini costieri attuali e dalla loro natura effimera.

Tra gli organismi viventi presenti in questi ambienti si ritrovano: fitoplancton, alghe e piante acquatiche, zooplancton, e organismi bentonici quali diversi invertebrati e batteri. Si tratta spesso di specie opportuniste, a strategia r , che hanno vita breve, cicli di sviluppo rapidi, piccole dimensioni corporee, alte densità numeriche e che sono adattate a particolari condizioni ambientali quali ad esempio carenza di ossigeno per un eccessivo carico organico e circolazione ridotta, contrariamente alle specie a strategia k rappresentate da una grande diversità di taxa.

Il fitoplancton è costituito da microscopici organismi vegetali unicellulari o coloniali, che vivono in sospensione nelle acque, caratterizzati da scarsa mobilità; essi rappresentano, insieme ad alghe e piante idrofite, i produttori primari, fissano attraverso la fotosintesi clorofilliana l'anidride carbonica atmosferica, producendo nuova materia vivente. Le piante idrofite invece sono piante che vivono sommerse o galleggianti nell'acqua. L'altra componente planctonica è rappresentata dallo zooplancton, ossia la componente animale del plancton, costituito da una grande varietà di organismi che possono condurre vita pelagica per tutta la loro esistenza (oloplancton) o solo per una parte di essa (meroplancton). Altra importante componente è rappresentata dalla comunità bentonica di fondo molle che comprende soprattutto diversi invertebrati e batteri. Gli invertebrati che vivono nei sedimenti, quali nematodi, copepodi, anellidi, molluschi, crostacei, sono la base alimentare per molte specie di pesci e invertebrati più grandi; presentano un certo grado di eurialinità e sono in grado di sopportare variazioni della concentrazione salina entro un vasto arco di valori. Si tratta di organismi relativamente sedentari, dal ciclo vitale lungo e che svolgono un ruolo importante nel riciclo dei nutrienti e di altri composti chimici, tra i sedimenti e la colonna d'acqua soprastante. Le loro funzioni principali includono: la frammentazione, che favorisce il metabolismo microbico permettendo il riciclo della materia organica; l'alimentazione sospensiva, che raccoglie e trasporta i sedimenti attraverso l'interfaccia acqua-sedimenti; la bioturbazione che smuove i sedimenti dentro e fuori il fondo marino e può influenzare la velocità con cui la materia organica viene decomposta e se si verifica

decomposizione aerobica o anaerobica. I bioturbatori all'interno dei sedimenti delle zone umide possono formare grandi tane profonde, come è caratteristica di molti tipi di granchi e gamberetti, o piccole tane, come quelli di anellidi, un gruppo estremamente abbondante nei sedimenti di estuari o altre zone umide costiere. Tutti questi invertebrati rappresentano vettori che favoriscono il trasporto di nutrienti e materia organica dai sedimenti alla colonna d'acqua sovrastante.

Le comunità bentoniche vengono considerate lo strumento migliore per la descrizione delle condizioni ecologiche di questi ecosistemi perché a diretto contatto con il sedimento e quindi fortemente dipendenti dalle sue caratteristiche. Inoltre, essendo organismi caratterizzati generalmente da una scarsa mobilità non hanno la possibilità di sottrarsi all'azione di inquinanti o ad eventi di disturbo. Risultano pertanto dei buoni indicatori delle fluttuazioni naturali o dei disturbi indotti dalle attività umane. Anche la composizione microbica dei sedimenti, la qualità dell'acqua, sono esempi di indicatori spesso utilizzati per valutare lo stato delle zone umide costiere. Negli ultimi anni diverse normative hanno riconosciuto l'importanza del benthos nel fornire indicazioni circa la qualità di laghi, fiumi, acque costiere e ambienti di transizione (Direttiva quadro 2000/60/CE). Anche le singole specie possono fornire informazioni su diversi fattori di un determinato ambiente in base alla loro presenza o/e abbondanza. La struttura e la composizione del popolamento bentonico è fortemente variabile nello spazio e nel tempo, data la variabilità di questi sistemi. Spesso tali popolamenti subiscono drastiche variazioni in numero o composizione in risposta a diversi stress abiotici, ma sono comunque in grado di ricolonizzare rapidamente questi sistemi anche dopo drastici cambiamenti ambientali.

1.1.3 Minacce e gestione

Oltre alle prevedibili variazioni stagionali dei vari parametri ambientali, vi sono eventi di disturbo, spesso dovuti alle attività umane, in grado di provocare profonde variazioni a livello delle comunità bentoniche. Le zone umide costiere risultano infatti particolarmente sensibili e vulnerabili alle varie pressioni antropiche, le quali rappresentano un pericolo per la loro integrità e per la biodiversità. Lo sviluppo umano

sta già eliminando le zone umide costiere ad un tasso del 1% annuo. È stato stimato che circa il 50% della superficie delle zone umide a livello mondiale è stato perso a causa di attività umane, 26% del quale è stato utilizzato per l'agricoltura intensiva. Le alterazioni possono essere raggruppate in quattro categorie: geomorfologiche e idrologiche (deviazioni di acqua, arginamento, costruzioni di dighe), nutrienti e contaminanti (eutrofizzazione, immissione di sostanze inquinanti); raccolte, estinzioni, e invasioni (pascolo, raccolte di piante e animali, specie esotiche), e cambiamenti climatici (riscaldamento globale, intensità e frequenza di temporali ecc.). Questi sono esempi di fattori di stress di origine antropica che possono avere impatti profondi e improvvisi sugli ecosistemi costieri.

L'attività umana sta provocando grandi cambiamenti nella quantità di nutrienti che arrivano negli estuari o nelle altre zone umide costiere soprattutto attraverso i fiumi. I carichi di azoto, in particolare, sembra essere in aumento negli ultimi anni. Questi input di nutrienti stimolano la produzione fitoplanctonica ed algale, la quale aumenta l'input di materiale organico sul fondo con conseguente riduzione della disponibilità di ossigeno e cambiamento nella struttura dei popolamenti bentonici. L'ipossia, o a volte anossia, si verifica soprattutto nel periodo estivo durante il quale c'è un maggior riscaldamento delle acque quindi una maggiore stratificazione. L'effetto a lungo termine può essere la perdita di produttività e di diversità di pesci e invertebrati a causa della formazione di composti tossici come solfuro di idrogeno e di gas in traccia quali metano, monossido di carbonio, e spesso la perdita di potenziali attività ricreative perché l'acqua diventa torbida. Gli effetti dell'eutrofizzazione possono inoltre portare a uno squilibrio nelle reti alimentari, aumentando la probabilità di crisi distrofiche con conseguenze disastrose per la qualità dell'acqua, il mantenimento delle funzioni ecosistemiche e l'integrità di questi sistemi. In aggiunta, molto spesso, a seguito di tali condizioni, si verificano fioriture algali nocive (HAB) e pericolose per la salute di tutti gli organismi compreso l'uomo. I problemi connessi con l'eutrofizzazione possono essere aggravati dalla perdita di alimentatori sospensioni, che hanno la capacità di filtrare particelle in sospensione, ma anche di bioturbatori, che favoriscono la circolazione dell'acqua quindi una maggiore disponibilità di ossigeno. Le immissioni antropiche nelle zone umide costiere non interessano solo azoto e fosforo, ma sfortunatamente anche inquinanti. I contaminanti possono alterare la diversità delle

specie attraverso la tossicità diretta o effetti subletali che influenzano la fitness, ma possono anche portare alla perdita di specie attraverso la riduzione delle prede. La perdita di biodiversità associata ad una ridotta ossigenazione e bioturbazione dei sedimenti potrebbe diminuire la biodegradazione e il trasporto di inquinanti ed aumentare efficacemente il loro sequestro a lungo termine nei sedimenti anaerobi. In generale, elevati disturbi antropici all'interno delle zone umide determinano una bassa diversità, creano un sistema particolarmente vulnerabile alla colonizzazione da parte di specie a rapido accrescimento, opportunistiche e invasive. Le zone umide costiere infatti, risultano oggi frequentemente soggette a invasioni di specie alloctone che arrivano da acqua di zavorra, incrostazioni delle navi, acquacoltura. È proprio la bassa ricchezza di specie e gli alti tassi di disturbo che caratterizzano molte zone umide a determinare e favorire il successo dei nuovi invasori.

Le pesanti attività antropiche su questi sistemi costieri stanno determinando quello che viene chiamato perdita di habitat oltre ad una serie di alterazioni dei processi chimici e fisici. Queste perdite fanno seguito ad attività di dragaggio, costruzione di dighe, canali, strade e cambiamenti su larga scala nell'uso del suolo. Sono tutte attività che stanno determinando cambiamenti significativi nella profondità, direzione e velocità dei flussi di acqua, così come alterazioni nel trasporto e nella distribuzione di sedimenti e di altri materiali, ma anche estinzioni di numerose specie quindi, ancora una volta, portando verso la perdita di diversità. Va ricordato che alla perdita di diversità è associata la perdita di importanti servizi ecosistemici.

Anche il cambiamento climatico rappresenta una grave minaccia per la sopravvivenza delle specie e l'integrità degli ecosistemi umidi costieri a livello mondiale. Ci si aspetta che agisca in combinazione con tutta una serie di altre pressioni determinando alterazioni nei regimi idrologici, influenzando in particolare la natura e la variabilità dell'idroperiodo e il numero e la gravità degli eventi estremi. Osservazioni satellitari, mostrano che dal 1993, il livello del mare sta aumentando ad una velocità di circa 3 mm/anno. L'accelerato aumento del livello del mare è una particolare minaccia per i bacini bassi, poco profondi che stanno sperimentando sempre più frequenti inondazioni. Un aumento del livello del mare può ridurre anche la penetrazione della luce per la vegetazione acquatica sommersa, riducendo il potenziale fotosintetico dei produttori primari e cambiando le dinamiche dei nutrienti in tali ambienti che possono diventare

più sensibili all'eutrofizzazione. Tuttavia, molte altre variabili legate al clima possono svolgere ruoli importanti nel determinare gli impatti negativi su queste zone, tra cui l'aumento della temperatura, l'alterazione dell'evaporazione, l'ammontare dei carichi di sedimenti, i cambiamenti nell'intensità delle precipitazioni e delle tempeste. Variazioni regionali nella distribuzione delle precipitazioni possono avere effetti importanti sulle caratteristiche fisiche ed ecologiche delle lagune costiere determinando cambiamenti di salinità e concentrazione di ossigeno disciolto. Eventi di precipitazioni intense, ad esempio, aumenterebbero gli ingressi d'acqua dolce facendo diminuire la salinità.

Negli ultimi 100 anni, la temperatura dell'aria è aumentata drasticamente e si prevede un ulteriore incremento. Le variazioni di temperatura dell'aria influenzano fortemente la temperatura dell'acqua di corpi idrici superficiali, come le lagune costiere. La temperatura degli oceani del mondo è aumentata, in media, di 0,3 °C (Intergovernmental Panel on Climate Change 2007) e probabile continuerà ad aumentare. L'IPCC prevede che le temperature globali aumenteranno di 1-5 °C nel corso del 21° secolo. La temperatura dell'acqua a sua volta influenza le concentrazioni di ossigeno disciolto, così come la fisiologia degli organismi, la gamma delle specie presenti e le caratteristiche delle migrazioni. Molte specie marine vivono vicino alla loro soglia di tolleranza termica, quindi, anche piccole variazioni di temperatura, possono avere un forte impatto sulla loro riproduzione e sopravvivenza. Inoltre, questi ecosistemi sono più suscettibili ad aumenti di colonizzazione di specie invasive che possono prosperare in acque più calde. Nelle lagune di poca estensione con bassi tassi di scambio e alti ingressi di nutrienti, un aumento della temperatura potrebbe determinare un aumento di eventi ipossici e quindi conseguenti cambiamenti nella struttura della comunità bentonica con la diffusione di specie più tolleranti all'ipossia. I cambiamenti previsti si manifesteranno come quella che è stata definita la 'sindrome da distress', caratterizzata dalla riduzione della biodiversità, dall'alterazione della produttività primaria e secondaria, del ciclo dei nutrienti, dall'aumento della prevalenza di malattie, della dominanza di invasori e specie opportunistiche.

Alla luce di queste considerazioni risulta necessario proteggere questi ambienti da uno sfruttamento economico incontrollato che rischia di danneggiarli in maniera irreversibile. Negli ultimi anni il riconoscimento delle funzioni vitali fornite e garantite dagli ecosistemi umidi costieri è aumentata radicalmente, tanto che diverse normative

hanno evidenziato l'importanza di questi sistemi che devono essere soggetti a monitoraggio e strategie gestionali che ne permettano la conservazione. Proprio da questa necessità di protezione, nel 1971 è nata la Convenzione di Ramsar sulle zone umide, oggi sottoscritta da più di 100 Paesi nel mondo e con oltre 900 zone umide designate. Essa rappresenta una delle più significative manifestazioni di cooperazione tra gli Stati per la tutela di questi ambienti particolarmente sensibili, evidenziando la consapevolezza a livello internazionale del loro valore. La Convenzione adotta una definizione, vista precedentemente, molto ampia di zone umide, includendo laghi e paludi, fiumi e aree costiere, acque in movimento o stagnanti, salate o dolci, promuovendo i principi dello sviluppo sostenibile e della conservazione della biodiversità. Ad oggi 50 siti del nostro Paese sono stati riconosciuti e inseriti nell'elenco d'importanza internazionale stilato ai sensi della Convenzione di Ramsar.

Sono seguiti diversi interventi legislativi: la Direttiva quadro delle acque (WFD 2000/60/CE), la Direttiva Conservazione degli uccelli selvatici, nota come Direttiva "Uccelli selvatici" (79/409/CEE) e la Direttiva Conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche, comunemente chiamata Direttiva "Habitat" (92/43/CEE). In base a quest'ultima, la conservazione della natura viene attuata tramite la realizzazione di un sistema integrato di aree denominato Rete Natura 2000 che individua e tutela zone di grande importanza naturalistica, diffuse su tutto il territorio dell'Unione Europea, che costituiscono le così dette Zone di Protezione Speciale (ZPS) e Siti di Importanza Comunitaria (SIC). Le ZPS sono zone idonee in numero e superficie alla conservazione di tutte le specie di uccelli viventi naturalmente allo stato selvatico, così come vengono definite dalla Direttiva "Uccelli selvatici". I SIC sono invece siti che contribuiscono in modo efficace a mantenere o a ripristinare un tipo di habitat naturale in uno stato di conservazione soddisfacente contribuendo così al mantenimento della biodiversità. Questi siti nascono con la Direttiva "Habitat" (DIR 92/43/CEE), recepita dal D.P.R. n. 357/97 e successivo n. 120/03, finalizzata alla conservazione degli habitat naturali e delle specie animali e vegetali di interesse comunitario. Questa direttiva si propone anche lo scopo della protezione delle specie vulnerabili, rare, o in via di estinzione, o minacciate da specie invasive. Con la Rete Natura 2000 si sta costruendo un sistema di aree in relazione tra loro dal punto di vista funzionale e non un semplice insieme di territori protetti isolati. Non si tratta di aree

protette, ma di siti nei quali si potranno continuare a praticare attività precedenti, quali la coltivazione agricola o la caccia, purché queste vengano gestite in maniera da non pregiudicare lo stato delle specie e degli habitat. Nel 2000 è stata adottata dalla Commissione europea la direttiva quadro europea sull'acqua al fine di istituire un quadro per la protezione di tutti i sistemi acquatici comprendendo i sistemi di transizione. L'obiettivo principale della direttiva è il raggiungimento di un "buono stato ecologico" e di un "buono stato chimico" per tutte le acque entro il 2016. Buono stato ecologico è definito nella WFD in termini di qualità delle comunità biologiche e caratteristiche idrologiche e chimiche. Diverse componenti biologiche sono utilizzati come criteri di qualità per la classificazione dello stato ecologico degli ecosistemi acquatici, comprese le comunità microbiche.

Molte organizzazioni non governative e istituzioni multinazionali come IUCN, UNEP, UNESCO, Worldwatch Institute, World Resource Institute, WWF, Wetlands International hanno un ruolo di primo piano nel garantire la protezione della biodiversità e la conservazione e il ripristino di molte zone umide; le loro azioni dovranno aumentare nel prossimo futuro, in relazione alla crescente conoscenza circa l'importanza strategica di questi ecosistemi. Una strategia di gestione importante per garantire la sostenibilità delle zone umide è la prevenzione o la riduzione di stress aggiuntivi che possono ridurre la capacità di queste zone di rispondere ai cambiamenti climatici. Il mantenimento dell'idrologia, la riduzione dell'inquinamento, dell'introduzione di vegetazione esotica, e la protezione della diversità biologica e dell'integrità sono attività importanti per mantenere e migliorare la capacità di recupero degli ecosistemi delle zone umide in modo che esse continuino a fornire servizi importanti in mutate condizioni climatiche. Data però la diversità delle zone umide e le loro caratteristiche specifiche, gli impatti derivanti dalle diverse attività antropiche saranno differenti e così dovranno essere anche gli interventi di risanamento.

1.1.4 Lagune costiere

Tra le zone umide costiere, molto importanti per le funzioni che svolgono e per il notevole interesse naturalistico, sono le lagune costiere. Le lagune costiere possono essere definite come corpi idrici costieri poco profondi, di acqua salata o salmastra che sono parzialmente isolate dal mare da un cordone di sabbia e ghiaia o più raramente da una barriera rocciosa che si forma in presenza di apporti terrigeni e di cospicuo apporto litoraneo. In alcuni casi vengono fatti ingressi artificiali per facilitare la navigazione o affrettare lo scarico delle acque di piena verso il mare. Le lagune costiere sono formate e mantenute attraverso processi di trasporto di sedimenti da fiumi, onde, correnti, vento e maree. Questi bacini occupano circa il 13% delle zone costiere in tutto il mondo. Nel Mediterraneo esse coprono una superficie di 6.500 km². Rispetto alla maggior parte delle lagune Atlantiche, le lagune costiere del Mediterraneo sono meno colpite dalla marea, sono caratterizzate da ingressi di acqua dolce più bassi, mentre salinità e temperatura media dell'acqua sono più alte. Esse variano in dimensioni e forma in relazione alla morfologia e al grado di erosione e deposizione. La maggior parte delle loro proprietà nascono, infatti, dalla loro conformazione geomorfologica. La forma può variare da poche centinaia di metri quadrati a vaste aree di mare poco profondo. La profondità massima in alcune lagune può raggiungere più di 30 metri, anche se la profondità media è raramente superiore a 2 metri. A causa della scarsa profondità, la penetrazione della luce nell'interfaccia sedimento-acqua è generalmente elevata.

L'idrodinamica all'interno delle lagune costiere è strettamente condizionata dalla topografia del fondo, e il vento colpisce la colonna d'acqua promuovendo la risospensione di materiali, sostanze nutritive e piccoli organismi dallo strato superficiale dei sedimenti. Lo scambio tra la laguna e l'oceano è guidato dall'azione delle onde del mare ed è spesso il principale componente del bilancio idrico lagunare. Il tasso di flusso, cioè, il tasso al quale l'acqua entra, circola attraverso, ed esce dalla laguna, è una proprietà fisica fondamentale e controlla il tempo di ritenzione dei componenti nella laguna. Le lagune tendono ad avere bassi tassi di flusso a causa del limitato scambio con l'oceano, e questo contribuisce all'elevata produttività primaria e a concentrazioni di inquinanti potenzialmente elevati. Determinanti del tasso di flusso comprendono: la dimensione e la forma della laguna, il livello di connettività con l'oceano, l'escursione di marea e il flusso di acqua dolce. Il regime sedimentario è conseguenza del regime

idrologico che le caratterizza; in zone di forte corrente verranno sedimentati i materiali più grossolani, in zone di minore energia sedimenteranno le sabbie più fini. Una laguna può o non può essere soggetta a maree e la salinità può variare da quella di un lago costiero d'acqua dolce a una laguna ipersalina. L'equilibrio salino si basa su diversi fattori, quali lo scambio di acqua con il mare aperto, l'ingresso di acque continentali provenienti dai fiumi, corsi d'acqua e fenomeni di pioggia-evaporazione. Non solo la salinità, ma anche tanti altri parametri chimici e fisici subiscono variazioni giornaliere e stagionali. La variabilità all'interno della laguna è quindi stata attribuita a molti fattori biotici e abiotici. La maggior parte della variabilità fisica e ambientale nelle lagune costiere atlantico-mediterranee, per esempio, è legata alla dimensione della laguna, alle differenze di salinità rispetto al mare aperto e allo stato trofico della colonna d'acqua. Inoltre, tutti questi parametri sono fortemente influenzati dalle variazioni del livello del mare, dall'ingegneria costiera e da altre attività umane. Da un punto di vista puramente fisico, questi ecosistemi sono caratterizzati dalla presenza di confini tra terra e acqua, tra la colonna d'acqua, lo strato di sedimenti e l'atmosfera, tra la laguna e il mare e di frequente, tra la laguna e i sistemi d'acqua dolce. Gran parte del motivo per cui le lagune costiere e gli estuari sono produttivi, stabili e complessi è dovuto alla natura e al numero di questi confini. Ogni limite comporta forti gradienti fisici ed ecologici, che li rende sistemi molto dinamici. Tutte queste caratteristiche ambientali contribuiscono all'elevata produttività biologica di questi ecosistemi. Essa deriva soprattutto dalla loro capacità di intrappolare sedimenti inorganici e materia organica. Data questa elevata produttività, al momento, questi ecosistemi sono considerati un fattore chiave nei piani di sviluppo regionale in quanto forniscono importanti servizi ricreazionali e sostengono l'attività di pesca.

Da un punto di vista ecologico, le lagune costiere mostrano un'elevata biodiversità e una grande diversità di habitat idonei per molte specie di vegetali, pesci e invertebrati. Più di 621 specie di macrofite, 944 di macroinvertebrati e 199 di pesci, sono noti per essere presenti in lagune costiere nella regione atlantico-mediterranea. Le caratteristiche degli assemblaggi biologici, tra cui la struttura della comunità e la produttività, sono correlati alle caratteristiche geo-morfologiche delle lagune ma anche alla variabilità di parametri fisici e chimici come la salinità. L'influenza dell'acqua marina o dolce determina in gran parte non solo la ricchezza di specie, ma anche la composizione delle specie. Questa è

però determinata anche da molti altri fattori quali ad esempio l'idrodinamismo, gli apporti di nutrienti, l'esposizione alla luce, e sono questi fattori nel loro insieme a determinare la complessità finale della rete trofica. Alla fine degli anni '80 molti autori hanno evidenziato l'omogeneità strutturale delle comunità lagunari. Guelorget e Perthuisot (1992), ad esempio, hanno osservato che un certo numero di specie tendono a ripresentarsi in tali ambienti, dove vivono e crescono, quindi, da quel momento, l'idea delle lagune costiere come ecotoni è stata abbandonata. Gli stessi autori hanno assegnato questi ambienti ad un sistema più grande che include anche altri tipi di ambienti semichiusi che condividono comunità biologiche analoghe, e hanno chiamato questo sistema "paralico", indicando, con questo termine, gli ambienti acquatici che hanno un rapporto con il mare. Secondo gli autori, le differenze tra le comunità lagunari non si verificano nella composizione tassonomica, ma nella struttura di dominanza, a seconda dello stato trofico, che a sua volta è funzione del grado di interazione con i sistemi circostanti. Le lagune costiere fungono anche da zone di crescita e zone di alimentazione per pesci opportunistici, la maggior parte dei quali di reale o potenziale interesse per la pesca. Le principali specie commercializzate sono pesci appartenenti alle famiglie di Sparidae, Mugilidae, Anguillidae e Moronidae, presenti in più del 75% delle lagune del Mediterraneo, anche se i gamberi e vongole possono avere una grande importanza economica locale. Il totale delle catture nelle lagune costiere atlantico-mediterranee supera le 48.947 tonnellate/anno di pesci con una media di 92,8 (\pm 14,4) kg per ettaro e per anno. Di conseguenza, la pesca nelle lagune costiere fornisce il 10% della produzione ittica e il 30% dei pesci demersali nel Mediterraneo. Spesso, a scala locale, la resa economica derivata dalla pesca in laguna è uguale o superiore a quella ottenuta in zone costiere adiacenti. Alla fine del 20° secolo, una forma tradizionale di pesca, nota anche come "la cultura lagunare", che si basa sui movimenti migratori dei pesci tra la laguna e il mare, è stata praticata in circa 29.000 ettari di lagune costiere che si affacciano sul Mediterraneo, con una produzione annuale di circa 13.000 tonnellate di spigole, orate, triglie, sogliole e anguille. Questo tipo di pesca è basata sul fatto che i pesci entrano nelle lagune in primavera, crescono in estate, e sono intrappolati quando tentano di tornare al mare in autunno. L'acquacoltura è un'altra attività produttiva nelle lagune costiere, ma è più eterogenea rispetto alla pesca in termini di specie coltivate e tecniche applicate. L'acquacoltura nelle lagune costiere e in altri ambienti salmastri

produce circa 3,4 milioni di tonnellate (5,7% della produzione mondiale). La maggior parte dei pesci d'acquacoltura lungo le coste del Mediterraneo sono tipiche specie lagunari quali branzino (*Dicentrarchus labrax*) e orata (*Sparus auratus*).

La stretta relazione con l'ecosistema terrestre, ma anche gli elevati tempi di residenza sia di acque che di sedimenti, rendono questi ambienti particolarmente vulnerabili a impatti umani, e input terrestri e d'acqua dolce che aumentano i tassi di sedimentazione e il rischio di eutrofizzazione e di inquinamento. Negli ultimi anni, gli input di nutrienti nelle lagune costiere è aumentata in conseguenza delle attività umane, soprattutto legate a pratiche agricole e industriali. Come risultato, questi ambienti sono di grande preoccupazione sociale e costituiscono una delle principali priorità nella gestione integrata delle zone costiere a causa della loro suscettibilità agli impatti antropici e dell'intensificazione della competizione per il loro uso. Le lagune costiere hanno infatti una lunga storia di usi da parte dell'uomo. Tra le attività storiche, lo sviluppo dell'agricoltura e la deforestazione hanno prodotto il maggior impatto attraverso l'incremento dei tassi di sedimentazione. Ma anche altre attività, come l'apertura di canali artificiali per la pesca, le bonifiche e la costruzione di porti e spiagge artificiali hanno determinato gravi conseguenze sulla struttura e sulle dinamiche delle comunità biologiche qui presenti. Attività di dragaggio o pompaggio di sabbia nelle lagune, ad esempio, possono alterare le caratteristiche dei sedimenti, portando a stress e alla sostituzione di fanerogame con nuovi prati algali su substrati melmosi con elevato contenuto di sostanza organica, e alla conseguente sostituzione di invertebrati e di specie ittiche. Quindi, qualsiasi attività che altera le caratteristiche lagunari, come le loro dimensioni, il perimetro, lo scambio con il mare, e le caratteristiche dei sedimenti, avrà importanti conseguenze sul biota e sui processi ecologici, e deve pertanto essere analizzata e valutata. Il mantenimento dello scambio è ritenuto essenziale per il mantenimento della diversità delle specie, la colonizzazione di specie marine, l'attività di pesca, e per evitare le crisi distrofiche estive. Cambiamenti nella topografia delle insenature potrebbero limitare l'ingresso dei pesci nelle lagune, influenzando così la produzione della pesca. Queste pratiche possono anche avere conseguenze sul resto del biota lagunare, sulla biodiversità in generale e sulla struttura delle comunità, dovrebbero pertanto essere presi in considerazione in ogni piano di gestione integrata di tali ecosistemi. Infatti, l'attività principale di gestione di solito comporta regolazione del

funzionamento delle insenature al fine di mantenere una buona circolazione e qualità delle acque che entrano in laguna. Poiché le lagune costiere sono sistemi molto variabili ma anche sistemi stressati, esposti ad elevati stress antropogenici, è difficile distinguere cambiamenti nella fisiologia degli organismi o della composizione delle specie dovuti ad impatti umani o a condizioni naturali di questi habitat. Inoltre, il biota di questi ecosistemi è ben adattato a questa variabilità e ha la capacità di sopportare lo stress senza effetti negativi, rendendo difficile osservare alcun cambiamento. Questo problema, noto come il “paradosso di qualità estuarino” da Elliott e Quintino (2007), deve essere preso in considerazione per l'attuazione di un piano di gestione ambientale.

1.2 Sito di studio: Pialassa dei Piomboni

La regione Emilia-Romagna possiede una vasta area coperta da zone umide, caratterizzate da un'elevata variabilità ambientale e biologica: saline, lagune, laghi salmastri, meandri e foci fluviali; purtroppo questi ambienti sono poco considerati nell'ambito dei consueti programmi di monitoraggio. Infatti, fino al 2002, in ambito regionale non esisteva una consolidata rete di monitoraggio delle acque di transizione. Con l'attuazione delle nuove normative, esse entrano a pieno titolo nell'ambito dei piani di bacino, i quali dovranno garantire la loro tutela, la gestione sostenibile e il raggiungimento dell'obiettivo di un buono stato ambientale.

Tra i corpi di transizione individuati nel Piano di Tutela delle Acque della Regione Emilia-Romagna c'è il sistema delle Pialasse (Figura 2). La Pialassa Baiona, la Pialassa dei Piomboni e le circostanti zone umide si estendono per circa 1.500 ettari, sono collegate al mare tramite un unico sbocco rappresentato dal canale Candiano e dalla bocca di porto. Il Candiano separa l'area in due distinti spazi lagunari, la Pialassa Baiona a nord e quella dei Piomboni a sud. Si tratta di due grandi lagune salmastre sviluppatasi a partire dal XVII secolo per progressiva occlusione di un braccio di mare in seguito alla costituzione di nuovi cordoni dunosi costieri, regimate idraulicamente sin dalla loro formazione. Sono bacini geologicamente giovani e di natura effimera sottoposti all'azione combinata da parte dei fiumi, con i loro apporti di materiale sedimentario, e dei mari, con il loro moto ondoso e mareale. La geomorfologia delle Pialasse è ancora oggi in continua evoluzione, in quanto è il risultato della sovrapposizione di fenomeni naturali e di interventi antropici. Sulle stesse Pialasse, e più in generale sugli specchi d'acqua dolce o salmastra retrostanti la fascia litoranea e le pinete, sono inoltre stati effettuati diversi interventi di bonifica.



Figura 2. Il sistema delle Pialasse: Pialassa Baiona, Pialassa Piomboni e il Canale Candiano.

L'etimologia del nome "Pialassa" potrebbe derivare dal greco "pielòs", cioè "bacino", oppure dal dialetto ravennate che con questo termine indicava "un bacino estuario piatto con acque stagnanti, quasi ferme". L'interpretazione più comune però, ricollega il nome al termine dialettale "piglia e lascia", facendo riferimento al caratteristico sistema dinamico che caratterizza questi bacini, influenzati dai livelli di marea. Il sistema infatti, riceve ("piglia") l'acqua marina per due volte al giorno durante l'alta marea, attraverso la sola imboccatura connessa al canale portuale, per poi ricederla ("lascia") per altrettante volte durante la bassa. Secondo Zaccarini (1995) però, queste ipotesi sull'origine etimologica del termine pialassa sono tutte confutabili; il termine corretto sarebbe *pilasse* e deriverebbe dal dialetto veneziano *pedalassa* che, in origine, doveva connotare "un'articolazione ramificata del fondo lagunare costituita da canali sommersi i quali diramando da una foce marina, progressivamente evaniscono con l'addentrarsi nel bassofondo della laguna morta".

Come già detto il sistema delle Pialasse comprende due complessi specchi d'acqua salmastra di scarsa profondità: la Pialassa Baiona e la Pialassa Piomboni. La prima è una zona di 1100 ettari in cui è presente una fitta rete di canali con profondità media di 2-3 metri. La Pialassa dei Piomboni è situata a latitudine 44° 28' N e longitudine 12° 16' E, occupa un'area di 310 ha, e si trova a 8 Km NE dalla città di Ravenna e ad 1 Km W dal Mare Adriatico. Si tratta di un bacino privo di canalizzazioni interne con una profondità massima di 5 metri; è in parte utilizzata come area portuale, la parte rimanente, invece, presenta ancora interessanti aspetti di carattere naturalistico, seppur alterati. A nord confina con il porto canale Candiano e l'annessa zona industriale, a nord-est con una zona artigianale e cantieristica, ad est con la pineta comunale Piombone, a sud con terreni parzialmente coltivati e ad ovest con una zona industriale e cantieristica. Nel complesso è un'area in evidente stato di degrado a causa di pesanti interventi di antropizzazione ed industrializzazione che stanno determinando forti problemi di inquinamento.



Figura 3. Veduta aerea della Pialassa dei Piomboni.

Come già detto, la Pialassa dei Piomboni può essere divisa in due sub-aree (Fig.4): una zona portuale ed industriale ad ovest, la cui gestione rientra nel Piano Regolatore Portuale, e una zona di circa 200 ettari (pialassa vera e propria) soggetta a vincolo territoriale paesaggistico, di competenza comunale ed inserita come zona di pre-parco nel Parco Regionale del delta del Po. Si tratta quindi soprattutto di una suddivisione di tipo giuridico anche se, le due zone presentano chiare differenze idrauliche e morfologiche. L'area portuale e industriale è caratterizzata da una profondità media di 6-8 metri, mentre nell'area naturale la profondità media oscilla tra 40 e 100 centimetri, con ampie parti emerse in occasione delle basse maree. Tale configurazione comporta un ricambio idrico legato ai flussi e reflussi tidali molto più evidente nella zona portuale e industriale rispetto alla zona naturale.

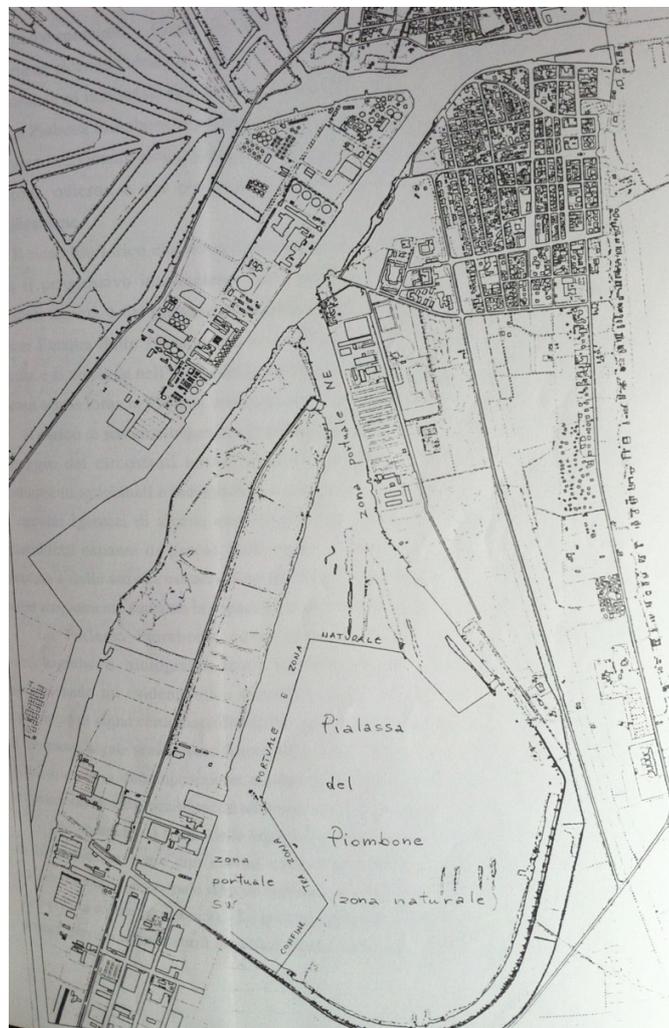


Figura 4. Le due zone della Pialassa dei Piomboni: zona portuale-industriale e zona naturale (Comune di Ravenna).

Il sito ricade in parte entro la stazione “Pineta di S. Vitale e Pialasse di Ravenna” del Parco Regionale Delta del Po (zona C: 110 ha, pre - parco: 13 ha). Rappresenta una zona di Pre-Parco, ossia area contigua non ricompresa nel parco ma con funzione di connessione rispetto al territorio del Parco stesso. Nelle aree contigue sono da favorire e sostenere tutti gli interventi volti alla progressiva valorizzazione ambientale del territorio, alla salvaguardia dei caratteri originari degli insediamenti umani e di quelli dell’agricoltura tradizionale. L’area della Pialassa dei Piomboni, inoltre, rientra all’interno del proposto Sito di Importanza Comunitaria denominato “Pialassa dei Piomboni, Pineta di Punta Marina” identificato con il codice IT4070006, ed è una zona di protezione speciale.

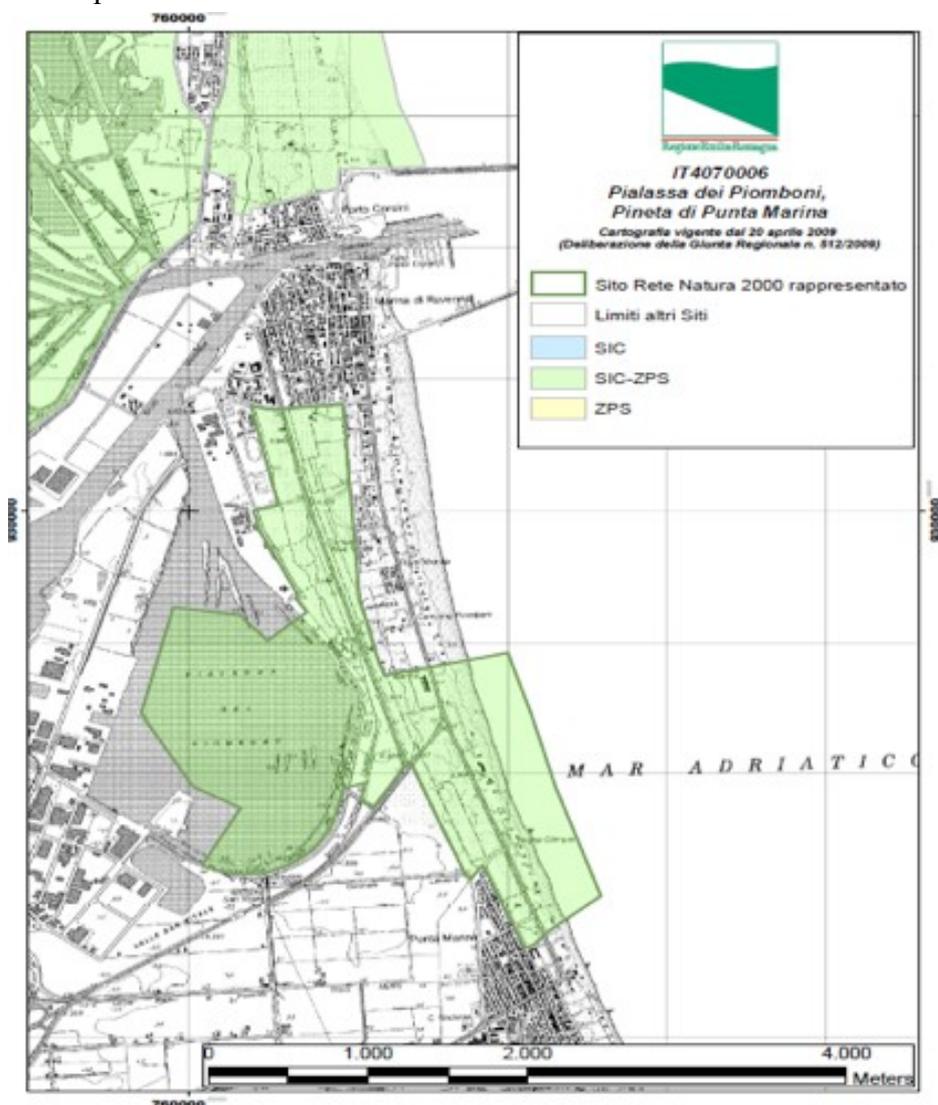


Figura 5. Pialassa dei Piomboni: Sito di Interesse Comunitario (SIC) e Zona di Protezione Speciale (ZPS) (da Regione Emilia-Romagna).

A livello regionale, il Piano Territoriale Paesaggistico Regionale (P.T.P.R.) identifica l'area di interesse come appartenente alle "Zone di tutela naturalistica" disciplinate dall'art. 25 del Bollettino Ufficiale della Regione E.R. n.75 del 1993. Tali zone sono soggette a strumenti di pianificazione finalizzati "alla conservazione del suolo, del sottosuolo, delle acque, della flora e della fauna attraverso il mantenimento delle attività produttive primarie compatibili e ad una controllata fruizione collettiva per attività di studio, di osservazione, escursionistiche e ricreative".

Uno degli aspetti faunistici più interessanti di questa laguna costiera è rappresentato dalla fauna ornitica migratoria che popola il bacino in diversi momenti dell'anno. Molte sono le specie di uccelli acquatici che trovano qui il luogo ideale per sostare o svernare durante i loro lunghi viaggi migratori. L'avifauna annovera la presenza di undici specie, sei delle quali nidificanti in modo più o meno regolare (Avocetta, Cavaliere d'Italia, Fraticello, Sterna comune, Averla piccola e Fratino). I migratori abituali comprendono 46 specie: tra questi sono rappresentati tutti i gruppi di specie acquatiche (Svassi, Fenicottero, Ardeidi, Anatidi, Gabbiani e Sterne, Limicoli) presenti con nuclei anche numerosi durante i periodi di migrazione e svernamento. Per quanto riguarda l'ittiofauna si ritrovano tre specie tipiche di ambienti lagunari: il Nono (*Aphanius fasciatus*), il Ghiozzetto di laguna (*Knipowitschia panizzae*), il Ghiozzetto cenerino (*Pomatoschistus canestrini*). Ma si ritrovano anche altre specie: il Cefalo (*Mugil cephalus*), la Mormora (*Lithognathus mormyrus*), la Sogliola (*Solea solea*), la Spigola (*Dicentrarchus labrax*). Questi pesci prediligono queste acque per l'elevata disponibilità di cibo. Molte di queste specie sono elencate nell'Allegato II della DIR 92/43/CEE (Specie di interesse comunitario la cui conservazione richiede la designazione di Zone Speciali di Conservazione). La presenza di branzini, anguille, vongole e ostriche, ha portato in questi sistemi un grande sviluppo della pesca. La vegetazione prevalente è caratterizzata da alghe verdi appartenenti all'ordine delle *Ulvales*, tolleranti alle acque inquinate e da comunità di giunchi e graminacee con *Limonium serotinum*. È anche diffusa la specie *Ruppia maritima*, che costituisce nutrimento per molti anatidi. Tra le specie vegetali, anche se in forte declino, si ricorda l'endemica *Salicornia veneta*. Un'altra specie vegetale da segnalare, seppur non inclusa nell'Allegato II della Direttiva Habitat, è il *Limonium bellidifolium* incluso nell'elenco del Libro Rosso delle piante d'Italia (Conti et al., 1992). È una specie rara e minacciata presente solo in una ristretta fascia costiera

regionale. I terreni tra la laguna ed il mare sono occupati da una pineta litoranea a *Pinus pinaster* sul sistema dunale con tratti di sottobosco arbustivo e di spiaggia sabbiosa. Dal 2002 ad oggi si è verificato oltre che un decremento nel numero di specie, un calo del numero di individui presenti per ogni singola specie.

Uno dei principali problemi che interessano questa zona è rappresentato dalla subsidenza, ossia un abbassamento del suolo, dovuto sia a cause naturali che antropiche. La subsidenza artificiale è provocata da molteplici fattori, uno di questi è riconducibile alle arginature degli alvei fluviali dal XII secolo in poi. Tali barriere se da un lato hanno impedito le inondazioni, dall'altro hanno provocato il mancato apporto di sedimenti alluvionali nelle aree interfluviali, con conseguente abbassamento di ampie superfici. Ulteriori cause del fenomeno sono associate all'azione di bonifica, e alla sottrazione di fluidi dal sottosuolo.

Il sito è interessato da tante altre pressioni antropiche che causano alterazioni significative, in particolare la caccia da appostamento fisso e il bracconaggio (caccia notturna, con uccisione di specie protette), ma anche la molluschicoltura e diverse attività industriali. L'area nord-occidentale della Pialassa dei Piomboni è, come già anticipato, a uso prevalentemente portuale, industriale e commerciale, qui si ritrovano anche numerosi cantieri navali e banchine cementate (Figura 6). Il lato sud-orientale invece è caratterizzato dalla presenza di numerosi capanni e baracche, utilizzati soprattutto per attività di pesca, ed è in forte stato di degrado per la presenza di rifiuti e di strutture abbandonate costruite per prevenire fenomeni di erosione (Figura 7).



Figura 6. Cantieri navali



Figura 7. Capanni da pesca e baracche

La qualità dell'acqua di tale bacino risente di numerosi scarichi inquinati provenienti dal polo industriale e portuale, che vengono riversati senza essere sottoposti ad alcun intervento di controllo e depurazione. Altro fattore di pressione è determinato dall'immissione, protrattasi per anni, di ingenti carichi trofici e sostanze inquinanti di origine agricola che entrano in laguna soprattutto attraverso l'idrovora di San Vitale. In aggiunta l'idrovora portuale immette rilevanti volumi di acque di provenienza agricola, industriale e civile. Tutti questi scarichi determinano un'immissione di circa 60 t/a di azoto, di 23 t/a di fosforo, valori che hanno da tempo ampiamente superato la capacità autodepurante propria del sistema. Il livello di inquinanti nelle acque, inoltre, aumenta a causa di piccoli ma significativi sversamenti di idrocarburi provenienti da numerose imbarcazioni da diporto e dallo scarico abusivo di rifiuti solidi e liquidi. A seguito di accurate campagne di monitoraggio negli anni 1990-1991 da parte dell'U.S.L. 35 di Ravenna, sono stati registrati i valori di azoto e fosforo immessi nella Pialassa dei Piomboni da parte dell'idrovora di San Vitale e l'idrovora portuale. La prima ha riversato nel 1991 circa il 18% di P e 59% di N; la seconda circa l'81% di P e il 40% di N, valori estremamente elevati. L'elevato apporto di nutrienti e lo scarso ricambio delle acque può portare, soprattutto nella stagione estiva, in alcune aree all'instaurarsi di condizioni distrofiche con conseguenti fenomeni di ipossia e in seguito anossia. La presenza di sedimenti di colore grigio o nero, dovuto alla presenza di solfuri ferrosi, è un buon indizio delle condizioni riducenti del sistema. Da qui la necessità di realizzare una gestione integrata al fine di raggiungere sia un'utilizzo sostenibile della risorsa riducendo i conflitti di interesse, sia la protezione dell'ambiente.

1.3 I microrganismi marini

1.3.1 La materia organica in ambiente marino

La materia organica in ambiente marino costituisce una miscela complessa di composti organici con diversa composizione chimica, struttura fisica e reattività. Viene generalmente divisa in: POM (materiale organico particellato), composto da grandi macromolecole come i polimeri che concorrono alla struttura delle membrane e delle pareti, e DOM (materiale organico disciolto) composto da aminoacidi, carboidrati, acidi organici e acidi nucleici che sono assorbiti rapidamente dai microrganismi e riciclati.

La sostanza organica proviene di solito da batteri, fitoplancton e zooplancton nella colonna d'acqua. Il fitoplancton rappresenta la sorgente principale. La fissazione del carbonio inorganico in composti organici attraverso la fotosintesi, viene misurata come produzione primaria:



Il carbonio inorganico è assimilato come bicarbonato (HCO_3^-), l'azoto come nitrato (NO_3^-), il fosforo come fosfato (PO_4^{3-}) e lo zolfo come solfato (SO_4^{2-}). L'entità della produzione primaria dipende da diversi fattori ambientali quali la temperatura e la torbidità dell'acqua, che influenza la luce trasmessa attraverso la colonna d'acqua, ma anche la disponibilità di nutrienti, primi tra tutti azoto e fosforo. Infatti la reazione evidenzia come il fitoplancton necessiti di questi nutrienti inorganici disciolti per portare a termine il processo fotosintetico. Si stima che il 35- 45% dei processi fotosintetici globali avvengono in ambiente acquatico con un flusso di carbonio stimato in circa 50 gigatonnellate (Gt) per anno. A seguito della morte di questi organismi, la sostanza organica scende in profondità dove viene degradato dai microrganismi. Solo però un'esigua quantità del materiale biogenico originatosi nella zona eufotica raggiunge il fondo marino dove viene seppellito. Durante gli eventi di eutrofizzazione però la quantità che raggiunge il fondo può essere elevata determinando ipossia per consumo dell'ossigeno da parte dei microrganismi che degradano questo materiale e a volte, anche soffocamento degli organismi bentonici per eccessiva sedimentazione.

In ambiente planctonico, la maggior parte (circa il 95%) del carbonio organico è presente in fase disciolta. Globalmente la quantità di carbonio nella forma di DOM,

nelle acque oceaniche, è di circa 700 Gt, simile a quella della CO₂ atmosferica. L'origine del materiale organico disciolto è determinata da diversi processi: essudazione del fitoplancton, perdita di materiale cellulare durante i processi di predazione (sloppy feeding), lisi cellulare mediata da infezioni virali, attività di degradazione sulle "faecal pellets" da parte dei detritivori. Il DOM viene suddiviso in tre categorie in base alla disponibilità biologica: labile, semi-labile e recalcitrante. Il DOM labile può essere utilizzato dai microrganismi eterotrofi in pochi giorni o addirittura ore, il suo consumo rappresenta il principale flusso di energia, carbonio e nutrienti negli ecosistemi pelagici; quello semi-labile invece può persistere per mesi o anni in quanto resistente ad una rapida degradazione microbica. Il DOM recalcitrante essendo resistente alla decomposizione biologica, è il pool di carbonio più persistente, può essere conservato per millenni nelle profondità marine. Recentemente è stato proposto il concetto di "Pompa microbica del carbonio" che si riferisce ai processi microbici che trasformano il DOC labile in recalcitrante.

Fino agli anni 80, si riteneva che l'energia fluisse dai produttori primari (fitoplancton) ai predatori, rappresentati in primo luogo dal mesozooplancton. Le comunità microbiche venivano invece relegate alla funzione di degradazione della sostanza organica persa dalla catena trofica planctonica. In seguito allo sviluppo della microscopia ad epifluorescenza, è aumentato l'interesse verso la comunità microbica marina. Si scoprì che le cellule microbiche erano i veri regolatori dei flussi di energia e di nutrienti lungo la catena trofica. In Figura 8 possiamo osservare lo schema di un ecosistema marino strutturato dalla componente microbica. Il DOC labile viene rapidamente utilizzato dai batteri eterotrofi che lo convertono in nuova biomassa. L'utilizzo della materia organica rilasciata dal fitoplancton o da altre fonti da parte dei batteri, è una via nella rete trofica marina indicata come "microbial loop". In questo loop il batterioplancton mineralizza a CO₂ una parte del carbonio organico e assimila il rimanente per produrre biomassa. Reazioni fotochimiche sono stimolate dalla luce, quindi in acqua torbide, dove la penetrazione della luce è ridotta, queste saranno limitate allo strato superficiale. La produzione di biomassa batterica è indicata come produzione secondaria. Per questi organismi la materia organica funge non solo da fonte di carbonio, ma fornisce anche da superfici solide su cui aderire. È proprio la complessità in composizione e struttura della

materia organica, assieme alle variazioni di disponibilità, a rappresentare probabilmente uno dei fattori principali della grande diversità nelle comunità microbiche marine.

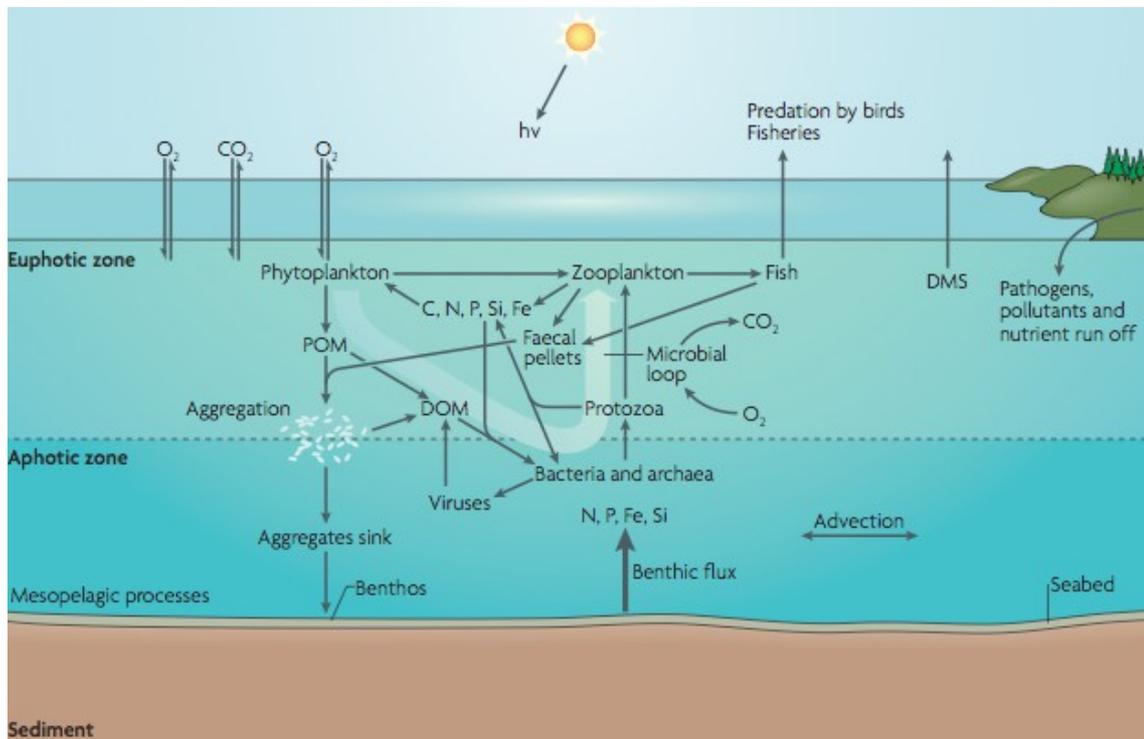


Figura 8. Schema di un ecosistema marino strutturato dalla componente microbica. In evidenza il ruolo del microbial loop nel restituire parte di DOM alla catena trofica classica (da Azam & Malfatti, 2007).

1.3.2 I sedimenti marini: ipossia e anossia

I sedimenti rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici, in cui avvengono importanti trasformazioni e processi di scambio. L'interfaccia acqua-sedimento costituisce il limite superiore tra la fase acquosa e il sedimento. È qui che si verifica molto spesso l'associazione tra i cicli geochimici di molti elementi e i sistemi biologici. Questo accoppiamento contribuisce al riciclo degli elementi momentaneamente immobilizzati nella fase solida che, di conseguenza, possono essere restituiti alla sovrastante fase acquosa. Lo studio dei processi biogeochimici che avvengono all'interfaccia acqua-sedimento riveste grande importanza nel comprendere

quali fattori ambientali siano responsabili del riciclo degli elementi, e quali aree siano più sensibili a tali processi. I processi biogeochimici, infatti, sono sotto l'influenza delle condizioni ambientali altamente dinamiche, come per esempio, l'intensità della luce, la temperatura, la pressione dell'acqua, l'idrodinamica (ad esempio, intensità di corrente, irrigazione, avvezione, risospensione dei sedimenti), le concentrazioni di ossigeno, il carico di materia organica e la salinità.

L'ossigeno è necessario per sostenere la vita di tutti i pesci e invertebrati. Negli ambienti acquatici, l'ossigeno proveniente dall'atmosfera e dall'attività fotosintetica del fitoplancton si dissolve nella colonna d'acqua e viene utilizzato nella respirazione di tutti gli animali, compresi quelli che nuotano o si spostano sul fondo e di quelli che hanno una vita sedentaria. Solo una parte dell'ossigeno raggiunge il fondo. Un assunto spesso fatto è quello che, in condizioni normali, la quantità di materiale organico generato nella colonna d'acqua è in equilibrio con i processi di pascolo e degradazione. Quando però l'apporto al fondo è basso o il tasso di consumo supera il rifornimento, le concentrazioni di ossigeno diminuiscono oltre il punto necessario per sostenere la vita per la maggior parte degli organismi. Questa condizione di basso ossigeno disciolto è noto come ipossia. Grave ipossia di lunga durata e di anossia possono provocare l'accumulo di composti ridotti nei sedimenti, seguiti da frequenti eventi di mortalità, con un conseguente impoverimento dei metazoi negli ecosistemi, e diffusione di zone cosiddette "morte", prive delle risorse di pesca, come pesci, gamberetti e granchi. L'ipossia porta alla grave perdita di biodiversità, a stress sub-letali per numerose specie, come la riduzione della crescita e della riproduzione, a stress fisiologico, migrazioni forzate, viene aumentata la vulnerabilità alla predazione e la rottura dei cicli di vita. Gli organismi bentonici sono particolarmente vulnerabili ad eventi di ipossia costiera perché vivono più lontano dal contatto con l'ossigeno atmosferico e perché i sedimenti costieri tendono ad esaurire l'ossigeno più velocemente rispetto alla colonna d'acqua sovrastante. Funzioni ecosistemiche legate alla macrofauna quali la bioirrigazione e la bioturbazione sono significativamente influenzate dall'ipossia. Quindi l'ipossia è il principale contributore ai cambiamenti faunistici. È però evidente che gli effetti prodotti non sono causati da un unico fattore ma sono il risultato dell'interazione di una serie di fattori diversi. Non è solo l'arricchimento di materiale organico, ma la sua interazione con l'eccessiva sedimentazione, la diminuzione delle concentrazioni di ossigeno, e la

presenza di idrogeno solforato ed eventualmente ammoniacale, a determinare conseguenze negative per il biota. Valutare le soglie di ossigeno a cui si verificano effetti letali e subletali è fondamentale per stabilire la vulnerabilità di organismi marini all'ipossia e per fissare gli obiettivi di gestione per evitare la mortalità. Mentre le soglie di ipossia proposte in letteratura vanno sostanzialmente da 0,28 mg O₂/l a 4 mg O₂/l, la maggior parte delle segnalazioni (55%) si riferiscono a un valore di 2 mg O₂/l o inferiore. Inoltre, bisogna ricordare che la diversità degli adattamenti comportamentali e fisiologici all'ipossia suggerisce che i diversi taxa hanno diverse tolleranze all'ipossia e possono avere, di conseguenza, soglie di ossigeno minimo diverse, questione non affrontata dalle convenzionali soglie di ossigeno in uso. Gli organismi che si sono evoluti in ambiente permanentemente ipossico, come le zone di ossigeno minimo, sembrano prosperare a livelli molto bassi di ossigeno disciolto. Inoltre, le condizioni anossiche possono avere differenti conseguenze a causa della tossicità dei solfuri per molti organismi, in particolare metazoi. Un altro fattore importante che disciplina la sensibilità degli organismi alla carenza di ossigeno è la durata delle condizioni di ipossia; episodi di breve durata possono essere superati o evitati tramite eventi di migrazione, ma difficilmente gli organismi riescono a sopravvivere ad episodi di lunga durata. È la combinazione di sensibilità ai livelli di ossigeno e la durata e l'intensità dell'ipossia che governa la sopravvivenza e il funzionamento degli organismi in diversi ambienti costieri. L'ipossia costiera può essere un evento occasionale, un fenomeno ricorrente stagionale (a causa della stagionalità nella crescita delle alghe, di venti stagionali o della risalita di acque profonde), o un fenomeno più permanente che dura per anni. Come già accennato, i due fattori principali che portano allo sviluppo di ipossia, talvolta fino all'anossia, sono: la stratificazione della colonna d'acqua, che isola l'acqua di fondo dallo scambio con l'acqua superficiale ricca di ossigeno, e la decomposizione della materia organica in acqua di fondo, che riduce i livelli di ossigeno. Entrambe le condizioni devono verificarsi per lo sviluppo e la persistenza dell'ipossia. Molti ecosistemi hanno segnalato una diminuzione dei livelli di ossigeno disciolto nel tempo con una forte correlazione con l'aumento delle attività umane. Nessun'altra variabile ambientale di tale importanza ecologica, in estuari ed ecosistemi marini costieri di tutto il mondo, è cambiata così drasticamente, in un così breve periodo di tempo, come l'ossigeno disciolto. Diversi studi hanno evidenziato come il numero di siti

costieri in cui è stata segnalata l'ipossia è aumentato con un tasso di crescita esponenziale del 5,54% all'anno. Eventi di ipossia costiera possono sorgere in modo naturale, influenzati dall'uomo o risultanti dalle interazioni dei processi naturali e di origine antropica. Le influenze umane sull'ipossia costiera sono molteplici. Esse sono legate all'aumento dei fenomeni di eutrofizzazioni, che portano alla produzione eccessiva di sostanza organica, la quale aumenta la richiesta di ossigeno da parte degli organismi per la sua degradazione, e l'aumento della temperatura causata dai cambiamenti climatici. L'eutrofizzazione sta diventando un problema diffuso in tutte le zone costiere del mondo ed è strettamente legata agli eccessivi input di nutrienti. Le principali fonti di nutrienti e di DOM/POM in acque costiere sono le acque reflue domestiche ed agricole che arrivano in gran parte attraverso i fiumi. La drammatica crescita delle popolazioni umane nelle zone costiere, l'aumento della produzione industriale e agricola attraverso l'uso di fertilizzanti, la deforestazione e l'aumento del rilascio di ossidi di azoto in atmosfera hanno reso il problema più acuto. L'esame della distribuzione delle zone ipossiche in tutto il mondo ha dimostrato che esse sono strettamente associate con i bacini sviluppati o centri abitati costieri che rilasciano grandi quantità di nutrienti, il più importante è l'azoto. L'ingresso crescente di nutrienti di origine antropica in molte zone costiere nel corso degli ultimi decenni, è stato suggerito come il principale contributore del declino delle concentrazioni di ossigeno delle acque di tutto il mondo. Molti studi hanno dimostrato una correlazione nel tempo tra la crescita della popolazione, l'aumento degli scarichi di nutrienti, aumento della produzione primaria, e una maggiore presenza di ipossia e anossia. Altra importante causa del verificarsi di eventi di anossia è il riscaldamento globale, il quale sta infatti portando ad una riduzione della solubilità dell'ossigeno, all'aumento della stratificazione delle acque e a cambiamenti nei modelli di circolazione del vento che riguardano il trasporto e la miscelazione di ossigeno. Modifiche nell'idrologia possono influenzare anche la consegna dei nutrienti e della materia organica sui sistemi costieri proveniente da terreni e quindi, ancora una volta, il consumo di ossigeno. L'idrografia di un sistema è forse l'elemento più critico nel determinare il verificarsi o meno di eventi di ipossia. Questi processi naturali ed umani che influenzano l'equilibrio di ossigeno nelle acque costiere interagiscono e insieme governano la dinamica dell'ossigeno disciolto. L'ipossia costiera è, dunque, una grave minaccia per gli ecosistemi costieri a livello globale.

A causa della loro geomorfologia e pattern di circolazione, alcuni sistemi marini hanno una maggiore tendenza a sviluppare condizioni di ipossia. Le caratteristiche di base di un sistema che lo rendono incline all'ipossia sono: bassa energia fisica (maree, correnti, o il vento) e grande ingresso di acqua dolce. Queste caratteristiche si combinano per formare stratificate o stabili masse d'acqua vicino al fondo che diventano ipossiche quando sono isolate dalla riossigenazione con le acque superficiali. L'ipossia estiva annuale è la forma più comune di bassi livelli di ossigeno disciolto registrati in tutto il mondo.

1.3.3 Comunità microbiche dei sedimenti e degradazione della materia organica

I batteri sono responsabili della degradazione e del riciclo di elementi essenziali come carbonio, azoto e fosforo, possono inoltre influenzare la disponibilità di metalli pesanti e svolgere altri importanti servizi ecosistemici. In particolare, processi quali l'azotofissazione, la respirazione anaerobica, la nitrificazione, sono mediati esclusivamente dai microrganismi. La maggiore diversità microbica si ritrova nei sedimenti, dove la materia organica, che deriva principalmente da organismi morti, si deposita. I microrganismi presenti nei sedimenti sono però in larga parte sconosciuti. La maggior parte infatti non è coltivabile in laboratorio; è stato calcolato che solo 0,1% della comunità microbica marina è coltivabile. Per risolvere questo problema, i microbiologi hanno sviluppato degli approcci di studio coltura-indipendenti come i metodi molecolari basati sul sequenziamento dei geni ribosomiali ottenuti per amplificazione con PCR del DNA estratto dagli organismi raccolti per filtrazione, che hanno panto portato alla luce parte della diversità microbica, aumentando la nostra comprensione sulla struttura e sulla funzione dei microrganismi nei sedimenti e le loro interazioni con l'ambiente. L'analisi genomica fornisce informazioni sui molti geni che guidano le attività biogeochimiche dei microrganismi marini; essa permette di comprendere il loro ruolo negli ambienti oceanici. Tutto questo ha evidenziato la presenza di una grande varietà di procarioti ed eucarioti difficilmente coltivabili in laboratorio. La creazione e il

sequenziamento di librerie genomiche di grandi inserti di DNA, conosciute con il termine di librerie metagenomiche, ha rivoluzionato gli studi della diversità microbica. I batteri, come già accennato, sono i principali responsabili dei processi di diagenesi precoce della sostanza organica nei sedimenti marini. Sono abbondanti e presenti in tutti i sedimenti, possono riprodursi e metabolizzare la sostanza organica più rapidamente degli altri organismi, possiedono enzimi e sistemi enzimatici versatili che rendono possibili reazioni che altrimenti avrebbero delle cinetiche molto più basse. Il fatto di essere di piccole dimensioni consente loro di avere una superficie reattiva maggiore e questo rende più rapidi certi processi metabolici e di dissoluzione o precipitazione di nuovi minerali. Possono utilizzare diversi tipi di substrati, sia sostanza organica particellata quindi solida, che materia organica disciolta già frutto di una parziale decomposizione (POM e DOM). Possono inoltre essere indipendenti dall'ossigeno, quindi ritrovarsi anche a profondità significative all'interno del sedimento. Spesso formano consorzi complessi e associazioni mutualistiche e simbiotiche con organismi dei livelli trofici superiori, che conferisce loro una capacità degradativa di gran lunga superiore a quella di un singolo organismo isolato. Indipendentemente dal tipo di sedimento, la crescita e la divisione delle cellule batteriche dipende dalla quantità di sostanze nutritive presenti nel sistema. Per questo motivo, i numeri di cellule batteriche e i tassi di produzione e di crescita, sono di solito correlati con i flussi di materiale organico disciolto e particolato. La diversità delle comunità microbiche però dipende anche da molti altri fattori ambientali quali: la temperatura, l'umidità, il pH e le caratteristiche del sedimento.

Il metabolismo dei microrganismi nella decomposizione della materia organica può essere aerobico se viene consumato ossigeno o anaerobico se vengono utilizzati altri componenti per ossidare la materia organica, detti ossidanti secondari (NO_3^- , MnO_2 , Fe_2O_3 e SO_4^{2-}). L'ossigeno, quando presente, è l'accettore di elettroni preferito. Quando l'ossigeno viene consumato, i batteri utilizzano gli altri accettori, secondo una sequenza denominata da Froelich et al. (1979) "sequenza diagenetica" (Figura 9). Le reazioni redox favorite dal punto di vista energetico avvengono prima e gli accettori di elettroni non si sovrappongono tra di loro in maniera significativa. Assumendo che la composizione della sostanza organica soggetta a degradazione sia simile a quella delle cellule fitoplanctoniche, ovvero che il rapporto C:N:P rispetti il rapporto di Redfield-

Richards (1963:16:1), la sequenza diagenetica ideale è quindi la seguente: nitrati, ossidi di Mn, ossidi di Fe e solfati. I processi di denitrificazione precedono quelli di riduzione degli ossidi di Mn e Fe, la solfato-riduzione e la metanogenesi.

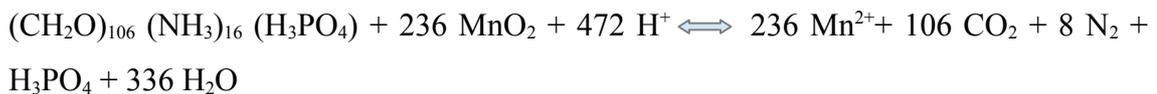
In presenza di ossigeno la reazione di ossidazione della sostanza organica è la seguente:



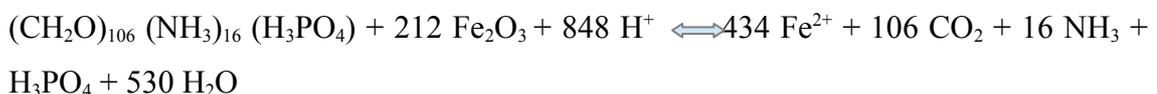
In assenza di ossigeno, il nitrato (NO_3^-) entra in gioco nei processi di decomposizione anaerobica della materia organica secondo la reazione:



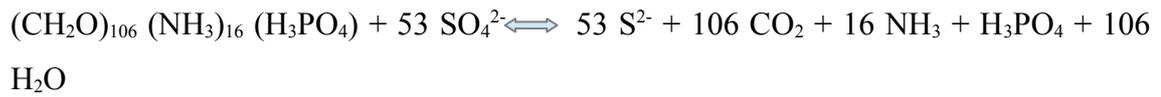
Questo processo è detto di denitrificazione. Si ipotizza che tutto l'azoto organico sia rilasciato in forma di NH_3 ossidata poi ad azoto molecolare. Diversi autori hanno stimato che il contributo della denitrificazione alla degradazione complessiva della sostanza organica presente nel sedimento, si aggiri attorno al 7-11% e che annualmente questo processo sia di almeno 2 ordini di grandezza superiore alla denitrificazione che avviene lungo la colonna d'acqua, il che indica l'importanza dei sedimenti marini quali riserve di azoto. Quando viene utilizzato manganese (MnO_2) la reazione è la seguente:



Segue l'ossidazione del ferro (Fe_2O_3) secondo la seguente reazione:



Uno degli ultimi passaggi della serie diagenetica è la solfato-riduzione. Questa reazione porta alla formazione di idrogeno solforato (H_2S) che, nelle condizioni di pH tipiche delle acque interstiziali, si trovano prevalentemente sotto la forma di HS^- .



In condizioni estremamente riducenti ci può essere un ultimo stadio in cui avviene la formazione di metano. Questo processo viene detto metanogenesi.



La mineralizzazione della sostanza organica, quindi, tramite la respirazione anaerobica, provoca la formazione di varie sostanze ridotte come NH_3 , Mn^{2+} , Fe^{2+} , H_2S e CH_4 . Queste sostanze ridotte tendono a diffondere verso la parte alta dei sedimenti dove, qualora ci sia ossigeno, vengono efficientemente riossodate perché contengono una notevole quantità di energia che era originariamente contenuta nella materia organica.

Nelle zone costiere, dove il tasso di sedimentazione della sostanza organica è generalmente piuttosto elevato, la superficie di transizione tra zona ossica ed anossica, si trova generalmente localizzata nei primi centimetri di sedimento. Nelle zone ad elevata produzione primaria, quali ad esempio gli ambienti lagunari, la zona anossica può estendersi anche alle acque di fondo. I sedimenti in cui avvengono questi processi hanno un colore nero, puzzano di uova marce, e sono caratterizzati da una diminuzione della concentrazione di solfati.

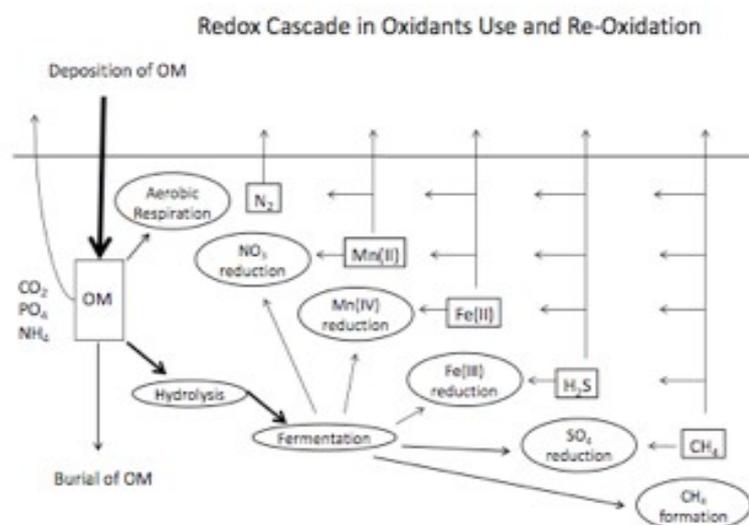
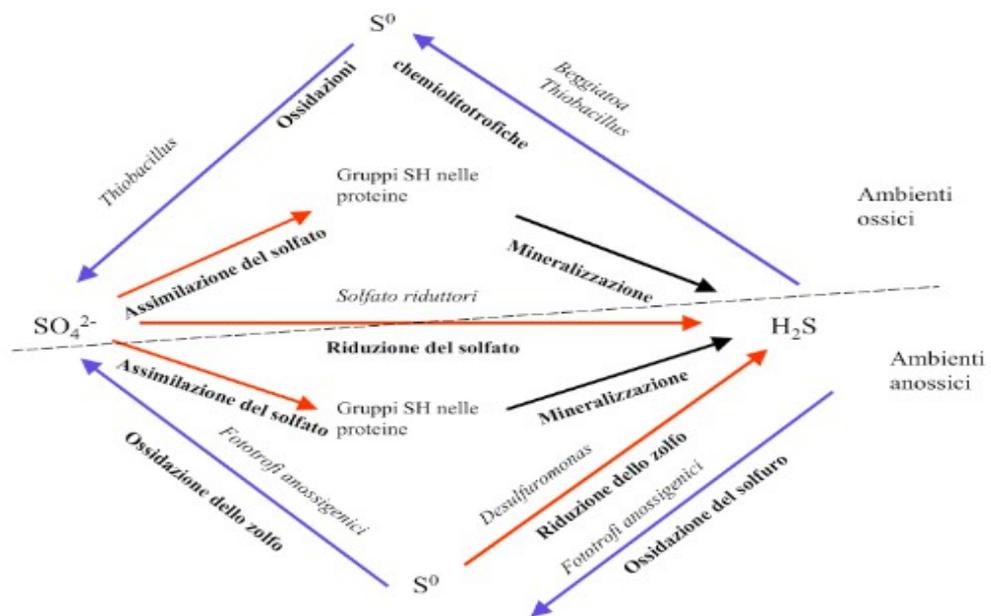


Figura 9. Sequenza diagenetica

1.3.4 Ciclo dello zolfo

Lo zolfo è il decimo elemento per abbondanza nella crosta terrestre ed è il sesto per abbondanza negli oceani con una concentrazione di 928 ppm. È anche uno dei costituenti essenziali per i processi biosintetici di tutti gli organismi viventi. Nella crosta terrestre si presenta nella forma di minerali contenenti solfati (esempio il gesso CaSO_4) e di minerali contenenti solfuri (esempio la pirite FeS_2), quindi in forme poco disponibili alle trasformazioni biologiche. Nell'acqua di mare si trova principalmente nella forma di ione solfato (SO_4^{2-}), il più accessibile per gli organismi viventi, ma si può trovare anche come solfuro di idrogeno (H_2S), zolfo elementare (S^0) e molecole organiche solforate. Gli oceani rappresentano per questo il più importante serbatoio di zolfo. Nelle cellule viventi lo zolfo è parte della struttura di molte molecole come amminoacidi (esempio metionina, cisteina), alcune vitamine, coenzimi e ormoni. Lo zolfo è anche utilizzato da diversi gruppi batterici, soprattutto nelle sue forme inorganiche, nei processi di produzione di energia metabolica.

Il ciclo biogeochimico dello zolfo (Figura 10) comprende varie specie, organiche e inorganiche, che subiscono trasformazioni ad opera di agenti chimici o biologici, e che fluiscono tra i diversi comparti naturali.



Le frecce rosse indicano le riduzioni

Le frecce blu le ossidazioni

Figura 10. Ciclo dello zolfo

Lo zolfo viene immesso in atmosfera a seguito dell'eruzioni vulcaniche o da diverse attività umane, sottoforma di gas quali anidride solforosa (SO_2) e, in misura minore, H_2S . Le attività industriali hanno avuto un forte aumento soprattutto a partire dal secolo scorso portando al rilascio in atmosfera di notevoli quantità di anidride solforosa, la quale ha avuto conseguenze importanti soprattutto nella formazione delle piogge acide. In atmosfera queste molecole vengono rapidamente ossidate fotochimicamente a solfato, il quale precipita con le piogge e viene disciolto nelle acque interne e negli oceani. Qui può reagire con ferro, calcio altri elementi formando solfuri e solfati metallici, che sono poco solubili e precipitano dando origine a sedimenti e a rocce. La fase sedimentaria dello zolfo è estremamente lunga, l'elemento in questa forma non è attivamente riciclato ed è pertanto escluso dal suo ciclo biogeochimico. Il solfato viene assimilato da organismi vegetali e microbici e inserito nelle molecole biologiche solforate. Nei sedimenti e in altri ambienti anossici, viene utilizzato dai batteri solfato riduttori come accettore finale di elettroni, in un tipo di respirazione anaerobica, e ridotto a solfuro di idrogeno. Il solfuro di idrogeno è un gas tossico, incolore, dal caratteristico odore di uova marce. Questo elemento può essere immesso nell'ambiente, sia in atmosfera che nelle acque di scarico, in cui assume la forma ionica di solfuro (HS^-). Il solfuro reagisce nei sedimenti in parte con il ferro (sciolto o particolato) per formare solfuro di ferro dando inizialmente forme volatili e alla fine pirite. La formazione di solfuro di ferro è uno dei processi biogeochimici più comuni e importanti nei sedimenti. Un'altra parte del solfuro generato viene ossidato da diversi gruppi microbici ad esempio gruppi di batteri litotrofi e fototrofi caratterizzati dalla capacità di ossidare il solfuro di idrogeno a zolfo elementare o a solfato. Lo zolfo elementare viene ossidato aerobicamente da batteri zolfo ossidanti producendo ancora solfato. Il solfato viene assimilato da una serie di microrganismi e organismi vegetali dando di nuovo via al ciclo. Per essere incorporato negli aminoacidi lo ione solfato viene ridotto a solfuro in un processo definito riduzione assimilatoria del solfato. Questo processo metabolico segue meccanismi simili a quello della riduzione dissimilativa da parte dei batteri solfato-riduttori, con consumo di un ATP per la formazione del composto solforato ad alta energia APS. Nella riduzione assimilativa viene utilizzata l'energia di un'ulteriore molecola di ATP per formare un secondo composto solforato ad alta energia il PAPS (3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato). Una volta assimilato, lo zolfo viene trasferito da

piante e batteri ai livelli trofici superiori e poi rilasciato a seguito di processi metabolici di degradazione nella forma di H_2S .

Il riciclo dello S nella biosfera è molto rapido e i microrganismi marini hanno un ruolo fondamentale. Come risultato di queste attività microbiche, il ciclo dello S ha connessioni multiple con i cicli degli altri elementi, in particolare C, N, P e Fe.

1.3.5 Il DMS e l'influenza sul clima

Come già detto nel paragrafo precedente, lo zolfo nella zona fotica viene assimilato dal fitoplancton e incorporato, in forma ossidata, in polisaccaridi solforati, ma soprattutto in aminoacidi quali metionina e cisteina. La metionina è convertita dal fitoplancton in dimetilsolfoniopropionato ($(CH_3)_2S^+CH_2CH_2COO^-$ (DMSP) un composto con diverse funzioni. Il suo effetto principale è osmoprotettivo in molte alghe, batteri e alcune piante acquatiche, in cui regola gli scambi osmotici tra l'ambiente esterno ed l'interno della cellula. Ma ha anche altre funzioni: citoprotettivo, chemioprotettivo, ha un'attività antiossidante in alcune alghe marine e può limitare la predazione da parte dello zooplancton. Questo composto può raggiungere concentrazioni citoplasmatiche anche molto elevate; complessivamente il DMSP sintetizzato annualmente dai fotoautotrofi marini ammonta a circa 10^9 tonnellate. Poiché ogni molecola di DMSP contiene 5 atomi di C, la sintesi di questo composto è importante anche per il ciclo del carbonio. Il 3-10% del carbonio fissato nella produzione primaria va a formare questa molecola, e quindi la sua degradazione fornisce circa il 3-10% della domanda di carbonio dei batteri eterotrofi nella zona oceanica superficiale. Il DMSP viene successivamente rilasciato dal fitoplancton nell'ambiente esterno, in parte con la cosiddetta essudazione, ma soprattutto a seguito di lisi cellulare, predazione, morte, e diventa così un elemento appetibile per molti organismi presenti in loco, tra cui batteri eterotrofi che lo utilizzano come fonte di carbonio, di energia, ma anche di zolfo, già presente in forma organica utilizzabile quindi per la biosintesi degli aminoacidi. Il DMSP può subire due vie degradative diverse: 1. demetilazione con formazione di MMPA (3metil-mercaptio-propionato) che poi porta alla formazione di metanotiolo, il quale viene in seguito inserito nella via di sintesi degli aminoacidi; 2. rottura del DMSP con formazione di

1.3.5 I batteri solfato-riduttori

Nella riduzione dissimilativa del solfato, i microrganismi utilizzano il solfato inorganico come accettore di elettroni per ossidare substrati energetici con conseguente produzione di idrogeno solforato. Il solfato può essere utilizzato come accettore di elettroni sia da membri di batteri che da archea. La maggior parte dei procarioti con capacità solfato-riducenti sono batteri. I batteri Solfato-Riduttori (RSB) sono ampiamente distribuiti in ecosistemi terrestri e marini; anche se tassi di solfato-riduzione significativi sono stati riportati anche per i sedimenti di acqua dolce, nonostante la bassa concentrazione di solfato. La maggior parte delle sequenze relative a batteri solfato-riduttori sono state trovate in sedimenti ricchi di nutrienti, suggerendo che l'abbondanza di questi batteri aumenta con l'aumentare dell'arricchimento organico. La diversità o densità dei SRB possono, quindi, essere utilizzati come indicatore biologico per valutare i livelli di inquinamento nei sedimenti di allevamenti ittici marini.

I batteri SRB sono microrganismi strettamente anaerobi, differentemente dalla maggior parte dei microrganismi che utilizzano nitrato come accettore di elettroni nella degradazione della materia organica, i quali sono anaerobi facoltativi. Il contributo di questi batteri al processo di mineralizzazione del carbonio totale nei sedimenti marini, dove il solfato non è limitante, è stata stimata essere fino al 50%. I SRB non sono strettamente correlati da un punto di vista tassonomico, ma formano un evidente raggruppamento di tipo fisiologico ed ecologico, giocando un ruolo importante nella biogeochimica dei vari ambienti in cui vivono. Alcuni riduttori di solfato sono in grado di crescere a temperature inferiori a 5 °C, mentre all'estremo opposto, specie termofile, in grado di crescere a 65-80 °C, sono stati rilevate in acque profonde. Probabilmente l'aspetto più significativo del loro metabolismo è la produzione di H₂S, che, essendo un forte agente riducente, è in grado di inibire la crescita di alcuni microorganismi aerobi. Questo composto svolge anche un ruolo importante nell'ambiente, in quanto funziona come un donatore di elettroni per la crescita di alcuni batteri sulfurei.

I SRB sono adattati con successo a quasi tutti gli ecosistemi del pianeta, tra cui le nicchie estreme come le acque profonde delle sorgenti idrotermali, acque provenienti da giacimenti di petrolio e di gas naturale, acque reflue industriali. In questi ecosistemi, i SRB devono far fronte a condizioni fisico-chimiche drastiche, ad esempio, ad alta temperatura e alta pressione. Sono abbondanti soprattutto negli ambienti acquatici dove

il solfato non è limitante, ma anche negli strati anossici del suolo dove il solfato è più scarso. Una crescente evidenza biochimica e genetica suggerisce che i batteri SRB hanno iniziato a divergere in un momento precoce della storia. Questa lunga storia evolutiva ha portato allo sviluppo in questi organismi di una varietà di proteine uniche e processi biochimici di profonda importanza. I SRB devono pertanto essere considerati come microrganismi ancestrali, che hanno contribuito al primordiale ciclo biogeochemico dello zolfo non appena la vita è comparsa sul pianeta. Argomenti attuali infatti, indicano che lo sviluppo della riduzione dissimilatoria del solfato si è verificato tra 2,8 e $2,5 \times 10^9$ anni fa ed è stata simultanea con la fotosintesi ossigenica da parte di cianobatteri ancestrali, ma prima della respirazione aerobica.

A causa della loro importanza per i processi critici dell'ecosistema, l'interesse per i SRB è aumentata negli ultimi 10 anni. Le più ampie ricerche sulle vie metaboliche dei SRB sono state fatte con i membri del genere *Desulfovibrio*, che sono i riduttori di solfato più facilmente coltivati. Più di 220 specie di 60 generi di SRB sono stati descritti fino ad ora. Con lo sviluppo di analisi filogenetica basate sull'rRNA, notevoli progressi sono stati fatti nella tassonomia e filogenesi di questo gruppo molto diversificato. I SRB possono essere divisi in quattro gruppi sulla base di analisi di sequenza dell'rRNA: Gram-negativi mesofili, Gram-positivi formanti spore, batteri termofili e archea termofili. Essi includono generi come *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfotomaculum*, *Thermodesulfobacterium*, *Archaeoglobus*, ecc. I più conosciuti batteri solfato-riduttori, appartengono al genere *Desulfonema* che si compone di organismi filamentosi 3-8 μm di diametro.

I solfato riduttori sono per la maggior parte organotrofi, cioè necessitano di molecole organiche come fonte di carbonio, essendo incapaci di fissare CO_2 . La ragione principale risiede nel processo stesso di riduzione del solfato: il potenziale di ossidoriduzione della coppia $\text{HS}^-/\text{SO}_4^{2-}$ è di $-0,217 \text{ V}$ e questo significa che il solfato è un cattivo accettore di elettroni, relativamente alla coppia $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$ (potenziale $+0,82 \text{ V}$) o anche alla coppia $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (potenziale $+0,43 \text{ V}$). La conseguenza è che nella respirazione anaerobica del solfato viene liberata poca energia, insufficiente per sostenere un metabolismo autotrofo. Negli ambienti anossici, nei quali sono presenti i BSR, sia H_2 che le piccole molecole organiche usate come donatori di elettroni derivano da processi fermentativi. Quindi, i BSR sono parte di consorzi batterici anaerobi,

composti da microrganismi fermentatori, solfato riduttori e metanogeni che cooperano per mineralizzare i composti organici formando anidride carbonica e metano. Esiste un'apparente competizione tra i BSR e metanogeni, in quanto entrambi sono microrganismi strettamente anaerobi e utilizzano gli stessi substrati prodotti nei processi fermentativi, in particolare H_2 e acetato. In realtà, negli ambienti acquatici dove il solfato è abbondante, i solfato riduttori prevalgono sui metanogeni perché hanno una affinità maggiore per l'idrogeno molecolare e perché sono bioenergeticamente più efficienti. Invece negli ecosistemi impoveriti di solfato come i sedimenti di acqua dolce, i metanogeni sono i principali responsabili dell'utilizzo di idrogeno e acetato. Alternativamente, i metanogeni sono in grado di utilizzare alcuni substrati come le metilammine, che non sono degradati dai solfato riduttori.

Inizialmente, si credeva che i batteri solfato-riduttori utilizzassero una gamma limitata di substrati come fonti di energia (per esempio, lattato, idrogeno molecolare, piruvato, etanolo, ecc), ma recenti studi microbiologici e biochimici hanno notevolmente ampliato il numero di accettori di elettroni e donatori noti da loro utilizzati. Più di un centinaio di componenti compresi zuccheri (ad esempio, fruttosio, glucosio, ecc), aminoacidi (glicina, serina, alanina, ecc) e acidi monocarbossilici (ad esempio, acetato, propionate, butirato, ecc), acidi bicarbossilici (fumarato, succinato, malato, ecc), alcool (ad esempio, metanolo, etanolo, ecc) e composti aromatici (benzoato, fenolo, ecc) sono potenziali donatori di elettroni per i SRB. Il tipo di fonte di carbonio utilizzata varia secondo il genere. Inoltre, alcune specie di SRB considerati prima come anaerobi stretti sono stati in grado di eseguire una microaerobica respirazione accoppiata al risparmio energetico. Diversi studi hanno infine dimostrato la capacità di alcune specie di ridurre nitrati e nitriti, con rese energetiche anche superiori a quelle registrate con il solfato.

1.3.5 La riduzione del solfato

Come già anticipato, la riduzione del solfato rappresenta uno dei passaggi fondamentali nel ciclo dello zolfo. Si tratta di una forma di respirazione anaerobica, tipica dei batteri solfato riduttori (BSR), e come tale avviene in ambienti anossici quali ad esempio i sedimenti marini, e più in generale in tutti quegli ambienti che siano deprivati di

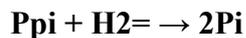
ossigeno a seguito di processi microbici di decomposizione della materia organica. Avviene quindi, principalmente nei primi centimetri di sedimento, ma può avvenire anche in profondità.

Il primo passo nella biochimica della solfato-riduzione è il trasporto di solfato esogeno attraverso la membrana nella cellula batterica. Questo processo può essere inibito da un analogo strutturale del solfato, il selenato. Il processo di riduzione del solfato richiede, come anticipato, la presenza di donatori di elettroni quali H₂, lattato, piruvato, fumarato, acetato, butirato ecc. e porta alla produzione di H₂S. Il solfuro di idrogeno è molto tossico, soprattutto a pH non acidi, per una vasta gamma di batteri e organismi superiori, compreso l'uomo. Inoltre nella forma SH⁻ reagisce con i metalli nei citocromi, formando solfuri metallici ed è quindi in grado di sopprimere la crescita di alcuni organismi aerobici. Fortunatamente il solfuro di idrogeno si presenta in forma gassosa e tende a diluirsi nell'ambiente.

Lo ione solfato è alquanto stabile e, per essere ridotto, deve essere precedentemente attivato dall'enzima ATP solfurilasi (CE 2.7.7.4; ATP solfato adenyltransferase), che catalizza l'esterificazione del solfato con un fosfato proveniente da un ATP, formando adenosina fosfosolfato (APS) e PPi (pirofosfato inorganico) secondo la reazione:



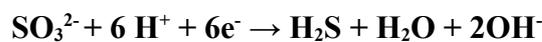
L'ATP solfurilasi è stata purificata e caratterizzata da *Desulfovibrio gigas* e *D. desulfuricans* ATCC 27774, una nuova metalloproteina contenente cobalto e zinco. La formazione di PPi è termodinamicamente sfavorevole, la reazione deve essere portata a compimento da un secondo enzima, una pirofosfatasi inorganica (EC 3.6.1.1; pirofosfato phosphohydrolase) che idrolizza PPi secondo la seguente reazione:



Il gruppo solfato dell'APS viene ridotto a solfito (SO₃²⁻) dall'enzima APS reduttasi, utilizzando gli elettroni provenienti dall'ossidazione di H₂, a opera della idrogenasi, con liberazione di AMP:



L'APS reduttasi (EC1.8.99.2) è stata purificata e caratterizzata da numerose specie, quali ad esempio *Desulfovibrio* e *A. fulgidus*. L'APS reduttasi citoplasmatica è una flavoproteina contenente ferro-zolfo un FAD e otto atomi di ferro disposti in due differenti centri. Il donatore di elettroni richiesto per la riduzione di APS a bisolfito è ancora sconosciuto. Il trasferimento di elettroni coinvolge il citocromo c3 che è tipico dei BSR. Il solfito (SO_3^{2-}) è tossico e viene ridotto immediatamente a solfuro di idrogeno non appena viene prodotto. Con l'utilizzo di altri 6 elettroni, derivanti sempre dall'ossidazione di H_2 , l'enzima solfito reduttasi (EC 1.8.99.1) completa il processo di riduzione:



Un certo numero di differenti solfito reduttasi sono stati segnalati nei batteri solfato-riduttori. Il solfito può quindi essere ridotto mediante una varietà di intermedi per formare lo ione solfuro. La reazione complessiva di riduzione del solfato quando viene utilizzato H_2 come donatore di elettroni è:



Il gene *dsrAB* codifica per l'enzima che catalizza lo step finale della riduzione del solfato, la solfito reduttasi (Dissimilatory Sulfite Reductase, DSR). Questo enzima è sintetizzato da tutti i solfato-riduttori conosciuti ed è composto da due subunità, α e β . La sua ubiquità e la sequenza altamente conservata lo hanno reso ideale per la valutazione della biodiversità negli ambienti anossici. I geni *aps* e *apr*, codificano rispettivamente per l'adenosina-5'-fosfosolfato reduttasi e per l'APS reduttasi. I tre geni nel loro insieme sono responsabili della completa riduzione del solfato ad idrogeno solforato (H_2S). Essendo altamente conservati rappresentano i target più adatti per l'identificazione molecolare della struttura della comunità microbica del ciclo dello zolfo nell'ambiente.

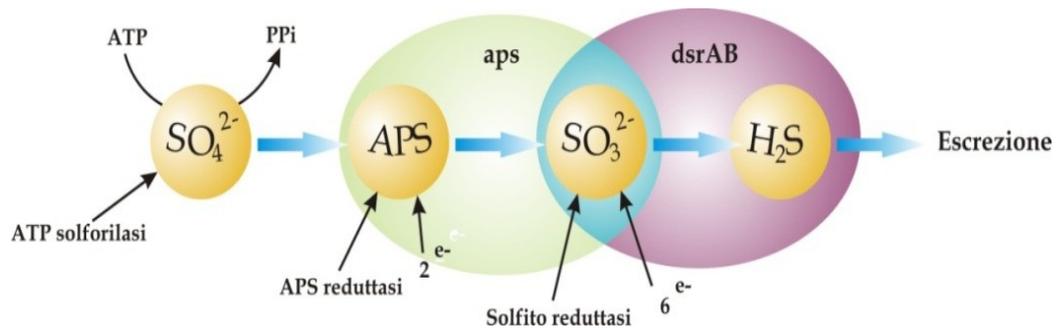


Figura 12. Geni coinvolti nella riduzione del solfato

Esistono altri gruppi microbici, sia batteri che archea, in grado di ottenere energia per la crescita riducendo lo zolfo elementare S^0 anziché solfato. Questi batteri utilizzano lo zolfo elementare come substrato respiratorio in assenza di altri possibili accettori terminali di elettroni come solfato, solfito, tiosolfato, nitrito, o nitrato. Sono indicati come zolfo-riduttori e, allo stesso modo dei BSR, producono H_2S come prodotto finale del processo bioenergetico. Il genere più conosciuto è *Desulfuromonas*, i cui membri accoppiano la riduzione dello zolfo elementare all'ossidazione di piccole molecole organiche quali l'acetato, l'etanolo e il propanolo:



I batteri zolfo-riduttori si ritrovano in molti degli ambienti dove sono presenti i solfato riduttori, dove possono associarsi a batteri che ossidano H_2S a S^0 .

1.3.6 I solfobatteri e l'ossidazione dei composti ridotti dello zolfo

Quando si forma in piccola quantità, l'idrogeno solforato viene trattenuto nei fondali, dove precipita a solfuro di ferro o a solfuri di altri metalli pesanti, dai quali deriva il colore nero dei sedimenti:



Se le quantità liberate sono più cospicue, il gas gorgoglia verso la superficie. Generalmente solo circa il 10% del solfuro prodotto dai solfato riduttori viene precipitato da ioni metallici. Il resto è potenzialmente disponibile per l'ossidazione a S^0 da parte di batteri chemiolitotrofi in grado di ossidare solfuro, zolfo elementare o tiosolfato ($S_2O_3^{2-}$) formando solfato come prodotto finale, stimolando nuovamente l'attività dei batteri solfato-riduttori. Si tratta di microrganismi microerofili in quanto crescono preferibilmente in presenza di basse concentrazioni di ossigeno. In questo processo di ossidazione molto importanti risultano essere i batteri filamentosi *Beggiatoa* e *Thiothrix*, *Thiomargarita*. Si tratta di tre generi, strettamente correlati, che si sono adattati a ossidare il solfuro anche in assenza di O_2 utilizzando il nitrato come accettore di elettroni. Per riuscire a competere con altri solfuro-ossidanti, essi immagazzinano il nitrato delle acque profonde in un vacuolo e lo trasportano nel sedimento dove è prodotto il solfuro. Per incamerare più nitrato possibile, essi devono ingrandire i loro vacuoli e, come risultato, questo gruppo comprende diverse specie giganti visibili anche a occhio nudo. Questi grandi solfo-batteri utilizzano nitrato ma, contrariamente ai batteri denitrificanti, sembra che riducano il nitrato ad ammoniaca e non a N_2 . Quando la zona anaerobica coinvolge anche una porzione di colonna d'acqua dove penetra la luce, si possono sviluppare batteri fototrofi che utilizzano composti ridotti dello zolfo non a scopo energetico, ma come sorgente di elettroni per la fissazione della CO_2 nel processo della fotosintesi anossigenica. Questi microrganismi sono raggruppati come solfobatteri purpurei (ad esempio *Chromatium*, *Thiocapsa*, *Thiopedia* spp.) o verdi (ad esempio *Chlorobium*, *Pelodictyon*, *Prosthecochlorarius*), e richiedono anche la luce e una fornitura di carbonio organico per la crescita, sono per questo diffusi nelle zone anossiche di laghi stagnanti, fonti sulfuree e laghi ipersalini, e in tutti quegli habitat dove sono contemporaneamente presenti solfuro e luce.

CAPITOLO 2

Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare la presenza di batteri solfato-riduttori nella laguna costiera Pialassa dei Piomboni. Come già anticipato, i batteri solfato riduttori (sulphate-reducing bacteria, SBR) sono microrganismi anaerobi importanti in molti comparti ambientali, compresi i sedimenti delle lagune costiere, dove svolgono un ruolo importante nei processi di mineralizzazione della sostanza organica, che determina la produzione di idrogeno solforato, un composto tossico per le piante acquatiche, per i pesci e per l'uomo, e la cui presenza in ambiente è causa dello sviluppo di cattivi odori, in particolare il caratteristico odore di "uovo marcio".

Lo sviluppo di odori sgradevoli che avviene periodicamente nella Pialassa dei Piomboni ha fatto sorgere la necessità di verificare l'eventuale presenza di batteri solfato-riduttori nelle acque e/o nei sedimenti. La ricerca è stata svolta dal Laboratorio sperimentale di fisiologia dell'Università di Bologna sede di Ravenna.

La Pialassa dei Piomboni rappresenta una zona terminale di laguna e come tale va spesso incontro a problemi di cattiva qualità delle acque. Pur risentendo degli eventi di marea presenta un tasso di ricambio molto lento. In aggiunta è una zona interessata dalla presenza di numerosi scarichi industriali e agricoli che potrebbero determinare fenomeni di eutrofizzazione seguiti da fenomeni di anossia del fondale e quindi conseguente diffusione di batteri solfato-riduttori.

Normalmente questi batteri si sviluppano nel periodo estivo, durante il quale le alte temperature favoriscono il ristagno dell'acqua e una minore solubilità dell'ossigeno. Tuttavia, l'elevata presenza di materia organica e di eventuali contaminanti dovuti agli scarichi urbani e industriali rappresentano condizioni favorevoli alla presenza di una elevata attività batterica anche in altri periodi dell'anno. Pertanto, le analisi sono state svolte nei mesi di Novembre-Dicembre, periodo durante il quale questi batteri, di norma, non si sviluppano in altri tipi di ambienti.

Gli obiettivi di queste tesi possono essere riassunti così:

1- determinare la presenza o l'assenza di batteri solfato-riduttori nei campioni di acqua e sedimento, con utilizzo di una metodologia molecolare basata sull'estrazione dell'eDNA (environmental DNA) dalle matrici ambientali e la successiva amplificazione (PCR) di un tratto genico codificante l'enzima *dissimilatory sulfite reductase* (solfito reductasi) (*dsrAB*), specifico dei procarioti solfato-riduttori;

2- effettuare, qualora i campioni analizzati fossero stati positivi, una valutazione semi-quantitativa dei livelli di solfobatteri presenti mediante la stima del contenuto di eDNA codificante per il gene *dsrAB*, al fine di conoscere in quali aree della laguna si sviluppano maggiormente.

Inoltre, negli stessi campioni utilizzati per le indagini molecolari, sono state effettuate ulteriori misure concernenti i solfuri ed i solfati, i nitriti, i fosfati e la clorofilla *a*.

CAPITOLO 3

Materiali e Metodi

3.1 Campionamento

Questo lavoro di Tesi fa parte di un piano monitoraggio sulla Pialassa dei Piomboni coordinato dal Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali (CIRSA, Università di Bologna), in cui saranno investigati diversi aspetti per una corretta valutazione dello stato di qualità dell'ambiente e il possibile impatto di attività antropiche per la salute umana e per gli ecosistemi.

Il campionamento è stato effettuato nei mesi di Novembre-Dicembre del 2012. Sono stati definiti 100 punti di campionamento, e di questi 50 stazioni sono state selezionate per effettuare i prelievi (i siti dispari mostrati nella mappa in basso).

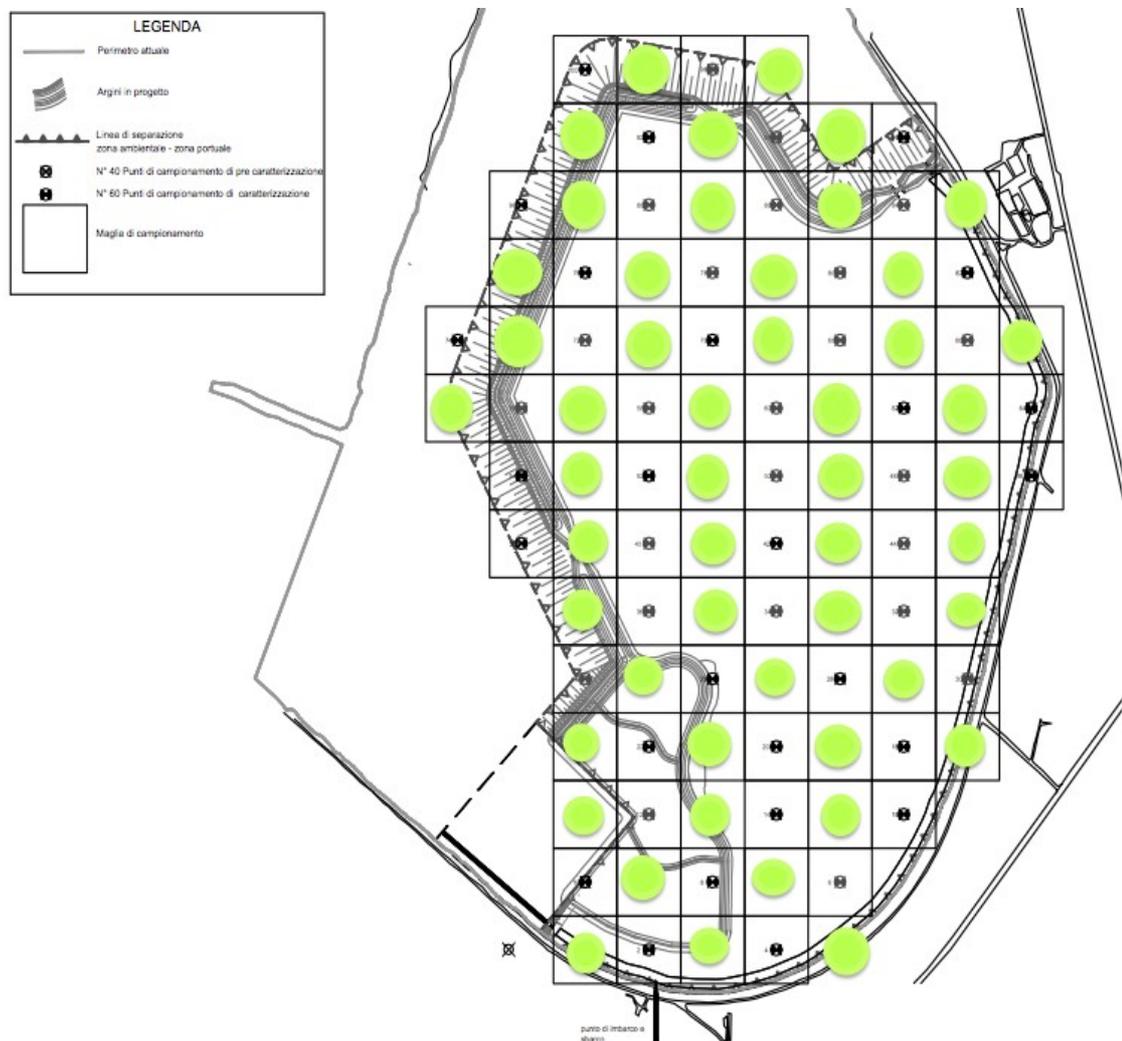


Figura 13. Piano di campionamento preliminare dei sedimenti e delle acque della Pialassa dei Piomboni. Autorità portuale di Ravenna.

Le coordinate geografiche sono le seguenti:

Tabella 1. Coordinate geografiche relative ai siti campionati

STAZIONE DI CAMPIONAMENTO	COORDINATE GEOGRAFICHE (E, N WGS 84, UTM 32)	
1	2302652,35	4925576,64
3	2302935,20	4925576,64
5	2303218,03	4925576,65
7	2303076,61	4925718,06
9	2302793,77	4925718,06
11	2302652,35	4925859,48
13	2302935,19	4925859,48
15	2303218,03	4925859,48
17	2303500,87	4926000,90
19	2303218,03	4926000,91
21	2302935,19	4926000,91
23	2302652,35	4926000,91
25	2302793,77	4926142,32
27	2303076,61	4926142,32
29	2303359,46	4926142,33
31	2303500,87	4926283,74
33	2303218,03	4926283,74
35	2302935,19	4926283,74
37	2302652,35	4926283,74
39	2302652,35	4926425,17
41	2302935,19	4926425,16
43	2303218,03	4926425,16
45	2303500,87	4926425,16
47	2303500,87	4926566,59
49	2303218,03	4926566,59
51	2302935,19	4926566,59
53	2302652,35	4926566,59
55	2302369,51	4926708,00
57	2302652,35	4926708,00
59	2302935,19	4926708,00
61	2303218,03	4926708,00
63	2303500,87	4926708,01
65	2303642,29	4926849,42
67	2303359,45	4926849,42
69	2303076,61	4926849,42
71	2302793,77	4926849,42
73	2302510,93	4926849,42
75	2302510,93	4926990,85
77	2302793,77	4926990,85
79	2303076,61	4926990,84
81	2303359,45	4926990,84
83	2303500,87	4927132,27
85	2303218,04	4927132,27
87	2302935,19	4927132,27
89	2302652,36	4927132,26
91	2302652,36	4927273,68
93	2302935,19	4927273,68
95	2303218,03	4927273,68
97	2303076,61	4927415,10
99	2302793,77	4927415,10

I campioni d'acqua sono stati prelevati con bottiglie sterili completamente riempite (per evitare la volatilizzazione dei solfuri) e sono stati mantenuti ad una temperatura di 4°C e al buio fino al momento delle analisi. I campioni di sedimento superficiale (i primi 15 cm) sono stati prelevati mediante l'utilizzo di una benna e conservati a -80°C per le analisi molecolari.

3.2 Analisi dei parametri chimico-fisici

Insieme al prelievo dei campioni sono state effettuate anche le misure dei principali parametri chimico-fisici attraverso sonde da campo. Questi parametri comprendono: temperatura, pH, ossigeno disciolto e salinità.

Sono state successivamente misurate le concentrazioni di: solfuri, solfati, fosfati, nitrati per via spettrofotometrica mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro Hach Lange 100. Per l'analisi della concentrazione dei solfuri è stato utilizzato il metodo del blu di metilene (USEPA 376.2, Sulfide reagents, Hach Lange) sul campione d'acqua tal quale (25 mL).

Dopo l'analisi dei solfuri, i campioni d'acqua sono stati divisi in due aliquote 250 mL e filtrati con filtri in fibra di vetro (porosità 0.4 μm , Whatman GF6). L'acqua filtrata è stata utilizzata per determinare le concentrazioni di solfati, nitrati e fosfati, usando i seguenti metodi:

Tabella 2. Metodi utilizzati per determinare le concentrazioni di solfati, nitrati e fosfati nei campioni di acqua.

ELEMENTO	METODO
Solfati	USEPA 375.4 (SulfaVer 4 kit, Hach Lange)
Nitrati	riduzione del Cd (Nitriver 5 kit, Hach Lange)
Fosfati	acido ascorbico, USEPA 365.2 (PhosVer 3 kit, Hach Lange)

I filtri contenenti la biomassa planctonica sono stati poi utilizzati per l'analisi del contenuto di clorofilla a e per l'estrazione del DNA ambientale. La concentrazione di clorofilla a è stata determinata mediante estrazione in acetone del pigmento dai campioni di biomassa fitoplanctonica immobilizzata sui filtri e successiva lettura spettrofotometrica secondo la norma UNI 11006:2002.

3.3 Analisi molecolari per l'identificazione dei batteri Solfato-Riduttori

In Figura 14 è schematizzato il protocollo utilizzato per la rilevazione della presenza di batteri solfato-riduttori nei campioni di acqua e sedimento. Questo protocollo prevede l'estrazione del eDNA (environmental DNA, DNA ambientale) dalle matrici ambientali e la successiva amplificazione (PCR) di un tratto genico codificante l'enzima *dissimilatory sulfite reductase* (solfito reduttasi) (DsrAB), specifico dei procarioti solfato-riduttori, mediante l'utilizzo di specifiche sonde molecolari (o primers). La presenza di batteri solfato riduttori nelle matrici ambientali è stata quindi verificata tramite l'amplificazione selettiva del gene DsrAB.

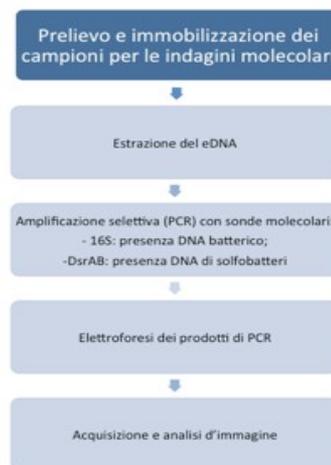


Figura 14. Protocollo seguito per l'identificazione dei batteri solfato-riduttori nei campioni di acqua e sedimento mediante tecniche molecolari.

1.3.1 Estrazione del DNA

Il eDNA è stato ottenuto mediante lisi termica dei campioni di biomassa fitoplanctonica immobilizzata nel filtro e dei campioni di sedimento. I campioni sono stati precedentemente omogeneizzati in opportuni campioni di acqua milliQ sterile 2,5 µM, bolliti per 10 minuti e immediatamente incubati in ghiaccio per 5 minuti. Gli estratti sono stati quindi centrifugati a 5000 xg per 15 min e i surnatanti trasferiti in nuovi tubi sterili, conservati a -20°C fino al loro utilizzo come templati per le reazioni di PCR.

1.3.2 Amplificazione selettiva (PCR, Polymerase Chain Reaction)

La reazione a catena della DNA polimerasi (*polymerase chain reaction* PCR) consente un'amplificazione di tipo esponenziale del frammento di DNA target attraverso un processo ciclico nel quale il numero di copie di DNA bersaglio aumenta esponenzialmente ad ogni iterazione. Per lo svolgimento della reazione *in vitro* viene preparata una miscela di reazione contenente: un template, ossia un DNA stampo, rappresentato da un campione di DNA contenente la sequenza da amplificare, i primers ovvero piccoli oligonucleotidi (lunghi generalmente da 20 a 30 basi) complementari alle regioni fiancheggianti il frammento da amplificare. Appaiandosi a tali regioni, i primers costituiscono un tratto di DNA a doppio filamento dal quale la DNA polimerasi può iniziare la sintesi, ovvero la formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del segmento iniziatore e il dNTP complementare allo stampo. Una miscela equimolare di deossinucleotidi tri-fosfato (dNTPs); lo ione Mg^{2+} , cofattore necessario per il corretto funzionamento della polimerasi, ed in grado di influenzare anche l'appaiamento dei primer allo stampo; un tampone di reazione ad una concentrazione salina ideale per il corretto funzionamento dell'enzima e infine l'enzima; la DNA polimerasi. Le polimerasi utilizzate nelle reazioni di PCR sono definite Taq DNA polimerasi e derivano da quella ottanta dal microrganismo *Thermus aquaticus*, identificato nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone, negli Stati Uniti. Questo batterio che quindi vive normalmente a temperature di circa 75°C possiede una DNA polimerasi altamente termostabile, che quindi non viene degradata durante la prima fase di denaturazione del DNA, in cui si hanno temperature di circa 95°C. La Taq polimerasi ha un optimum di attività a 72°C, temperatura cui normalmente è condotta la fase di estensione nella reazione di PCR. Il principale criterio che determina la specificità della reazione di PCR è la scelta dei primers, i quali, per poter assicurare unicità di amplificazione di una sequenza dovrebbero avere una lunghezza media di circa 20 paia di basi (bp). Infatti primers troppo corti risultano essere poco specifici avendo alte probabilità di legarsi a zone di complementarietà presenti nel genoma. Attualmente l'utilizzo di specifici software permette di selezionare sequenze oligonucleoidiche ottimali da utilizzare come primer nella reazione di amplificazione. In questa ricerca sono state ottenute sonde molecolari (o primers) specifiche per il gene codificante l'enzima solfito reduttasi (*dsrAB*). *DsrAB*, come già detto nell'introduzione, è un enzima chiave nella riduzione

dissimilatoria del solfato nei procarioti solfato-riduttori. La presenza del *dsrAB* è stata dimostrata in diversi ceppi di batteri solfato-riduttori, ma non solo. È stata infatti ritrovata anche in diversi ceppi di solfobatteri, è stata quindi proposta una sua funzione nell'ossidazione del solfuro. Comunque, le sequenze del gene *dsrAB* nei solfobatteri fototrofi sono conservate e filogeneticamente distinte da quelle dei procarioti solfato-riduttori.

Primers specifici per *dsrAB* sono riportati in Mori et al. (2010), e appositamente costruiti per l'identificazione di differenti specie di solfobatteri e solfato-riduttori in diverse matrici ambientali. Come è possibile vedere in Tabella 4, si tratta di primer degenerati, ovvero primer la cui sequenza non è determinata univocamente, ma contiene una o più posizioni, rappresentate dalle Y, in cui possono essere presenti più nucleotidi in miscela. Le degenerazioni rendono possibile l'appaiamento dei primers a sequenze diverse e quindi l'amplificazione del tratto genico *dsrAB* appartenente a specie diverse di solfobatteri.

Microorganisms	Strain no	PGdsrAF	PGdsrAR
Primer		5' -CAYGGBCAGACCCGGBRAYATYATG-3'	5' -RCAGTGCATRCACGHCACRCA-3'
Target		5' -CAYGGBCAGACCCGGBRAYATYATG-3'	3' -YGTACACGTAYGTMGCDTGYGT-5'
Purple sulfur bacteria			
<i>Allochromatium vinosum</i>	DSM180 ^T
<i>Halochromatium salexigens</i>	DSM4395 ^T
<i>Halorhodospira halophila</i>	DSM244 ^T
<i>Marichromatium gracile</i>	DSM203 ^T
<i>Thiorhodococcus drewsii</i>	DSM15006 ^T
<i>Thiobaca trueperi</i>	DSM13587 ^T
<i>Thiocapsa marina</i>	DSM5653 ^T
<i>Thiocystis gelatinosa</i>	DSM215 ^T
Green sulfur bacteria			
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	DSM266
<i>Chlorobaculum tepidum</i>	DSM12025 ^T
<i>Chlorobium limicola</i>	DSM257
<i>Chloebium luteorum</i>	DSM273 ^T
<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	DSM271
<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	DSM261
Colorless sulfur bacteria			
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	DSM12475 ^T ^T ^T
<i>Thiothrix nivea</i>	DSM5205 ^T
Sulfate-reducing prokaryote			
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	DSM4304 ^TTC...T..A.....CAC.....
<i>Thermodesulfobacterium commune</i>	DSM2178 ^TTCT.....CG.ACAA...
<i>Thermodesulfobacterium islandicus</i>	DSM12570 ^TTCT..A.....GG.T	...T.....A...T...
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	DSM2032 ^TTCC.....G..CCCA...
<i>Desulfobacterium dehalogenans</i>	DSM9161 ^TAGCT..T..A...GC...C	...T.....CCA...
<i>Desulfococcus multivorans</i>	DSM2059 ^TTCC.....CC.....
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	DSM771 ^TTCT.....TT...CA...
<i>Desulfosporosinus orientis</i>	DSM765 ^TATCA..A..A.....T	...T.....T...CA...
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	DSM2060 ^TTCC.....TCCA...
<i>Desulfovibrio africanus</i>	DSM2603 ^TTCC.....G..C.....
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DSM642 ^TTTCC.....T.GT.	...T.....C.....
<i>Desulfobacter postgatei</i>	DSM2034 ^TGCC.....T	...T.....CCA...
<i>Desulfotomaculum ruminus</i>	DSM2154 ^TGCC..G.....GG.TT...CCA...

Figura 15. Sequenza dei primers utilizzati per l'amplificazione selettiva del gene *DsrA* e specie di procarioti solfato-riduttori che possono essere rilevati (da Mori et al., 2010).

La reazione di amplificazione è stata realizzata in 25 μL di reazione con:

- iPROOF HF Master MIX 2X (Bio RAD), ossia una miscela contenente la Taq polimerasi, il buffer, Mg e dNTPs 12,5 μL
- primer forward 0.5 μM
- primer reverse 0.5 μM
- eDNA template 1 μL

In una prima fase di screening, è stata valutata la presenza o meno di DNA batterico nei campioni esaminati mediante l'amplificazione del tratto genico codificante il 16S rDNA batterico (Caccamo et al., 1999). Nei campioni risultati positivi è stata quindi valutata la presenza di DNA di solfato-riduttori. Il 16S rDNA è un gene di circa 1500 pb che codifica per la subunità piccola del ribosoma procariote. Questo gene muta molto lentamente durante l'evoluzione, e rappresenta pertanto un marcatore molecolare ideale per l'analisi della diversità microbica. Presenta, infatti, regioni altamente conservate, che hanno una elevata identità di sequenza in tutti i batteri; regioni semi-conservate, che hanno una elevata identità di sequenza tra batteri dello stesso taxon, e regioni variabili, che hanno una elevata identità di sequenza tra batteri appartenenti alla stessa specie.

La reazione di amplificazione prevede il succedersi di cicli di amplificazione costituiti da tre fasi:

1. la denaturazione della doppia elica del DNA stampo in due singole eliche (alla temperatura di 95 $^{\circ}\text{C}$)
2. l'appaiamento (*annealing*) dei primers alle sequenze di DNA a singola elica ad essi complementari e localizzati alle estremità del frammento bersaglio (ad una temperatura in genere compresa tra i 50 ed i 70 $^{\circ}\text{C}$)
3. l'estensione degli inneschi mediante aggiunta di nucleotidi nella direzione 5'-3' ad opera della DNA polimerasi che porta alla sintesi di una nuova elica complementare al DNA stampo (ad una temperatura compresa tra i 68 e i 72 $^{\circ}\text{C}$).

Questi tre passaggi costituiscono un ciclo di PCR, ma una completa amplificazione prevede il susseguirsi di queste tre fasi per circa 30-35 volte. Al termine del primo ciclo, sono presenti due coppie del segmento, ciascuna formata da un filamento nuovo ed uno vecchio. I prodotti di questo primo ciclo sono a loro volta utilizzati come stampo nei cicli successivi. Mediante ripetuti cicli di denaturazione, appaiamento dei primers

(*annealing*) ed estensione si ottiene un accumulo esponenziale del frammento target fino al raggiungimento di un plateau.

Le reazioni sono state effettuate utilizzando un termocicizzatore ONE Gradient (Celbio) con i seguenti parametri termici:

FASI	TEMPO	TEMPERATURA
denaturazione iniziale	2 minuti	94°C

35 cicli costituiti da:

denaturazione	45 secondi	94°C
appaiamento delle sonde	45 secondi	60°C (dsrAB) o 55°C (16S)
estensione	1 minuto	72°C

1.3.3 Elettroforesi e analisi d'immagine

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% in tampone TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA). Questa tecnica consente la separazione dei frammenti di DNA per migrazione in una matrice semisolida (gel) sotto l'azione di un campo elettrico con direzione e voltaggio costante generato da una differenza di potenziale applicata agli elettrodi di una cella elettrochimica. La molecola di DNA è carica negativamente per la presenza dei gruppi fosfato legati al carbonio 5', e pertanto tenderà a migrare verso il polo positivo con velocità (e quindi distanza percorsa) dipendente dalle dimensioni della molecola stessa, che, assieme alla percentuale di agarosio utilizzato per la preparazione del gel, influenza la resistenza che la molecola incontra nel migrare attraverso la trama del gel. Quindi, durante la migrazione, i frammenti di DNA si separano in base allo loro peso molecolare. I frammenti di DNA sono resi visibili direttamente sul gel mediante l'utilizzo di coloranti fluorescenti in grado di intercalarsi al DNA, visualizzando così le bande esposte alla luce ultravioletta. Nel nostro caso è stato utilizzato il colorante Gel Red (Biotium). Utilizzando marcatori di peso molecolare, costituiti da una miscela di frammenti a lunghezza nota (1kb and 100 bp ladder, Sigma Aldrich) è inoltre possibile stimare la lunghezza dei frammenti derivanti da reazioni di PCR. L'acquisizione delle immagini

relative alle corse elettroforetiche è stata effettuata attraverso il sistema Gel Doc™ EZ System e il software Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories).

3.4 Quantificazione relativa dei Solfato-Riduttori nei campioni positivi

I campioni di sedimenti risultati positivi alla presenza di solfato-riduttori sono stati ulteriormente analizzati per svolgere una analisi semi-quantitativa. È stato per questo necessario andare a costruire la curva di amplificazione del prodotto di PCR. Questa curva è solo teoricamente esponenziale, ma in realtà, dopo la prima fase, assume un andamento rettilineo che progressivamente raggiunge un valore massimo al quale tendono tutti i campioni, a prescindere dalla quantità di DNA di partenza. Un profilo di amplificazione è infatti composto da tre distinte fasi: esponenziale, in cui il prodotto di amplificazione aumenta seguendo l'equazione esponenziale; lineare, che porta al consumo dei reagenti e ad un conseguente rallentamento della cinetica della reazione; plateau, la reazione di amplificazione termina per mancanza di reagenti e il prodotto di amplificazione incomincia a degradarsi.

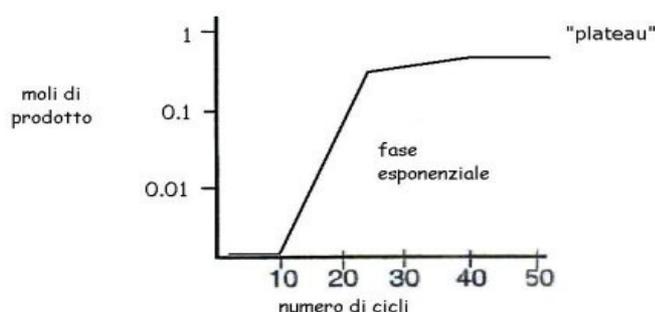


Figura 16. Curva di crescita del prodotto di PCR.

All'aumentare dei cicli la concentrazione degli amplificati aumenta. Pertanto misurando l'incremento di fluorescenza, dovuto alla formazione del prodotto di reazione all'avanzare dei cicli, è possibile ricavare la curva di amplificazione del template di interesse. In questa fase, è quindi possibile individuare un numero di cicli di amplificazione ottimale a cui la quantità di prodotto dipende linearmente dalla quantità

di templatato per il tratto genico in esame inizialmente presente nel campione. Pertanto il protocollo di PCR utilizzato nella fase di *screening* per la presenza dei solfato-riduttori nei campioni esaminati è stato ulteriormente ottimizzato per la valutazione semi-quantitativa. In particolare, sono stati effettuati degli esperimenti per determinare il numero di cicli ottimali (28) in cui la reazione risulta essere nella fase lineare.

I soli campioni risultati positivi alla presenza di DNA di solfato-riduttori sono stati, quindi impiegati per l'analisi semi-quantitativa della presenza del gene *dsrAB* nei campioni di eDNA in esame. La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 25 µL contenente:

- iPROOF HF Master MIX 2X (Bio RAD), ossia una miscela contenente la Taq polimerasi, il buffer, Mg e dNTPs
- primer *dsrAB* forward 0.5 µM
- primer *dsrAB* reverse 0.5 µM
- 1 µL DNA templatato.

Le reazioni sono state effettuate utilizzando un termocicizzatore ONE Gradient (Celbio) con i seguenti parametri termici:

FASI	TEMPO	TEMPERATURA
denaturazione iniziale	2 minuti	94°C

28 cicli costituiti da:

denaturazione	45 secondi	94°C
appaiamento delle sonde	45 secondi	60°C (<i>dsrAB</i>) o 55°C (16S)
estensione	1 minuto	72°C

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% in tampone TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA). L'acquisizione e l'analisi densitometrica delle immagini delle corse elettroforetiche è stata effettuata con sistema Gel Doc™ EZ System e il software Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories), che misura la densità ottica delle bande elettroforetiche. I dati ottenuti per il sito di campionamento 1 sono stati utilizzati come riferimento (110%) per la normalizzazione dei risultati.

CAPITOLO 4

Risultati

4.1 Risultati relativi all'analisi chimica delle acque

4.1.1 principali parametri chimico-fisici

I parametri rilevati al momento del campionamento sono stati: temperatura, pH, ossigeno disciolto e salinità.

Tabella 3. Valori dei principali parametri chimico-fisici

Campione	°C	pH	DO ppm	Salinità
1	11,81	8,26	6,26	27,71
3	11,45	7,80	5,84	27,01
5	10,15	8,32	6,93	28,61
7	9,94	8,21	7,54	29,11
9	10,88	8,10	7,79	29,23
11	12,31	8,23	12,08	27,58
13	12,34	8,19	13,08	12,65
15	11,07	8,11	7,31	28,75
17	13,82	8,71	5,34	24,50
19	11,02	9,27	7,56	14,34
21	11,93	8,61	12,51	28,27
23	11,72	9,49	12,07	27,42
25	10,37	8,53	9,85	13,04
27	10,70	8,25	7,70	23,62
29	10,92	8,40	8,18	27,99
31	12,15	8,56	6,84	27,83
33	11,58	8,66	10,35	25,28
35	12,68	8,87	13,89	13,61
37	13,44	8,71	10,15	27,68
39	12,82	9,16	10,13	22,39
41	12,44	8,87	12,78	14,02
43	12,55	8,80	9,89	26,87
45	11,96	10,04	11,28	28,19
47	11,30	9,43	9,42	27,64
49	10,83	8,37	9,44	13,62
51	11,73	8,43	9,46	28,68
53	12,50	8,00	4,38	29,52
55	12,48	8,18	7,00	14,53
57	13,03	8,64	8,49	13,89
59	12,01	8,58	11,16	28,72
61	11,82	8,35	9,00	28,31
63	12,49	9,10	9,03	27,92
65	13,04	8,58	8,05	26,61
67	12,74	8,52	11,82	31,11
69	4,05	7,82	9,5	31,03
71	5,44	9,71	7,27	31,75
73	6,01	9,99	6,89	31,85
75	6,76	9,35	5,4	32,08
77	5,79	9,11	6,03	31,86
79	4,36	9,82	8,48	20,89
81	4,37	10,06	9,44	31,33
83	3,71	10,18	6,24	30,73
85	4,69	9,62	7,89	31,53
87	5,39	10,24	9,42	31,76
89	6,91	10,02	9,56	32,15
91	6,06	10,29	7,45	31,92
93	5,56	10,45	7,89	31,72
95	4,82	10,51	6,91	31,52
97	5,44	10,51	6,54	31,77
99	6,49	10,34	5,89	32,02

4.1.2 Solfuri, solfati, nitrati, fosfati e clorofilla a

Dalle analisi chimiche dei campioni di acqua abbiamo ottenuto i valori, mostrati in tabella 4, relativi alle concentrazioni di solfuri, solfati, nitrati, fosfati e clorofilla a.

Tabella 4. Concentrazioni di solfuri, solfati, nitrati, fosfati, Chl a

SITO	S2- (mg/L)	SO42- (mg/L)	NO3- (mg/L)	PO43- (mg/L)	chp-a (µg/L)
1	0,001	2400,0	89,7	1,97	14,54
3	0,004	2700,0	146,7	0,80	9,87
5	0,006	2300,0	120,0	3,43	8,07
7	under range	2666,7	183,3	0,87	1,03
9	0,000	2200,0	106,7	0,78	6,19
11	0,001	2300,0	123,3	0,80	3,30
13	under range	2700,0	260,0	1,20	2,16
15	0,001	2800,0	300,0	0,57	3,96
17	0,0067	1900,0	220,0	0,38	0,38
19	0,002	3100,0	276,7	0,87	6,61
21	under range	1700,0	210,0	0,23	24,37
23	0,001	3000,0	96,7	0,82	23,75
25	0,002	2100,0	170,0	0,73	4,08
27	0,0053	2400,0	110,0	0,60	0,27
29	0,003	2100,0	143,3	0,70	14,85
31	0,006	2300,0	173,3	0,70	1,77
33	0	2633,3	246,7	0,49	11,38
35	under range	2300,0	290,0	0,49	2,11
37	0,003333333	2700,0	180,0	0,70	1,92
39	0,0003	2600,0	173,3	2,10	1,85
41	under range	2766,7	136,7	2,20	5,15
43	0,0007	2700,0	100,0	1,43	1,10
45	0,001	2100,0	113,3	0,70	0,19
47	0,000666667	2733,3	163,3	1,13	3,99
49	under range	2100,0	140,0	0,57	14,77
51	under range	2900,0	113,3	2,33	3,86
53	under range	2400,0	170,0	3,00	20,72
55	under range	2200,0	166,7	0,60	0,78
57	0,003	2600,0	136,7	0,67	18,03
59	0,0007	2600,0	123,3	2,97	5,67
61	0,001	2600,0	136,7	2,33	19,07
63	0,003	2600,0	130,0	2,00	2,79
65	0,001	2400,0	163,3	0,37	10,78
67	under range	2100,0	126,7	1,50	2,26
69	0,001	2900,0	150,0	3,10	3,40
71	0,004	2500,0	130,0	2,40	5,66
73	0,003333333	2800,0	153,3	5,33	4,96
75	0,005333333	2800,0	130,0	5,90	3,97
77	0,013666667	2600,0	160,0	3,80	5,39
79	0,003	2500,0	110,0	4,53	27,93
81	0	2500,0	143,3	3,97	32,85
83	0	3300,0	196,7	2,13	4,36
85	0,005	2766,7	120,0	2,50	0,44
87	0,003	3000,0	186,7	2,87	25,82
89	0,006	2600,0	116,7	3,50	18,12
91	under range	3600,0	190,0	3,00	4,27
93	0,000666667	3000,0	190,0	5,90	35,40
95	0,006666667	2900,0	200,0	4,60	7,92
97	under range	2800,0	196,7	4,37	34,35
99	0,001666667	2466,7	126,7	2,97	3,65

I valori di clorofilla a rilevati nei siti campionati sono stati poi riportati in Figura 17.

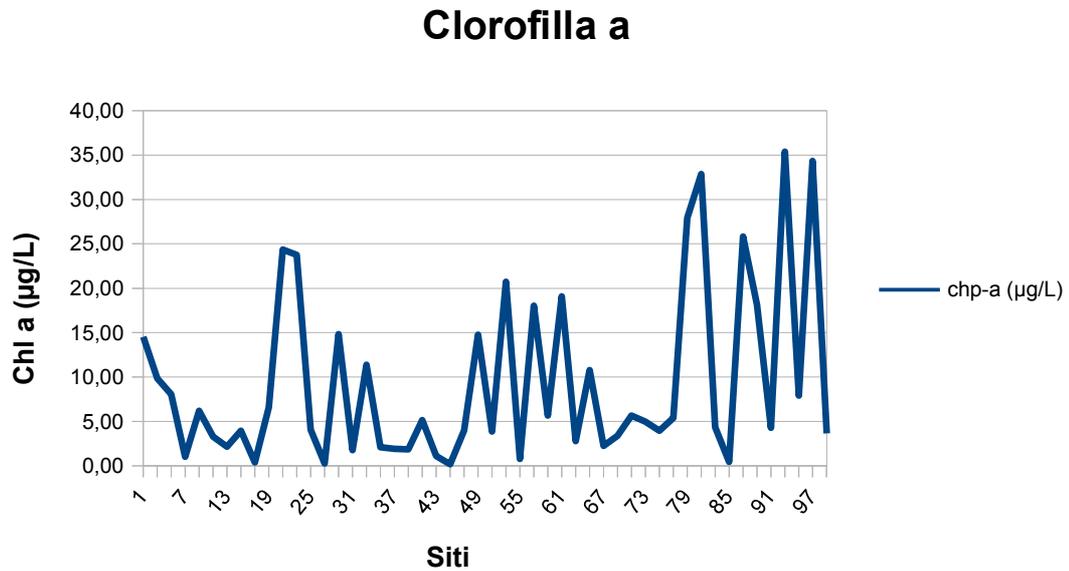


Figura 17. Valori di Clorofilla a nei siti campionati

Come anche le concentrazioni di solfato e fosfato.

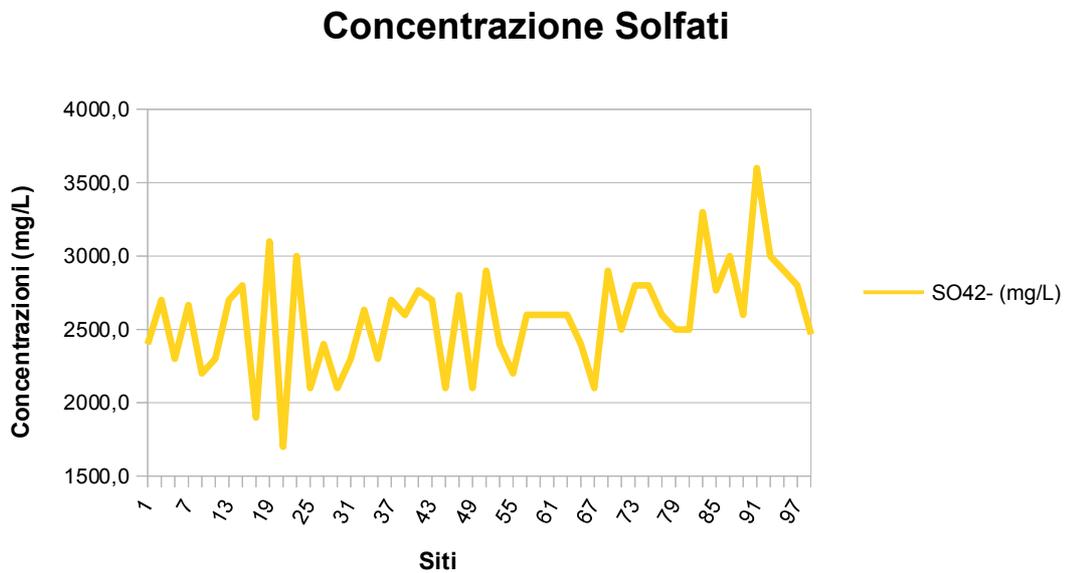


Figura 18. Concentrazioni di Solfato nei siti campionati

Concentrazioni Fosfato

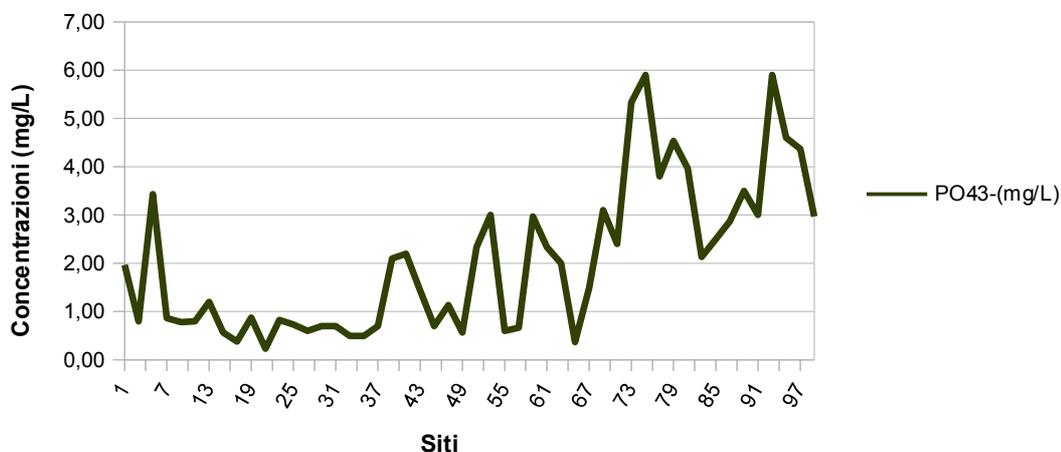


Figura 19. Concentrazioni di Fosfato nei siti campionati

4.2 Risultati relativi all'analisi molecolari dei solfato-riduttori presenti nelle acque e nei sedimenti

4.2.1 Identificazione dei batteri solfato-riduttori

I primer utilizzati in questo studio permettono l'amplificazione di un tratto di DNA di lunghezza pari a circa 1500 paia di basi (bp) per il 16S rDNA e di circa 500 bp per il DsrAB.

Di seguito sono riportati esempi delle immagini ottenute dall'amplificazione selettiva di questi due geni (Figura 20). Questi dati confermano la presenza di batteri (immagine in alto) e di batteri solfato-riduttori (immagine in basso).

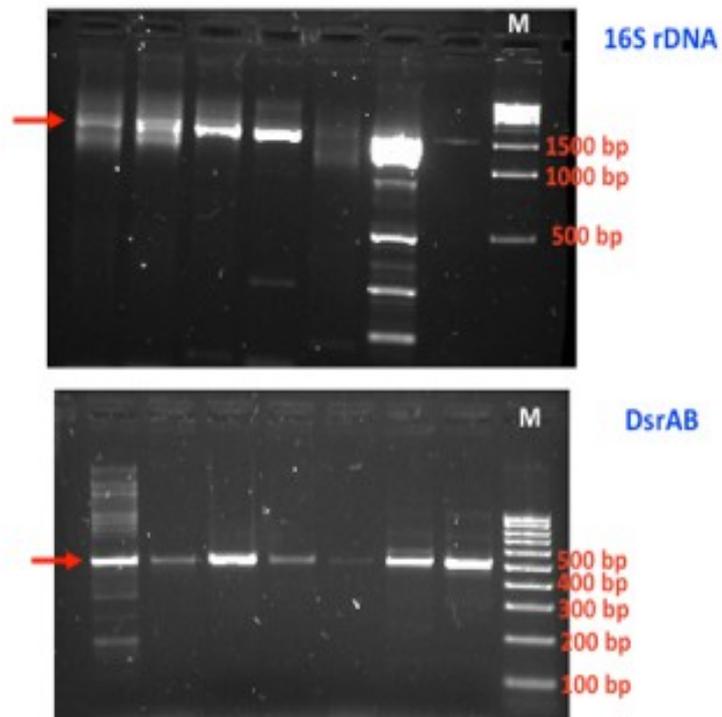


Figura 20. Esempio di visualizzazione dei prodotti dell'amplificazione selettiva del gene 16S rDNA (in alto) e del gene DsrAB (in basso)

I risultati di tutte le amplificazioni sono stati infine riportati in tabella 5. Possiamo osservare quali stazioni di campionamento risultano positive alla presenza di DNA batterico e DNA di solfato-riduttori.

Tabella 5. Campioni di acqua e di sedimento risultati positivi alla presenza di DNA batterico (prime due colonne) e DNA di solfato-riduttori (ultime due)

SITO	DNA batterico (16S UNI)		DNA di solfato-riduttori (dsRA)	
	acqua	sedimento	acqua	sedimento
1	+	+	+	+
3		+		
5		+		+
7		+		
9				
11				
13		+		+
15				
17		+		
19		+		
21		+		
23		+		
25	+			
27				
29				
31				
33	+			
35	+	+		
37		+		+
39	+	+		+
41	+			
43				
45		+		
47				
49				
51		+		
53		+		
55		+		
57		+		
59	+			
61				
63				
65	+			
67		+		
69		+		+
71		+		+
73		+		+
75		+		+
77		+		+
79		+		
81		+		
83		+		+
85		+		+
87		+		
89		+		
91		+		+
93		+		+
95	+	+		+
97	+	+		+
99	+	+		+

Dalla tabella si può osservare come la maggior parte dei campioni di sedimento sono risultati positivi alla presenza di DNA batterico; alcuni di questi campioni presentavano DNA di batteri solfato - riduttori.

Questi risultati sono stati poi riportati su mappa.



Figura 21. Rappresentazione dei sedimenti risultati positivi (cerchi verdi) alla presenza di batteri solfato-riduttori

È possibile osservare che i campioni di sedimento risultati positivi alla presenza di DNA di batteri solfato-riduttori sono localizzati prevalentemente nella parte settentrionale della Pialassa, ad indicare una maggiore attività di riduzione del solfato in questa zona.

4.2.2 Quantificazione relativa dei solfato-riduttori nei campioni positivi

I campioni di sedimento risultati positivi alla presenza di DNA di solfato-riduttori sono stati impiegati per svolgere una valutazione semi-quantitativa dei livelli di questi batteri presenti mediante la stima del contenuto di eDNA codificante per il gene *dsrAB* (Figura 22). Il campione prelevato al sito 1 è stato utilizzato come riferimento per la normalizzazione dei risultati.

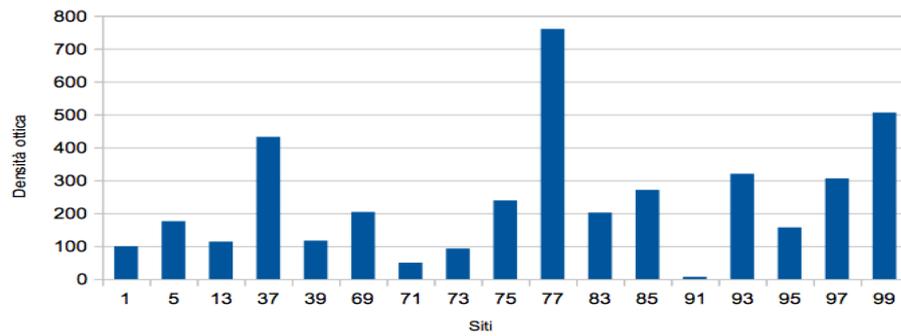


Figura 22. Quantità relativa (OD/OD Sito 1)

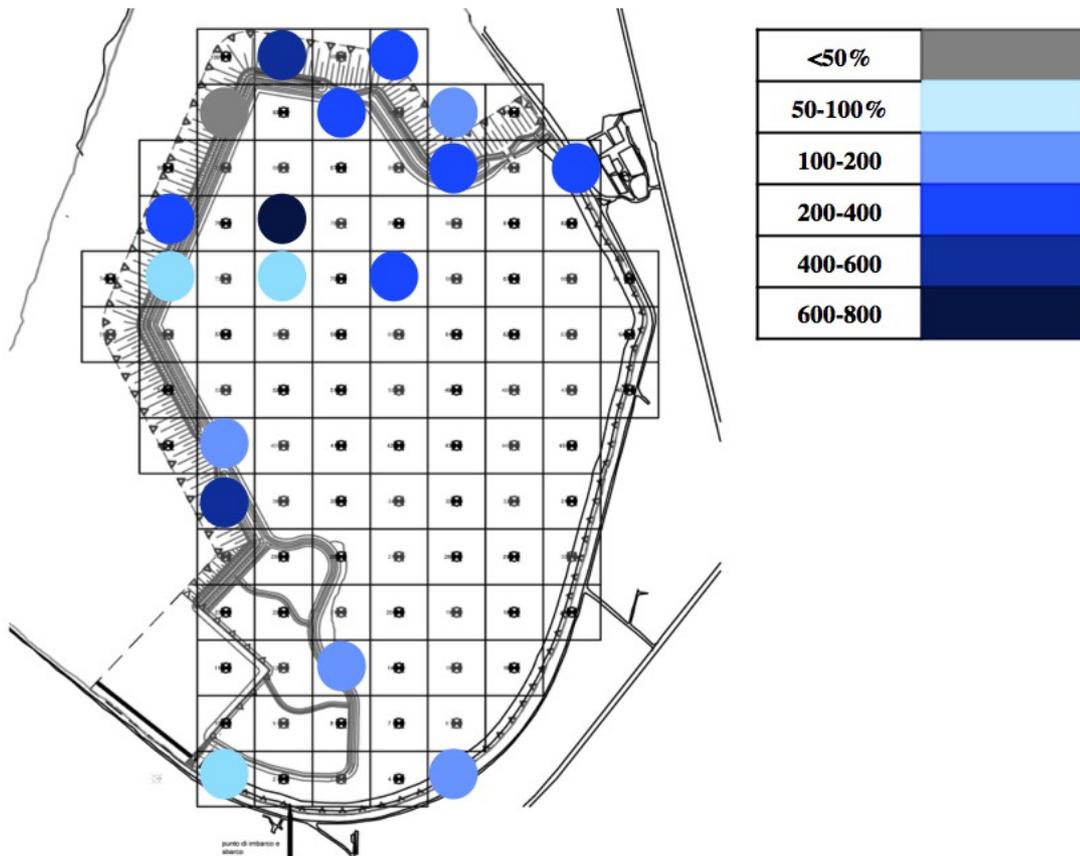


Figura 23. Quantificazione relativa batteri solfato-riduttori

In questa mappa i diversi colori indicano la quantità relativa dei batteri solfato-riduttori rispetto al campione 1. La quantità relativa è variabile, non è infatti possibile osservare un chiaro andamento spaziale.

CAPITOLO 5

Discussione

La tabella 3 riporta le misure dei principali parametri chimico-fisici che sono stati misurati al momento del campionamento. La temperatura dell'acqua è un fattore chiave dello stato delle acque marino-costiere, si tratta di uno dei principali regolatori dei processi vitali che si svolgono nelle acque. I valori di temperatura sono più o meno costanti in tutti i punti di campionamento, soltanto gli ultimi, dal sito 69 al 99, presentano una forte riduzione di tale parametro. Questo è sicuramente dovuto al fatto che queste stazioni sono state campionate ad una distanza temporale di qualche giorno, periodo in cui si è verificato un forte calo della temperatura. I valori di pH non mostrano particolari oscillazioni, così anche la salinità. Quest'ultimo parametro presenta valori più bassi di quelli tipici dell'acqua marina, oscilla infatti tra 27 e 32 psu; mentre in alcune stazioni la salinità è molto più bassa (circa 13 psu). La Pialassa dei Piomboni è infatti una laguna costiera, di acqua salmastra, che riceve diverse immissioni di acqua dolce, attraverso le piogge e i diversi scarichi.

Altro importante parametro è la concentrazione di ossigeno. L'ossigeno disciolto è vitale per l'esistenza della maggior parte degli organismi acquatici. Esso regola tutti i processi ossido-riduttivi presenti nelle acque e viene utilizzato dai microrganismi eterotrofi per degradare la sostanza organica. La concentrazione di ossigeno disciolto in un ambiente acquatico è un importante indicatore della qualità dell'acqua. I principali fattori influenzanti la quantità di ossigeno disciolto sono: salinità, temperatura, attività fotosintetica, percentuale di ossigeno atmosferico e presenza di sostanze organiche biodegradabili. A causa dell'attività dei vegetali, il livello di ossigeno disciolto può fluttuare durante il giorno, crescendo durante le ore mattutine e raggiungendo un picco nel pomeriggio. Di notte la fotosintesi cessa, ma tutti gli organismi continuano a respirare, causando un decremento del livello di ossigeno disciolto. La temperatura è un fattore chiave per ciò che riguarda la capacità dell'ossigeno di sciogliersi in acqua, poiché l'ossigeno, come tutti i gas, possiede valori differenti di solubilità al variare della temperatura. L'ossigeno si scioglie più facilmente in acqua fredda piuttosto che in quella calda. Le attività dell'uomo, come la deforestazione lungo i corsi d'acqua o lo scarico di acque calde utilizzate nei processi industriali, possono causare un incremento della temperatura dell'acqua determinando un impoverimento della quantità di ossigeno disciolto. Nel nostro studio si possono osservare delle lievi oscillazioni di questo parametro che però risulta mantenersi a valori medi di circa 8 ppm.

In tutti i campioni di acqua prelevati dai siti analizzati per gli scopi di questa Tesi non sono stati rilevati livelli misurabili di solfuri, mentre le concentrazioni di solfato oscillano intorno al valore di 2.700 mg/l, concentrazioni tipiche dell'acqua di mare. Questo elemento non risulta essere limitante per i batteri solfato-riduttori che possono quindi svilupparsi in queste acque. Inoltre, come evidenziato dalla Figura 18, i livelli di solfati tendono lievemente ad aumentare andando dalla parte meridionale alla parte settentrionale della Pialassa dei Piomboni. L'assenza di solfuri disciolti nelle acque è indice di mancanza di una significativa attività solfobatterica, anche se i valori relativamente elevati di solfati nella parte settentrionale della Pialassa porta ad identificare questa area come potenzialmente soggetta alla presenza di tale fenomeno in condizioni ambientali favorevoli (alte temperature, elevati apporti di materia organica, scarsa circolazione di acqua).

I dati circa le concentrazioni di nitrati e fosfati, permettono di avere un quadro sullo stato trofico della laguna. Lo stato trofico designa il livello di produzione primaria sostenuto dalla disponibilità di nutrienti in forma assimilabile dagli organismi autotrofi. I livelli di nutrienti analizzati risultano molto variabili (Tabella 4), ma comunque è possibile osservare un andamento crescente Sud-Nord dei livelli di fosfati (Figura 19).

La concentrazione di clorofilla *a* viene utilizzata per stimare indirettamente la biomassa fitoplanctonica. Essa rappresenta un efficace indicatore della produttività del sistema e dell'instaurarsi di condizioni eutrofiche. Come è mostrato in Figura 17, sono state registrate forti oscillazioni di questo parametro con valori molto bassi (prossimi a zero, ad esempio 0,27 µg/L sito 27) in alcuni siti, ma anche picchi estremamente alti soprattutto nei siti settentrionali della Pialassa (siti 81,87,93,97) dove raggiunge anche valori di 35,40 µg/L (sito 93). L'area settentrionale della Pialassa è, pertanto, da ritenere maggiormente soggetta a fenomeni di eutrofizzazione e di deterioramento della qualità delle acque nelle condizioni stagionali che favoriscono tali fenomeni.

Queste osservazioni sono state anche confermate dalle analisi molecolari (Figura 20) che hanno permesso di identificare i siti interessati dalla presenza di batteri solfato-riduttori. Le analisi sono state condotte applicando le moderne tecnologie biomolecolari che prevedono l'amplificazione selettiva tramite PCR di tratti genici esclusivi del genoma batterico partendo dal DNA estratto dalle diverse matrici ambientali. Quest'approccio è altamente specifico, selettivo, relativamente rapido, e con prestazioni

superiori ai classici metodi di coltura microbiologica. In particolare, la presenza di DNA dei solfato-riduttori è stata rilevata mediante l'amplificazione del gene codificante l'enzima solfito reduttasi (DsrAB); questo enzima svolge un ruolo chiave nel processo biochimico riduzione dei solfati, ed è quindi considerato un ottimo marker per la presenza di solfato-riduttori (Mori Y. et al. 2010).

In tabella 5 è possibile osservare quali campioni di acqua e di sedimento sono risultati positivi alla presenza di DNA batterico e di DNA di solfato-riduttori. I campioni di acqua non presentano particolari criticità, c'è infatti una scarsa presenza di DNA batterico nei campioni esaminati, come evidenziato dalle analisi preliminari relative all'amplificazione del gene 16S rDNA, per il quale sono risultati positivi 11 campioni sui 50 analizzati. Inoltre, solo il campione 1 è risultato positivo alla presenza di DNA di batteri solfato-riduttori. La positività in questo primo campione di acqua è forse dovuta al campionamento: essendo stato prelevato in una parte poco profonda del bacino, di pochi centimetri, si è probabilmente verificata una risospensione di sedimento contenente solfato-riduttori. Infatti, nessun altro campione di acqua è risultato positivo. Invece, per quanto riguarda i sedimenti, 34 campioni sui 50 analizzati sono risultati positivi alla presenza di DNA batterico, e di questi 17 sono risultati positivi alla presenza di DNA di solfato-riduttori.

I batteri solfato riduttori sono i principali responsabili della produzione e dell'accumulo di H₂S negli ambienti marini costieri caratterizzati da livelli elevati di solfati e da accumuli di materia organica nei sedimenti come conseguenza di svariate attività antropiche, come ad esempio l'acquacoltura, la presenza di scarichi urbani, ecc. La presenza di questi batteri è, pertanto, indice di una scarsa qualità ambientale. Questi batteri vivono in ambienti ipo-ossici, e riducono i solfati naturalmente presenti nelle acque a H₂S degradando più del 50% della materia organica presente nei sedimenti degli ambienti di transizione. L'H₂S è tossico per le piante acquatiche, per i pesci, e per l'uomo, e la sua presenza in ambiente è causa dello sviluppo di cattivi odori, in particolare il caratteristico odore di "uovo marcio". Lo sviluppo di colorazioni e odori anomali che avviene periodicamente nella Pialassa dei Piomboni ha fatto sorgere la necessità di verificare la eventuale presenza di questi batteri nelle acque e/o nei sedimenti; i quali, in condizioni di marcata stratificazione della colonna d'acqua come quelle che si possono verificare nel stagione estiva, possono portare ad un marcato

aumento del rilascio di H₂S nella colonna d'acqua con conseguente sviluppo dei cattivi odori.

La distribuzione spaziale di questi 17 campioni positivi, riportata nella mappa in Figura 21. Questa mappa evidenzia come la maggioranza dei siti interessati dalla presenza di solfato-riduttori nei sedimenti siano localizzati nella parte occidentale e settentrionale della Pialassa dei Piomboni. Queste aree della Pialassa sono, pertanto, da ritenere maggiormente soggette al rischio di aumentati dei livelli di H₂S nell'acqua e allo sviluppo di cattivi odori nelle condizioni stagionali che favoriscono l'aumento dell'attività batterica o a seguito variazioni del regime d'acqua dovute ad interventi idraulici che eventualmente determinino una scarsa circolazione.

Dalle analisi relative alla quantificazione dei batteri solfato-riduttori non è invece emersa un chiaro andamento spaziale. Come è possibile osservare in Figura 23, la quantità relativa di questi batteri nei siti risultati positivi è risultata variabile.

CAPITOLO 6

Valutazioni finali

Il presente studio ha dimostrato la presenza dei batteri solfato-riduttori nella laguna costiera Pialassa dei Piomboni nei mesi di Novembre-Dicembre. Come già anticipato nel capitolo 2, si tratta di batteri che normalmente si sviluppano in estate, periodo dell'anno in cui si verificano aumenti della temperatura, ristagni dell'acqua e conseguenti fenomeni anossici nei fondali. Il fatto di ritrovare questi batteri in inverno, fa supporre che la zona sia fortemente soggetta a stratificazioni occasionali. I motivi di ciò non sono stati dimostrati ma sono probabilmente legati ad un insieme di fattori quali ad esempio la configurazione stessa della laguna. Essendo infatti una zona collegata al mare solo da uno stretto canale, il Candiano, è facile che si verificano crisi anossiche in quanto lo scarso rimescolamento delle acque fa sì che i fondali non vengano riforniti dell'ossigeno che è stato utilizzato per la degradazione del materiale organico. Questo porta al suo completo consumo e quindi al diffondersi di batteri anaerobi in grado di degradare la materia organica in un ambiente anossico. Bisogna però sottolineare che, anche fattori di pressione quali ad esempio l'immissione, protrattasi per anni, di acque di pessima qualità sia di provenienza industriale che agricola, possono determinare eventi di questo tipo. Nonostante gli interventi di depurazione degli scarichi e di miglioramento delle acque che entrano in laguna abbiano portato sostanziali benefici al sistema delle zone umide salmastre, permangono numerosi fattori di criticità legati all'eccessiva presenza antropica. Le zone della laguna, che maggiormente risentono di questi scarichi, sono risultate essere, dalle analisi svolte, la zona più a nord e tutta la zona ad ovest; in effetti, come si può osservare dalle mappe riportate nel capitolo 1, si tratta della zona portuale ed industriale. Dalle analisi svolte nel presente lavoro di Tesi, le zone della laguna che maggiormente risentono di questi scarichi sono risultate essere l'area di nord-ovest; in effetti, come si può osservare dalle mappe riportate nel capitolo 1, si tratta della zona portuale ed industriale.

L'insieme di diverse fonti di impatto antropico unitamente alle caratteristiche idrodinamiche e morfologiche della Pialassa porterebbe a creare un ambiente fortemente deteriorato che necessita un costante monitoraggio e nuovi interventi di protezione e mitigazione degli impatti. Bisogna, infatti, considerare che queste condizioni potrebbero inaspriarsi nel periodo estivo rendendo la zona impraticabile dal punto di vista delle attività antropiche ma anche particolarmente pericolosa per tutti gli organismi qui presenti. La liberazione di idrogeno solforato a seguito della degradazione

anaerobica della sostanza organica ad opera dei batteri solfato-riduttori potrebbe portare ad una drastica riduzione della biodiversità, non permettendo più a diverse specie di uccelli di nidificare in questi ambienti e ad altre numerose specie di pesci ed invertebrati di trovare rifugio e cibo. Si arriverebbe quindi ad una semplificazione delle reti trofiche e alla completa degradazione dell'area.

Interventi gestionali potrebbero essere incentrati sulla riduzione dei diversi scarichi agricoli, industriali e portuali. La quantità di nutrienti ed inquinanti che entrano nella Pialassa sarebbero così contenuti, permettendo un ripristino di questo sensibile sistema lagunare. Si potrebbe poi procedere ad interventi, anche di tipo ingegneristico, che promuovono una maggiore circolazione delle acque. Questo permetterebbe, anche e soprattutto nel periodo estivo, un maggiore rimescolamento, e quindi porterebbe ad una riduzione di eventi di anossia dei fondali, allo sviluppo di solfato-riduttori e alla conseguente liberazione di idrogeno solforato, composto che abbiamo visto essere tossico per tutti gli organismi.

Queste ovviamente sono solo valutazioni e suggerimenti volti alla protezione e al miglioramento delle condizioni di questo sistema. Ciò che invece deve precedere qualsiasi intervento che si voglia realizzare, è il riconoscimento del valore importantissimo che hanno le zone umide costiere. Senza questa consapevolezza e sensibilità gli interventi gestionali saranno sempre mirati al raggiungimento di interessi economici e non di protezione e conservazione dell'ambiente.

Bibliografia

Al-Raei AM, Bosselmann K, Böttcher ME, Hespeneide B e Tauber F (2009). Seasonal dynamics of microbial sulfate reduction in temperate intertidal surface sediments: controls by temperature and organic matter. *Ocean Dynamics* 59:351-370.

Alongi DM (1994) The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. *Hydrobiologia* 285:19-32

Alongi DM (1998). *Coastal Ecosystem Processes*. CRC Press, Boca Raton.

Anderson DM, Gilbert PM, e Burkholder JM (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries and Coasts* 25(4):704-746.

Andrew WB Johnston, Jonathan D. Todd, e Andrew R. J. Curson (2013). *Microbial Origins and Consequences of Dimethyl Sulfide*

Anthony A, Atwood J, August P, Byron C e altri (2009). Coastal lagoons and climate change: ecological and social ramifications in U.S. Atlantic and Gulf coast ecosystems. *Ecol Soc* 14:8.

Appunti del corso “Microbiologia marina e cicli biogeochimici” del docente Borghese Roberto Università di Bologna.

Arrigo KR (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437:349-355.

Azam F, Fenchel T, Fiel JG, Gray JS, Meyer-Reil LA e Thingstad F (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257-263.

Azam F e Malfatti F (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Rev. Microbiol.* 5:782-791

Bacci G (1954) Alcuni rilievi sulla fauna di acque salmastre. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli* 25, 380±396.

Bandini R (1994-1995). Caratterizzazione ambientale della Pialassa Piombone. Tesi di laurea magistrale Scienze Ambientali – Indirizzo marino. Università di Bologna in Ravenna.

Barbieri P, Bestetti G, Galli E, Zannoni D (2007). *Microbiologia ambientale ed elementi di ecologia microbica*. Casa editrice Ambrosiana, Milano, pp. 97-103.

Barnes RSK (1980). *Coastal Lagoons*. Cambridge University Press, Cambridge.

Barnes RSK (1991). European estuaries and lagoons, a personal overview of problems and possibilities for conservation and management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Eco- systems* 1, 79±87.

Barton LL e Fauque GD (2009). Chapter 2: Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria. *Advances in Applied Microbiology* 68: 41-98.

Barton LL e Tomei FA (1995). Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. In “*Biotechnology Handbooks. Vol. 8, Sulfate-Reducing Bacteria*” (L. L. Barton, Ed.), pp. 1–23. Plenum Press, New York.

Beer NA, Joyce CB (2013). North Atlantic coastal lagoons: conservation, management and research challenges in the twenty-first century. *Hydrobiologia* 701:1-11.

Berner RA (1980). *Early diagenesis: A theoretical approach*. Princeton University Press.

Bianchi CN (1988). Caratterizzazione bionomica delle lagune costiere italiane. *Acqua Aria* 4:15–20.

Bondesan M (1990). Le zone umide salmastre dell'Emilia-Romagna: aspetti geografici e morfologici. Da aspetti naturalistici delle zone umide salmastre dell'Emilia-Romagna. Regione Emilia-Romagna.

Bird ECF (1994). Chapter 2. Physical setting and geomorphology of coastal lagoons. pp 9-40 in B. Kjerfve, editor. *Coastal lagoon processes*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Burdige D (2006). *Geochemistry of Marine Sediments*, Princeton University Press, 2006.

Cappenberg TE (1975). Relationships between sulfate-reducing and methane-producing bacteria. *Plant and Soil* 43:125-139.

Cappenberg TE e Prins RA (1974). Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria. Experiments with ¹⁴C labelled substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 40:457-469.

Carrara C e Fresi E (1988). Le lagune salmastre costiere. Alcune riflessioni sui metodi e sui problemi. In: *Le lagune costiere. Ricerca e gestione*. G.C. Carda, F.Cicogna e E. Fresi (Editors). CLEM, Massa Lubrense (Napoli): 35-56.

Castro HF, Williams NH e Ogram A (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:1–9.

Charlson RJ et al. (1987) Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* 326, 655–661.

Cognetti G (1994) Colonization of brackish waters. *Marine Pollution Bulletin* 28, 583±586.

Cognetti G, Maltagliati F (2000). Biodiversity and adaptive mechanisms in brackish water fauna. *Marine Pollution Bulletin*, 1(40): 7-14.

Cognetti G, Sarà M, Magazzù G (2008). *Biologia marina*. editore Edagricole – Calderini. Pp 606.

Conley DJ, Carstensen J, Aertebjerg G, Christensen PB, Dalsgaard T, Hansen JLS e Josefson A.B. (2007). Long-term changes and impacts of hypoxia in Danish coastal waters. *Ecological Applications* 17(sp5):S165-S184.

D'Avanzo C e Kremer DWR (1994). Diel oxygen dynamics and anoxic events in an eutrophic estuary of Waquoit Bay, Massachusetts. *Estuaries* 17:131-139.

Day JW et al. (2008b). Consequences of climate change on the ecogeomorphology of coastal wetlands. *Estuaries and Coasts* 31: 477-491.

Diaz R (2001). Overview of hypoxia around the world, *J. Environ. Qual.* 30: 275-281.

Diaz RJ e Rosenberg R (1995). Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna, London, *Ann. Rev. Ocean. Mar. Biol.*, 33:245-303.

Diaz RJ e Rosenberg R (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems, *Science*, 321:926–929.

Elliott M, Quintino V (2007) The estuarine quality paradox, environmental homeostasis and the difficulty of detecting anthropogenic stress in naturally stressed areas. *Mar Pollut Bull* 54(6): 640 – 645.

Erwin KL (2009). Wetlands and global climate change: the role of wetland restoration in a changing world. *Wetlands Ecology and Management* 17(1): 71 – 84.

Ewel KC, Cressa C, Kneib RT, Lake PS, Levin LA, Palmer MA, Snelgrove P, Wall DH (2001). Managing critical transition zones. *Ecosystems* 4:452-60.

European Union (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy. Official Journal L 327.

FAO (1979). Development of Coastal Aquaculture in the Mediterranean Region. Report of a Mission to Formulate a Cooperative Programme of Activities, October 1978–February 1979.

Fauque GD (1995). Ecology of sulfate-reducing bacteria. In “Biotechnology Handbooks. Vol. 8, Sulfate-Reducing Bacteria” (L. L. Barton, Ed.), pp. 217-241. Plenum Press, New York.

Farber S, Costanza R (1987). The economic value of wetlands system. *Journal of Environmental Management* 24(1):41-51.

Fauque G, LeGall J, e Barton LL (1991). Sulfate-reducing and sulfur-reducing Bacteria. In “Variations in Autotrophic Life” (J.M. Shively and L.L. Barton, Eds.), pp. 271-337. Academic Press Limited, London.

Fauque G e Ollivier B (2004). Anaerobes: The sulfate-reducing bacteria as an example of metabolic diversity. In “Microbial Diversity and Bioprospecting” (A. T. Bull, Ed.), pp. 169-176. ASM Press, Washington, DC.

Faure G (1991). The sulfur cycle. In *Principles and Applications of Inorganic Geochemistry*. New York, MacMillan. pp 519-521.

Franco A, Elliott M, Torricelli P (2007). Preface: Biodiversity and ecosystem functioning in coastal and transitional waters. *Estuarine, coastal and shelf science* 75:1-3.

Froelich PN, Klinkhammer GP, Bender ML (1979). Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43, 1075-1090.

Gamito S, Gilabert J, Marcos C, Pérez-Ruzafa A (2005) Effects of changing environmental conditions on lagoon ecology. In: Gönenç IE, Wolflin JP (eds) *Coastal lagoons: Ecosystem processes and modeling for sustainable use and development*. CRC, Boca Ratón, pp 193-229.

Gavel OY, Bursakov SA, Calvete JJ, George GN, Moura JIG e Moura I (1998). ATP sulfurylases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. A novel metalloprotein containing cobalt and zinc. *Biochemistry* 37:16225-16232.

Gibson GR (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 69:769-797.

Goldhaber B e Kaplan R (1974). The sulfur cycle. In *The Sea-Ideas and Observations on Progress in the Study of Seas*. ed. Goldberg, E.D. pp. 569-655. New York: Interscience.

Gönenç IE e Wolflin JP (2005). *Coastal lagoons: ecosystem processes and modeling for sustainable use and development*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Gray JS WuRSS, OrYY (2002) Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Mar Ecol Prog Ser* 238:249–279.

Greenson PE, Clark JR, Clark JE (1979). *Wetland Functions and Values: The State of Our Understanding*. Minneapolis, MN: Am. Water Resour. Assoc.

Guelorget O, Perthuisot JP (1992). Paralic Ecosystems. Biological organization and functioning - *Vie Milieu*, 42 (2): 215-251.

Hadas O e Pinkas R (1992). Sulfate-reduction process in sediments of Lake Kinneret, Israel. *Hydrologia* 235/236: 295-301.

Hamilton P e Macdonald KB (1980). *Estuarine and Wetland Processes*. Plenum Press, Inc., New York, 653 pp.

Hedges JJ e Keil RG (1995). Sedimentary Organic-Matter Preservation – an Assessment and Speculative Synthesis, *Mar. Chem.*, 49:81–115.

Holling CS (1973). Resilience and stability of ecological systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 4: 1–23.

Holmer M, e Kristensen E (1996). Seasonality of sulfate reduction and pore water solutes in a marine fish farm sediment: the importance of temperature and sedimentary organic matter. *Biogeochemistry* 32:15–39.

Intergovernmental Panel on Climate Change (2007). Summary for policy makers. In S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor, and H. L. Miller, editors. *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Ishimoto M e Fujimoto D (1959). Adenosine-5'-phosphosulfate as an intermediate in the reduction of sulfate by a sulfate-reducing bacterium. *Proc. Japan Acad.* 35:243-245.

Ishimoto M e Fujimoto D (1961). Sulfate-reducing bacteria. Adenosine-5'-phosphosulfate reductase. *J. Biochem. (Tokyo)* 50:299-304.

Joos F, Plattner GK, Stocker TF, Körtzinger A e Wallace DWR (2003). Trends in marine dissolved oxygen: implications for ocean circulation changes and the carbon budget. *Eos, Transactions, American Geophysical Union* 84 (21):197-207.

Jørgensen BB (1977). Sulphur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark), *Limnol. Oceanogr.* 22: 814 – 832.

Jørgensen BB (1982). Mineralization of organic matter in the seabed the role of sulphate reduction. *Nature Lond.* 296: 643-645.

Jørgensen BB (1982b). Ecology of the bacteria of the sulfur cycle with special reference to anoxic-oxic interphase environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B.* 298: 543 – 561.

Jørgensen BB (2006). Bacteria and marine biogeochemistry, edited by: Shulz, H. D. and Zabel, M., *Mar. Geochem.*, 169–206.

Jørgensen BB e Fenchelt M (1974). The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Marine Biology* 24: 189 – 201.

Kapetsky JM (1984). Coastal lagoon fisheries around the world: some perspectives on fishery yields, and other comparative fishery characteristics. In: Kapetsky, J.M., Lasserre, G. (Eds.), *Management of Coastal Lagoon Fisheries. FAO Studies and Reviews, GFCM No. 61.* FAO, Rome, pp. 97-139.

Kapetsky JM, Lasserre G (1984). Management of Coastal Lagoon Fisheries, *Studies Review GFCM* 61(2):439–776.

Kawahara N, Shigematsu K, Miura S, Miyadai T e Kondo R (2008). Distribution of sulfate-reducing bacteria in fish farm sediments on the coast of southern Fukui Prefecture, Japan. *Plankton Benthos Res.* 3:42–45.

Kerr JL, Baldwin DS, Whitworth KL (2013). Options for managing hypoxic blackwater events in river systems: A review. *Journal of Environmental Management*. 114 p. 139.

Kjerfve B (1994). *Coastal Lagoon Processes*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 577 pp.

Knoppers B (1994). Aquatic primary production in coastal lagoons. pp 243–286 in B. Kjerfve, editor. *Coastal Lagoon Processes*. Elsevier, Amsterdam.

Kondo R, Mori Y e Sakami T (2012). Comparison of Sulphate-reducing Bacterial Communities in Japanese Fish Farm Sediments with Different Levels of Organic Enrichment. *Microbes Environ*. Vol. 27(2):193–199.

Kusler J, Brinson M, Niering W, Patterson J, Burkett V, Willard D (1999) *Wetlands and climate change: scientific knowledge and management options*. White Paper Institute for Wetland Science and Public Policy. Association of Wetland Managers/Wetland International, Berne.

Lampreia J, Pereira AS e Moura JJG (1994). Adenylylsulfate reductases from sulfate-reducing bacteria. In “*Methods in Enzymology*” (H. D. Peck, Jr. and J. LeGall, Eds.), Vol. 243, *Inorganic Microbial Sulfur Metabolism*. pp. 241–260. Academic Press, San Diego.

Lardicci C, Como S, Corti S, Rossi F (2001). Recovery of the macrozoobenthic community after severe dystrophic crises in a mediterranean coastal lagoon (Orbetello, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 42(3): 202-214.

Lardicci C, Rossi F e Castelli A (1997) Analysis of macrozoobenthic community structure after severe dystrophic crises in a Mediterranean coastal lagoon. *Marine Pollution Bulletin* 34: 536 ± 547.

LeGall J e Fauque G (1988). Dissimilatory reduction of sulfur compounds. In “Biology of Anaerobic Microorganisms” (A. J. B. Zehnder, Ed.), pp. 587-639. Wiley, New York.

Legall J Postgate JR (1973). The physiology of sulphate-reducing bacteria. *Advanced Microbial Physiology* 10:81-133.

Levin LA, Boesch DF, Covich A (2001) The Function of Marine Critical Transition Zones and the Importance of Sediment Biodiversity. *Ecosystems* 4: 430-451

Levin LA, Ekau W, Gooday AJ, Jorissen F, Middelburg JJ, Naqvi W, Neira C, Rabalais NN, e Zhang J (2009). Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos, *Biogeosciences Discuss* 6:3563-3654.

Lloret J, Marín A e Marín-Guirao L (2008). Is coastal lagoon eutrophication likely to be aggravated by global climate change? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 78(2):403-412.

Lovelock JE et al. (1972) Atmospheric sulphur and the natural sulphur cycle. *Nature* 237, 452-453.

Luptakova A (2007). Importance of sulphate-reducing bacteria in environment. *Nova Biotechnologica* VII-I.

Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP (2012). *Brock biologia dei microrganismi* vol.1, Pearson Education Italia, 1° edizione, pp. 409.

Meyer B, Kuever J (2007a) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* 153:2026-2044

Middelburg JJ e Levin LA (2009). Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry. *Biogeosciences*, 6:1273-1293.

Middelburg JJ, Soetaert K, Herman PMJ, Heip CHR (1996). Denitrification in marine sediments: A model study. *Global Biogeochemical Cycles* 10, 661–673.

Miller CB (2004) Habitat determinants of primary production in the sea. In: Miller CB (ed) *Biological oceanography*. Blackwell Publishing 46-68

Mistri M (2002). Persistence of benthic communities: a case study from the Valli di Comacchio, a Northern Adriatic lagoonal ecosystem (Italy). *ICES Journal of Marine Science*, 59: 314–322.

Mitsch WJ e Gosselink JG (2000). *Wetlands*, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 920 pp.

Mori Y, Purdy KJ, Oakley BB, Kondo R (2010). Comprehensive detection of phototrophic sulfur bacteria using PCR primers that target reverse dissimilatory sulfite reductase gene. *Microbes Environ.* 25(3):190-6.

Muyzer G, e Stams AJM (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:441–454.

Nagata T (2008) Organic matter-bacteria interactions in seawater. In: *Microbial ecology of the oceans*, second edition (Kirchman DL ed) John Wiley & Sons, pp 207-242.

Nichols MM e Boon JD (1994). Chapter 7. Sediment transport processes in coastal lagoons. Pages 157-219 in B. Kjerfve, editor. *Coastal lagoon processes*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Nixon SW (1982). Nutrient dynamics, primary production and fisheries yields of lagoons. Pages 357-371 in P. Lasserre and H. Postma, editors. Coastal lagoons: proceedings of the International Symposium on Coastal Lagoons (Bordeaux, France, 1981). *Oceanologica Acta* 4 (Supplement). Gauthier- Villars, Paris, France.

Nixon SW (1995). Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41:199-219.

Odom JM, Rivers Singleton JR (1993). *The Sulfate-reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*, Springer-Verlag, New York.

Oremland RS e Polcin S (1982). Methanogenesis and sulphate reduction: competitive and non competitive substrates in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 127G 1276.

Oremland RS e Taylor BF (1978). Sulfate reduction and methanogenesis in marine sediments. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 42,209-214.

Pauly D, Yáñez-Arancibia A (1994). Chapter 12. Coastal lagoons as fish habitat ??? Fisheries in coastal lagoons. In: Kjerfve, B. (Ed.), *Coastal Lagoon Processes*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 377 e 399.

Peck HD, Jr. (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn.). (1961). Enzymatic basis for assimilatory and dissimilatory sulfate reduction. *J. Bacteriol.* 82: 933–939.

Pérez-Ruzafa A, Marcos C (2005). Pressures on Mediterranean coastal lagoons as a consequence of human activities. In: Fletcher, C., Spencer, T., Da Mosto, J., Campostrini, P. (Eds.), *Flooding and Environmental Challenges for Venice and its Lagoon: State of Knowledge*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 545– 555.

Pérez-Ruzafa A, Fernández AI, Marcos C, Gilabert J, Quispe JI, García-Charton JA (2005a). Spatial and temporal variations of hydrological conditions, nutrients and chlorophyll a in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, Spain). *Hydrobiologia* 550: 11-27.

Pérez-Ruzafa A, Marcos C (2012). Fisheries in coastal lagoons: An assumed but poorly researched aspect of the ecology and functioning of coastal lagoons. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Volume 110, p. 15-31.

Pérez-Ruzafa A, Marcos C, Pérez-Ruzafa IM (2011b). Mediterranean coastal lagoons in an ecosystem and aquatic resources management context. *Physics and Chemistry of the Earth* 36:160-166. Doi:10.1016/j.pce.2010.04.013.

Pérez-Ruzafa A, Marcos C, Pérez-Ruzafa IM, Pérez-Marcos M (2011a). Coastal lagoons: “transitional ecosystems” between transitional and coastal waters. *Journal for Coastal Conservation* 15(3):369-392.

Pérez-Ruzafa A, Mompeán MC, Marcos C (2007a). Hydrographic, geomorphologic and fish assemblage relationships in coastal lagoons. *Hydrobiologia* 577:107-125.

Pfenning N e Widdel F (1982). The bacteria of the sulphur cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 298:433-441.

Pfenning N, Widdel F e Trüper HG (1981). The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria* ed. Starr, M.P., Stolp, H., Triiper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G. pp. 926-940. Berlin: Springer-Verlag.

Phleger FB (1981). A review of some general features of coastal lagoons. Pages 7-14 in *Coastal lagoon research, present and future: proceedings of a seminar*. UNESCO Technical Papers in Marine Science 33. United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization, Paris, France.

Piano Territoriale della Stazione “Pineta San Vitale e Pialasse di Ravenna”.

Pickett STA e White PS (1985). The ecology of natural disturbance and patch dynamics. Academic Press, New York. 472 pp.

Pihl L, Baden SP, Diaz RJ (1991). Effects of periodic hypoxia on distribution of demersal fish and crustaceans. *Mar Biol* 108:349-360.

Pinto R, Patricio J, Baeta A, Fath BD, Neto JM, Marques JC (2008). Review and evaluation of estuarine biotic indices to assess benthic condition. *Ecological Indicators*. *Ecological Indicators* 9, 1; 1-25.

Pollard PC e Moriarty DJW (1991). Organic carbon decomposition, primary and bacterial productivity and sulphate reduction, in tropical seagrass beds of the Gulf of Carpentaria, Australia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69: 149-159.

Postgate JR (1965). Recent advances in the study of sulphate-reducing bacteria. *Bacteriological Reviews* 29:425-441.

Postgate JR (1984). *The Sulphate-Reducing Bacteria* 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Purdy KJ, Embley TM e Nedwell DB (2002). The distribution and activity of sulphate reducing bacteria in estuarine and coastal marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 181-187.

Rabus R, Hansen TA e Widdel F (2006). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In “The Prokaryotes” (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt, Eds.), Vol. 2, *Ecophysiology and Biochemistry*. pp. 659–768. Springer, Berlin.

Remane A (1940) Einführung in die Zoologische Ökologia der Nord u. Ostsee. Die Tierwelt der Nord u. Ostsee 1, 1±80.

Sacchi CF (1995) Le lagune costiere come ambienti di transizione. Atti VI Congresso Nazionale S.It.E. 16, 149±154.

Sather JH, Smith RD (1984). An overview of major wetland functions and values. U.S. Fish and Wildlife Service. FWS/OBS-84-18.

Sather JH, Stuber PJR (Technical Coordinators), (1984). Proceedings of the national wetland values assessment workshop. U.S. Fish and Wildlife Service Western Energy and Land Use Team. FWS/OBS-84/12.

Scialpi A, Mengoni A (2008). La PCR e le sue varianti. Quaderno di laboratorio. Firenze University Press.

Scienze Ambientali Università di Bologna in Ravenna (2003). La Pialassa della Baiona: qualità dell'ambiente e attività di ricerca. Comune di Ravenna. Editrice La Mandragora. pp 267.

Senez J, quoted by Starkey RL (1960). In Sulfate-reducing bacteria-physiology and practical significance. Lectures on theoretical and applied aspects of modern microbiology. University of Maryland. College Park, Md.

Shen Y e Buick R (2004). The antiquity of microbial sulphate reduction. Earth-Sci. Rev. 64:243–272.

Sievert SM et al. (2007) The sulfur cycle. Oceanography 20:117-123

Sims A, Zhang Y, Gajaraj S, Brown PB, Hu Z (2013). Toward the development of microbial indicators for wetland assessment. Water research, 47:1711-1725.

Simó R (2001). Production of atmospheric sulphur by oceanic plankton: biogeochemical, ecological and evolutionary links. *Trends Ecol. Evol.* 16: 287- 294

Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, con il patrocinio del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mar. Qualità dell'ambiente urbano. VIII Rapporto, Edizione 2012: Focus su porti, aeroporti e interporti.

Smith NP (1994). Chapter 4. Water, salt, and heat balances of coastal lagoons. pp 69-101 in B. Kjerfve, editor. *Coastal lagoon processes*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Smith TM, Smith RL (2007). *Elementi di ecologia*. Sesta edizione. Pearson Paravia Bruno Mondadori, pp. 728.

Soprani S, Giaquinta S et al. (1992). Studio e valutazione sull'assetto ambientale della Pialassa Piombone. U.S.L. 31, Ravenna; pp.162.

Souchu P, Gasc A, Collos Y, Vaquer A, Tournier H, Bibent B e Deslous-Paoli JM (1998). Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Marine Ecology Progress Series* 164:135±146.

Spaulding ML (1994). Chapter 5. Modeling of circulation and dispersion in coastal lagoons. pp 103-131 in B. Kjerfve, editor. *Coastal lagoon processes*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Spurgeon J (1998). The socio-economic costs and benefits of coastal habitat rehabilitation and creation. *Marine Pollution Bulletin* 37 (8-12), 373-382.

Stachowicz JJ, Terwin JR, Whitlatch RB e Osman RW (2002). Linking climate change and biological invasions: ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(24):15497-15500.

Stille W e Trüper HG (1984). Adenylylsulfate reductase in some new sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology* 41:1230-1237.

Tagliapietra D, Sigovini M, Ghirardini AV (2009) A review of terms and definitions to categorise estuaries, lagoons and associated environments. *Mar Freshw Res* 60:497-509.

Trüper HG, Kelleher JJ e Jannash HW (1969). Isolation and characterisation of sulfate-reducing bacteria from various marine environments. *Archiv für Mikrobiologie* 65:208-217.

Tsai Y-L e Olson BH (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1070-1074.

UE (2000). Direttiva 2000/60/CE del 23 Ottobre 2000 del Parlamento europeo che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque.

UE (1992). Direttiva 92/43/CEE del 21 Maggio 1992 relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche.

UNESCO (1971). Ramsar Convention on wetland of international importance especially as Waterfowl Habitat. UNESCO, Paris.

UNESCO (1980). Coastal lagoons survey. UNESCO Technical Papers in Marine Science, 31: 7.

UNESCO (1981). Coastal lagoons research, present and future. UNESCO Technical Papers in Marine Science 32: 51–79.

USEPA (1978). Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes. EPA 600/4-79/020.

Vaquer-Sunyer R e Duarte CM (2008). Thresholds of hypoxia for marine biodiversity, P. Natl. Acad. Sci. USA, 105:15452-15457.

Van De Werfhorst LC, Holden PA, Scow KM (2006). Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California Salt Marsh Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3357-3366.

Weilhoefer CL (2011). A review of indicators of estuarine tidal wetland condition. *Ecological indicators* 11, 2; 514-525. Publisher: Elsevier Science B.V., Amsterdam.

Westrich JT e Berner RA (1984). The role of sedimentary organic matter in bacterial sulfate-reduction : the G model tested. *Limnol. Oceanogr.* 29: 236-249.

Westrich JT e Berner RA (1988). The effect of temperature on rates of sulfate-reduction in marine sediments. *Geomicrobiol. J.* 6: 99-117 .

Widdel F (1988). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In *Biology of Anaerobic Microorganisms* ed. Zehnder, A.J.B. pp. 469-586. New York: John Wiley.

Widdel F, Pfennig N (1984). Dissimilatory sulfate or sulfur-reducing bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1 ed. Krieg, N.R. & Holt, J.G. pp. 663-679. Baltimore: Williams & Wilkins.

Wiley J e Sons. *Microbial ecology of the oceans*, second edition (Kirchman DL ed), pp 207-242.

Winfrey MR e Ward DM (1983). Substrates for sulfate reduction and methane production in intertidal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 45:193-199.

Woodward RT, Wui Y (2001). The economic value of wetland services: a meta-analysis. *Ecological Economics* 37:257-270.

Yáñez-Arancibia A, Day JW, Knoppers BA e Jiménez JA (2011). Coastal Lagoons and Estuaries: ecosystem approach. *Ciencia Interamericana OAE Washington D.C.* 22 (1-2): 11-25.

Zaccarini U (1995). Pialasse: origine e storia del nome. In: *Orizzonti d'acqua*. Anastasis Editrice Ravenna.

Zedler JB, Kercher S (2005). Wetland resources: status, trends, ecosystem services, and restorability. *Annual Review of Environment and Resources* 30(1):39-74.

Zehnder AJB (ed) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley e Sons, Inc., New, New York, pp 872.

Siti web

http://www.minambiente.it/home_it/menu.html

www.arpa.erm.it

www.ramsar.org

www.regione.emilia-romagna.it

<http://ambiente.regione.emilia-romagna.it/parchi-natura2000>

<http://ambiente.regione.emilia-romagna.it/parchi-natura2000/rete-natura2000/siti/it4070006>

www.parcodeltapo.it