

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

Variazione della comunità microbica
in un peculiare ambiente salmastro (lago di Ganzirri)
in relazione ai flussi mareali

Relatore
Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da
Marco Melita

Correlatori
Prof.ssa Silvana Vanucci

III sessione

Anno Accademico 2009/2010

INDICE

1 – INTRODUZIONE	pag. 5
1.1 Comunità microbica e rete trofica microbica	pag. 5
1.2 I batteri nell’ecosistema marino	pag. 7
1.3 I virus nell’ecosistema marino	pag. 9
1.4 Batterioplancton e virioplancton	pag. 12
1.5 Rapporto di abbondanza virus/batteri VBR	pag. 17
1.6 Fitoplancton e virioplancton	pag. 18
1.7 Infezione virale e implicazioni sulla struttura della rete trofica e sui cicli biogeochimici	pag. 20
1.8 Regolazione della struttura e composizione della comunità microbica	pag. 22
1.9 Morfologia e idrodinamismo dell’area di studio	pag. 26
2 – SCOPO DELLA TESI	pag. 29
3 – MATERIALI E METODI	pag. 31
3.1 Strategia di campionamento	pag.31
3.2 Misure <i>in situ</i> e trattamento dei campioni	pag. 36
3.3 Analisi chimico-fisiche	pag. 37
3.4 Analisi biologiche	pag. 38
3.5 Analisi molecolari	pag.43
3.6 Analisi statistica dei dati	pag. 46

4 – RISULTATI	pag. 48
4.1 Principali parametri chimico-fisici	pag. 48
4.2 Comunità microbiche	pag. 63
4.3 Correlazioni dei principali parametri	pag. 75
4.4 Diversità batterica	pag. 79
5 – DISCUSSIONI	pag. 88
6 – CONCLUSIONI	pag. 96
7 - BIBLIOGRAFIA	pag. 98

1 - INTRODUZIONE

1.1 Comunità microbica e rete trofica microbica

All'inizio degli anni '80 del secolo scorso la disponibilità di adeguate metodiche, quali la microscopia ad epifluorescenza (Hobbie et al., 1977), per lo studio e la visualizzazione dei protisti di piccole dimensioni ($< 20 \mu\text{m}$) ha permesso di evidenziarne le abbondanze e quindi l'importanza ed il ruolo ecologico negli ecosistemi marini. Sulla base di queste conoscenze, Azam *et al.*, nel 1983, hanno introdotto il concetto di “*microbial food loop*” o “anello trofico microbico” ampliato successivamente da Lenz (1992) e definito come “*microbial food web*”.

Questa rete trofica microbica è composta sia da organismi autotrofi, che mixotrofi, che eterotrofi, appartenenti alle classi dimensionali nano- ($20\text{-}2 \mu\text{m}$), pico- ($0.2\text{-} 2 \mu\text{m}$) e femto- ($0.02\text{-} 0.2 \mu\text{m}$; Sieburth et al., 1978) a cui si aggiungono i ciliati. La principale caratteristica dei microrganismi è la loro presenza ubiquitaria in tutti gli ecosistemi acquatici, ciò comporta una composizione della comunità microbica simile in tutti questi ambienti, siano essi d'acqua salata che d'acqua dolce, tropicali o temperati, oligotrofici o eutrofici (Fogg, 1986;; Stockner, 1988; Mousseau et al., 1996; Bettarel et al., 2002); inoltre è stato riscontrato come i rapporti fra le densità cellulari dei diversi organismi che costituiscono la rete trofica microbica sono simili in tutti gli ecosistemi; nella colonna d'acqua sono presenti in media: 10^9 cell l^{-1} di picoplancton eterotrofo, 10^7 cell l^{-1} per il picoplancton autotrofo e 10^6 cell l^{-1} per il nanoplancton. Alla luce dei più recenti lavori, a questi valori vanno aggiunti fino a 10^{11} particelle virali per litro (Bergh et al., 1989; Proctor & Fuhrman, 1990; Fuhrman, 1999).

Come è noto, la rete trofica microbica è connessa alla catena trofica classica "erbivora", che va dal fitoplancton di dimensioni maggiori (principalmente diatomee $> 5 \mu\text{m}$) ai copepodi, alle larve di pesci e da questi ai pesci di taglia maggiore (Cushing, 1989; Fig. 1.1). La rete trofica microbica e la catena

alimentare erbivora sono strettamente intercorrelate; è stato osservato infatti che sistemi dominati da una o dall'altra delle due vie trofiche (catena erbivora o microbial food web) rifletterebero condizioni transitorie mentre una bilanciata coesistenza di queste due vie porterebbe ad un equilibrio persistente nel tempo e nello spazio (Legendre & Rassoulzadegan 1995). La dominanza relativa della catena trofica classica o della rete microbica varia nei diversi ambienti in presenza di differenti condizioni ambientali; ad esempio vaste regioni degli oceani tropicali oligotrofici sono caratterizzate dalla dominanza della microbial food web (Cho & Azam, 1987; Campbell et al., 1997), mentre al contrario, le aree eutrofiche spesso supportano la catena di pascolo erbivora (Cushing, 1989; Legendre & Rassoulzadegan, 1995). La dominanza della microbial food web nelle acque oligotrofiche può essere spiegata dalla forte competizione per i nutrienti che seleziona piccole cellule con elevato rapporto superficie/volume. Infatti è stato riscontrato come in questi ambienti la maggior parte della produzione primaria sia imputabile ad organismi fototrofi di dimensioni inferiori a 5 μm (Cushing, 1989).

Sebbene il concetto di microbial food web abbia ampliato la visione sulla struttura della comunità planctonica, le dinamiche delle popolazioni microbiche negli ecosistemi acquatici presentano aspetti ancora poco chiari. Ciò è dovuto sia alla scoperta che le dimensioni delle prede e dei loro predatori, nella rete trofica microbica, possono essere molto simili e talvolta sovrapporsi (Becquevort et al., 1992), ma soprattutto a seguito della constatazione delle grandi abbondanze dei virus in tutti i comparti marini con importanti implicazioni sull'organizzazione trofica delle comunità microbiche. Negli ultimi anni, un'attenzione particolare è stata quindi rivolta allo studio delle dinamiche di interazione tra i virus e gli organismi ospiti più abbondanti, ovvero i batteri e, in ultima analisi, alle dinamiche della microbial food web.

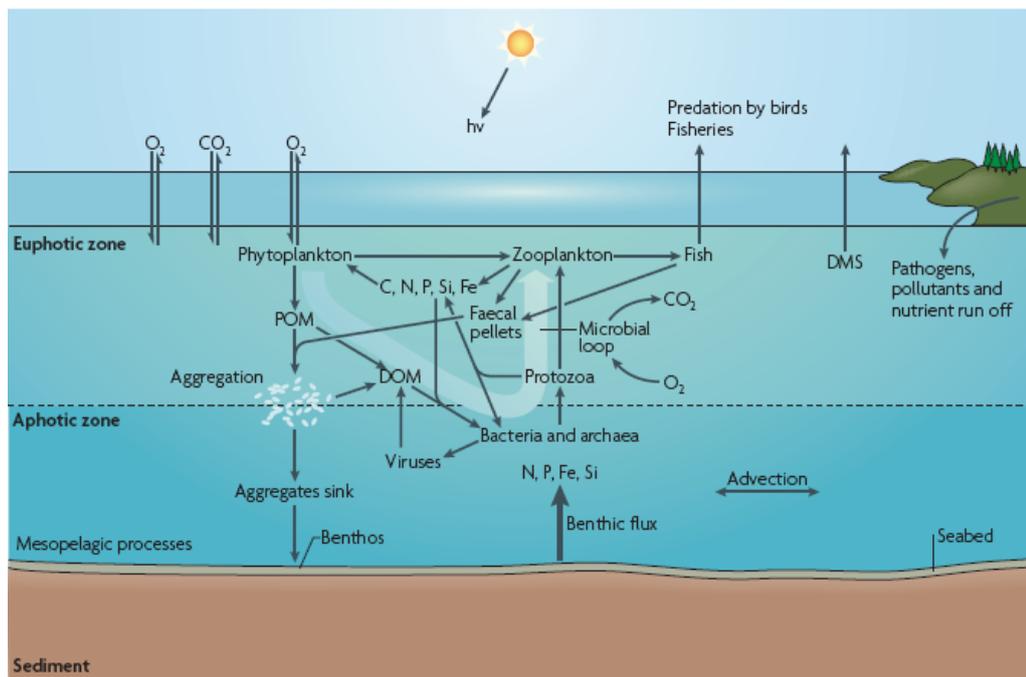


Fig. 1.1 – Rete trofica microbica di un ecosistema marino. Un'importante frazione della sostanza organica sintetizzata dai produttori primari diviene sostanza organica disciolta (DOM) ed è utilizzabile quasi esclusivamente dalla componente batterica. La maggior parte della DOM viene trasformata in CO₂ a seguito della respirazione, mentre un'altra frazione viene assimilata e reintrodotta nella classica catena trofica (dal fitoplancton allo zooplancton ai pesci). L'azione dei batteri sulla sostanza organica gioca un ruolo principale nel riciclo del carbonio attraverso la formazione di DOM. Ciò influenza inoltre gli scambi oceano-atmosfera della CO₂, l'accumulo di C e il suo trasferimento agli organismi acquatici. Modificato da Azam & Malfatti, 2007.

1.2 I batteri nell'ecosistema marino

I batteri sono tipicamente organismi procarioti unicellulari e, sebbene la loro esistenza nell'ambiente marino fosse già ben nota, è solo grazie a metodiche di conteggio ad epifluorescenza, messe a punto negli ultimi 30 anni, che si è riusciti a stimare abbondanze medie in campioni di acqua marina di circa 10^6 - 10^9 cell l⁻¹ (Ferguson & Rublee, 1976; Hobbie et al., 1977). Già prima della loro individuazione erano presenti numerosi studi allo scopo di quantificare l'importanza della componente batterica nel riciclo dei nutrienti, del carbonio e nel determinare la funzionalità ecosistemica, ma è soprattutto negli ultimi decenni che si è assistito ad un incremento esponenziale degli studi

atti ad aumentare la conoscenza globale sull'ecologia microbica (e.g. Fuhrman & Azam, 1980 e bibliografia in esso riportata).

E' opportuno accennare brevemente alle caratteristiche biologiche di questi organismi ricordando che i batteri sono tra gli organismi più semplici e primitivi, con dimensioni che ricadono prevalentemente nella porzione dimensionale 0.2 - 2 μm (pico-). In quanto procarioti questi organismi presentano una membrana cellulare, tipicamente formata da un doppio strato lipidico, ma sono del tutto privi di membrana nucleare, organuli o altre suddivisioni interne (Lewis, 1941). Il DNA è presente sotto forma di grande molecola a doppio filamento, circolare nella maggior parte dei procarioti (Robinow & Kellenberger, 1994); non è inusuale, inoltre, trovare del materiale genetico extracromosomico, di forma circolare che prende il nome di plasmide (Roth & Helinski, 1967). I batteri presentano anche RNA tipicamente associato alle unità ribosomiali. Peculiarità dei microrganismi procarioti è la presenza di una parete cellulare formata prevalentemente da peptidoglicano (Cummins & Harris, 1956).

Ciò che concorre maggiormente a determinare la diversità microbica è il loro metabolismo, l'energia utilizzata e le fonti di carbonio che questi microrganismi necessitano per espletare le loro funzioni vitali. Tutte le cellule richiedono infatti energia ed essa può essere ottenuta in tre modi:

- da composti chimici di natura organica, gli organismi che utilizzano tale strategia sono detti chemiorganotrofi;

- da composti chimici di natura inorganica e in tal caso prendono il nome di chemiolitotrofi;

- dalla luce se si tratta di organismi fototrofi.

La chemiolitotrofia è caratteristica esclusiva dei microrganismi procariotici, lo spettro dei composti inorganici utilizzati è molto ampio e questa inusuale capacità si dimostra essere un adattamento estremamente vantaggioso in quanto viene quasi del tutto azzerata la competizione con altre specie viventi e spesso i substrati energetici richiesti sono i prodotti di scarto del metabolismo chemiorganotrofo, ciò fa sì che siano quasi sempre disponibili, permettendo la sopravvivenza di tali specie anche in condizioni estreme.

I batteri chemiorganotrofi sono chiaramente eterotrofi, mentre al contrario molti chemiolitotrofi, e di fatto tutti i fototrofi, sono autotrofi.

I **batteri eterotrofi** sono i più abbondanti nella maggior parte degli ambienti acquatici. Per la formazione di nuova biomassa incorporano molecole organiche che ottengono dalle particelle organiche disciolte nel mezzo per attacco chimico effettuato con esoenzimi. Un' importante frazione della produzione primaria infatti, diviene materia organica disciolta (DOM) attraverso vari meccanismi della catena trofica (Williams, 1981), e questa è accessibile quasi esclusivamente ai microrganismi eterotrofi che, nel corso dell'evoluzione hanno sviluppato diverse strategie per poterla rendere disponibile e trasportarla al loro interno (Azam et al., 1983; Ducklow & Carlson, 1992).

I microrganismi procariotici decompongono la sostanza organica in molecole relativamente piccole che poi ossidano anche completamente. Vengono così rimessi in ciclo le forme inorganiche degli elementi che costituiscono la materia vivente. Si attua in questo modo il processo di mineralizzazione della sostanza organica senza il quale sul fondale si accumulerebbe rapidamente un grande strato di materia organica e di organismi morti.

In condizioni di eccesso di sostanza organica la mineralizzazione non si può realizzare completamente perché viene rapidamente consumato l'ossigeno disponibile. Il sistema diventa allora anossico, prendono il sopravvento ceppi di batteri anaerobi (capaci di esplicare le funzioni metaboliche in assenza di ossigeno), la sostanza organica viene demolita con processi non ossidativi che producono gas (metano, idrogeno solforato) incompatibili con la vita di molti organismi (Fuhrman & Hagström, 2008 e bibliografia in esso riportata).

1.3 I virus nell'ecosistema marino

La presenza dei virus nell'ambiente marino è nota da molti decenni (Spencer, 1955; Valentine et al., 1966, Torrella & Morita, 1979), ma la loro importanza come componente funzionale della comunità microbica marina è stata

ipotizzata solo a partire dalla fine degli anni '90 del secolo scorso quando, a seguito della messa a punto di versatili metodiche di conteggio, sono state rilevate nei campioni di acqua di mare densità virali dell'ordine di 10^8 - 10^{10} virus l^{-1} (Bergh et al., 1989; Paul et al.; 1993; Hara et al.; 1996; Proctor 1997). I virus sono quindi le forme di vita più abbondanti negli ecosistemi acquatici ed il loro numero nell'oceano probabilmente supera 10^{29} (Wilhelm & Suttle, 1999). Ipotizzando un allineamento dei virus presenti nell'oceano, e assumendo un diametro medio di 50 nm per virus marino, si formerebbe un 'filo di perle di virus' lungo 400000 anni luce; in confronto, il diametro della nostra galassia, la via lattea, è solo di 25000 anni luce (Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004).

L'enorme numero dei virus trovato negli ambienti acquatici implica che essi giochino un ruolo significativo nel riciclo della sostanza organica e dei nutrienti nelle reti trofiche. E' stato inoltre osservato come abbiano importantissimi risvolti anche sulle dinamiche di popolazione e di comunità degli organismi della microbial food web, essendo importanti agenti di mortalità per i batteri e per il fitoplancton (Fuhrman, 1999; Wommack & Colwell, 2000), ovvero per gli organismi più abbondanti nell'ecosistema marino. Ne segue che l'abbondanza e la struttura tassonomica dei popolamenti microbici è modulata, oltre che da altri fattori, quali la disponibilità delle risorse (e.g. nutrienti, sostanza organica) e l'attività di grazing da parte dei protisti, dall'entità dell'infezione virale (Wilhelm & Matteson, 2008 e bibliografia in esso riportata). L'importanza dell'attività virale varia quindi in funzione delle condizioni ambientali e delle caratteristiche delle diverse masse d'acqua (Wommack & Colwell, 2000).

E' opportuno ricordare brevemente che i virus sono particelle delle minori dimensioni fin ora riscontrate, generalmente comprese fra 0.02 – 0.2 μm . Sono costituiti da acido nucleico (DNA o RNA a singolo o doppio filamento), avvolto da un capsido proteico che, in alcuni casi, può essere circondato da una membrana composta da un doppio strato lipidico ("envelope"). Dato che il genoma virale è di dimensioni esigue, i virus devono parassitare una cellula ospite per riprodursi comportandosi al di fuori dell'ospite come particelle inerti (Fuhrman, 1999 e bibliografia in essa riportata). Tutti gli organismi viventi

possono venire infettati dai virus. Il virus entra casualmente in contatto con la cellula ospite, aderisce alla sua parete ed infine penetra al suo interno. L'ingresso avviene sfruttando le proteine di trasporto delle membrane cellulari, per iniezione diretta del solo materiale genetico o per endocitosi da parte della cellula ospite (Fig. 1.2).

Le modalità con cui il virus si riproduce sono principalmente:

- 1) l'infezione litica: il virus aderisce alla cellula ospite, inserisce il materiale genetico ed induce la cellula a produrre una nuova progenie virale; i nuovi virus sono poi rilasciati in seguito alla lisi cellulare.
- 2) l'infezione cronica: in questo caso il rilascio dei nuovi virus avviene per gemmazione o per espulsione degli stessi, senza che si verifichi la morte della cellula ospite.
- 3) l'infezione lisogenica: l'acido nucleico virale s'inserisce all'interno del genoma della cellula ospite e si riproduce come materiale genetico nella linea cellulare dell'ospite.

Focalizzando l'attenzione sui microrganismi marini, l'infezione lisogenica rappresenta una strategia di "sopravvivenza" che i virus adottano quando le densità cellulari degli ospiti sono scarse e, allo stesso tempo, comporta alcuni vantaggi anche per l'ospite (Fuhrman, 1999); infatti, la cellula ospite diviene immune ad ulteriori infezioni virali, con cui è in rapporto e, al contempo può acquisire nuove funzioni che vengono codificate dal genoma virale (Lenski, 1988). L'infezione lisogenica appare di fondamentale importanza anche per quanto riguarda il trasferimento orizzontale di materiale genetico attraverso la trasduzione (Wilcox & Fuhrman, 1994; Bratbak & Heldal, 1995; Weinbauer & Suttle, 1996; Jiang & Paul, 1997; Fuhrman, 1999; vedi oltre).

Il passaggio alla fase litica è indotto generalmente da fattori ambientali di stress a cui la cellula ospite è sottoposta, come per esempio la luce ultravioletta, le radiazioni ionizzanti, gli inquinanti (i.e. idrocarburi e PCB; Jiang & Paul, 1996; Cochran et al., 1998). Inoltre, sebbene sia noto che l'irraggiamento solare, in particolare i raggi UV-B, sia uno dei fattori responsabili della diminuzione delle abbondanze di virus e batteri nelle acque superficiali (Wilhelm et al. 1998), quest'ultimi possiedono sistemi di riparazione del materiale genetico (DNA ed RNA) lievemente danneggiato (Fuhrman, 1999; Wommack &

Colwell, 2000). Pertanto, nel caso di un'infezione lisogenica, anche il genoma virale inserito all'interno di quello batterico è soggetto alla riparazione di eventuali danni (Wilhelm et al. 1998). Questo ha portato ad affermare che, contrariamente a quanto si potesse pensare, i virus che si trovano nella zona fotica sono infettivi (Wilhelm et al., 1998).

Un tipo di infezione ancora poco studiata è quella pseudolisogenica nella quale l'acido nucleico virale rimane dentro la cellula ospite senza essere integrato né replicato per diverso tempo, generalmente per alcune generazioni, prima che si verifichi la lisi (Lenski, 1988). La cellula ospite è in un stato definito "carrier state". In questo stato il profago non è inducibile in quanto non è stimolabile né da agenti fisici né chimici (Danovaro et al., 2008).

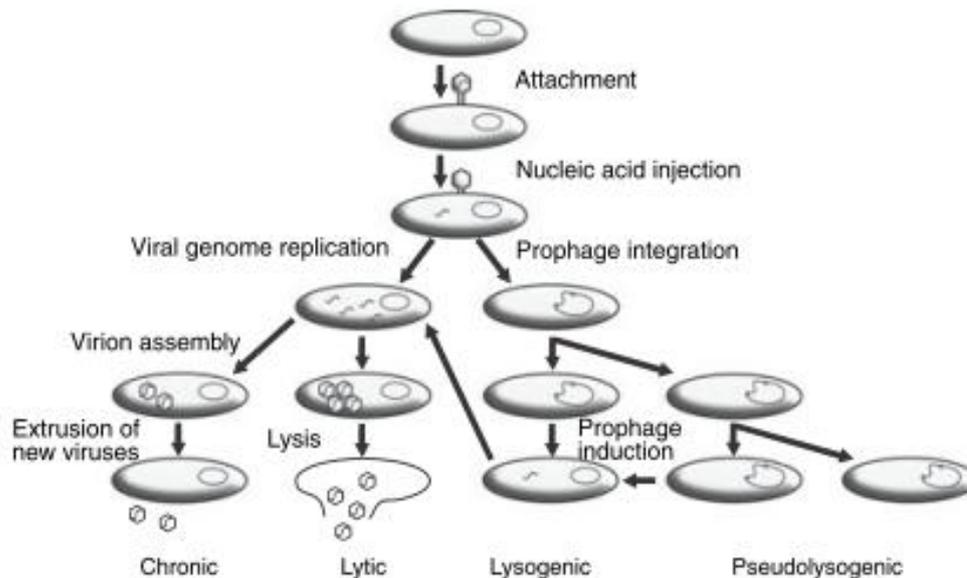


Fig. 1.2 – Rappresentazione schematica dei differenti cicli vitali del virus: cronico, litico, lisogenico e pseudo-lisogenico. Modificato da Danovaro et al., 2008.

1.4 Batterioplancton e virioplancton

I procarioti, dopo i virus, sono le forme di vita più abbondanti presenti nell'ambiente marino; la frazione eterotrofa, rappresentata dagli archaea e dai

batteri, è delegata ai processi di degradazione e riciclo della materia (Azam & Malfatti, 2007; Legendre & Revkin, 2008). Limitandoci in questo studio ai batteri presenti nell'ambiente planctonico (batterioplancton), questi presentano delle abbondanze medie marine di $10^8 - 10^9$ cell l^{-1} , corrispondenti al 90% della biomassa marina (Suttle, 2007; Fig. 1.3) e costituiscono i principali ospiti dei virus planctonici (virioplancton) (Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004).

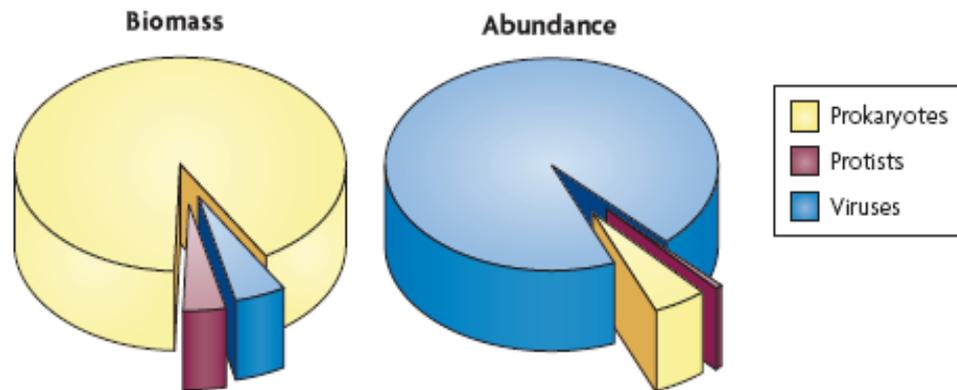


Fig. 1.3 – Biomassa e abbondanza relativa di procarioti, protisti e virus in ambiente marino. I virus sono le entità biologiche più abbondanti negli oceani, comprendendo approssimativamente il 94% delle particelle contenenti acidi nucleici. Tuttavia a causa delle loro dimensioni infinitesimali essi concorrono a circa il 5% della biomassa totale. Per contro, anche se i procarioti (intesi come batteri) rappresentano meno del 10% delle particelle contenenti acidi nucleici, essi rappresentano oltre il 90% della biomassa. I protisti (i.e. flagellati eterotrofi), possono rappresentare fino al 50% della biomassa totale nelle acque superficiali, mentre nelle acque oceaniche profonde meso- e batipelagiche rappresentano una minima % della biomassa totale. Modificato da Suttle 2007.

1.4.1 Variazioni spazio-temporali

Il batterioplancton presenta valori di abbondanza maggiori nelle zone estuarine e di transizione (5×10^9 l^{-1}), seguiti dalle zone costiere ($1 - 5 \times 10^9$ l^{-1}) e infine valori minori ($0.5 - 10 \times 10^8$ l^{-1}) per gli ambienti pelagici (Azam, 1983). L'abbondanza batterica è correlata alla produttività primaria e/o allo stato trofico del sistema (Fuhrman & Hagstrom, 2008) ed è più alta quando nutrienti e clorofilla sono maggiori. Il virioplancton presenta abbondanze tipicamente di 10^{10} particelle l^{-1} nelle acque superficiali (5-25 volte le abbondanze del batterioplancton) e, generalmente, in un determinato ambiente, segue gli stessi andamenti spaziali delle abbondanze batteriche (Cochlan et al., 1993; Clasen et al., 2008). Questi andamenti includono una diminuzione di circa un ordine di grandezza tra le acque ricche costiere e le acque oceaniche oligotrofe; una

diminuzione di 5-10 volte tra la zona eufotica e le acque mesopelagiche più superficiali (fino a 500 m) e, un' ulteriore diminuzione di diverse volte nelle profondità abissali (Furhman, 1999 e referenze in esso riportate). In generale, quindi, esiste una correlazione positiva fra l'abbondanza batterica ed abbondanza virale (Wilhem & Matteson, 2008 e bibliografia in esso riportata; Fig. 1.4).

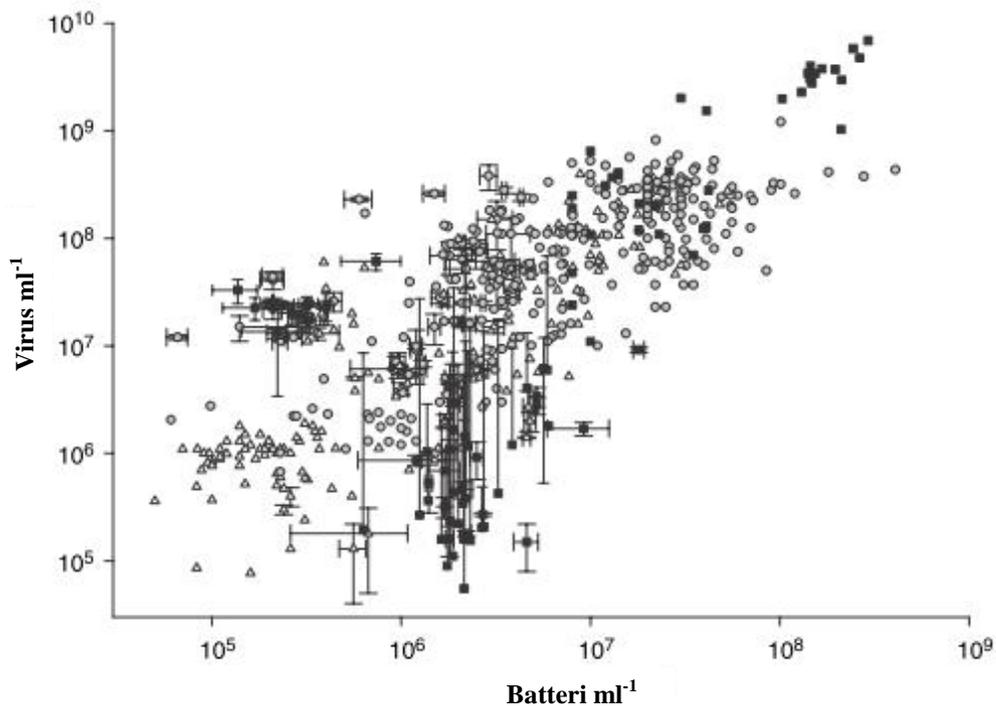


Fig. 1.4 – Correlazioni tra le abbondanze virali e batteriche in acque dolci (■) e ambienti oceanici, costieri (○) e pelagici (△). Modificato da Wilhelm & Matteson 2008.

Nei sistemi planctonici, l'abbondanza virale segue le variazioni non solo spaziali, ma anche temporali, del batterioplancton e della produzione primaria. Ne consegue che, per esempio, nelle acque costiere della Norvegia sono state evidenziate variazioni stagionali della loro abbondanza riconducibili alle dinamiche stagionali delle fioriture fitoplanctoniche con concentrazioni delle particelle virali inferiori a 10^7 l⁻¹ in inverno e superiori a circa 5×10^9 l⁻¹ da

inizio primavera fino a fine autunno (Bergh *et al.* 1989). Anche in acque costiere oceaniche temperate e in acque salmastre sono evidenziate tendenze stagionali simili (Wommack *et al.* 2001; Wommack & Colwell, 2000); in tali ambienti, nel periodo che intercorre dall'inverno a fine estate è stato osservato un aumento di densità virale di un ordine di grandezza da meno di 10^9 l⁻¹ ad oltre 10^{10} l⁻¹ (Jiang & Paul, 1994; Weinbauer *et al.*, 1995; Cochran & Paul, 1998). Un importante aspetto che accomuna tutti questi studi, svolti in ambienti diversi, è la maggiore abbondanza virale in autunno in corrispondenza del bloom autunnale del fitoplancton piuttosto che in corrispondenza del bloom primaverile, molto probabilmente da attribuire ad un'abbondanza del virioplancton e del batterioplancton già più consistente sin dal periodo estivo rispetto a quella invernale (Wommack & Colwell, 2000). Di norma, inoltre, durante i periodi in cui si ha stratificazione lungo la colonna d'acqua, la densità microbica è maggiore a livello del termoclino (Weinbauer *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 1985; Hewson & Fuhrman, 2007), a livello del quale sono concentrati i nutrienti, il fitoplancton ed il batterioplancton; così pure nelle zone frontali (Alonso *et al.*, 2010).

Ciò non di meno, è stato dimostrato da recenti studi come l'abbondanza virale in particolare sia legata allo stato trofico del sistema in misura variabile, dipendendo maggiormente dalla scala spaziale dell'analisi (Riemann & Middelboe, 2002; Corinaldesi *et al.*, 2003), dalla distribuzione delle masse d'acqua e la relativa composizione della comunità microbica (Riemann & Middelboe, 2002).

1.4.2 Virus e mortalità batterica

I virus entrano in contatto casualmente con le cellule ospiti tuttavia, poiché l'infezione virale è un'infezione specie-specifica e dipende dalla densità degli ospiti, gli ospiti potenziali che presentano concentrazioni elevate sono più soggetti alle infezioni rispetto a quelli con basse densità (Fuhrman & Suttle, 1993). Si ipotizza che i vincitori (winners) nella competizione per le risorse abbiano le abbondanze più elevate nelle comunità batteriche planctoniche (e nei sedimenti), e che queste stesse popolazioni a seguito della lisi virale subiscano un declino; questa teoria prende il nome di "kill the winner"

(Thingstad & Lignell, 1997). Ne consegue che all'interno di una comunità microbica in equilibrio nessuna specie raggiungerà densità molto maggiori rispetto alle altre in seguito all'effetto predatorio limitante esercitato dai virus, permettendo a numerose specie di sopravvivere nello stesso habitat. Inoltre il rapporto che intercorre tra le densità virali e batteriche durante un'infezione è strettamente dipendente dal *burst size*, ovvero il numero delle particelle virali prodotte da una singola cellula ospite infettata e che vengono rilasciate nell'ambiente (a seguito della lisi), ed è di circa 20 nel caso in cui la cellula ospite sia di natura batterica (Parada et al., 2006); ciò significa che durante la fase litica vi è una crescita esponenziale delle particelle infettanti che vengono liberate e, in tal modo, i virus sono in grado di controllare la popolazione batterica limitandone la densità cellulari (Fuhrman, 1999). Si ritiene che i virus siano responsabili di una mortalità batterica compresa fra il 20 ed il 50%, nelle acque superficiali costiere, nelle quali, equiparano, approssimativamente, la mortalità batterica indotta dall'attività di grazing dei nanoflagellati (Fuhrman & Noble, 1995). Una mortalità superiore, fra il 50 ed il 100% è stata evidenziata in ambienti ostili alla vita dei grazers, quali acque lacustri povere di ossigeno (Fuhrman & Suttle, 1993; Steward et al., 1996; Weinbauer & Hoffle, 1998; Fuhrman & Noble, 1995; Suttle, 1994). Queste percentuali sono stati confermate anche da osservazioni in microscopia elettronica a trasmissione che hanno evidenziando la presenza di virus nel 0.8 – 4.3% delle cellule batteriche (Proctor & Fuhrman, 1990; Proctor & Fuhrman, 1991; Mathias et al., 1995); poiché i virus sono visibili all'interno della cellula infettata solo durante l'ultima fase dell'infezione litica, ossia in un lasso di tempo limitato rispetto alla durata complessiva del processo infettivo (Fuhrman, 1999); questi valori sono da moltiplicare per un fattore di correzione pari 10. Negli ambienti marini, quindi è stato stimato che, in ogni istante, il 5-25% della comunità batterica presenti un carico virale (Weinbauer, 2004).

1.5 Rapporto di abbondanza virus/batteri VBR

Gli andamenti spazio-temporali delle principali componenti microbiche, precedentemente descritti, si riflettono sul rapporto fra l'abbondanza delle particelle virali e l'abbondanza dei batteri (virus to bacteria ratio = VBR), per il quale sono state evidenziate marcate differenze fra differenti ambienti.

In molti ambienti planctonici marini finora studiati l'abbondanza virale supera quella batterica; generalmente il rapporto è compreso tra 3 e 10 (Wommack & Colwell, 2000), mostrando valori del rapporto VBR maggiori in ambienti ricchi in nutrienti. Questa semplice osservazione suggerisce, quindi, che il batterioplancton, popolazione ospite, ha un alto tasso di infezione e subisce un maggior numero di attacchi virali producendo un elevato numero di virus, quando le condizioni ambientali favoriscono una veloce crescita batterica e un'alta produttività.

Tuttavia, studi condotti in diversi siti caratterizzati da condizioni fisico-chimiche, come anche biologiche, differenti, hanno portato all'individuazione di variazioni nel rapporto VBR anche notevoli. Ad esempio nelle acque superficiali dell'oceano Pacifico il VBR è circa 40, mentre e in quelle dell'oceano Artico è circa 10. Valori inferiori a 5 sono stati riscontrati in acque dolci (Clasen et al., 2008) e valori ~ 1 in acque profonde, sia Mediterranee (Weinbauer et al., 2003) che oceaniche (Hara et al., 1996). Tuttavia, a causa di peculiari condizioni ambientali, è stato riscontrato come in acque oceaniche profonde, il VBR possa superare il valore 100 (Parada et al 2007). I valori più alti di VBR riscontrati nelle acque profonde sembra siano da attribuire a zone di accumulo della così detta *neve marina*, sostanza organica particellata prodotta nella zona eufotica, a seguito dei normali processi biologici, che raggiunge le zone più profonde senza essere degradata completamente lungo la colonna d'acqua. Tale fonte di nutrimento, che giunge in un habitat caratterizzato da forti condizioni oligotrofiche, induce la presenza di *hot spots* microbici, modificando le abbondanze relative delle singole componenti microbiche (Azam & Malfatti, 2007; Parada et al., 2007).

Nella maggior parte degli ambienti studiati, è stata riscontrata una relazione inversa tra il VBR e l'abbondanza della comunità batterica; ciò è dovuto al

fatto che un alto valore del VBR è associato ad una cospicua lisi del batterioplancton seguita da una maggiore produzione di virioplancton. Ne consegue che a determinare il valore effettivo del VBR sia maggiormente l'incremento del numero di particelle virali, proporzionalmente più alto dell'aumento del numero di batteri. Inoltre Bratbak & Heldal (1995) e Tuomi et al. (1995), hanno formulato un'interessante ipotesi per spiegare la relazione inversa fra VBR e densità batterica e secondo la quale il VBR potrebbe essere un indicatore della diversità delle comunità ospiti. Quando la comunità batterica è dominata da solo poche specie batteriche, potrebbe essere favorito l'adsorbimento specie-specifico dei virus all'ospite; una volta adsorbiti ai loro specifici recettori, i virus sono persi effettivamente dalla componente libera virioplanctonica. Mentre, negli ambienti caratterizzati da una notevole diversità di specie ospiti, il virioplancton potrebbe impiegare più tempo come forma libera prima di essere adsorbito provocandone l'infezione. Questa ipotesi si basa su due assunzioni: 1) che l'adsorbimento specie-specifico è un fattore importante nella perdita dei virus; 2) che il numero dei batteri aumenta mentre la diversità della comunità nel suo insieme diminuisce. L'ultima assunzione può essere facilmente accettata per i blooms mono- o poli-specifici, quando le popolazioni aumentano vertiginosamente e simultaneamente si osserva perdita della diversità specifica.

1.6 Fitoplancton e virioplancton

I virus marini infettano anche il fitoplancton, sia eucariotico che procariotico; fra il fitoplancton eucariotico sono state evidenziate infezioni virali in molte classi tassonomiche (e.g. diatomee, crisofite, primnesiofite, haptofite, rafidofite e criptomonadi) ma probabilmente, ogni specie fitoplanctonica può essere infettata (Fuhrman, 1999 e referenze in esso riportate). Tra gli organismi fitoplanctonici eucariotici suscettibili al controllo virale vi sono specie tossiche quali *Aureococcus anophagefferans* (e.g. Gobler et al., 1997) ed *Heterosigma akashiwo* (Nagasaki & Yamguchi, 1998).

L'infezione virale del fitoplancton può avere, in particolari condizioni, un importante impatto ecologico, dato che il fitoplancton si trova alla base della catena trofica. Per esempio, è stato osservato che i virus esercitano un controllo diretto sulle fioriture di specie ubiquitarie quali *Phaeocystis pouchetii* ed *Emiliana huxleyi* (Suttle et al., 2007; Wilhelm & Matteson, 2008 e bibliografia in essi riportata); per queste specie è stato rilevato un notevole aumento dell'abbondanza virale in condizioni di bloom, associato ad una percentuale di cellule infettate (evidenziate tramite osservazioni al TEM) di oltre il 50% durante la fase centrale del bloom e quasi del 100% nella fase finale del bloom (e.g. Brussard et al., 1996), determinato anche da un *burst-size* di circa 100-200 particelle virali per cellula fitoplanctonica infettata (Wilhelm & Matteson, 2008), evidenziando un controllo delle abbondanze cellulari secondo la modalità "kill the winner" (Suttle et al., 2007). Queste specie producono notevoli quantità di composti come il DMSP (dimetilsulfidepropionato), l'infezione virale quindi, ne modula il rilascio in mare con potenziali implicazioni anche sul clima (vedi oltre).

Ciò nondimeno, il picofitoplancton (o picoplancton fototrofo; dimensioni: 0.2-2 μm) procariotico, e fra questo la componente cianobatterica appartenente al genere *Synechococcus*, a seguito delle elevate abbondanze in mare (10^6 - 10^7 cell l^{-1}), è l'ospite più importanti del virioplancton, dopo i batteri. In fase litica è stata evidenziata una percentuale di cellule *Synechococcus* spp. infettate molto variabile (1- 15%; Waterbury & Valois, 1993; Suttle & Chan, 1994); questi risultati implicano che i bloom di *Synechococcus* spp. sono probabilmente dovuti alla compresenza di molte popolazioni che differiscono per i differenti recettori virali e che quindi i cianofagi (essendo specie-specifici) regolano la composizione della comunità cianobatterica (Muhling, 2005; Suttle, 2007).

1.7 Infezione virale ed implicazioni sulla struttura della rete trofica e sui cicli biogeochimici

Data l'elevata mortalità che i virus causano tra le popolazioni batteriche marine e fitoplanctoniche, essi hanno una ripercussione diretta a livello trofico e sui cicli biogeochimici.

Quando una cellula va incontro a lisi, si trasforma in detrito; questo è composto da molecole disciolte (monomeri, oligomeri, polimeri), sostanze colloidali e frammenti cellulari (Shibata *et al.*, 1997). Proctor & Fuhrman (1990) e Bratbak *et al.* (1990) hanno dimostrato che la quasi totalità del materiale organico disciolto derivante dalla lisi virale viene utilizzato dai batteri. Pertanto, se la cellula lisata è un batterio ed il lisato viene utilizzato dai batteri, si instaura una sorta di anello trofico il “viral loop” nel quale la biomassa batterica viene degradata dai batteri stessi (Fuhrman, 1999; Fig. 1.5).

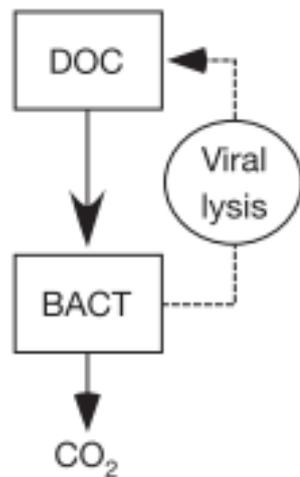


Fig. 1.5 – Effetti della lisi virale sulla catena trofica microbica e formazione del *viral loop*. Modificato da Legendre & Rivkin 2008.

Questo anello virale è inoltre rifornito dall'esterno grazie al rilascio di sostanza organica disciolta da parte del fitoplancton e dei grazers (Bratbak *et al.*, 1990; Fuhrman, 1992). La morte dei batteri e la conseguente diminuzione della loro abbondanza a seguito di lisi virale provoca, da un lato, una maggiore

disponibilità di sostanza organica disciolta che viene utilizzata dai batteri stessi, determinando un aumento della produzione batterica e, dall'altro, una diminuzione della produzione dei batterivori, ovvero degli organismi pico- e nanoeterotrofi e mixotrofi che si nutrono di batteri. In maniera analoga, la lisi degli organismi fitoplanctonici provoca una diminuzione del grazing da parte degli organismi pascolatori (e.g. nanoflagellati) e induce la trasformazione della sostanza organica in biomassa nelle sue forme più piccole; ciò a scapito di un parziale mancato trasferimento della sostanza organica lungo la catena alimentare classica.

In un sistema caratterizzato da una forte attività virale, la trasformazione della sostanza organica in forma particellata di piccole dimensioni e disciolta facilita la permanenza della stessa nella zona eufotica, a seguito dei coefficienti di sedimentazione molto bassi (Fuhrman, 1992). Ciò permette, quindi, la permanenza nella zona eufotica dei principali nutrienti (azoto, fosforo e ferro) che si trovano in concentrazioni relativamente alte nei batteri e che possono limitare la produzione primaria (Fuhrman, 1992). Al contrario, una ridotta attività virale comporta uno sprofondamento di nutrienti organici ed inorganici dalla zona fotica verso le zone più profonde ed una conseguente diminuzione della produzione nella zona eufotica (Fuhrman, 1999).

La lisi degli organismi ed il rilascio del loro contenuto cellulare svolgono un'azione anche a livello biogeochimico che dipende dalle proprietà chimico-fisiche delle sostanze rilasciate e dalla zona della colonna d'acqua in cui si verifica la lisi. Ad esempio, il rilascio di polimeri può facilitare l'aggregazione e la sedimentazione di sostanze dalla zona eufotica (Proctor & Fuhrman, 1991; Peduzzi & Weinbauer, 1993).

Inoltre, recentemente, è stato ipotizzato che i virus potrebbero avere un importante ruolo anche nelle modificazioni climatiche (Azam & Malfatti, 2007); essi sono infatti in grado di indurre il rilascio di dimetilsulfidepropionato (DMSP), un precursore del DMS (dimetilsulfide), a seguito della lisi indotta su determinate componenti fitoplanctoniche. Charlson et al. (1987) furono i primi a ipotizzare come il DMS fosse in grado di modificare le condizioni climatiche anche su scala globale, mettendo a punto quella che oggi è nota sotto il nome di ipotesi CLAW. Secondo tale ipotesi in

condizioni di forte irradianza solare vi è un aumento dell'abbondanza fitoplanctonica, seguita da un aumento di DMS prodotto ed in seguito rilasciato nell'atmosfera; una volta entrato a contatto con l'atmosfera si suppone che questo composto vada a influenzare la formazione di aggregati nuvolosi, i quali a loro volta incidono sull'aumento dell'albedo e quindi una diminuzione dell'incidenza dei raggi solari; questo porta ad una diminuzione dell'irradianza che ha come conseguenza la diminuzione dell'abbondanza fitoplanctonica, principale produttore di DMS (Charlson et al. 1987, Ayers & Cainey, 2007).

Tra gli organismi fitoplanctonici produttori di DMSP vi sono principalmente specie quali *Micromonas pusilla* (Hill et al., 1998) e altre, tra cui *Emiliana huxleyi* (Brussard, 1996) e *Phaeocystis pouchetii*, le quali, come precedentemente accennato, sono tra le cellule ospiti preferenziali per l'infezione virale, a seguito delle elevatissime abbondanze raggiunte durante i bloom di cui sono protagoniste. E' a seguito dell'attività di grazing o infezione litica su queste particolari specie che avviene un importante rilascio in mare di DMSP (Malin et al., 1998).

1.8 Regolazione della struttura e composizione della comunità microbica

La struttura e la composizione della comunità microbica è un descrittore importante del funzionamento degli ecosistemi (Danovaro & Pusceddu, 2007; Pugnetti et al., 2010) ed è legata alla disponibilità delle risorse e ai processi ecologici che vi si svolgono quali la competizione, la predazione e la produzione all'interno della comunità.

Come è stato precedentemente accennato, la struttura della comunità microbica presenta abbondanze relative delle varie componenti proporzionalmente simili nei vari ecosistemi acquatici. Tuttavia, insieme all'attività di grazing, è stata dimostrata l'importanza della componente virale, nell'influenzare la struttura della comunità microbica. In particolare, l'attività virale interferisce con la dinamica delle popolazioni e le successioni delle comunità, sia batteriche che

fitoplanctoniche, agendo in primo luogo sulle abbondanze e, in secondo luogo, sulla qualità delle risorse (ad esempio qualità della DOM e POM, nutrienti; Fuhrman, 1992; Wilhelm & Matteson, 2008).

1.8.1 Controllo bottom-up della comunità batterica

Andando ad analizzare più nel dettaglio la composizione e la struttura della comunità batterica, risulta evidente come questa sia regolata da diversi fattori. La dimensione di una popolazione batterica è controllata in prima analisi dal bilanciamento tra il tasso di crescita e il tasso di mortalità; tuttavia la sua composizione, intesa come numero di taxa dominanti, è determinata dalla disponibilità e dalla qualità dei nutrienti e più in generale dalle risorse presenti nell'ambiente. Tale controllo è definito bottom-up e si basa sull'interazione di tipo competitivo che si instaura tra diverse "specie" batteriche per gli stessi nutrienti limitanti. Appare chiaro come in condizioni limitanti, la comunità sarà composta principalmente dai così detti *core taxa*, ovvero poche specie dominanti, ma caratterizzate da un elevato numero di individui, in grado di prendere il sopravvento sui taxa rari (o *seed bank*; Pedròs-Aliò, 2006) a fronte di una maggiore capacità nell'up-take dei nutrienti, o più in generale, nell'utilizzo delle risorse presenti.

In questo processo è stato riscontrato come anche l'infezione virale giochi un ruolo principale in quanto, a seguito della lisi cellulare, vengono resi disponibili nutrienti sia sotto forma disciolta che particellata; va inoltre fatta una distinzione in base alla cellula infettata (come precedentemente accennato), poiché la natura della sostanza organica sarà diversa se si tratti di una cellula fitoplanctonica, di una cellula batterica o altro (Wilhelm & Matteson, 2008 e bibliografia in esso riportata); questo ruolo della componente virale risulta particolarmente importante in forti condizioni limitanti e in presenza di una bassa pressione predatoria sui batteri (Hewson & Fuhrman, 2007).

D'altro canto in particolari ambienti, caratterizzati da importanti input di nutrienti e di sostanza organica di diversa natura, si nota una correlazione positiva con la diversità della comunità microbica, permettendo la formazione di differenti nicchie ecologiche e conseguentemente un aumento del numero di

diversi taxa in grado di coesistere (Becquevort et al., 1992; Wilhelm & Matteson, 2008)

1.8.2 Controllo top-down della comunità batterica

La struttura e la dimensione della comunità batterica è regolata anche da un controllo di tipo top-down. Tale controllo è espletato dalle specie predatorie dei batteri, i così detti grazers, ma anche dai batteriofagi, ovvero la componente virale in grado di infettare i batteri.

Se da una parte i grazers modificano la composizione della comunità batterica a seguito di una predazione selettiva, dovuta alle dimensioni o all'appetibilità di particolari taxa rispetto ad altri (Simek et al., 1999; Jurgens & Matz, 2002; Jardillier et al., 2005), dall'altra i virus sono gli autori della strategia "kill the winner" (Thingstad & Lignell, 1997). L'infezione virale, quindi, dovrebbe avere come effetto globale quello di aumentare la diversità delle comunità permettendo a numerosi differenti taxa batterici di competere per le risorse disponibili. In ambienti oligotrofi la lisi virale è probabilmente un fattore molto importante per la determinazione della diversità della comunità batterica essendo responsabile di cambiamenti significativi nell'abbondanza relativa nelle comunità tramite lisi dei batteri (ovvero, controllo top-down), e attraverso il rilascio dei prodotti di lisi (ovvero, controllo bottom-up).

Da studi sulle dinamiche di variazione della comunità batterica, il controllo top-down risulta avere effetti sulla struttura della comunità microbica su scala temporale più brevi, mentre il controllo bottom-up (ovvero disponibilità di risorse) probabilmente è in grado di strutturare la composizione delle comunità su scala temporale più lunga.

1.8.3 Diversità batterica

In ultima analisi è stato recentemente evidenziato come l'attività virale possa influenzare attivamente la biodiversità batterica andando a modificare l'informazione genetica e verosimilmente contribuendo alla formazione di nuove specie. Questo concetto prende il nome di trasferimento genetico orizzontale e prevede l'innesto di tratti genomici di un batterio in un altro tramite l'infezione lisogenica (Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004). Difatti

durante un ciclo di infezione lisogenica il genoma di una particella virale viene inserito e replicato assieme al genoma batterico. Non è infrequente che, una volta avvenuto il rilascio delle particelle virali, esse portano con se tratti genici della cellula ospite. Quando queste particelle virali andranno in contro ad un altro ciclo lisogenico potrebbero introdurre, oltre al proprio genoma, anche un ridotto numero di paia di basi del genoma dell'organismo precedentemente infettato. Com'è facilmente comprensibile ciò contribuisce notevolmente ad aumentare la biodiversità batterica globale, e può inoltre avere effetti ecologici promuovendo la formazione di nuove nicchie ecologiche aumentando ulteriormente la diversità batterica.

Secondo (Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004) una modalità per valutare la diversità batterica è lo studio della distribuzione degli individui e delle loro biomasse in un particolare tempo e in un dato ecosistema mediante l'ausilio di tre parametri ecologici quali: la ricchezza specifica (S' ; il numero di specie, o ribotipi, presenti), l'omogeneità della distribuzione delle specie (J'), e l'indice di diversità di Shannon-Wiener (H').

Per poter analizzare la biodiversità oggi giorno ci si affida alle tecniche molecolari denominate *tecniche di fingerprinting* (FT); queste tecniche si basano principalmente sull'ibridizzazione DNA-DNA e sulla comparazione di determinate sequenze genetiche conservative, quali il tratto 16S rRNA e il tratto intergenico ITS-1 compreso tra il 16S e il 23S rRNA. In particolare, secondo alcuni autori (Danovaro et al. 2007) la tecnica ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) risulta essere più accurata rispetto alle altre nella stima della comunità batterica marina. Inoltre, a parità di FT utilizzata, è stato riscontrato come analisi effettuate sul tratto genetico ITS-1 forniscano maggiori informazioni, permettendo un'accuratezza dell'informazione fino all'identificazione sottospecie-specifica (Guasp et al. 2000, Kwon et al. 2005, Song et al. 2004).

Questa nuova frontiera dello studio della biodiversità procariotica ha reso necessaria una rivisitazione del concetto di specie in ecologia microbica, al quale è stato associato il concetto di unità tassonomica operativa (*operational taxonomic unit*, OTU).

1.9 Morfologia e idrodinamismo dell'area di studio

I prelievi sono stati effettuati nel lago di Ganzirri (anche detto Pantano Grande) delle lagune di Capo Peloro collocate all'interno dell'omonimo complesso urbano di Ganzirri (38°.15' N, 15°.37' E; Messina, Sicilia; Fig.1.6).



Fig. 1.6 - Vista aerea dello Stretto di Messina e del lago di Ganzirri

L'origine delle lagune risale alla formazione alluvionale della costa orientale dello Stretto di Messina. Il materiale alluvionale, costituito da terreni cristallini, ha formato le colline che si affacciano sullo Stretto. Tutta la pianura costiera, che include i due pantani, è derivata quindi dall'apporto di sabbie detritiche e dalle correnti marine. Queste ultime hanno prodotto un cordone di dune che si estese fino a Capo Peloro. La laguna così creata è stata suddivisa in più parti a causa dei materiali trascinati dai torrenti, questo ha determinato la formazione di quattro pantani (Ganzirri, Madonna di Trapani, Margi e Faro). Più di quattro secoli fa lo scienziato messinese Francesco Maurolico riferiva invece di due laghi. Questo suggerisce che probabilmente il pantano di Margi sia stato prosciugato da interrimenti ed il Madonna di Trapani si sia collegato al pantano di Ganzirri o Pantano Grande.

Il Pantano Grande, la cui formazione si fa risalire tra il 3000 e il 2500 a.C., ha una superficie di 338.400 m² (lunghezza: 1860 m; larghezza massima: 282 m)

e una profondità che varia da 1.5 – 6.50 m. E' di formazione marina ma riceve l'apporto di acque dolci da vicine sorgenti.

Il Pantano comunica per mezzo di due canali (Catuso e Carmine) con lo Stretto di Messina e tramite il canale Margi con il Pantano Piccolo (zona Faro).

Il canale Catuso, scavato nel 1807, è un canale molto stretto e solo occasionalmente aperto al mare.

Il canale Margi, scavato nel 1810, non consente un grosso scambio con il Pantano Piccolo (< 1%; Giacobbe *et al.*, 1996).

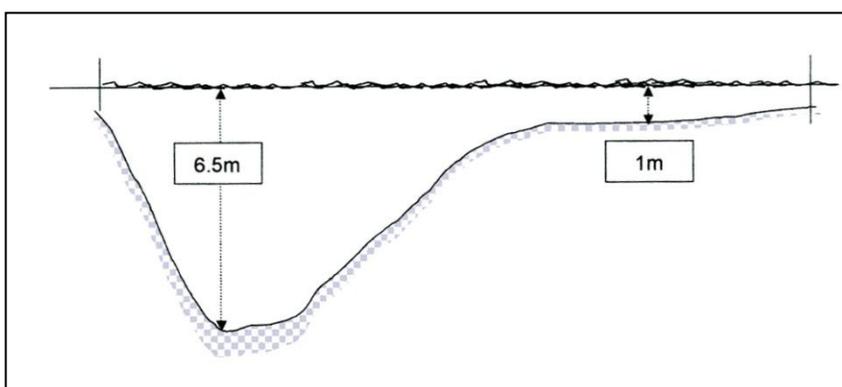
Il canale Carmine permette uno scambio di acque superficiali con lo Stretto di Messina, che è il punto di congiunzione (o forse meglio di separazione) tra due bacini, lo Jonio ed il Tirreno, contigui ma fisiograficamente distinti, aventi acque con caratteristiche fisico-chimiche ed oscillatorie diverse. In quest'area, anche in funzione della particolare geomorfologia, vi sono forti rimescolamenti e trasferimenti di masse d'acqua da un bacino all'altro, condizionati da correnti stazionarie e, in modo particolare, da correnti di marea. Le correnti stazionarie a livello della "sella" sottomarina, corrispondente alla sezione Ganzirri-Punta Pezzo, ove si riscontrano la minore ampiezza (poco meno di 4 Km) e le minori profondità (mediamente intorno agli 80-90 m fino ad un massimo di 120 m con profilo particolarmente accidentato), fluiscono verso sud dalla superficie a 30 m ed in senso inverso da questa profondità fino al fondo, creando rapide rimonte di acque profonde di origine levantina. Quando il mare Tirreno presenta bassa marea al suo confine meridionale con lo Stretto, il contiguo mare Jonio si trova in fase di alta marea; ciò è legato alla condizione di "canale di comunicazione" tra due bacini che si verifica nello Stretto. In fase di corrente "scendente" le acque tirreniche più leggere e meno salate scorrono sulle joniche più pesanti e più salate fino a riempire l'intera parte centrale dello Stretto, costeggiando preferenzialmente le coste Siciliane. All'opposto, con il predominio della corrente "montante", acque via via più pesanti interesseranno il centro del bacino affondando sulle acque tirreniche più leggere che, in precedenza, occupavano lo Stretto per versarsi quindi nel Tirreno, principalmente lungo le coste Calabre, una volta oltrepassata la "sella".

Le diverse caratteristiche delle acque dei due bacini e la loro non immediata miscibilità consentono alle stesse di mantenere sia la loro identità fisico-

chimica che biologica, anche a distanza dalla zona di origine. Le differenze tra le acque sono evidentemente notevoli a livello dei caratteri chimici (salinità ed alcalinità) ed in periodo estivo le differenze fisiche (temperatura e densità), già sensibili in primavera, si accentuano negli strati superiori (De Domenico *et al.* 1987).

Il Pantano Grande presenta caratteristiche morfologiche tali da permettere una ideale divisione in due zone: sud-ovest e nord-est, che si differenziano in maniera particolare per la loro batimetria e morfologia del fondo (Fig. 1.7), ma anche per le caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua.

La zona sud-ovest è caratterizzata da sedimenti fangosi contenenti in parte idrogeno solforato ed è in questa zona che si registrano il maggior apporto degli scarichi fognari, mentre la zona nord-est presenta sedimenti di grana grossolana (Giacobbe *et al.* 1996) ed è caratterizzata maggiormente dalle



permeazio
ni di acque
dolci di
origine
freatica. A
causa di
questa

Fig. 1.7 - Profilo verticale del lago di Ganzirri

particolare morfologia e batimetria, sono molto frequenti nella zona notevoli variazioni spazio-temporali dei principali valori quali temperatura, salinità e ossigeno disciolto (frequenti sono infatti crisi distrofiche).

Sul fondo del lago, inoltre, sono presenti macroalghe appartenenti alla divisione delle *Chlorophycophita* e *Rhodophycophita* (Cavalieri, 1963).

In particolare la zona nord-est è caratterizzata dalla presenza di mattes di *Chlorophyceae* affioranti in più punti. La loro estensione è variabile nel tempo e nello spazio anche perché il Pantano Grande è antropizzato ed ha subito nel tempo interventi di rastrellamento delle alghe ad opera dell'uomo (Gangemi, 2000). Inoltre in passato si sono registrati fenomeni di distrofia delle acque con relativo aumento del fitoplancton (Gangemi, 2000).

2 - SCOPO DELLA TESI

E' ormai noto come la biodiversità sia un chiaro ed inequivocabile indicatore della funzionalità ecosistemica. E se ciò è vero per i vari ambienti acquatici, lo è ancor di più per gli ambienti di transizione, quali lagune o zone estuarine, da sempre ritenuti i più produttivi e ricchi in diversità.

Lo scopo che la seguente ricerca si prefigge è quello di ampliare le conoscenze su vari e differenti aspetti inerenti la struttura della comunità microbica in un particolare ecosistema lagunare costiero antropizzato, quale è appunto il lago di Ganzirri. Lo studio si basa sulla possibile individuazione di differenze nella struttura della comunità microbica, tenendo in considerazione le principali componenti, le cui dinamiche di interazione sembrano variare non solo su scala stagionale, ma anche su scala giornaliera e addirittura su scala oraria.

In particolare viene focalizzata l'attenzione sulle possibili variazioni cui la struttura della comunità microbica può andare in contro in seguito all'ingresso o meno, a causa dell' escursione mareale, di acque tipicamente pelagiche, caratterizzate da proprie comunità microbiche, provenienti dell' adiacente stretto di Messina, collegato tramite un canale (canale Carmine).

Ulteriori analisi sono state effettuate sulle componenti abiotiche che caratterizzano l' area cercando di individuare altresì una possibile variazione della comunità seguendo un andamento giorno-notte.

Per tale scopo è stato effettuato uno studio ad elevata risoluzione temporale, in condizioni di massime correnti di marea, sulla dinamica e sulle interazioni del virioplancton, batterioplancton e picofitoplancton.

L'ambiente analizzato presenta eterogeneità spazio-temporali di alcuni parametri ecologici legati alla penetrazione di corpi d'acqua di differente origine, e precisamente: acque provenienti dallo Stretto di Messina (generate dal mescolamento di acque superficiali joniche e/o tirreniche con quelle profonde di origine levantina), acque di Faro (lago meromittico), acque di scarico urbano ed acque di origine freatica.

Ciò genera, all'interno del bacino, dei microcosmi dalle diverse caratteristiche chimico-fisiche, alle quali si suppone siano associate differenti comunità microbiche (virioplancton e batterioplancton).

Recenti studi sono stati effettuati nella stessa area (Vanucci et al. 2005). Tale ricerca ha messo in luce una maggior carica batterica e virale nelle stazioni di campionamento interne al lago rispetto ai valori riscontrati nel canale che collega lo stesso al mare.

Valori medi di $9,5 \times 10^6$ cell ml⁻¹ per la componente batterica e $1,38 \times 10^8$ cell ml⁻¹ per quella virale sono stati i risultati di un campionamento annuale (Giugno 2000 – Luglio 2001) e risultano essere tra i più alti in letteratura, confrontabili solo con quanto riscontrato in altri ambienti lagunari.

3 - MATERIALI E METODI

3.1 Strategia di campionamento

L'indagine su breve scala temporale è stata effettuata, previa consultazioni delle tavole di marea (Tab. 3.1), nei giorni 12 e 13 Luglio 2010 in corrispondenza del plenilunio e, quindi, in presenza di massimi di correnti mareali con direzione S→N (corrente Montante), e massimi di corrente mareali con direzione N→S (corrente Scendente) nello Stretto di Messina all'altezza del lago salmastro di Ganzirri. Ciò al fine d' incontrare i massimi di corrente in entrata ed in uscita dal lago.

Tab. 3.1 - Tavola di marea relativa al mese di Luglio 2010 nello Stretto di Messina; è stato evidenziato il periodo di campionamento e i relativi valori di marea.

STRETTO DI MESSINA (Ganzirri)												
ORE DEL FUSO -1 (+) Corrente entrante (montante)						(-) Corrente uscente (scendente)						
GIORNO	ORA STANCA	MAX CORRENTE ORA	VEL.	ORA STANCA	MAX CORRENTE ORA	VEL.	ORA STANCA	MAX CORRENTE ORA	VEL.	ORA STANCA	MAX CORRENTE ORA	VEL.
LUGLIO												
1	5.01	1.37	-3.19	10.23	7.29	1.36	16.12	13.33	-2.24	22.57	19.19	2.55
2	5.40	2.18	-3.05	11.21	8.11	1.41	16.58	14.24	-1.95	23.28	19.57	2.15
3	---	3.00	-2.92	6.20	9.01	1.50	12.27	15.19	-1.70	17.51	20.39	1.73
4	0.02	3.47	-2.82	7.04	10.00	1.64	13.41	16.23	-1.56	18.55	21.30	1.33
5	0.41	4.37	-2.77	7.53	11.08	1.88	14.52	17.28	-1.59	20.12	22.35	1.01
6	1.29	5.32	-2.78	8.43	12.16	2.23	15.58	18.35	-1.81	21.33	23.53	0.84
7	2.27	6.28	-2.89	9.34	13.16	2.67	16.53	19.35	-2.17	22.50	---	---
8	3.31	1.11	0.67	10.25	7.21	-3.07	17.42	14.08	3.13	23.51	20.30	-2.83
9	---	2.16	1.08	4.34	8.14	-3.29	11.15	14.55	3.56	18.28	21.19	-3.10
10	0.43	3.10	1.36	5.33	9.05	-3.52	12.01	15.38	3.91	19.10	22.05	-3.53
11	1.28	3.58	1.68	6.28	9.52	-3.69	12.48	16.19	4.13	19.51	22.48	-3.87
12	2.10	4.45	1.97	7.20	10.40	-3.77	13.33	17.01	4.21	20.30	23.32	-4.10
13	2.52	5.29	2.20	8.11	11.27	-3.74	14.18	17.41	4.12	21.10	---	---
14	3.33	0.15	-4.20	9.03	6.13	2.36	15.06	12.15	-3.58	21.48	18.21	3.87
15	4.16	0.59	-4.17	9.58	6.59	2.43	15.52	13.05	-3.31	22.28	19.03	3.46
16	5.00	1.43	-4.02	10.56	7.49	2.43	16.44	13.57	-2.95	23.10	19.48	2.92
17	5.48	2.31	-3.77	12.00	8.42	2.37	17.41	14.55	-2.56	23.53	20.37	2.32
18	---	3.20	-3.48	6.37	9.46	2.32	13.11	15.58	-2.23	18.46	21.35	1.70
19	0.41	4.16	-3.19	7.33	10.58	2.34	14.26	17.07	-2.04	20.07	22.50	1.19
20	1.35	5.13	-2.96	8.30	12.14	2.51	15.39	18.17	-2.07	21.39	---	---
21	2.39	0.21	0.90	9.26	6.13	-2.84	16.42	13.22	2.78	23.10	19.25	-2.28
22	---	1.41	0.89	3.43	7.12	-2.84	10.21	14.17	3.09	17.37	20.23	-2.80
23	0.16	2.43	1.02	4.46	8.07	-2.91	11.10	15.06	3.35	18.23	21.14	-2.93
24	1.04	3.33	1.21	5.41	8.56	-3.01	11.57	15.46	3.52	19.05	21.57	-3.20
25	1.41	4.15	1.39	6.29	9.41	-3.10	12.38	16.21	3.57	19.42	22.37	-3.40
26	2.14	4.50	1.56	7.13	10.24	-3.14	13.17	16.53	3.52	20.16	23.14	-3.52
27	2.41	5.21	1.70	7.54	11.03	-3.11	13.55	17.21	3.38	20.46	23.48	-3.56
28	3.10	5.50	1.82	8.35	11.43	-3.01	14.33	17.48	3.16	21.16	---	---
29	3.39	0.23	-3.52	9.16	6.20	1.94	15.09	12.24	-2.83	21.42	18.16	2.88
30	4.11	0.57	-3.43	10.00	6.51	2.02	15.50	13.07	-2.58	22.08	18.46	2.55
31	4.45	1.35	-3.29	10.50	7.28	2.08	16.33	13.52	-2.28	22.35	19.19	2.17

I campioni d'acqua sono stati prelevati sinotticamente nelle quattro stazioni prese in esame, st. M, st. A, st. B, st. C. I prelievi sono stati ripetuti con frequenza di circa 3 ore per un periodo di 25 ore: 1) h 17:01, corrente Montante, vel. 4.21 cm/sec; 2) h 20:30, stanca; 3) h 23:32, corrente Scendente, vel. 4.10 cm/sec; 4) h 2:52, stanca; 5) h 5:29, corrente Montante, vel. 2.20 cm/sec; 6) h 8:11, stanca; 7) h 11:27, corrente Scendente, vel. 3.74 cm/sec; 8) h 14:18, stanca; 9) h 17:41, corrente Montante, vel. 4.12 cm/sec.

La scelta delle stazioni di campionamento è stata basata sull'ideale percorso seguito dall'acqua marina in entrata e dall'acqua lacustre in uscita, per le Stazioni M ed A (vedi oltre), mentre la scelta delle altre due, Stazione B e Stazione C (vedi oltre), è stata effettuata a seguito della loro relativa lontananza dal canale (i.e. canale Carmine) che mette in comunicazione il lago col mare, e si suppone presentino una comunità microbica caratteristica del lago, prestandosi meglio a fornire eventuali informazioni sulla variabilità giorno-notte della comunità microbica.

Le quattro stazioni scelte per il campionamento dell'acqua superficiale (Fig. 2.1) sono così ubicate:

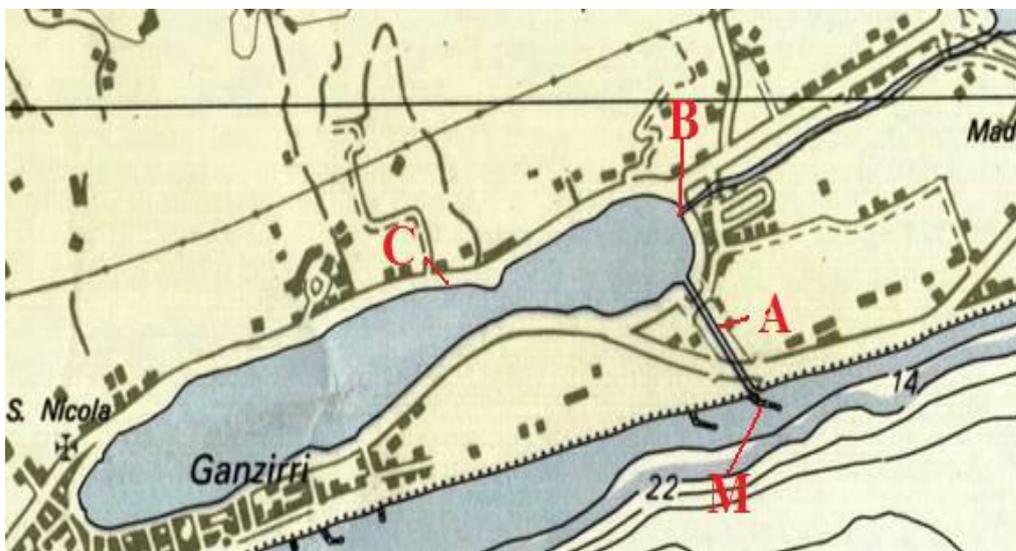


Fig. 3.1 – Lago di Ganzirri e stazioni di campionamento

- La stazione **M** è stata localizzata nella zona costiera, in un punto antistante l'imbocco del canale (canale Carmine) di comunicazione con le acque dello Stretto; la profondità rilevata è di circa 2,5 metri. I campioni d'acqua prelevati in tale sito dovrebbero presentare abbondanze microbiche e struttura di comunità riconducibili a quelle di ambienti marini e distinguibili da quelle riscontrabili nelle stazioni più interne al lago (St. B e St. C). Lo scopo di una stazione di campionamento in tale punto è l'osservazione di eventuali cambiamenti delle variabili biotiche e abiotiche in relazione ai flussi mareali.
- La stazione **A** è stata collocata nel canale Carmine nel quale transitano le acque in entrata ed in uscita dal lago; la profondità rilevata è di circa 0,5 metri. Tale sito è presumibilmente caratterizzato da una forte eterogeneità delle diverse variabili, biotiche e abiotiche, a causa dei riflussi e mescolamenti delle diverse masse d'acqua in transito.
- La stazione **B** è stata collocata nella zona nord-est del lago, in uno spazio compreso tra le imboccature del canale Carmine e del canale Margi, che collega il lago di Ganzirri col lago meromittico di Faro. La massima profondità rilevata è di circa 1,5 metri. Questa posizione permette di vedere gli scambi che possono avvenire nella traiettoria fra le due imboccature dei canali.
- La stazione **C** è stata localizzata nella zona centrale del lago. La collocazione in tale punto è scaturita a causa della maggiore distanza dai principali siti di comunicazione diretti con il mare, e mostra l'entità dell'influenza degli scambi d'acqua. La massima profondità rilevata è di circa 2 metri. Questa zona condiziona gli scambi tra la parte nord e la parte sud del lago.

I campioni d'acqua per lo studio del virioplancton, del batterioplancton e della componente procariotica del picofitoplancton, nonché per le analisi dei principali parametri chimico-fisici, sono stati prelevati alla quota di superficie.

Nella Tabella 3.2 è riportato il protocollo di campionamento in cui sono segnate le date e gli orari di campionamento. Tali orari sono quelli riportati nella tavola di marea ed indicativi. Come si può vedere è presente infatti una colonna dedicata alle osservazioni dirette di intensità e direzione del flusso d'acqua. Sono state inoltre effettuate le principali misure chimiche quali temperatura, salinità, ossigeno disciolto in modo da poter fornire una caratterizzazione ambientale dell'area di indagine.

Tab. 3.2 – Protocollo di campionamento. E' riportata la velocità della corrente montante (+) e scendente nello Stretto (-); la stazione e l'orario di campionamento. U = corrente uscente; E = corrente entrante; S = stanca; + = intensità corrente osservata.

Data	Ora c. m/s	St	ora camp.	Direzione corrente osservata
12-lug 2010	17.01 c. 4,21	M1	17:08	U+
		A1	17:01	U+++
		B1	17:01	U
		C1	17:04	E
	20.30 c. SA	M2	20:25	E++
		A2	20:30	E+
		B2	20:30	S
		C2	20:25	S
	23.32 c. -4,1	M3	23:34	E
		A3	23:32	E+++
		B3	23:32	S
		C3	23:30	S
13-lug 2010	2.52 c. SA	M4	3:00	U+
		A4	2:52	U+
		B4	2:52	U
		C4	2:57	S
	5.29 c. 2,2	M5	5:36	U
		A5	5:29	U++
		B5	5:29	S
		C5	5:25	S
	8.11 c. SA	M6	8:18	S
		A6	8:11	U+
		B6	8:11	E
		C6	8:24	U
	11.27 c. -3,74	M7	11:26	S
		A7	11:27	E++
		B7	11:27	U
		C7	11:25	E
	14.18 c. SA	M8	14:23	S
		A8	14:18	U
		B8	14:18	S
		C8	14:17	E
	17.41 c. 4,12	M9	17:53	U
		A9	17:55	U
		B9	17:55	U
		C9	17:55	E

3.2 Misure *in situ* e trattamento dei campioni

Ogni campione d'acqua è stato prelevato con bottiglie sterili e successivamente suddiviso in diverse aliquote per il trattamento e l'analisi dei principali parametri chimico-fisici (temperatura, salinità, pH e ossigeno disciolto), dei principali nutrienti, quali composti azotati e ortofosfati, nonché degli indicatori trofici quali concentrazione di Chl *a* e sostanza organica (POM).

La temperatura e la salinità sono state misurate *in situ* con un salinometro portatile YSI-80. Il pH è stato misurato sul posto con un pHmetro HANNA. Per quanto concerne le stime di O₂ disciolto, queste sono state effettuate seguendo la metodica Winkler; i campioni sono dunque stati fissati con i due reagenti di Winkler (MnSO₄ e KI in soluzione NaOH) contestualmente al prelievo per evitare variazioni di O₂ dovute a mescolamento o diffusione.

Per lo studio della struttura della comunità microbica si è provveduto alla suddivisione di diverse aliquote, ognuna delle quali ha seguito un differente iter.

Due falcon sterili da 50 ml (due repliche per campione) sono state utilizzate per lo studio quantitativo del virioplancton, batterioplancton nonché per la componente procariotica del picofitoplancton. Il campione è stato successivamente fissato con 2,5 ml di formalina al 40% (tamponata e prefiltrata su membrana di 0.02 µm di porosità). Le falcon sono state conservate in frigorifero a +4°C per poi, essere successivamente analizzate in laboratorio.

Infine per le analisi di biologia molecolare sono stati prelevati circa dieci litri di acqua, il campione è stato poi filtrato su filtri Millipore type gs (Ø47 mm; porosità 0,22 µm) mediante pompe peristaltiche. Il volume filtrato è stato di circa 2 – 4 litri per le stazioni M ed A, e di circa 1 – 2 litri per le stazioni B e C. Dopo aver effettuato quest'operazione i filtri sono stati riposti a -80 °C in modo da poter preservare l'integrità del DNA.

Trattandosi di analisi prevalentemente microbiologiche, e quindi particolarmente suscettibili di contaminazioni esterne, si è provveduto preventivamente a sterilizzare e/o lavare con HCl (in concentrazione 1:4), e successivamente risciacquare con acqua distillata, ciascuna bottiglia,

contenitore, apparato di filtrazione e quant'altro è entrato in contatto con i campioni in modo da garantire la minima contaminazione possibile.

3.3 Analisi chimico-fisiche

Come precedentemente riportato le misure di ossigeno disciolto, temperatura, salinità e pH sono state effettuate direttamente *in situ* mediante sonde parametriche e successivamente plottate in grafico. Trasportati i campioni in laboratorio si è provveduto al proseguimento delle ulteriori analisi per gli altri parametri che richiedono una procedura più elaborata.

Le analisi di ossigeno disciolto, pigmenti fotosintetici, principali nutrienti e sostanza organica particellata (POM) sono stati gentilmente effettuate per lo svolgimento di questa tesi dalla Dott.^{ssa} Giuseppina Pulicanò, ricercatrice del Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina dell'Università di Messina.

Si riportano brevemente i metodi utilizzati

3.3.1 Ossigeno

L'ossigeno disciolto è stato quantificato utilizzando il classico metodo di Winkler; una volta aggiunti i due reattivi ($MnSO_4$ e KI in soluzione NaOH, immediatamente dopo il prelievo) si forma un precipitato bruno di idrossido di manganese (IV), per reazione tra l'ossigeno disciolto ed il manganese bivalente introdotto (reattivo 1), in ambiente basico per idrossido di sodio (reattivo 2). La colorazione del precipitato è strettamente legata alla concentrazione di ossigeno presente. Il colore bruno si intensifica all'aumentare dell'ossigeno, mentre il precipitato si presenta bianco se l'ossigeno è assente. I valori possono essere espressi poi in ml/l o mg/l.

L'ossigeno è stato espresso anche in saturazione percentuale utilizzando la Formula di Benson e Krause (1980); facendo poi il rapporto percentuale fra l'ossigeno reale e il valore teorico ricavato dall'equazione di Benson e Krause, si ottiene il valore in saturazione percentuale (Sat O₂%) che viene usato come indice dello stato ambientale. Da tale rapporto si possono avere poi tre tipi di

risultati: Sat O₂% = 100: l'ossigeno misurato corrisponde al fisicamente solubile e c'è un sostanziale equilibrio fra produzione e consumo biotico. Sat O₂% > 100: l'ossigeno misurato indica la prevalenza di una sensibile produzione biotica (fotosintesi). Sat O₂% < 100: l'ossigeno misurato indica la prevalenza di un sensibile consumo biotico (respirazione).

3.3.2 Pigmenti fotosintetici

Per la determinazione della clorofilla *a* (Chl *a*) sono stati utilizzati filtri Whatman GF/F in fibra di vetro con porosità di 0.45µm (Ø 25 mm) ed un set di filtrazione con bicchieri da 250 ml; i filtri sono stati riposti al buio a -20°C fino al momento dell'analisi.

Per determinare la clorofilla *a* “attiva” è stato utilizzato il metodo spettrofotometrico secondo le metodiche riportate in “Metodi nell'Ecologia del plancton marino” (AA. VV., 1990).

3.3.3 Analisi dei principali nutrienti e della sostanza organica particellata

Qui di seguito si riportano in sintesi le metodiche utilizzate per i sopraddetti parametri. Le concentrazioni dei nutrienti (nitrati, nitriti, fosfati e ammoniaca) sono state determinate secondo le metodiche riportate da Saggiomo et al. (2010).

La concentrazione della sostanza organica particellata è stata valutata, dopo aver filtrato il campione su filtri Whatman GF/F (Ø 47 mm), dalla differenza in peso tra il peso secco (105°C) e quello delle ceneri (450°C), secondo le metodiche riportate da Boldrin et. al (2010).

3.4 Analisi biologiche

Contestualmente alle analisi di tipo ambientale si è provveduto ad analizzare la componente biotica, intesa come comunità microbica. Tali analisi sono state di differente tipo. Si è provveduto infatti sia ad una stima di tipo quantitativo delle principali componenti della comunità microbica quali batteri, virus e picofitoplancton procariotico, sia ad analisi di tipo qualitativo utilizzando la

recente tecnica molecolare di *fingerprinting* ARISA per studiare la struttura delle comunità batterica.

3.4.1 Analisi del virioplancton e del batterioplancton

Per la determinazione della densità particellare del virioplancton e cellulare del batterioplancton è stata impiegata quella che è ormai la metodica più comune, ovvero il conteggio diretto tramite microscopia ad epifluorescenza. Nel corso degli anni questa tecnica è stata sempre più affinata e i fluorocromi potenziati; per l'analisi dei nostri campioni è stato deciso di utilizzare la metodica proposta da Danovaro et al. (2010) e il relativo protocollo cui sono state apportate alcune modifiche per meglio adattarsi alla nostra tipologia di campioni.

I campioni sono stati filtrati su filtri sterili Whatman di porosità 0.02 μm e diametro \varnothing 25 mm. A causa di una maggiore abbondanza batterica e virale in ambienti salmastri rispetto alle normali acque marine, aperte o costiere, si è reso necessario filtrare volumi d'acqua differenti a seconda della stazione presa in esame, in modo da poter ottenere preparati facilmente analizzabili e confrontabili. In alcuni casi si è ritenuto necessario variare la quantità di campione da filtrare anche tra le due stazioni poste all'interno del lago in quanto le diverse condizioni idrologiche hanno portato a notevoli variazioni di abbondanza persino su piccola scala spazio-temporale.

Le diverse quantità di campione scelte (da 0,5 a 2 ml) per la filtrazione sono state quindi il frutto di varie prove atte ad ottimizzare la lettura microscopica finale. Ogni aliquota di campione, è stata quindi versata nel bicchiere dell'apparato di filtrazione equipaggiato con una membrana filtrante Whatman (porosità 0.02 μm , \varnothing 25 mm). Si è proceduto alla filtrazione, prestando attenzione che la depressione non superasse le 5 atm (< 100 mm Hg), per evitare il danneggiamento delle cellule. Il filtro è stato successivamente posto in una piastra petri piccola, e ivi messo a contatto con 100 μl di fluorocromo SYBR Gold (Invitrogen) a concentrazione 8 X. Tale concentrazione è stata ottenuta mediante successive diluizioni dallo stock iniziale (10.000 X) tramite buffer TE (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA, pH 7.4 – 7.6) prefiltrato su filtro 0.02 μm . E' stato necessario preparare giornalmente tali diluizioni poiché il SYBR

Gold non è stabile a basse concentrazioni. Una volta aggiunto, il fluorocromo è stato distribuito omogeneamente e infine fatto incubare al buio per 15 minuti.

E' stato deciso di utilizzare il SYBR Gold poichè tale colorante è un potente intercalante sia del DNA che dell'RNA e inoltre è in grado di legarsi al materiale genetico sia a singolo che a doppio filamento, presentando indubbi vantaggi nell'identificazione dei virus e facilitandone il conteggio (Noble & Fuhrman, 1998).

Qualsiasi operazione svolta durante l'analisi è stata eseguita rispettando i criteri di sterilità, lavorando sotto cappa, vicino al becco Bunsen, con puntali sterili monouso; inoltre, estrema attenzione è stata posta nel lavaggio e nella successiva sterilizzazione di tutto il materiale utilizzato.

Una volta fatto agire il SYBR Gold il filtro è stato posto nuovamente sull'apparato di filtrazione per eliminare il colorante in eccesso e infine posto su un vetrino portaoggetti, accuratamente pulito, su cui erano stati aggiunti 20 µl di antifade (glicerolo in soluzione PBS). Una quantità analoga di antifade è stata posta sul filtro che si è venuto quindi a trovare fra due zone con un indice di rifrazione omogeneo. Si è coperto il filtro con un vetrino coprioggetto e lo si è conservato al buio a -20°C.

Per il conteggio delle particelle virali e delle cellule batteriche è stato utilizzato un microscopio Axiovert 100 (Zeiss) equipaggiato per l'epifluorescenza con un sistema di illuminazione costituito da una lampada a vapori di mercurio HBO di 50 W. L'osservazione è stata effettuata ad un ingrandimento di 1000x, realizzato mediante la combinazione di un obiettivo 100x e di oculari ad ingrandimento 10x. Uno dei due oculari era munito di lente reticolata per semplificare il conteggio.

Per l'osservazione del virioplancton e del batterioplancton è stato utilizzato un set di filtri con campo di eccitazione nel blu (filtro di eccitazione PB 450-490, ripartitore cromatico FT 510 e filtro di sbarramento LP 520).

Il numero dei campi ottici nei quali è stato effettuato il conteggio è stato generalmente di dieci, subendo variazioni in dipendenza delle concentrazioni del virioplancton e del batterioplancton nel campione, in modo da ottenere coefficienti di variazioni minori del 20%. Infine per ogni campione d'acqua sono state preparate e osservate al microscopio tre repliche.

Le cellule batteriche che presentavano un setto completo al loro interno, tale da sembrare cellule accoppiate, sono state considerate in divisione; la frequenza dei batteri in divisione (FDC) è stata calcolata dividendo il numero di cellule in divisione per il numero totale dei batteri conteggiati.

Virus e batteri sono stati discriminati seguendo un criterio dimensionale: i virus hanno dimensioni comprese fra 0.015 e 0.2 μm , i batteri fra 0.2 e 2 μm . Noble & Fuhrman (1998) sostengono che qualora i batteri di piccole dimensioni venissero contati come virus, si commetterebbe un errore minore del 5% e pertanto pressoché trascurabile.

3.4.2 Analisi della comunità picofitoplanctonica

Per effettuare le analisi sulla frazione procariotica del picofitoplancton è stata utilizzata la metodica della microscopia ad epifluorescenza riportata da Caroppo et al. (2010) cui sono state apportate alcune modifiche per meglio adattarsi alla nostra tipologia di campioni.

Tale metodica si basa sulla visualizzazione delle cellule che posseggono pigmenti fotosintetici che, eccitati con luce di opportuna lunghezza d'onda, emettono fluorescenza naturale (autofluorescenza). I principali pigmenti fotosintetici sfruttati per il conteggio del picofitoplancton sono la clorofilla *a* (o la divinil-clorofilla *a* per le proclorofite) e le ficobiline, rappresentate da una varietà di ficocianine e ficoeritrine. Le ficobiline sono utilizzate per evidenziare i cianobatteri. Tra questi, si distinguono quelli con prevalenza in ficocianina, quelli con ficoeritrina di tipo I e quelli con ficoeritrina di tipo II (Wood *et al.*, 1985). In microscopia, fra le popolazioni marine è possibile distinguerne alcune di diversa valenza ecologica in base alle ficobiline predominanti ed al tipo di ficoeritrina. La ficoeritrina di tipo I contiene, in varie proporzioni, entrambi i cromofori ficourobilina (PUB) e ficoeritrobilina (PEB) che presentano rispettivamente un massimo di assorbimento a 490-500 nm (blu) e a 540-565 nm (verde); la ficoeritrina tipo II ha solo il cromoforo PEB e un massimo di assorbimento a 540-565 nm. Entrambi i tipi di ficoeritrine quindi, assorbono luce verde ed emettono fluorescenza giallo-arancio (550-580 nm), mentre solo la ficoeritrina di tipo I assorbe efficientemente anche la luce blu. Più nel dettaglio, è stato osservato come popolazioni picofitoplanctoniche

procariotiche che presentino ficoeritrina di tipo I siano ecologicamente predominanti in ambienti oligotrofici, quali possono essere masse d'acqua tipicamente marine, mentre popolazioni caratterizzate dalla presenza di ficoeritrina di tipo II ed alte concentrazioni di ficocianina siano predominanti in ambienti eutrofici e di transizione.

Passando alla procedura di conteggio, questa prevede una serie di passaggi effettuati in laboratorio, rispettando i criteri di sterilità, lavorando sotto cappa, vicino al becco Bunsen, con puntali sterili monouso.

Un'aliquota del campione d'acqua, variabile fra 1 e 8 ml (in relazione allo stato trofico del campione), viene versata nel bicchiere dell'apparato di filtrazione, precedentemente allestito con una membrana filtrante Nucleopore in policarbonato nero di 25 mm di diametro e porosità di 0.2 μm . La filtrazione viene eseguita a bassa pressione (< 50 mm Hg), per evitare il danneggiamento delle cellule.

Una volta completata questa operazione, il filtro è stato posto su di un vetrino portaoggetto, accuratamente pulito, su cui è stata precedentemente versata una piccola goccia di olio per immersione a bassa fluorescenza (tipo Zeiss 518 C, con un indice di rifrazione di 1.518 a 23°C). Un'altra goccia di olio viene posta sul filtro che si viene quindi a trovare fra due zone con un indice di rifrazione omogeneo. Il filtro viene coperto con un vetrino coprioggetto e si conserva al buio a -20°C fino all'osservazione microscopica.

Per ogni campione d'acqua sono stati preparati tre vetrini, ovvero tre repliche, al fine di ottenere una valutazione significativa della stima dell'abbondanza picofitoplanctonica.

Per il conteggio cellulare è stato utilizzato un microscopio Axiovert 100 (Zeiss) equipaggiato per l'epifluorescenza con un sistema di illuminazione costituito da una lampada a vapori di mercurio HBO di 50 W.

L'osservazione è stata effettuata ad un ingrandimento di 1000x, mediante la combinazione di un obiettivo 100x e di oculare ad ingrandimento 10x.

3.5 Analisi molecolari

Le analisi di carattere molecolare sono state effettuate successivamente in laboratorio con lo scopo di fornire indicazioni riguardanti la struttura della comunità evidenziando eventuali differenze tra i diversi siti di campionamento e all'interno dello stesso sito tra i diversi tempi in cui sono stati effettuati i prelievi. Tale fase è costituita da successivi step propedeutici l'uno all'altro.

3.5.1 ARISA

Tra le diverse tecniche di *fingerprinting* si è deciso di applicare unicamente la tecnica denominata ARISA (Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis). Tale scelta è stata dettata da una resa maggiormente efficace della suddetta tecnica, capace di individuare differenze all'interno della comunità fino al livello di sotto-specie (Danovaro et al., 2006). La suddivisione dei prodotti di PCR avvengono in base alla lunghezza del frammento e quindi indipendente dalla composizione molecolare. Questa suddivisione sfrutta quella che è la naturale variabilità specifica che caratterizza lo spazio intragenico (ITS), compreso tra i geni 16S e 23S.

La procedura di preparazione per l'analisi con ARISA si basa sul principio secondo il quale ogni frammento amplificato con la PCR ha una specifica lunghezza in bps (cioè paia di basi) ed è considerato un'unità tassonomica. Infatti il tratto ITS-1 è caratterizzato da una variabilità nel numero di basi, da 100 pbs a oltre 1000 pbs, specifica a livello di sottospecie (Borneman & Triplett, 1997; Daffonchio *et al.*, 2003). Dato che ai *primers* usati durante l'amplificazione è legata una molecola fluorescente, i frammenti amplificati vengono riconosciuti dal laser del sequencer a capillare attraverso il quale i frammenti migreranno. I frammenti vengono separati elettroforeticamente a 2800 V per 10 ore in un gel di acrilammide (5%). Lo standard da utilizzare per l'identificazione della lunghezza dei vari frammenti è ROX 1000BV (Applied Biosystem; Fig. 2.2). Per ottenere l'esatta lunghezza del frammento ITS-1 è inoltre necessario sottrarre al valore calcolato dal programma di analisi GeneScan, circa 300-350 paia di basi che sono esterne all'ITS-1 (circa 200 del gene 16S e 125 del gene 23S).

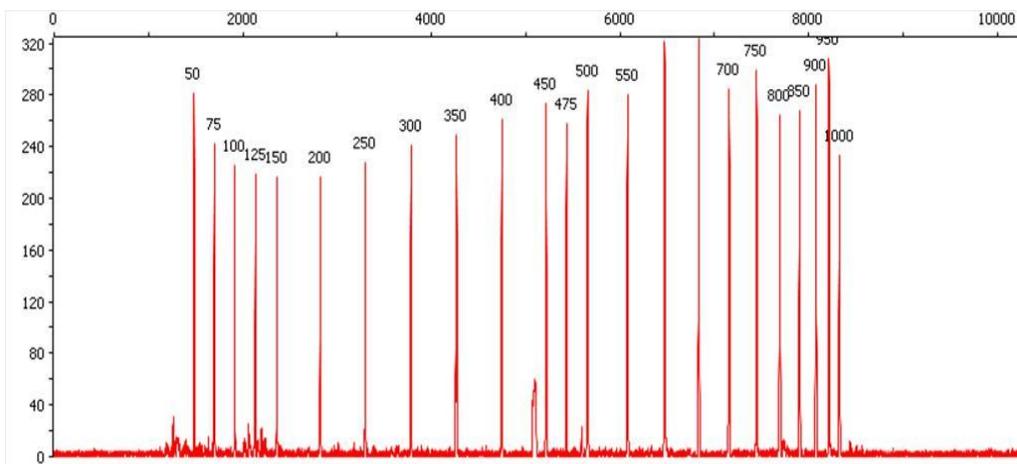


Fig. 2.2 – Standard ROX 1000BV utilizzato come riferimento per l'identificazione e analisi dei picchi ARISA. Sono presenti picchi di cui è nota sia l'ampiezza che il numero di paia di basi corrispondenti.

3.5.2 Estrazione DNA

Una volta provveduto a filtrare le opportune quantità di campione per ogni stazione, si è reso necessario passare all'estrazione del DNA da ogni supporto filtrante (Millipore type GS, Ø47mm; 0.22µm). Il DNA batterico della comunità totale è stato estratto tramite il kit QIAGEN Dneasy. Ogni filtro è stato sminuzzato mediante bisturi sterile e posto nell'apposita eppendorf fornita nel kit. In seguito è stata seguita la procedura fornita dal produttore che comprende l'aggiunta di buffer di lisi enzimatica, successivi cicli di centrifuga e buffer di lavaggio alternati, ed infine l'utilizzo di un buffer eluente che ha permesso di ottenere circa 200 µl di DNA estratto per ogni campione.

Una volta estratto il materiale genetico si è provveduto ad effettuare una quantizzazione, per avere la certezza della presenza dello stesso, mediante kit QUBIT Invitrogen.

3.5.3 Amplificazione mediante PCR

Le reazioni di PCR sono state realizzate utilizzando un termociclatore Applied Biosystem *Geneamp 9700*.

Durante questo procedimento si è amplificato il tratto genomico ITS-1, utilizzato per la tecnica ARISA e si è utilizzato la coppia di primers universali specifici, questi sono: il 16S-1406F (5'FAM- TGYACACACCGCCCGT-3'), marcato all'estremità 5' con il fluorocromo FAM ed il 23S-125R (5'TET-GGGTTBCCCCATTCRG-3'). sintetizzati da MWG (Germany).

La miscela di PCR (volume finale 50 µl) conteneva entrambi i primers a 0.2 µM, buffer di reazione (1 X), 1,5 mM di MgCl₂, 0.2 µM di ogni deossinucleoside trifosfato (Promega) e 1 unità di *Taq* polimerasi (Titanium).

Il protocollo di PCR utilizzato è stato specificatamente messo appunto e comprende: denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, seguita da 25 cicli di denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing a 50°C per 1 minuto ed estensione a 72°C per 2 minuti. La reazione è stata completata da un'estensione finale di 72°C per 10 minuti. Il risultato della PCR è stato analizzato mediante gel di agarosio allo 1% in tampone TAE, colorato con SYBR safe (Invitrogen). I prodotti di PCR sono stati purificati mediante kit QIA PCR Purification Kit, quantificati mediante gel d'agarosio (1%, wt/vol) comparandoli con un DNA standard (Ladder mix), e preparati per il successivo invio presso la ditta BMR Genomic che assicura il servizio di Genescan.

3.5.4 Analisi dei ferogrammi ARISA

Il servizio commerciale BMR Genomics assicura l'analisi dei frammenti fluorescenti (servizio Genescan) e genera per ogni campione un tracciato (ferogramma) nel quale vengono riportati i differenti picchi (ordinati in base alla lunghezza) ed in base all'intensità di fluorescenza.

L'analisi preliminare dei risultati prevede, per ogni singolo ferogramma, il calcolo del threshold (come riportato da Luna et al., 2006), l'eliminazione di tutti i picchi la cui intensità di fluorescenza risulti inferiore al threshold e l'eliminazione di tutte le "shoulders" (picchi contigui la cui lunghezza differisce di meno di 2 basi).

Eliminati tutti i picchi spuri, i differenti data set devono essere allineati per poterli confrontare fra di loro. Tale operazione è stata effettuata tramite il programma Web-based T-Align (Smith et al., 2005), originariamente creato per l'analisi T-RFLP, ma applicabile con successo anche all'analisi ARISA. Tutti i dati vengono immessi on-line organizzati su un unico foglio Excell (avendo cura di riportare la lunghezza del picco e la relativa fluorescenza percentuale) ed il programma allinea tutti i dataset fra di loro, generando una matrice unica che può essere utilizzata per le successive elaborazioni.

3.6 Analisi statistica dei dati

Per individuare le differenze, dei parametri biotici e abiotici, fra le stazioni è stato effettuato uno studio univariato mediante l'analisi della varianza (ANOVA) dopo una trasformazione $\log(x + 1)$.

È stata effettuata invece un'analisi di correlazione Spearman rank per saggiare il grado di correlazione tra le variabili studiate.

Per quanto concerne le analisi sulla struttura di comunità batterica è stata creata una matrice di similarità, calcolata secondo Bray-Curtis, e previa trasformazione logaritmica dei dati. La struttura della comunità batterica di ogni campione è stata ottenuta mediante l'analisi dei ferogrammi forniti dall'ARISA, basandosi sull'assunzione che il numero di picchi, presenti in ogni campione, corrisponda al numero di specie e che la fluorescenza degli stessi picchi corrisponda all'abbondanza relativa di ogni componente (Luna et al., 2004; Luna et al., 2006).

Sulla base della matrice di similarità è stata effettuata una *cluster analysis* che ha restituito dei dendogrammi relativi alla similarità dei differenti campioni; la visualizzazione delle possibili differenze tra le comunità è stata ottenuta inoltre mediante la tecnica di ordinamento nMDS, la quale non fornisce però correlazioni lineari.

La significatività delle differenze tra le comunità dei diversi gruppi di campioni è stata indagata tramite il test statistico ANOSIM (Analysis of Similarities); questa tecnica riflette le differenze presenti tra i diversi gruppi messi a

confronto in contrasto con le differenze presenti tra i campioni dello stesso gruppo. Il valore dell'R-statistico ottenuto è compreso tra -1 e 1, ma più generalmente tale valore ricade tra 0 e 1; tanto più il valore di R si avvicina ad 1, maggiori sono le differenze tra i diversi gruppi esaminati, viceversa, tanto più R si avvicina a 0, quanto più l'ipotesi nulla H_0 viene accettata, ovvero non vi sono differenze nella composizione della comunità dei gruppi in esame. Ciascun valore ottenuto è poi considerato significativo qualora $p < 0.05$.

Infine, per ottenere maggiori confronti tra i diversi campioni sono stati calcolati anche i principali indici di diversità; tra questi citiamo il numero totale di ribotipi, ovvero la ricchezza genotipica (S') e l'indice di diversità di Shannon-Wiener (H') definito come:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i$$

dove:

p_i = frequenza dell'i-esimo taxon stimata come n_i/N

n_i = abbondanza dell'i-esimo taxon del campione

N = il numero totale di individui nel campione.

Tale indice tiene conto del numero di OTU (Operational Taxonomic Unit) presenti e la loro importanza relativa all'interno di ogni campione.

E' stato calcolato infine l'indice di omogeneità (o evenness) di Pielou (J') definito come:

$$J' = H'/H'_{\max}$$

dove:

H' = Indice di Shannon-Wiener calcolato

$H'_{\max} = \log_2 S$

con S = numero di taxa.

Tale indice riflette l'importanza relativa di ogni taxon all'interno dell'intero dataset.

Tutti gli indici di diversità e le differenze nella composizione della comunità nei diversi campioni sono stati calcolati usando il software PRIMER 6 & PERMANOVA +.

4 - RISULTATI

I risultati di seguito riportati hanno lo scopo di illustrare le variazioni, ad elevata risoluzione temporale, dei principali parametri chimico-fisici e della comunità microbica caratterizzanti l'area di studio. Tutti i dati si riferiscono ad un monitoraggio della durata di 24 ore, con campionamenti effettuati a intervalli di tre ore l'uno dall'altro, per un totale di 9 campionamenti (per ognuna delle 4 stazioni campionate), seguendo le tavole di marea relative all'area dello Stretto di Messina prospiciente il lago di Ganzirri.

4.1 Principali parametri chimico-fisici

4.1.1 Temperatura

Durante il periodo di indagine (dalle ore 17:08 del 12/07/2010 alle ore 17:53 del 13/07/2010), e considerando l'intero set di dati, il valore minimo di temperatura, pari a 19°C, è stato registrato nella stazione M, posta nello Stretto di Messina, in prossimità dell'imboccatura del canale (canale Carmine) che collega lo Stretto al lago; il valore massimo di T 32.2°C è stato riscontrato nelle zone più interne del lago, stazioni B e C. Il valore medio è risultato pari a 27°C (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 – Parametri statistici relativi a: temperatura (T), salinità (S), pH, ossigeno, nutrienti inorganici, Clorofilla *a* (Chl *a*) e sostanza organica particellata (POM), riferiti all'intero set di dati.

	T°C (°C)	S Psu	pH	O ₂ mg/l	O ₂ sat %	NH ₄ ⁺ µm/l	NO ₂ ⁻ µm/l	NO ₃ ⁻ µm/l	PO ₄ ⁻ µm/l	Chl <i>a</i> µg/l	POM mg/l
N° osserv.	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
min	19,00	32,40	8,20	2,14	32,56	1,47	0,09	0,74	0,12	0,21	0,60
max	32,20	37,50	8,83	15,43	256,66	15,00	2,39	16,24	3,95	4,51	4,80
media	27,03	35,11	8,49	7,63	117,68	7,61	0,41	4,58	0,76	2,42	2,23
Dev. Stand	3,99	1,60	0,15	3,13	52,70	3,20	0,51	2,93	0,94	1,47	1,13
c.v	0,15	0,05	0,02	0,41	0,45	0,42	1,24	0,64	1,22	0,61	0,51
mediana	27,85	35,35	8,50	7,28	111,64	7,53	0,21	3,63	0,41	2,72	1,88
Err. Std.	0,67	0,27	0,02	0,52	8,78	0,53	0,09	0,49	0,16	0,24	0,19

Nella stazione M l'escursione giornaliera di temperatura è stata di circa 7.6°C (range: 19.0–26.6°C), mostrando i valori minori tra il tardo pomeriggio (ore 20:00) e le prime ore della giornata (ore 3:00); il valore medio della stazione è stato di circa 22.7°C (Tab. 3.2; Fig. 4.2).

Nella stazione A, posta nel canale Carmine, è stata registrata la maggiore escursione termica di tutta l'area di indagine (range: 19.7–31.5°C; valore medio: 25.4°C). Dal grafico riportato in figura 4.1 risultano evidenti tre massimi di T, registrati rispettivamente durante il 1°, 6° e 9° prelievo d'acqua, in concomitanza ad una forte corrente in uscita dal canale Carmine in direzione dello Stretto e, in base alle tavole di marea relative all'area dello Stretto prospiciente Ganzirri, durante i valori massimi di marea montante. Per contro, i valori minimi di temperatura, registrati durante il 4° e 7° prelievo, sono stati osservati in presenza di una forte corrente in entrata nel canale proveniente dallo Stretto e corrispondente ai massimi di marea scendente.

Nelle stazioni B e C, posizionate rispettivamente nella zona nord-est e nella zona centrale del lago, l'andamento della temperatura è risultato simile (Fig. 4.1) e fondamentalmente legato alle variazioni giornaliere dell'irraggiamento solare, e registrando valori medi più alti (St. B, 29.7°C; St.C, 30.3°C; Tab. 4.2) rispetto alle stazioni M ed A.

In figura 4.2 sono riportati i valori medi di T; l'analisi della varianza (ANOVA), ha evidenziato una differenza significativa tra i valori della temperatura della stazione M e delle stazioni B e C (ANOVA, $p < 0.0001$), seguite dalle differenze tra la stazione A e le zone interne del lago (staz B e C; ANOVA, $p < 0.001$). Non è emersa invece una differenza significativa tra le temperature delle stazioni A e M e tra le stazioni B e C (ANOVA, $p > 0.05$).

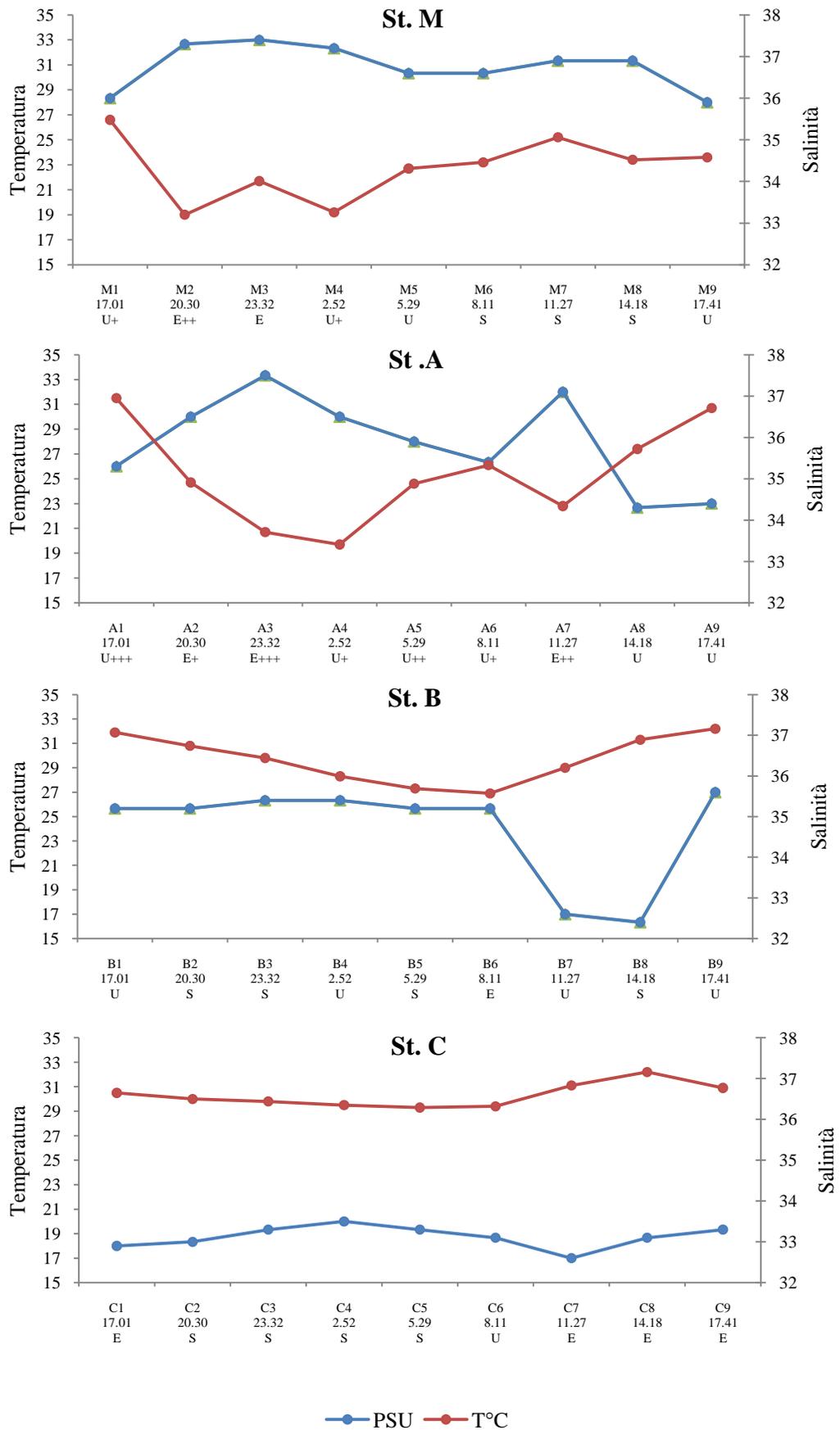


Fig. 4.1 - Andamento temporale della temperatura (T °C) e della salinità (S) nelle quattro stazioni prese in esame.

4.1.2 Salinità

Considerando l'intero set di dati, il valore minimo di salinità (32.4) è stato rilevato nella stazione B, mentre il valore massimo (37.5) è stato rilevato nella stazione A, il valore medio del parametro, durante l'intera indagine, è stato di 35.11 (Tab. 4.1).

L'andamento temporale della salinità nella stazione M presenta un valore minimo di 35.9, registrato durante l'uscita di acqua dal canale Carmine in direzione dello Stretto (ore 17:53), in concomitanza di una forte corrente montante come riportato dalla tavola di marea relativa alla zona, ed un valore massimo di 37.4, durante il campionamento delle ore 20:00, in concomitanza all'entrata di acqua marina nel canale e corrispondente ad una corrente scendente nello Stretto (Fig. 4.1). Il valore medio è risultato pari a 36.7 (Tab 4.2).

Nella stazione A, la salinità presenta maggiori variazioni rispetto alla vicina stazione M. Il valore medio della stazione si attesta su 35.9, con un minimo di 34.3 alle ore 14:18 (con corrente uscente dal lago), e con due massimi (37.1 e 37.5) in corrispondenza di forti correnti in entrata dal mare in direzione del lago (Fig. 4.1). In tutti i campionamenti in cui si sono rilevati i valori più bassi di salinità si è in presenza di forti correnti in uscita dal lago in direzione dello Stretto durante fasi di corrente montante in cui le acque dello Jonio si riversano nel bacino Tirrenico prevalentemente lungo la costa calabrese. Situazione inversa si osserva nei campionamenti caratterizzati dai valori più alti di salinità, effettuati durante fasi di corrente scendente, che scorre principalmente seguendo la costa siciliana, con ingresso di acque marine lungo il canale Carmine.

Nella stazione B la salinità ha valori relativamente costanti (35.2-35.4) nei primi 6 campionamenti, mentre durante il 7° e 8° campionamento (effettuati rispettivamente alle ore 11:26 e 14:18), è stata registrata una brusca caduta dei valori (~ 32.5; Fig. 4.1), verosimilmente dovuta all'imput di masse d'acqua dolce di origine alloctona; durante l'ultimo campionamento si è invece avuto un aumento della salinità il cui valore è andato a riposizionarsi intorno alla media della stazione. All'imput di queste masse d'acqua alloctona sono

riconducibili anche i minimi di salinità riscontrati, sinotticamente, nella stazione C (32.6; 7° campionamento; vedi oltre), e ragionevolmente più tardivi, nella stazione A con acqua in uscita dal lago (campionamenti 8 e 9).

Nella stazione C dove sono stati riscontrati i valori di salinità più bassi dell'intera area di studio (valore medio: 33.1; Tab. 4.2) e un andamento relativamente costante nel tempo (Fig. 4.1).

In figura 4.2 sono riportati i valori medi di S per le 4 stazioni e, per quanto concerne il confronto statistico, la salinità è risultata significativamente più elevata nella stazione M rispetto alle stazioni più interne del lago, B e C (ANOVA, $p < 0.001$). Ulteriori differenze significative sono state evidenziate tra la stazione A e i siti B e C, sebbene tali differenze siano meno marcate (ANOVA, $p < 0.05$). Non vi è invece un significativo discostamento dei valori medi di salinità delle stazioni M ed A (ANOVA, ns).

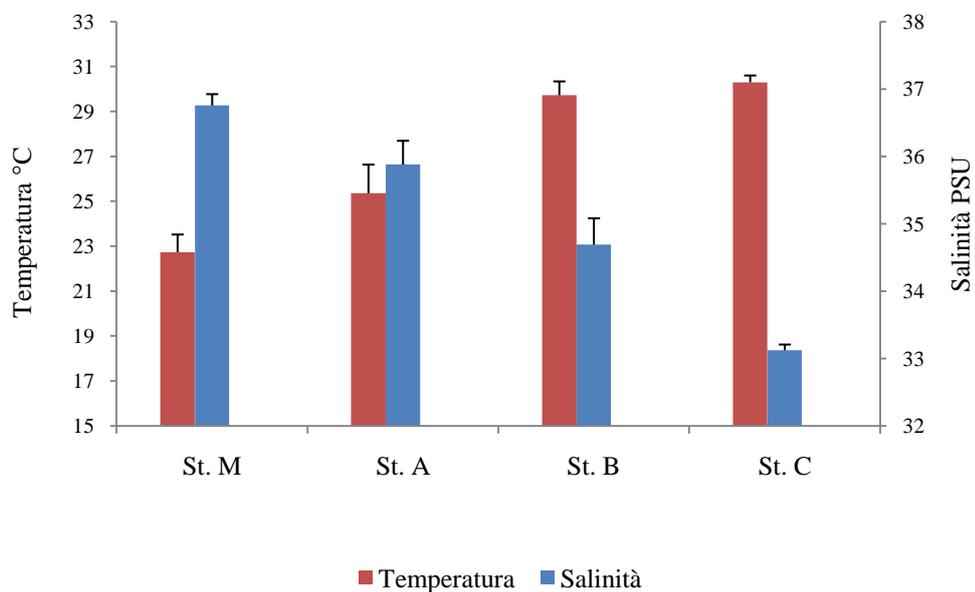


Fig. 4.2 – Valori medi di temperatura (T °C) e salinità (S) per ciascuna delle quattro stazioni prese in esame

4.1.3 pH

Gli ambiti di variazione del valore del pH rilevati nel periodo di indagine sono riportati nella tabella 1. Considerando l'intero set di dati, il valore medio di pH è risultato pari a 8.49. Non sono state evidenziate differenze significative tra i valori medi dei diversi siti di campionamento (ANOVA, $p > 0.05$). Tutti i siti, infatti, presentano un andamento temporale privo di variazioni significative, tuttavia, nella stazione A e nella B si riscontrano valori massimi all'inizio e alla fine del campionamento con una caduta durante le ore notturne tra il quarto e il sesto campionamento (dati non mostrati).

4.1.4 Ossigeno

Durante l'analisi si è provveduto ad effettuare misurazioni dell'ossigeno disciolto, espresso sia come mg/l che in saturazione percentuale. Durante l'intera indagine il valore medio dell'ossigeno è stato di 7.63 mg/l con una saturazione del 117%. Il valore minimo riscontrato è stato di 2.14 mg/l mentre il massimo rilevato è stato di 15.43 mg/l (Tab. 4.1); entrambi i valori sono stati registrati nella stazione B (vedi oltre).

L'andamento temporale del parametro ossigeno presenta forti oscillazioni nelle stazioni A e B; i rilievi hanno messo in luce valori massimi di concentrazione, per entrambi i siti, durante il primo campionamento, effettuato alle ore 17:01; successivamente si è osservata una graduale caduta dei valori durante le ore notturne con un picco minimo, per entrambi i siti, durante il campionamento delle ore 8:11, per poi osservare una risalita dei valori fino ad un massimo durante l'ultimo prelievo alle ore 17:55 (Fig. 4.3). L'andamento dell'ossigeno disciolto nelle restanti due stazioni, M e C, non ha mostrato variazioni particolarmente significative durante l'intero periodo di campionamento (Fig. 4.3).

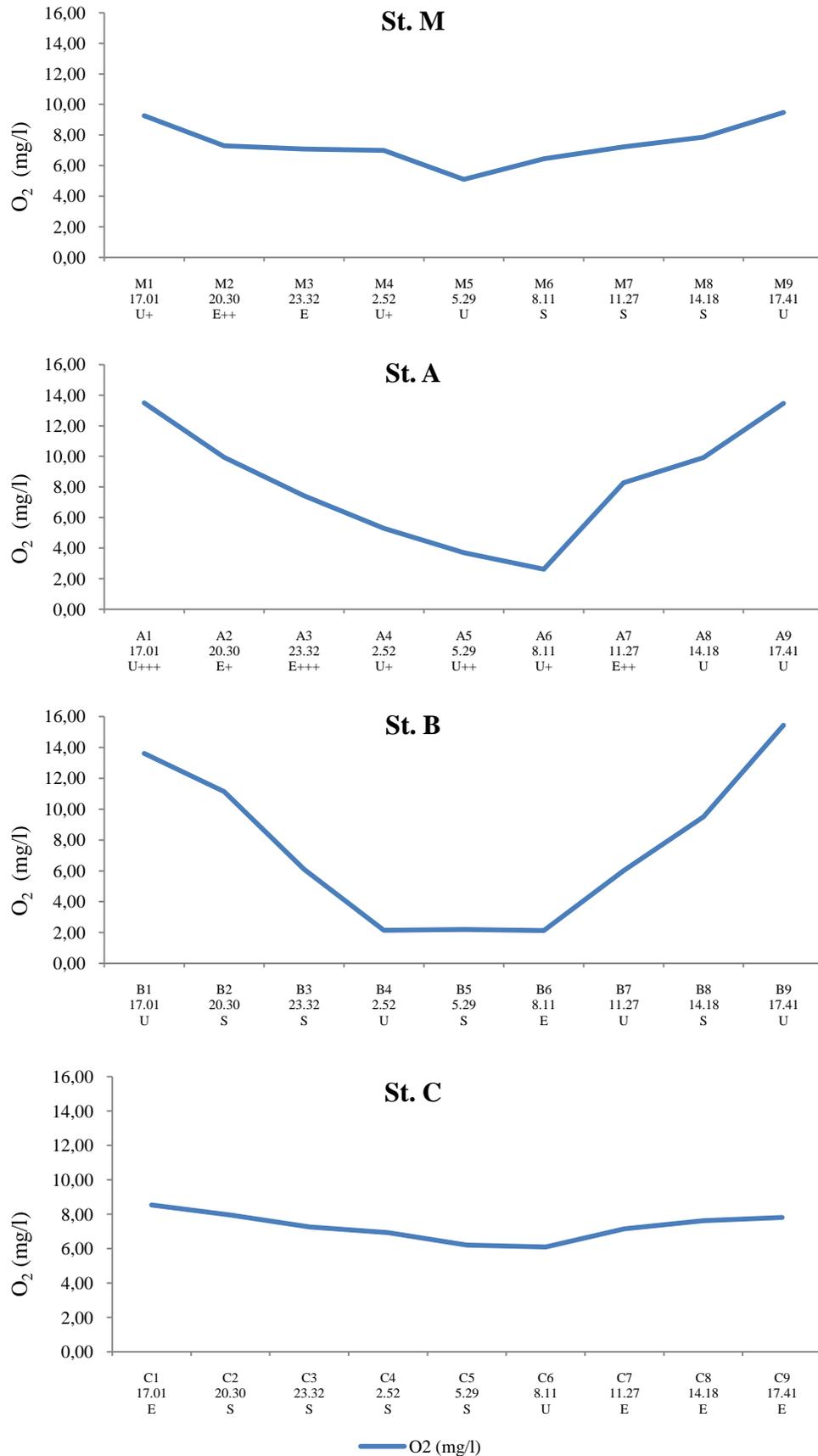


Fig. 4.3 – Andamento temporale della concentrazione di ossigeno disciolto (mg/l) nelle quattro stazioni in esame.

L'analisi statistica, relativa ai valori medi della concentrazione di ossigeno nei quattro siti in esame, ha rinvenuto come la stazione A abbia il valore medio più elevato, tuttavia, a causa dell'eterogeneità dei dati, non è stata evidenziata alcuna differenza significativa tra i valori medi delle diverse stazioni (Fig. 4.4; ANOVA, ns).

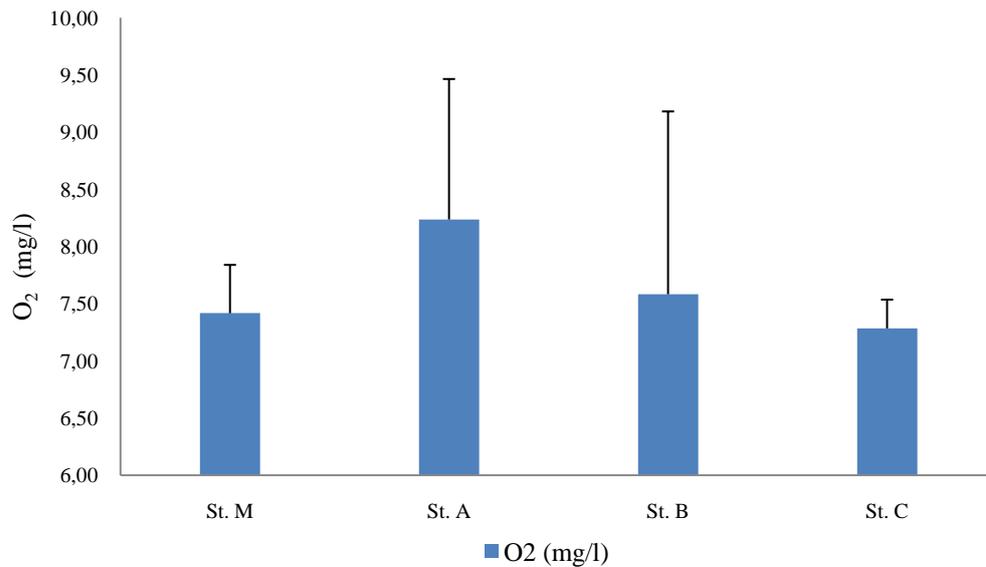


Fig.4.4 – Valori medi della concentrazione di ossigeno espressa in mg/l per ciascuna delle quattro stazioni in esame

4.1.5 Principali nutrienti inorganici

Durante il periodo di indagine le concentrazioni dei nutrienti inorganici (azoto ammoniacale, azoto nitroso, azoto nitrico e ortofosfati), hanno mostrato un ampio ambito di variazione, rispettivamente da 10 a 20 volte per quanto riguarda i composti azotati (range NH_4^+ : 1.47 - 15 $\mu\text{mol/l}$, valore medio: 7.61 $\mu\text{mol/l}$; range NO_2^- : 0.08-2.39 $\mu\text{mol/l}$, valore medio: 0.41 $\mu\text{mol/l}$; range NO_3^- : 0.74 - 16.24 $\mu\text{mol/l}$, valore medio: 4.58 $\mu\text{mol/l}$), e di oltre 40 volte per gli ortofosfati (range: 0.12 - 3.95 $\mu\text{mol/l}$, valore medio: 0.77 $\mu\text{mol/l}$), come riportato in tabella 4.1.

Nella stazione M sono stati rilevati i valori minimi per tutti i nutrienti inorganici presi in esame (Tab. 3.2); più nel dettaglio il minimo di NH_4^+ è stato registrato durante il 2° campionamento (ore 20:00), in corrispondenza ad un massimo di salinità, mentre i minimi di NO_3^- e PO_4^- si sono avuti durante le ore 11:26 (7° campionamento), in condizioni di massima marea scendente, secondo quanto riportato dalla tavola di marea, e condizioni di stanca secondo quanto osservato (Fig. 4.5). Nella stazione A invece sono stati rinvenuti per tutti i nutrienti i massimi valori (Fig. 4.5) , alle ore 11:27 per l'azoto ammoniacale e alle ore 14:18 (8° uscita) sia per l'azoto nitrico che per gli ortofosfati, in condizioni di corrente uscente dal canale e minimo di salinità.

Per quanto riguarda la stazione B particolarmente rilevante, è stata la presenza dei valori massimi della concentrazione di azoto nitroso (NO_2^-), rinvenuti nei campionamenti 7 e 8 delle ore 11:27 e 14:18, in concomitanza con la caduta dei valori di salinità precedentemente discussi. Inoltre, durante i suddetti campionamenti, si sono registrati anche i valori più alti riguardanti la concentrazione di azoto nitrico (NO_3^-); simili concentrazioni sono state rinvenute successivamente nella stazione A durante i campionamenti 8 e 9 (Fig. 4.5).

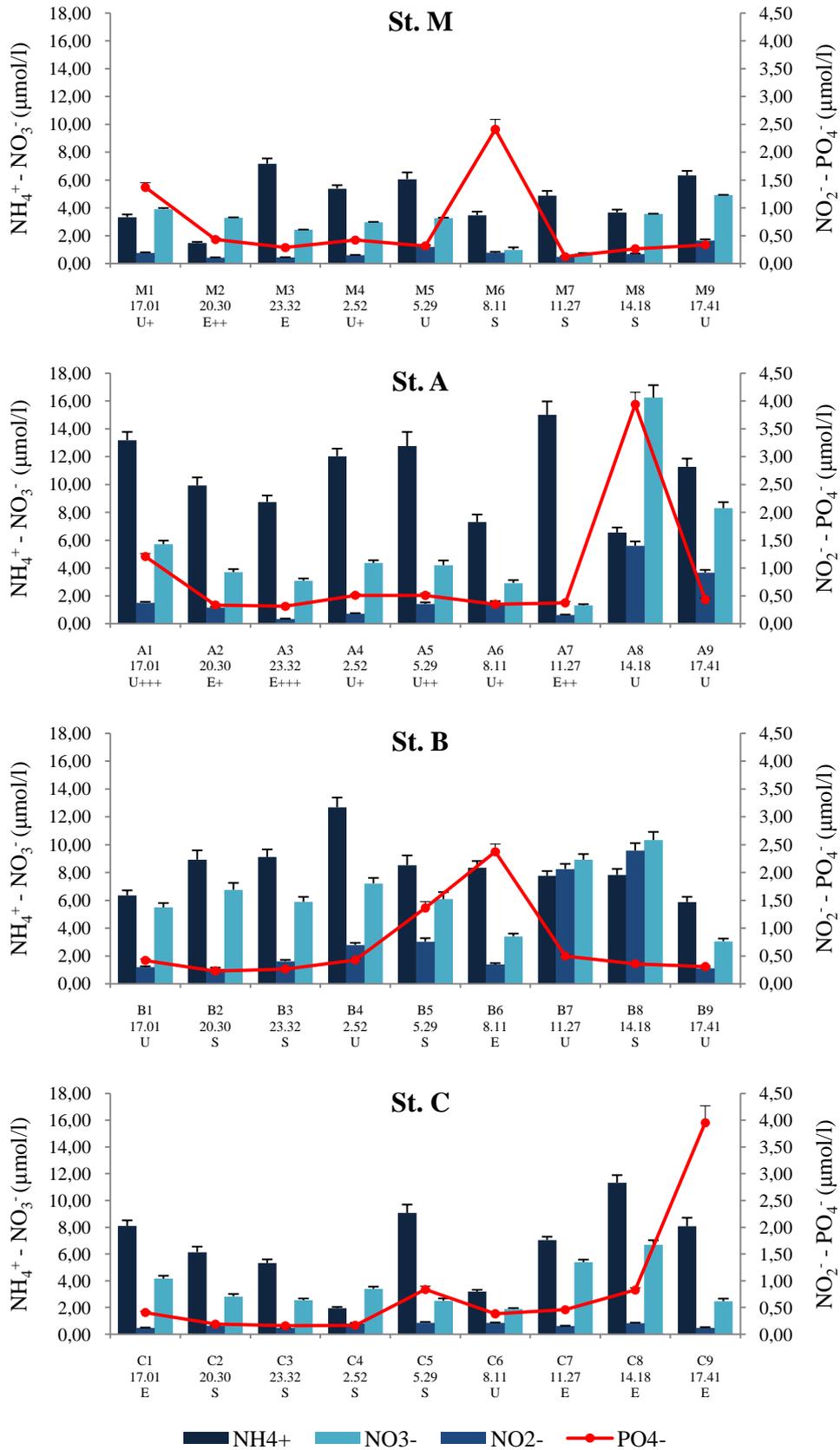


Fig. 4.5 – Andamento temporale della concentrazione dei principali nutrienti inorganici (NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻ e PO₄⁻), espresse in μmol/l, nelle quattro stazioni prese in esame

L'analisi della varianza ha messo in luce, per quanto riguarda la concentrazione di NH_4^+ , una differenza significativa (ANOVA, $p < 0.0001$) tra i valori medi della stazione M e A; non è stata invece evidenziata una differenza significativa tra i valori medi delle due stazioni interne al lago (ANOVA, ns; Fig. 4.6). I valori medi più alti delle concentrazioni di NO_3^- sono stati registrati nella stazione B; la concentrazione di NO_2^- è risultata significativamente più elevata rispetto a quelle riscontrate nelle stazioni M e C (ANOVA, $p < 0.001$), ma non rispetto alla stazione A (ANOVA, ns). Infine la concentrazione media degli ortofosfati, non è risultata significativamente differente tra le quattro stazioni (ANOVA, ns).

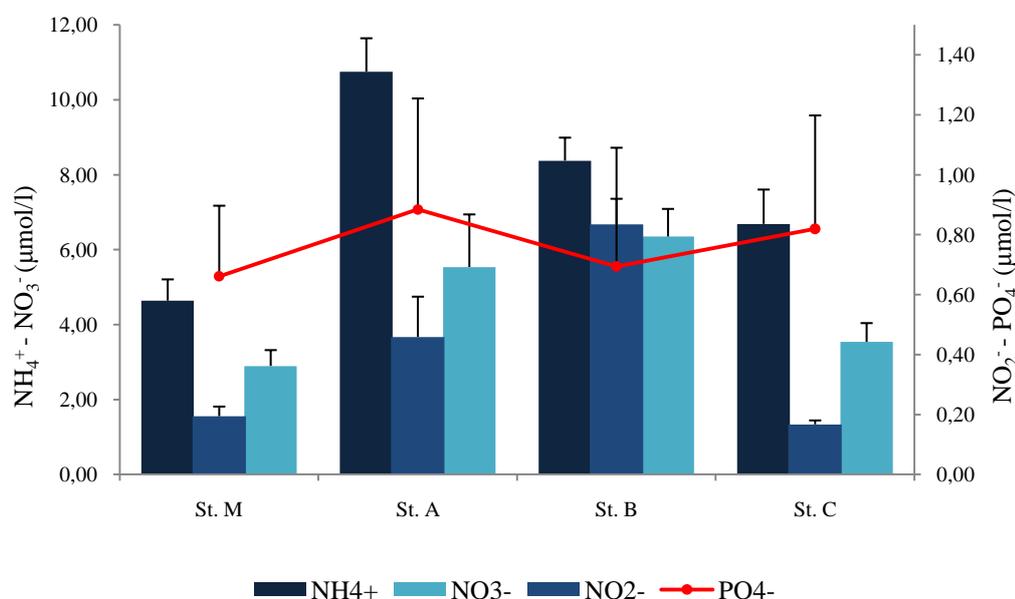


Fig. 4.6 – Valori medi delle concentrazioni dei principali nutrienti inorganici (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- e PO_4^-), espresse in $\mu\text{mol/l}$, per ciascuna delle quattro stazioni prese in esame.

4.1.6 Clorofilla *a*

Durante il periodo di campionamento la concentrazione della clorofilla *a* è variata di circa 20 volte, precisamente da 0.21 (St. M) a 4.51 µg/l (St. C); il valore medio è risultato pari a 2.42 µg/l (Tab. 4.1).

Per quanto concerne le variazioni temporali della concentrazione di Chl *a*, in tutte le stazioni i valori più alti sono stati riscontrati durante le ore pomeridiane (primo e ultimo campionamento), e durante le prime ore del mattino (ore 5:25) nelle stazioni M, A e C, e alle ore 8:11 nella stazione B; i valori minimi sono stati registrati durante le ore notturne e durante il primo pomeriggio in tutti e quattro i siti di campionamento (Fig. 4.7).

Confrontando tra loro le diverse stazioni si nota un evidente trend di aumento dei valori medi di Chl *a* dalla stazione M, che registra il minore valore medio, fino alla stazione C, che invece presenta il più alto, la variazione tra i due estremi è stata di ben 7 volte (da 0.6 µg/l nella staz. A a 4.16 µg/l nella staz. C; Fig. 4.8). Ulteriore conferma si è avuta dal test statistico che ha evidenziato differenze significative tra i valori medi di tutti e quattro i siti di campionamento (ANOVA, $p < 0.0001$).

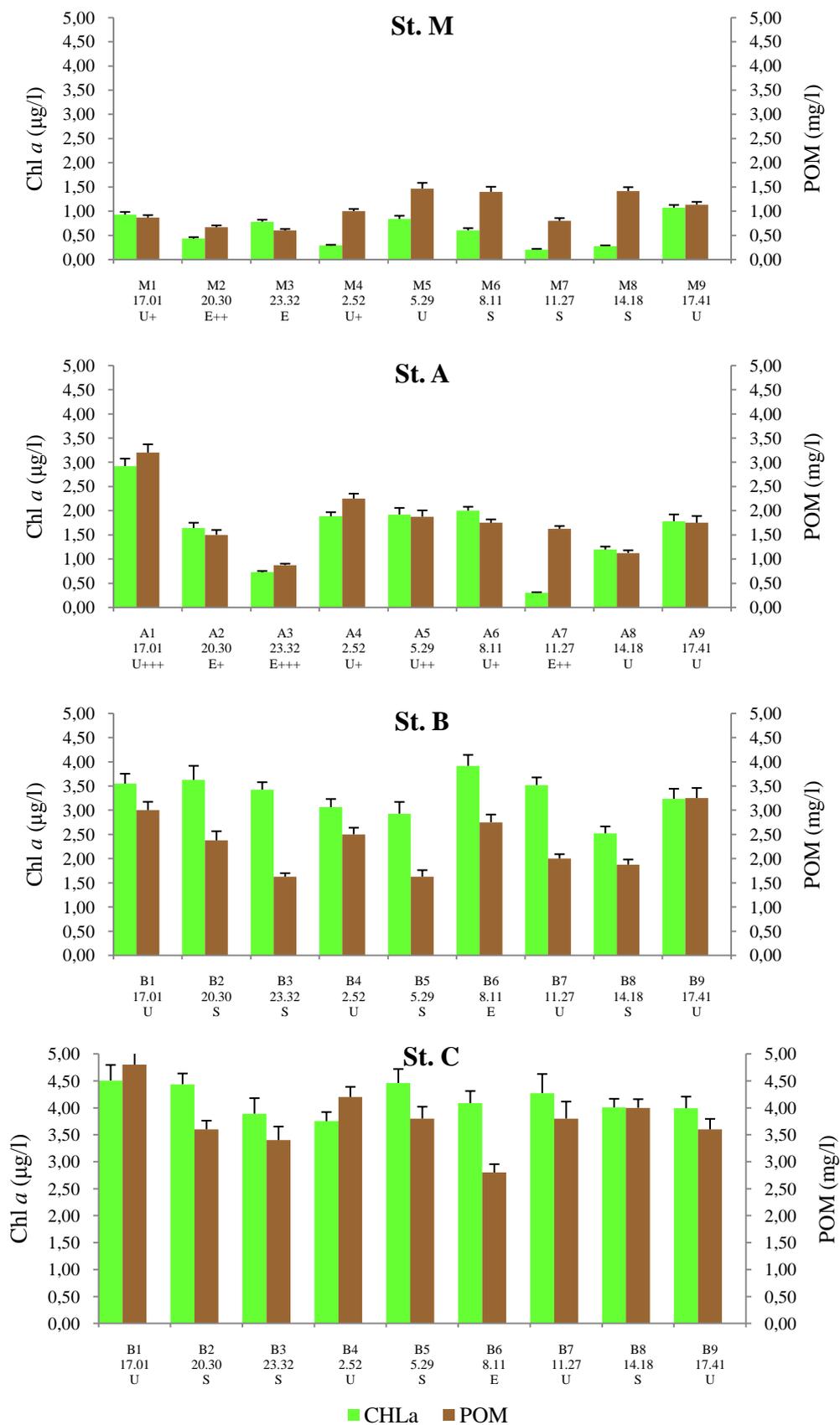


Fig. 4.7 – Andamento temporale della concentrazione della clorofilla *a* (Chl *a*) e della sostanza organica particellata (POM) nelle quattro stazioni prese in esame

Infine l'ultimo parametro chimico-fisico indagato, la concentrazione della sostanza organica, è variato di circa 8 volte durante l'intero arco giornaliero, presentando un minimo di 0.6 mg/l, registrato nella stazione M durante il 3° campionamento (ore 23:34), in condizioni di corrente scendente ed entrata di acque dallo Stretto in direzione del lago, e un massimo di 4.8 mg/l registrato nella stazione C durante il 1° campionamento (ore 17:08; Fig. 4.7). Il valore medio della concentrazione della sostanza organica durante l'intero periodo di indagine è stato di 2.23 mg/l (Tab. 4.1).

Il valore medio più alto della concentrazione della sostanza organica è stato rilevato nella stazione C (3.78 mg/l), mentre il valore più basso è stato riscontrato nella stazione M (1.04 mg/l; Fig. 4.8). L'analisi della varianza ha riportato la presenza di differenze significative, particolarmente marcate, tra il sito M ed i siti B e C, e, all'interno del lago stesso, tra i siti B e C (ANOVA, $p < 0.0001$); una differenza significativa è stata riscontrata anche tra il sito M e il sito A (ANOVA, $p < 0.05$), sebbene meno marcata rispetto a quelle precedentemente riportate; inoltre non sono state riscontrate differenze significative tra i valori medi della concentrazione di sostanza organica tra i siti A e B (ANOVA, ns).

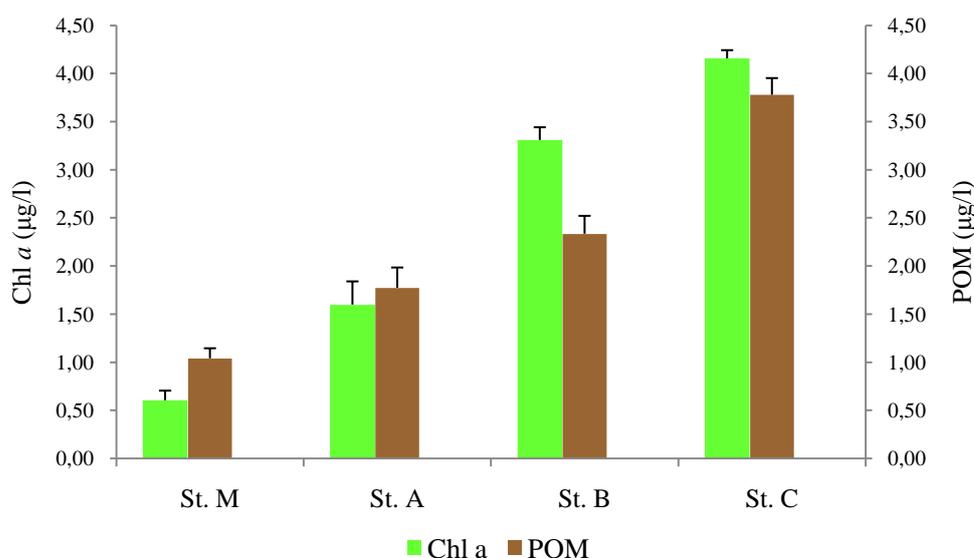


Fig. 4.8 - Valori medi delle concentrazioni di Clorofilla *a* (Chl *a*) e della sostanza organica particellata (POM), espresse in µg/l, per ciascuna delle quattro stazioni prese in esame.

Tab. 4.2 – Parametri statistici relativi a: temperatura (T), salinità (S), pH, ossigeno, nutrienti inorganici, Clorofilla *a* (Chl *a*) e sostanza organica particellata (POM), in riferimento all'intero set di dati considerati per ciascuna stazione.

STAZIONE M

	T (°C)	S psu	pH	O ₂ mg/l	O ₂ sat %	NH ₄ ⁺ µm/l	NO ₂ ⁻ µm/l	NO ₃ ⁻ µm/l	PO ₄ ⁻ µm/l	CHLa µg/l	POM mg/l
N° osserv.	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
min	19,00	35,90	8,37	5,11	73,10	1,47	0,10	0,74	0,12	0,21	0,60
max	26,60	37,40	8,56	9,48	141,10	7,17	0,41	4,92	2,41	1,07	1,47
media	22,73	36,76	8,44	7,42	106,57	4,64	0,19	2,89	0,66	0,60	1,04
dev stand	2,36	0,51	0,05	1,27	20,44	1,70	0,10	1,26	0,71	0,30	0,31
c.v	0,10	0,01	0,01	0,17	0,19	0,37	0,50	0,44	1,07	0,49	0,30
mediana	23,20	36,90	8,42	7,23	99,99	4,87	0,17	3,27	0,33	0,60	1,00
err std	0,79	0,17	0,02	0,42	6,81	0,57	0,03	0,42	0,24	0,10	0,10

STAZIONE A

	T (°C)	S psu	pH	O ₂ mg/l	O ₂ sat %	NH ₄ ⁺ µm/l	NO ₂ ⁻ µm/l	NO ₃ ⁻ µm/l	PO ₄ ⁻ µm/l	CHLa µg/l	POM mg/l
N° osserv.	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
min	19,70	34,30	8,28	2,63	39,59	6,55	0,09	1,31	0,31	0,30	0,87
max	31,50	37,50	8,81	13,50	221,73	15,00	1,40	16,24	3,94	2,92	3,20
media	25,36	35,88	8,49	8,24	125,08	10,75	0,46	5,54	0,88	1,60	1,77
dev stand	3,83	1,06	0,17	3,68	62,11	2,67	0,40	4,21	1,11	0,72	0,63
c.v	0,15	0,03	0,02	0,45	0,50	0,25	0,88	0,76	1,26	0,45	0,36
mediana	24,70	35,90	8,43	8,27	118,83	11,27	0,35	4,20	0,43	1,78	1,75
err std	1,28	0,35	0,06	1,23	20,70	0,89	0,13	1,40	0,37	0,24	0,21

STAZIONE B

	T (°C)	S psu	pH	O ₂ mg/l	O ₂ sat %	NH ₄ ⁺ µm/l	NO ₂ ⁻ µm/l	NO ₃ ⁻ µm/l	PO ₄ ⁻ µm/l	CHLa µg/l	POM mg/l
N° osserv.	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
min	26,90	32,40	8,20	2,14	32,56	5,87	0,27	3,05	0,23	2,52	1,62
max	32,20	35,60	8,83	15,43	256,66	12,68	2,39	10,33	2,37	3,91	3,25
media	29,72	34,69	8,49	7,58	122,93	8,37	0,83	6,35	0,69	3,31	2,33
dev stand	1,85	1,18	0,21	4,79	80,36	1,84	0,77	2,21	0,68	0,40	0,56
c.v	0,06	0,03	0,02	0,63	0,65	0,22	0,92	0,35	0,97	0,12	0,24
mediana	29,80	35,20	8,52	6,10	97,60	8,34	0,41	6,08	0,42	3,42	2,38
err std	0,62	0,39	0,07	1,60	26,79	0,61	0,26	0,74	0,23	0,13	0,19

STAZIONE C

	T (°C)	S psu	pH	O ₂ mg/l	O ₂ sat %	NH ₄ ⁺ µm/l	NO ₂ ⁻ µm/l	NO ₃ ⁻ µm/l	PO ₄ ⁻ µm/l	CHLa µg/l	POM mg/l
N° osserv.	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
min	29,30	32,60	8,50	6,09	95,62	1,95	0,12	1,88	0,16	3,75	2,80
max	32,20	33,50	8,65	8,54	136,29	11,32	0,21	6,69	3,95	4,51	4,80
media	30,30	33,12	8,55	7,28	116,15	6,69	0,17	3,54	0,82	4,16	3,78
dev stand	0,91	0,25	0,05	0,76	12,91	2,75	0,04	1,50	1,13	0,26	0,52
c.v	0,03	0,01	0,01	0,10	0,11	0,41	0,24	0,42	1,38	0,06	0,14
mediana	30,00	33,10	8,53	7,26	114,97	7,04	0,16	2,82	0,40	4,09	3,80
err std	0,30	0,08	0,02	0,25	4,30	0,92	0,01	0,50	0,38	0,09	0,17

4.2 Comunità microbiche

4.2.1 Abbondanza batterica, virale e rapporto VBR

Nell'area di indagine, nell'arco delle 24 ore di campionamento, la densità cellulare dei batteri, e particellare dei virus, hanno mostrato un range di variazione di alcuni ordini di grandezza. In particolare, tutte le componenti microbiche hanno presentato minimi di abbondanza durante periodi di massima corrente in entrata o in fase di stanca.

Considerando l'intero set di dati, l'abbondanza delle particelle virali è stata quella che ha subito la maggiore variazione, che è stata di tre ordini di grandezza (range: 2.31×10^7 – 6.48×10^{10} particelle l^{-1} ; valore medio: 1.60×10^{10} particelle l^{-1} ; Tab. 4.3). Il minimo è stato registrato nella stazione M (2° campionamento), mentre il massimo nella stazione B (6° campionamento; Tab 4.4).

Il batterioplancton ha mostrato un valore medio di 4.27×10^9 cellule l^{-1} , e un range di variazione inferiore rispetto a quanto osservato per la componente virale (Tab. 4.3); il valore minimo infatti è stato di 2.02×10^8 cell l^{-1} (stazione A), mentre il massimo è stato di 9.24×10^9 cell l^{-1} (stazione C; Tab. 4.4).

La percentuale del batterioplancton in divisione (FDC) ha mostrato una discreta variabilità oscillando dallo 0% della stazione C al 6.16% della stazione A. Infine il rapporto tra abbondanza virale e batterica (VBR) ha presentato un elevato tasso di variazione di circa tre ordini di grandezza, da 0.09, registrato nella stazione M, a 13.02 riscontrato nella stazione A (Tab. 4.3).

Tab. 4.3 – Parametri statistici relativi al batterioplancton (Batteri), virioplancton (Virus), alla frequenza di batteri in divisione (FDC), al rapporto virus/batteri (VBR), in riferimento all'intero set di dati.

	Batteri Cell l^{-1}	Virus particelle l^{-1}	FDC	VBR
osserv.	36	36	36	36
min	2,019E+08	2,310E+07	0	0,10
max	9,240E+09	6,480E+10	4,132E+08	13,02
media	4,273E+09	1,602E+10	1,184E+08	3,20
dev stand	2,925E+09	1,369E+10	1,186E+08	2,63
c.v	0,68	0,85	1,00	0,82
mediana	4,756E+09	1,552E+10	8,452E+07	2,83
err std	4,875E+08	2,281E+09	1,977E+07	0,44

Prendendo in considerazione le singole stazioni, le densità virali e batteriche nella stazione M, nell'arco delle 24 ore di campionamento, hanno mostrato un andamento molto simile, mettendo in evidenza valori minimi durante le fasi di ingresso di acqua marina o in fase di stanca, e massimi durante le fasi di uscita dell'acqua proveniente dal lago (Fig. 4.9). Ciò nondimeno l'entità della variazione delle due componenti è stata notevolmente differente: un ordine di grandezza per il batterioplancton ($2.14 \times 10^8 - 2.21 \times 10^9 \text{ cell l}^{-1}$) e di quasi tre ordini di grandezza per il virioplancton ($2.31 \times 10^7 - 8.15 \times 10^9 \text{ cell l}^{-1}$; Tab. 4.4) che si è tradotto in un rapporto VBR inferiore a 1 nelle acque di origine marina.

Un andamento simile è stato osservato nella stazione A, fatta eccezione per l'aumento dei valori medi di tutti e tre i parametri e per la maggior escursione tra i valori massimi e minimi (Tab. 4.4). Nelle stazioni più interne del lago, sia il batterioplancton che il virioplancton, non hanno invece evidenziato un andamento temporale dei valori di densità direttamente riconducibili all'ingresso o meno di acqua marina; in entrambe le stazioni le oscillazioni tra i valori minimi e massimi delle abbondanze, sia batteriche che virali, si sono mantenute tra le 2 e le 4 volte, pur presentando valori medi più alti rispetto alle stazioni M e A (St. B, valori medi: $5.77 \times 10^9 \text{ cell l}^{-1}$ e $3.08 \times 10^{10} \text{ particelle l}^{-1}$; St. C, valori medi: $7.70 \times 10^9 \text{ cell l}^{-1} - 2.25 \times 10^{10} \text{ particelle l}^{-1}$; Fig. 4.9).

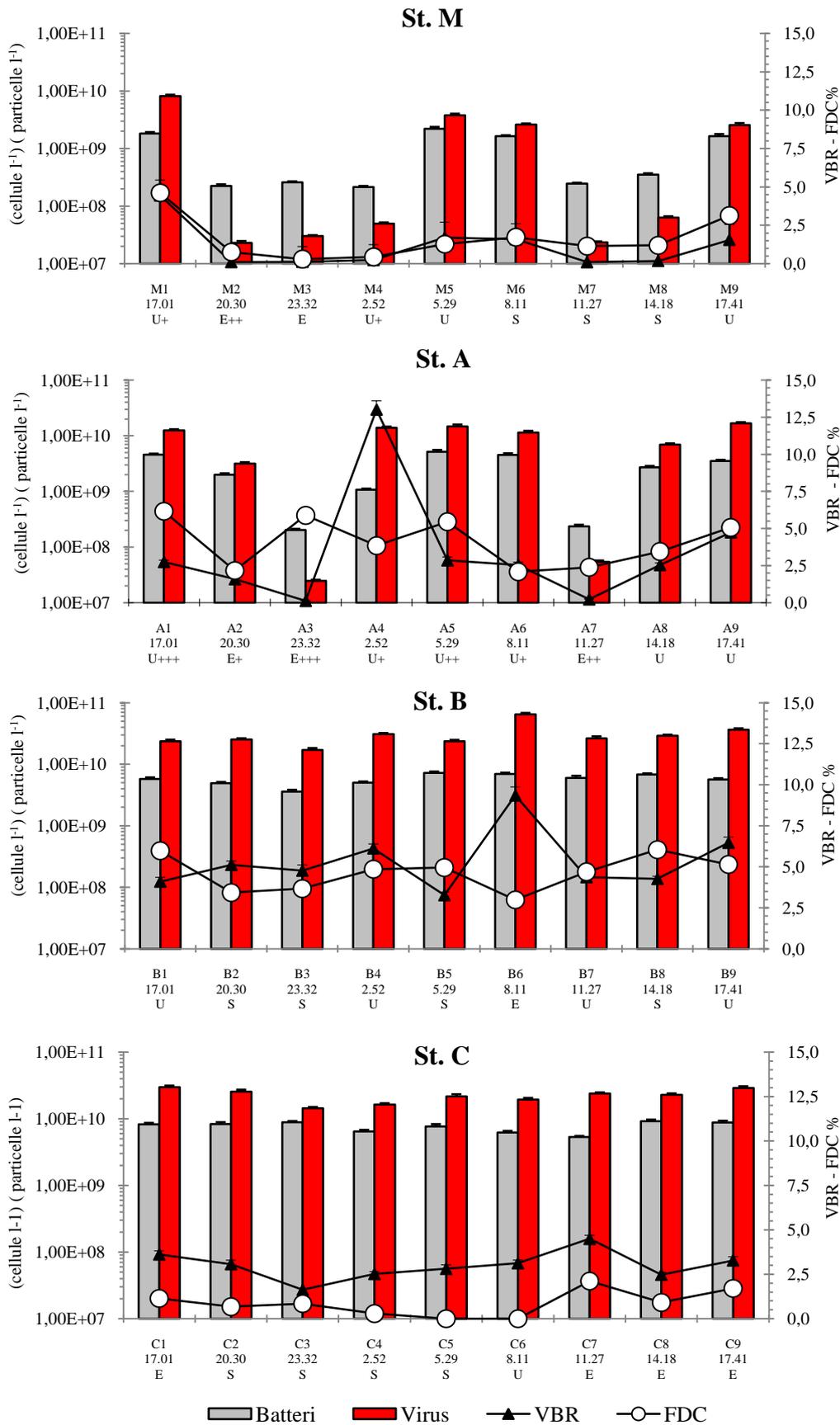


Fig. 4.9 – Andamento temporale dell'abbondanza batterica, virale, del rapporto virus/batteri (VBR) e della % dei battei in divisione (FDC) nelle quattro stazioni prese in esame.

Nella figura 4.10 è riportato il confronto tra i valori medi delle diverse stazioni, e ne consegue che l'abbondanza batterica ha mostrato differenze significative tra la stazione M e le stazioni B e C (ANOVA, $p < 0.0001$); significatività comparabile è stata riscontrata anche tra la stazione A e le stazioni B e C (ANOVA, $p < 0.0001$); differenza meno marcata, ma pur sempre significativa, è presente tra l'abbondanza batterica del sito B e del sito C (ANOVA, $p < 0.05$); non vi è invece una significativa differenza tra le concentrazioni di organismi batterici tra le stazioni M e A (ANOVA, $p > 0.05$).

Per quanto concerne la carica virale invece, l'andamento è meno lineare rispetto alla componente batterica, la stazione B è quella che presenta il maggior valore medio di concentrazione e la stazione M quella col valore medio più basso (Fig. 4.10). Non vi sono significative differenze tra la stazione M e la stazione A, così come non ve ne sono tra la stazione B e la stazione C (ANOVA, $p > 0.05$); risultano essere tuttavia decisamente significative le differenze che intercorrono tra i valori medi di abbondanza virale tra la stazione M e le stazioni B e C e, parimenti, quelle tra la stazione A e le stazioni B e C (ANOVA, $p < 0.0001$).

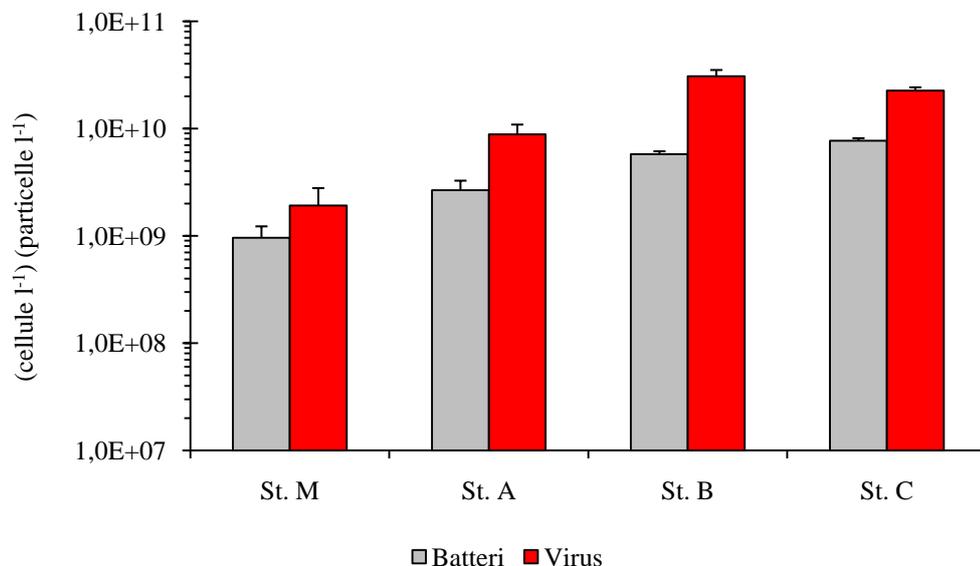


Fig. 4.10 – Valori medi delle abbondanze batteriche (cellule l⁻¹) e virali (particelle l⁻¹) per ciascuna delle quattro stazioni prese in esame.

L'analisi della varianza in relazione al rapporto tra la concentrazione virale e batterica ha mostrato un andamento simile alla distribuzione dei valori medi della carica virale e, non a caso, la stazione B risulta avere il valore medio più alto di VBR (Fig. 4.11). Tuttavia, a causa di un'elevata deviazione standard nei diversi campioni, è risultato esserci una differenza significativa soltanto tra i valori medi della stazione M e la stazione B (ANOVA, $p < 0.05$).

La stazione B presenta i valori medi più alti anche per quanto concerne la percentuale dei batteri in divisione (FDC), mentre è la stazione M ad essere caratterizzata dai valori medi più bassi (Fig. 4.11). L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative tra i valori della stazione B e tutte le altre stazioni (ANOVA, $p < 0.001$), mentre non sono state rilevate differenze nei confronti tra le altre stazioni (ANOVA, ns).

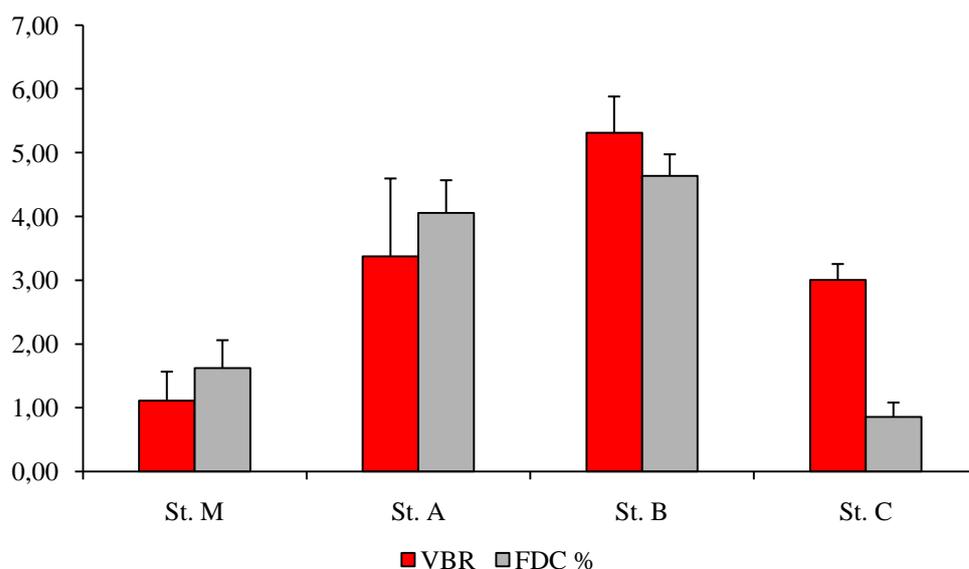


Fig. 4.11 – Valori medi del rapporto virus/batteri (VBR) e della percentuale di batteri in divisione (FDC) per ciascuna delle quattro stazioni prese in esame

Tab. 4.4 – Parametri statistici relativi al batterioplancton (Batteri), virioplancton (Virus), alla frequenza di batteri in divisione (FDC), al rapporto virus/batteri (VBR), in riferimento all'intero set di dati considerati per ciascuna stazione

Stazione M				
	Batteri Cell l ⁻¹	Virus Particelle l ⁻¹	VBR	FDC %
osserv.	9	9	9	9
min	2,14E+08	2,31E+07	0,10	0,30
max	2,22E+09	8,15E+09	4,45	4,62
media	9,58E+08	1,92E+09	1,11	1,62
dev stand	7,98E+08	2,60E+09	1,36	1,32
c.v	0,83	1,35	1,22	0,81
mediana	3,54E+08	6,34E+07	0,23	1,19
err std	2,66E+08	8,66E+08	0,45	0,44
Stazione A				
	Batteri Cell l ⁻¹	Virus Particelle l ⁻¹	VBR	FDC %
osserv.	9	9	9	9
min	2,02E+08	2,45E+07	0,12	2,08
max	5,16E+09	1,67E+10	13,02	6,16
media	2,67E+09	8,85E+09	3,37	4,05
dev stand	1,79E+09	6,10E+09	3,66	1,54
c.v	0,67	0,69	1,08	0,38
mediana	2,72E+09	1,14E+10	2,54	3,84
err std	5,98E+08	2,03E+09	1,22	0,51
Stazione B				
	Batteri Cell l ⁻¹	Virus Particelle l ⁻¹	VBR	FDC %
osserv.	9	9	9	9
min	3,59E+09	1,71E+10	3,27	2,98
max	7,21E+09	6,48E+10	9,35	6,04
media	5,77E+09	3,08E+10	5,31	4,63
dev stand	1,09E+09	1,31E+10	1,71	1,02
c.v	0,19	0,42	0,32	0,22
mediana	5,76E+09	2,62E+10	4,76	4,85
err std	3,62E+08	4,35E+09	0,57	0,34
Stazione C				
	Batteri Cell l ⁻¹	Virus Particelle l ⁻¹	VBR	FDC %
osserv.	9	9	9	9
min	5,31E+09	1,44E+10	1,62	0
max	9,24E+09	2,98E+10	4,50	2,12
media	7,69E+09	2,25E+10	3,00	0,85
dev stand	1,29E+09	4,95E+09	0,76	0,68
c.v	0,17	0,22	0,25	0,80
mediana	8,24E+09	2,29E+10	3,07	0,84
err std	4,31E+08	1,65E+09	0,25	0,23

4.2.2 Analisi della comunità picofitoplanctonica

Come descritto nel capitolo Materiali e Metodi, lo studio picofitoplancton è stato condotto sulla componente procariotica riconducibile ai cianobatteri coccoidi del genere *Synechococcus*; l'utilizzo di due diversi set di filtri ottici durante il conteggio in microscopia ad epifluorescenza, ha permesso di evidenziare che, nell'area di indagine, la comunità dei cianobatteri era composta, in percentuali diverse, a seconda del sito e dell'ora di campionamento, sia da cianobatteri con ficoeritrina di tipo I (Tipo I), che da cianobatteri con ficoeritrina di tipo II (Tipo II); i due tipi di cianobatteri, come precedentemente accennato, presentano valenza ecologica diversa.

Prendendo in considerazione tutti e 4 i siti in esame durante l'intero arco temporale, si è riscontrato un valore medio dell'abbondanza cellulare del picofitoplancton totale (cianobatteri tipo I + cianobatteri tipo II) pari a 2.96×10^8 cell l^{-1} , mostrando un ampio range di variazione tra il valore minimo e massimo (Tab. 4.5), registrati rispettivamente nella stazione M (3.2×10^6 cell l^{-1}), e nella stazione C (1.52×10^9 cell l^{-1}), a seguito dell'eterogeneità dei siti presi in esame e delle diverse condizioni idrografiche durante i vari campionamenti; il contributo globale medio dei cianobatteri di tipo I e tipo II al totale della comunità, è stato rispettivamente del 15 e dell'85%. Ciò nonostante la composizione della comunità picofitoplanctonica ha presentato notevoli variazioni, specialmente nelle stazioni poste in prossimità dello Stretto.

Tab. 4.5 – Parametri statistici relativi ai cianobatteri totali (Ciano tot), ai cianobatteri contenenti ficoeritrina di tipo I (Ciano tipo I), ai cianobatteri contenenti ficoeritrina di tipo II (Ciano tipo II), alla frequenza dei cianobatteri in divisione (Ciano in coppia), e alla percentuale di cianobatteri con ficoeritrina di tipo II rispetto al totale del campione, in riferimento all'intero set di dati.

	Ciano tot Cell l^{-1}	Ciano tipo I Cell l^{-1}	Ciano tipo II Cell l^{-1}	Ciano in coppia %	Ciano tipo II %
osserv.	36	36	36	36	36,00
min	3,201E+06	0	0	0	0,00
max	1,521E+09	9,529E+06	1,521E+09	17,97	100,00
media	2,964E+08	1,156E+06	2,953E+08	4,28	84,69
dev stand	4,862E+08	2,285E+06	4,869E+08	4,89	29,66
c.v	1,64	1,98	1,65	1,14	0,35
mediana	3,362E+07	0,000E+00	3,362E+07	2,56	100,00
err std	8,104E+07	3,808E+05	8,115E+07	0,81	4,94

Nella stazione M, sono stati evidenziati i valori più bassi di abbondanza cellulare, con un range di oscillazione di quasi un ordine di grandezza (range: 3.20×10^6 - 2.33×10^7 , rispettivamente alle ore 11:26 e 17:08; Tab. 4.6). Inoltre è stato osservato un andamento particolarmente interessante di alternanza dei cianobatteri di tipo I ed di tipo II come componente dominante della comunità; più dettagliatamente è stata osservata una dominanza di cianobatteri di tipo II (dall'80 al 100%) durante i momenti di massimo flusso in uscita dal lago (Fig. 4.12); e viceversa, una co-dominanza della componente di tipo I, durante i restanti campionamenti, in concomitanza con l'entrata d'acqua marina in direzione del lago; in particolare, durante il 2° e 3° campionamento (ore 20:00 e 23:34), la comunità picofitoplanctonica è costituita per oltre il 90% da cianobatteri di tipo I (fig 4.12).

Come per gli altri parametri indagati, la stazione A restituisce un'immagine simile, in termini di composizione di comunità, alla stazione M, pur presentando valori medi delle abbondanze dei cianobatteri totali e dei cianobatteri di tipo II di oltre il doppio, ed escursioni tra i valori minimi e massimi meno marcate (Tab. 4.6)

La comunità picofitoplanctonica presente nella stazione B, come anche nella stazione C, è risultata costituita interamente da cianobatteri di tipo II, e non ha mostrato oscillazioni consistenti nella densità cellulare in relazione ai flussi in entrata di acqua marina nelle 24 ore. Ciò nonostante nella stazione B, la variazione dell'abbondanza picofitoplanctonica è stata di quasi 7 volte (range: 2.25×10^7 - 9.13×10^7 cell l^{-1} ; rispettivamente alle ore 11:27 e 20:30); i massimi si sono osservati durante le ore pomeridiane (1°, 2° e 9° campionamento), mentre durante le ore notturne e mattutine sono stati registrati i valori minori, in corrispondenza dei minimi di concentrazione d'ossigeno (Fig 4.12).

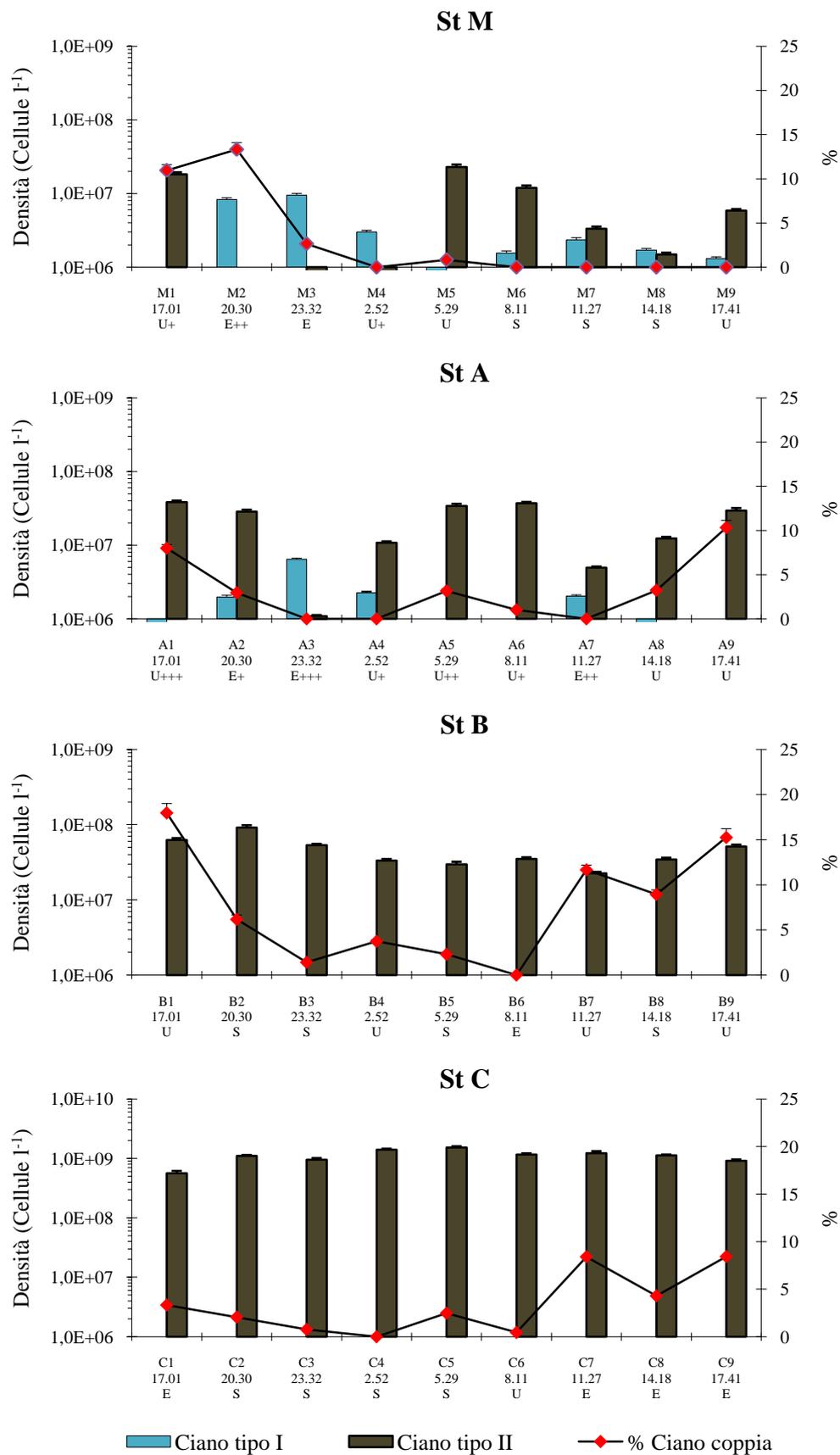


Fig. 4.12 – Andamento temporale dell'abbondanza dei cianobatteri contenenti ficoeritrina di tipo I (Ciano tipo I), dei cianobatteri contenenti ficoeritrina di tipo II (Ciano tipo II) e della % dei cianobatteri in divisione nelle quattro stazioni prese in esame.

Nella stazione C l'abbondanza picofitoplanctonica è risultata, per tutto il periodo d'indagine, di circa 2 ordini di grandezza superiore a quelle registrate nelle altre stazioni (Tab. 4.6) e, contrariamente a quanto osservato nella stazione B, le abbondanze più elevate sono state riscontrate nelle prime ore del mattino (ore 2:52 e 5:25). E' interessante osservare che in questa stazione il valore medio di densità cellulare dei cianobatteri, pari a 1.11×10^9 cell l^{-1} , sia dello stesso ordine di grandezza del valore medio della densità batterica, pari a 7.69×10^9 cell l^{-1} (Tab. 4.5).

In figura 4.13 sono riportati i valori medi dell'abbondanza picofitoplanctonica; su tali dati è stata effettuata l'analisi statistica, la quale conferma abbondanze del picofitoplancton totale e dei cianobatteri di tipo II significativamente più alte nella stazione C rispetto a tutte le altre stazioni (ANOVA, $p < 0.0001$); non sono state invece riscontrate differenze significative tra i valori medi di abbondanza picofitoplanctonica delle stazioni M, A e B (ANOVA, ns). Al contrario, l'abbondanza della componente cianobatterica di tipo I è risultata significativamente più elevata nella stazione M rispetto ai siti posti all'interno del lago (B e C; ANOVA, $p < 0.001$). L'analisi statistica effettuata sulla porzione cianobatterica in divisione ha rilevato il valore medio più alto all'interno della stazione B, tuttavia comparando tra loro i diversi siti non sono state riscontrate differenze significative (ANOVA, ns; Fig. 4.13).

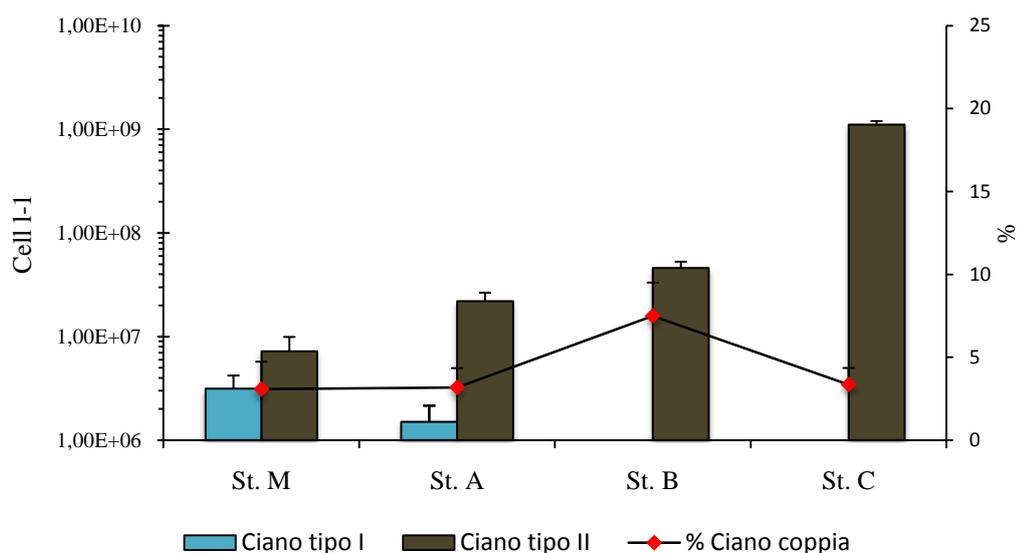


Fig. 4.13 – Valori medi del rapporto delle abbondanze di cianobatteri contenenti ficoeritrina di tipo I (Ciano tipo I), dei cianobatteri contenenti ficoeritrina di tipo II (Ciano tipo II) e della percentuale di cianobatteri in divisione per ciascuna delle quattro stazioni prese in esame

Tab. 4.6 – Parametri statistici relativi ai cianobatteri totali (Ciano tot), ai cianobatteri contenenti ficoeritrina di tipo I (Ciano tipo I), ai cianobatteri contenenti ficoeritrina di tipo II (Ciano tipo II), alla frequenza dei cianobatteri in divisione (Ciano in coppia), e alla percentuale di cianobatteri con ficoeritrina di tipo II, in riferimento all'intero set di dati considerati per ciascuna stazione.

Stazione M					
	Ciano tot Cell l ⁻¹	Ciano tipo I Cell l ⁻¹	Ciano tipo II Cell l ⁻¹	Ciano coppia %	Ciano II %
osserv.	9	9	9	9	9
min	3,20E+06	0	0	0	0
max	2,33E+07	9,53E+06	2,29E+07	13,31	100,00
media	1,03E+07	3,13E+06	7,22E+06	3,08	54,64
dev stand	6,47E+06	3,22E+06	8,03E+06	4,94	38,12
c.v	0,63	1,03	1,11	1,60	0,70
mediana	8,29E+06	1,71E+06	3,32E+06	0,00	58,61
err std	2,16E+06	1,07E+06	2,68E+06	1,65	12,71

Stazione A					
	Ciano tot Cell l ⁻¹	Ciano tipo I Cell l ⁻¹	Ciano tipo II Cell l ⁻¹	Ciano coppia %	Ciano II %
osserv.	9	9	9	9	9
min	7,01E+06	0	1,09E+06	0	14,5
max	3,86E+07	6,42E+06	3,82E+07	10,31	100,00
media	2,34E+07	1,50E+06	2,19E+07	3,18	84,13
dev stand	1,23E+07	1,96E+06	1,37E+07	3,48	26,35
c.v	0,53	1,31	0,63	1,09	0,31
mediana	2,96E+07	4,42E+05	2,84E+07	2,94	96,55
err std	4,10E+06	6,53E+05	4,56E+06	1,16	8,78

Stazione B					
	Ciano tot Cell l ⁻¹	Ciano tipo I Cell l ⁻¹	Ciano tipo II Cell l ⁻¹	Ciano coppia %	Ciano II %
osserv.	9	9	9	9	9
min	2,25E+07	0	2,25E+07	0	100
max	9,13E+07	0	9,13E+07	17,97	100
media	4,59E+07	0	4,59E+07	7,49	100
dev stand	2,01E+07	0	2,01E+07	6,01	0
c.v	0,44	0	0,44	0,80	0
mediana	3,49E+07	0	3,49E+07	6,17	100
err std	6,71E+06	0	6,71E+06	2,00	0

Stazione C					
	Ciano tot Cell l ⁻¹	Ciano tipo I Cell l ⁻¹	Ciano tipo II Cell l ⁻¹	Ciano coppia %	Ciano II %
osserv.	9	9	9	9	9
min	5,63E+08	0	5,63E+08	0	100
max	1,52E+09	0	1,52E+09	8,42	100
media	1,11E+09	0	1,11E+09	3,35	100
dev stand	2,65E+08	0	2,65E+08	3,00	0
c.v	0,24	0	0,24	0,89	0
mediana	1,12E+09	0	1,12E+09	2,47	100
err std	8,84E+07	0	8,84E+07	1,00	0

4.3 Correlazioni dei principali parametri

E' stata effettuata l'analisi di correlazione sull'intero dataset mettendo a confronto i principali parametri biologici e i fattori ambientali (Tab. 4.7).

Come si può osservare, esiste una correlazione positiva tra l'abbondanza del virioplancton e la temperatura ($R=0.75$; $p<0.01$), così come con la Chl *a* ($R=0.82$; $p<0.001$) e la sostanza organica ($R=0.76$; $p<0.001$). L'abbondanza particellare del virioplancton mostra forti correlazioni significative anche con l'abbondanza batterica ($R=0.82$; $p<0.001$) e con i cianobatteri di tipo II ($R=0.71$; $p<0.001$); è invece correlata negativamente con la salinità ($R=-0.80$; $p<0.001$) e con la concentrazione dei cianobatteri di tipo I ($R=-0.84$; $p<0.001$; Tab. 4.7).

Tab. 4.7 – Correlazione Spearman rank tra i differenti parametri: temperatura (T), salinità (S), pH, nutrienti inorganici (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻), clorofilla a (Chl a), sostanza organica particellata (POM), batteri, virus, batteri in divisione (FDC), rapporto virus/batteri (VBR), cianobatteri di tipo I, cianobatteri di tipo II. Sono riportati i coefficienti Spearman' rhos; n=0.64, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

	T°C	PSU	pH	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	CHL a	POM	B	V	FDC	VBR	Ciano tot	Ciano I	Ciano II	% ciano coppia
T°C	1																
PSU	-0,79***	1															
pH	0,64***	-0,36*	1														
NH ₄ ⁺	0,16	-0,08	-0,03	1													
NO ₂ ⁻	0,29	-0,33*	-0,01	0,32	1												
NO ₃ ⁻	0,38*	-0,38*	0,13	0,40*	0,67***	1											
PO ₄ ³⁻	0,04	-0,18	-0,26	0,27	0,25	0,25	1										
CHL a	0,74***	-0,85***	0,34*	0,17	0,11	0,17	0,11	1									
POM	0,75***	-0,77***	0,37*	0,23	0,05	0,12	0,06	0,90***	1								
B	0,75***	-0,87***	0,29	0,11	0,23	0,19	0,15	0,90***	0,84***	1							
V	0,75***	-0,78***	0,21	0,25	0,38*	0,39*	0,20	0,82***	0,76***	0,82***	1						
FDC	0,61***	-0,46**	0,15	0,39*	0,63***	0,67***	0,28	0,35*	0,33*	0,47**	0,69***	1					
VBR	0,55***	-0,53***	0,11	0,32	0,46**	0,50**	0,29	0,58***	0,51*	0,48**	0,82***	0,68***	1				
Ciano tot	0,76***	-0,77***	0,44	0,09	0,08	0,06	0,01	0,93***	0,88***	0,84***	0,69***	0,28	0,47*	1			
Ciano I	-0,76***	0,80***	-0,24	-0,12	-0,43**	-0,34*	-0,14	-0,80***	-0,72***	-0,84***	-0,84***	-0,62***	-0,71***	-0,78***	1		
Ciano II	0,79***	-0,80***	0,44**	0,10	0,13	0,08	0,00	0,92***	0,90***	0,86***	0,71***	0,31	0,48*	0,98***	-0,82***	1	
% Ciano coppia	0,58***	-0,39**	0,43***	0,12	0,26	0,49**	0,28	0,31	0,23	0,32	0,46	0,59***	0,45*	0,31	-0,43	-0,26	1

L'abbondanza batterica ha mostrato delle importanti correlazioni con i principali parametri ambientali presi in considerazione. Esiste una correlazione positiva e altamente significativa con la temperatura ($R=0.75$; $p<0.001$), con la concentrazione della Chl *a* ($R=0.90$; $p<0.001$) e con la concentrazione della sostanza organica ($R=0.84$; $p<0.001$). La concentrazione batterica mostra inoltre una correlazione positiva con la concentrazione dei cianobatteri di tipo II ($R=0.86$; $p<0.001$), mentre mostra, come per i virus, una correlazione negativa e altamente significativa sia con la salinità ($R=-0.87$; $p<0.001$), che con l'abbondanza dei cianobatteri di tipo I ($R=-0.84$; $p<0.001$; Tab. 4.7).

Per quanto riguarda il rapporto virus/batteri (VBR), esiste una forte correlazione positiva con i valori di temperatura ($R=0.55$; $p<0.001$), Chl *a* ($R=0.58$; $p<0.001$) e frequenza dei batteri in divisione ($R=0.68$; $p<0.001$); correlazioni significative, ma meno accentuate, si sono avute con i principali nutrienti azotati ($R=0.5$; $p<0.01$) e con l'abbondanza batterica ($R=0.48$; $p<0.01$), mentre è sempre presente una correlazione negativa con la salinità ($R=-0.53$; $p<0.001$).

Andando ad analizzare la frequenza dei batteri in divisione (FDC), è emersa una correlazione altamente significativa e positiva di tale parametro con la concentrazione dei composti azotati inorganici (nitrati e nitriti), con la temperatura e con la carica virale ($p<0.001$); una correlazione positiva, sempre significativa, seppur meno marcata, si è osservata con la concentrazione di Chl *a* e della sostanza organica ($R=0.33$; $p<0.05$); si è in ultimo avuta una significativa correlazione negativa con la salinità ($R=-0.42$; $p<0.01$; Tab. 4.7).

La concentrazione dei cianobatteri di tipo I mostra una correlazione positiva con la salinità ($R=0.80$; $p<0.001$), mentre presenta una correlazione negativa, e altamente significativa, sia con la temperatura ($R=-0.76$; $p<0.001$), che con i principali indici trofici (composti azotati, Chl *a* e sostanza organica; $p<0.001$).

La concentrazione dei cianobatteri di tipo II presenta risultati opposti a quelli appena riportati per i cianobatteri di tipo I, con cui è legata da una correlazione negativa ($R=0.82$; $p<0.001$), e mostra una correlazione positiva con la temperatura ($R=0.79$; $p<0.001$), e con i principali indici trofici ($R=0.90$; $p<0.001$). Vi è invece una correlazione negativa, e significativa, con la salinità ($R=0.80$; $p<0.001$).

L'analisi di correlazione è stata inoltre effettuata per ogni singola stazione e riportata nella tabella 4.8

Tab. 4.8 - tavola di correlazione tra virus (V), batteri (B), cianobatteri totali (Ciano tot), rapporto virus/batteri (VBR), batteri in divisione (FDC) e alcuni parametri ambientali: salinità (S), clorofilla (Chl *a*), sostanza organica (POM) e nutrienti (NO₂⁻) nelle quattro stazioni.

	Stazione M	Stazione A	Stazione B	Stazione C
V - S	-0.79*	-0.59	0.07	-0.60
V - B	0.87**	0.70*	0.23	0.08
V - Cya tot	0.57	0.53	-0.18	-0.53
B - S	-0.78*	0.68*	-0.56	0.23
B - sost org	0.57	0,60	-0.15	-0.02
B - Chl <i>a</i>	0.72*	0.82**	-0.18	-0.23
B - NO ₂ ⁻	0.80**	0.67*	0.48	-0.30
B - Cya tot	0.67*	0.85**	-0.58	-0.57
VBR - Chl <i>a</i>	-0.70*	0.66*	0.41	0.53
VBR - FDC	0.74*	0.57	-0.6	0.45
FDC - S	-0.96***	-0.74*	-0.42	-0.37
FDC - NO ₂ ⁻	0.81**	0.69*	0.46	-0.71*
FDC - V	1	0.73*	0.05	0.06

*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

La stazione M è caratterizzata da una significativa correlazione inversa tra l'abbondanza virale e la salinità (R=-0.79; p<0.05), analoga situazione si può osservare per quanto concerne la concentrazione batterica (R=-0.78; p<0.05; Tab. 4.8).

La componente batterica presenta inoltre una correlazione significativa sia con l'abbondanza virale che con la componente picofitoplanctonica ed i composti azotati (p<0.05).

Nel sito A non risulta esservi una correlazione significativa tra virus e salinità (p>0.05), situazione che invece si presenta analizzando la carica batterica (R = 0.68; p<0.05); quest'ultima inoltre sembra avere una discreta correlazione significativa con gli indici trofici (Chl *a* e NO₂⁻) e con la concentrazione dei cianobatteri.

Le stazioni B e C, invece, non mostrano livelli di correlazione significativi con nessuno dei principali parametri biologici e ambientali riportati (p>0.05; Tab. 4.8).

4.4 Diversità batterica

A seguito delle analisi dei principali parametri chimico-fisici, e alle stime di abbondanza microbica di ogni campione, è stata utilizzata la tecnica di *fingerprinting* Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) per l'analisi della struttura della comunità batterica, su una parte rappresentativa dell'intero set di campioni; la scelta è ricaduta sui campioni delle uscite 1, 3, 5, 7 e 9 appartenenti a tutte e 4 le stazioni fissate.

L'impiego dell'ARISA ha permesso di stimare la ricchezza batterica intesa come quantità di diversi genotipi presenti in ogni campione (S'), è stato inoltre possibile risalire alla struttura della comunità batterica di ogni campione e calcolarne i diversi indici di biodiversità (Tab. 4.9); tali indici poi, sono stati confrontati statisticamente tra tutti i siti presi in esame.

Per la nostra analisi sono stati utilizzati l'indice di diversità di Shannon-Wiener (H') e l'indice di omogeneità di Pielou (J').

Entrambi sono stati ottenuti mediante l'analisi dei ferogrammi forniti dall'ARISA, basandosi sull'assunzione che il numero di picchi, presenti in ogni campione, corrisponda al numero di ribotipi o OTU (operational taxonomic unit) e che l'altezza degli stessi picchi corrisponda all'abbondanza relativa di ogni ribotipo (Luna et al., 2004; Luna et al., 2006; Fig. 4.14).

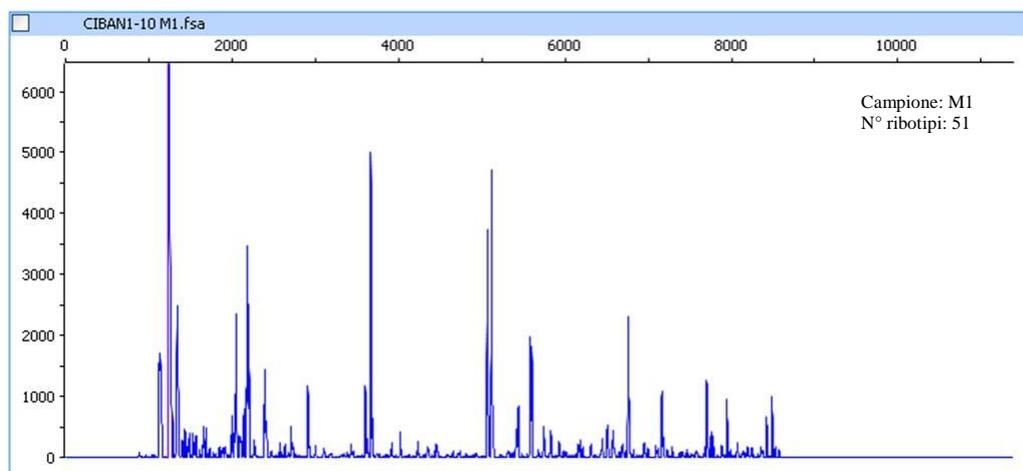


Fig. 4.14 – esempio di ferogramma ottenuto mediante ARISA, ogni picco corrisponde ad un diverso OTU mentre la sua ampiezza indica l'abbondanza dello stesso OTU.

Tab. 4.9 – Numero di ribotipi (ricchezza specifica S'), diversità batterica (indice di Shannon-Wiener, H') e equidistribuzione dei ribotipi (indice di Pielou, J' applicato sul numero di OTU), nei diversi campioni presi in esame.

	M1	M3	M5	M7	M9	A1	A3	A5	A7	A9	B1	B3	B5	B7	B9	C1	C3	C5	C7	C9
S'	51	52	38	64	57	34	61	39	67	39	58	61	58	53	58	58	67	56	65	54
H'	3,5	3,5	3,1	3,6	3,5	2,8	3,7	3,0	3,6	3,1	3,4	3,5	3,2	3,7	3,6	3,4	3,6	3,8	3,6	3,5
J'	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9

L'analisi della differente lunghezza dei frammenti ITS1, presenti in ciascun campione, mediante l'ARISA, ha permesso l'individuazione di circa 290 diversi OTU in totale; la ricchezza batterica nell'intera area di indagine è variata da un minimo di 34 genotipi (St. A, 1° campionamento), a un massimo di 67 genotipi (St. A, 7° campionamento; St. C, 3° campionamento) e il valore medio è stato di 55 genotipi per campione.

La minore ricchezza, in termini di ribotipi, si è riscontrata nella stazione A, durante il 1°, 5° e 9° campionamento (rispettivamente 34, 39 e 39 genotipi), in presenza di corrente montante nell'adiacente Stretto di Messina, e in condizioni di un flusso d'acqua in uscita dal lago in direzione dello Stretto; la maggiore ricchezza, invece, è stata osservata nella stazione C (67 genotipi; ore 23:32) in condizioni di stanca; la stessa ricchezza è stata riscontrata nella stazione A (67 genotipi; ore 11:27), sebbene in presenza di diverse condizioni ambientali e in concomitanza di un forte flusso di corrente in entrata dal vicino Stretto di Messina in direzione del lago.

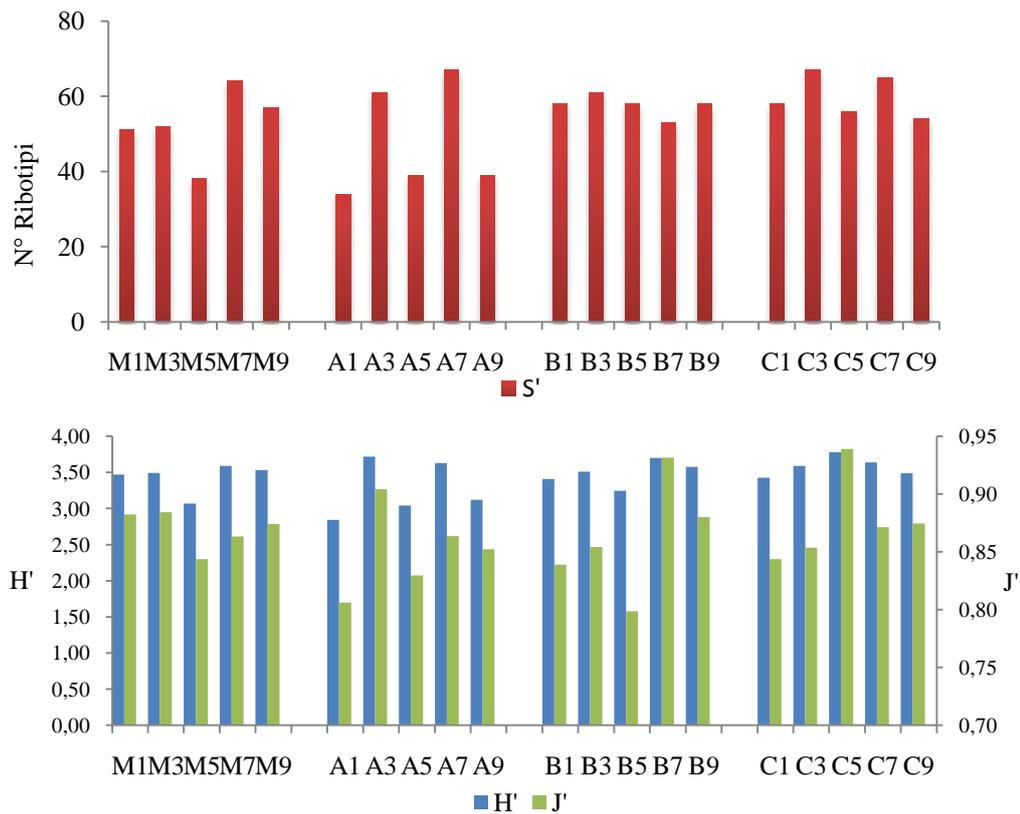


Fig. 4.15 - Numero di ribotipi (ricchezza specifica S^2), diversità batterica (indice di Shannon-Wiener, H') e equidistribuzione dei ribotipi (indice di Pielou, J' applicato sul numero di OTU), nei diversi campioni presi in esame.

Andando ad analizzare i valori medi delle singole stazioni (fig. 4.15) si nota una ricchezza media pari a 52 OTU nella stazione M, mentre la stazione A presenta la ricchezza media più bassa dell'intera indagine (48 OTU), ma è anche la stazione caratterizzata dalla maggior escursione tra i valori minimi (34 OTU) e massimi (67 OTU); nei siti più interni del lago, stazione B e stazione C, è stata riscontrata un'abbondanza media più elevata (rispettivamente 58 e 60 genotipi), e differenze tra i valori minimi e massimi meno marcati (8-10 OTU rispettivamente).

Nell'intera area di indagine si è rilevato un indice medio di diversità di Shannon-Wiener pari a 3.44; il valore minore (2.84) è stato registrato nella stazione A (ore 17:01) durante un forte flusso di acqua in uscita in direzione dello Stretto, mentre il valore maggiore (3.78) è stato registrato nella stazione C (ore 5:29) durante una fase di stanca (Fig. 4.15).

L'indice di Pielou, rappresentante l'omogeneità della distribuzione delle specie nei diversi campioni, ha mostrato un valore medio di 0.86 e una modesta variazione tra i valori minimi e massimi, rispettivamente 0.80 (St. B; ore 5:29) e 0.94 (St.C; ore 5:29).

In figura 3.16 sono riportati i valori medi di S' , H' , e J' nelle diverse stazioni; l'analisi della varianza (ANOVA) non ha rilevato differenze significative tra i valori medi dei diversi siti per i tre indici sopra riportati (ANOVA, ns; Fig. 4.16).

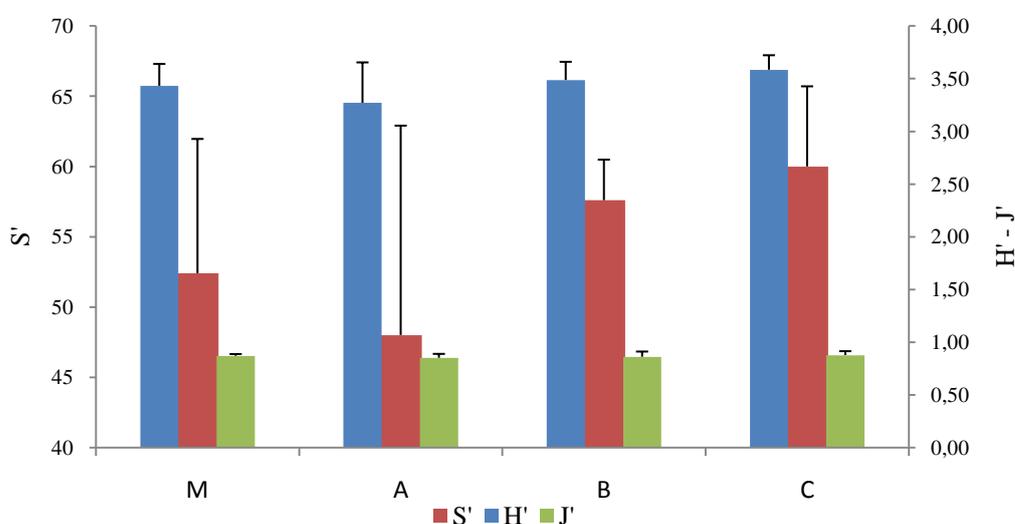


Fig. 4.16 – Valori medi di S' (ricchezza in ribotipi), H' (diversità batterica, indice di Shannon-Wiener) e J' (equidistribuzione dei ribotipi, indice di Pielou), per ciascuna delle quattro stazioni prese in esame

Sulla base dei ferogrammi relativi ad ogni campione, è stata inoltre costruita una matrice di similarità dalla quale è stata ricavata la visualizzazione grafica, tramite nMDS, delle distanze non parametriche tra le diverse comunità batteriche relative ad ogni campionamento (Fig. 4.17).

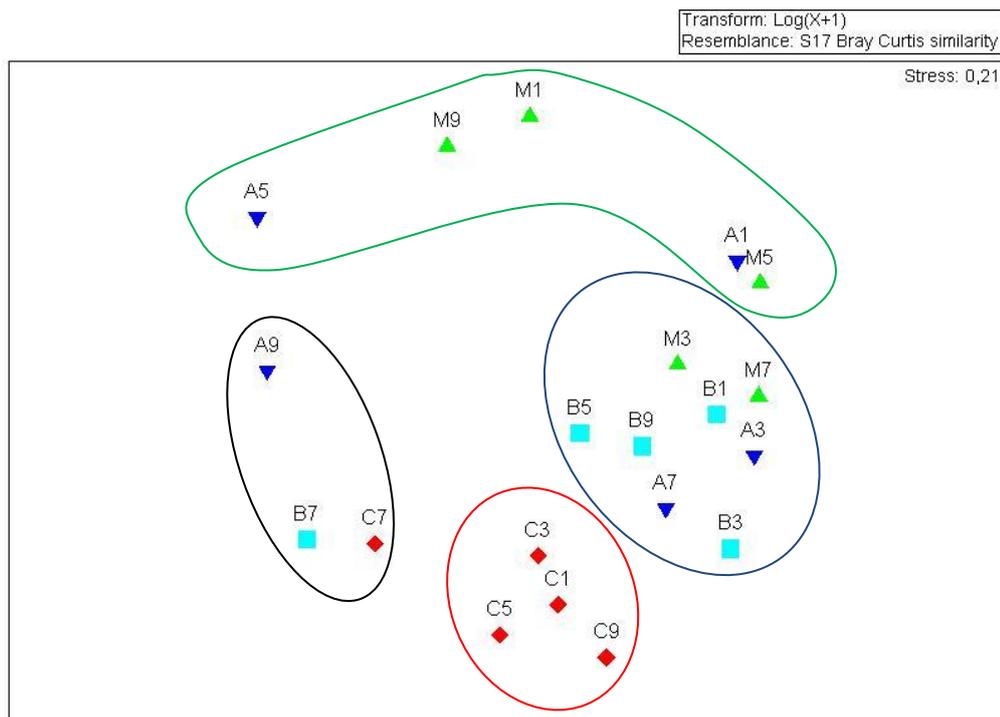


Fig. 4.17 – Rappresentazione grafica mediante nMDS dell'andamento della diversità batterica ottenuta mediante analisi ARISA. Sono raggruppati i campioni caratterizzati da una maggiore similarità.

Analizzando l'nMDS ottenuto è stato possibile individuare la vicinanza di campioni appartenenti a siti diversi e con differenti caratteristiche chimico-fisiche. Tale disposizione dei punti indica strutture e composizioni di comunità verosimilmente comparabili. Al fine di avvalorare questa ipotesi si è provveduto ad effettuare il test statistico ANOSIM (Analysis of Similarities), il quale è in grado di restituire un valore di similarità tra diversi gruppi di campioni in base alla struttura di comunità di ogni campione facente parte dello stesso raggruppamento. Per poter procedere col test ANOSIM è stato quindi necessario individuare insiemi di campioni verosimilmente differenti tra di essi; una prima analisi è stata effettuata prendendo in considerazione 6 diversi raggruppamenti così denominati e composti:

MU: comprendente i campioni M1, M9 E A5. Il confronto tra le comunità microbiche ha evidenziato una similarità del 54.5%, secondo la matrice di similarità calcolata mediante Bray-Curtis, tra i campioni M1e M9. In tutti e 3 i campioni si è in presenza di un flusso d'acqua proveniente dal lago

e in direzione dello Stretto, il valore medio di salinità registrato è pari a ~35.9; inoltre in suddetti campioni è stata riscontrata una dominanza di cianobatteri con ficoeritrina di tipo II (82-100%) rispetto alla composizione totale della popolazione picofitoplanctonica procariotica.

MU2: comprendente i campioni M5 e A1. Le comunità dei campioni appartenenti a questo raggruppamento presentano una similarità del 63.2% secondo la matrice di similarità calcolata mediante Bray-Curtis. In entrambi i campioni è stato osservato un flusso di acqua in uscita in direzione del mare registrato in presenza di una forte corrente montante nell'adiacente Stretto di Messina (vedi tavola di marea). E' stato registrato un valore medio di salinità pari a ~35.95, ed una temperatura media di 27.1°C; inoltre in suddetti campioni è stata riscontrata una dominanza totale (100%) di cianobatteri con ficoeritrina di tipo II rispetto alla composizione totale della popolazione picofitoplanctonica procariotica.

MA: comprendente i campioni M3, M7, A3 e A7. I quattro campioni presentano una similarità di oltre il 25% tra loro, si è in presenza dei massimi mareali scendenti nello Stretto, in corrispondenza di forti correnti di acqua marina in entrata in direzione del lago. In tutti e 4 i campioni si è in presenza dei massimi di salinità (valore medio 37.22); tra i 4 campioni appartenenti al gruppo vi è anche una similitudine degli andamenti dei parametri biologici, in tutte e 4 le comunità il VBR presenta i valori minimi (ca 0.1%), mentre si nota una presenza (dal 30 al 100%) dei cianobatteri con ficoritrina di tipo I nei popolamenti picofitoplanctonici totali.

BB: comprendente i campioni B1, B3, B5 e B9. In tale raggruppamento si è deciso di raggruppare tutti i campioni della stazione B, fatta eccezione per il campione B7 (vedi oltre), tra essi infatti intercorrono elevati valori di similarità, della struttura di comunità, che variano dal 25% (B1-B3) al 67% (B5-B9). Si tratta di comunità relative a campionamenti effettuati durante l'intero arco giornaliero nelle diverse condizioni idrografiche.

CC: comprendente i campioni C1, C3, C5 e C9. Si è deciso di raggruppare tutti i campioni della stazione C, fatta eccezione per il campione C7 (vedi oltre), in relazione ai valori di similarità che caratterizzano le comunità microbiche presenti (valore medio 32%).

ABC: comprendente i campioni A9, B7 e C7. Il grado di similarità delle comunità batteriche, caratterizzanti i suddetti campioni, varia dal 9% (A9-C7) al 33% (B7-C7). In tutti e 3 i campioni del raggruppamento si sono osservate le salinità minori dell'intero campionamento (valore medio 33.2) e i maggiori valori delle concentrazioni dei nitrati (valore medio $7.53 \mu\text{mol l}^{-1}$), ciò è dovuto al verosimile mescolamento con acqua dolce d'origine alloctona precedentemente discusso; nelle 3 stazioni in esame la totalità della comunità picofitoplanctonica è composta da cianobatteri di tipo II.

Il test statistico ANOSIM (Analisi delle Similarità), raggruppando i campioni come precedentemente descritto, ha fornito un R globale = 0.581 e $p < 0.001$ e ha messo in luce la presenza di differenze significative tra i gruppi di campioni presi in esame; i risultati sono riportati nella tabella 4.10

Tab. 4.10 – Risultati del test statistico ANOSIM effettuato sui campioni raggruppati secondo la prima ipotesi ($\mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4, \mu_5, \mu_6$). Valori significativi per significance level $< 5\%$.

ANOSIM					
Analysis of Similarities					
One-Way Analysis					
Global Test					
Sample statistic (Global R): 0,581					
Significance level of sample statistic: 0,1%					
Number of permutations: 999 (Random sample from a large number)					
Number of permuted statistics greater than or equal to Global R: 0					
Pairwise Tests					
Groups	R Statistic	Significance Level %	Possible Permutations	Actual Permutations	Number Observed
μ_1, μ_2	0,083	40	10	10	4
μ_1, μ_3	0,611	2,9	35	35	1
μ_1, μ_4	0,63	2,9	35	35	1
μ_1, μ_5	0,611	2,9	35	35	1
μ_1, μ_6	0,111	50	10	10	5
μ_2, μ_3	0,857	6,7	15	15	1
μ_2, μ_4	1	6,7	15	15	1
μ_2, μ_5	0,25	20	15	15	3
μ_2, μ_6	0,75	10	10	10	1
μ_3, μ_4	0,729	2,9	35	35	1
μ_3, μ_5	-0,073	62,9	35	35	22
μ_3, μ_6	0,778	2,9	35	35	1
μ_4, μ_5	0,604	2,9	35	35	1
μ_4, μ_6	0,537	5,7	35	35	2
μ_5, μ_6	0,778	2,9	35	35	1

L'analisi non ha evidenziato differenze significative tra le comunità del gruppo MU e MU2 e tra il gruppo BB e MA e i valori di R di tali confronti (rispettivamente 0.083 e -0.073) risultano essere i più bassi.

E' stato ritenuto opportuno quindi, per aumentare la potenza del test statistico, raggruppare le comunità MU e MU2 ($MU + MU2 = MU3$), e le comunità BB e MA ($BB + MA = BBMA$).

I risultati ottenuti effettuando l'analisi ANOSIM secondo il nuovo raggruppamento sono riportati nella tabella 4.11.

Tab. 4.11 - Risultati del test statistico ANOSIM effettuato sui campioni raggruppati secondo la seconda ipotesi (mu3, bbma, cc, abc). Valori significativi per significance level < 5%.

ANOSIM					
Analysis of Similarities					
One-Way Analysis					
Global Test					
Sample statistic (Global R): 0,616					
Significance level of sample statistic: 0,1%					
Number of permutations: 999 (Random sample from a large number)					
Number of permuted statistics greater than or equal to Global R: 0					
Pairwise Tests					
Groups	R Statistic	Significance Level %	Possible Permutations	Actual Permutations	Number Observed
mu3, bbma	0,553	0,2	1287	999	1
mu3, cc	0,506	1,6	126	126	2
mu3, abc	0,374	7,1	56	56	4
bbma, cc	0,713	0,2	495	495	1
bbma, abc	0,89	0,6	165	165	1
cc, abc	0,537	4,7	35	35	2

Come risulta, l'unione dei gruppi, precedentemente descritto, ha permesso di incrementare il global R del test aumentandone la significatività (R globale = 0.616; $p < 0.001$). Da questo nuovo confronto emerge la presenza di 4 possibili raggruppamenti di campioni, ognuno dei quali formato da comunità microbiche simili tra loro e significativamente diverse dalle comunità dei campioni appartenenti ad altri raggruppamenti (Fig. 4.17).

Le maggiori differenze si riscontrano tra le comunità batteriche del gruppo BBMA e CC ($R=0.713$; $p<0.002$), seguite dal confronto tra MU3 e BBMA ($R=0.553$; $p<0.002$), tra BBMA e ABC ($R=0.89$; $p<0,005$), tra MU3 e CC ($R=0.506$; $p<0.01$) e tra CC e ABC ($R=0.537$; $p<0.05$; Tab 3.11).

L'analisi della varianza effettuata sugli indici di diversità (S' , H' , J') dei 4 raggruppamenti utilizzati per l'analisi ANOSIM non ha evidenziato alcuna differenza significativa (ANOVA, ns; Fig. 4.18).

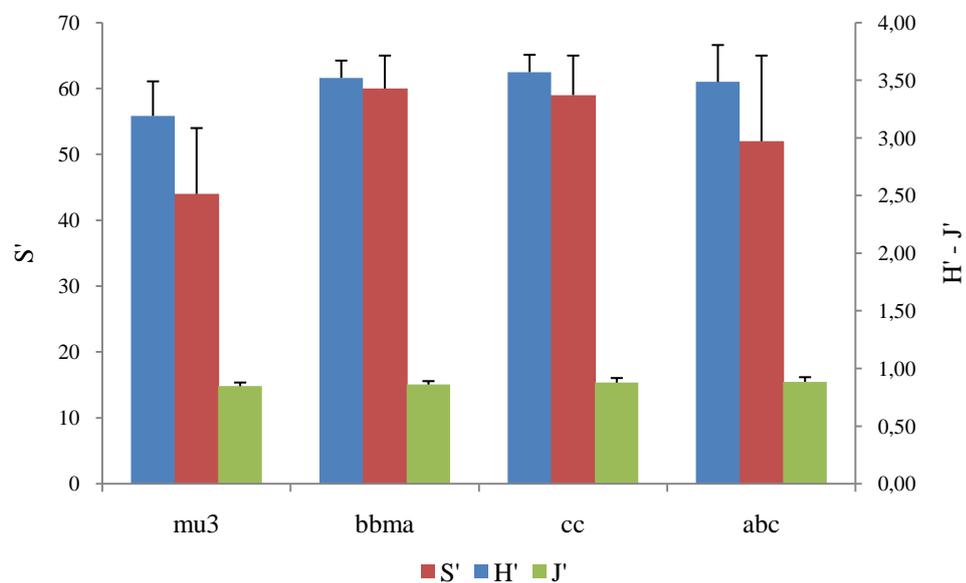


Fig. 4.18 – Valori medi del numero di ribotipi (S'), della diversità batterica (indice di Shannon-Wiener, H') e equidistribuzione dei ribotipi (indice di Pielou, J') per ciascuno dei quattro raggruppamenti (mu3, bbma, cc e abc).

5 – DISCUSSIONI

Lo studio delle comunità microbiche effettuato nel lago salmastro di Ganzirri nel periodo estivo (12 -13 Luglio 2010) e in condizioni di massime correnti di marea, ha permesso di evidenziare le dinamiche, a breve scala temporale, di abbondanza e di composizione di tali comunità in relazione ai parametri ambientali e alle diverse masse d'acqua presenti nel lago nel periodo di indagine.

Nel lago di Ganzirri, nell'arco delle 24 ore, sono state rilevate importanti abbondanze di tutte le componenti microbiche prese in esame: batterioplancton (valore medio: 4.27×10^9 cell Γ^{-1}), picofitoplancton, rappresentato in questo studio dai cianobatteri del genere *Synechococcus*, (valore medio: 2.96×10^8 cell Γ^{-1}) e virioplancton (valore medio: 1.60×10^{10} particelle Γ^{-1}). Le abbondanze batteriche sono risultate mediamente più alte (2-4 volte) di quelle riportate in letteratura per acque marine costiere (es. Paoli et al., 2006; Pan et al., 2007) mentre sono risultate confrontabili con quelle riportate per lagune costiere (Carvalho et al., 2003; Simonato et al., 2010). L'abbondanza media dei cianobatteri è risultata di un ordine di grandezza superiore a quella rilevata in zone costiere (es. Bernardi Aubry et al., 2006; Paoli & del Negro 2006; Pan et al., 2007) e simile ad altri ambienti di transizione presenti lungo le coste italiane (Caroppo, 2000; Bernardi Aubry et al., 2006; Sorokin et al., 2004; Paoli et al. 2007). Per quanto riguarda l'abbondanza virale, valori dello stesso ordine di grandezza sono stati riportati nella zona eufotica di molti ambienti neritici e pelagici (Pan et al., 2007; Suttle, 2007 e bibliografia in esso riportata); valori di un ordine di grandezza superiore sono stati osservati nello stesso ambiente di studio in altre condizioni idrografiche e stagionali (Vanucci et al., 2005) ed in altri ambienti lagunari costieri ed estuari (e.g. Hewson et al., 2001; Almeida et al., 2001; Schapira et al., 2009) spesso legati, oltre ad altri fattori, alle fioriture stagionali algali (Fhurman, 1999 e bibliografia in esso riportata; Vanucci et al., 2005). Il rapporto di abbondanza virus/batteri (VBR) è risultato tendenzialmente non elevato (VBR valore medio = 3.2) e ricade nel range dei valori medi riportati per la maggior parte delle acque marine

(Wommack & Colwell, 2000 e referenze in esso riportate; Suttle, 2007; Hewson & Fuhrman, 2007; Pan et al., 2007).

In questo ambiente salmastro, considerando l'intero set di dati, tutte le componenti microbiche, in termini di abbondanza, ed il rapporto VBR sono risultati positivamente correlati con la concentrazione della clorofilla *a* e della sostanza organica (quest'ultima verosimilmente anche di origine alloctona, vedi oltre); così come sono risultati correlati positivamente il VBR e l'abbondanza batterica. Queste correlazioni sottendono, in ultima analisi, le relazioni esistenti fra produzione primaria e/o stato trofico e la comunità microbica in tutti gli ecosistemi acquatici (Fuhrman et al., 1999; Corinaldesi et al., 2003; Weinbauer et al., 2004; Wilhelm & Matteson 2008 e bibliografia in esso riportata). Così come, in questo ambiente di transizione, la correlazione negativa osservata tra la salinità e le tre componenti microbiche riflette il grado di intrusione e di rimescolamento di masse d'acqua di diversa origine, prevalentemente di acqua marina proveniente dallo Stretto di Messina, ma anche di acque dolci di origine freatica e/o antropica (vedi oltre).

Per quanto concerne lo studio della composizione delle comunità batteriche, effettuata tramite tecnica di fingerprinting ARISA, nell'area di indagine sono stati identificati un numero relativamente elevato (209) di differenti unità tassonomiche operazionali (OTU). Le variazioni più ampie in ricchezza in ribotipi sono state osservate nelle comunità campionate nell'area di connessione con lo Stretto di Messina, con ricchezze minime in associazione a forti correnti in uscita (34 OTU) e ricchezze massime in associazione a forti correnti in entrata (67 OTU) indotte, rispettivamente, da massimi di corrente di marea montante e massimi di corrente di marea scendente nello Stretto. I valori degli indici di diversità (S' medio = 55; H' medio = 3.44; J' medio = 0.86) indicano una diversità batterica relativamente alta ed un'elevata omogeneità in quasi tutte le comunità. Attualmente non sono disponibili in letteratura studi di composizione di comunità di batterioplancton in ambienti lagunari effettuati con lo stesso metodo; sono invece disponibili per comunità batteriche di acque pelagiche oligotrofe e mesotrofiche di ampia distribuzione geografica (Hewson & Fuhrman, 2007; De Corte et al. 2010). La ricchezza in ribotipi trovata in questo studio, ricade nei range riportati per acque superficiali (OTU=

89 ± 37) e per quelle dello strato limite della zona eufotica (OTU= 81 ± 35; Hewson & Fuhrman, 2007). Inoltre, sebbene il confronto sia da effettuare con cautela, ricchezze e indici di diversità simili a quelli osservati in questo studio sono stati riportati nei sedimenti di lagune costiere (laguna di Lesina OTU = 88 ± 18 e laguna di Goro OTU = 94 ± 19, Danovaro et al., 2006; laguna di Venezia, Borin et al., 2009).

L'analisi ANOSIM, condotta su raggruppamenti di comunità batteriche individuati tramite rappresentazione nMDS della matrice di similarità Bray Curtis, ha evidenziato differenze significative fra più comunità, solo alcune delle quali associate a masse d'acqua differenti con caratteristiche chimico-fisiche e trofiche ben definite. In particolare sono state evidenziate due comunità batteriche, una associata alle acque presenti nella parte più occidentale del lago (St. C) e una seconda associata sia alle acque presenti nella parte più orientale del lago (St. B) che nelle acque marine in entrata dallo Stretto, ad indicare il forte contributo delle comunità microbiche marine in questa parte del lago.

Le rimanenti comunità analizzate sono, di fatto, riconducibili ad una miscellanea di ribotipi associati a masse d'acqua rimescolate (a seguito dell'azione mareale e dell'idrodinamismo del lago) e riscontrate, in uscita dal lago, nell'area di connessione tra il lago e lo Stretto. Fa eccezione un'unica comunità associata all'input di acque dolci ed evidenziata sinotticamente nelle stazioni B e C e, successivamente, nella stazione A in acque in uscita dal lago. Le differenze riscontrate nella composizione di questa comunità non si sono tradotte in differenze significative degli indici di diversità ad essa associati; ciò presumibilmente anche a seguito del fatto che le due principali comunità (vedi oltre) dalle quali verosimilmente originano, per parziale rimescolamento, presentano un numero analogo di ribotipi e simili indici di diversità.

Ne consegue che, nonostante le dimensioni relativamente piccole dell'ambiente preso in esame (338.400 m²), in base alla dinamica delle abbondanze, della composizione della comunità microbica, del VBR e della struttura e composizione della comunità batterica è stato possibile caratterizzare tre distinte aree:

- 1) l'area occidentale del lago di Ganzirri (stazione C): con le abbondanze più alte di picofitoplacton, di batterioplacton e una comunità batterica associata ben distinta, in acque eutrofizzate a bassa salinità (valore medio = 33.1);
- 2) area orientale del lago (St. B); con le abbondanze più alte di virioplancton e di VBR, e a cui si associa una comunità batterica ben distinta, in acque eutrofizzate a bassa salinità (valore medio = 34.7);
- 3) area di connessione con lo Stretto (St. A ed St. M) con le più basse abbondanze microbiche, in acque ad elevata salinità (valore medio = 36.3)

Area occidentale del lago di Ganzirri - La comunità microbica appare particolarmente strutturata in questa parte più interna del lago, dove le condizioni fisiche e idrochimiche permangono relativamente stabili nell'arco delle 24 ore e dove l'arrivo di acqua marina, in questo periodo dell'anno, sembra essere limitato anche in condizioni di massimi mareali; mentre input di acqua dolce di origine freatica e/o di origine antropica ricca di nutrienti inorganici sembra avere un ruolo più importante nel modificare la dinamica e la struttura di comunità. Questa zona si discosta significativamente dalla restante area di indagine per la salinità più bassa e per le concentrazioni più elevate di nutrienti (N e P), clorofilla *a* e di sostanza organica.

La composizione della comunità batterica è molto stabile ed associata alle condizioni chimico-fisiche e trofiche di quest'area; la ricchezza in specie è relativamente alta (59 OTU) così come l'indice di diversità di Shannon-Wiener ($H' = 3.57$), al quale si associa un elevato indice di uniformità ($J' = 0.87$).

La componente picofitoplanctonica della comunità microbica è rappresentata da una straordinaria abbondanza di cianobatteri coccoidi contenenti ficoeritrina tipo II ($> 10^9$ cell l^{-1} , di un ordine grandezza più alto rispetto agli altri siti), confrontabile solo con pochi altri ambienti di transizione, per esempio con la laguna di Cesine (Paoli et al. 2007). Questo tipo di cianobatteri presenta pigmenti fotosintetici che assorbono prevalentemente radiazioni verdi, quelle principalmente disponibili in ambienti caratterizzati da acque a bassa trasparenza. Questi organismi quindi, sono ecologicamente avvantaggiati in questi ambienti rispetto ai cianobatteri contenenti ficoeritrina tipo I, tipici delle acque marine e riscontrate nell'area di connessione con lo Stretto in condizioni

di massima corrente entrante. La presenza di concentrazioni così elevate di cianobatteri tipo II ulteriormente identifica l'ambiente come altamente eutrofizzato (Lantoiné & Neveux, 1997). Un numero così elevato di questi organismi, permette inoltre di ipotizzare che la produzione primaria, in questa area, sia sostenuta in buona parte da questa componente picoplanctonica (Sorokin et al., 2004; Paoli et al. 2007). Nell'area in esame è stato possibile inoltre evidenziare, almeno parzialmente, una dinamica di variazioni giorno-notte dei cianobatteri con massimi di abbondanza durante le prime ore del giorno in assenza di luce (h 3- 5.30) e con massimi di frequenza di divisione cellulare nella seconda parte della giornata (da mezzogiorno al tardo pomeriggio). Ad oggi gli studi sulla dinamica giornaliera della comunità microbica sono limitati (es. Bettarel et al. 2002; Winter et al., 2004); l'andamento riscontrato in questo studio è parzialmente riconducibile a quello osservato nel Mediterraneo Nord occidentale da Bettarel et al. (2002) nel quale i massimi di densità dei cianobatteri sono stati osservati intorno alla mezzanotte e i massimi di divisione cellulare in prima serata.

In questa area si riscontrano anche i massimi di abbondanza del batterioplancton (valore medio: 7.69×10^9 cell l⁻¹). Il batterioplancton presenta un trend giornaliero poco definito e differente da quello dei cianobatteri, con minimi nelle prime ore del mattino (ore: 3) e massimi intorno alla mezzanotte.

Il virioplancton presenta un trend giornaliero con minimi intorno alla mezzanotte e massimi nel tardo pomeriggio e parzialmente complementare a quello osservato per i cianobatteri, similmente a quanto osservato da Bettarel et al. (2002). Ciò permette di ipotizzare la presenza di cianofagi e di un loro controllo, tramite lisi virale, delle densità dei cianobatteri; in quest'area, infatti le densità dei cianobatteri sono dello stesso ordine di grandezza dei batteri. Un legame simile fra virus e *Synechococcus* è stato osservato anche da Bettarel et al. (2002) che ipotizza la stessa relazione preda-predatore fra cianobatteri e virioplancton cadenzata da ritmi circadiani dell'attività fotosintetica picofitoplanctonica.

Questi andamenti giornalieri sono modificati temporaneamente dall'input di acque dolci, presumibilmente di origine freatica, ricche di nutrienti, in particolare di composti azotati. La comunità batterica inoltre, oltre a mostrare

variazioni di abbondanza subisce variazioni anche nella composizione, differenziandosi significativamente da quella normalmente osservata nel sito.

Per quanto concerne l'attività virale (valuta in questo studio in termini di VBR), in questa zona del lago, è risultata non di particolare entità (VBR = 3), ed il VBR è risultato positivamente correlato con l'abbondanza virale; questo tipo di correlazione è stato osservato in molti ambienti e in acque di tutte le profondità, a testimonianza della presenza di un'azione virale (Hewson & Fuhrman, 2007). Tuttavia, in quest'area, è possibile ipotizzare che la pressione esercitata dai virus sul batterioplancton, sia per il controllo della densità che della struttura di comunità, sia secondario rispetto al controllo esercitato dalla elevata disponibilità e variabilità (in termini di qualità) delle risorse (controllo bottom-up) e anche da altri fattori quali l'attività di grazing (Suttle, 2007; Hewson & Fuhrman 2007). L'area è caratterizzata da alte concentrazioni di nutrienti ed elevato carico trofico, sia in termini di sostanza organica, (anche di origine alloctona), che in termini di biomassa autotrofa (valore medio di Chl *a* > 4 µg l⁻¹). In questi ambienti la disponibilità di materia organica, diversificata anche in composizione, può creare le condizioni per lo sviluppo di molte nicchie ecologiche e quindi di alta diversità batterica; la sostanza riciclata tramite il virial loop, costituirebbe solo un rumore di fondo (Hewson & Fuhrman, 2007). La diversità batterica è stata messa in relazione all'abbondanza e alla varietà di composizione della sostanza organica in acque costiere e in acque caratterizzate da gradienti trofici estuarini (es. Hewson & Fuhrman, 2004; Paoli et al. 2006; Alonso et al., 2010; Hewson Collusi et al., 2011) e in sedimenti di lagune costiere (Danovaro & Pusceddu 2007).

Area orientale del lago - L'area orientale del lago è caratterizzata da una comunità di cianobatteri di tipo II simile a quella riscontrata nella zona più occidentale, ma con abbondanze di oltre un ordine e mezzo inferiori (4.59×10^7 cell l⁻¹) e confrontabili con quelle riscontrate in acque costiere ed estuariali (Pan et. al., 2007). Il trend giornaliero appare molto diverso da quello individuato nell'area occidentale con valori minimi nelle prime ore del mattino (h 3 – 5.30) e in condizioni anossiche di difficile interpretazione con i dati disponibili; il basso fondale (ca. 2 m), che caratterizza quest'area, associato alle alte temperature di stagione e ad un'eventuale attività di grazing sui

cianobatteri, potrebbe suggerire un'ipotesi per ulteriori indagini. Per quanto riguarda il batterioplancton, le abbondanze rilevate in quest'area (valore medio: 5.70×10^9 cell l^{-1}) sono simili a quelle rinvenute nell'area occidentale; mentre il VBR presenta un valore medio più elevato (5.3) e, come osservato nell'area occidentale, è correlato con le abbondanze virali. Tuttavia, come previamente accennato, la comunità batterica presente in questa area (alla quale è associata un'elevata ricchezza e diversità; $S' = 60$ OTU; $H' = 3.52$; $J' = 0.86$) è simile a quella riscontrata nelle masse d'acqua di origine marina in entrata nel lago, sebbene queste ultime presentino abbondanze di oltre un ordine di grandezza inferiore (valore medio: 2.20×10^8 cell l^{-1}). Questo risultato evidenzia che:

- i) quest'area del lago è fortemente influenzata dalle comunità batteriche associate alle masse d'acqua marine e quindi alle caratteristiche chimico-fisiche delle stesse;
- ii) le condizioni trofiche presenti in quest'area favoriscono la crescita e la produzione batterica, come evidenziato anche dalla percentuale dei batteri in divisione significativamente più alta in quest'area rispetto alla restante area di indagine;
- iii) a questo aumento di abbondanza batterica si associa un aumento significativo di VBR (VBR= 5 e ~1, rispettivamente nelle acque di questa area e nelle acque marine) e l'assenza di effetti significativi sulla composizione e diversità della comunità batterica, almeno nella breve scala temporale utilizzata.

Sebbene siano auspicabili ulteriori indagini, questi dati indicano un incremento del controllo da parte dei virus (controllo top-down), nel mantenimento della composizione e della diversità batterica di una comunità strutturata in acque oliogotrofe (vedi oltre). La mortalità indotta dai virus sul batterioplancton è infatti selettivamente dipendente dalle specie batteriche che raggiungono un determinato tasso di crescita o abbondanza (Wommack & Colwell, 2000) con un'azione riconducibile all'ipotesi "kill the winner" (Suttle, 2000).

Area di connessione – L'area di connessione con lo stretto di Messina evidenzia un'alternanza di comunità microbiche associate alle masse d'acqua che vi transitano seguendo i flussi mareali. Nelle acque marine sono presenti cianobatteri coccoidei del genere *Synechococcus* con ficoeritrina di tipo I

(valore medio: $4.75 \cdot 10^6$ cell l^{-1}), i quali sembrano non essere competitivi una volta entrati nel lago. I valori delle abbondanze del picofitoplancton e del batterioplancton nelle acque marine entranti in quest'area sono risultati dello stesso ordine di quelli osservati nelle acque marine superficiali dello Stretto di Messina (Acosta Pomar et al., 1991; Maugeri et al., 1992) e, per quelli del virioplancton e del VBR, simili a quelli riscontrati in acque oligotrofe del Mediterraneo (Bettarel et al., 2002; Weinbauer et al., 2003; Stopar et al., 2004). Le acque marine fluite all'interno del lago sono state prevalentemente di provenienza tirrenica, sebbene vi sia un rimescolamento con acque ioniche dovuto ai turbolenti moti dello Stretto e con acque profonde di origine levantina che risalgono in modo rapido all'altezza della "sella" Ganzirri; questa corrente scendente scorre prevalentemente lungo la costa siciliana e si traduce in un ingresso di acqua tipicamente marina nel canale Carmine, e quindi nel lago di Ganzirri. La corrente montante, invece, a seguito della conformazione del bacino ionico e della costa a livello della sella Ganzirri-Punta Pezzo, scorre prevalentemente lungo le coste calabre e il dislivello delle acque dei due bacini (Tirrenico e Ionico) si traduce localmente in una corrente in uscita dal lago, anche nelle fasi di stanca che seguono la corrente montante.

6 – CONCLUSIONI

A fronte del presente studio è stato possibile ricavare diverse conclusioni sulla struttura e sulla dinamica delle comunità microbiche, sui cambiamenti che queste subiscono su breve scala temporale e sulle variazioni indotte dall'intrusione di differenti corpi idrici, o da imput alloctoni, nell'area in esame.

E' stato possibile ipotizzare un modello di variazione e dinamica della struttura della comunità microbica nelle diverse zone dell'area. Nell'area più occidentale (St. C), come detto, si è registrata la massima densità batterica, nonché il numero più alto di OTU presenti (60), mentre vi è un VBR relativamente basso (~3); in aggiunta all'elevato trofismo di questa zona, si è avanzata l'ipotesi di come la comunità batterica ivi presente subisca un importante controllo di tipo bottom-up, e che la varietà di nutrienti e la diversa qualità di sostanza organica favorisca la creazione di numerose nicchie ecologiche. Si può ipotizzare che questo tipo di controllo, almeno su breve scala spazio-temporale, possa portare ad una struttura della comunità batterica stabile nel tempo, influenzata minimamente dagli influssi mareali durante la stagione estiva caratterizzata da stratificazione delle acque e basso idrodinamismo. Per contro un controllo di tipo top-down da parte della componente virale sembrerebbe più evidente sulla porzione autotrofa.

Si ipotizza invece che la comunità della zona orientale, originata da una comunità marina, sia maggiormente soggetta ad un'attività virale. La constatazione di un mantenimento costante della diversità batterica, intesa come uguali ribotipi, e dei tre indici di diversità (S' , H' e J'), induce a pensare che: una comunità con caratteristiche pelagiche, caratterizzata da una discreta diversità, venga introdotta in un ambiente estremamente ricco in nutrienti, ciò potrebbe condurre poche specie, competitivamente dominanti, ad avere il sopravvento ma, l'azione virale, basata sull'ipotesi *kill the winner*, potrebbe controllarne la densità e favorire l'espressione anche delle specie meno

competitive, mantenendo più o meno inalterata la diversità iniziale, almeno per un lasso di tempo limitato quale può essere la scala temporale del nostro studio.

7 - BIBLIOGRAFIA

- AA. VV. 1990. Metodi nell'Ecologia del plancton marino. Nova Thalassia, 11: 123-158.
- Azam, F. and Hodson, R. E. 1977. Dissolved ATP in the sea and its utilization by marine bacteria. *Nature*; 267: 696-698.
- Azam, F. and Malfatti, F. 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*; 5: 782-791.
- Azam, F., Fenche, T., Field, J. G., Gra, J. S., Meyer-Rei, L. A. and Thingstad, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*; 10: 257-263.
- Becquevort, S., Mathot, A. and Lancelot, C. 1992. Interactions in the microbial community of the marginal ice zone of the north-western Weddell Sea through size distribution analysis. *Polar Biol.*, 12: 211-218.
- Bergh, Ø., Børsheim, K. Y., Bratbak, G. and Heldal, M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*; 340: 467-468
- Berman, T. 1987. Nutrient flux between bacteria, bacterivorous nanoplanktonic protists and algae. *Marine Microbiology Food Webs*; 2: 69-82.
- Bettarel, Y., Dolan, J.R., Hornak, K., Lemeè, R., Masin, M., Pedrotti, M.L, Rochelle-Newall, E., Simek, K. and Sime-Ngando, T. 2002. Strong, weak, and missing links in a microbial community of the N.W. Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Ecology*; 42: 451-462.
- Bjørnsen, P. K. 1988. Trophic interactions between heterotrophic nanoflagellates and bacterioplankton in manipulated seawater enclosures. *Limnology Oceanography*; 33: 409-420.
- Borin, S., Brusetti, L., Daffonchio, D., Delaney, E., and Baldi, F. 2009. Biodiversity of prokaryotic communities in sediments of different sub-basins of the Venice lagoon. *Research in Microbiology*; 160: 307-314
- Bratbak, G. and Heldal, M..1995. Viruses-the new players in the game: their ecological role and could they mediate genetic exchange by transduction? *In* I. Joint (ed.), *Molecular ecology of aquatic microbes*; 38: 249-264.

- Breitbart, M. and Rohwer, F. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*; 13: 278-284.
- Bryant, D. A. and Frigaard, N. U. 2006. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in Microbiology*; 14: 488-496.
- Callieri, C. 2007. Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews*; 1: 1-28.
- Campbell, L., Liu, H., Nolla, H. A. and Vault, D. 1997. Annual variability of phytoplankton and bacteria in the subtropical North Pacific Ocean at Station ALOHA during the 1991 - 1994 ENSO event. *Deep-Sea Research*; 44: 167-192.
- Caroppo, C., Vanucci, S., Del Negro, P., La Ferla, R. B., Maimone, G. And Maugeri, T. L. 2010. Abbondanza e biomassa del picofitoplancton (Microscopia ad epifluorescenza). In Socal G., Buttino I., Cabrini M., Mangoni O., Penna A., Totti C. *Metodologie di studio del Plancton marino*. (pp. 141-148).
- Celassi, M., Pugnetti, A. and Del Negro P. 2009. Structural dynamics of bacterioplankton assemblages in the Lagoon of Venice. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*; 84: 154-160.
- Charlson, R. J., Lovelock, J. E., Andreae, M. O. and Warren, S. G. 1987. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature*; 21: 326-655.
- Cho, B. C. and Azam, F. 1987. Significance of bacterioplankton biomass in the epipelagic and mesopelagic zones in the Pacific Ocean. *Eos*; 68: 1729.
- Christaki, U., Vázquez-Domínguez, E., Courties, C. and Lebaron, P. 2006. Grazing impact of different heterotrophic nanoflagellates on eukaryotic (*Ostreococcus tauri*) and prokaryotic picoautotrophs (*Prochlorococcus* and *Synechococcus*). *Environmental Microbiology*; 7: 1200-1210.
- Clasen, J. L., Brigden, S. M., Payet, J. P., and Suttle, C. A. 2008. Evidence that viral abundance across oceans and lakes is driven by different biological factors. *Freshwater Biology*; 53: 1090-1100.
- Cochlan, W. P., Wilkner, J., Steward, G. F., Smith, D. C. and Azam, F. 1993. Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments. *Marine Ecology Progress Series*; 92: 77-87.

- Cochran, P. K. and Paul J. H. 1998. Seasonal abundance of lysogenic bacteria in a subtropical estuary. *Applied Environmental Microbiology*; 64: 2308.
- Cushing, D. H. 1989. A difference in structure between ecosystems in strongly stratified waters and in those that are only weakly stratified. *Plankton Research*; 11: 1-13.
- Dalby, A. P., Kormas, K. A., Christaki, U. and Karayanni, H. 2008. Cosmopolitan heterotrophic microeukaryotes are active bacterial grazers in experimental oil-polluted systems. *Environmental Microbiology*; 10: 47–56.
- Danovaro, R., Luna, G., Dell’Anno, A. and Pietrangeli, B. 2007. Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes. Authors’ reply. *Applied and Environmental Microbiology*; 73: 2399–2401.
- Danovaro, R., Luna, G., Dell’Anno, A. and Pietrangeli, B. 2006. Comparison of two fingerprinting Techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*; 72: 5982–989.
- Danovaro, R., Corinaldesi, C., Filippini, M., Fischer U. R., Gessner, M. O., Jacquet, S., Magagnino, M. and Velimirov, B. 2008. Viriobenthos in freshwater and marine sediments: a review. *Freshwater Biology*; 53: 1186-1213.
- Danovaro, R. and Pusceddu, A. 2007. Biodiversity and ecosystem functioning in coastal lagoons: Does microbial diversity play any role? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*; 75: 4-12.
- Fera, M. T., Gugliandolo, C., Lentini, V., Favalaro, A., Bonanno, D., La Camera, E. and Maugeri, TL. 2010. Specific detection of *Arcobacter* spp. in estuarine waters of Southern Italy by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Letters in Applied Microbiology*; 50: 65-70.
- Finkel, Z. V., Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T. A. V. and Raven J. A. 2010. Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of plankton research*; 32: 119-137.

- Fogg, G. E. 1986a. Picoplankton. Royal Society London; 228: 1-30.
- Fuhrman, J. A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*; 399: 541-548.
- Fuhrman, J. A. and Suttle, C. A. 1993. Viruses in marine planktonic systems. *Oceanograph*; 5: 51-63.
- Fuhrman, J. A. and Noble, R. T.. 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology Oceanography*; 40: 1236-1242.
- Fuhrman, J.A. and Hagstrom, A. 2008. Bacterial and archeal community structure and its patterns. In *Microbial Ecology of the Oceans*, second edition. (pp. 45-90)
- Fuhrman, J. A., Azam, F. 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Canada, Antarctica, and California, USA. *Applied Environmental Microbiology*; 39: 1085-1095.
- Gugliandolo, C., Lentini, V. and Maugeri, T. L. 2010. Distribution and Diversity of Bacteria in a Saline Meromictic Lake as Determined by PCR-DGGE of 16S rRNA Gene Fragments.
- Hagström, Å., Larsson, U., Horstedt, P. and Normark, S. 1979. Frequency of dividing cells: a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Applied Environmental Microbiology*; 37: 805-812.
- Hara, S., Koike, I., Terauchi, K., Kamiya, H. and Tanoue, E. 1996. Abundance of viruses in deep oceanic waters. *Marine Ecology Progress Series*; 145: 269-277.
- Hewson, I. and Fuhrman, J. A. 2007. Covariation of viral parameters with bacterial assemblage richness and diversity in the water column and sediments. *Deep-Sea Research*; 54: 811-830
- Hobbie, J. Daley, R. J., Jasper, S. 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Applied Environmental Microbiology*; 33, 1225-1228.
- Jiang, S. C. and Paul, J. H. 1997. Significance of lysogeny in the marine environment: studies with isolates and a model of lysogenic phage production. *Microbial Ecology*; 35: 235-243.

- Karl, D. M., and Bossard, P. 1985. Measurement and significance of ATP and adenine nucleotide pool turnover in microbial cells and environmental samples. *Journal of Microbiology Method*; 3: 125-139.
- Legendre, L., Rassoulzadegan, F. 1995. Plankton and nutrient dynamics in marine waters. *Ophelia*; 41: 153-172.
- Legendre, L. and Rivkin, R. B. 2008. Planktonic food webs: microbial hub approach. *Marine Ecology Progress Series*; 365: 289-309.
- Lenski, R. E. 1988. Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage. *Advanced Microbiology Ecology*; 10: 1-44.
- Mannini, E., Luna, G. M., Corinaldesi, C., Zeppilli, D., Bortoluzzi, G., Caramanna, G. and Raffa, F. 2007. Prokaryote diversity and virus abundance in shallow hydrothermal vents of the Mediterranean sea and the Pacific ocean. *Microbiology Ecology*; 55: 626 – 639.
- Mathias, C. B., Kirschner, A. K. T. and Velimorov, B. 1995. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube River. *Applied Environmental Microbiology*; 61: 3734-3740.
- Maugeri, T.L. , Bianconi, G., Canganella, F., Danovaro, R., Gugliandolo, C., Italiano, F., Lentini, V., Manini, E. and Nicolaus, B. 2010. Shallow hydrothermal vents in the southern Tyrrhenian Sea. *Chemistry and Ecology*; 26: 285-298.
- Maugeri, T.L. , Lentini, V. , Gugliandolo, C., Cousin, S. and Stackebrandt, E. 2010. Microbial Diversity at a Hot, Shallow-Sea Hydrothermal Vent in the Southern Tyrrhenian Sea (Italy). *Geomicrobiology Journal*; 27,:380-390.
- Mitchell, J. G., Okubo, A. and Fuhrman, J. A. 1985. Microzones surrounding phytoplankton form the basis for a stratified marine microbial ecosystem. *Nature (London)*; 316: 58-59.
- Mousseau, L., Legendre, L. and Fortier, L. 1996. Dynamics of size-fractionated phytoplankton and trophic pathways on the Scotian shelf and at the shelf break, Northwest Atlantic. *Aquatic Microbial Ecology*; 10: 149-163.
- Noble, R. T. and Fuhrman, J. A. 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*; 14: 113-118.

- Pan, L. A., Zhang, J. and Zhang, L. H. 2007. Picophytoplankton, nanophytoplankton, heterotrophic bacteria and viruses in the Changjiang Estuary and adjacent coastal waters. *Journal of plankton research*; 29: 187-197.
- Paoli, A., Celassi, M., Valeri, A., Larato, C., Bussani, A., Umani, S. F., Vadrucchi, M. R., Mazziotti, C. and Del Negro, P. 2007. Picocyanobacteria in Adriatic transitional environments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*; 75: 13-20.
- Paoli, A., Karuza, A., De Vittor, C., Del Negro, P. and Umani, S. F. 2006. Daily variations of highly active bacteria in the Northern Adriatic Sea. *Journal of plankton research*; 28: 325-335.
- Paul, J. H., Rose, J. B., Jiang, S. C., Kellogg, C. A. and Dickson, L. 1993. Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. *Applied Environmental Microbiology*; 59: 718-724.
- Pedrós-Alió, C. 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*; 14: 257-263.
- Pedrós-Alió, C., 2006. Genomics and marine microbial ecology. *International Microbiology*; 9: 191-197.
- Proctor, L. M. and Fuhrman, J. A. 1991. Roles of viral infection in organic particle flux. *Marine Ecology Progress Series*; 69: 133-142.
- Proctor, L. M. 1997. Advances in study of marine viruses. *Microscale Research Technology*; 37: 136-161.
- Proctor, L. M. and Fuhrman, J. A. 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*; 343: 60-62.
- Pugnetti, A., Del Negro, P., Giani, M., Acri, F., Bernardi Aubry, F., Bianchi, F., Berto, D. and Valeri, A., 2010. Phytoplankton-bacterioplankton interactions and carbon fluxes through microbial communities in a microtidal lagoon. *FEMS Microbiology Ecology*; 72: 153-164.
- Riemann, B. 1978. Differentiation between heterotrophic and photosynthetic plankton by size fractionation, glucose uptake, ATP and chlorophyll content. *Oikos*; 31: 358-367.
- Smith, C. J., Danilowicz, B., Clear, A. K., Costello, F. J., Wilson, B. and Meijer, W. 2005. *FEMS Microbiology Ecology* 54 375–38

- Steward, G. F., Smith, D. C. and Azam, F. 1996. Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi Sea. *Marine Ecology Progress Series*; 131: 287-300.
- Stockner, Y. G. 1988. Autotrophic picoplankton: an overview from marine and freshwater ecosystem. *Limnology Oceanography*; 33: 765-775.
- Suttle, C. A. and Chan, A. M. 1994. Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Syneococcus* spp. *Applied Environmental Microbiology*; 60: 3167-3174.
- Suttle, C. A. 2005. Viruses in the sea. *Nature*; 437: 356-361.
- Suttle, C. A. 2007. Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Microbiology*; 5: 801-812.
- Suttle, C. A. and Fuhrman, J. A. 2010. Enumeration of virus particles in aquatic or sediment samples by epifluorescence microscopy. *Manual of aquatic viral ecology*; 15: 145-153.
- Tadonlèkè, R. D., Pinel-Alloul, B., Bourbonnais, N. and Pick, F. R. 2004. Factors affecting the bacteria-heterotrophic nanoflagellate relationship in oligo-mesotrophic lakes. *Journal of plankton research*; 26: 681-695.
- Thingstad, T. F., and Lignell, R. 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology*; 13: 19-27.
- Torrella, F. and Morita, R. Y. 1979. Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. *Applied Environmental Microbiology*; 37: 774-778.
- Valentine, A. F., Chen, P. K., Colwell, R. R. and Chapman, G. B. 1966. Structure of a marine bacteriophage as revealed by the negative-staining technique. *Journal of Bacteriology*; 91: 819-822.
- Vanucci, S., Bruni, V. And Pulicanò, G. 2005. Spatial and temporal distribution of virioplankton and bacterioplankton in a brackish environment (Lake of Ganzirri, Italy). *Hydrobiologia*; 539: 83-92
- Weinbauer, M. G. and Hoffle, M. G. 1998. Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in an eutrophic lake. *Applied Environmental Microbiology* ; 64: 431-438.

- Weinbauer, M. G. and Peduzzi, P. 1995. Significance of viruses versus heterotrophic nanoflagellates for controlling bacterial abundance in the Northern Adriatic Sea. *Journal of Plankton Research*; 17: 1851-1856.
- Weinbauer, M. G. and Suttle C. A. 1996. Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the Gulf of Mexico. *Applied Environmental Microbiology*; 62: 4374-4380.
- Weinbauer, M. G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*; 28: 127–181.
- Weinbauer, M. G., Brettar, I. and Hofle, M. G., 2003. Lysogeny and virus-induced mortality of bacterioplankton in surface, deep, and anoxic marine waters. *Limnology and Oceanography*; 48: 1457–1465.
- Weinbauer, M. G. and Rassoulzadegan, F. 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*; 6: 1-11.
- Weisse, T. and Cheffel-Moser, U. 1991. Uncoupling the microbial loop: growth and grazing loss rates of bacteria and heterotrophic nanoflagellates in the North Atlantic. *Marine Ecology Progress Series*; 71: 195-205.
- Wilcox, R. M. and Fuhrman, J. A. 1994. Bacterial viruses in coastal seawater: lytic rather than lysogenic production. *Marine Ecology Progress Series*; 114: 35-45.
- Wilhelm, S. W., Weinbauer, M. G., Suttle, C. A. and Jeffrey, W. H. 1998. The role of sunlight in the removal and repair of viruses in the sea. *Limnology Oceanography*; 43: 586-592.
- Wilhelm, S. W. and Matteson, A. R. 2008. Freshwater and marine viroplankton: a brief overview of commonalities and differences. *Freshwater Biology*; 53: 1076-1089.
- Wilhelm, S. W. and Suttle, C. A. 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience*; 49: 781–788.
- Winter, C., Herndl, G. J. and Weinbauer, M. G. 2004. Diel cycles in viral infection of bacterioplankton in the North Sea. *Aquatic Microbial Ecology*; 35: 207-216.
- Wolsing, M. and Priemè, A. 2004. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil. *FEMS Microbiology Ecology*; 48: 261 -271.

Wommack, K. E., and Colwell R. R. 2000. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Applied Environmental Microbiology* ; 64: 69-114.