



# Primi risultati del progetto LIFE+ sulle analisi microbiologiche delle acque nel Parco dei Gessi dell'Emilia Romagna

DIANA I. SERRAZANETTI<sup>1</sup>, DAVIDE GOTTARDI<sup>1</sup>, CHIARA MONTANARI<sup>1</sup>, M. ELISABETTA GUERZONI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università degli Studi di Bologna, Via Fanin 44, 40127 Bologna; diana.serrazanetti3@unibo.it

## Abstract

The Project Life + 08NAT/IT/000369 "Gypsum" 2, co-financed by the European Union, has started in the spring of 2010. This project aims to protect and manage the main karst caves and sites of Emilia-Romagna region. The A3 action provides a periodic monitoring of the main karst aquifers in terms of chemistry and microbiology.

During the first year and a half, karst waters of 50 control points were analysed (sinking streams, rivers and streams in caves, and resurgences).

The objective of this study is to evaluate the impact, in the waters of the cave, of agricultural substances or other forms of pollution or settlements related to human activities or natural factors. The experiment was developed using traditional microbiology techniques and molecular biology techniques (PCR and 16S rRNA PCR-DGGE), focused on the characterization of microbial populations in the different sampling sites and determination of their variations and/or changes. The total microbial concentration ranged from a maximum of 3.32 or 2.26 to values below the limit of detection (1 log CFU/ml) for total and faecal coliforms, respectively. The genetic analysis showed the presence of numerous bacterial species (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Rahnella aquatilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pedobacter swuonensis*, *Enterobacter* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter*, *Klebsiella* and *Raoultella*). The organisms identified have different origins, some come from the ground, others are common water contaminants and others derive from human activities (faecal bacteria). Up to now, PCR-DGGE revealed the ecological changes, in terms of microbial populations present in the samples, and different sampling sites within the same cave.

## Keywords

Karst Water, Microorganisms, Molecular Biology, Anthropogenic Ecological Impact

## Riassunto

Dal 2010 è in corso il Progetto Life + 08NAT/IT/000369 "Gypsum" 2, cofinanziato dall'Unione Europea, finalizzato alla tutela e gestione dei principali ambienti gessosi dell'Emilia Romagna. Nell'ambito dell'Azione A3 è previsto un monitoraggio pluriennale dei principali acquiferi carsici sotto l'aspetto chimico e microbiologico. Nel corso del primo anno sono state analizzate le acque carsiche su circa 50 punti di controllo (inghiottitoi, fiumi, torrenti in grotta, e risorgenti). In generale l'obiettivo di questa sperimentazione è quello di valutare l'impatto di sostanze di origine agricola o di altre forme di inquinamento, legate ad insediamenti o attività antropiche o fattori naturali, in acque di grotta. La sperimentazione è stata sviluppata tramite tecniche microbiologiche classiche e di biologia molecolare (PCR 16S rRNA e PCR-DGGE), finalizzate alla caratterizzazione delle popolazioni microbiche presenti nei diversi siti di prelievo e alla determinazione di loro eventuali variazioni e/o evoluzioni. I valori di carica microbica totale determinati oscillavano da un massimo di 3.32 ad un minimo di 0.18 log UFC/ml e da un massimo di 2.26 fino a valori al di sotto del limite di determinazione (1 log UFC/ml) per quanto riguarda i coliformi totali e fecali. Le analisi genetiche hanno mostrato la presenza di numerosi specie batteriche (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Rahnella aquatilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pedobacter swuonensis*, *Enterobacter* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter*, *Klebsiella* and *Raoultella*). I microrganismi identificati possono avere diverse origini, alcuni provengono dal terreno, altri possono essere comuni contaminanti delle acque ed altri avere un'origine antropica (batteri fecali). Fino a questo step del progetto, l'analisi PCR-DGGE ha evidenziato le evoluzioni ecologiche, in termine di popolazioni microbiche, presenti tra i diversi campioni e i diversi siti di campionamento all'interno di una stessa grotta.

## Parole Chiave

Acque carsiche, microrganismi, biologia molecolare, impatto antropologico ecologico

## Introduzione

Dal 2010 è in corso il Progetto Life + 08NAT/IT/000369 "Gypsum"2, cofinanziato dall'Unione Europea, finalizzato alla tutela e gestione dei principali ambienti gessosi dell'Emilia-Romagna. Nell'ambito dell'Azione A3 è previsto un monitoraggio pluriennale dei principali acquiferi carsici sotto l'aspetto chimico e microbiologico (Tabella 1). Negli ecosistemi acquatici la popolazione batterica gioca un ruolo essenziale nella trasformazione e nella demineralizzazione dei nutrienti e delle sostanze presenti. Inoltre le acque, oggetto di studio, possono avere diverse tipologie di contaminazione: sostanze di origine agricola (nutrienti, pesticidi e sedimenti), contaminazione antropica (allevamenti, nuclei residenziali etc.) e contaminazione naturale determinata dall'incidenza di una specifica specie animale autoctona (chironomidi).

Generalmente l'impatto microbiologico è strettamente correlato ad ogni tipo di contaminazione. Le popolazioni microbiche infatti vengono influenzate dall'ambiente e la loro evoluzione e i loro cambiamenti nel tempo possono rispecchiare delle situazioni particolari. I microrganismi tipi-

ci di ambienti estremi o poveri di nutrienti (come lo sono le acque di grotta) possono essere inoltre sfruttati per caratteristiche particolari applicabili anche a livello tecnologico.

Uno dei limiti più significativi del campionamento di ecosistemi acquatici in termini microbiologici è dato dal fatto che le tecniche di microbiologia tradizionali non sono più in grado di fornire una visione completa del campione analizzato. Per ovviare a questo problema, lo sviluppo e l'applicazione di nuove tecniche di biologia molecolare permettono di caratterizzare la popolazione microbica presente in un determinato ecosistema anche di fronte a variazioni ambientali. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare i cambiamenti che avvengono nella microflora dei diversi campioni di acque prelevate dal complesso carsico di gessi bolognesi. Oltre alle normali tecniche di campionamento, tipiche della microbiologia tradizionale, le acque sono state anche analizzate tramite PCR-DGGE. Questa tecnica viene ampiamente utilizzata per valutare la composizione e l'evoluzione di microrganismi procarioti nel tempo (ad esempio impatto stagionale e/o annuale) oppure in base al luogo di provenienza (Fry et al., 2006).

**Tabella 1** Punti di campionamento, descrizione dei campioni e sigle di riferimento. Carica microbica totale (RZA) presente nei diversi campioni a seconda del periodo di campionamento

*Table 1* Sampling sites, samples description and name of the samples. Total microbial charge (RZA) in the samples monitored in the different sampling season

| CAMP.   | Sistema carsico               | Punto di indagine   | Carica Microbica Totale (RZA)           |   |  |
|---|-------------------------------|---|---|---|--|
|   |                               |   | Campionamento Maggio 2010<br>Log UFC/ml | Campionamento Dicembre 2011<br>Log UFC/ml | Campionamento Marzo 2011<br>Log UFC/ml |
| Sic IT4030009 Gessi Triassici                             |                               |   |   |   |  |
| A01   | Fonti di Poiano               | Risorgente  | 2.88                                    | 0.95                                      | 2.63                                   |
| A02   | Tanoni                        | Tanone della Gacciolina   | 0.84                                    | 2.88                                      | 2.2                                    |
| A03   |                               | Ca' delle Ghiaie  | 0.85                                    | 2.82                                      | 2.68                                   |
| Sic IT4030017 Cà del Vento, Cà del Lupo, Gessi di Borzano |                               |   |   |   |  |
| B01   | Tana della Mussina di Borzano | Tana della Mussina di Borzano   | 3.28                                    | 3.37                                      | 2.83                                   |
| B02   | Risorgente del Rio Groppo     | Risorgente del Rio Groppo   | 1.22                                    | 2.9                                       | 3.05                                   |
| B03   | Tana del Tasso                | Tana del Tasso (fronte Montericco)  | 0.3                                     | 3.01                                      | 2.68                                   |
| Sic IT4050001 Gessi Bolognesi, Calanchi dell'Abbadessa    |                               |   |   |   |  |
| C01   | Coralupi – Pelagalli          | Grotta Coralupi – Dolina dell'Inferno                                     | 0.00                                    | 0.00                                      | 2.86                                   |
| C02   | Coralupi – Pelagalli          | ex cava Calgesso  | 0.18                                    | 3.08                                      | 2.91                                   |
| C03   | Farneto                       | Inghiottoio Valle cieca Ronzana   | 0.00                                    | 3.08                                      | 2.6                                    |
| C04   | Cioni – Ferro di Cavallo      | Risorgente Cioni – Ferro di Cavallo (lungo la strada)                     | 2.61                                    | 2.51                                      | 2.82                                   |
| C05   | Farneto                       | Risorgente Farneto (botola di cemento)                                    | 0.00                                    | 0.00                                      | 2.73                                   |
| C06   | Novella                       | Grotta Novella (bidone concrezionato a monte del laboratorio di biologia) | 0.00                                    | 2.6                                       | 2.84                                   |



| CAMP.   | Sistema carsico       | Punto di indagine   | Carica Microbica Totale (RZA)           |   |  |
|---|-----------------------|---|---|---|--|
|   |                       |   | Campionamento Maggio 2010<br>Log UFC/ml | Campionamento Dicembre 2011<br>Log UFC/ml | Campionamento Marzo 2011<br>Log UFC/ml |
| C07   | Novella               | Risorgente Valle Idice  |   |   |  |
| C08   | Calindri – Osteriola  | Inghiottitoio Valle cieca Budriolo – Grotta Calindri                      | 2.01                                    | 2.62                                      | 3.21                                   |
| C09   | Calindri – Osteriola  | Risorgente Osteriola (tubo a monte)                                       | 1.99                                    | 2.53                                      | 3.14                                   |
| C10   | Acquafredda – Spipola | Inghiottitoio Valle cieca Acquafredda                                     | 2.58                                    | 2.94                                      | 2.41                                   |
| C11   | Acquafredda – Spipola | Grotta della Spipola (Sala dei Sedimenti)                                 | 2.33                                    | 2.63                                      | 3.03                                   |
| C12   | Acquafredda – Spipola | Grotta della Spipola (arrivo a sinistra dell'inizio del Salone del Fango) | 0.00                                    | 0.00                                      | 3.41                                   |
| C13   | Acquafredda – Spipola | Grotta della Spipola (arrivo a sinistra della Sala dei Canali di Volta)   | 1.39                                    | 3.18                                      | 3.03                                   |
| C14   | Acquafredda – Spipola | Grotta della Spipola (attivo a monte della base del Pozzo Elicoidale)     | 2.84                                    | 2.68                                      | 3.21                                   |
| C15   | Gaibola               | Grotta dietro la Chiesa di Gaibola (risorgente)                           | 3.16                                    | 2.88                                      | 2.76                                   |
| C16   | Castel de'Britti      | Risorgente di Castel de'Britti  |   |   |  |
| C17   | Gaibola               | Grotta dietro la Chiesa di Gaibola (sifone a monte)                       | 2.42                                    | 2.91                                      | 2.92                                   |
| C18   | Gaibola               | Grotta dietro la Chiesa di Gaibola (mezzo)                                | 2.26                                    | 2.77                                      | 3.14                                   |
| Sic IT4050027 Gessi di Monte Rocca, Monte Capra e Tizzano |                       |   |   |   |  |
| D01   | Gortani               | Inghiottitoio   | 0.00                                    | 2.84                                      | 2.41                                   |
| D02   | Gortani               | Risorgente  | 0.00                                    | 2.88                                      | 3.31                                   |
| Sic IT4070011 Vena del Gesso Romagnolo                    |                       |   |   |   |  |
| E01   |                       | Grotta della Befana   |   |   |  |
| E02   | Rio Gambellaro        | Risorgente del Rio Gambellaro   | 2.22                                    | nc  | 2.48                                   |
| E03   | Re Tiberio            | Risorgente  | 2.09                                    | 2.21                                      | 2.72                                   |
| E04   | Re Tiberio            | Torrente in cava  |   |   |  |
| E05   | Ca' Boschetti         | Grotta N.1 di Ca' Boschetti   | 2.41                                    | 2.81                                      | 2.38                                   |
| E06   | Rio Stella-Basino     | Inghiottitoio   | 1.98                                    | 2.24                                      | 2.48                                   |
| E07   | Rio Stella-Basino     | Sifone  | 2.1                                     | 2.43                                      | 3.03                                   |
| E08   | Rio Stella-Basino     | Arrivo Abisso Bentini   | 1.86                                    | 2.45                                      | 2.26                                   |
| E09   | Rio Stella-Basino     | Risorgente  | 2.61                                    | 2.87                                      | 2.38                                   |
| E10   | Sempal                | Grotta della Colombaia  | 2.45                                    | 2.21                                      | 3.3                                    |
| E11   | Sempal                | Risorgente Sempal   | 1.78                                    | 2.21                                      | 2.58                                   |
| E12   | Cassano               | Grotta sotto Cassano Risorgente   | 2.24                                    | 2.24                                      | 3.3                                    |
| E13   | Rio Cavinale          | Risorgente  | 2.92                                    | 2.19                                      | 2.83                                   |
| E14   | Rio Cavinale          | Abisso Fantini  | 0.00                                    | 0.00                                      | 0.00                                   |
| E15   | Rio Cavinale          | Inghiottitoio di Selva  | 0.00                                    | 1.56                                      | 2.57                                   |
| E16   | Tanaccia              | Grotta della Tanaccia Risorgente  | 2.46                                    | 2.57                                      | 2.97                                   |
| E17   | Tana della Volpe      | Inghiottitoio   | 2.6                                     | nc  | 2.34                                   |
| E18 (6bis)  | Rio Stella-Basino     | A monte arrivo Bentini  | 0.00                                    | 0.00                                      | 2.96                                   |
| E19 (6 tris)  | Rio Stella-Basino     | Arrivo Ighetti Rio Stella   | 0.00                                    | nc  | 2.45                                   |
| E20   | Topolino              | Grotta del Topolino   | 1.48                                    | 2.66                                      | 2.71                                   |
| E21   |                       | Risorgente del Caronte  | 1.89                                    | nc  | 2.68                                   |
| Sic IT4090001 Onferno                                     |                       |   |   |   |  |
| F01   | Onferno               | Grotta di Onferno (a monte)   | 3.24                                    | 2.08                                      | 2.62                                   |
| F02   | Onferno               | Grotta di Onferno (arrivo sx)   | 3.32                                    | 2.21                                      | 2.68                                   |
| F03   | Onferno               | Grotta di Onferno (pisoliti)  | 2.67                                    | 2.24                                      | 2.2                                    |
| F04   | Onferno               | Grotta di Onferno (risorgente)  | 2.85                                    | 2.18                                      | 2.61                                   |

**Tabella 2 Carica di coliformi totali (37°C) o fecali (45°C) (VRBA) presente nei diversi campioni a seconda del periodo di campionamento****Table 2 Total (37°C) or faecal (45°C) coliforms charge (VRBA) in the samples monitored in the different sampling season**

| CAMP.   | Coliformi Totali e Fecali |                 |                             |                 |                          |                 |
|---|---------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
|   | Campionamento Maggio 2010 |                 | Campionamento Dicembre 2011 |                 | Campionamento Marzo 2011 |                 |
|   | Log UFC/ml 45°C           | Log UFC/ml 37°C | Log UFC/ml 45°C             | Log UFC/ml 37°C | Log UFC/ml 45°C          | Log UFC/ml 37°C |
| Sic IT4030009 Gessi Triassici                             |                           |                 |                             |                 |                          |                 |
| A01   | 1.2                       | 0               | 0                           | 0               | 1                        | 1               |
| A02   | 0.176                     | 0               | 0                           | 0.48            | 1                        | 1.2             |
| A03   | 1.6                       | 0               | 0                           | 1.16            | 1                        | 1               |
| Sic IT4030017 Cà del Vento, Cà del Lupo, Gessi di Borzano |                           |                 |                             |                 |                          |                 |
| B01   | 2.04                      | 1.67            | 0                           | 1.56            | 0.3                      | 1.06            |
| B02   | 1.98                      | 1.67            | 0                           | 0               | 0.48                     | 1.61            |
| B03   | 1.33                      | 0.74            | 0                           | 0.85            | 1                        | 1.11            |
| Sic IT4050001 Gessi Bolognesi, Calanchi dell'Abbadessa    |                           |                 |                             |                 |                          |                 |
| C01   | 0                         | 0               | 0                           | 0               | 3.21                     | 2.2             |
| C02   | 1.41                      | 1.061           | 0                           | 0               | 2.06                     | 2.08            |
| C03   | 0                         | 0               | 0.7                         | 0.6             | 2.24                     | 1.3             |
| C04   | 2.24                      | 2.18            | 0                           | 0.9             | 3.05                     | 3.32            |
| C05   | 0                         | 0               | 0                           | 0               | 2.48                     | 2               |
| C06   | 0                         | 0               | 0                           | 0.85            | 2.08                     | 1.6             |
| C08   | 0.54                      | 1.26            | 0                           | 0.85            | 3.41                     | 3.58            |
| C09   | 1.83                      | 1.39            | 0                           | 1               | 3.42                     | 3.5             |
| C10   | 2.039                     | 2.38            | 0                           | 0.95            | 3.08                     | 3.57            |
| C11   | 1.38                      | 1.7             | 0                           | 0               | 3.45                     | 3.68            |
| C12   | 0                         | 0               | 0                           | 0               | 2.57                     | 1               |
| C13   | 0                         | 0.95            | 0                           | 0               | 1                        | 1               |
| C14   | 1.6                       | 1.71            | 0                           | 0               | 3.53                     | 3.07            |
| C15   | 0                         | 2.56            | 0                           | 0.85            | 4.04                     | 3.83            |
| C16   |                           |                 |                             |                 |                          |                 |
| C17   | 0.86                      | 1.53            | 0                           | 1.02            | 3.88                     | 4.1             |
| C18   | 1.74                      | 2.32            | 0                           | 0.9             | 3.33                     | 3.5             |
| Sic IT4050027 Gessi di Monte Rocca, Monte Capra e Tizzano |                           |                 |                             |                 |                          |                 |
| D01   | 0                         | 0               | 0                           | 0.95            | 1                        | 1               |
| D02   | 0                         | 0               | 0                           | 1               | 1                        | 1.46            |
| Sic IT4070011 Vena del Gesso Romagnola                    |                           |                 |                             |                 |                          |                 |
| E01   |                           |                 |                             |                 |                          |                 |
| E02   | 1.95                      | 0.4             | 0                           | 0               | 1                        | 1               |
| E03   | 1.68                      | 1.06            | 0                           | 1.28            | 1.15                     | 2.75            |
| E05   | 2                         | 0               | 1.3                         | 1               | 1                        | 0.3             |
| E06   | 1.3                       | 0.3             | 0                           | 0.7             | 1                        | 1               |
| E07   | 1.44                      | 1.53            | 0                           | 0.74            | 1.3                      | 2.11            |
| E08   | 0.4                       | 1.15            | 0                           | 0.81            | 1                        | 1               |
| E09   | 1                         | 0.3             | 0                           | 0.9             | 0.6                      | 0.85            |
| E10   | 1.59                      | 2.09            | 0                           | 0               | 1                        | 0.3             |



| CAMP.                 | Coliformi Totali e Fecali |                 |                             |                 |                          |                 |
|-----------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
|                       | Campionamento Maggio 2010 |                 | Campionamento Dicembre 2011 |                 | Campionamento Marzo 2011 |                 |
|                       | Log UFC/ml 45°C           | Log UFC/ml 37°C | Log UFC/ml 45°C             | Log UFC/ml 37°C | Log UFC/ml 45°C          | Log UFC/ml 37°C |
| E11                   | 1.75                      | 1.15            | 0                           | 0.78            | 1                        | 1               |
| E12                   | 1.77                      | 1.23            | 0                           | 0               | 0.3                      | 1.68            |
| E13                   | 1.46                      | 2.26            | 0                           | 0.98            | 1                        | 0.4             |
| E14                   |                           |                 |                             |                 |                          |                 |
| E15                   | 0                         | 0               | 0.7                         | 1.6             | 1                        | 1               |
| E16                   | 1.43                      | 1.67            | 0.6                         | 0.6             | 1                        | 2               |
| E17                   | 1.77                      | 2.36            | 0.95                        | 0.85            | 0.48                     | 1.32            |
| E18 (6bis)            | 0                         | 0               | 0                           | 0               | 0.75                     | 1.35            |
| E19 (6 tris)          | 0                         | 0               | 0                           | 0.7             | 1                        | 0.48            |
| E20                   | 0                         | 0               | 0                           | 0.7             | 1                        | 1               |
| E21                   | 0                         | 0.78            | 0.3                         | 1.18            | 1                        | 1               |
| Sic IT4090001 Onferno |                           |                 |                             |                 |                          |                 |
| F01                   | 2.2                       | 2.04            | 0.6                         | 1.35            | 1                        | 1.32            |
| F02                   | 1.98                      | 1.9             | 0.95                        | 1.74            | 1                        | 0.93            |
| F03                   | 2.13                      | 1.79            | 0                           | 1.62            | 1                        | 1.16            |
| F04                   | 1.82                      | 1.06            | 1.11                        | 2.05            | 1                        | 1.45            |

## Materiali e metodi

### Modalità di campionamento

La raccolta dei campioni inerenti alla ricerca è stata svolta dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Scienze della Terra e Geologico-Ambientali (Università di Bologna) con l'utilizzo di contenitori sterili. Le acque provenienti dai diversi siti sono state campionate tramite conta diretta su piastra. I campioni arrivati in laboratorio sono stati conservati ad una temperatura di 4°C e al riparo della luce, al fine di riprodurre nel modo più fedele possibile le condizioni presenti nelle grotte di provenienza, fino al momento delle analisi (entro 7 giorni dal ricevimento dei campioni). Per determinare la carica microbica totale si è usato il terreno R2A (Wu et al., 2006; Dewettinck et al., 2001). Le piastre sono state incubate al buio per circa 10 giorni a 20°C. Oltre a determinare la carica microbica totale si è svolto anche un piastramento in terreno selettivo (immersione a doppio strato) per la determinazione dei Coliformi totali (incubazione a 37°C per 48 ore) e fecali (incubazione a 45°C per 48 ore) su terreno VRBA (Oxoid). Dopo i rispettivi tempi di incubazione le colonie presenti sono state contate e quelle morfologicamente diverse tra di loro sono state isolate e purificate.

### Isolamento dei microrganismi

Una volta verificata la crescita e svolta la conta delle colonie presenti sulla piastra si è proceduto con l'isolamento e la purificazione delle colonie morfologicamente diverse tra di loro al fine di poter identificare il maggior numero di microrganismi possibile. Le colonie isolate dal terreno R2A sono state strisciate su piastre fresche di R2A, mentre le colonie isolate da terreno VRBA su terreno TSA (Oxoid). Le piastre di R2A sono state incubate a 20°C fino a crescita e quelle di TSA sono state incubate a 37°C per circa 24-48 ore.

### Estrazione del DNA

In seguito all'isolamento di ogni colonia batterica si è proceduto con l'estrazione del DNA genomico. Il DNA dei batteri isolati è stato estratto tramite il kit InstaGene Matrix (Bio-Rad).

### Estrazione del DNA totale da piastre R2A:

#### Metodo Bulk

Tutte le colonie presenti su ogni piastra contabile di R2A sono state portate in sospensione con l'utilizzo di circa 2 ml di acqua sterile. Successivamente il DNA totale è stato isolato tramite il kit InstaGene Matrix (Bio-Rad).

### Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD PCR)

Per svolgere una prima differenziazione genotipica i ceppi sono stati analizzati mediante RAPD-PCR con l'utilizzo del primer universale M13. L'amplificazione è stata svolta su 1-10 ng di DNA isolato, utilizzando il termociclatore T3000 (Biometra). I prodotti di PCR sono separati su gel di agarosio (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) al 1.5% (w/v) contenente etidio bromuro 0.5 mg/ml. I profili RAPD-PCR sono stati acquisiti utilizzando Gel Doc EQ System (Bio-Rad, Germany). Le distanze genotipiche sono state calcolate attraverso l'analisi dell'immagine utilizzando il programma Fingerprinting II Informatix™ Software (Bio-Rad) che ha permesso di costruire dei cluster di similarità (coefficiente di similarità Pearson e dendrogramma tipo UPGMA). I diversi fingerprinting RAPD sono stati sottoposti ad identificazione tramite sequenziamento della regione 16S rRNA.

### Identificazione dei batteri isolati tramite sequenziamento della regione 16S rRNA

La regione 16S del rRNA è stata amplificata con i primers EUB\_F: GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  
EUB\_R: GCCCGGGAACGTATTCACCG  
usando le condizioni di PCR proposte da Wu et al. (2006). I prodotti di PCR, così ottenuti, sono stati purificati tramite QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) e sequenziati presso il laboratorio BMR Genomics (Padova). Le sequenze sono state allineate alle sequenze note presenti nei database della GenBank utilizzando il programma per l'identificazione batterica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### PCR-DGGE Condizioni PCR 16S EUB-GC

L'ecologia delle acque è stata caratterizzata tramite PCR-DGGE. Questa metodica (elettroforesi verticale su gel di poliacrilamide) è particolarmente adatta per lo studio di campioni ambientali con elevata diversità. Infatti, è in grado di fornire una immagine istantanea della popolazione microbica della matrice nel momento del campionamento. Dai campioni di acque è stato quindi estratto il DNA totale (DNA di tutte le popolazioni microbiche presenti – eucarioti e procarioti) tramite metodica Bulk e kit InstaGene Matrix (Bio-Rad). Il DNA è stato poi amplificato con primers universali per i batteri (Eub – sequenza 16S rRNA). L'analisi dei gel DGGE combinata con l'utilizzo del programma Fingerprinting II (Bio-Rad) ha permesso di caratterizzare i campioni in relazione ai pattern genetici le cui differenze hanno portato alla formazione di cluster con correlazione di Pearson. I prodotti di PCR, ottenuti tramite amplificazione della regione 16S rRNA, sono stati analizzati utilizzando un apparecchio Dcode (Bio-Rad). I campioni (40µl) sono stati caricati su un gel di poliacrilamide al 8% (w/v) (acrilamide / bisacrilamide, 37.5:1) in 1 ml tampone TAE (2 M Tris base, 1M acido acetico glaciale, 50 mM EDTA, pH 8). Nel

caso dei batteri la separazione ottimale dei frammenti di PCR è stata ottenuta con gradiente denaturante di 40-60% di urea-formamide (100% soluzione denaturante contiene 40%(w/v) formamide e urea 7,0 M) (Tabella 3). I Gel hanno corso per 6 h a 60 ° C, con un voltaggio costante di 130 V. Le immagini dei gel DGGE sono state analizzate tramite il programma Fingerprinting II Informatix™ Software (Bio-Rad) che ha permesso di creare cluster di comparazione dei pattern ecologici dei diversi campioni analizzati.

**Tabella 3 Formulazione di gel per DGGE**

**Table 3 DGGE gel formulation**

| 40%   | 60%  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 ml acrilamide</li> <li>• 4 ml formamide</li> <li>• 4.24 g urea</li> <li>• 500 µl TAE 50X</li> <li>• Portare a volume 25 ml H2O.</li> <li>• 55 µl temed *</li> <li>• 75 µl APS 10% *</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 ml acrilamide</li> <li>• 6 ml formamide</li> <li>• 6.35 g urea</li> <li>• 500 µl TAE 50X</li> <li>• Portare a volume 25 ml H2O</li> <li>• 55 µl temed *</li> <li>• 75 µl APS 10% *</li> </ul> |

\*Gli agenti polimerizzanti vanno aggiunti poco prima di versare il gel

## Risultati

### Isolamento e identificazione

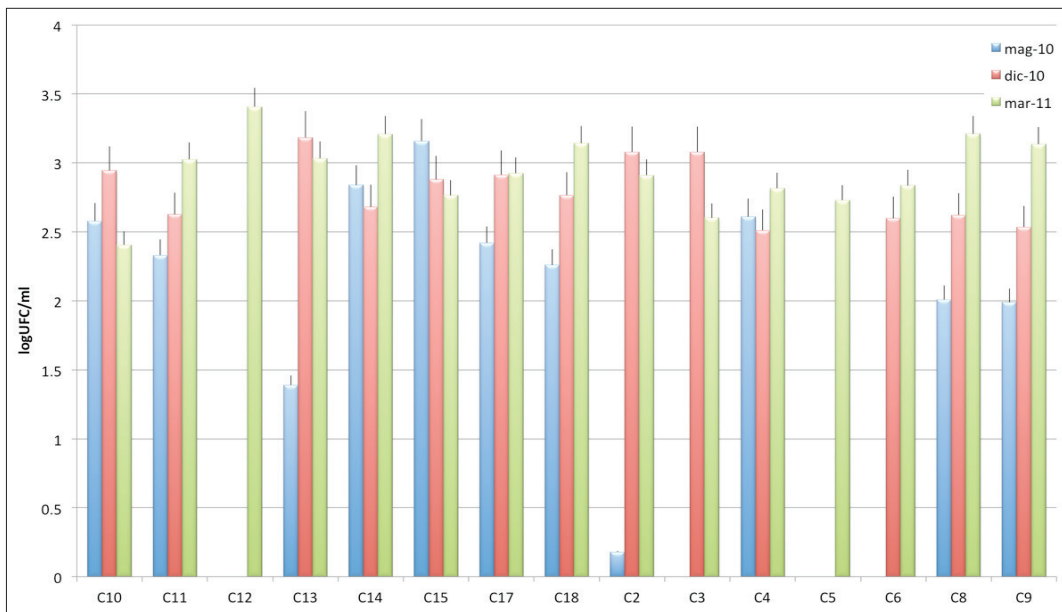
Dai diversi campionamenti svolti sulle acque dei differenti complessi carsici gessosi sono stati isolati e identificati numerosi microrganismi. Questi appartengono a diverse specie microbiche come batteri, coliformi totali e fecali, lieviti e muffe. In particolare sono stati isolati circa 500 batteri appartenenti a specie diverse che sono stati poi caratterizzati a livello genotipico tramite RAPD PCR. Gli stessi batteri sono in via d'identificazione tramite sequenziamento della regione 16S rRNA.

I valori di contaminazione oscillano da un massimo di 3.32 ad un minimo inferiore al limite di determinazione (1log UFC/ml) in R2A e da un massimo di 2.26 fino a valori al di sotto del limite di determinazione (1 log UFC/ml) in VRBA.

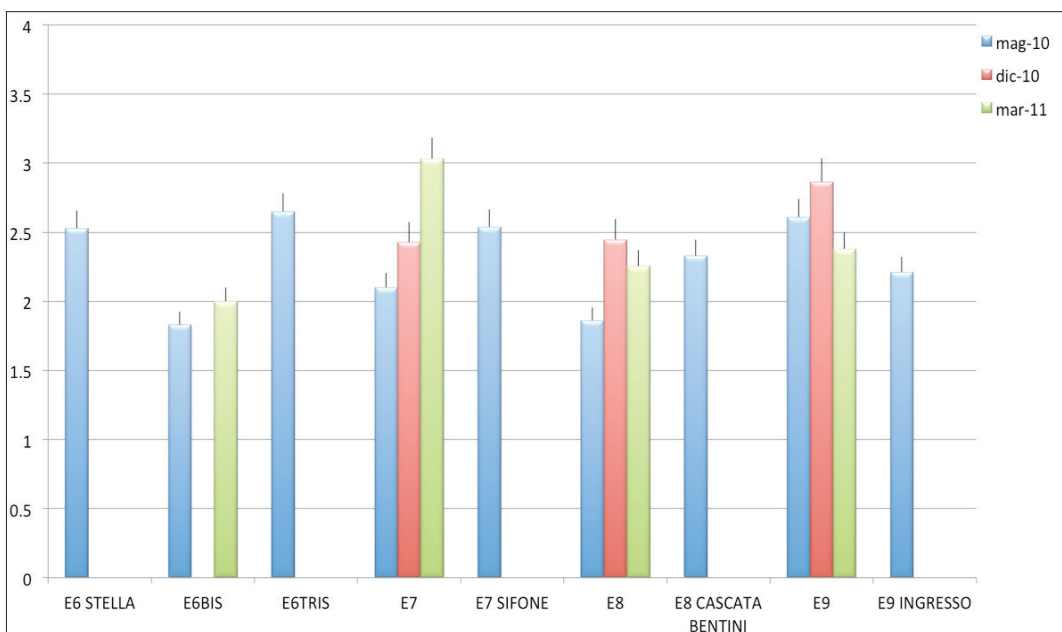
In Tabella 1 e 2 sono riportate le cariche microbiche dei diversi campioni nei diversi periodi di campionamento. Dal campionamento svolto in R2A (Tabella 1), per la valutazione della carica microbica totale, si evidenzia come non ci siano grosse differenze tra le varie stagioni di campionamento e soprattutto come le concentrazioni rilevate non siano così diverse. I campioni che hanno mostrato maggiori variazioni nel tempo sono stati descritti nelle Figure 1 e 2. In Figura 1 sono riportati i valori di log UFC/ml nei cam-

pioni del gruppo C. Si nota come le maggiori differenze riguardino i campioni C12 e C5 nel periodo di marzo 2011. Infatti, questi campioni hanno mostrato precedentemente la completa assenza di una carica microbica totale aerobia, in particolare, lieviti, muffe e batteri aerobi. Questi campioni corrispondono rispettivamente ad un punto di prelievo della grotta della Spipola (C12) e alla risorgente della grotta del Farneto (C5). In Figura 2 sono descritti i campioni del gruppo E. Come si evince, anche in questo caso ci sono grandi differenze nella concentrazione dei microrganismi

tra le diverse stagioni di campionamento. Tutti i campioni sono “omogenei” nel monitoraggio di maggio 2010 toccando concentrazioni medie di circa 2.5 log UFC/ml di acqua campionata. Diverso è il discorso per i campionamenti di dicembre 2010 e marzo 2011. Infatti, i campioni E7, E8 ed E9 si mostrano costanti, mentre negli altri campioni la carica microbica decresce drasticamente raggiungendo valori prossimi a 0 logUFC/ml. Dalla Tabella 4 si vede come l’evoluzione dei coliformi totali sia influenzata decisamente dalla stagione di campionamento.



**Fig. 1** Evoluzione della carica microbica totale, in termini di log UFC/ml di acqua, nei campioni del gruppo C  
**Fig. 1** Microbial charge evolution, log CFU/ml of water, in the group C samples



**Fig. 2** Evoluzione della carica microbica totale, in termini di log UFC/ml di acqua, nei campioni del gruppo E  
**Fig. 2** Microbial charge evolution, log CFU/ml of water, in the group E samples

Le colonie morfologicamente diverse, presenti sulle piastrine, sono state isolate su terreno R2A e TSA per lo studio della loro morfologia in purezza e per l'estrazione del DNA mediante RAPD-PCR e PCR 16S. In media sono state isolate da 3 a 6 colonie da ogni punto di prelievo per ottenere sufficienti informazioni riguardo la popolazione microbica di ogni sito. Le colonie sviluppate a 22°C su terreno R2A hanno presentato una notevole diversità e alcune sono caratterizzate da una notevole produzione di esopolissaccaridi (EPS) che, in alcuni casi, a contatto con la luce, hanno cambiato colore da un bianco crema ad un rosa inteso, giallo o viola (Figura 3).

### Valutazione della diversità microbica (RAPD-PCR)

Il DNA estratto dai ceppi puri è stato sottoposto ad una prima amplificazione con RAPD-PCR tramite il primer universale M13. Il DNA amplificato ha consentito, mediante analisi dell'immagine del gel (Fingerprinting II Bio-Rad), di suddividere i microrganismi in cluster permettendo così una loro prima identificazione. I ceppi rappresentativi dei diversi cluster sono stati scelti per le successive operazioni di identificazione (sequenziamento). È opportuno sottolineare che nel primo campionamento sono stati isolati molti più microrganismi che nei campionamenti successivi.

La correlazione di Pearson esposta nella Figura 4 consente di avere un'immagine molto chiara dell'elevata diversità microbica presente nei campioni analizzati (in questo caso riferiti ai campionamenti di marzo e di ottobre 2010). Da questo dendrogramma si riescono ad identificare alcuni dei microrganismi presenti correlandoli a quelli

noti grazie al loro sequenziamento. Il cluster riportato in Figura 4 presenta 5 suddivisioni principali all'interno delle quali si riscontra una grande diversità. I cluster 1 e 2 raggruppano principalmente ceppi isolati dal complesso Stella Basino; questi clusterizzano in maniera omogenea tra di loro con una similarità in alcuni casi maggiore del 60%. Analizzando i cluster 1 e 2 si identificano due blocchi principali con ceppi isolati dal complesso Stella Basino; alcuni di questi appartengono alle specie *Erwinia*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Chrysesobacterium*, *Duganella* ed *Enterobacter*. I cluster 3, 4 e 5 presentano una variabilità più elevata sia in termini di luoghi di campionamento che di specie identificate.

### Identificazione dei microrganismi isolati (Sequenziamento)

In seguito ad una prima identificazione mediante RAPD-PCR si è proceduto al sequenziamento del materiale genetico di quegli individui che sono risultati rappresentativi dei diversi cluster. L'analisi è stata fatta tramite sequenziamento della sequenza corrispondente al 16S rRNA (allineamento con sequenze batteriche note presenti nei database: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Questa operazione ha consentito l'identificazione (similarità 99%) di alcuni dei microrganismi presenti e isolati. In Tabella 4 sono riportate le principali specie identificate e i rispettivi siti di prelievo. In alcuni casi è stato possibile identificare i microrganismi con una percentuale di similarità del 100%, mentre in altri casi questa percentuale è scesa al 61% (*Variovorax paradoxus*). Questo fa pensare alla presenza di microrganismi appartenenti allo stesso genere ma a specie diverse potenzialmente non ancora presenti nei database.

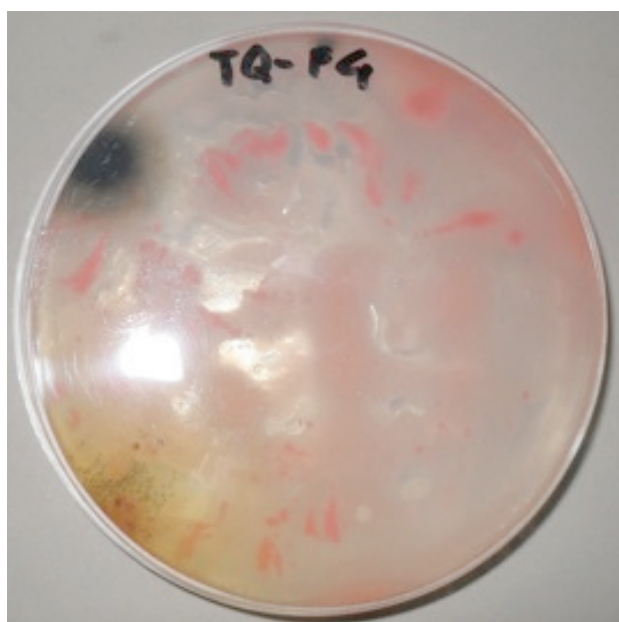
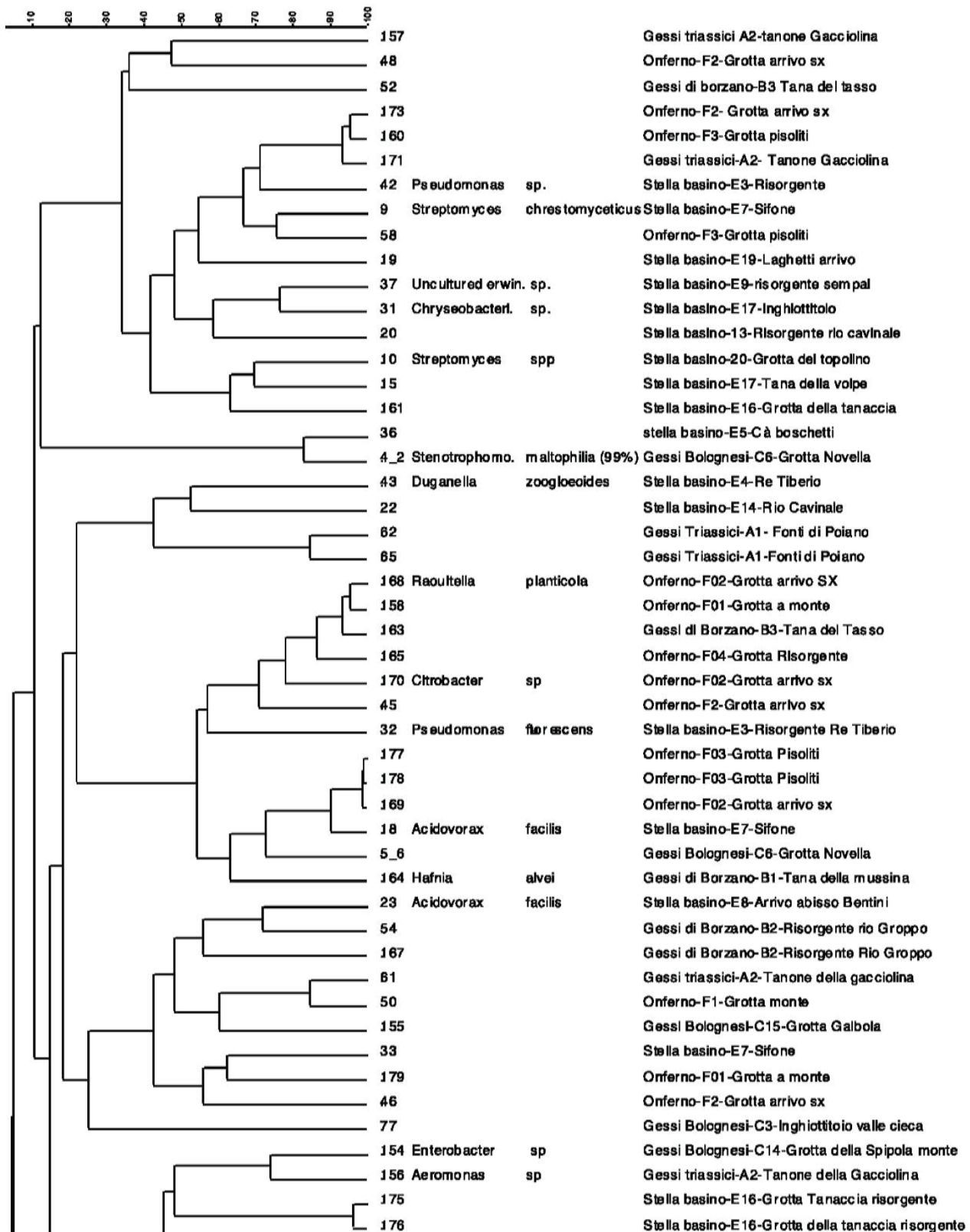


Fig. 3 Piastra di R2A campionata con acque (Onferno) tal quali (marzo 2010)

Fig. 3 R2A medium inoculated with water from Onferno cave (March 2010)





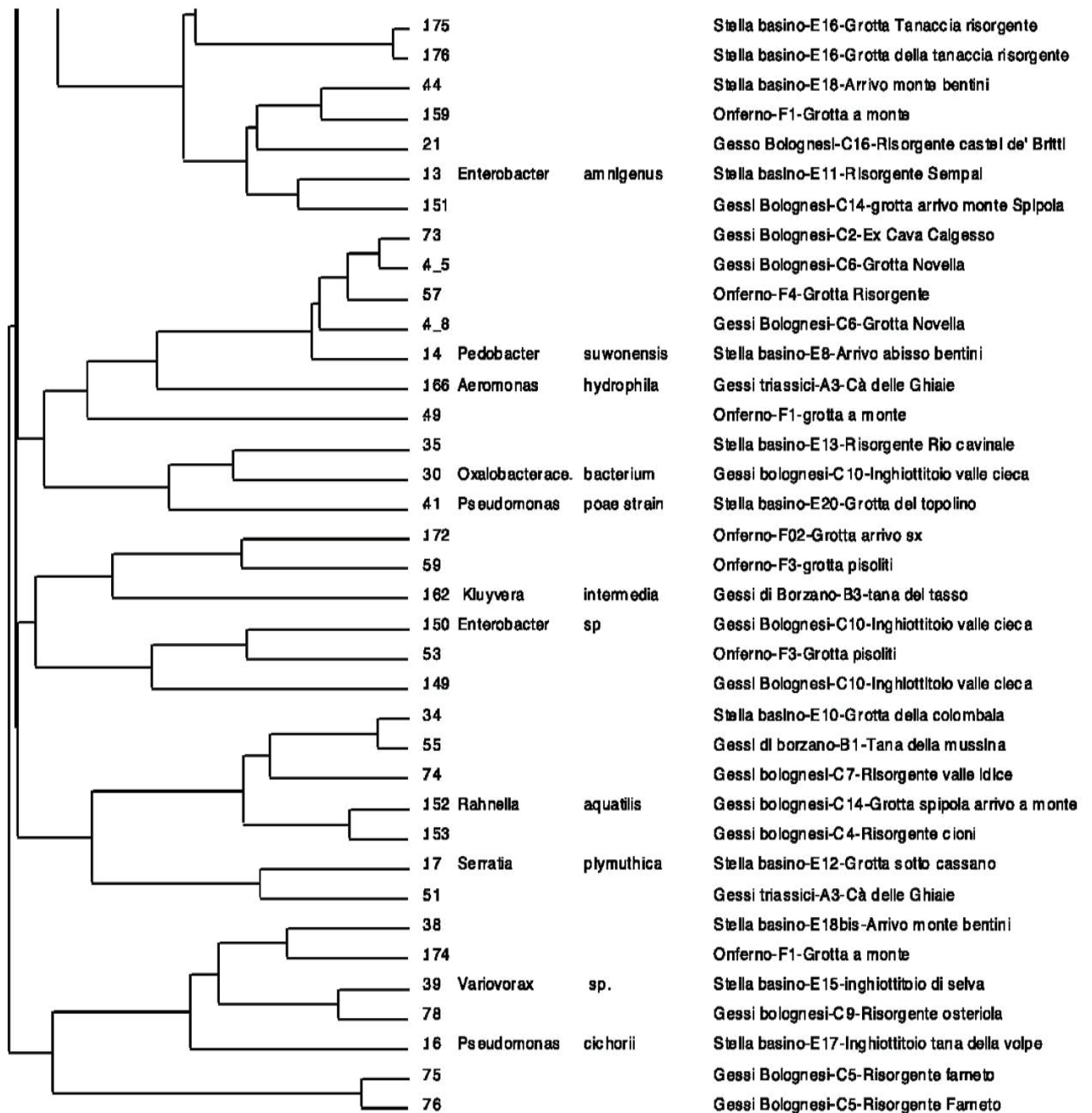


Fig. 4 Cluster ottenuto dall'analisi della correlazione di Pearson dei diversi fingerprinting batterici risultanti dalla RAPD-PCR  
 Fig. 4 Cluster obtained by Pearson correlation analysis of the different bacteria RAPD-PCR fingerprinting



**Tabella 4 Alcuni dei microrganismi isolati e identificati tramite sequenziamento della regione 16S rRNA. Dati relativi ai campionamenti 2010**

**Table 4 microorganisms isolated and identified by 16S rRNA sequencing. Data referred to 2010 sampling**

| Campione   | Luogo Prelievo    | Identificazione   | Percentuale    |
|------------|-------------------|---|----------------|
|            |                   |   | Riconoscimento |
| VALLE 4-11 | Rio Stella/Basino | Agrobacterium tumefaciens   | 98%            |
| 1-1B-8     | Rio Stella/Basino | Uncultured Stenotrophomonas sp. clone GI3-M-7-D08 16S ribosomal; Xanthomonas group bacterium LA37 16S ribosomal RNA gene, partila | 99%            |
| 1-2A-5     | Rio Stella/Basino | Agrobacterium tumefaciens *   | 99%            |
| 04/02      | Rio Stella/Basino | Stenotrophomonas maltophilia  | 99%            |
| 04/03      | Rio Stella/Basino | Rahnella aquatilis  | 99%            |
| 10         | Rio Stella/Basino | Streptomyces spp. / S. chrestomyceticus strain 13663Q 16S –   | 99%            |
| 13         | Rio Stella/Basino | Enterobacter amnigenus strain KNUC183 16S   | 100%           |
| 14         | Rio Stella/Basino | Pedobacter suwonensis strain 15-52 16S/ P. terrae strain DS-57 16S  | 99%            |
| 16         | Rio Stella/Basino | Pseudomonas cichorii *  | 99%            |
| 17         | Rio Stella/Basino | Serratia plymuthica/ Serratia spp.  | 100%           |
| 18         | Rio Stella/Basino | Acidovorax facilis partial 16S rRNA gene 100%   | 100%           |
| 23         | Rio Stella/Basino | Acidovorax facilis strain 228 16S/ Drinking water bacterium M2 16S ribosomal RNA  | 99%            |
| 30         | Rio Stella/Basino | Oxalobacteraceae bacterium NBGD42 16S/ Duganella sp/ Burkholderia sp. III-116a-32 16S   | 96%            |
| 31         | Rio Stella/Basino | Chryseobacterium sp. CH23 16S ribosomal RNA gene  | 99%            |
| 32         | Rio Stella/Basino | Pseudomonas fluorescens strain PFDW-D(NBAII) 16S *  |                |

| Campione | Luogo Prelievo    | Identificazione   | Percentuale    |
|----------|-------------------|---|----------------|
|          |                   |   | Riconoscimento |
| 37       | Rio Stella/Basino | Uncultured Erwinia sp./ Pantoea sp. ATCC 27992 16S ribosomal RNA gene (insect gut) 71%/ Pantoea agglomerans strain TAC 94.I.1 16S             | 71%            |
| 39       | Rio Stella/Basino | Variovorax paradoxus strain BS160 16S ribosomal RNA gene, partila sequence  | 61%            |
| 41       | Rio Stella/Basino | Pseudomonas poae strain YUST-DW11 16S ribosomal RNA (Heavy Metals Concentration and Evaluation of Microbiological Security in Drinking Water) | 95%            |
| 42       | Rio Stella/Basino | Pseudomonas sp. R-41393 partial 16S rRNA  | 100%           |
| 43       | Rio Stella/Basino | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone LIIIa_20-E12-T7/ Duganella zoogloeoides gene for 16S rRNA, partial sequence, strain         | 97%            |
| 44       | Rio Stella/Basino | n.i.  |                |
| 9        | Rio Stella/Basino | Streptomyces chrestomyceticus strain 13663Q 16S ribosomal RNA gene  | 100%           |
| 170      | Onferno           | Citrobacter. sp. *  | 100%           |
| 168      | Onferno           | Citrobacter sp / Klebsiella oxytoca   | 100%           |
| 166      | Gessi Triassici   | Aeromonas hydrophila  | 99%            |
| 164      | Gessi di Borzano  | Hafnia alvei  | 99%            |
| 162      | Gessi di Borzano  | Klebsiella sp   | 96%            |
| 156      | Gessi Triassici   | Aeromonas sp  | 99%            |
| 154      | Gessi Bolognesi   | Enterobacter sp   |                |
| 152      | Gessi Bolognesi   | Rahnella sp   | 100%           |
| 150      | Gessi Bolognesi   | Enterobacter sp   | 99%            |

### Valutazione dell'impatto ambientale (PCR-DGGE)

La DGGE è uno strumento di biologia molecolare che consente lo studio delle popolazioni microbiche presenti in campioni di DNA totale e la loro dinamica nel tempo in diverse condizioni ambientali. Per DNA totale si intende il DNA di lieviti, batteri o muffe. Il DNA viene selettivamente amplificato, tra questi gruppi microbici utilizzando *primers* specifici. In questo lavoro sono stati utilizzati *primers* relativi a specie batteriche. Questa metodica è particolarmente adatta allo studio di campioni ambientali con ele-

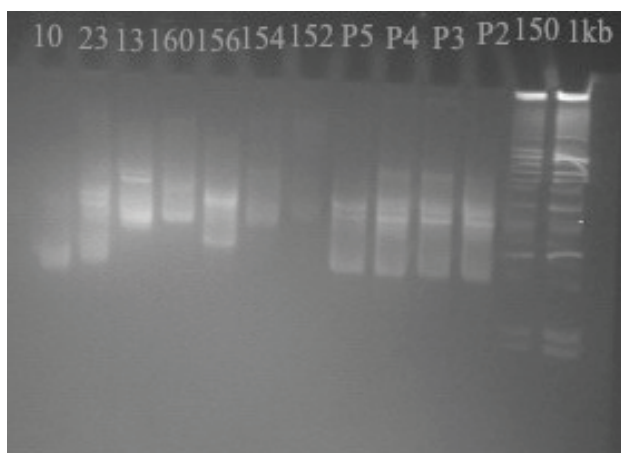
vata diversità dato che fornisce una prima immagine dello stato microbico della matrice. Nelle Figure 5 e 6 si vedono i profili ottenuti dalle corse di DNA totale su gel con gradiente chimico DGGE. Anche in questo caso, l'analisi dell'immagine consente di osservare la diversità presente nelle popolazioni microbiche dei campioni analizzati.

Con questa analisi sono stati identificati due *cluster* principali (Figura 7) all'interno dei quali se ne formano altri con crescenti gradi di correlazione. In generale un *cluster* rappresenta il raggruppamento di almeno un campione proveniente da ogni sito di prelievo inerente al progetto;

**Tabella 5** legenda Figura 5

**Table 5** legend Figure 5

| Codice | Origine   | Identificazione            |
|--------|---|----------------------------|
| 10     | E20-Grotta del Topolino-Stella basino           | <i>S. chrestomyceticus</i> |
| 23     | E8-Arrivo Arrivo abisso bentini-Stella basino   | DNA TOTALE                 |
| 13     | E11-Risorgente sempal-Stella basino             | DNA TOTALE                 |
| 160    | F3-Ramo pisoliti-Onferno                        | DNA TOTALE                 |
| 156    | A2-Tanone dell gacciolina-Gessi triassici       | DNA TOTALE                 |
| 154    | C14-Grotta spipola arrivo monte-Gessi bolognesi | DNA TOTALE                 |
| P5     | B1-Tana della mussina-Gessi di Borzano          | DNA TOTALE                 |
| P4     | B2-Risorgente Rio groppo-Gessi di Borzano       | DNA TOTALE                 |
| P3     | F4-Grotta risorgente-Onferno                    | DNA TOTALE                 |
| P2     | F1-Grotta a monte-Onferno                       | DNA TOTALE                 |
| 1KB    | Marker  | Marker                     |
| 1KB    | Marker  | Marker                     |

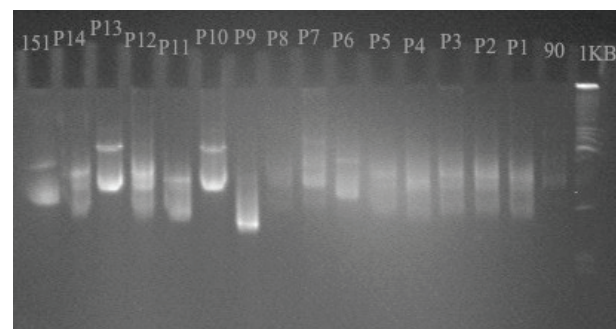


**Fig. 5** profilo DGGE dei campioni riportati in Tabella 5  
**Fig. 5** DGGE profile of the samples reported in Table 5

**Tabella 6:** Legenda Figura 6

**Table 6:** Legend Figure 6

| Codice | Origine   | Identificazione                   |
|--------|---|-----------------------------------|
| 151    | C14-Grotta della spipola arrivo monte-Gessi Bolognesi | <i>Enterobacter amnigenus</i> 60% |
| P14    | C14-Grotta arrivo monte spipola-Gessi Bolognesi       | DNA TOTALE                        |
| P13    | E9-Risorgente stella basino                           | DNA TOTALE                        |
| P12    | C8-Inghiottoio valle cieca budriolo-Gessi Bolognesi   | DNA TOTALE                        |
| P11    | E7-Sifone-Stella Basino                               | DNA TOTALE                        |
| P10    | E2-Risorgente rio Gambellaro-Stella basino            | DNA TOTALE                        |
| P9     | E20-Grotta del topolino-Stella basino                 | DNA TOTALE                        |
| P8     | E10-Grotta della colombaia sempal-Stella basino       | DNA TOTALE                        |
| P7     | E17-Inghiottoio tana della volpe-Stella basino        | DNA TOTALE                        |
| P6     | C10-Inghiottoio valle cieca-Gessi Bolognesi           | DNA TOTALE                        |
| P5     | B1-Tana della mussina-Gessi di Borzano                | DNA TOTALE                        |
| P4     | B2-Risorgente del rio groppo-Gessi di Borzano         | DNA TOTALE                        |
| P3     | F4-Grotta risorgente-Onferno                          | DNA TOTALE                        |
| P2     | F1-Grotta a monte-Onferno                             | DNA TOTALE                        |
| P1     | A1-Risorgente fonti di poiano-Gessi triassici         | DNA TOTALE                        |
| 90     | C10-Inghiottoio valle cieca spipola-Gessi Bolognesi   | DNA TOTALE                        |
| 1KB    | Marker  | Marker                            |



**Fig. 6** Profilo DGGE dei campioni riportati in Tabella 6  
**Fig. 6** DGGE profile of the samples reported in Table 6

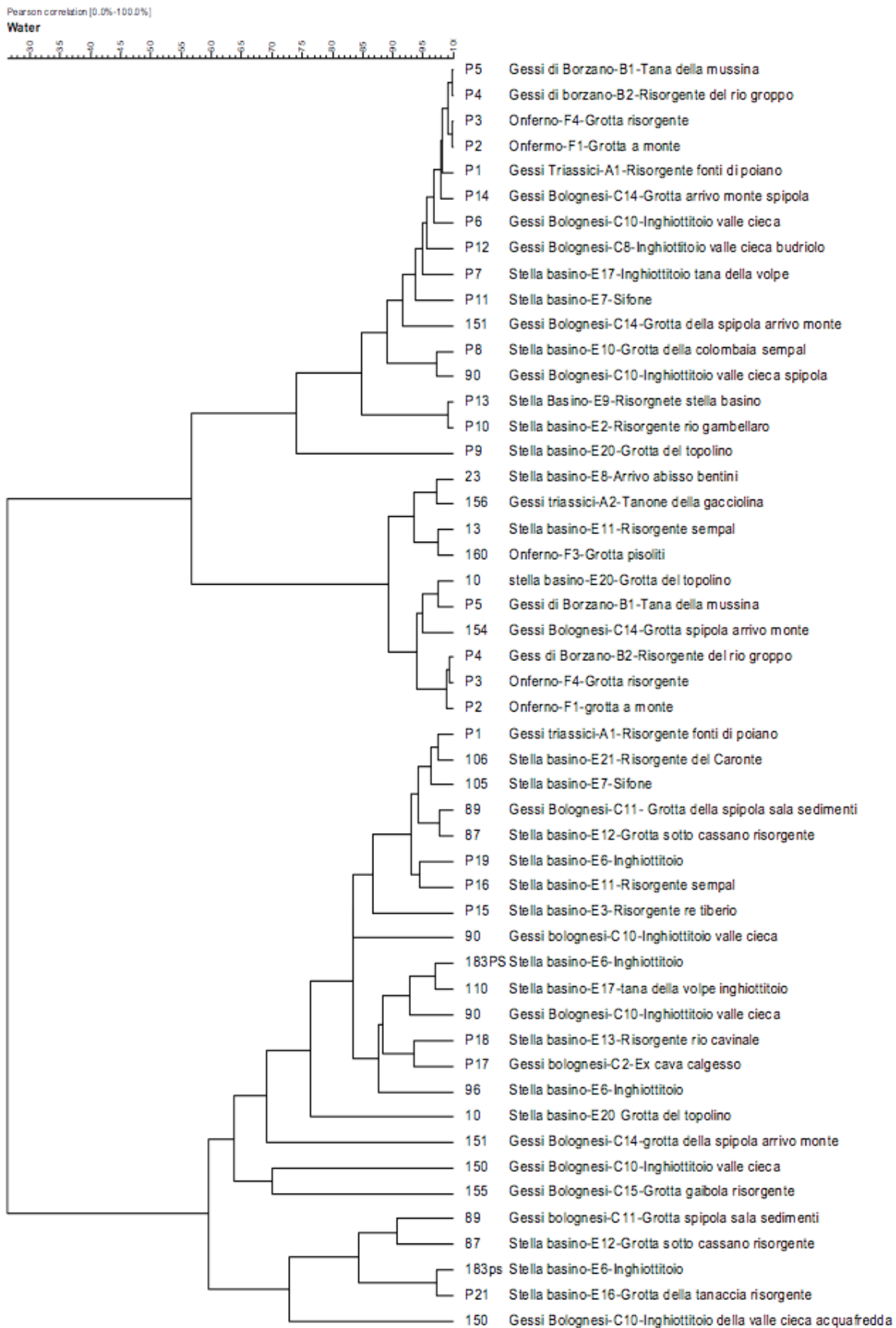


Fig. 7 Cluster ottenuto dall'analisi dell'immagine di gel DGGE. Campionamenti 2010

Fig. 7 Cluster of DGGE gel image analysis. 2010 sampling

all'interno di questo *cluster* principale si separano ulteriormente gruppi corrispondenti a siti di prelievo vicini geograficamente e dotati di una buona correlazione. Inoltre, si osservano diversità genetiche su campioni prelevati nella stessa località ma in diversi siti, del complesso stesso, indicando diversità microbica che può derivare anche dalla variazione geografica di pochi chilometri.

Come sopra descritto, in Figura 7 possiamo osservare la formazione di due cluster principali all'interno dei quali si formano altri cluster con crescenti gradi di correlazione. Il primo cluster (superiore) presenta il raggruppamento di almeno un campione proveniente da ogni sito di prelievo inerente al progetto; all'interno di questo cluster principale si separano ulteriormente gruppi inerenti a siti di prelievo geograficamente vicini con una buona correlazione. Inoltre, si osservano diversità genetiche su campioni prelevati nella stessa località ma in diversi siti del complesso, indicando la presenza di diversità microbica. La diversità microbica può derivare anche dalla variazione geografica di pochi chilometri. In particolare, si può vedere come i campioni P2 e P3, inerenti a prelievi ad Onferno, nel primo caso all'ingresso della grotta e nel secondo alla risorgente, presentano una similarità del 99%. Dall'altro canto la popolazione microbica dell'interno della grotta, nel campione 160 di Ramo Pisoliti, ha una buona similarità (89%) con gli altri due siti di prelievo. Ciò sottolinea una variazione della popolazione microbica in quella nicchia ecologica. Si può osservare come gli inghiottitoi presenti nel complesso dei gessi Bolognesi (P14, P6, P12) presentano una similitudine tra di loro del 95%, mentre la grotta Spipola, dello stesso complesso, presenta una similitudine agli ultimi dell'85%, riproponendo l'effetto selettivo che svolge l'ambiente sulle popolazioni microbiche.

Il secondo cluster principale (inferiore) presenta una minore diversità, escludendo i campioni provenienti da Onferno e dai Gessi di Borzano. In questo raggruppamento si verifica nuovamente la diversità tra inghiottitoio, grotte e risorgenti. Nel caso dei Gessi Bolognesi si osserva una correlazione tra l'inghiottitoio della valle cieca e la Grotta Spipola sala sedimenti del 70% il che propone un cambiamento nella popolazione microbica tra l'ingresso alla grotta e l'interno della stessa.

## Discussione

Alcuni dei microrganismi presenti in Tabella 5 sono inquinanti comuni delle acque quali *Enterobacter* e *Aeromonas hydrophila*. Questi possono essere indici d'inquinamento fecale derivanti da attività umane come per esempio gli allevamenti. *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Raoultella* sono associati al tratto intestinale dei mammiferi e

come tali sono stati riscontrati nelle acque e nel terreno. Inoltre, in alcuni casi, sono stati identificati nelle acque di scarto della lavorazione del legno. Altri microrganismi come *Pseudomonas spp.* sono inquinanti meno frequenti delle acque, ma possono rappresentare imponenti fonti di rischio per la popolazione nel caso di contaminazione delle acque potabili.

Sia nel caso del Ramo Pisoliti che in quella Spipola sono stati isolati ed identificati microrganismi con capacità di produzione di EPS, quali *Pseudomonas* ed *Enterobacter* rispettivamente, come riportato da Bala Subramanian et al. (2010). Questo ci può portare ad ipotizzare che gli EPS prodotti dalle specie sopra riportate siano inerenti allo sviluppo delle stesse, in questi ambienti, grazie alla formazione di biofilm aderenti alle strutture presenti nelle grotte. Inoltre, specie microbiche quali *Serratia plymuthica* e *Pseudomonas poae*, considerate da Bala Subramanian et al. (2010) come produttrici di EPS, sono state isolate nelle grotte E12 grotta sotto Cassano (Stella Basino) ed E20 grotta del Topolino (Stella Basino) suggerendo l'ipotesi di pressione selettiva determinata dall'ambiente, sopra esposta.

## Conclusioni

La sperimentazione, seppur preliminare, ha evidenziato che gli ambienti segregati presi in considerazione, e particolarmente le acque che fluiscono lungo i diversi ecosistemi, hanno mantenuto, nonostante il modificarsi progressivo degli ambienti esterni superficiali, una specifica identità per quanto riguarda la popolazione batterica. La presenza di specie inusuali, solo raramente riscontrate nelle acque superficiali o nei suoli, fa ritenere che tali ecosistemi continuino ad essere nicchie caratterizzate da condizioni nutrizionalmente povere e da valori ambientali sfavorevoli come le basse temperature. Tale risultato, che sarà confermato nel corso del progetto Europeo Life +08NAT/IT/000369 "Gypsum", suggerisce che il livello di antropizzazione degli ecosistemi presi in considerazione non abbia raggiunto livelli sensibili.

Lo studio svolto ha inoltre confermato le potenzialità applicative di microrganismi isolati da ambienti estremi, come per esempio una situazione di oligotrofia. In tali sistemi, infatti, i microrganismi sono in grado di colonizzare superfici inorganiche quali rocce gessose e sviluppare su di esse grazie alla loro capacità di produrre esopolisaccaridi (EPS). Tra i microrganismi isolati oltre l'80% produce EPS, suggerendo che tale caratteristica sia un prerequisito per il loro sviluppo in questi ambienti. Lo sfruttamento di questo carattere può offrire importanti opportunità anche perché i ceppi produttori appartengono a specie rare,



poco studiate sia in termini di fisiologia che in termini di potenziale applicazione tecnologica. I settori di impiego degli EPS sono numerosi e vanno dall'uso come flocculanti nella purificazione delle acque all'uso come fibre nell'industria alimentare. Soprattutto le fibre ad attività prebiotiche sono di grande interesse ed elevato costo. Tale carattere, ecologicamente fondamentale, può diventare una opportunità inusuale per le industrie biotecnologiche e alimentari.

## BIBLIOGRAFIA

### Ringraziamenti

*Ringraziamo Jo De Waele, docente di Geografia e Cartografia nel Corso di Scienze Naturali presso l'Università di Bologna Alma Mater, per l'aiuto e il supporto nella stesura di questo lavoro e il gruppo di ricerca del Dipartimento di Scienze della Terra e Geologico-Ambientali Università di Bologna Alma Mater per la raccolta dei campioni. Si ringrazia inoltre l'Unione Europea, Progetto LIFE, per i finanziamenti conferiti a questa ricerca.*

BALA SUBRAMANINAN, S., YAN, S., TYAGI, R.D., SURAMPALLI, R.Y., 2010 – *Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: Isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering*, Water research, 44: 2253-2266.

DEWETTINCK, T., HULSBOSCH, W., VAN HEGE, K., TOP, E.M., VERSTRAETE, W., 2001 – *Molecular fingerprinting of bacterial populations in groundwater and bottled mineral water*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 57: 412-418.

FRY, J. C., WEBSTER, G., CRAGG, BARRY A., WEIGHTMAN, ANDREW J., PARKES, R. JOHN, 2006 – *Analysis of DGGE profiles to explore the relationship between prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin*, FEMS Microbiol. Ecol., 58: 86-98.

WU, Q., ZHAO, X.H., ZHAO, S., 2006 – *Application of PCR-DGGE in research of bacterial diversity in drinking water*, Biomedical and Environmental Sciences, 19: 371-374.