

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

FACOLTA' DI SCIENZE, MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA

IN

SCIENZE BIOLOGICHE

(INDIRIZZO BIOLOGIA AMBIENTALE)

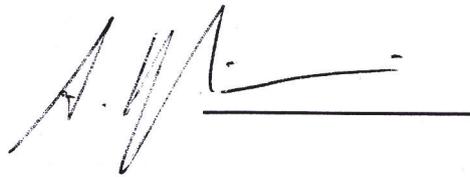
**Studio del Microbioma delle spiagge marine
mediante tecniche molecolari**

*Study of the Microbiome of marine beaches by
using molecular techniques*

di

Ettore Pagoto

RELATORE: Prof. Alberto Ugolini

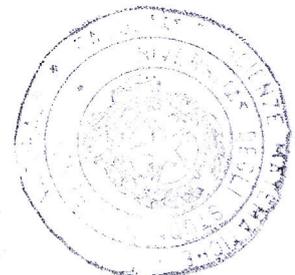


CORRELATORE: Dott. Alessio Mengoni



Anno Accademico 2011-2012

30 NOV 2012



INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	3
<i>MATERIALI E METODI</i>	10
<i>Campionamento</i>	10
<i>Metodologia di Campionamento</i>	12
<i>Analisi Elementare (Carbonio organico e totale)</i>	13
<i>Analisi granulometrica</i>	14
<i>Determinazione peso specifico</i>	15
<i>Analisi Umidità</i>	16
<i>Analisi IPA</i>	17
<i>Analisi metalli pesanti</i>	21
<i>Terreni di coltura</i>	22
<i>Determinazione del Titolo Batterico</i>	23
<i>Estrazione del DNA dal campione</i>	24
<i>Reazione a catena della polimerasi (PCR)</i>	24
<i>Elettroforesi su gel di agarosio</i>	25
<i>T-RFLP “Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism “</i>	26
<i>Digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione</i>	29
<i>Sequenziamento del DNA mediante tecnica Illumina SOLEXA</i>	29
<i>RISULTATI</i>	33
<i>Conteggio microbico</i>	33
<i>Contenuto d’acqua nel substrato</i>	35
<i>Carbonio Organico</i>	37

<i>Metalli Pesanti</i>	38
<i>Tessitura e composizione del sedimento</i>	41
<i>Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)</i>	42
<i>Diversità tassonomica delle comunità batteriche</i>	45
<i>Analisi metagenetica della spiaggia di "I FARAGLIONI "</i>	52
CONCLUSIONI	54
BIBLIOGRAFIA	57
SITOGRAFIA	60
ALLEGATO A	61

INTRODUZIONE

L'ambiente litorale è complesso, variabile e sottopone gli organismi che ci vivono a molti fattori di stress, spesso presenti in un forte gradiente.

Alcuni di questi sono di carattere fisico, come ad esempio moto ondoso, salinità, umidità, temperatura e ossigeno, altri di tipo biologico, come la predazione e la competizione per lo spazio ed altre risorse.

I naturali fattori di stress che caratterizzano delle zoocenosi costiere sono molteplici, ma i più rilevanti sono:

- La natura mobile del substrato, spesso variabile nello spazio e nel tempo: ad esempio la sabbia che, sospinta dal vento, tende frequentemente a ricoprire gli organismi animali più piccoli e le loro potenziali risorse trofiche
- L'aridità del substrato a livello degli ambienti dunali e di spiaggia emersa, soprattutto nella stagione estiva, legata all'incapacità dei granelli di sabbia di trattenere significativamente l'umidità di origine meteorica, di per sé già limitata
- La povertà di nutrienti di norma presenti nei substrati di spiagge e dune sabbiose, in grado quindi di sostenere comunità relativamente limitate sia di produttori primari che di consumatori
- La salsedine, intesa sia come tenore salino dell'acqua circolante o imbibente i terreni, le sabbie umide e gli accumuli di detriti organici di origine marina, sia come presenza di cloruri che si trovano in vario modo in sospensione nella bassa troposfera, per azione dell'aerosol marino, o cristallizzati al suolo per effetto della disidratazione superficiale, almeno fino al dilavamento e alla diluizione operati dalle piogge
- L'insolazione spesso molto marcata, specialmente nella stagione estiva, combinata con substrati superficiali di norma a bassa capacità termica, ovvero caratterizzati da grande facilità a surriscaldarsi e raffreddarsi rapidamente; questa condizione aumenta gli stress termici e le variazioni termiche giornaliere a carico delle zoocenosi costiere

- L'elevata ventosità e l'esposizione alle mareggiate, che può portare alla frequente e continua rimozione fisica di molti organismi animali dai loro microhabitat naturali, sia in direzione marina che in direzione terrestre, con conseguente aumento della mortalità e probabilmente diminuzione delle potenzialità riproduttive

- La grande capacità termica delle masse idriche marine, che permette di mitigare in modo rilevante sia le eccessive temperature e aridità estive, sia le basse temperature invernali, consentendo quindi a molti organismi animali di raggiungere sia verso Sud che verso Nord latitudini atipiche, grazie al microclima costiero termicamente più favorevole e stabilizzato. Ad esempio, molte specie termofile a distribuzione mediterranea sono in grado di penetrare attivamente anche in aree costiere dell'Italia Settentrionale grazie all'azione termoregolatrice del mare che le lambisce, mentre non potrebbero sopravvivere in aree più interne, a clima invernale troppo rigido.

- L'azione del moto ondoso e delle mareggiate e quella, spesso associata, delle alluvioni fluviali, che consentono apporti di materiali organici di varia natura (seppure ad andamento pulsante e di scarsa predittibilità), assai cospicui in alcuni settori, in particolare quelli prossimi alle foci dei grandi fiumi o ad estese praterie marine a *Posidonia*.

In queste condizioni possono essere sostenute comunità animali, almeno a livello di invertebrati, anche di una certa consistenza e diversità, in termini di numero di specie e di strutturazione di ruoli trofici.

- L' "effetto siepe" rappresentato dai cordoni dunali e dalle spiagge per molti organismi terrestri trasportati passivamente o semi-passivamente su ampi bracci di mare dalle correnti marine, dai venti, da alluvioni, specialmente durante tempeste ed eventi meteorologici eccezionali. (Sandro Ruffo, et al.;2008)

Come stretta conseguenza delle comunque difficili e particolari condizioni micro- e macroclimatiche degli ambienti litoranei sabbiosi, molti invertebrati sabulicoli e dunali hanno messo a punto particolari adattamenti eco-etologici.

I più tipici di questi sono una risposta al problema del sovente eccessivo irraggiamento solare e sono costituiti dallo sviluppo marcato di attività fossorie (scavo di gallerie) nei substrati che lo consentono (sabbiosi umidi, sabbioso-terrosi o limoso-sabbiosi) da parte di molte specie, spesso con paralleli adattamenti e modificazioni morfologiche degli organi di scavo, tra gli artropodi coincidenti di norma con le zampe anteriori. Oppure dallo spostamento di buona parte dei periodi di attività nelle ore notturne (specialmente nei mesi più caldi).

Alcune specie sabulicole ad attività diurna (ad esempio alcuni ortotteri acrididi), particolarmente adattate al microclima caldo e secco delle assolate dune litoranee, necessitano al contrario di infossarsi parzialmente o quasi totalmente nella sabbia proprio durante le ore notturne, sia per minimizzare gli effetti dell'abbassamento della temperatura, sia per sfuggire ai numerosi predatori notturni lungo le dune.

Molte specie meno termofile spostano il proprio ciclo riproduttivo annuale in periodi invernali-primaverili o autunnali, con ampi periodi di estivazione (ossia di diapausa e totale inattività nei mesi più caldi); altre effettuano migrazioni trofiche circadiane o stagionali tra la battigia e le dune consolidate, per ottimizzarne su scala temporale giornaliera o annuale i vantaggi in termini di protezione o di disponibilità di risorse trofiche.

Molte specie perseguono strategie atte a minimizzare il contatto con i substrati più surriscaldati dal sole, come lo sviluppo di arti sottili e allungati, la deambulazione veloce, lo sviluppo negli insetti di capacità di volo veloce e radente (per meglio contrastare l'influenza dei forti venti marini), o, al contrario, la perdita totale delle capacità di volo negli stessi, con fenomeni di brachitterismo e atterismo (cioè di riduzione o scomparsa totale delle ali portanti).

Queste caratteristiche rendono difficile la sopravvivenza al di fuori della zona di elezione, molte specie hanno perciò sviluppato meccanismi fisiologici e comportamentali che permettono l'adattamento a repentine

variazioni delle condizioni ambientali (Herrkind,1983; Vannini e Chelazzi,1985).

A differenza di altri ecosistemi, le spiagge sabbiose hanno ricevuto una scarsa attenzione da parte dei ricercatori poiché, il loro intrinseco, e poco apprezzato, valore ecologico è stato percepito come secondario rispetto al loro valore economico (Brown e McLachlan,1994; Schlancher et al.,2007).

Le spiagge marine si comportano come filtri biocatalitici per diversi tipi di materiali portate dalle correnti e venti, includendo materiale disciolto e particolato organico proveniente da biomassa vivente e non, di origine sia terrestre che marina.

Oltre a rappresentare importanti aree di transizione e collegamento tra due tipi di ecosistemi molto diversi tra di loro (quello marino e quello terrestre), forniscono un ampio range di servizi ecosistemici necessari per l'utilizzazione umana delle coste (Defeo et al, 2009), alcuni dei più importanti includono: deposito e trasporto sedimenti, dissipazione dell'energia del moto ondoso, protezione contro eventi come tempeste e mareggiate, filtrazione e purificazione dell'acqua, riciclo e mineralizzazione dei nutrienti, immagazzinamento di materiale organico e di composti inquinanti ed, inoltre, ospitano organismi utilizzati come fonte di cibo dall'uomo.

Gli invertebrati di maggiori dimensioni appartenenti al macrobenthos, sono rappresentativi di diversi phyla (molluschi, crostacei, anellidi) e costituiscono la maggior componente in termini di abbondanza e biomassa (Brown e McLachlan,1994).

Molte delle specie tipiche di questi ambienti presentano peculiari adattamenti morfologici ed eco-fisiologici come la mobilità, abilità nello scavo, esoscheletro protettivo, comportamenti ritmici a varie periodicità raffinati meccanismi di orientamento e plasticità comportamentale (Chelazzi e Vannini,1998; Brown e McLachlan,1994).

Diversi studi hanno mostrato come l'habitat sabbioso, con l'elevata diversità di microniches ecologiche presenti, supporti una ricca

comunità batterica costituita essenzialmente da specie “residenti” ben adattate all’adesione sui granelli di sabbia, e da specie “occasional”, legate alle fluttuazioni stagionali o all’impatto antropico.

I microrganismi che popolano i sedimenti marini hanno un ruolo fondamentale per la mineralizzazione della materia organica e la degradazione di inquinanti, inoltre regolano l’equilibrio di diversi cicli biogeochimici.

Alcuni microrganismi producono polimeri extracellulari, sostanze che si attaccano sulla superficie dei granelli di sabbia, formando dei biofilm.

Il risultato dell’habitat dei biofilm può essere considerato come un bioreattore che accumula diverse caratteristiche delle popolazioni microbiche, come enzimi extracellulari, nutrienti e materia organica di origine diversa. (Angélique Gobet et al., 2012)

Il volume dei granelli di sabbia rappresenta uno spazio costante per lo scambio di particelle a causa del flusso turbolento di correnti attraverso i pori, ciò induce un flusso significativo di materia organica.

Rimane ancora sconosciuto quali biofilm siano associati ai granelli di sabbia provenienti dal mare e trasportati attraverso la sabbia, e all’opposto quali microrganismi derivino da reservoir di tipo terrestre (es. suolo).

Molti studi sulla microbiologia dei sedimenti marini si sono tuttavia concentrati su specifici gruppi funzionali, i cui processi biogeochimici possono essere misurati direttamente e pochi studi sono stati condotti per fornire un quadro completo sulla comunità microbica nei sedimenti marini, e come questa sia strutturata in relazione all’ambiente chimico e ai processi associati (Llobet-Brossa et al., 1998). A fronte tuttavia di un certo numero di lavori microbiologici sui sedimenti sabbiosi sommersi, ancora sono scarsi gli studi sulle comunità microbiche presenti nella fascia sopralitorale delle coste sabbiose ed in particolare possano essere influenzate dai cicli stagionali, dalla pressione antropica e dal conseguente inquinamento.

Inoltre, nella strutturazione della comunità batterica della spiaggia giocano, potenzialmente, anche altri fattori ambientali, oltre a quelli sopramenzionati. Uno dei più rilevanti è la distanza dalla linea di battigia, che determina un gradiente nel contenuto di acqua e salinità.

Negli ambienti costieri, contraddistinti principalmente dalla presenza di spiagge sabbiose, vi è più notevole impatto antropico particolarmente rilevante soprattutto a causa di uno spostamento sempre più crescente, della popolazione umana verso le coste (UNCED,1992). Per quel che riguarda il bacino del Mediterraneo, la popolazione degli stati costieri era di 246 milioni nel 1960, di 380 milioni nel 1990 (EEA,1999).

Nonostante le aree costiere siano sempre state sfruttate dall'uomo, essendo importanti centri di sviluppo per potenziale scambio di merci e disponibilità di risorse alimentari e materiali, i cambiamenti indotti dalle attività umane hanno subito un forte incremento nel corso del XX secolo (Nordstrom,2002; Halpern et al.,2009).

Attività antropiche su spiagge marine possono generare differenti fenomeni (Schlacher et al.,2007; Defeo et al.,2009):

Costruzione di infrastrutture porta a perdita e frammentazione degli habitat

Erosione costiera: una minaccia per l'ambiente correlata ad una combinazione di attività umane come lo sviluppo litoraneo, eccessiva urbanizzazione, l'abbandono dell'agricoltura e il cambiamento climatico globale. Erosione dell'habitat si è verificata anche principalmente per l'uso competitivo della zona costiera.

Interventi gestionali come i ripascimenti e la costruzione di pannelli frangiflutti realizzati

Sfruttamento delle risorse naturali

Attività di tipo ricreativo (principalmente a scopo turistico-balneare)

Cambiamenti climatici che comportano innalzamento del livello del mare con conseguente modificazione della linea di riva.

Vista l'importanza che assumono le spiagge marine, da un punto di vista ambientale con la presenza di molti bioindicatori nell'accumulo di

metalli in traccia e l'impatto ecologico e genetico che i metalli possono avere sulle comunità naturali; un altro aspetto che sta suscitando sempre più interesse negli ultimi anni riguarda la microbiologia dei sedimenti sabbiosi, sia per quanto riguarda i microrganismi coltivabili, sia per la frazione microbica totale.

A fronte tuttavia di un numero consistente di lavori sui sedimenti sabbiosi sommersi, ancora sono scarsi gli studi sulle comunità microbiche presenti nella fascia sopralitorale delle coste sabbiose e di come queste possano essere influenzati dai cicli stagionali e dalla pressione antropica e dal conseguente inquinamento.

Inoltre nella strutturazione della comunità batterica della spiaggia giocano potenzialmente altri fattori ambientali, oltre a quelli per i sedimenti sommersi.

Uno dei più rilevanti è la distanza dalla linea di battigia, che determina un gradiente nel contenuto di acqua e salinità, soprattutto nella stagione estiva.

La mia tesi si propone di :

- Sviluppare la messa a punto di un protocollo per il campionamento
- Caratterizzare la contaminazione da agenti chimici e le comunità microbiche di spiagge a differente pressione antropica.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Per i miei esperimenti, come località di campionamento sono state scelte tre spiagge dell'isola di Favignana (Figura A), caratterizzate da differenze di origine :

- geografica
- esposizione differente a venti e correnti
- differenti pressioni di origine antropiche e turistiche

Le tre spiagge sono:

Lido Burrone (Figura B), spiaggia sottoposta a pressione legate al flusso turistico nei mesi estivi;

Spiaggia dei Faraglioni (Figura C), a causa della sua posizione non subisce particolari pressioni, ne legate al flusso turistico ne legate ad attività antropiche;

Praja-spiaggia del paese (Figura D), spiaggia sottoposta a differenti pressioni antropiche legate alla vicinanza con il centro abitato e attività da diporto;



Figura A.Cartina geografica che mostra la costa dell'isola di Favignana e la posizione delle 3 località oggetto del campionamento, **B:** Spiaggia del Lido Burrone; **C:**Spiaggia dei Faraglioni;**D:** Spiaggia del paese “Praja”



B: Spiaggia del Lido Burrone, prima località campionata



C: Spiaggia dei Faraglioni, seconda località campionata



D: Spiaggia del paese "Praja", terza località campionata

Metodologia di Campionamento

Il campionamento sulle tre spiagge è stato effettuato in due periodi stagionali differenti, uno a settembre (campionamento estivo) ed uno a dicembre (campionamento invernale).

Per ogni spiaggia sono stati campionati tre punti lungo un transetto mare-terra (linea di battigia, metà spiaggia, fine spiaggia) e per ogni punto sono stati prelevati 3 campioni.

I campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente per tre giorni e poi congelati a -80°C prima dell'estrazione del DNA.

Strategia di campionamento:

La spiaggia è stata suddivisa secondo un asse X ed un asse Y;

Asse Y la spiaggia è stata suddivisa in tre punti:

- Punto primo corrispondente alla linea di Battigia (shore-line)
- Punto secondo corrispondente a circa metà spiaggia (mid-line)
- Punto terzo corrispondente a fine spiaggia (upper-line)

Asse X:

Seguendo l'asse X si sono effettuati due prelievi a distanza l'uno dall'altro di circa 5 metri.

Per ogni punto di prelievo sono stati effettuati tre prelievi, conferendo i codici:

(1,2,3)-Punti di prelievo per la linea di battigia

(4,5,6)-Punti di prelievo per la metà spiaggia

(7,8,9)-Punti di prelievo per la fine spiaggia

Inoltre ad ogni spiaggia è stato accostato un codice secondo l'ordine di campionamento:

Spiaggia numero 1-Lido Burrone

Spiaggia numero 2-Faraglioni

Spiaggia numero 3-Paese

Analisi Elementare (Carbonio organico e totale)

Le apparecchiature destinate alla determinazione degli elementi carbonio, azoto, idrogeno, sono dei gascromatografi combinati ad una fornace. I campioni vengono pesati in un recipiente di stagno (per il carbonio organico verrà successivamente spiegata la procedura) e introdotti in un tubo di quarzo mantenuto ad una temperatura di 925 °C (camera di combustione), attraverso il quale fluisce una corrente costante di elio. Dopo l'introduzione dei campioni, la corrente di elio è temporaneamente arricchita con ossigeno puro che dà luogo ad una combustione flash. La miscela dei gas ottenuti viene fatta passare sopra Cr_2O_3 , successivamente si ha:

Ossidazione Matrice contenente carbonio \Rightarrow CO_2

Ossidazione Matrice contenente azoto \Rightarrow Ossidi di azoto

Ossidazione Matrice contenente carbonio \Rightarrow H_2O

In seguito i gas prodotti passano attraverso un secondo tubo, riempito di rame a 640 °C per rimuovere l'eccesso di ossigeno e ridurre gli ossidi di azoto a N_2 . Infine la miscela viene fatta passare attraverso una colonna cromatografica termostata dove i singoli componenti (CO_2 , H_2O , N_2) sono separati ed inviati ad un rivelatore di termococonducibilità. L'uso della cromatografia frontale ha il vantaggio che il segnale generato dal TCD (detector a termococonducibilità), si presenta sotto forma di gradino e quindi è misurabile con una grande precisione.

Per le analisi mi sono avvalso di un analizzatore elementare Perkin Elmer CHNS/O serie II modello 2400 (Fig.1) e di una bilancia Perkin Elmer AD 4 autobalance. Inizialmente si provvede alla taratura dello strumento mediante la combustione di un composto organico standard (acetanilide).

Per la determinazione del carbonio organico totale (TOC) i campioni pesati devono essere preventivamente trattati mediante dei cicli di acidificazione (HCl 10%) ed essiccazione in stufa ad una temperatura di 50 °C fino a totale scomparsa dell'effervescenza, indicando la completa eliminazione del C inorganico del carbonato di Ca sottoforma di CO₂.

Il protocollo utilizzato è quello presente nel Supplemento ordinario della G.U. del 21-10-1999 per la determinazione del carbonio organico e dell'azoto in campioni di suolo calcareo.(Metodo WalkleyBlack)



Figura 1. Analizzatore Perkin Elmer CHNS/O serie II modello 2400

Analisi granulometrica

Si introducono circa 200 grammi di terreno granulometricamente significativo, preventivamente essiccato, nel primo dei setacci posti uno sopra l'altro con le dimensioni delle maglie in ordine decrescente dall'alto verso il basso. (Vannocci P.,2010). Terminata la setacciatura per via umida, i residui di sabbia sono depositati nei relativi setacci che differiscono per diametro. Successivamente i campioni vengono classificati secondo granulometria in:

Ciottoli con un diametro superiore ai 60mm

Ghiaia con diametro compreso tra 60mm e 2 mm

Sabbia con il diametro compreso tra 2mm e 0.06mm

Limo con diametro dei sedimenti compreso tra 0.06mm e 0.002 mm

Argilla se il diametro è inferiore a 0.002mm



Figura 2. Setacci per granulometria

Determinazione peso specifico

Per peso specifico solido di un terreno si intende il peso dell'unità di volume delle particelle solide e si ottiene dividendo il peso delle particelle solide per il loro volume

Procedimento:

Si prelevano dal campione setacciato 40, 25, o 10 grammi, la quantità varia in base al picnometro che si utilizza, vengono introdotti nel picnometro aggiungendo acqua distillata disaerata.

Si attendono 12 ore per avere una completa saturazione .

Procedura di calcolo:

Si pesa il picnometro dopo che tutto il materiale introdotto si è decantato (Pt)

Successivamente si pesa il picnometro con acqua distillata sola (Pa)

Si calcola il peso del materiale introdotto (P_s) facendo la differenza tra P_t e P_a , a questo punto si calcola il volume di acqua spostato dalle particelle solide che approssimativamente è dato da $P_a + P_s - P_t$.



Figura 3. Picnometri

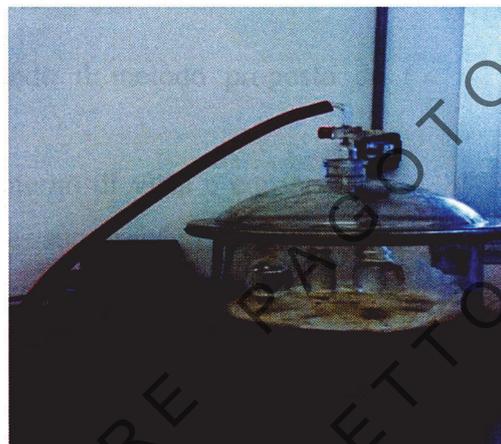


Figura 4. Disaeratore

Analisi Umidità

Per tutti i campioni prelevati è stata determinata la percentuale di Umidità residua. L'umidità residua è calcolata come differenza tra massa del campione preparato per l'analisi e la massa del medesimo campione dopo l'essiccazione a fmo a massa costante.

Procedimento:

-Si preparano dei dischetti di alluminio e se ne determina il peso, determinato il peso dei dischetti si pesano 2 grammi di sabbia per ogni campione nel dischetto di alluminio;

-I campioni vengono messi in stufa per 3-4 giorni, in tal modo il campione si essicca facendo evaporare tutta l'acqua residua;

-Successivamente si ripesano i campioni e si determina la % di umidità del campione.

-Per ogni campione si effettuano 4 pesate da 2 grammi, successivamente l'essiccazione in stufa del campione si effettua una media tra le 4 pesate per ogni campione

Umidità per singolo campione = $1 - \text{Media}(4\text{pesate})/2$

Analisi IPA

Estrazione di campioni di sabbia e spiaggiato

I campioni sono stati estratti ottimizzando il metodo proposto da (Kannan et al. 1998).

I campioni raccolti sono stati posti all'interno di vials e conservati a 20°C fino al momento delle analisi e successivamente sono stati sottoposti ad un trattamento di liofilizzazione per eliminare l'acqua presente.

Circa 24 ore di liofilizzazione.

Prima dell'estrazione ogni campione è stato pesato su una bilancia analitica (Shimadzu AW120). In Tabella 1 sono riportati i pesi di ciascun campione estratto

Campioni		Peso (g)
<i>Spiaggia Lido Burrone</i>	Inizio	9.94571
<i>Spiaggia Lido Burrone</i>	Metà	10.02218
<i>Spiaggia Lido Burrone</i>	Fine	10.02023
<i>Spiaggia dei Faraglioni</i>	Inizio	10.04186
<i>Spiaggia dei Faraglioni</i>	Metà	10.12296
<i>Spiaggia dei Faraglioni</i>	Fine	10.03338
<i>Spiaggia del Paese Praja</i>	Inizio	10.1075
<i>Spiaggia del Paese Praja</i>	Metà	10.05046
<i>Spiaggia del Paese Praja</i>	Fine	10.00854

Tabella 1: Peso dei campioni di sabbia

I campioni una volta pesati, e posti all'interno di ditali di vetro ed estratti in soxlet (Figura 5) per 16 ore con 250 mL di una miscela 4:1 v/v n-Esano:Acetone.



Figura 5: Estrazione campioni in soxhlet

Prima dell'estrazione ai campioni sono stati aggiunti 100 μL di standard BDE-119 e 100 μL di standard PCB-53 per valutare la percentuale di recovery.

Gli estratti sono stati concentrati fino ad un volume di 5 mL con Rotavapor (BUCHI) (Figura 6) e successivamente ad un volume finale di circa 1mL in bagno di ghiaccio e sotto leggero flusso di azoto prima di essere sottoposti alla fase finale di clean-up.



Figura 6: Rotavapor

Procedura di CLEAN-UP

La procedura di clean-up (Figura 7) è un passaggio molto importante in quanto altri composti come ad esempio sostanze umiche, composti polari e sostanze lipidiche possono essere co-estratte insieme agli analiti di interesse ed andare ad interferire nella loro determinazione cromatografica. Per la procedura di clean-up vengono utilizzate colonne in vetro (190mm x 22mm) impaccate in modo differente per le diverse tipologia di campioni utilizzati.



Figura 7: Clean-up campioni di sabbia

Trattamento di silice e solfato

Per eseguire la procedura di clean-up è stato necessario trattare la silice e il solfato di sodio in muffola a 450°C per 12 ore e conservati in stufa a 100°C. Successivamente la silice è stata trattata con tre tipi diversi di reagenti.

Silice trattata con nitrato di argento:

45g di silice sono trattati con 5g di nitrato (AgNO_3) sciolti in 25 ml di acqua. La soluzione è stata aggiunta, goccia a goccia, sotto agitazione per 8h. La silice è stata quindi conservata in bottiglie di vetro scure.

Silice trattata con acido solforico:

56g di silice sono trattati con 44g di acido solforico (H₂SO₄ 95%) aggiunto goccia a goccia, sotto agitazione per 8h e successivamente conservata in bottiglie di vetro scure.

Silice trattata con idrossido di sodio:

33g di silice sono trattati con 17g di idrossido di sodio (NaOH 1M) aggiunto goccia a goccia sotto agitazione per 8h e successivamente conservate in bottiglie di vetro scure.

Solfato di sodio:

il solfato di sodio utilizzato è stato precedentemente trattato in muffola a 450°C per circa 8h e conservato a 150°C

Clean-up dei campioni di sabbia e spiaggiato

La colonna per il clean-up dei campioni di sabbia e spiaggiato è stata impaccata, partendo dal basso con:

2g di silice

5g di silice trattata con idrossido di sodio (per la rimozione di composti acidi)

2g di silice

5g di silice trattata con nitrato di argento (per la rimozione dello zolfo e composti contenenti zolfo)

10g di solfato di sodio anidro (per la rimozione del quantitativo di acqua)

Dopo aver condizionato la colonna con 50mL di Diclorometano e 50mL di Cicloesano, il campione è stato eluito con 50mL di Cicloesano seguiti da 50mL di una miscela Cicloesano:Diclorometano 4:1 (v/v) (Figura 8).

L'eluato è stato evaporato con Rotavapor fino ad un volume di 5mL e, successivamente, fino ad un volume finale di circa 100µL in bagno di ghiaccio e sotto leggero flusso di azoto. Successivamente 1 µL dell'estratto è stato sottoposto ad analisi gas-cromatografica accoppiata a spettrometria di massa.



Figura 8: Clean-up dei campioni portati a volume

Analisi metalli pesanti

Le fasi riguardanti l'analisi dei metalli pesanti sono due, una prima fase in cui il campione viene mineralizzato in uno strumento definito "Bomba" ed una seconda fase in cui i campioni mineralizzati vengono analizzati in uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. (A. Ugolini et al;2004-Ugolini et al; 2005)

PROCEDURA:

I campioni sono stati prima asciugati a 40°C e poi macinati finemente

Circa 150 mg di sabbia sono stati omogeneizzati e mineralizzati in teflon con 3 ml di HNO_3 ed inseriti in un sistema di digestione pressurizzato a 120 °C per 8 ore. Successivamente i campioni sono stati portati a volume (10ml) con acqua deionizzata.

Pb e Cd sono stati analizzati con uno spettrofotometro ad assorbimento atomico dotato di forno a grafite e correttore di fondo ZEEMAN (ZETAAS).

Hg è stato analizzato mediante iniezione di flusso a spettrometria ad assorbimento atomico (FI-ASS).

Al,Fe,Cr,Cu,Zn sono stati determinati con uno spettrometro al plasma ad emissione atomica (ICPAES).

La qualità dei dati è verificata per ciascun campione mediante analisi di fustellati e digestione simultanea e analisi dei materiali di riferimento standard (RSR):SRM 1566 del National Institute of Standards and Technology (Nist,gait Hersburg,USA).

I campioni che differiscono dal valore standard certificato vengono ripetuti.

La concentrazione degli elementi (espressa come lg g1 del peso secco) sono determinati addizionando lo standard prima della mineralizzazione.

Soluzioni standard di elementi inorganici (BDH) vengono preparati per diluizione seriale di stock standard, contenenti 1g/1 dell'elemento da determinare.

Il tasso di recupero varia tra il 92% e 105%.

Terreni di coltura

Tutti i terreni devono essere sciolti in acqua distillata (bidistillata nel caso di terreni minimi) e autoclavati a 1,7 atmosfere. Il tempo di autoclavatura viene preso dopo che sono state raggiunte le 1,7 atm e dipende dal volume massimo di terreno presente all'interno della singola bottiglia (se sono presenti più bottiglie il tempo viene preso in base a quella con la maggiore quantità di terreno):

- Per 250 ml di terreno 25 minuti
- Per 500 ml di terreno 35 minuti
- Per 750 ml di terreno 45 minuti

Terreno GC Agar.

Il terreno GC agar è un terreno ideale per la crescita di microrganismi marini.

Il terreno contiene una quantità di sale di 0.32M.

Non avendo un standard di piastramento e crescita per questo tipo di campione (sabbia), il terreno è stato modificato,in piastra,aggiungendo NaC a concentrazioni note (fino al 3-4%).

L'aggiunta di NaCl è stata effettuata per eguagliare la concentrazione salina presente nel mar Mediterraneo e creare quindi un terreno il più adeguato possibile per la crescita dei microrganismi.

Successivamente si sono piastrati i microrganismi a diverse concentrazioni.

Determinazione del Titolo Batterico

Per poter determinare il titolo dei batteri occorre preparare prima delle diluizioni seriali della coltura, le diluizioni seriali sono state effettuate con solfato di magnesio in 10mM. (Harry W. et al; 2005)

Prelevati circa 1 grammo di sabbia diluiti in 10 ml di solfato di magnesio si inserisce la provetta in un agitatore per circa 1-2 ore, per poter far staccare i microrganismi dalla sabbia.

Successivamente si attende che i residui si depositino sul fondo e si procede con le diluizioni.

Diluizioni da piastare sono le seguenti: Concentrazione tal quale, diluizione 10^{-2} e 10^{-4}

Le piastre vengono incubate alla temperatura appropriata finché le colonie non sono cresciute, le piastre sono state incubate per 24-48 e 72 ore. Terminato il periodo di crescita le colonie formatesi vengono contate singolarmente e successivamente moltiplicate per il fattore di diluizione

Estrazione del DNA dal campione

Il DNA dalla sabbia viene estratto mediante un apposito Kit di estrazione, il FastDNA Kit for Soil (QBiogene) seguendo le istruzioni fornite con il kit.

Fase successiva all'estrazione del DNA è la misurazione, concentrazione e determinazione della purezza del DNA, può essere determinata calcolando l'assorbanza all'UV260, usando uno spettrofotometro (BioPhotometer, Eppendorf). L'analisi viene effettuata usando un metodo programmato, come raccomandato dalla casa costruttrice.

Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (*amplificazione*) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni. (Mengoni, et al. 2007)

Programma utilizzato per l'amplificazione PCR dei miei campioni è il 16S rRNA, comprende diversi cicli a temperature e tempi differenti.

Ciclo di amplificazione:

5' a 95°C; 5 cicli: 95°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto e 30 secondi; 5 cicli: 95°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto e 30 secondi; 25 cicli: 95°C per 30 secondi, 50°C per 30 secondi, 72°C per 2 minuti, 72°C per 8 minuti.

Dopo l'ultimo passaggio la reazione viene tenuta a 8°C, prima di essere prelevata e conservata a -20°C.

La miscela di reazione della PCR è riportata in Tabella 2

Reagente	Volume	Concentrazione stock
dH ₂ O	12.35 µl	
BSA	1 µl	10 mg/ml
BUFFER 10X	5 µl	10X
MgCl ₂	1.5 µl	25 mM
dNTP _s	0.5 µl	10 mM
Primer P ₆	1 µl	10 µM
Primer P ₀	1 µl	10 µM
Taq DNA polimerasi	0.4 µl	5U /µl
Dimetilsolfossido	1.25 µl	
DNA	1 µl	10 ng/ µl

Tabella 2: Miscela di reazione della PCR sul gene del 16S rRNA

Elettroforesi su gel di agarosio

Questo metodo è utilizzato per la visualizzazione e la quantificazione di DNA a doppia elica. Il gel di agarosio può avere una concentrazione di 0.6-1% (W/V).

□ Miscelare l'agarosio con il buffer TEA 1X e scaldarlo finchè non si è completamente disciolto.

Raffreddare la soluzione agarosio-TEA fino a 50°C, aggiungere la soluzione di bromuro d'etidio fino ad una concentrazione finale di 1 mg/l e versarla in una camera orizzontale con un pettinino.

Quando il gel si è solidificato, coprirlo con il buffer TEA e rimuovere il pettinino.

Miscelare il DNA con il loading buffer BBF 6X (blu di bromo fenolo, colorante blu contenente glicerolo) e caricarlo nei pozzetti del gel.

Far correre il gel utilizzando un voltaggio di 100 V.

Si può ottenere un'immagine del gel illuminandolo con la luce UV del transilluminatore e facendone una fotografia.

Il sistema è collegato ad un alimentatore in grado di creare il campo elettrico.

Grazie al campo elettrico generatosi la miscela di frammenti comincerà a migrare verso il polo positivo in base al loro diverso peso molecolare: quelle più pesanti (a maggior PM) migreranno più lentamente rispetto a quelle più leggere (a minor PM), che a loro volta migreranno più velocemente.

T-RFLP “Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism “

La tecnica denominata T-RFLP, nasce come evoluzione logica dell'analisi RFLP ed applicata all'analisi di comunità microbiche e in grado di rilevare differenze anche minime tra ceppi, consentendo la comprensione della struttura ed evoluzione della comunità microbica in esame.

Come indica il suo nome, l'analisi T-RFLP misura il polimorfismo di lunghezza dei frammenti terminali di restrizione di un *marker* genetico amplificato mediante PCR.

L'analisi T-RFLP è basata sulla digestione con endonucleasi di restrizione di prodotti di PCR marcati all'estremità con una molecola fluorescente (Figura 9).

Uno o entrambi i *primers* possono essere marcati con fluorocromi differenti.

I prodotti di digestione vengono mescolati con uno standard interno di taglie molecolari, marcato con un differente colorante fluorescente ed i frammenti vengono poi separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide o con sistemi basati sull'elettroforesi capillare con rilevamento automatico dei frammenti marcati di DNA mediante laser

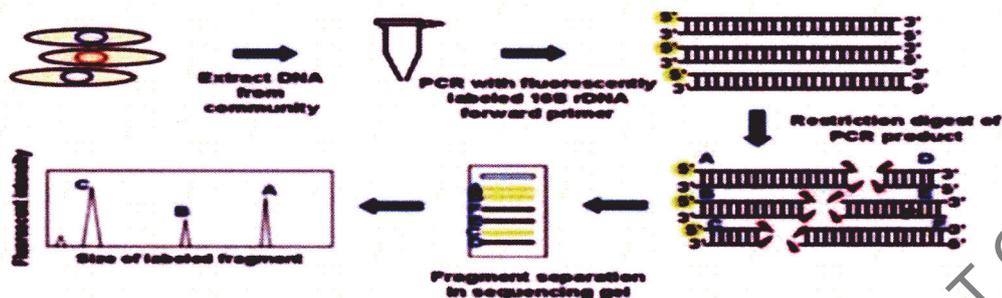


Figura 9: Schema della procedura t-RFLP

Il risultato di tale analisi è un elettroferogramma costituito da una serie di picchi che differiscono per mobilità (dimensione molecolare), altezza ed area e che rappresentano, indirettamente, le diverse specie microbiche presenti nella comunità in esame (Figura 10).

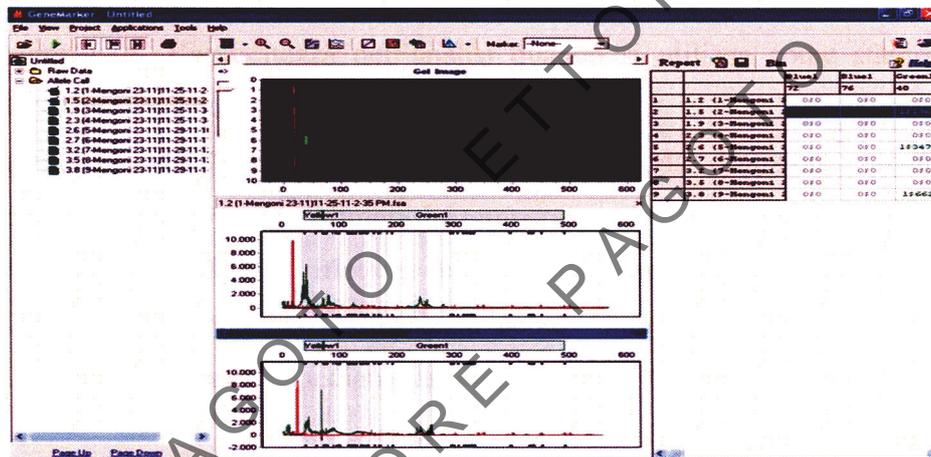


Figura 10: Screen shot del metodo di analisi dei ferogrammi

L'altezza di ogni picco dovrebbe fornire una misura della proporzione relativa di ogni componente della popolazione, tuttavia a causa dell'appaiamento preferenziale dei *primers* su alcuni stampi di DNA rispetto ad altri, il valore assoluto di questa misura deve essere trattato con cautela.

Inoltre, microrganismi differenti possono avere per un determinato enzima un *Terminal-Restriction Fragment* (T-RF) della stessa dimensione e quindi non essere distinguibili in base ad un singolo profilo di restrizione.

Questo è particolarmente vero per i T-RFs generati dall'estremità 3' terminale del gene codificante per l' rRNA 16S.

Una discriminazione maggiore viene fornita dalla regione 5' in conseguenza dell'eterogeneità di sequenza all'estremità 5' del gene, nelle regioni V1, V2 e V3.

Il programma di analisi fornisce, oltre all'elettroferogramma, una tabella, in cui sono riportate, la dimensione espressa in paia di basi di ogni picco (calcolata facendo riferimento allo standard interno) e l'altezza del picco relativa alla quantità di fluorescenza rilevata.

Quando si analizza un particolare profilo, viene fissata una soglia minima di fluorescenza per escludere il rumore di fondo.

Occorre, inoltre, stabilire quali altri fattori risultano importanti per aumentare l'accuratezza dell'analisi quando si utilizza come stampo DNA proveniente da campioni naturali:

cioè, riproducibilità dell'esperimento, effetti di diluizione, scelta appropriata di *primers*, polimerasi e temperatura di *annealing*.

I profili così ottenuti riflettono la diversità genetica della comunità e ciascun T-RF può essere utilizzato come "*data point*" per effettuare confronti di comunità mediante analisi statistiche. (Tabella 3)

Codice Campione	Località campionata
1.2/1.1	L.Burrone inizio spiaggia
1.5/1.6	L.Burrone-metà spiaggia
1.8/1.9	L.Burrone-fine spiaggia
2.3/2.5	Faraglioni-inizio spiaggia
2.2/2.3	Faraglioni-metà spiaggia
2.7/2.6	Faraglioni- fine spiaggia
3.2/3.5	Paese-Inizio spiaggia
3.8/3.7	Faraglioni-metà spiaggia

Tabella 3 : Codice dei campioni relativi ai luoghi di campionamento

Digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione

La reazione di digestione con l'enzima di restrizione viene attuata secondo le specifiche del produttore (in un totale di 10 μ l).

Il DNA da digerire, viene portato ad un volume finale di 10 μ l con acqua distillata sterile.

Successivamente da ciascun campione di DNA è stato amplificato il gene codificante il 16S rRNA ed analizzato mediante la tecnica del Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) usando gli enzimi di restrizione *AluI* e *TaqI*. (Mengoni et al;)

I frammenti ottenuti (TRFs) dopo la digestioni sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI310 usando il ROX500 come standard di dimensione.

Mix con enzima <i>AluI</i>		Mix con enzima <i>TaqI</i>	
Buffer	1ul	Buffer	1ul
PCR purificata	3ul	Pcr purificata	3ul
Enzima <i>AluI</i>	1ul	Enzima <i>TaqI</i>	1ul
ddH2O	5ul	ddH2O	5ul

Tabella 4 Miscela di reazione per digestione enzimatica

Sequenziamento del DNA mediante tecnica Illumina SOLEXA

Per il sequenziamento massivo mediante tecnica ILLUMINA SOLEXA sono stati presi tre pool di campioni rappresentativi del transetto mare-terra è stata infine amplificata la regione variabile V3 del gene 16S rRNA, successivamente il pool di ampliconi è stato poi sottoposto a sequenziamento massivo mediante tecnica Illumina. (Gregory B. Gloor et al;2010)

Tale metodologia di analisi prevede due fasi:

-Prima fase consiste nella preparazione della miscela del campione e successivo ciclo di amplificazione del DNA e quantificazione mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Il ciclo di amplificazione prevede differenti step a temperature e tempi ben precisi:

Ciclo di amplificazione: 5 minuti a 95°C; 5 cicli: 95°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto e 30 secondi; 5 cicli: 95°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto e 30 secondi; 25 cicli: 95°C per 30 secondi, 50°C per 30 secondi, 72°C per 2 minuti, 72°C per 8 minuti. Dopo l'ultimo passaggio la reazione viene tenuta a 8°C, prima di essere prelevata e conservata a -20°C. La quantità totale di miscela per campione è di 50µl. (Tabella 5)

-Seconda fase consiste nella vera e propria analisi mediante sistema Solexa.

Questa è stata fatta usando il service della ditta BGI

Il sistema **SOLEXA** prodotto da Illumina è una piattaforma per il sequenziamento in parallelo di segmenti di DNA amplificati in modo clonale e legati a sfere magnetiche.

(Figura 11A,B,C,D)

La metodologia di sequenziamento è basata sulla "sintesi sequenziale" di oligonucleotidi attraverso l'utilizzo di terminatori dideoossi reversibili.

Il sistema **SOLEXA** può generare oltre 1 Gbp di dati di sequenza (sequenze di lunghezza pari a 30-35 bp) con un'accuratezza superiore al 99%.

I suoi sequenziatori sfruttano la DNA polimerasi, ma introducono due accorgimenti tecnici che fanno la differenza.

Il primo è l'immobilizzazione del DNA su un supporto fisso: le molecole da sequenziare sono infatti incollate a un vetrino tramite degli adattatori. Questo permette di leggere milioni di frammenti di DNA contemporaneamente, perché ciascuno di essi viene a trovarsi in un punto preciso e non si può confondere con gli altri.

La seconda, importantissima novità sono i terminatori reversibili, che rispetto al metodo Sanger i cui nucleotidi modificati bloccano la sintesi del DNA in modo irreversibile, quelli di Illumina possono essere riattivati, grazie all'azione di un enzima che taglia via la parte di molecola che blocca il lavoro della DNA polimerasi. In questo modo, è possibile monitorare in tempo reale l'aggiunta di tutti i nucleotidi su ogni frammento, fotografando le fluorescenze emesse a ogni passaggio da tutte le molecole di DNA depositate sul vetrino

Reagente	Volume	Concentrazione stock
dH ₂ O	24.7 μ l	
BSA	2 μ l	10 mg/ml
BUFFER 10X	10 μ l	10X
MgCl ₂	3 μ l	25 mM
dNTPs	1 μ l	10 mM
Primer V3f	2 μ l	10 μ M
Primer V3r	2 μ l	10 μ M
<i>Taq</i> DNA polimerasi	0.8 μ l	5U / μ l
Dimetilsolfossido	2.5 μ l	
DNA	2 μ l	10 ng/ μ l

Tabella 5: Miscela di reazione per amplificazione DNA

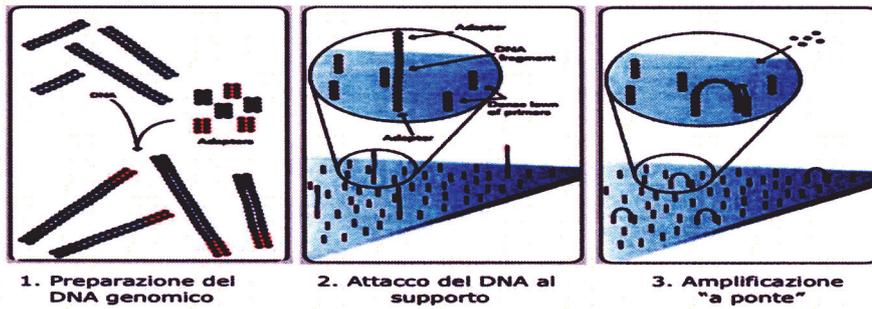


Figura 11a

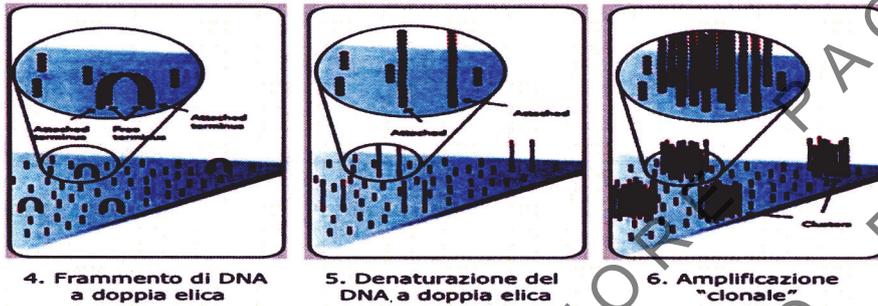


Figura 11b



Figura 11c

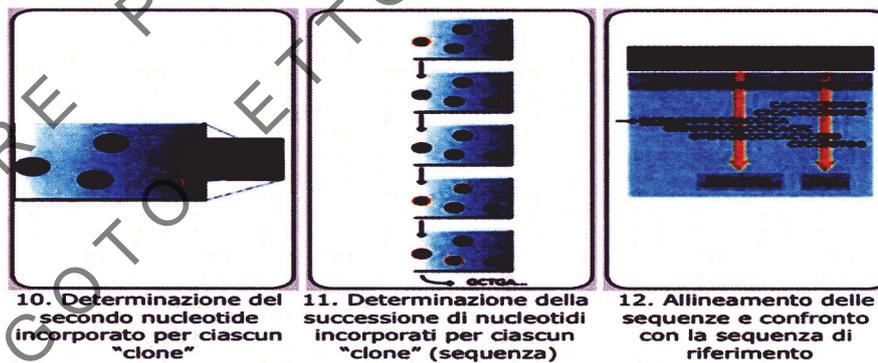


Figura 11d

RISULTATI

Conteggio microbico

Le colture su piastra hanno evidenziato per i siti campionati la presenza di una comunità eterotrofa coltivabile a lenta crescita (gran parte delle colonie compare dopo 8 giorni di incubazione) e tollerante livelli di salinità confrontabili (3-3,5-4%) alla salinità media del Mediterraneo (3,2-3,9%). (Tabella 6 e Figura 12).

Crescita dopo:	48h			8 giorni		
	3 % NaCl	3,5 % NaCl	4 % NaCl	3 % NaCl	3,5 % NaCl	4 % NaCl
Spiagge campionate	$4 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^4$
L.Burrone-inizio						
	$1,4 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$
L.Burrone-metà						
	$6,2 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^5$	$8,3 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^5$	$8,1 \cdot 10^5$	$8,2 \cdot 10^5$
L.Burrone-fine						
	$3 \cdot 10^3$	0	0	$2,3 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^3$
I Faraglioni-inizio						
	$5 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^4$	$7,8 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^7$
I Faraglioni-metà						
	$7 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^3$	$10 \cdot 10^4$	$9,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$
I Faraglioni-fine						
	$5 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	$13 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^4$
Paese-inizio						
	$1,3 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^7$	$9,6 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^7$
Paese-metà						
	$7 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$
Paese-fine						

Tabella 6: Valori di crescita a 48h e 8 giorni

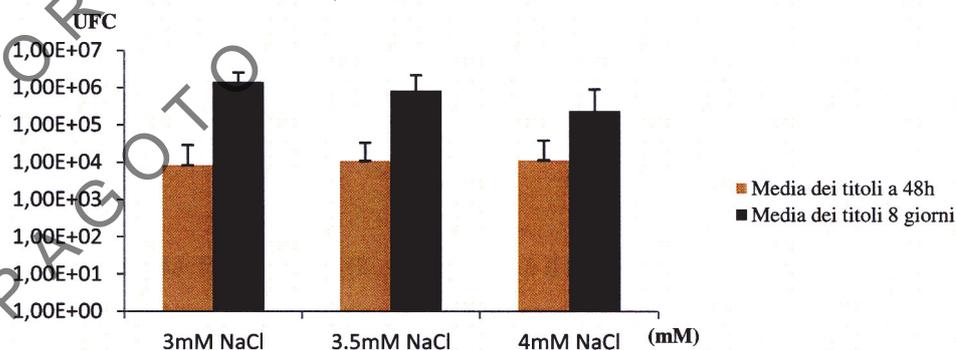


Figura 12: Titoli medi di Unità formanti colonie (UFC) per gr di sabbia ottenuti dalle 3 spiagge in esame

Nella Figura 13 viene riportato il rapporto tra le unità formanti colonie (UFC) a crescita veloce (48h) e quelle a crescita lenta (8 gg). Questo rapporto, che può essere approssimato al rapporto r/K-strateghi tra microrganismi a selezione "r" (che si riproducono velocemente) e organismi a selezione "K" che si riproducono più lentamente, mostra una maggiore crescita per quei microrganismi con una più alta concentrazione salina per circa l'84%.

	3% NaCl	3.5% NaCl	4% NaCl
48h/8giorni	0,00585	0,01	0,05

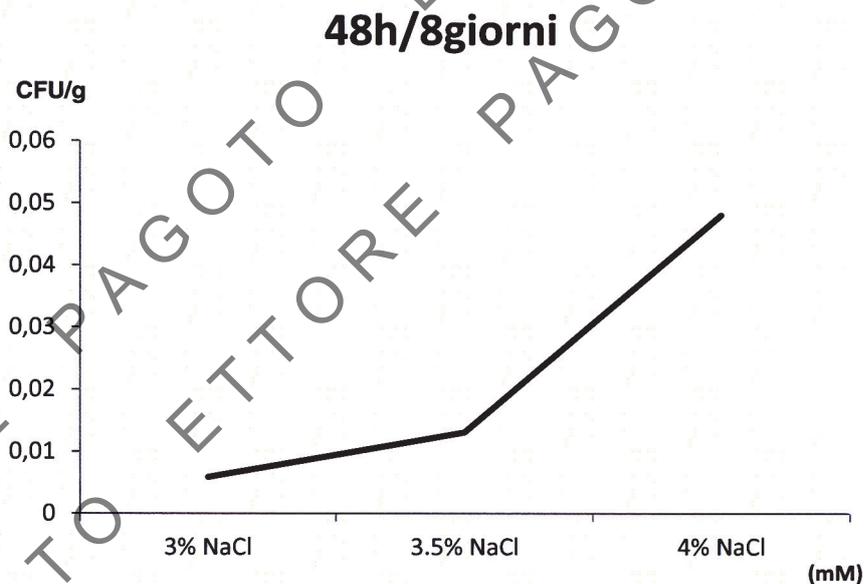


Figura 13: Rapporto tra r/K-strateghi che è il rapporto tra le CFU/g dopo 48/h e dopo 8 giorni

Contenuto d'acqua nel substrato

La percentuale di acqua presente varia sensibilmente a seconda che si analizzi inizio, metà e fine spiaggia. I campioni che contengono la maggiore quantità di acqua sono quelli in prossimità dell'inizio spiaggia, legato all'eccessiva vicinanza al mare e il continuo flusso di acqua in arrivo (Tabella 7a-7b, Figura 14). Altro fattore che influenza il campione è il periodo di campionamento, i campioni invernali risultano avere una maggiore quantità di acqua.

	Spiaggia "LidoBurrone"						Spiaggia "Faraglioni"						Spiaggia del Paese "Praja"						
	Inizio		Metà		Fine		Inizio		Metà		Fine		Inizio		Metà		Fine		
	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	
Peso del terreno umido (g)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Peso del terreno secco (g)	1,49	1,37	1,95	1,82	1,98	1,86	1,61	1,85	1,97	1,86	1,93	1,91	1,64	1,69	1,94	1,83	1,99	1,89	
Peso acqua (g)	0,51	0,63	0,05	0,18	0,02	0,14	0,39	0,15	0,03	0,14	0,07	0,09	0,36	0,31	0,06	0,17	0,01	0,11	
Contenuto d'acqua(%)	0,26	0,32	0,02	0,09	0,01	0,07	0,2	0,08	0,02	0,07	0,04	0,05	0,18	0,1	0,03	0,07	0,01	0,06	

Tabella 7a: Peso in gr tra peso del terreno umido e secco nei campionamenti I (invernale) E (estivo)

	% acqua-estate	% acqua-inverno
L.Burrone-inizio	0,26	0,31625
L.Burrone-metà	0,02	0,0925
L.Burrone-fine	0,01	0,06875
I Faraglioni-nizio	0,20	0,07375
I Faraglioni-metà	0,02	0,07125
I Faraglioni-fine	0,04	0,04375
Spiaggia Paese-inizio	0,18	0,15625
Spiaggia Paese-metà	0,03	0,07
Spiaggia Paese-fine	0,01	0,055

Tabella 7b: Livelli in % di acqua presente nei campioni in relazione a periodo campionamento e punto di prelievo campione

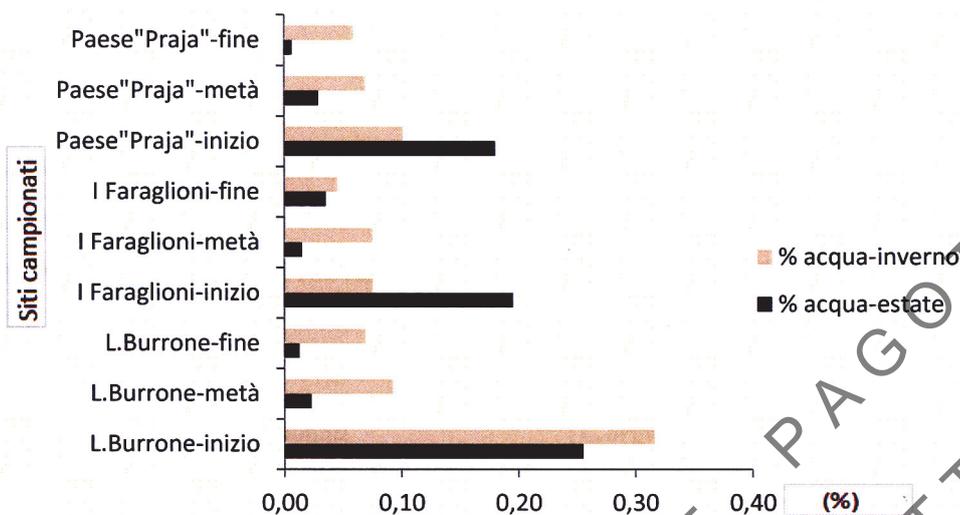


Figura 14: Andamento e confronto dei campioni tra periodo campionamento e punto di prelievo in %

%H2O (Peso secco di tutti i campioni)				
	Inizio spiaggia	Metà spiaggia	Fine spiaggia	Media % acqua
Media (n=9)	1,58	1,96	1,96	0,21
Deviazione standar	0,08	0,01	0,03	

Tabella 8: Media e Deviazione standard tra inizio spiaggia, metà spiaggia e fine spiaggia di tutte e tre le spiagge campionate

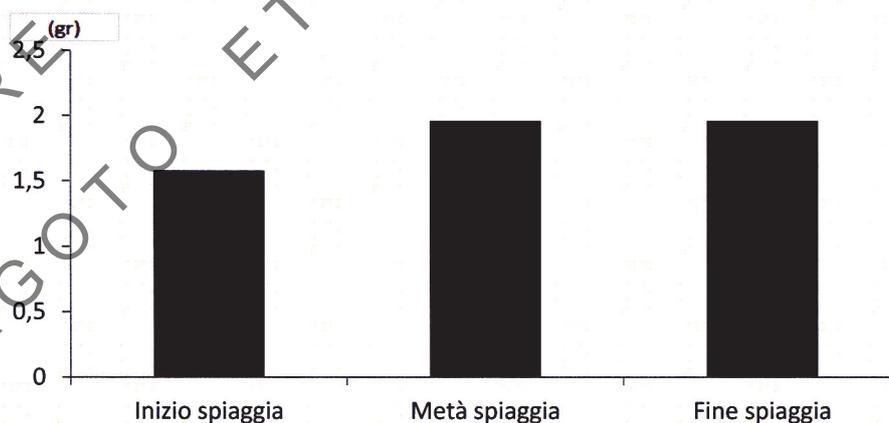


Figura15: Peso secco (gr) ad inizio, metà e fine spiaggia delle tre spiagge campionate

Carbonio Organico

I livelli di carbonio organico variano in tutte e tre le spiagge, ma la spiaggia dei "I Faraglioni" risulta contenere una maggior percentuale di C organico.

Non vi sono differenze rilevanti per le altre due spiagge. (Tabella 9-Figura 16).

Siti campionati	C.orgánico
L.Burrone-Battigia	5,93
L.Burrone-Metà spiaggia	5,79
L.Burrone-Fine spiaggia	5,9
I'Faraglioni-Battigia	9,76
I'Faraglioni-Metà spiaggia	8,96
I'Faraglioni-Fine spiaggia	8,52
Paese-Battigia	6,56
Paese-metà spiaggia	7,14
Paese-Fine spiaggia	6,76

Tabella 9: Abbondanza di Carbonio Organico (mg) nelle tre località campionate

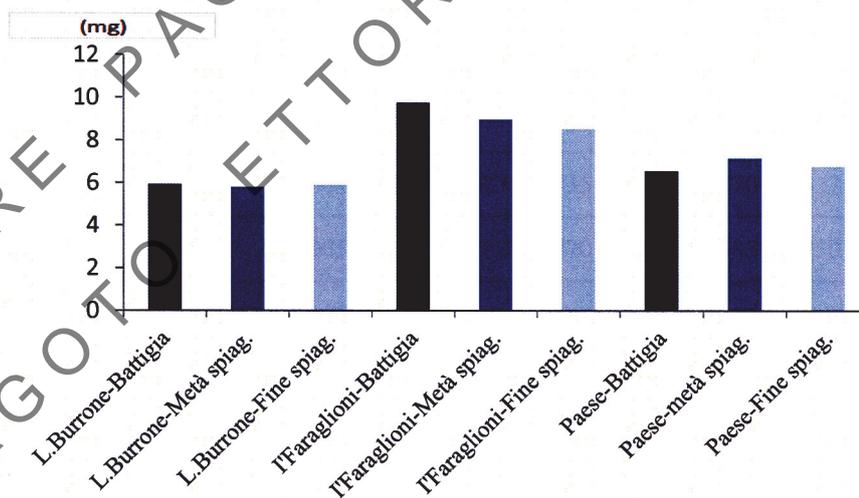


Figura 16: Rappresentazione dei livelli di Carbonio organico nelle 3 spiagge oggetto di studio e nei diversi transetti (inizio, metà e fine spiaggia)

Metalli Pesanti

La spiaggia del Paese risulta avere i maggiori valori per Al, Fe, Cu e Zn; concentrazioni maggiori di Manganese e Rame si ritrovano a metà spiaggia del Paese e spiaggia dei Faraglioni. Nella spiaggia del Lido Burrone la concentrazione di metalli pesanti lungo il transetto mare-terra risulta essere più bassa rispetto alle altre due località campionate (Tabella 10-11, Figura 17-18). Tuttavia, se consideriamo la contaminazione per zona di campionamento lungo l'asse y è possibile osservare (Tabella 10 e 11) che la contaminazione è simile per Faraglioni e Burrone per la zona di battigia e per "fine spiaggia". La spiaggia del "Paese" risulta la più contaminata in tutte e tre le zone di campionamento.

	Hg	Cd	As	Cr	Cu	Pb	Zn	Mn
L.Burrone-Battigia	0,003	0,028	0,546	3,788	1,590	1,550	4,612	12,431
L.Burrone-Metà spiag.	0,003	0,036	0,432	3,470	1,157	1,600	3,757	16,410
L.Burrone-Fine spiag.	0,003	0,041	0,361	3,317	1,276	1,782	4,278	19,765
I'Faraglioni-Battigia	0,002	0,017	2,315	3,300	1,047	1,001	3,496	25,592
I' Faraglioni-Metà spiag.	0,002	0,020	2,229	3,731	4,836	1,336	4,028	27,701
I' Faraglioni-Fine spiaggia	0,002	0,020	2,134	3,687	1,070	1,349	3,345	26,592
Paese-Battigia	0,004	0,045	1,527	3,002	6,165	3,928	11,673	22,713
Paese-Metà spiag.	0,004	0,045	1,073	2,735	4,303	4,770	8,327	27,078
Paese-Fine spiag.	0,005	0,054	1,288	2,970	3,382	5,483	9,930	31,207

Tabella 10: Distribuzione di Metalli pesanti nei siti campionati

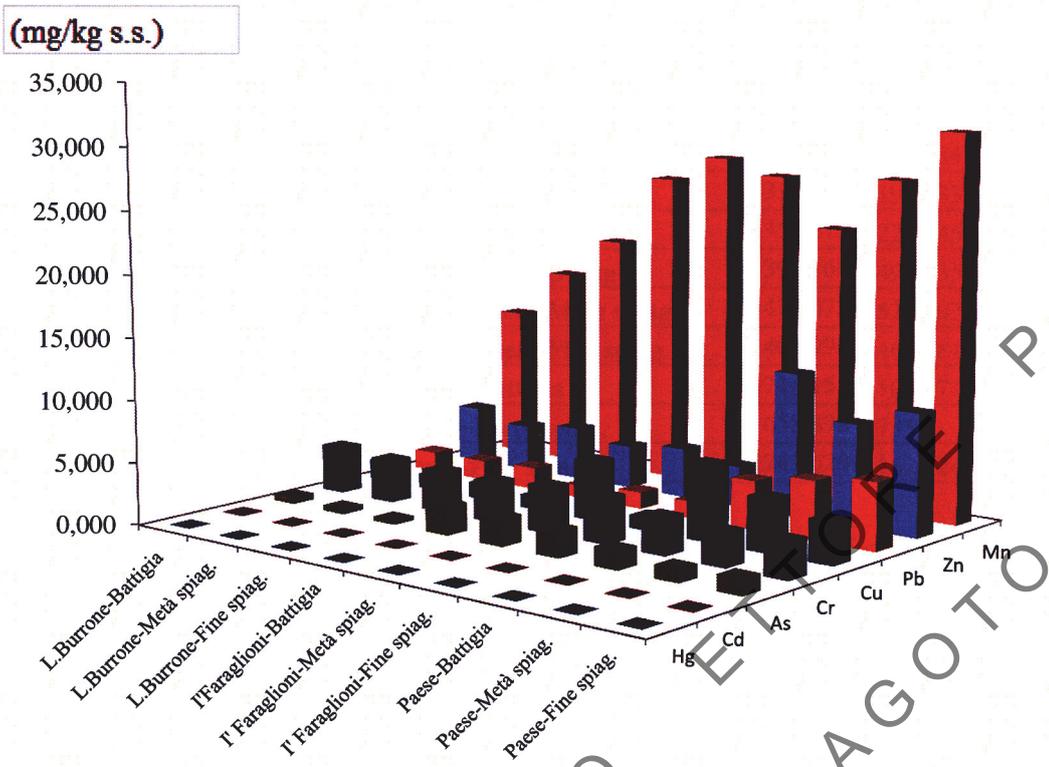


Figura 17: Distribuzione di metalli pesanti nei siti campionati (mg/kg s.s.)

	Al	Fe
L.Burrone-Battigia	276,834	145,384
L.Burrone-Metà spiag.	315,803	197,433
L.Burrone-Fine spiag.	357,271	228,445
I'Faraglioni-Battigia	396,160	497,735
I' Faraglioni-Metà spiag.	473,071	521,107
I' Faraglioni-Fine spiag.	401,996	462,784
Paese-Battigia	714,155	1035,7
Paese-Metà spiag.	658,898	735,6
Paese-Fine spiag.	743,620	1623,247

Tabella 11: Distribuzione di metalli pesanti(Alluminio e Ferro) nei siti campionati

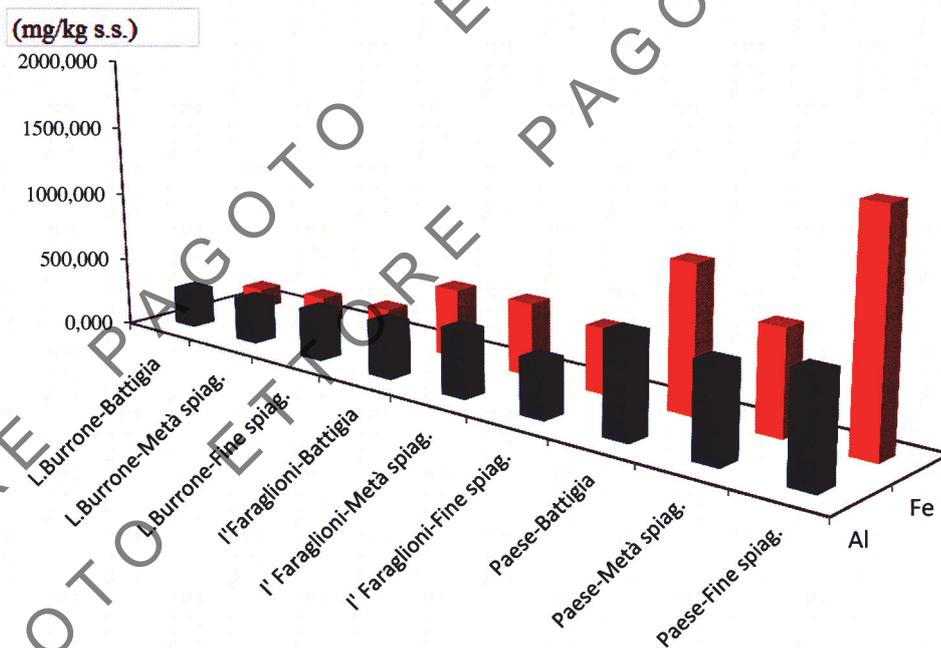


Figura 18: Distribuzione di metalli pesanti (Alluminio e Ferro) nei siti campionati(mg/kg s.s.)

Tessitura e composizione del sedimento

Le analisi granulometriche hanno evidenziato una granulometri diversa per la spiaggia del Paese rispetto alle altre due per quanto riguarda la percentuale di ghiaia e anche per la presenza, seppur limitata, di limo e argilla.

%	SABBIA	GHIAIA	LIMO	ARGILLA
L.Burrone-inizio	97,9		2	
L.Burrone-metà	99,5		0,5	
L.Burrone-fine	97,6	0,3	2	0,1
I Faraglioni-inizio	99	1		
I Faraglioni-metà	100			
I Faraglioni-fine	100			
Paese-inizio spiaggia	87,4	10,8	1,8	0,1
Paese-metà spiaggia	98,5		1,4	0,1
Paese-fine spiaggia	97,8	0,3	1,9	0,1

Tabella 12: Composizione in % della tessitura delle spiagge marine lungo i transetti oggetto di studio

Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

I risultati derivanti dall'analisi GC-MS per la determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) hanno permesso di identificarne la presenza in tutti i siti presi in esame anche se le concentrazioni determinate non sono risultate elevate. Dai dati riportati in Tabella 13 e Figura 18 si nota che i valori di concentrazione totali sono risultati maggiori nei campioni prelevati presso la spiaggia dei "I Faraglioni" (inizio e fine spiaggia) con una notevole differenza di concentrazione nelle tre zone della spiaggia considerate. Il contenuto totale di IPA risulta, invece, inferiore per quanto riguarda Lido Burrone anche se, in questo caso, le concentrazioni totali misurate sono più omogenee tra di loro nelle tre zone della spiaggia. Le concentrazioni misurate presso la spiaggia del paese sono risultate le più basse in assoluto, un tale risultato è in parte inaspettato visto il maggior impatto antropico sul sito. La distribuzione dei singoli IPA nei vari siti riflette l'andamento delle concentrazioni totali; si osservano, infatti, un numero maggiore di singoli composti in particolare nei campioni prelevati presso la fine della spiaggia di Lido Burrone e Faraglioni, un numero più esiguo si registra, invece, presso la fine della spiaggia del paese. A tal proposito bisogna ricordare che gli IPA sono composti volatili e, quindi, le condizioni di campionamento (temperatura, vento, umidità, ecc...), del campione possono influenzare in maniera critica le concentrazioni; dunque i dati qui riportati devono essere considerate preliminari in mancanza di campionamenti ripetuti.

Gli IPA sono presenti nell'ambiente sotto forma di miscele complesse contenenti oltre un centinaio di differenti composti. A causa di questa estrema varietà in genere è possibile identificarne analiticamente solo alcuni. Negli anni 1980 l'Agenzia federale statunitense dell'ambiente (EPA) ha incluso 16 di questi composti nell'elenco dei principali inquinanti ambientali (priority pollutants). Per tale motivo in generale vengono analizzati i 16 IPA classificati come maggiormente oppure si

tende a determinare solo il benzo(a)pirene, classificato dalla IARC (International Agency for Research on Cancer) come cancerogeno nell'essere umano ed ritenuto responsabile di mutazioni genetiche, infertilità e disturbi dello sviluppo neuronale. La IARC nel 2006 ha eseguito una nuova valutazione degli IPA, dichiarandone 15 cancerogeni dimostrati, probabili o possibili per l'essere umano (IARC, 2008; Allegato A). L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ritiene che 8 IPA siano cancerogeni per l'uomo quando vengono assunti con gli alimenti (EFSA, 2008; Allegato A). Poiché gli IPA vengono adsorbiti dal particolato atmosferico che si deposita sulla superficie terrestre o su bacini acquiferi, il fattore responsabile dell'incorporazione degli IPA nei sedimenti marini, è la sedimentazione del materiale sospeso nell'acqua marina. La dispersione dipende da molti fattori quali, ad esempio, la solubilità in acqua, la velocità di degradazione ed i fenomeni di risospensione di sedimenti inquinati. I composti organici meno solubili (proprio come gli IPA) hanno maggiore tendenza ad associarsi alle particelle sospese nell'acqua, quindi ad essere inglobati nei sedimenti. La maggiore concentrazione di IPA a metà e fine spiaggia per i siti interessati quali Faraglioni e Lido Burrone, potrebbe essere dunque legata alla distanza dal mare e, quindi, alla minor interazione con un effetto di dilavamento dell'acqua sulla battigia. La determinazione di IPA in campioni di sabbia indica che le spiagge sabbiose rappresentano un recettore importante per alcuni composti idrofobici (Galgani et al., 2011)

IPA	Lido Burrone			Faraglioni			Paese		
	inizio	metà	fine	inizio	metà	fine	inizio	metà	fine
	ng/g								
Naphthalene			0,140			0,644	0,258	0,064	0,274
Acenaphthylene	0,069					0,475	0,210	0,058	
Acenaphthene	0,043								
Fluorene	0,072	0,135	0,164	0,236	0,012	0,158	0,115	0,011	0,199
Phenanthrene	0,019	0,023	0,028	0,020	0,031	0,072	0,045	0,020	0,215
Anthracene	0,047	0,038	0,027	0,008	0,027	0,054	0,038	0,013	0,136
Fluoranthene	0,042	0,012	0,021	0,107	0,086	0,069	0,114	0,018	0,078
Pyrene	0,123	0,024	0,031	0,186	0,129	0,076	0,186	0,043	0,168
Benzo(a)antracene	0,010		0,015	0,003		0,062		0,013	
Chrysene	0,008		0,025			0,070		0,010	
Benzo(b)fluoranthene			0,019			0,062			
Benzo(k)fluoranthene			0,028			0,078			
Benzo(j)fluoranthene			0,032			0,061			
Benzo(e)pyrene			0,026			0,071			
Benzo(a)pyrene			0,019			0,062			
Perilene									
Indeno(1,2,3-cd)pyrene			0,021			0,045			
Benzo(ghi)Perilene			0,029			0,072			
DiBenzo(a,h)Anthracene	1,450	1,657	1,036	1,862	0,193	1,388	0,524	0,632	0,827
DiBenzo(a,l)Pyrene			0,022			0,070			
DiBenzo(a,e)Pyrene			0,026			0,062			
DiBenzo(a,i)Pyrene									
DiBenzo(a,h)Pyrene									
Totale	1,884	1,888	1,709	2,422	0,478	3,650	1,490	0,881	1,897
Phe / Ant	0,414	0,613	1,017	2,519	1,148	1,322	1,184	1,578	1,581
Fl/Py	0,344	0,505	0,676	0,575	0,667	0,901	0,613	0,413	0,464

Tabella 13: Valori IPA nei tre siti campionati

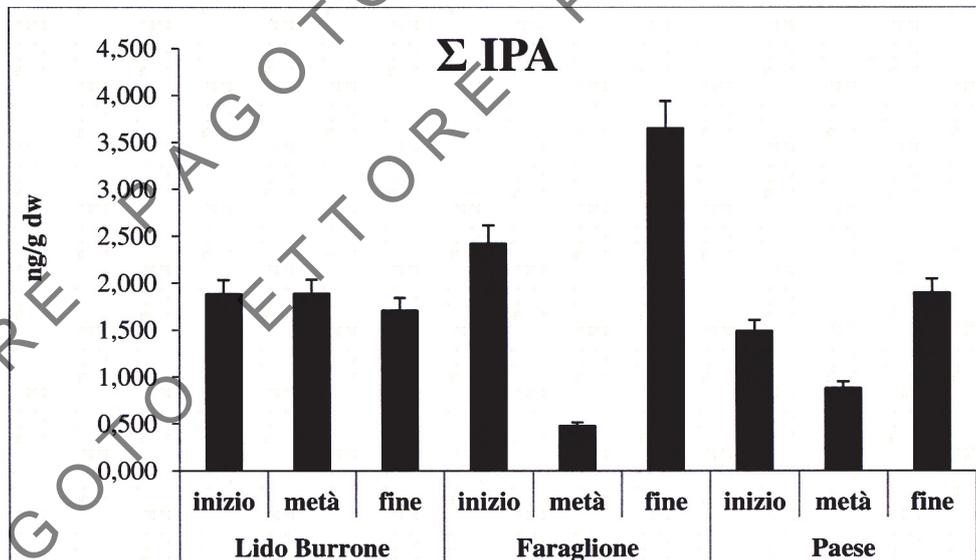


Figura 18: Distribuzione e concentrazione ng/peso secco (dw) di IPA nei tre siti campionati

Diversità tassonomica delle comunità batteriche

Dall'analisi dei profili T-RFLP sono stati ottenuti 46 T-RFs o ribotipi, dai due enzimi di restrizione. La diversità tassonomica della comunità batterica viene espressa come richness o diversità ribotipica (Tabella 15 e Figura 19). Questa risulta maggiore nei campioni invernali rispetto a quelli estivi, anche se tuttavia le differenze riscontrate non sono significative (1-way ANOVA). Non si evidenziano differenze nella diversità ribotipica in relazione al tipo di spiaggia.

Località Campionata	Richness
L.Burrone-inizio S	9
L.Burrone-metà S	6
L.Burrone-fine S	7
Faraglioni-inizio S	10
Faraglioni-metà S	7
Faraglioni-fine S	6
Spiaggia Paese-inizio S	9
Spiaggia Paese-metà S	7
Spiaggia Paese-fine S	3
L.Burrone-inizio W	3
L.Burrone-metà W	0
L.Burrone-fine W	19
Faraglioni-inizio W	20
Faraglioni-metà W	4
Faraglioni-fine W	20
Spiaggia Paese-inizio W	0
Spiaggia Paese-metà W	4
Spiaggia Paese-fine W	8

Tabella 14: Diversità ribotipica per località campionata nei due campionamenti; Estivo (S) Invernale (W)

Richness

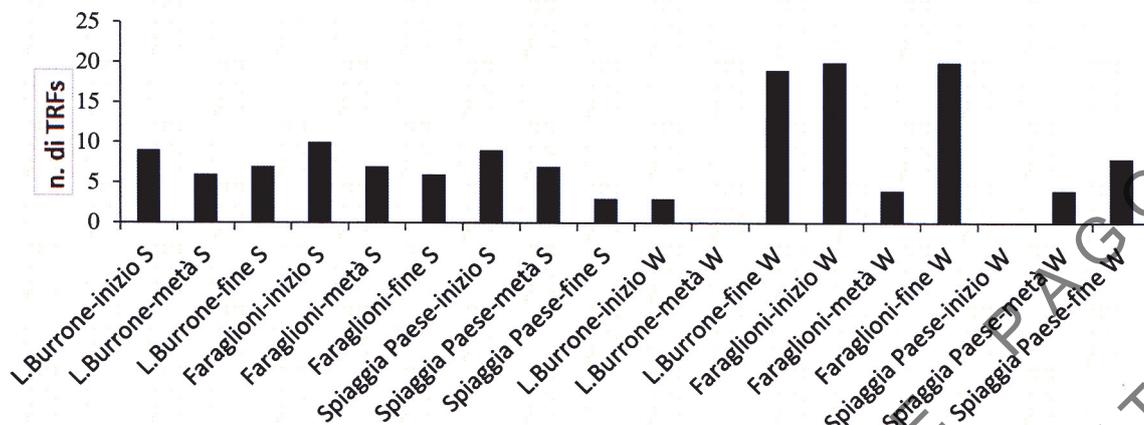


Figura 19: Rappresentazione dell'abbondanza ribotipica come numero di T-RFs nelle tre località campionate nei diversi transetti analizzati (inizio, metà, fine spiaggia) e stagione di campionamento (S:estate; W: inverno)

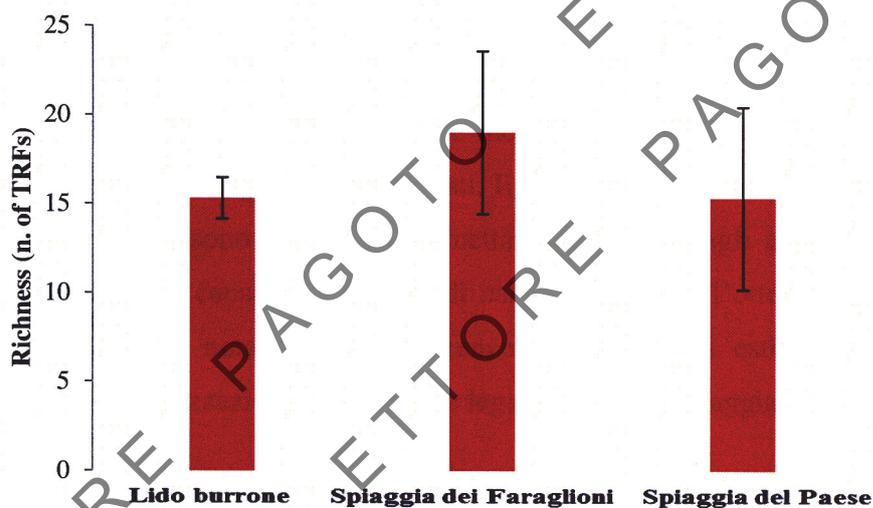


Figura 20: Diversità ribotipica nelle tre spiagge campionate

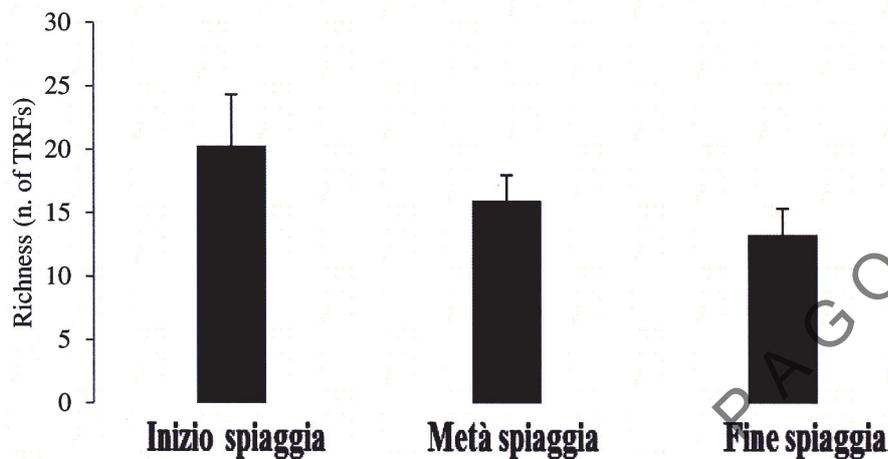


Figura 21: Differenze ribotipiche nei transetti (Inizio, metà e fine spiaggia) dei tre siti campionati (Spiaggia del Lido Burrone, Faraglioni e Paese)

I profili T-RFLP delle comunità batteriche campionate sono stati successivamente processati mediante analisi multivariata (N-MDS), come spiegato in materiali e metodi per evidenziare eventuali similarità tra i profili per i vari ambienti. Il risultato ottenuto è mostrato nella figura 22. Vi sono due campioni nettamente diversi dagli altri (3.1W e 1.6W), forse a causa di problemi di natura tecnica nell'ottenimento dei profili. Non si notano nette differenze tra campioni estivi ed invernali, né clusterizzazioni significative legate al tipo di spiaggia

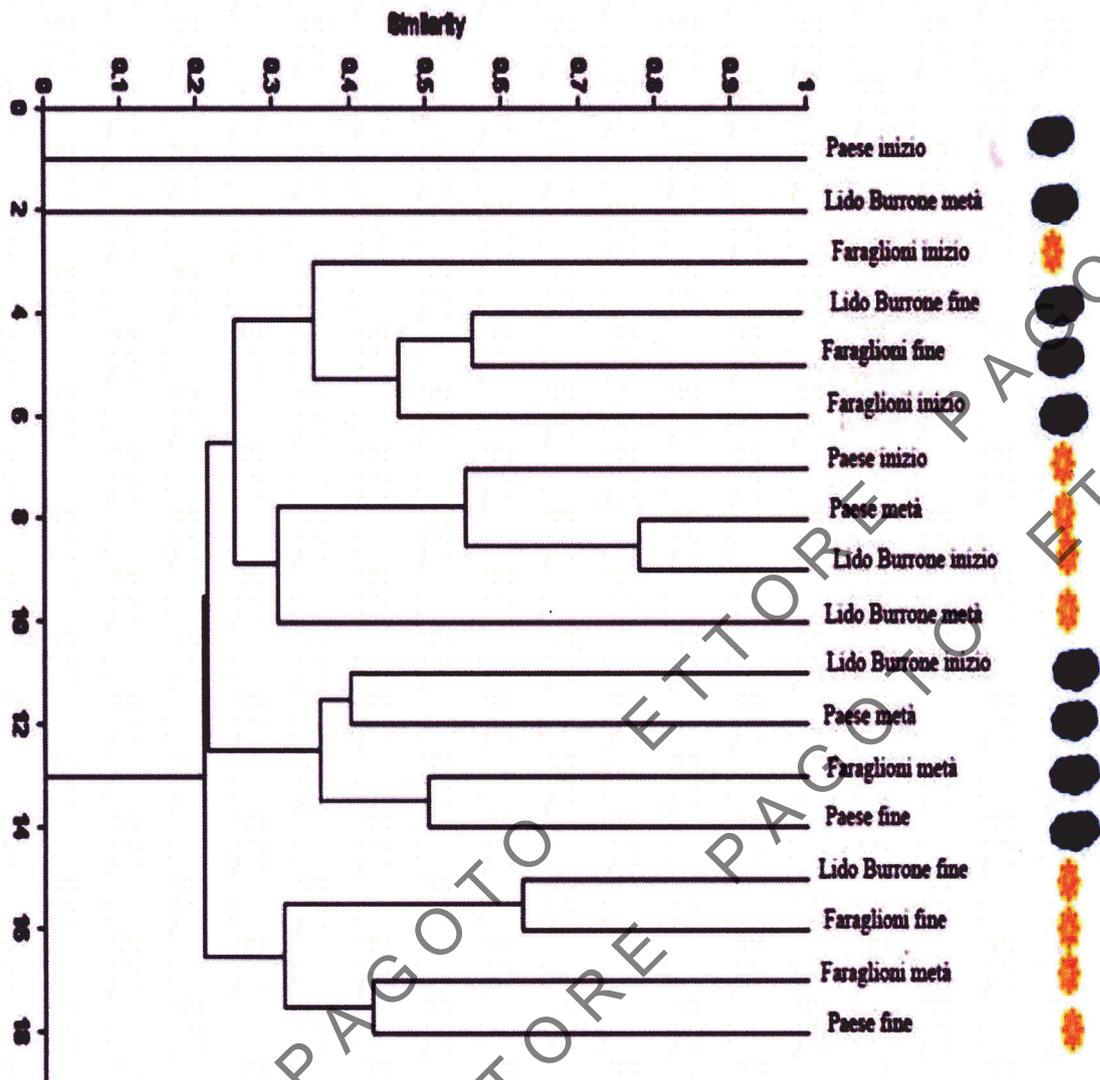


Figura 22: Analisi cluster (UPGMA) dei campioni T-RFLP della comunità microbica totale nei due campionamenti : Estivo * Invernale ●

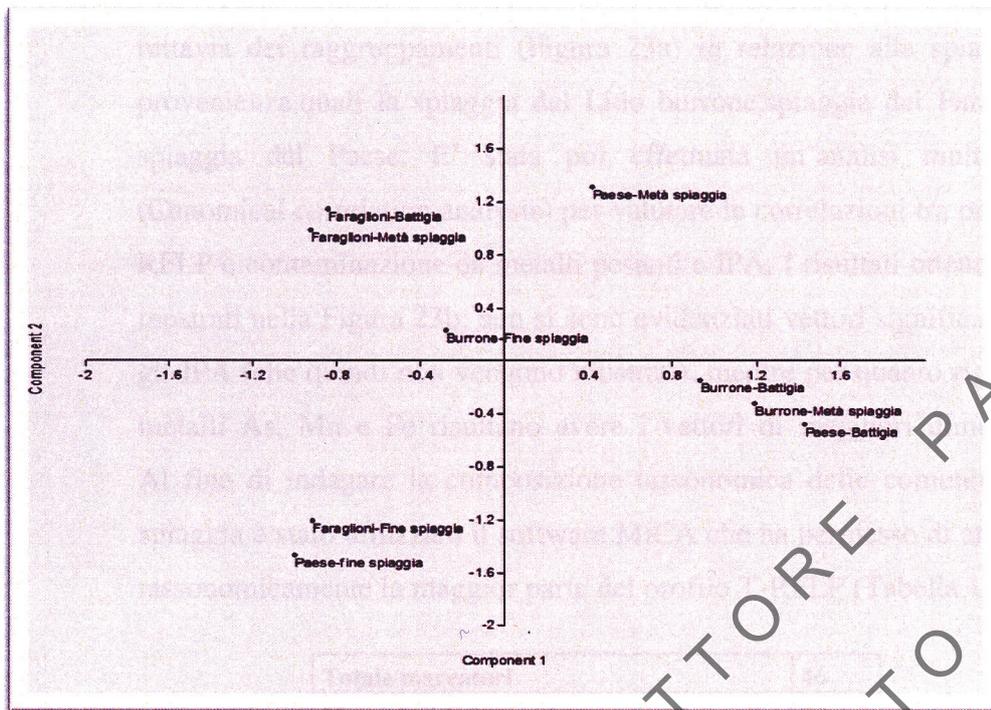


Figura 23a: Analisi PCA dei profili T-RFLP del campionamento estivo

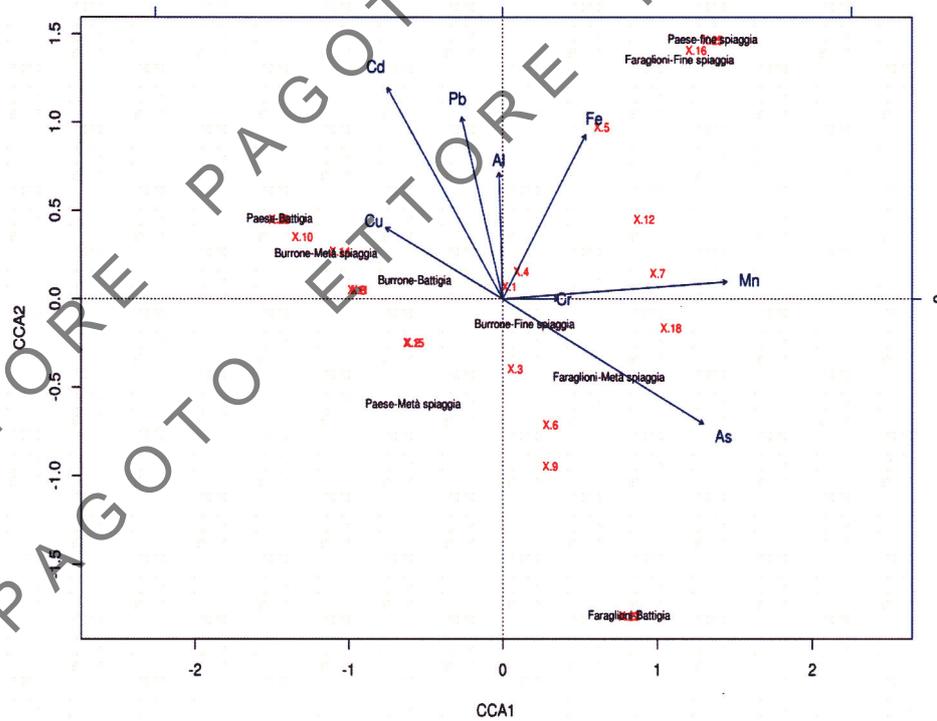


Figura 23b: Analisi CCA dei profili T-RFLP e dei metalli pesanti

Se si prende in considerazione il solo campionamento estivo si notano tuttavia dei raggruppamenti (Figura 23a) in relazione alla spiaggia di provenienza, quali la spiaggia del Lido burrone, spiaggia dei Faraglioni, spiaggia del Paese. E' stata poi effettuata un'analisi multivariata (Canonical correlation analysis) per valutare le correlazioni tra profili T-RFLP e contaminazione da metalli pesanti e IPA. I risultati ottenuti sono mostrati nella Figura 23b. non si sono evidenziati vettori significativi per gli IPA (che quindi non vengono mostrati), mentre per quanto riguarda i metalli As, Mn e Fe risultano avere i vettori di maggiori dimensioni. Al fine di indagare la composizione tassonomica delle comunità della spiaggia è stato utilizzato il software MiCA che ha permesso di attribuire tassonomicamente la maggior parte del profilo T-RFLP (Tabella 14).

Totale marcatori	46
Marcatori tassonomicamente assegnati	20
Marcatori miscellanei	20
Marcatori non identificati	6

Tabella 14: Raggruppamento marcatori T-RFLP

Il risultato ottenuto (Tabella 15 e Figura 24) mostrano una presenza di alfa proteobatteri e firmicutes nella battigia.

	Inizio spiaggia	Metà spiaggia	Fine spiaggia
alphaproteobacteria	6	7	4
betaproteobacteria	1	0	0
gammaproteobacteria	3	3	2
Firmicutes	8	5	3
Thermomicrobia	6	4	5
Planctomycetacia	2	1	1
Spirochaete	1	2	0

Tabella 15: Frequenze delle classi microbiche per zona di spiaggia, cumulate indipendentemente dalla località

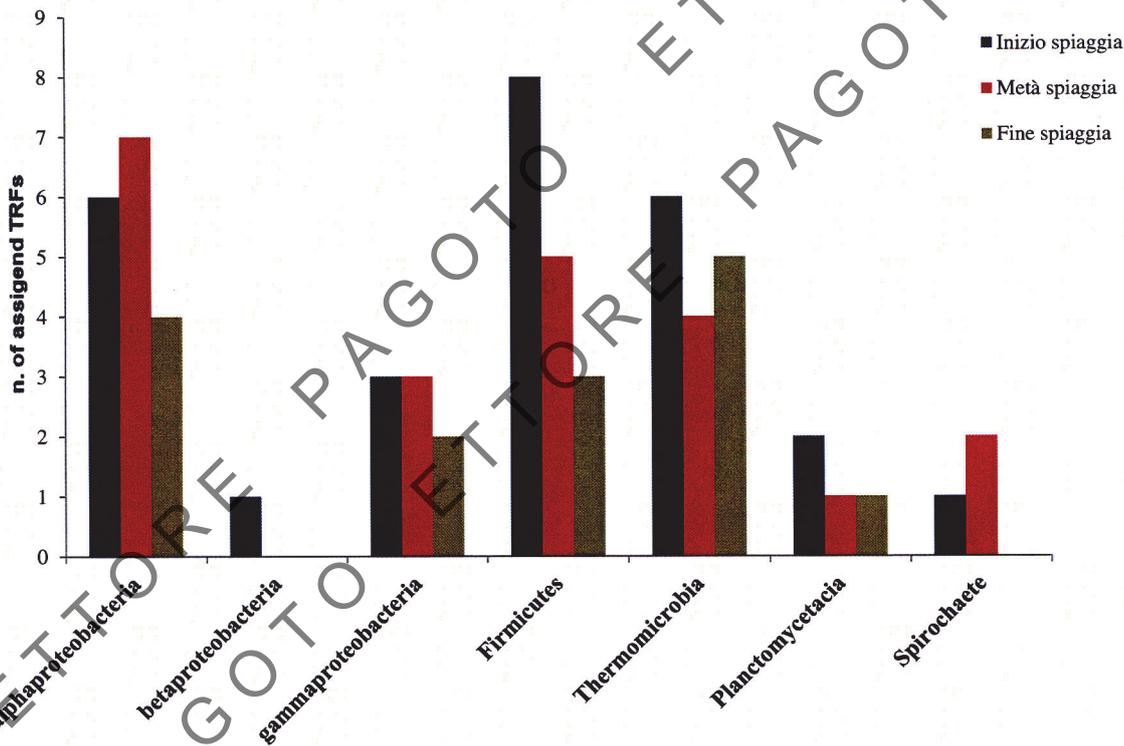


Figura24: Raggruppamento di classi di microrganismi in base ai profili T-RFLP su i tre transetti unità di misura (n.of assigeng TRFs)

Analisi metagenetica della spiaggia di “I FARAGLIONI “

Per la spiaggia dei “I Faraglioni”, data la sua posizione geografica, abbondanza di carbonio organico, si è valutata la composizione tassonomica in modo approfondito utilizzando la tecnica del sequenziamento metagenetico dell’amplificato del gene per il 16SrRNA. Inoltre la spiaggia dei “I Faraglioni” l’unica dei tre siti campionati ad essere più vicina ad una zona di riserva marina (B) che impone norme di sicurezza e tutela maggiore rispetto alle altre zone di riserva. Il risultato ottenuto, dopo l’assegnazione tassonomica delle sequenze (Figura 25), mostra una **Heat map** (43° convegno SIBM) della composizione tassonomica relativa rispetto alla distribuzione delle famiglie batteriche lungo il transetto mare-fine spiaggia. L’analisi mostra che i campioni di battigia sono più simili a quelli di metà spiaggia per composizione microbica. E’ interessante notare che il campione di fine spiaggia sia invece separato nettamente dagli altri due, inizio e metà spiaggia.

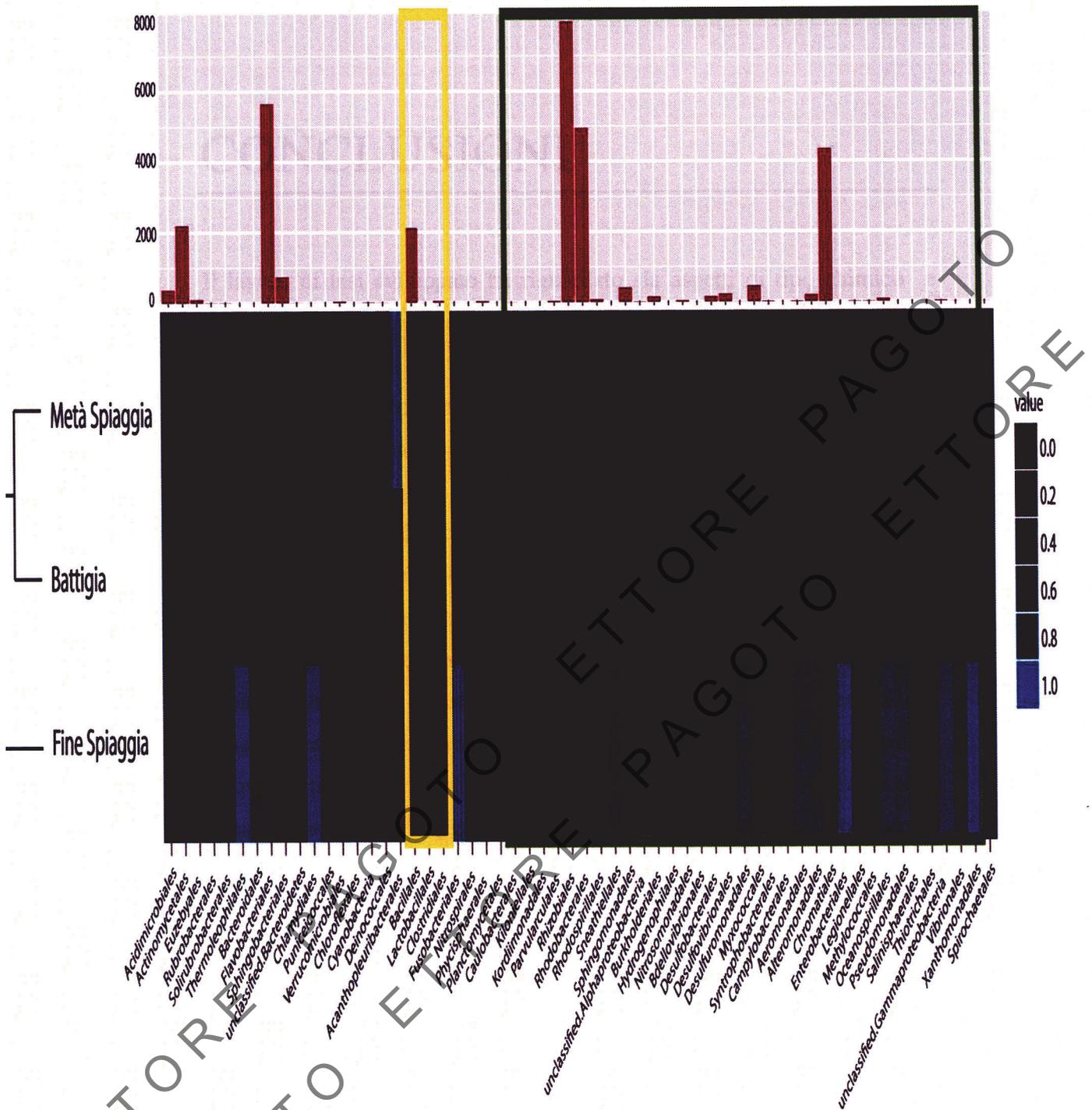


Figura25: HEAT MAP “Le barre dell’istogramma rappresentano l’abbondanza assoluta in giallo il phylum dei *Firmicutes*, in verde i *Proteobacteria*”

CONCLUSIONI

Il lavoro di tesi sviluppato ha riguardato sia aspetti di tipo chimico e fisico (granulometria, contenuto di acqua, contenuti di metalli, IPA e elementi minerali), sia aspetti di tipo microbiologico (composizione tassonomica delle comunità batteriche).

Per quanto riguarda le analisi dei metalli pesanti, si è evidenziato che tutte e tre le spiagge contengono alti livelli di Ferro e Alluminio, maggiori rispetto alle concentrazioni totali degli altri metalli pesanti. Ogni spiaggia risulta comunque avere concentrazioni differenti; la spiaggia del Lido Burrone è il sito campionato con minor concentrazione di metalli pesanti e minor presenza di carbonio organico. La spiaggia del paese risulta avere le concentrazioni più elevate di metalli pesanti, ciò possibilmente è da imputare ad attività da diporto e posizione geografica in quanto tutto attorno si sviluppa il centro urbano e la Tonnara. Inoltre questa spiaggia è soggetta a pochi scambi di correnti ed abbondanti spiaggiamenti di detriti e inquinanti disciolti in acqua a causa dell'insenatura portuale. La spiaggia dei Faraglioni, che per posizione risulta la più esposta a correnti e venti, ed è la più isolata e meno soggetta ad attività antropiche, risulta avere le maggiori concentrazioni di Carbonio organico mentre i metalli pesanti risultano minori rispetto a quelli del Paese ma maggiori della spiaggia del Lido Burrone. Nella spiaggia dei Faraglioni fa eccezione il Manganese, che rispetto agli altri metalli pesanti, risulta a concentrazioni maggiori in particolar modo a metà spiaggia.

Gli Idrocarburi policiclici aromatici (IPA), a differenza dei metalli, sono composti soggetti ad evaporazione, equilibri di scambio con acqua e aria, foto trasformazione. La spiaggia dei "I Faraglioni" risulta avere le più alte concentrazioni. Molto probabilmente questa zona che è area marina

protetta è comunque influenzata dall'impatto antropico a causa del trasporto di inquinanti ad opera di correnti marine favorevoli. Generalmente nella zona spira vento da Nord che muove le masse d'acqua e d'aria verso la battigia. L'analisi degli IPA permette, al di là della valutazione delle concentrazioni, di risalire, tramite lo studio di rapporti caratteristici, all'origine di questi stessi e di ottenere, quindi, un'indicazione circa le principali sorgenti d'inquinamento. Studi geochimici recenti hanno, infatti, permesso di calcolare il "fingerprint" di IPA di origine pirolitica o petrogenica che possono essere valutati da rapporti caratteristici tra specifici IPA. I criteri di scelta si basano sulla valutazione delle peculiarità nella composizione e distribuzione degli IPA come funzione delle loro sorgenti di emissione. Un valore del rapporto maggiore di 1 tra composti a basso peso molecolare (da 2 a 3 anelli) e alto peso molecolare (da 4 a 6 anelli) indica sorgenti petrogeniche. Studi di letteratura (Siere et al. 1987; Colombo et al. 1989; Budzinski et al. 1997; Baumard et al. 1998; Soclo et al. 2000; Magi et al. 2002) indicano una sorgente petrogenica quando il rapporto tra Fenantrene/Antracene assume valori >10 e pirolitica quando tale rapporto risulta <10 . Inoltre quando Fluorantene/ Pirene è >1 si ha indicazione di sorgenti pirolitiche mentre per valori <1 prevale una componente petrogenica. I valori calcolati in questo studio, e riportati in Tabella 13, mostrano per il primo rapporto una prevalenza della componente pirolitica e per il secondo una prevalenza della componente petrogenica. I risultati suggeriscono che tali sorgenti abbiano un peso simile e indicano come le attività di diporto possano influenzare significativamente le concentrazioni degli IPA determinati; infatti entrambe le sorgenti (petrogenica e pirolitica) possono essere legate al traffico navale e, in parte, a piccole attività edili che operano nella zona. Comunque si ribadisce che l'influenza antropica sulle spiagge considerate è bassa; infatti in zone più antropizzate e industrializzate le concentrazioni di IPA sono risultate di gran lunga superiori (www.provincia.livorno.it). I dati registrati in questo studio sono dello

stesso ordine di grandezza di quelli misurati in spiagge toscane a basso impatto antropico (Ugolini et al. 2012). Va ricordato che attualmente non è in vigore una normativa sulla concentrazione di metalli pesanti e microinquinanti organici per il sopralitorale. Per quanto riguarda le analisi microbiologiche, si è osservata la presenza di circa $1 \cdot 10^6$ UFC/g di sabbia, gran parte dei quali a lenta crescita (dopo 8 giorni), suggerendo la necessità di una riattivazione metabolica dei batteri presenti, o una comunità microbica composta in prevalenza da ceppi a lenta crescita (a selezione di tipo k). E' interessante notare che i titolimaggiore di unità formanti colonie si registrano a concentrazioni di salinità relativamente alte.

Dal punto di vista tassonomico l'analisi T-RFLP indica una notevole eterogeneità nella struttura tassonomica, pur in presenza di alcuni cluster formati dalle singole spiagge. Sono risultate notevoli anche le differenze tra campionamenti estivi ed invernali. Rispetto al grado di contaminazione delle spiagge, tuttavia non vi sono indicazioni di un potenziale effetto di riduzione delle biodiversità in spiagge soggette a maggiore pressione antropica. Questo ultimo punto andrà comunque meglio indagato con ulteriori campionamenti e confrontando un maggior numero di situazioni modello. L'analisi metagenetica ha permesso di identificare i gruppi batterici presenti lungo il gradiente dalla battigia alla parte superiore della spiaggia. In particolare sono risultati dominanti i *Proteobacteria* ed in particolare la classe degli *Alphaproteobacteria* e i *Firmicutes* che presentano anche le maggiori differenze lungo il transetto mare-terra. I risultati fin qui ottenuti indicano che il sistema spiaggia presenta un microbioma altamente complesso, anche in presenza di scarsità di nutrienti, acqua e alta salinità, come nei campioni di fine spiaggia. Restano da chiarire gli aspetti funzionali delle comunità batteriche identificate nei riguardi dei cicli dei nutrienti. Questi risultati possono avere implicazioni per chiarire gli aspetti di transizione tra spiaggia e suolo (es. colonizzazione vegetale della duna) e per modellizzare la desertificazione e salinizzazione dei suoli.

Bibliografia

1. Baumard P, B.H., Garrigues P, Sorbe JC, Burgeot T, Belloq J, (1998) Concentration of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* **36**, 951-960.
2. Budzinski H, J.I., Belloq J, Pierrad C, Garrigues P. (1997) Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* **58**, 85-97.
3. Colombo JC, P.E., Brochu C, Khalil M, Catoggio JA (1989) Determination of hydrocarbon sources using n-alkanes and polycyclic aromatic distribution indexes. Case study: rio de la plata Argentina. *Environ Sci Technol.***23**, 888-894.
4. Defeo Omar, A.M., David S. Schoemanc, Thomas A. Schlacherd, Jenifer Dugane, Alan Jonesf, Mariano Lastrag, Felicita Scapini (2009) Threats to sandy beach ecosystems: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **89**,1-12.
5. EEA, Stato e pressioni sull'ambiente marino e costiero del Mediterraneo, A.E. dell'Ambiente", Editor. 1999
6. Galgani F., Ellerbrake K., Fries E., Goreux C.(2011) «Marine pollution : let us not forget beach sand » *Environmental sciences europe* **23** -40
7. Gloor Gregory B, R.H., Jean M. Macklaim, Russell J. Dickson, Andrew D. Fernandes, Roderick MacPhee, Gregor Reid (2010) Microbiome Profiling by Illumina Sequencing of Combinatorial Sequence-Tagged PCR Products. *plouse one* **5**, 1-15.
8. Gobet A, S.I.B.e., Susan M Huse, Justus EE van Beusekom, Christopher Quince, Mitchell L Sogi, Antje Boetius, and Alban Ramette, (2012) Diversity and dynamics of rare and of resident bacterial populations in coastal sands. *The ISME Journal* **6**, 542-553.
9. Halpern Benjamin S, S.W., Kimberly A. Selkoe, Carrie V. Kappel, Fiorenza Micheli, Caterina D'Agrosa, John F. Bruno, Kenneth S. Casey, Colin Ebert, Helen E. Fox, Rod Fujita, Dennis

10. Heinemann, Hunter S. Lenihan, Elizabeth M. P. Madin, Matthew T Perry, Elizabeth R. Selig, Mark Spalding, Robert Steneck and Reg Watson, (2008) A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *science* **319**, 948-952.
11. Harry W. Seeley, j.P.J.V.J.J.L., Laboratorio di microbiologia, 1°edizione. 2005: Zanichelli.
12. Kannan Kurunthachalam , T.I., ‡ Alan L. Blankenship , † and John P. Giesy †, (1998) Isomer-Specific Analysis and Toxic Evaluation of Polychlorinated Naphthalenes in Soil, Sediment, and Biota Collected near the Site of a Former Chlor-Alkali Plant. *Environmental Science Technology* **32**, 2507-2514.
13. Llobet-Brossa E, R.-M.R., Amann R (1998) Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and environmental microbiology* **64**, 2691-2696
14. Magi E, B.R., Ianni C, Di Carro M, (2002) Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. *Environmental Pollution* **119**, 91-98.
15. McLachlan A, A.C.B., Alexander Claude Brown, (2006) *The Ecology of sandy shores*, ed. A.P. Copyright. Elsevier.
16. Mengoni A, B.G., Pagoto E, Ugolini A. (2012) Caratterizzazione delle comunità microbiche di spigge sabbiose dell'Isola di Favignana (Egadi, TP), in 43 Congresso della Società Italiana di Biologia Marina- Marina di Camerota (SA).
17. Mengoni A, G.E., Bazzicalupo M, (2007) Application of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) for Molecular Analysis of Soil Bacterial Communities. *Advanced Techniques in Soil Microbiology Soil Biology* **11**, 295-305.
18. Mengoni A., S.A.(2008) *La PCR e le sue varianti*, ed. c. manuali-scienze
19. Ministero D.M. del 13/09/99, G.U.n.d., *Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo*, M.p.l.P. Agricole, Editor. 1999.
20. Nordstrom, (2002) Worldwide Occurrences of Arsenic in Ground Water. *Science* **296**, 2143-2145.

21. Ruffo, Quaderni habitat "Dune e spiagge sabbiose" (2008) Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare Museo Friulano di Storia Naturale - Comune di Udine.
22. Schlacher, T.A.S., J. Dugan, D.S. Schoeman, M. Lastra, A. Jones, F. Scapini, A. McLachlan, O. Defeo, (2007) Sandy beaches at the brink. *Diversity and Distribution* **13**, 556-560.
23. Schlacher, T.A.S., L.M.C. Thompson, S. Price (2007) Vehicles versus conservation of invertebrates on sandy beaches: quantifying direct mortalities inflicted by off-road vehicles (ORVs) on ghost crabs. *Marine Ecology* **28**,354–367.
24. Sicre MA, M.J., Saliot A, Aparicio X, Grimalt J, Albaiges J, (1987) Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: occurrence and origin. *Atmos Environ* **21**, 2247-2259.
25. Soclo HH, G.P., Ewald M (2000) Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Mar Pollution Bulletin* **40**, 387-396.
26. Ugolini A, B.B., Calosi P, Bazzicalupo M, Chelazzi G , Focardi S.(2004) Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin* **48**, 526-532
27. Ugolini A, B.B., Focardi F, Chelazzi G. (2005) Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugolini* Bellan Santini and Ruffo. *Marine Pollution Bulletin* **50**, 1328–1334.
28. Ugolini A, P.G., Focardi S, Somigli S, Martellini T, Cincinelli A. (2012) Sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) as a Bioindicator of Contamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **89**, 1272-1276.
29. Ugolini A, Ungherese G (2012) Sandhoppers as bioindicators of anthropogenic influence on mediterranean sandy beaches. In: Stambler N (ed) *Life in the Mediterranean Sea: a look at habitat changes*, Environmental Science Engineering and Technology Ser. Nova Science Publ, New York,413–443
30. UNCED, U.N.C.o.E.a.D., Declaration, in United Nations Conference on Environment and Development, Declaration. 1992

31. Vannini M, C.G.(1985) Adattamenti comportamentali alla vita intertidale tropicale. *Oebalia NS* **11**, 23-37

Sitografia

www.wikipedia.org/wiki/United_Nations_Conference_on_Sustainable_Development

www.europa.eu.int

www.provincia.livorno.it

“Convegno Movimentazione materiali in ambiente marino o in zone ad esso contigue”

www.ncbi.com

www.lennotech.it

www.ampisoleegadi.it

www.favignana.com

www.minambiente.it

Allegato A

Nome	EPA Priority Pollutans	Cancerogeno per l'uomo (IARC, 2008)	Cancerogeno negli alimenti (EFSA, 2008)
Benzo(a)pirene			
Ciclopenta(c,d)pirene			
Dibenzo(a,h)antracene			
Dibenzo(a,l)pirene			
Benzo(j)aceantrilene			
Benzo(a)antracene			
Benzo(b)fluorantene			
Benzo(j)fluorantene			
Benzo(k)fluorantene			
Benzo(c)fenantrene			
Crisene			
Dibenzo(a,h)pirene			
Dibenzo(a,i)pirene			
Indeno(1,2,3,c,d)pirene			
5-metilcrisene			
Benzo(g,h,i)perilene			
Antracene			
Acenaftene			
Acenaftilene			
Fluorantene			
Fluorene			
Naftalina			
Fenantrene			
Pirene			

1 - cancerogeno dimostrato per l'uomo
2A - cancerogeno probabile per l'uomo
2B - cancerogeno possibile per l'uomo

(IARC, 2008; Allegato A)

RINGRAZIAMENTI

Il principale ringraziamento è rivolto alla direzione dell'**Area Marina Protetta delle Isole Egadi** per l'autorizzazione ai campionamenti ed il supporto logistico in loco, ed il Comune di Favignana; al Prof. Ugolini Alberto e al Dott. Mengoni Alessio per aver messo a mia disposizione la loro esperienza, non soltanto in relazione a questo lavoro di tesi, ma in tutte le occasioni di confronto scientifico-culturale; alla Dott.ssa Martellini Tania, Dott.ssa Cincinelli Alessandra per la disponibilità concessami per poter apprendere al meglio metodologie di analisi di laboratorio molto complesse.

Inoltre intendo ringraziare CIBM (Livorno) per le analisi dei metalli pesanti, Dott. Passaponti Maurizio per le analisi sul carbonio organico e totale, il Prof. Vannocci Pietro per le analisi sulla granulometria.

Un ringraziamento per aver reso piacevole ogni giorno passato in laboratorio e avermi aiutato lì dove incontravo delle difficoltà a Francesco Pini, Marco Galardini ed in particolar modo a Giovanni Bacci per aver contribuito in maniera sostanziale allo sviluppo dei dati metagenomici.