UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E
TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

Dottorato di Ricerca in Ambiente e Territorio
(XXII CICLO)

Antonio Bucci

"ANALISI E CARATTERIZZAZIONE DELLA *FACIES* MICROBICA IN ACQUE SOTTERRANEE"

Tutor: prof. Gino Naclerio
Co-tutor: prof. Fulvio Celico

Coordinatore del Dottorato: prof. Fulvio Celico

Commissione:

prof. Maurilio De Felice (Presidente)
prof. Gino Naclerio
dott. Ermanno Federici

Anno Accademico 2008/2009

ANALISI E CARATTERIZZAZIONE DELLA *FACIES* MICROBICA IN ACQUE SOTTERRANEE

Antonio Bucci

Laureato c/o Università degli Studi del Molise
Anno Accademico 2005-2006

TESI PRESENTATA PER IL CONSEGUIMENTO
DEL DOTTORATO DI RICERCA IN

AMBIENTE E TERRITORIO
XXII Ciclo

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE

Tutor: prof. Gino Naclerio Co-Tutor: prof. Fulvio Celico

Coordinatore del Dottorato: prof. Fulvio Celico

Commissione:
prof. Maurilio De Felice (Presidente)
prof. Gino Naclerio
dott. Ermanno Federici

INDICE

1 INTRODUZIONE pag. 3

1.1 Composizione, struttura e dinamica delle comunità microbiche pag. 4

1.2 Lo studio delle comunità microbiche pag. 5

1.3 Le comunità microbiche come traccianti naturali nello studio di dinamiche idrogeologiche pag. 6

1.4 DGGE [*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*] pag. 8

1.5 T-RFLP [*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*] pag. 11

1.6 L'RNA ribosomale 16S pag. 16

2 MATERIALI E METODI pag. 18

2.1 Area campione di "Acqua dei Faggi" pag. 18

2.1.1 Procedura di campionamento pag. 19

2.2 Area campione dell'"Isola d'Ischia" pag. 21

2.2.1 Procedura di campionamento pag. 21

2.3 Area campione di "Pozzo del Sale" pag. 23

2.3.1 Procedura di campionamento pag. 23

2.4 Estrazione degli acidi nucleici pag. 26

2.5 PCR dei campioni per DGGE pag. 27

2.6 DGGE pag. 28

2.7 Reazione di ligazione pag. 29

2.8 Preparazione di cellule di *E. coli* competenti pag. 30

2.9 Trasformazione di cellule competenti di *E. coli* pag. 31

2.10 PCR ed analisi T-RFLP per i *Bacteria* pag. 32

2.11 PCR ed analisi T-RFLP per gli *Archaea* pag. 33

2.12 Elaborazione dei dati T-RFLP pag. 34

3 RISULTATI DELLE ANALISI BIOMOLECOLARI pag. 35

3.1 Area campione di "Acqua dei faggi" pag. 35

3.2 Area campione dell'"Isola d' Ischia" pag. 37

3.3 Area campione di "Pozzo del Sale" pag. 41

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI pag. 46

5 BIBLIOGRAFIA pag. 50

ALLEGATO A pag. 59

RINGRAZIAMENTI pag. 65

1 INTRODUZIONE

Per definire una comunità microbica occorre innanzitutto soffermarsi su quella che è una caratteristica comune alle problematiche ecologiche e cioè il livello d'indagine.
L'indagine biologica può infatti essere svolta su più livelli: da quello molecolare a quello cellulare, dal livello dell'organismo (multicellulare), alla popolazione di organismi, per arrivare poi al livello di comunità.

Ogni livello dipende, per molte delle sue proprietà, da quelli sottostanti; ad esempio, una cellula manifesterà l'insieme delle caratteristiche date dai suoi componenti molecolari, un organismo quelle date dalle sue cellule e una comunità quelle date dalle popolazioni. Tuttavia ogni livello presenta anche caratteristiche peculiari che non vengono rivelate dall'analisi delle singole componenti e sono dovute all'interazione tra le componenti del sistema. Queste caratteristiche sono spesso biologicamente molto importanti per il funzionamento del sistema (basti pensare che in alcuni casi la degradazione della sostanza organica viene svolta da consorzi di popolazioni di specie diverse in cui le singole specie non possono però portare avanti da sole l'intero processo) e sono quindi necessari degli strumenti di analisi specifici per il livello di complessità biologica che si vuole indagare.

Questo dato è il fattore trainante nello sviluppo di metodologie sempre più nuove e sofisticate che permettano lo studio sia dei singoli componenti sia dell'insieme delle comunità microbiche in una visione al contempo riduzionista e olista della problematica biologica. In effetti negli ultimi anni si è sviluppato un grande interesse per i risvolti ecologici dello studio dei microrganismi, per il ruolo centrale che questi svolgono in un numero estremamente elevato di processi, sia a livello della biosfera (cicli biogeochimici) che a quello applicativo ed industriale (depurazione, biotecnologie, produzione di alimenti).

1.1 Composizione, struttura e dinamica delle comunità microbiche

Per avere un quadro ben definito del grado di biodiversità esistente all'interno di una comunità microbica naturale è necessario non solo determinarne il numero e la frequenza relativa delle specie presenti, ma anche la distribuzione degli individui all'interno delle varie specie, cioè la sua struttura, il numero e la frequenza relativa di ceppi appartenenti alla stessa specie. In generale la struttura di una popolazione microbica può variare da clonale a panmittica.

Una struttura clonale è la conseguenza di una riproduzione asessuata, in assenza di variazioni genetiche. In questo modello, ogni membro della popolazione è genotipicamente identico alla cellula madre, e i cambiamenti genetici, qualora insorgessero, sono limitati ad alcune cellule. Un modo molto semplice per descrivere la struttura clonale di una specie microbica è quello di considerare una popolazione come un insieme di cloni, ossia di linee cellulari a riproduzione asessuata. Tuttavia, può verificarsi la comparsa di un clone diverso (genotipo mutato) a causa di una o più mutazioni che intervengono su una cellula. Se il genotipo mutato ha una maggiore capacità di adattamento all'ambiente rispetto al genotipo originario, può accadere che esso abbia il sopravvento su quest'ultimo, fino a rimpiazzarlo completamente. La comparsa di genotipi mutati può avvenire più volte all'interno della stessa popolazione, ma se non si verificano scambi di materiale genetico, mediante coniugazione, trasformazione o trasduzione, tra una cellula e l'altra, le differenze tra un clone e l'altro saranno ridotte.

Uno scenario più complesso si prospetta invece nel caso in cui vi sia trasferimento genico orizzontale tra i vari individui della popolazione. Se, infatti, in una popolazione microbica si verificano con una certa frequenza eventi di trasferimento genico orizzontale che hanno come effetto finale la ricombinazione tra il DNA donatore e quello ricevente della cellula ospite, in assenza di una selezione naturale che favorisca specifiche associazioni di geni, le differenze tra i vari cloni saranno più marcate.

In generale, quindi, una popolazione non clonale (panmittica) è dovuta alla frequente ricombinazione genetica (scambi sessuali) che avviene tra il genoma dei suoi membri. Tuttavia, all'interno di una popolazione di questo tipo, possono comparire cloni particolari, come i cloni epidemici, che sono la conseguenza transitoria di una rapida espansione clonale.

I microrganismi che vivono negli ambienti naturali possono presentare l'una e l'altra condizione (popolazione panmittica o clonale) a seconda della specie e della situazione ambientale stessa.

1.2 Lo studio delle comunità microbiche

Le procedure "*standard*" di analisi delle comunità microbiche, o "metodi classici", prevedono l'identificazione dei microrganismi attraverso l'isolamento di colture pure, seguito da test che analizzano alcune caratteristiche morfo-fisiologiche e biochimiche. Queste analisi non sono sufficienti per l'identificazione della maggior parte delle specie di microrganismi e inoltre sono limitate alle specie coltivabili che rappresentano una piccolissima percentuale di tutte le specie presenti in natura. Questi test inoltre presentano il grave limite di richiedere un notevole dispendio di tempo. Nel corso degli ultimi decenni, le ricerche nel campo della microbiologia ambientale hanno dimostrato che le comunità microbiche svolgono un ruolo funzionale di controllo degli ecosistemi che non é riconducibile a singole specie ma alle comunità stesse intese come "unità funzionali". Questa attività funzionale delle comunità microbiche é, in molti casi, responsabile di processi importanti per l'uomo, tra cui la biodegradazione dei rifiuti di origine umana negli impianti di trattamento dei reflui e nelle discariche, il compostaggio ed, in generale, tutti i processi in cui avvengono trasformazioni chimiche delle sostanze prodotte dalle attività antropiche. Conoscere l'evoluzione delle comunità microbiche nel loro insieme, significa quindi anche conoscere meglio le dinamiche che regolano questi processi fondamentali per lo sviluppo sostenibile delle comunità umane. Per questi motivi, sono state sviluppate nuove metodologie (tra cui la DGGE e la T-RFLP) che hanno permesso di analizzare la struttura delle comunità microbiche indipendentemente dalla fase d'isolamento, allo scopo di caratterizzarle (nel loro insieme) e di seguirne le dinamiche. Queste tecniche, che si basano sullo studio di biomolecole prodotte dai microrganismi, hanno affiancato e in parte soppiantano quelle classiche basate sull'isolamento di colture pure (Head et al., 1998).

1.3 Le comunità microbiche come traccianti naturali nello studio di dinamiche idrogeologiche

Una comunità microbica è funzione dei caratteri chimico-fisici di un determinato ambiente. Lo studio di tali comunità, mediante l'applicazione di moderne tecniche di biologia molecolare (come, ad esempio, la DGGE [*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*] e la T-RFLP [*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*]), può quindi fornire indicazioni interessanti nell'analisi di alcune dinamiche idrogeologiche. Recentemente, tali tecniche sono state applicate per analizzare il rapporto esistente tra variazioni dei caratteri fisico-chimici lungo il Fiume Danubio e variazioni delle comunità microbiche acquatiche (Winter et al., 2007). Tale studio ha dimostrato che, quanto meno nel caso in esame, le comunità microbiche risultano un buon tracciante della diversificazione fisico-chimica accertata lungo l'intero corso del fiume. Per quanto riguarda invece le acque sotterranee, fino ad ora sono stati sviluppati pochissimi studi che mirano a verificare la potenzialità delle comunità microbiche nell'analisi di dinamiche idrogeologiche. In particolare, un primo studio (Farnleitner et al., 2005) è stato condotto in due acquiferi carbonatici alpini, al fine di verificare se le comunità microbiche delle acque sorgive potessero essere considerate dei traccianti affidabili dei rispettivi caratteri geolitologici e idrogeologici. Ne è risultato che le due sorgenti analizzate, una alimentata da un acquifero dolomitico ed una alimentata da un acquifero calcareo, sono caratterizzate da comunità microbiche distinte e, quindi, peculiari dei due diversi sistemi acquiferi. Ancor più di recente, è stato condotto un secondo studio su un acquifero carbonatico svizzero (Pronk et al., 2009), finalizzato ad analizzare la potenzialità delle comunità microbiche, quali traccianti dei rapporti di interazione tra corpi idrici superficiali e corpi idrici sotterranei, in acquiferi in cui i sistemi carsici fungono da punti di immissione nel sottosuolo di acque di ruscellamento. Anche in questo caso, i risultati ottenuti dall'applicazione di tecniche di biologia molecolare, messi a confronto con quelli ottenuti dall'applicazione dei classici approcci idrogeologici e idrogeochimici, hanno dimostrato che le comunità microbiche possono essere un ottimo tracciante per analizzare il contributo, alla ricarica della falda, legato alle acque superficiali che si infiltrano nel sistema carsico.

I risultati degli studi finora condotti in tal senso, e sintetizzati in precedenza, conducono ad affermare che le comunità microbiche possono costituire un valido tracciante naturale delle dinamiche idrogeologiche, ma non sussistono ancora gli elementi sperimentali sufficienti per comprendere rispetto a quante e quali dinamiche, in quanti e quali contesti tale validità può essere estesa.

L’obiettivo del seguente lavoro è stato analizzare e caratterizzare le comunità microbiche presenti nell'acquifero carbonatico di "Acqua dei Faggi" (IS), nel sistema idrotermale dell'isola d'Ischia (NA) e nelle acque saline del sito "Pozzo del Sale" nel comune di Grottolella (AV), nonché verificare sperimentalmente se le suddette comunità possono essere utilizzate efficacemente come nuovi traccianti naturali per studiare alcune dinamiche idrogeologiche degli acquiferi in questione.

La affidabilità dei risultati ottenuti mediante l’applicazione delle tecniche di biologia molecolare DGGE e T-RFLP, è stata verificata confrontando questi ultimi con quelli ottenuti mediante indagini idrogeologiche, geofisiche, geochimiche e di geochimica isotopica.

Le analisi biomolecolari mediante T-RFLP sono state effettuate presso il Dipartimento di Microbiologia dell'Università Eötvös Loránd di Budapest.

1.4 DGGE [*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*]

L' elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE) è una tecnica di separazione elettroforetica, recentemente introdotta nell'ambito della biologia molecolare, impiegata per la separazione e l'analisi di frammenti di DNA che differiscono nella sequenza nucleotidica anche di una sola coppia di basi. Nelle elettroforesi classiche condotte su gel di agarosio o acrilammide, i frammenti di DNA vengono separati in base al peso molecolare; la velocità di corsa diminuisce parallelamente all'incremento di lunghezza del frammento. Al contrario, nella DGGE frammenti di DNA di pari peso molecolare sono separati in base al *pattern* di denaturazione (Lerman et al., 1984). La presenza di calore o denaturanti chimici consente la denaturazione dei due filamenti costituenti una molecola di *double-stranded* DNA (dsDNA). Temperatura e concentrazione di denaturante a cui si verifica la separazione dei due filamenti, dipendono fortemente dalla sequenza del frammento stesso. In particolare, i fattori determinanti sono: quantità di legami idrogeno che si instaurano tra basi complementari e tipo di interazioni che si stabiliscono tra basi adiacenti sullo stesso filamento (*stacking interaction*). Una molecola di DNA possiede, quindi, domini (*domains*) con temperature di fusione (*melting*) o Tm caratteristiche, determinate dalla sequenza nucleotidica. Frammenti di DNA pressoché identici in peso molecolare, ma che differiscono anche per un singolo nucleotide, possono essere caratterizzati da Tm e *melting domains* diversi tra loro.

L'analisi DGGE viene condotta su gel di poliacrilammide contenente un gradiente denaturante in modo tale che il dsDNA sia soggetto, durante la corsa, ad un aumento nelle condizioni di denaturazione con conseguente separazione in corrispondenza dei *melting domains*. Nella parte superiore del gel, dove si hanno condizioni di denaturazione blanda, i *melting domains* a Tm inferiori iniziano a denaturarsi parzialmente, creando molecole ramificate con mobilità minore.

L'incremento nelle condizioni di denaturazione lungo il gel di poliacrilammide può determinare la totale dissociazione dei frammenti parzialmente denaturati in *single-stranded* DNA (ssDNA).

Sperimentalmente, la completa dissociazione dei due filamenti di dsDNA viene ostacolata mediante introduzione, all'estremità di ciascun filamento, di domini caratterizzati da alto contenuto in G+C ed alte Tm. La formazione di 3 legami a idrogeno in una coppia di basi GC, a differenza dei 2 presenti in una coppia AT, implica la necessità di raggiungere una temperatura o una concentrazione di denaturante chimico più elevata, per ottenere la rottura di tali legami. Regioni G+C-*rich* vengono create artificialmente ad una estremità del dsDNA mediante incorporazione di una GC-*clamp* durante le reazioni di amplificazione. L'incorporazione della

GC-*clamp* è resa possibile dall'utilizzo di *primers* caratterizzati da una sequenza di circa 30-40 GC all'estremità 5'. La regione di dsDNA così ottenuta, stabile anche a forti condizioni di denaturazione, si comporta al pari di un vero e proprio morsetto, impedendo la dissociazione completa dei frammenti in ssDNA. La presenza della GC-*clamp* di ugual sequenza all'estremità di ciascuna molecola fa sì che le differenze tra i profili di corsa dei frammenti analizzati, siano principalmente determinate da variazioni nella sequenza dei *low melting domains* (Figg. 1, 2).

Poiché la Tm è determinata dalla sequenza nucleotidica, la presenza di una singola mutazione è capace di generare un profilo di denaturazione diverso e, conseguentemente, una diversa corsa elettroforetica: quindi la ricorrenza di polimorfismi in geni altamente conservati può essere analizzata mediante DGGE e può fornire informazioni utili per caratterizzare la struttura delle comunità microbiche. Infatti, con l'elettroforesi su gel in gradiente denaturante si ottiene un profilo elettroforetico formato da una serie di bande in cui, in prima approssimazione, il numero di bande è proporzionale al numero di specie presenti e la posizione di ogni banda è diversa per ogni specie.

La tecnica DGGE fornisce, quindi, un semplice approccio per ottenere profili di comunità microbiche che possono essere utilizzati per identificare differenze spaziali e temporali nella struttura delle comunità o per monitorare variazioni nella struttura che occorrono in risposta a perturbazioni ambientali.

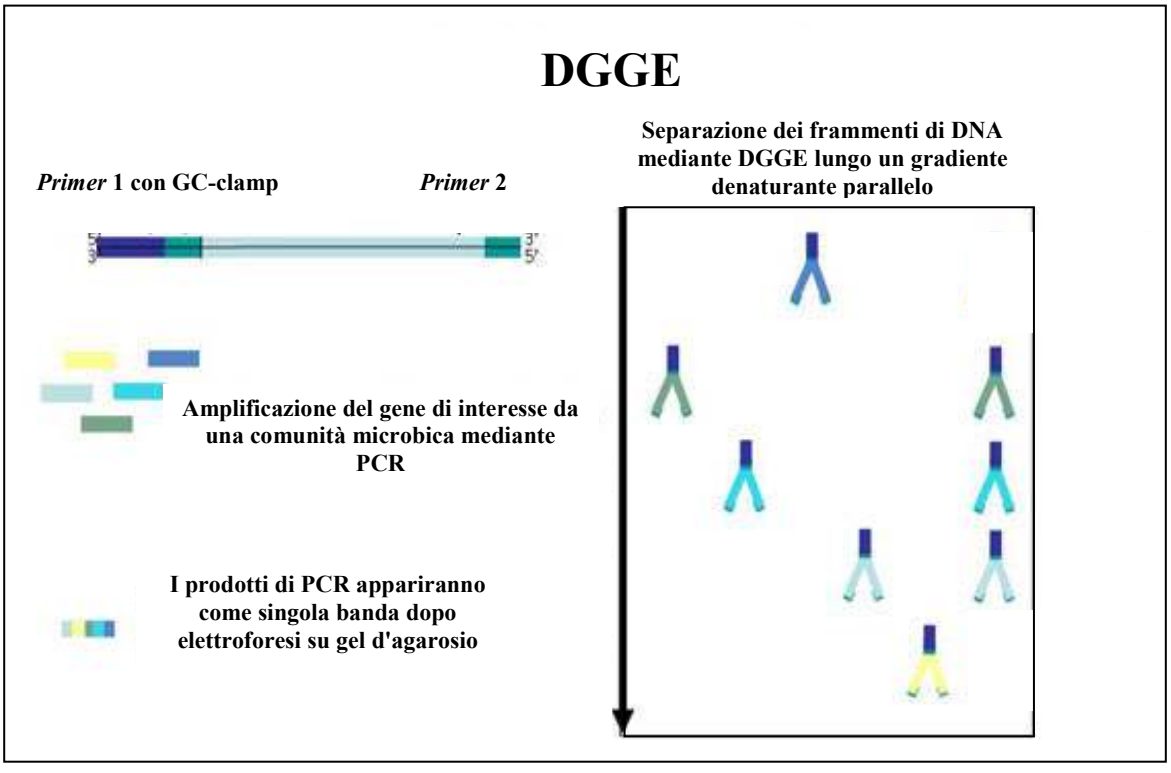

Figura 1. Rappresentazione schematica della tecnica DGGE.

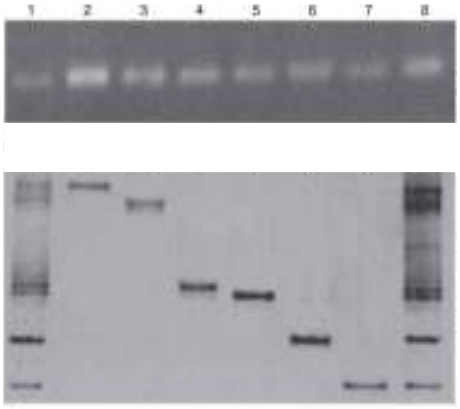

Figura 2. Separazione mediante DGGE di frammenti di DNA della stessa dimensione (evidenziati come singola banda dopo elettroforesi su gel d'agarosio, parte superiore dell'immagine) ma con differente sequenza nucleotidica (parte inferiore dell'immagine).

La PCR-DGGE è stata utilizzata, per la prima volta nel 1993, in studi di ecologia microbica (Muyzer et al., 1993). Oggi, vi è un'ampia letteratura sull'impiego di questa metodologia in campo microbiologico. Tra le applicazioni più recenti di questa tecnica alcune sono state rivolte a studiare la struttura e l'evoluzione di comunità microbiche nel suolo (Norris et al., 2002; Avrahami et al., 2003; Nicol et al., 2003); in acque di mare (Bano & Hollibaugh, 2002), fiume (Sekiguchi et al., 2002), e lago (Crump et al., 2003); nel tratto gastrointestinale (Zoetendal et al., 2002); in bioreattori per il trattamento di acque di scarico (Gray et al., 2002; Stamper et al., 2003); e in campioni clinici (Burton et al., 2003; Donskey et al., 2003; Mc Bain et al., 2003). La PCR-DGGE è anche utilizzata per l'identificazione e la tipizzazione di forme microbiche (Nielsen et al., 2000; Theelen et al., 2001; Gurtler et al., 2002) e in ambito di microbiologia degli alimenti. Alcuni ricercatori hanno esaminato la successione microbica durante la produzione artigianale di formaggio siciliano, mentre altri hanno studiato mediante PCR-DGGE e sequenziamento delle regioni V3 e V4-V5 del 16S rDNA la struttura della comunità batterica presente nel formaggio Stilton (Randazzo et al., 2002, Ercolini et al., 2003). Una combinazione di *multiplex* PCR e DGGE è stata utilizzata per monitorare le specie di *Lactobacillus* associate con il lievito naturale (Settanni et al., 2006). Infine, è stato sviluppato un protocollo di PCR-DGGE, basato sul gene *rpoB*, per il rilevamento e l'identificazione di *Yersinia* spp. negli alimenti, fornendo risultati in tempi molto più rapidi (24-36 ore) rispetto ai metodi tradizionali (7-28 giorni) (Cocolin & Comi, 2005).

1.5 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 è in grado di rilevare differenze anche minime tra ceppi, consentendo la comprensione della struttura e l'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. 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 poliacrilammide o con sistemi basati sull'elettroforesi capillare con rilevamento automatico dei frammenti marcati di DNA mediante laser (Fig. 3).

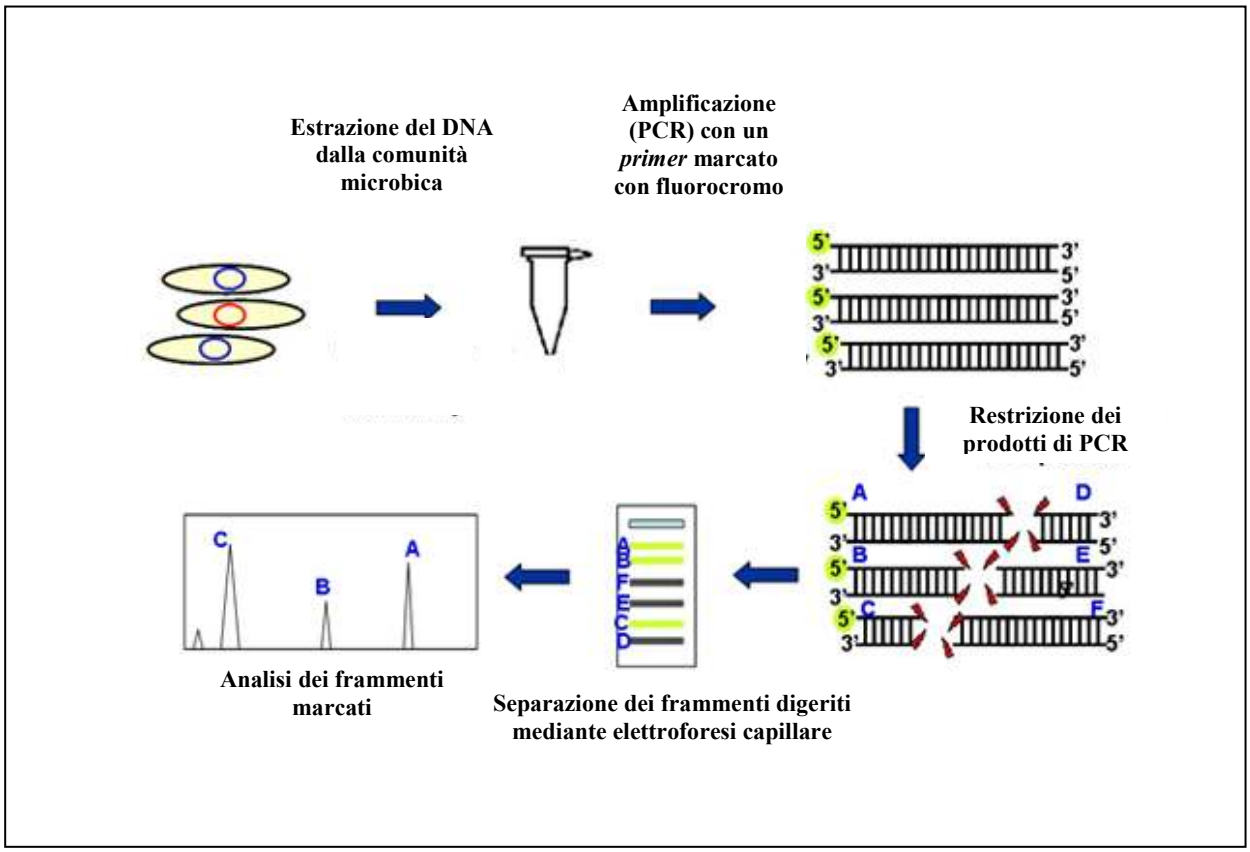

Figura 3. Schema del metodo Terminal-Restriction Fragment Lenght Polymorphism (T-RFLP).

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.

Nella figura 4 si possono notare tre *set* di picchi: il primo di colore rosso, rappresenta il *marker* standard interno, mentre gli altri due indicano i frammenti di restrizione terminali (T-RFs) dei prodotti di digestione (in blu quelli corrispondenti all'estremità 5'del prodotto di amplificazione e in verde quelli corrispondenti all'estremità 3').

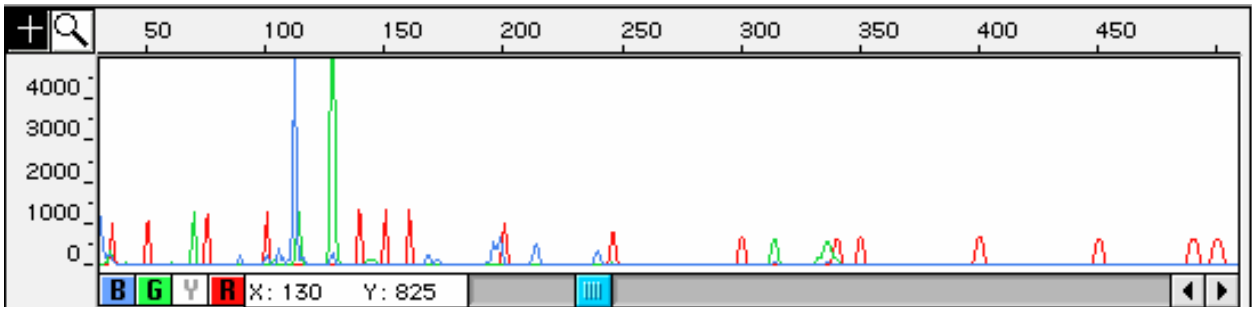

Figura 4. Esempio di elettroferogramma ottenuto mediante analisi TRFLP.

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 (Suzuki & Giovannoni, 1996). 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 (Suzuki et al., 1998). 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.

L'analisi T-RFLP è soggetta a tutte le interferenze caratteristiche degli approcci sperimentali che prevedono un'amplificazione del DNA; è stato osservato che anche in una semplice comunità artificiale, una interferenza nell'amplificazione di particolari sequenze,

causata dall'*annealing* preferenziale di alcune coppie di *primers*, o da un incremento nell'incidenza di prodotti di PCR chimerici in relazione all'aumento del numero di cicli di PCR, può ridurre la qualità delle predizioni quantitative (Osborn et al., 2000). Altre potenziali complicazioni possono essere associate con la PCR; DNA batterico contaminante all'interno dei reagenti di amplificazione della PCR, della Taq polimerasi o anche nei tubi di PCR possono portare a risultati falsi positivi a causa dell'amplificazione di molecole di DNA non correlate con le sequenze bersaglio. In più, amplificazioni da stampi batterici misti possono dar luogo alla formazione di artefatti molecolari che non corrispondono a geni microbici esistenti in natura. Inoltre c'è la possibilità di ottenere risultati falsi negativi dovuti alla presenza di sostanze inibitrici presenti nella soluzione di reazione (Kolbert & Persing, 1999). Pertanto è necessario ridurre al minimo e definire chiaramente la quantità di variabili sperimentali inerenti ai metodi basati sulla PCR. 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* (Osborn et al., 2000). Usando un sistema di elettroforesi capillare (come ad esempio il sistema ABI PRISM 310) con un meccanismo automatico di caricamento del campione (caricamento elettro-cinetico), il grado di variabilità tra corse replicate dello stesso campione risulta molto minore che in sistemi manuali con gel di poliacrilammide. La differenza maggiore che si osserva in analisi replicate dello stesso campione utilizzando un sistema di caricamento manuale su gel, è una diminuzione generale dell'ampiezza di tutti i picchi, con la scomparsa, in alcuni casi, dei picchi minori. Questo è dovuto al fatto che errori di caricamento possono determinare variazioni nella quantità totale del campione che si intende analizzare. Infine, l'analisi T-RFLP prevede la presenza in ogni campione di uno standard interno, anch'esso fluorescente, che permette di quantificare variazioni in termini di dimensioni in basi dei T-RFs e variazioni nelle proporzioni relative di ciascun T-RF nel profilo di una comunità microbica. Questo tipo di tecnologia fa sì che si possano ottenere profili con un alto grado di riproducibilità.

La tecnica T-RFLP è rapida e sensibile e può essere utilizzata per l'identificazione di ceppi batterici, per l'analisi comparativa di comunità e per ottenere una stima della diversità filogenetica all'interno di una comunità. Grazie alla grande capacità di produzione e al supporto dei *database* di sequenza, tale tecnica si dimostrerà sempre più preziosa nell'analisi comparativa di comunità. Inoltre, livelli crescenti nella dissezione di comunità microbiche possono essere ottenuti con l'uso sistematico nel protocollo T-RFLP di *primers* filogeneticamente specifici. I dati T-RFLP, se utilizzati insieme a quelli sulla diversità e distribuzione di *marker* fisiologici fondamentali, o a quelli chimico-fisici che descrivono un particolare ecosistema, possono fornire

un livello di comprensione profonda della struttura e della funzione di una comunità microbica (Marsh, 1999). Il dettaglio delle informazioni fornite (per esempio, la dimensione espressa in bp dei T-RFs) permette il confronto tra i profili di restrizione ottenuti da metagenoma o da DNA di singoli isolati e le informazioni presenti nei *database* di predizione di T-RFs "in silico", aprendo la possibilità di assegnazioni filogenetiche immediate a partire dall'analisi del T-RFLP (Osborn et al., 2000).

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.

Vi è una vasta letteratura sull'utilizzo del T-RFLP per lo studio di comunità batteriche. Horz et al. (2004) mediante analisi T-RFLP hanno esaminato la risposta di batteri che ossidano l'ammonio (AOB) nei confronti di incrementi contemporanei di: anidride carbonica atmosferica, precipitazione, temperatura e deposizione di composti contenenti azoto. In questo lavoro è stato osservato che la comunità microbica può subire delle alterazioni significative per effetto di cambiamenti globali con implicazioni rilevanti sulla funzione dell'ecosistema.

Pester et al. (2004) mediante analisi T-RFLP del gene *pmoA*, hanno studiato la diversità e la struttura della comunità di batteri che ossidano il metano, presente nei sedimenti del litorale del lago di Costanza. I profili T-RFLP hanno indicato una elevata similarità tra la comunità attiva presente nello strato ossico e quella inattiva presente nello strato anossico a 10 cm di profondità. Inoltre, non sono stati osservati grandi variazioni nella struttura della comunità presente in sedimenti prelevati nel periodo estivo ed in quello invernale. Sono state invece osservate notevoli differenze nella struttura della comunità presente nei sedimenti dello strato superficiale ed in quello più profondo. Peréz-Jiménez e Kerkhof (2005) hanno esaminato la comunità di batteri che riducono il solfato, mediante analisi T-RFLP del gene *dsrAB*, che codifica per la solfito reduttasi. Edlund et al. (2006) hanno studiato la struttura della comunità microbica in sedimenti inquinati del Mar Baltico, mentre Moss et al. (2006) hanno analizzato la stabilità temporale ed i cambi dei gruppi filogenetici dominanti del dominio *Bacteria* in una comunità di biofilm presente negli estuari. L'alternanza della dominanza di gruppi filogenetici tra le varie stagioni è risultata associata a cambi stagionali nella temperatura, nella disponibilità di nutrienti e nella luce. La struttura della comunità è apparsa essere stabile durante questi periodi malgrado i cambi di salinità e ossigeno disciolto. Hoshino et al. (2005) hanno dimostrato che l'analisi T-RFLP è una metodica appropriata per il monitoraggio quotidiano delle comunità microbiche coinvolte nei processi di trattamento delle acque reflue. È stato osservato, in particolare, che batteri appartenenti ai generi *Hydrogenophaga* e *Acidovorax* aumentano in numero dopo l'inizio della denitrificazione. L'analisi T-RFLP è stata utilizzata da Saikaly et al.

(2005) per studiare la riproducibilità e la stabilità della struttura della comunità batterica in sistemi di fanghi attivi utilizzati per rimuovere sostanze organiche e nutrienti (azoto e fosforo) dalle acque di scarico municipali. Yoshie et al. (2006) hanno studiato la comunità batterica alofila responsabile della denitrificazione delle acque di scarico industriali utilizzando l'analisi T-RFLP. Questa metodica è stata anche utilizzata per analizzare la struttura e la disposizione spaziale della comunità microbica presente in reattori utilizzati per il biorisanamento di reflui agro-industriali ricchi in composti fenolici (Bertin et al., 2004, 2006). Fedi et al. (2005) hanno dimostrato che l'analisi T-RFLP rappresenta uno strumento molto utile per valutare i cambi nella struttura della comunità microbica presente in bioreattori sviluppati per la degradazione di policlorobifenili (PCB) ed emendati con metil-β-ciclodestrine. Hartmann e Widmer (2006) hanno dimostrato che l'analisi T-RFLP è un metodo molto sensibile per osservare le differenze nella struttura delle comunità microbiche del suolo.

L'analisi T-RFLP è stata utilizzata anche in campo alimentare per monitorare la dinamica di popolazione di una frazione metabolicamente attiva presente in colture *starter* utilizzate di *routine* nella preparazione di formaggi (Sánchez et al., 2006).

L'analisi del polimorfismo dei frammenti terminali di restrizione del gene che codifica per l'enzima gliceraldeide-3-fostato deigrogenasi (*gap*) viene utilizzata per l'identificazione di specie di *Staphylococcus* in campioni clinici (Layer et al., 2006). Rogers et al. (2003) hanno utilizzato tale metodica molecolare per caratterizzare, senza ricorrere a procedure di coltivazione, la comunità batterica presente in campioni prelevati da pazienti adulti affetti da fibrosi cistica. Un saggio diagnostico basato sul T-RFLP è stato sviluppato da Christensen et al. (2004) per ricercare *Lactobacillus* in campioni di sangue provenienti da pazienti affetti da batteriemia. L'analisi T-RFLP ha permesso la corretta identificazione di specie di *Lactobacillus* in tutti i campioni analizzati. Il saggio è stato completato in 8 ore rispetto alle 24-48 richieste dalle tecniche tradizionali basate sulla coltivazione e sulla caratterizzazione biochimica. Questo ha importanti implicazioni per la durata dell'infezione, il costo per la cura del paziente, la durata dell'ospedalizzazione, lo sviluppo della resistenza ad antibiotici ad ampio spettro e la mortalità dovuta a batteriemia.

1.6 L'RNA ribosomale 16S

Gli RNA ribosomali rappresentano molecole essenziali per la vita delle cellule poiché costituiscono la parte non proteica dei ribosomi e sono elementi chiave della sintesi proteica; sono presenti, nelle loro varianti, nelle cellule di tutti gli esseri viventi (sono quindi molecole "universali") e la loro origine si fa risalire ai primi stadi dell'evoluzione molecolare, si tratta perciò di molecole antichissime.

Nei procarioti gli rRNA vengono distinti, in base al loro coefficiente di sedimentazione, in 5S, 16S e 23S e i relativi geni vengono indicati come 5S rDNA (circa 120 pb), 16S rDNA (circa 1500 pb) e 23S rDNA (circa 3000 pb). Negli eucarioti si distinguono gli RNA ribosomali 5S (120 basi), 5,8S (160 basi), 18S (circa 1870 basi), e 28S (circa 4700 basi). I geni che codificano gli RNA ribosomali sono organizzati sia nei procarioti che negli eucarioti in operoni che consistono di una regione promotrice seguita dalla sequenza codificante l'rRNA 16S/18S, una regione spaziatrice che può contenere un numero variabile di geni per l'RNA *transfer*, la sequenza dell' rRNA 23S/28S e, dopo un secondo breve spaziatore, quella per il 5S.

Dei tre geni ribosomali, quelli che codificano per il 16S/18S rRNA rappresentano le molecole di elezione per l'analisi della diversità microbica; sono, in effetti, i geni più utilizzati nella classificazione microbica. Il motivo di base risiede nel fatto che la filogenesi ricostruita utilizzando questi particolari marcatori genetici riflette la storia evolutiva dei microrganismi. Inoltre, il gene codificante l'rRNA ribosomale 16S cambia (muta) molto lentamente durante l'evoluzione e solo in rarissimi casi è soggetto ad eventi di trasferimento genico orizzontale. Per questi motivi l'analisi comparativa della sequenza del 16S rDNA permette di costruire gli alberi filogenetici e di stabilire perciò le relazioni filogenetiche esistenti tra i microrganismi. La bassa velocità di evoluzione del 16S rDNA è dovuta al fatto che, poiché la molecola dell' RNA ribosomale 16S entra a far parte dei ribosomi, essa deve prendere correttamente contatto con le altre componenti (ad esempio alcune proteine) del ribosoma stesso per dare origine a un complesso funzionante. La molecola è soggetta quindi a forti "costrizioni" strutturali e funzionali; in altre parole, mutazioni che possono alterare la struttura tridimensionale del 16S rRNA, impedendole di prendere correttamente contatto con le altre componenti del ribosoma, sono svantaggiose e, quindi, il gene codificante il 16S rRNA può "accettare" mutazioni solo se queste cadono in regioni della molecola che non modificano la struttura tridimensionale dell' RNA ribosomale 16S.

Il gene codificante il 16S rRNA è perciò costituito da regioni "costanti" (sequenze che sono identiche o molto simili in tutti gli organismi viventi) e regioni "variabili" e "ipervariabili" che sono quelle che possono accettare delle mutazioni e che differiscono perciò tra

microrganismi diversi. Inoltre, la presenza di regioni altamente conservate all'inizio e alla fine del gene stesso permettono la sua amplificazione in vitro mediante PCR. La sua dimensione è in effetti compatibile con l'amplificazione via PCR e con uno sforzo di sequenziamento non eccessivo.

Questo fatto ha spinto i ricercatori a depositare nelle banche dati un numero enorme di sequenze di 16S (e poi di 18S rDNA) rendendo perciò questo gene un marcatore ideale per il confronto tra un ceppo incognito e la banca dati di tutti i microrganismi noti. Non esiste, infatti, alcun altro gene per il quale sia disponibile una paragonabile mole di dati, e questo grazie alla relativa facilità con cui si possono oggi ottenere e analizzare tali molecole sia da microrganismi coltivabili che dalla comunità microbica in toto.

La possibilità di ottenere informazioni tassonomiche sui microrganismi sia coltivabili sia non coltivabili si basa quindi oggi prevalentemente sull'amplificazione mediante PCR dei geni codificanti il 16S rRNA o il 18S rRNA e la loro successiva analisi.

In particolare, se il prodotto di amplificazione è stato ottenuto dal DNA estratto da una comunità microbica, esso sarà costituito da una miscela eterogenea di molecole di 16S/18S rDNA di diversa provenienza tassonomica. La loro separazione può essere effettuata, quindi, in diverse maniere (T-RFLP o DGGE/TGGE), oppure si può direttamente clonare l'intero prodotto di amplificazione in appositi vettori plasmidici.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Area campione di "Acqua dei Faggi"

Il sito sperimentale di Acqua dei Faggi (Longano, Molise) ha un'estensione areale pari a circa 4 km^2 (Fig. 5). L'acquifero carbonatico è costituito prevalentemente da rocce calcaree e subordinatamente da rocce a più bassa permeabilità, composte principalmente da marne e marne calcare. Il mezzo carbonatico risulta essenzialmente fratturato e subordinatamente carsificato.

L'acquifero è delimitato da zone di faglia a bassa permeabilità o da faglie che mettono a contatto le rocce carbonatiche con litotipi a bassa permeabilità relativa. All'interno dell'acquifero il mezzo risulta caratterizzato da zone di parziale discontinuità, costituite da faglie, il cui nucleo a bassa permeabilità conferisce alle faglie stesse un ruolo semi-tamponante rispetto al deflusso della falda (Celico et al., 2006). Il mezzo è lateralmente e verticalmente ben interconnesso e la spaziatura tra le fratture è sufficientemente fitta da applicare l'approccio del mezzo continuo per descrivere il flusso anche a scala metrica (Petrella et al., 2008).

Nell'area di studio i calcari sono affioranti o sottoposti ad un suolo di origine piroclastica di spessore variabile (Vitric Andosols, secondo la classificazione FAO, 1988). Tale tipologia di suolo è presente in tutto il sito sperimentale, ad esclusione dell'area vicino al piezometro (P1), utilizzato per analizzare le variazioni della conducibilità elettrica in foro. In questa area il suolo è classificato come Calcaric Cambisol (FAO, 1988) ed è sovrapposto a marne e marne calcaree a più bassa permeabilità. Entrambe le tipologie di suolo permettono una infiltrazione diffusa delle precipitazioni (Naclerio et al., 2008).

Per quanto riguarda l'uso del suolo, l'area di studio è prevalentemente adibita a bosco e a pascolo. Il bosco, deciduo, ricopre circa il 45% della superficie dell'area in esame, ed è principalmente composto da faggi (*Fagus sylvatica*). Il restante 55% della superficie è adibito a pascolo (diverse centinaia di capi di bestiame, presenti sul territorio durante l'intero anno solare). In piccole ed isolate piane carsiche vengono coltivati principalmente patate, cereali ed erba medica. In queste aree viene sparso il letame come concime.

Nel piezometro P1 è stato riscontrato un profilo di conducibilità elettrica (EC) non uniforme e variabile nel tempo. In generale, è possibile distinguere un orizzonte più superficiale (LSGL) a bassa EC, che si ispessisce nel corso di eventi di ricarica, ed un secondo orizzonte (HSGL) a più alta EC, riscontrato sempre al di sotto dei 1062 metri s.l.m, che si mostra pressoché omogeneo. Le molteplici indagini isotopiche ($\delta^{18}O$, $\delta^{2}H$, $\delta^{13}C_{DIC}$, ^{3}H) condotte sulle precipitazioni, sulle acque di falda, su quelle sorgive e su quelle di infiltrazione efficace alla base del Calcaric Cambisol indicano che l'orizzonte LSGL è prevalentemente costituito da acque che

hanno attraversato il suddetto suolo. Tale interazione è ulteriormente confermata dai risultati delle analisi chimiche condotte sulle acque prelevate in LSGL e negli estratti da pasta satura ottenuti dal Calcaric Cambisol che mostrano significative concentrazioni di acetato (≤ 4.5 mg/L e ≤ 110.3 mg/L, rispettivamente), mentre S2 e HSGL sono privi di acetato, così come gli estratti da pasta satura ottenuti dal suolo (Vitric Andosol) che affiora estesamente su calcari, nell'ambito del sistema acquifero (Petrella et al., 2009).

2.1.1 Procedura di campionamento

Il 15 febbraio 2008 sono stati campionati 10 L di acqua alla sorgente S2 ed al piezometro P1 per effettuare le analisi biomolecolari per lo studio della *facies* microbica. Alla sorgente S2 l'acqua è stata prelevata direttamente in bottiglie sterili, mentre al piezometro P1 è stato utilizzato un campionatore pneumatico, in acciaio inossidabile a singola valvola nella parte terminale, preventivamente sterilizzato. Una volta prelevato il campione in foro, l'acqua è stata posta in bottiglie sterili.

I campioni d'acqua sono stati filtrati attraverso filtri di esteri misti di cellulosa (Membrane Filtranti S-Pak^{TM}, diametro 47 mm, diametro dei pori 0.22 μm, Millipore Corporation, Billerica, MA). La filtrazione è avvenuta entro 8 ore dal campionamento ed i filtri sono stati conservati a -80°C fino all'estrazione degli acidi nucleici.

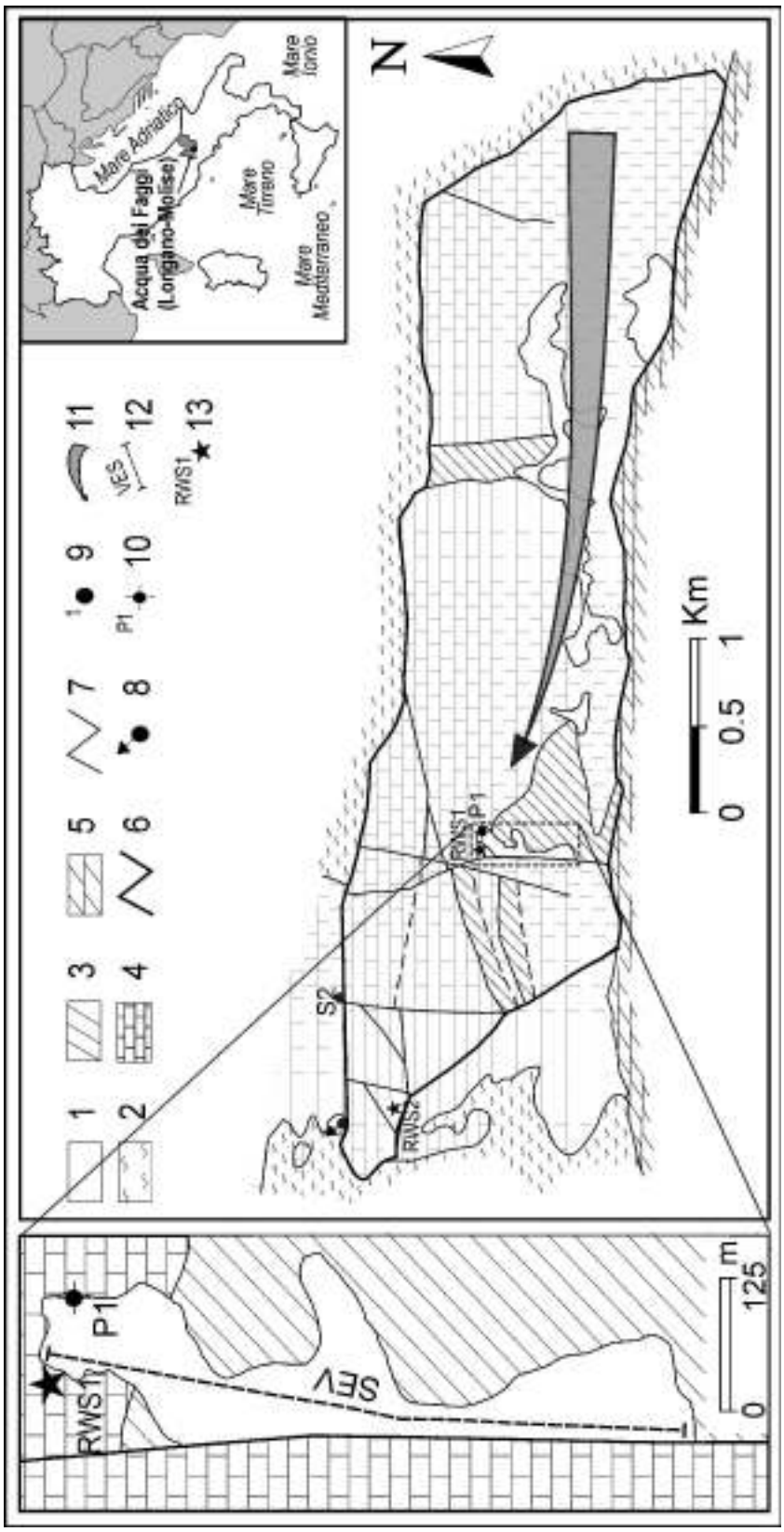

Figura 5. Schema idrogeologico dell'acquifero di Acqua dei Faggi (Legenda: 1-depositi quaternari; 2-depositi marnosi e argillosi; 3-depositi marnosi e calcareo marnosi; 4-depositi calcarei; 5-depositi dolomitici; 6-limite del bacino idrogeologico; 7-faglia; 8-sorgente perenne; 9-sorgente stagionale; 10-piezometro; 11-principale direttrice di deflusso della falda; 12-sondaggio elettrico verticale [SEV]; 13-campionatore di pioggia [RWS]).

2.2 Area campione dell'"Isola d'Ischia"

L'isola di Ischia delimita il margine nord-occidentale del Golfo di Napoli e fa parte della ben nota area vulcanica napoletana, comprendente anche i Campi Flegrei ed il Somma Vesuvio (Fig. 6).

Il vulcanismo ischitano ha avuto origine circa 150.000 anni fa ed è continuato fino in epoche storiche, da numerosi centri eruttivi monogenici, dando luogo a depositi differenziati per modalità di messa in posto e chimismo (Rittmann & Gottini, 1980; Gillot et al., 1982; Poli et al., 1987; Vezzoli,1988; Orsi et al., 1990).

Le acque sotterranee dell'isola d'Ischia sono state già oggetto, in passato, di numerose ricerche dalle quali risulta uno schema di circolazione idrica sotterranea molto complesso. Da recenti studi è emersa la presenza di uno o più serbatoi geotermici profondi con temperature comprese tra i 160 e 350 °C (Carapezza et al., 1988; Panichi et al., 1992) che causano la risalita di fluidi ad alta temperatura, responsabili del riscaldamento dell'acquifero superficiale. Soprattutto nel settore settentrionale dell'isola è stata inoltre evidenziata l'esistenza di un processo di miscelamento tra fluidi idrotermali ed acque di mare, al di sotto dell'interfaccia tra l'acqua di falda e l'acqua di mare stessa (Carapezza et al., 1988; Panichi et al., 1992, Corniello et al., 1994).

Le acque sotterranee dell'isola sono caratterizzate da: temperatura compresa tra 18 °C e 90 °C; conducibilità elettrica compresa tra 841 e 56000 μS/cm; elevati tenori in alcali e silice (fino a 600 mg/L), tipici di circuiti idrici sotterranei in rocce vulcaniche potassiche (Celico et al., 1999). Tale *facies* idrochimica è ascrivibile a quattro gruppi di acque: bicarbonato-calciche, bicarbonato-alcaline, di transizione e solfato-clorurate-alcaline (Celico et al., 1999).

2.2.1 Procedura di campionamento

I campioni d'acqua (1 L) per la caratterizzazione delle comunità microbiche sono stati prelevati presso due pozzi, denominati HP ed HM, situati rispettivamente nel settore orientale ed occidentale dell'isola (Fig. 6). Il pozzo HM è profondo 110 m, con diametro di 0,3 m, il pozzo HP è profondo 55 m, con diametro di 0,4 m. Tali campioni sono stati raccolti in bottiglie di vetro sterili e successivamente trasportati al buio in contenitori refrigerati (4 °C).

E' seguita la fase di filtrazione su membrana in esteri misti di cellulosa (Membrane Filtranti S-Pak^{TM}, diametro 47 mm, diametro dei pori 0.22 μm, Millipore Corporation, Billerica, MA) entro otto ore dal campionamento.

Tutte le membrane sono state conservate a -80 °C fino alla successiva fase di estrazione del DNA.

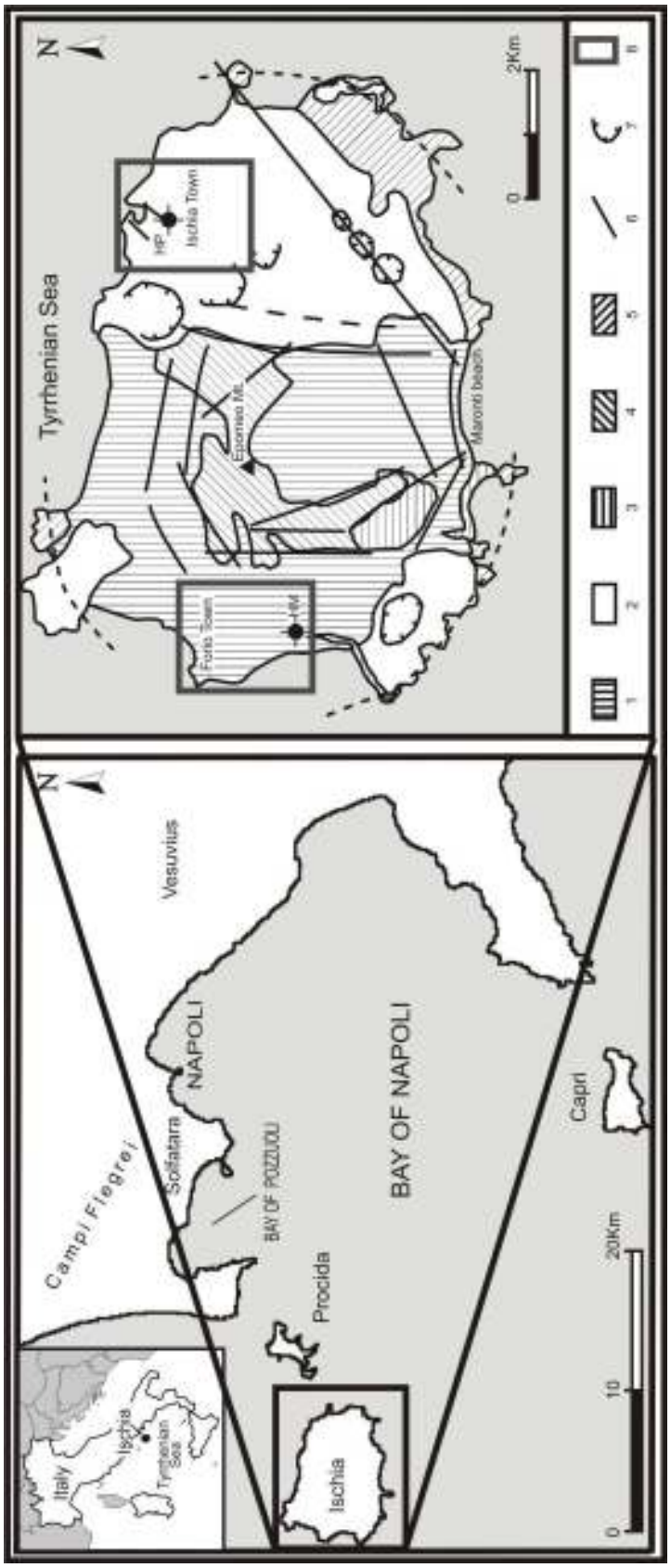

Figura 6. Carta geologica dell'isola d'Ischia (Legenda: 1-depositi di colata; 2- unità vulcaniche; 3-tufo di Citara; 4- tufo verde e formazioni di Colle Jetto; 5-formazioni del primo complesso vulcanico; 6-faglia; 7-cratere; 8-ubicazione dei pozzi di studio).

2.3 Area campione di "Pozzo del Sale"

Dal punto di vista geologico i1 territorio di Grottolella è costituito da un banco di argille marnose frammiste a sabbia e, a tratti, a banchi di breccia e puddinghe, con intercalazioni di depositi evaporitici di diversa natura (Celico et al., 2008). A copertura di questa formazione c'è una coltre di depositi piroclastici.

La presenza di rocce evaporitiche conferisce (Celico et al., 2008) alle acque sotterranee una serie di caratteri fisico-chimici molto peculiari, testimoniati, ad esempio, dalla sorgente ipersalina sulfurea denominata “Pozzo del Sale”. La coesistenza di differenti minerali evaporitici (tra cui soprattutto salgemma e gesso) all’interno del substrato argilloso-marnoso, la sovrapposizione dei depositi piroclastici al suddetto substrato e la permeabilità di quest’ultimo, legata soprattutto alla presenza di fratture discontinue e poco interconnesse, generano una circolazione delle acque sotterranee molto articolata ed una notevole diversificazione dei caratteri idrochimici. Dal punto di vista idrogeologico si sottolinea l’esistenza di due falde sovrapposte l’una all’altra, di cui una circolante nei depositi piroclastici ed una circolante nel substrato. Dal punto di vista idrochimico, si sottolinea la presenza di acque oligominerali (bicarbonato-alcalino-terrose), saline ed ipersaline (solfato-clorurato-alcaline e solfato-clorurato-alcalino-terrose).

2.3.1 Procedura di campionamento

I campioni d’acqua sono stati prelevati presso 9 pozzi (P1, P2, P3, P6, P7, P8, P18, P27, VPS) ed una sorgente (S1) in località “Pozzo del Sale” (Fig. 7), scelti in seguito ad una fase iniziale di indagine delle caratteristiche idrochimiche delle acque prelevate da una maglia più ampia di punti presenti nell’area studio.

La profondità dei pozzi campionati varia da alcuni metri (P1- 3 m -, P8 -6 m -, P18 -10 m -, P27 - 4 m -, VPS -1,5 m -) a decine di metri (P2 - 27 m -, P3 - 26 m -, P6 -27 m -, P7 - 22 m -); in tutti i casi i prelievi dei campioni d'acqua sono stati effettuati a fondo foro.

I parametri chimico-fisici determinati nelle acque prelevate dai pozzi e dalla sorgente nella stessa data dei campionamenti per le indagini biomolecolari sono riportati in tabella 1.

	pH (20°C)	Conducibilità elettrica a 25°C (µS/cm)	Na^+ (mg/L)	K^+ (mg/L)	Mg^{++} (mg/L)	Ca^{++} (mg/L)	F^- (mg/L)	Cl^- (mg/L)	NO_2^- (mg/L)	NO_3^- (mg/L)	SO_4^{--} (mg/L)	HCO_3^- (mg/L)	S^{--} (mg/L)
P1	7.16	4030	348.44	10.65	95.20	444.50	3.73	329.18			1529.32	294.3	0.4
P2	7.57	10700	2261.00	7.48	25.36	162.54	2.70	2074.64			2283.02	486.7	5.2
P3	7.75	6590	1301.76	18.48	17.68	171.53		872.51			1646.19	515.0	1.0
P6	7.29	3420	207.10	20.59	34.73	594.96		87.69			1672.22	287.5	
P7	7.44	19500	4225.48	33.72	25.33	138.71		5537.24			1043.50	537.7	0.0
P8	7.26	1774	96.18	34.17	14.19	226.44	0.56	243.14		8.62	234.59	412.0	0.0
P18	7.15	1135	61.68	19.95	9.59	145.07	0.90	69.19	1.41	13.16	155.94	375.8	
P27	7.25	3340	407.32	34.07	31.04	241.09	1.53	381.63			633.78	639.5	34.4
S1	7.38	707	23.63	13.70	6.41	101.49	0.64	22.26	1.42	19.59	38.24	330.5	
VPS	7.02	170400	51690	250	150	1740		78600			5130	262.6	0.0

Tabella 1. Parametri chimico-fisici determinati nelle acque prelevate dai punti campionati il 20/02/2008.

È stata utilizzata una sonda preleva campioni SUB 15 in acciaio Inox (Crami Amafilter Group): sono stati raccolti 2 L di acqua in bottiglie di vetro sterili, successivamente trasportate al buio in contenitori pre-raffreddati. I campioni (1,5 L) sono stati filtrati su membrana in esteri misti di cellulosa con diametro 47 mm e dimensione dei pori 0,22 µm (Millipore).

Tutte le membrane sono state conservate a -80 °C fino alla successiva fase di estrazione del DNA.

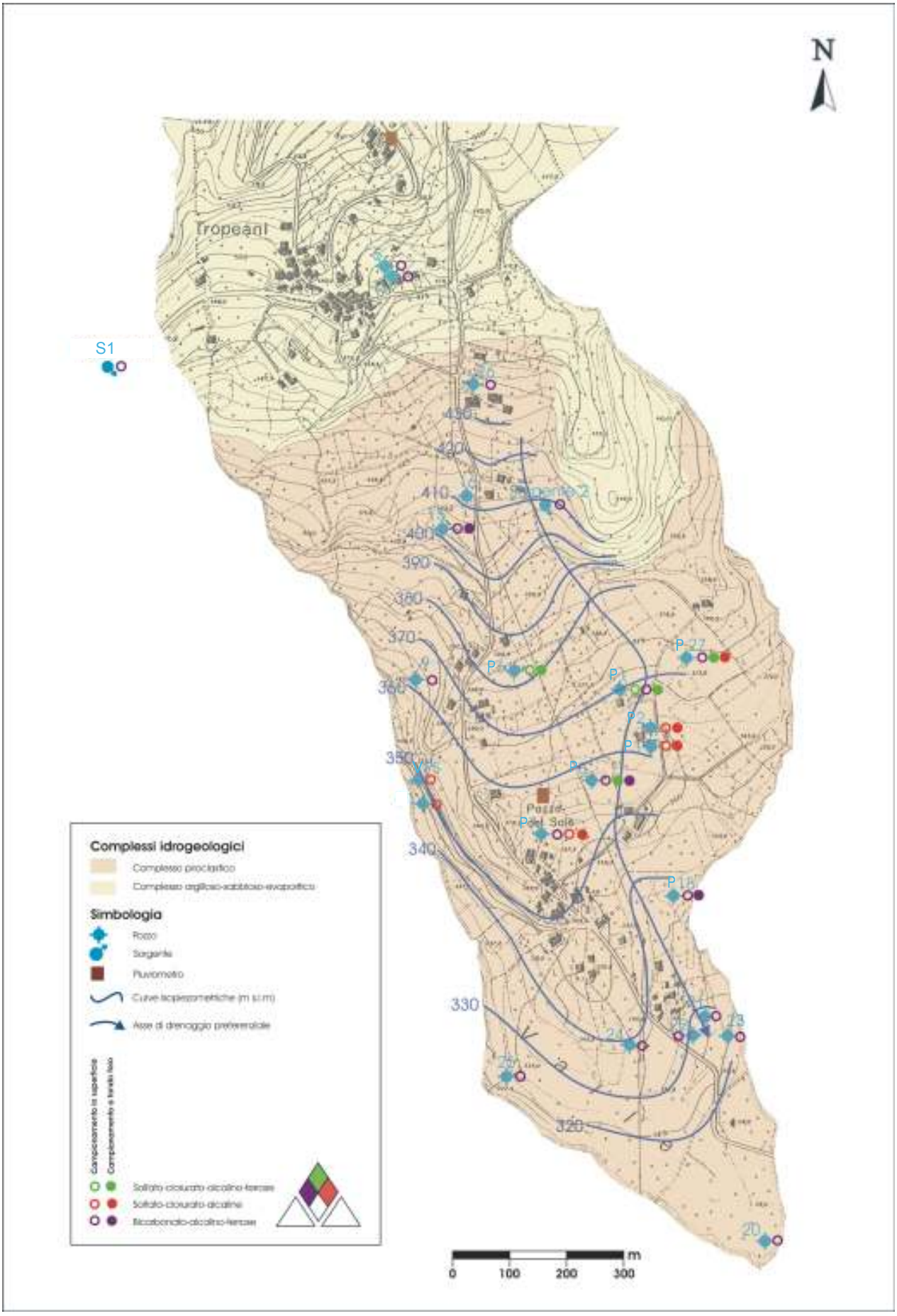

Figura 7. Area di studio "Pozzo del Sale".

2.4 Estrazione degli acidi nucleici

L' estrazione del DNA totale è stata condotta seguendo il protocollo di Gich et al. (2005), a cui sono state apportate alcune modifiche; metà filtro di ciascun campione è stato tagliato in sottili strisce con una forbice e le strisce sono state trasferite in tubi in polistirene da 15 ml sterili. Dopo l'aggiunta di 4 ml di *buffer* STE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA pH [8.0], 100 mM NaCl) e 0,1 volume di SDS 10% (wt/vol), i filtri sono stati bolliti per 10 minuti a bagnomaria. La fase liquida è stata trasferita in un nuovo tubo in polistirene, mentre i filtri sono stati lavati con 2 ml di *buffer* TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1mM EDTA [pH 8.0]).

Dopo aver riunito le fasi liquide è stata condotta un'estrazione con 4 ml di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25:24:1).

E' seguito un passaggio di centrifugazione a 5000 rpm per 10' per permettere la separazione delle due fasi, dopodiché 5 ml della fase acquosa sono stati concentrati utilizzando tubi Centricon 50 (Amicon, inc, U.S.A.). Il DNA è stato lavato con 2 ml di *buffer* TE.

Il DNA recuperato è stato precipitato in etanolo, risospeso in 20 µl di acqua ultrapura sterile e conservato a -20 °C fino alla fase successiva di amplificazione della regione di interesse.

2.5 PCR dei campioni per DGGE

Nella reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata amplificata la regione V3 del gene codificante per la subunità 16S dell' RNA ribosomale del dominio dei *Bacteria* e degli *Archaea* utilizzando tre coppie di *primers*: PRBA338f (Lane, 1991) e PRUN518r (Muyzer et al., 1993) per i *Batteri*, PRA46f e PREA1100r e PARCH340f e PARCH519r per gli *Archaea* (Øvreås et al., 1997). La *clamp* di GC descritta da Muyzer et al. (1993) è stata aggiunta all'estremità 5' dei *primers* PRBA338f e PARCH340f.

Il *mix* di reazione per PCR è così composto: 1 µl di acidi nucleici, 0,5 pmol/ µl di ciascun *primer*, 10 µl di 5X *Go*Taq Flexi *Buffer*, 0,25 µl di *Go*Taq *polymerase* [5u/ µl] (Promega), 3 µl $MgCl_2$ [25 mM], 1 µl dNTPs mix [10 mM], acqua ultrapura sterile fino ad un volume finale di 50 µl.

Condizioni di PCR per i *Bacteria*: fase iniziale di denaturazione a 92 °C per 2', 30 cicli di denaturazione a 92 °C per 1', *annealing* a 55 °C per 30'' e fase di elongazione a 72 °C per 1'. Lo *step* finale di elongazione è stato condotto a 72 °C per 6'.

Per gli *Archaea* è stata condotta una *nested* PCR con le stesse condizioni utilizzate per i *Batteri* ma con una temperatura di *annealing* di 53.5 °C.

Successivamente i prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% per verificare la corretta amplificazione del frammento desiderato, utilizzando come *marker* di peso molecolare un 100 bp DNA *ladder* (BioLabs).

2.6 DGGE

L'analisi DGGE è stata condotta con il sistema DCode™ *Universal Mutation Detection System* (BIO-RAD): aliquote dei prodotti di PCR purificati mediante *kit* commerciali sono state caricate in ciascun pozzetto del gel all'8% Acrylamide/ Bis (37.5:1) con gradiente denaturante lineare 25% - 65% composto da urea e formammide.

La corsa elettroforetica è stata condotta in *buffer* TAE 1X per 16 h a 60 °C passando da un voltaggio di 50 V, mantenuto per i primi dieci minuti, a 100 V.

Terminata la corsa, il gel è stato immerso in 250 ml di *buffer* 1X TAE con bromuro d'etidio 0,5 μg/ml in agitazione, quindi è stato decolorato in una soluzione 1X TAE per 15 minuti.

E' seguita la fase di acquisizione con il Sistema Chemi-Doc (BIO-RAD) e l'elaborazione dei profili con il *software* TL120 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) .

I singoli frammenti risolti mediante DGGE sono stati tagliati da gel, lasciati eluire *over*/*night* a 4 °C in 20 μl di acqua ultrapura, riamplificati e direttamente sequenziati o clonati nel plasmide pGEM®-T Easy poi utilizzato per trasformare cellule competenti del ceppo DH5α di *E. coli*.

Per ciascuna banda escissa da gel DGGE, sono stati scelti in maniera *random* tre cloni utilizzati per la reazione di sequenziamento del plasmide contenente l'inserto di interesse.
Il sequenziamento è stato effettuato presso la BMR-Genomics, Padova, Italia.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti in banca dati (NCBI) e sono state depositate nella banca dati dell'EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*).

2.7 Reazione di ligazione

Le reazioni di ligasi tra vettori (pGEM®-T Easy Vector, Promega, di cui è riportata la mappa in figura 8) ed inserti, in rapporto molare di 1:3, sono state effettuate in volumi di 10 µl di acqua, contenenti 3 unità Weiss di T4 DNA ligasi ed il tampone di reazione specifico (Promega); le miscele di reazione sono state incubate *over*/*night* a 4 °C.

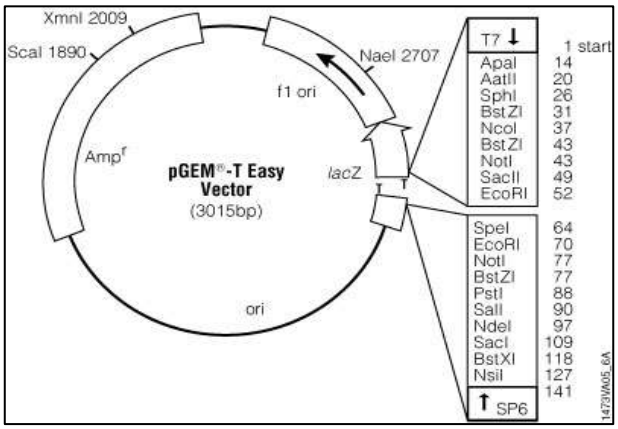

Figura 8. Mappa del vettore plasmidico pGEM®-T Easy

2.8 Preparazione di cellule di *E. coli* competenti

Per rendere competenti all'ingresso di DNA cellule del ceppo DH5α di *E. coli*, 4 ml di coltura, ottenuti a partire da singola colonia, sono stati inoculati in 400 ml di terreno LB ed incubati a 37 °C fino a raggiungere un valore di $O.D._{600nm}$ compreso tra 0,6 e 0,8. La coltura è stata poi posta in ghiaccio per 15' e centrifugata per 10' a 3500 rpm a 4 °C. Il pellet è stato risospeso in 200 ml di $CaCl_2$ 50 mM sterile e freddo e lasciato in ghiaccio per 15'. La coltura è stata centrifugata per 10' a 3500 rpm a 4 °C ed il pellet è stato risospeso in 34 ml di $CaCl_2$ 50 mM sterile e freddo e lasciato in ghiaccio per 60'. Sono stati addizionati 6 ml di glicerolo sterile al 100% . Sono state preparate aliquote da 100 µl successivamente poste a -80 °C.

2.9 Trasformazione di cellule competenti di *E. coli*

La trasformazione è stata effettuata aggiungendo 2 µl della reazione di ligasi a 100 µl di cellule competenti, lasciando la sospensione per 25' in ghiaccio, incubandola per 4' a 42 °C e per 5' a temperatura ambiente. Sono stati addizionati 900 µl di di terreno LB ed è seguita l'incubazione a 37 °C per 1 h. Infine le colture sono state piastrate su terreno LB agar contenente ampicillina (50 µg/ml) per la selezione delle cellule trasformate.

2.10 PCR ed analisi T-RFLP per i *Bacteria*

Le comunità batteriche delle acque prelevate presso il sito sperimentale denominato "Pozzo del Sale" sono state investigate anche mediante la tecnica T-RFLP.

A partire dal DNA genomico estratto dai filtri è stato amplificato il gene codificante per l'rRNA ribosomale 16S con una *semi nested* PCR utilizzando le coppie di *primers* 27f (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492r (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT) e 27f marcato con il fluorocromo TET (*tetrachlorofluorescein phosphoramidite*) e 519r (5'ATTACCGCGGCTGCTGG).

Il *mix* di reazione della prima reazione di amplificazione è composto da 4 µl di acidi nucleici, $MgCl_2$ 2 mM, *buffer* della polimerasi 1X, 200 µM dNTPs, 0,325 µM of ciascun *primer*, 2 U di Taq DNA polimerasi (Fermentas) ed acqua ultrapura sterile sino ad un volume finale di 50 µl.

Condizioni di PCR: fase iniziale di denaturazione a 98 °C per 5', 25 cicli di denaturazione a 95 °C per 30'', *annealing* a 52 °C per 30'' e fase di elongazione a 72 °C per 1,5'. Lo *step* finale di elongazione è stato condotto a 72 °C per 10'.

Nella seconda reazione di amplificazione sono state utilizzate le medesime condizioni sopra descritte ma il numero di cicli è stato portato a 30 ed il tempo di elongazione è stato ridotto ad 1'.

I prodotti di PCR sono stati controllati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all' 1%.

Aliquote dei prodotti amplificati sono state digerite separatamente con le endonucleasi di restrizione *Alu*I ed *Hin*6I (3 U) in un volume di reazione di 20 µl per 3 h a 37 °C.

Il DNA è stato precipitato in etanolo e risospeso in 20 µl di acqua ultrapura sterile.

I campioni preparati per l'analisi T-RFLP contengono 12 µl di formammide deionizzata, 0,3 µl di 500 TAMRA *internal size standard* (Applied Biosystems) e DNA digerito; quindi, sono stati denaturati a 98 °C per 5' e subito posti in ghiaccio.

I frammenti di restrizione terminali sono stati separati con il sequenziatore ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) per 28' a 15 kV a 60 °C.

Il *software* GENEMAPPER versione 3.7 è stato utilizzato per analizzare i cromatogrammi prodotti.

2.11 PCR ed analisi T-RFLP per gli *Archaea*

Per gli *Archaea*, è stata condotta una *semi nested* PCR utilizzando le coppie di *primers* 109f (5' AC(G/T)GCTCAGTAACACGT) e 934r (5' GTGCTCCCCCGCCAATTCCT) e 344f (5' ACGGGGTGCAGCAGGCGCGA) marcato con il fluorocromo HEX (*6-carboxy-hexafluorescein*) e 934r.

Il *mix* di PCR è composto da 4 µl di acidi nucleici, $MgCl_2$ 2 mM, *buffer* della polimerasi 1X, 200 µM dNTPs, 0,325 µM of ciascun *primer*, 2 U di Taq DNA polimerasi (Fermentas) ed acqua ultrapura sterile sino ad un volume finale di 50 µl.

Condizioni di PCR: fase iniziale di denaturazione a 98 °C per 5', 94 °C per 10'', 35 cicli di denaturazione a 94 °C per 30'', *annealing* a 60 °C per 30'' con decrementi di 0,5 °C nei primi 20 cicli, e fase di elongazione a 72 °C per 1'. Lo *step* finale di elongazione è stato condotto a 72 °C per 10'.

I prodotti di PCR sono stati controllati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all' 1%.

Aliquote dei prodotti amplificati sono state digerite separatamente con le endonucleasi di restrizione *Alu*I ed *Msp*I (3 U) in un volume di reazione di 20 µl per 3 h a 37 °C.

Il DNA è stato precipitato in etanolo e risospeso in 20 µl di acqua ultrapura sterile.

I campioni preparati per l'analisi T-RFLP contengono 12 µl di formammide deionizzata, 0,3 µl di 500 TAMRA *internal size standard* (Applied Biosystems) e DNA digerito; quindi, sono stati denaturati a 98 °C per 5' e subito posti in ghiaccio.

I frammenti di restrizione terminali sono stati separati con il sequenziatore ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) per 30' a 15 kV a 60 °C.

Il *software* GENEMAPPER versione 3.7 è stato utilizzato per analizzare i cromatogrammi prodotti.

2.12 Elaborazione dei dati T-RFLP

I profili T-RFLP dei differenti campioni sono stati allineati con il *software* T-Align ed i dati ottenuti sono stati ordinati mediante Analisi delle Componenti Principali (PCA) e sottoposti a *cluster analysis* (*unweighted pair-group average* (UPGMA) *algorithm*; Bray-Curtis *measure for abundance data*). Sono stati calcolati inoltre diversi indici di diversità (Simpson_1-D, Shannon_H, and Buzas and Gibson's *evenness* = e^H/S) con i *softwares* PAST e STATISTICA versione 7.1.

In dettaglio:

Indice di Simpson = 1-D

Indice di Shannon (H) = -sum((n_i/n) ln(n_i/n))

Buzas and Gibson's evenness = e^H/S

D = sum((n_i/n)^2)

S = numero di taxa

n = numero totale di individui

n_i = numero di individui appartenenti al taxon i

3 RISULTATI DELLE ANALISI BIOMOLECOLARI

3.1 Area campione di "Acqua dei Faggi"

Nell'area campione di "Acqua dei Faggi" l'obiettivo specifico delle indagini biomolecolari è stato quello di accertare se le comunità microbiche fossero in grado di fornire indicazioni in merito all'origine dell'aloclino rinvenuto e caratterizzato nel piezometro P1.

Il confronto dei profili di DGGE relativi alla regione V3 del DNA ribosomale (rDNA) 16S, ottenuti da campioni prelevati al piezometro (nella porzione superficiale e meno mineralizzata della falda; LSGL) ed alla sorgente (S2), mostra un *pattern* di bande completamente diverso tra i due tipi di acque (Fig. 9), evidenziando quindi la presenza di due diverse comunità batteriche. Inoltre, dal sequenziamento dei geni codificanti per l'RNA ribosomale (rRNA) 16S emerge che in LSGL sono presenti batteri acetato-assimilatori ascrivibili a *Betaproteobacteria* ed a *Bacteroidetes*, strettamente ricollegabili al Calcaric Cambisol affiorante in prossimità del P1, che rappresenta l'unico suolo, nell'area di studio, nei cui estratti di pasta satura sono state rinvenute elevate concentrazioni di acetato (≤ 110.3 mg/L). Diversamente, le sequenze estratte da S2 sono attribuibili ad *Enterococcus faecalis, Alphaproteobacteria* e batteri di suoli forestali, ricollegabili alle aree boscate ed alle aree a pascolo che caratterizzano gran parte del bacino di interesse (Tab. 2) (ALLEGATO A).

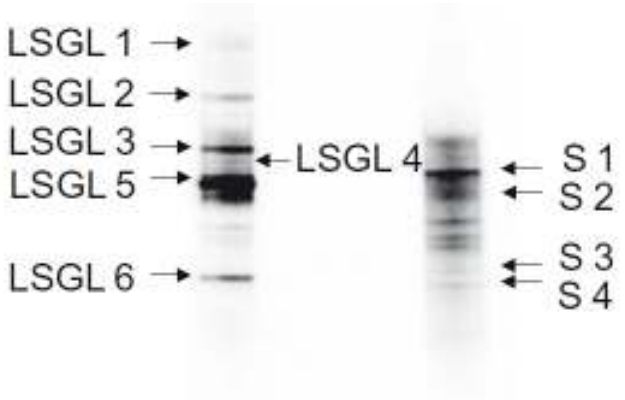

Figura 9. Profili di DGGE dei frammenti di 16S rDNA amplificati dal DNA estratto da campioni di LSGL ed S2.

Sequenza	*Accession number*	Affiliazione filogenetica	*Accession number*	Similarità
LSGL1	FM180001	*Acidovorax defluvii* strain b336	EU434529	94%
LSGL2	FM180002	*Flavobacterium* sp. HTCC554	AY584585	99%
LSGL3	FM180003	*Flavobacterium* sp. DB1.1-1	AM492775	99%
LSGL4	FM180004	*Flavobacterium* sp. DB3.4-10	AM493405	98%
LSGL5	FM180005	*Flavobacterium* sp. 0499	DQ515962	98%
LSGL6	FM180006	*Dechloromonas* sp. EMB269	DQ413167	98%
S1	FM180007	*Enterococcus faecalis* strain IJ-12	EU547777	100%
S2	FM180008	Uncultured forest soil bacterium clone DUNssu 205	AY913410	96%
S3	FM180009	*Devosia yakushimanensis*	AB361068	97%
S4	FM180010	Uncultured *alphaproteobacterium* clone LTUA02856	AY144198	99%

Tabella 2. Sequenze parziali dei geni codificanti per l' rRNA 16S relative ai campioni LSGL (LSGL1-LSGL6) ed S2 (S1-S4) ed affiliazioni filogenetiche.

3.2 Area campione dell'"Isola d' Ischia"

Nell'area campione dell'isola d'Ischia l'obiettivo specifico delle indagini biomolecolari è stato quello di accertare se le comunità microbiche fossero in grado di fornire indicazioni in merito:

1. alla presenza di una (Inguaggiato et al., 2000), ovvero due (Tedesco, 1996) differenti sorgenti magmatiche profonde, condizionanti, tra le altre cose, i caratteri fisico-chimici dell'acquifero vulcanico in esame; nell'ipotesi di Tedesco (1996) sussisterebbero due diversi distretti idrotermali, in ciascuno dei quali è stato selezionato un pozzo di campionamento per le analisi biomolecolari;
2. all'interazione tra circuiti idrotermali ed il presunto substrato carbonatico dei depositi vulcanici (Finetti & Morelli, 1974);
3. al sussistere o meno di fenomeni di intrusione marina, indotti dal pompaggio delle acque di falda da pozzi ubicati in prossimità della linea di costa.

Dalle analisi effettuate sui campioni d'acqua prelevati nei due pozzi in esame non sono stati rinvenuti microrganismi appartenenti al dominio degli *Archaea*, mentre la popolazione batterica è risultata essere fortemente differenziata (Fig. 10).

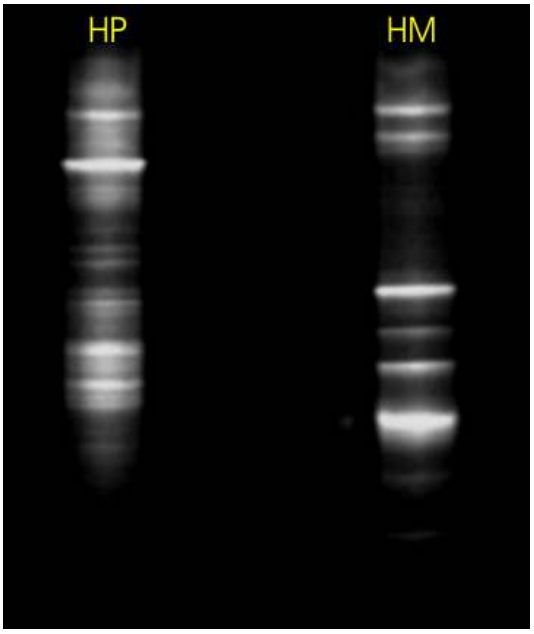

Figura 10. Profili di DGGE dei campioni HP ed HM.

Nel pozzo HP (T 61 °C, pH 6.7, TDS 7 g/L) situato nella porzione orientale dell'isola d'Ischia sono stati identificati 7 isolati diversi (Tab. 3). La sequenza HP1-2 risulta avere identità

pari al 99% con le sequenze di *uncultured bacterium clones* isolati da acque saline o ipersaline in siti differenti. Per esempio, l'*uncultured Firmicutes bacterium clone* C56 (*accession number* DQ521176) è stato rinvenuto in acque di sorgenti fredde (<7 °C) ed ipersaline (TDS fino a 122 g/L) sull'isola di Axel Heiberg in Canada (Perreault et al., 2007). La sequenza HP2-3 presenta un'identità del 100% con *uncultured bacterium clones* isolati da ambienti ipersalini. Entrambi questi ceppi sono correlati ad ambienti con caratteristiche simili a quelli marini e sostengono l'ipotesi di un fenomeno di ingressione di acqua marina determinata da pompaggio nei pozzi.
Le sequenze HP3-1 ed HP4-2 mostrano rispettivamente similarità del 100% e del 95% con quelle di due *uncultured bacterium,* clone Pol_B_60 (*accession number* EF444682) e clone Pol_B_41 (*accession number* EF444700), isolati dalle sorgenti Polychnitos (T 78 °C, pH 6.8) nell'isola greca di Lesvos in cui sembra essere presente una miscela tra acque termali ed acqua marina (Lambrakis & Stamatis, 2008). Entrambi i ceppi sono stati, quindi, isolati in due isole vulcaniche (Ischia e Lesvos) dove, ancora una volta, in base ad indagini idrogeologiche ed idrochimiche è stato ipotizzato un processo di *mixing* tra fluidi idrotermali ed acque marine.
La sequenza HP4-14 mostra un'identità del 100% ad un *uncultured bacterium* clone CSR-26 (*accession number* AY699376) isolato da una sorgente termale (T 70 °C) situata nella penisola di Reykjanes, nella parte nord-occidentale dell'Islanda, dove indagini biologico-molecolari hanno rivelato la presenza di specie correlate a microrganismi sia terrestri sia marini (Hobel et al., 2005). Quindi, anche in questo caso il clone HP4-14 è correlato ad un ambiente dove si verifica l'interazione tra acque marine ed acque terrestri.

La sequenza HP2-1 è simile all' 84% a quella di un *uncultured bacterium* clone p760_b_9.29 (*accession number* AB305438) isolato da sedimenti idrotermali mentre la sequenza HP4-23 è simile al 92% a quelle di *uncultured bacterium clones* isolati da sorgenti idrotermali in acque profonde e sedimenti ricchi in arsenico: in questa porzione dell' isola d' Ischia sono state rilevate concentrazioni di arsenico comprese tra 100 e 500 μg/L (Lima et al., 2003).

Nel pozzo HM (T 85 °C, pH 6.4, TDS 3 g/L), situato nella porzione occidentale dell'isola, sono stati identificati 6 isolati. La sequenza HM2-2 mostra similarità del 100% con quella di *Hydrogenobacter subterraneus* (*accession number* AB026268; Takai et al., 2001) isolato da acque calde in un pozzo profondo 1500 m, nell'impianto geotermale di Hacchoubaru nella prefettura di Oita in Giappone. Questo ceppo è un ipertermofilo che cresce a temperature comprese tra i 60 °C e gli 85 °C con un optimum a 78 °C e richiede zolfo elementare e composti ridotti dello zolfo come substrati per il proprio metabolismo (Takai et al., 2001). Inoltre, sulla base di indagini filogenetiche (Takai et al., 2001) questa specie è quella maggiormente correlata ad *H. thermophilus* T3 isolato da una sorgente geotermale in Toscana, Italia (Bonjour &

Aragno, 1986; Pitulle et al., 1994). Le sequenze HM3-1 e HM4-3 presentano similarità del 100% e 98% con quelle di ceppi appartenenti al genere *Thermus* come, ad esempio, *Thermus sp.* O1B-343 (*accession number* AF311356; Hjorleifsdottir et al., 2001) isolato da una sorgente calda (T 85-88 °C, pH 6.9) nella parte sud-occidentale dell'Islanda. Gli isolati che appartengono al filotipo O1B-343 presentano identità del 100% con *Thermus scotoductus* NMX2 A.1 (Hudson, 1986). Recenti studi (Hreggvidsson et al., 2006) condotti sui fattori ecologici ed i meccanismi evolutivi alla base della diversa distribuzione delle specie appartenenti al genere *Thermus* in Islanda hanno messo in evidenza come questa specie sia spesso isolata da sorgenti calde con valori di pH < 8.0 in accordo con i valori determinati nel pozzo HM. La sequenza HM1-2 ha similarità del 100% con molte sequenze di *uncultured bacterium clones* appartenenti al gruppo dei *ε-proteobacteria* (ad esempio, l'isolato WM83 *accession number* DQ133932; Macalady et al., 2006). Diversi ceppi sono stati isolati nelle grotte di Frasassi (Appennino carbonatico) in Italia centrale ed in altri acquiferi carbonatici (ad esempio, l'isolato BAC_2_C05, *accession number* FJ967860, in Chaudhary et al., 2009 e l'isolato CC1B_16S_58, *accession number* EU662330, in Porter et al., 2009) e sono strettamente correlati a specie zolfo-ossidanti o cloni isolati in ambienti ricchi in zolfo e solfuri (Macalady et al., 2006).

La sequenza HM1-3 è simile al 96% con quella di un *uncultured bacterium* clone 2004-4-30-081407 (*accession number* EU234577; Baniulyte et al., 2009) isolato da un suolo in Illinois (USA) e a numerose sequenze di *uncultured bacterium clones* isolate da siti contaminati, mentre la sequenza HM4-1 è simile al 100% con sequenze relative a numerosi ceppi appartenenti al gruppo degli *Actinobacteria*, isolati in differenti ambienti. Quindi, entrambe le sequenze, HM1-3 ed HM4-1, non possono essere associate a nessun ambiente specifico.

Sequenza	*Accession number*	Affiliazioni filogenetiche	*Accession number*	Similarità
HP1-2	FM242514	Uncultured bacterium clone C56	DQ521176	99%
		Uncultured *Firmicutes* bacterium clone PL07-22	FJ844313	99%
		Uncultured bacterium clone ARDBACWH17	EU869411	99%
HP2-1	FM242515	Uncultured bacterium clone p760_b_9.29	AB305438	84%
HP2-3	FM242516	Uncultured organism clone MAT-CR-P2-H06	EU246076	100%
		Uncultured bacterium clone XKE-008	EF490106	100%
		Uncultured bacterium clone SalB15	EF031088	100%
HP3-1	FM242517	Uncultured bacterium clone Pol_B_60	EF444682	100%
HP4-2	FM242518	Uncultured bacterium clone Pol_B_41	EF444700	95%
HP4-14	FM242519	Uncultured bacterium clone CSR-26	AY699376	100%
HP4-23	FM242520	Uncultured *Chloroflexi* bacterium clone pMARB10_30	AB496521	92%
		Uncultured bacterium clone 20	DQ165106	92%
HM1-2 (*)	FM242521	Uncultured bacterium clone WM83	DQ133932	100%
HM1-3	FM242522	Uncultured bacterium clone 2004-4-30-081407	EU234577	96%
HM2-2	FM242523	*Hydrogenobacter subterraneus* strain HGP1	AB026268	100%
HM3-1	FM242524	*Thermus* sp. O1B-343	AF311356	100%
HM4-1 (*)	FM242525	Uncultured soil bacterium clone 8F-519R-41	EU703606	100%
HM4-3	FM242526	*Thermus* sp. O1B-343	AF311356	98%

Tabella 3. Sequenze parziali dei geni codificanti per l'rRNA 16S relative ai campioni HP ed HM ed affiliazioni filogenetiche. L'asterisco indica che le sequenze sono simili al 100% con più di tre sequenze depositate in banca dati.

3.3 Area campione di "Pozzo del Sale"

Nell'area campione di "Pozzo del Sale" l'obiettivo specifico delle indagini biomolecolari è stato quello di accertare se le comunità microbiche fossero in grado di fornire indicazioni in merito alla notevole frammentazione dei circuiti idrici sotterranei, ipotizzata sulla base di indagini idrogeologiche, geochimiche e isotopiche.

Le comunità microbiche delle acque sotterranee, prelevate presso una sorgente e nove pozzi nel sito di "Pozzo del Sale", sono state analizzate mediante l'utilizzo di due tecniche molecolari: DGGE e T-RFLP. Nonostante le differenze tra le due tecniche utilizzate l'analisi dei profili di DGGE con il *software* TL120 e la *cluster analysis* dei dati della T-RFLP con il *software* PAST hanno evidenziato, per i *Bacteria,* un raggruppamento simile dei campioni esaminati (Fig. 11) (il campione P27 non è stato analizzato mediante T-RFLP in seguito a problemi nella reazione di PCR). In particolare, le comunità batteriche dei pozzi VPS, P2 e P8 risultano essere quelle più dissimili dalle altre, mentre le comunità relative ai pozzi P18, P1 ed S1 e quelle relative ai pozzi P6 e P7 sono raggruppate insieme, ma i valori di similarità tra i vari profili risultano essere piuttosto bassi. L'unica discordanza si rileva per il pozzo P3. L'ordinamento dei dati di T-RFLP mediante analisi delle componenti principali (PCA) ha fornito simili indicazioni (Fig. 12). Non è stata invece trovata una correlazione significativa tra i dati di T-RFLP e di DGGE, e le peculiarità idrochimiche dei campioni analizzati.

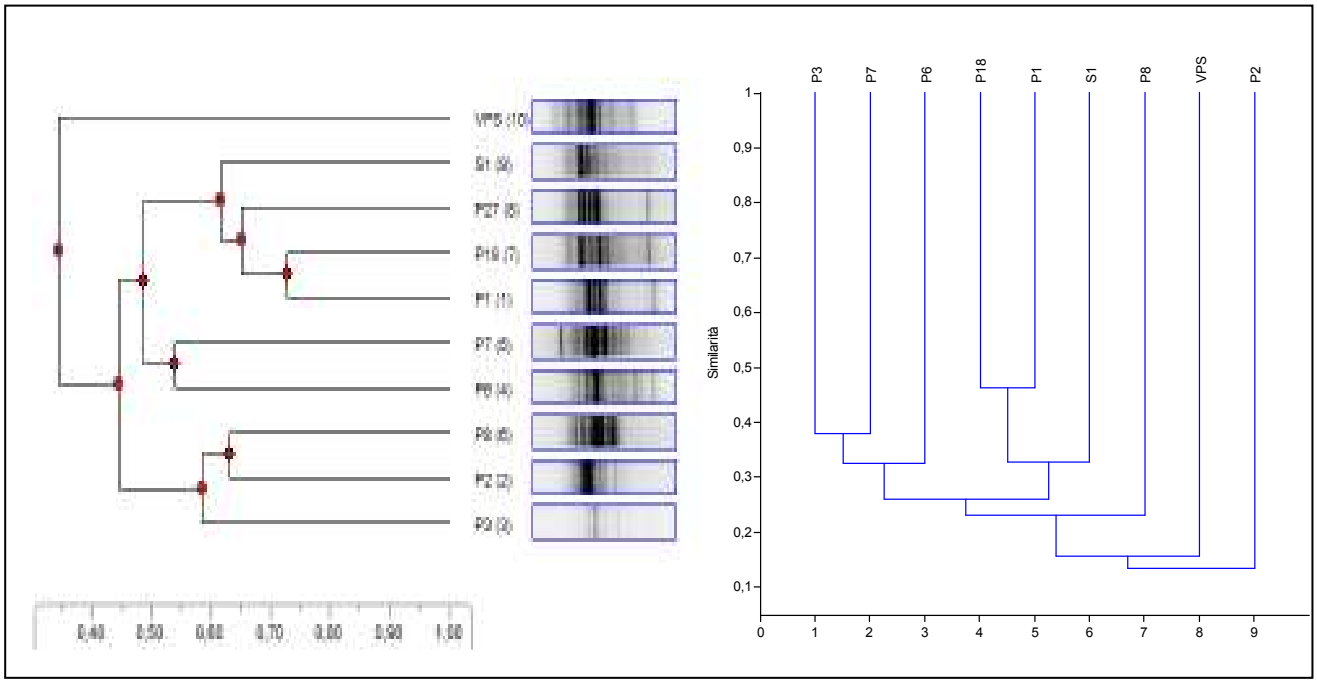

Figura 11. A sinistra: dendrogramma profili DGGE per i *Bacteria* (i numeri tra parentesi indicano la posizione della *lane* su gel DGGE). A destra: dendrogramma dati T-RFLP (UPGMA *algorithm* e Bray-Curtis *measure for abundance data*).

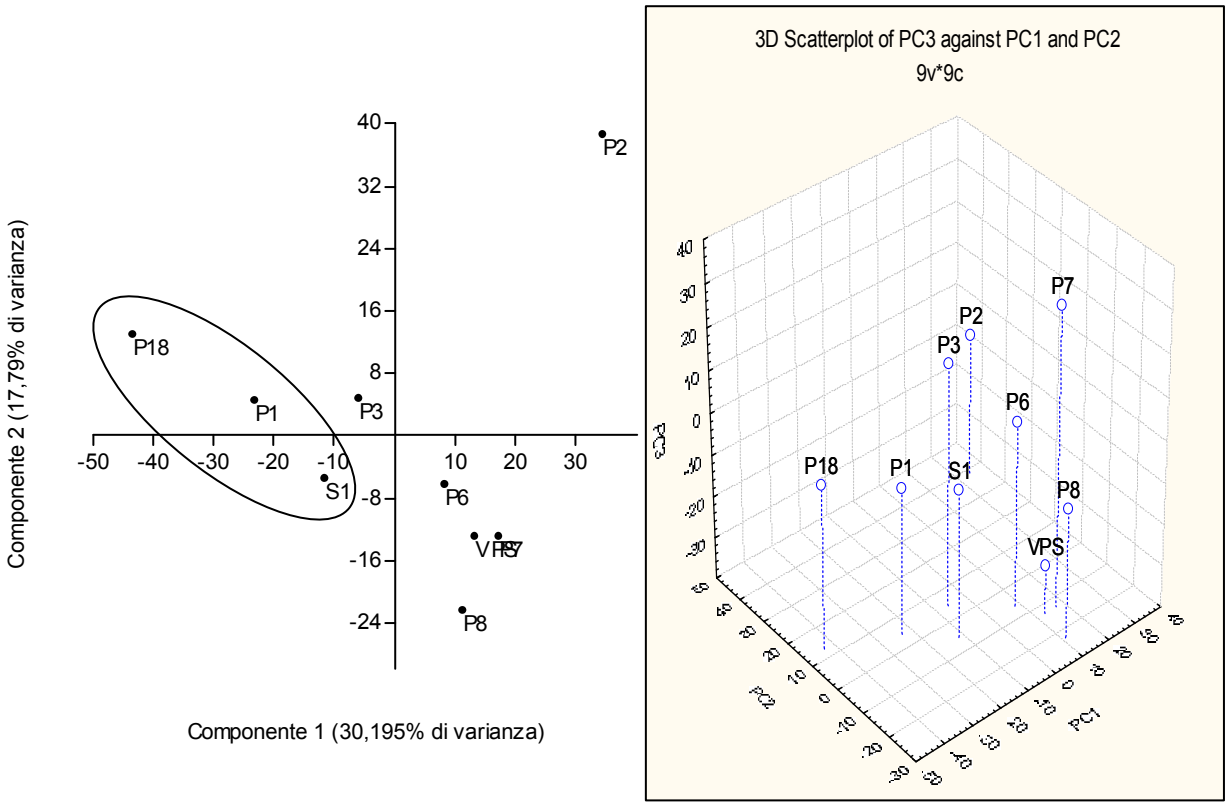

Figura 12. 2D e 3D *scatterplot* PCA dei dati T-RFLP.

Inoltre, dai profili di T-RFLP ottenuti dalle digestioni con i due enzimi di restrizione *Alu*I ed *Hin*6I (Fig. 13) sono stati calcolati i seguenti indici di diversità: l'indice di Simpson (1-D), l'indice di Shannon (H) e *Buzas and Gibson's evenness* (Fig. 14). Sono riportate significative differenze tra le comunità microbiche in esame; il pozzo P6 presenta i valori più alti per tutti gli indici calcolati (indice di Simpson 0,9648; indice di Shannon 3,874; *Buzas and Gibson's evenness* 0,3914) mentre i valori più bassi sono registrati per il pozzo P18 (indice di Simpson 0,8958; indice di Shannon 2,944; Buzas and Gibson's evenness 0,2021).

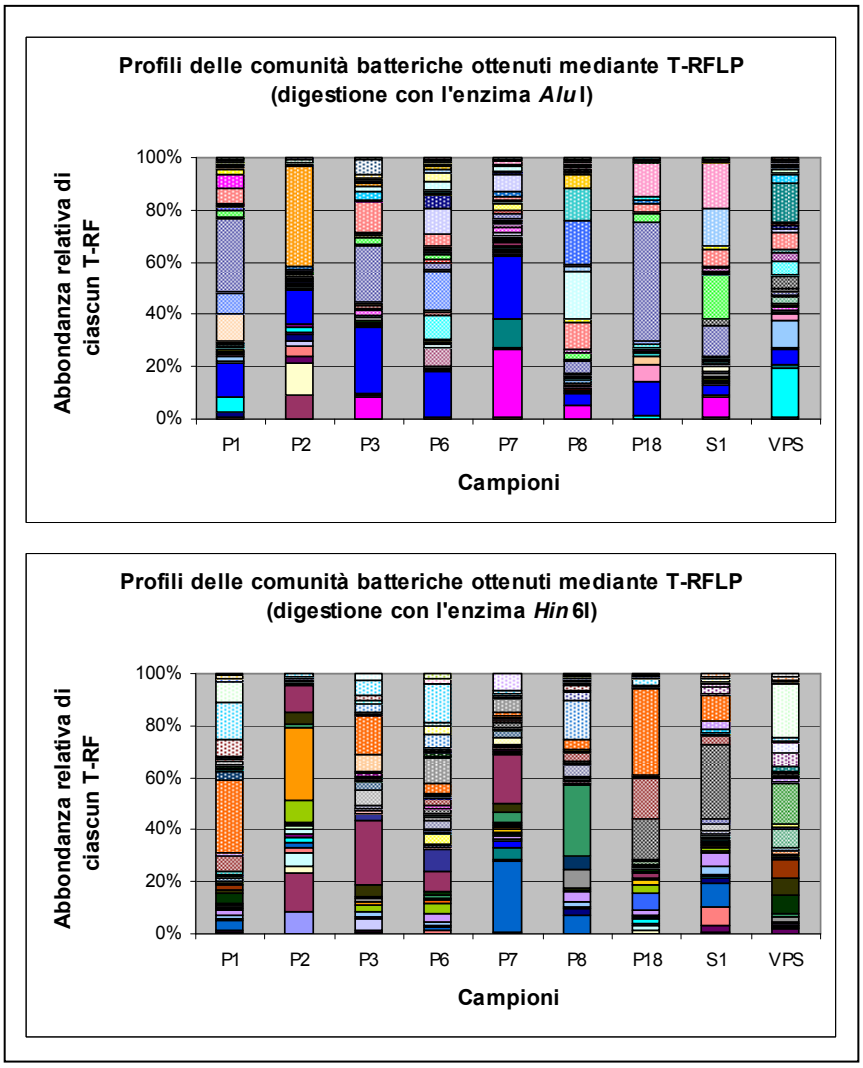

Figura 13. Profili delle comunità batteriche ottenuti dall'analisi T-RFLP.

	P1	P2	P3	P6	P7	P8	P18	S1	VPS
Simpson_1-D	0.9393	0.9194	0.9393	0.9648	0.9312	0.9465	0.8958	0.945	0.9554
Shannon_H	3.493	3.086	3.396	3.874	3.404	3.508	2.944	3.504	3.669
Evenness_e^H/S	0.2455	0.3266	0.3317	0.3914	0.2685	0.2783	0.2021	0.3138	0.3268

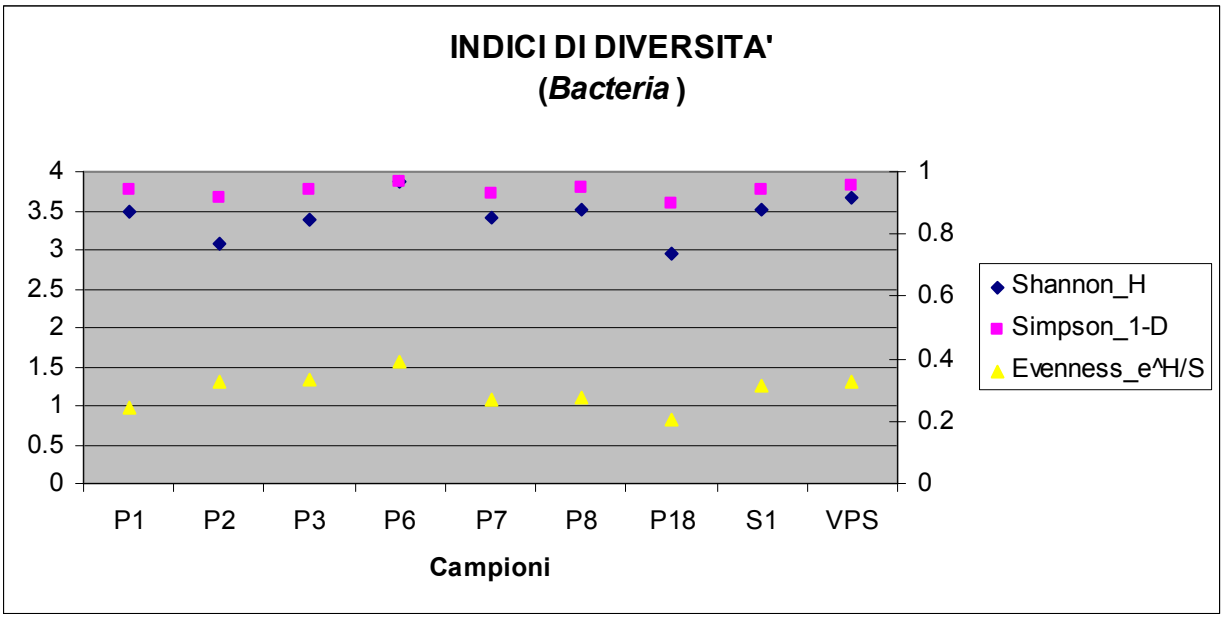

Figura 14. Valori degli indici di diversità calcolati per i dati T-RFLP per i *Bacteria*.

Nel caso degli *Archaea*, nel pozzo P27 non è stato rinvenuto alcun microrganismo appartenente a tale dominio. Negli altri punti campionati invece, i profili di comunità ottenuti dalle due tecniche di *fingerprinting* genetico utilizzate sono risultati differenti (i campioni P6 e P18 non sono stati analizzati mediante T-RFLP in seguito a problemi nella reazione di PCR) (Figg. 15, 16): i *clusters* ottenuti dall'elaborazione dei dati di T-RFLP e dei profili di DGGE presentano infatti un basso grado di sovrapposizione. In ogni caso ai fini specifici della presente ricerca anche i risultati ottenuti dall'analisi degli *Archaea* confermano un grado di similarità relativamente basso tra le comunità rinvenute nei differenti punti di campionamento. I valori dei tre indici di diversità calcolati sulla base dei dati di T-RFLP confermano le differenze tra le comunità di *Archaea* analizzate (Fig. 17).

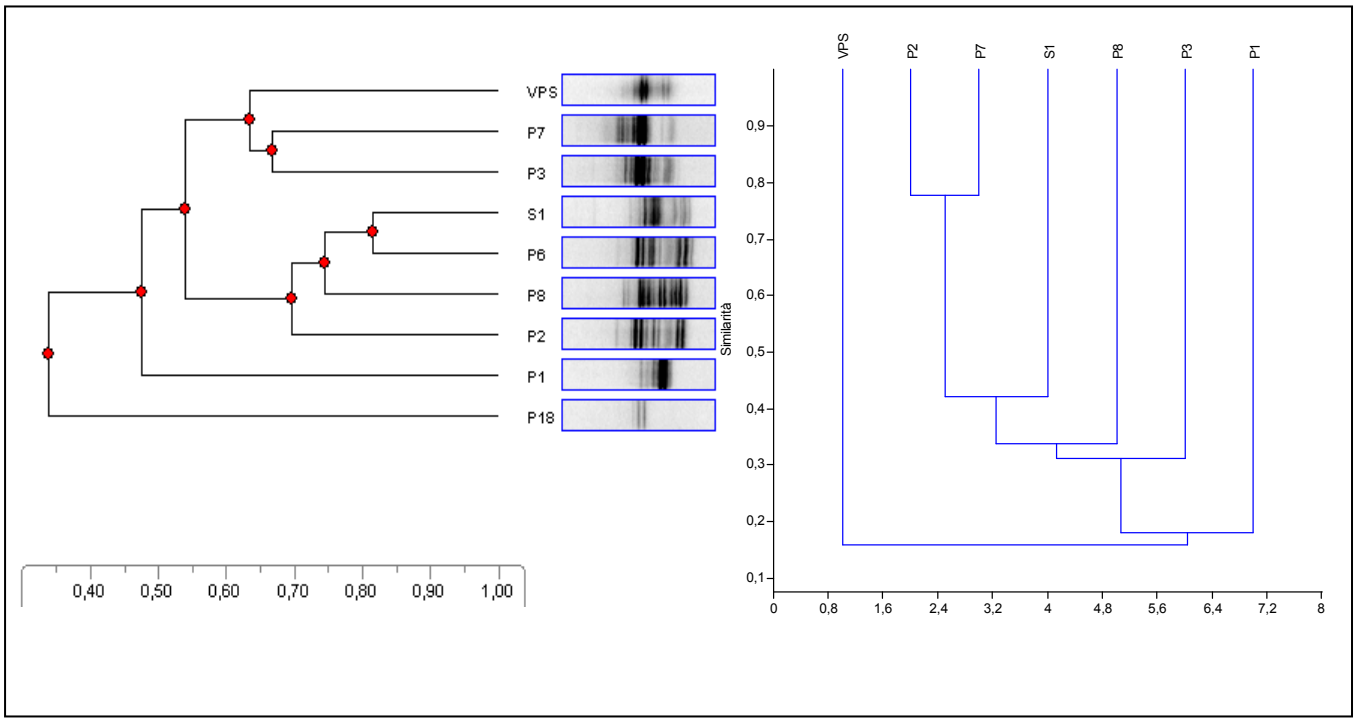

Figura 15. A sinistra: dendrogramma profili DGGE per gli *Archaea*. A destra: dendrogramma dati T-RFLP (UPGMA *algorithm* e Bray-Curtis *measure for abundance data*).

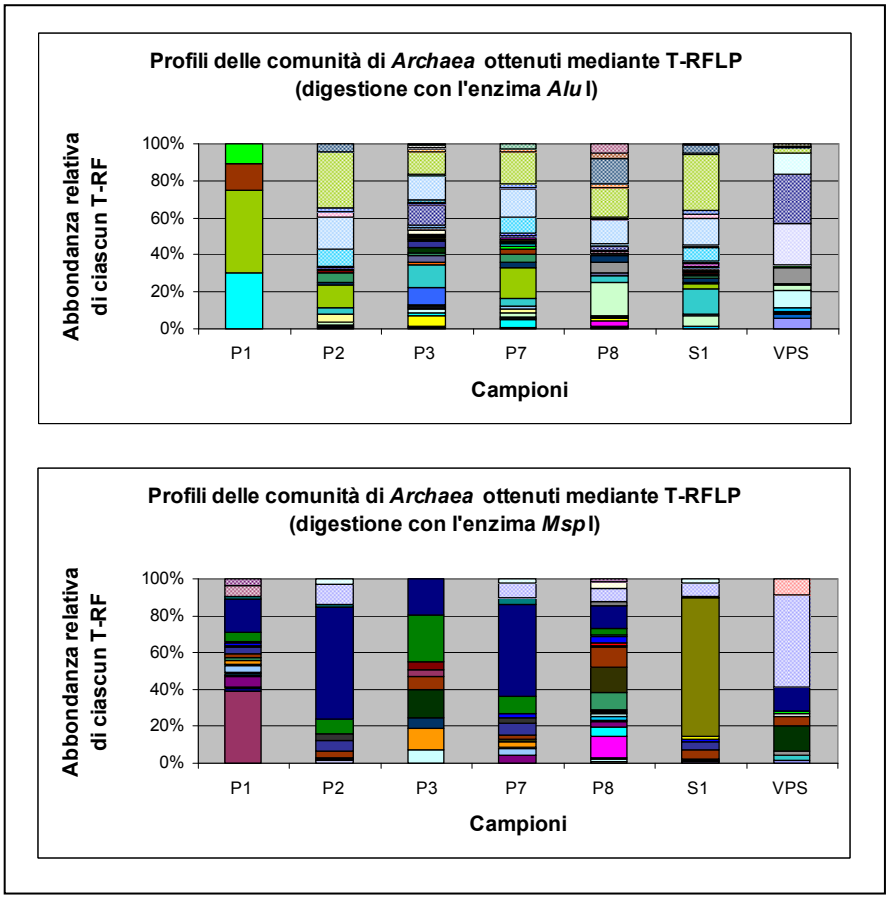

Figura 16. Profili delle comunità di *Archaea* ottenuti dall'analisi T-RFLP.

	P1	P2	P3	P7	P8	S1	VPS
Simpson_1-D	0.8687	0.8616	0.9416	0.9065	0.953	0.8191	0.8873
Shannon_H	2.424	2.555	3.208	2.989	3.419	2.462	2.586
Evenness_e^H/S	0.3529	0.429	0.3926	0.4732	0.407	0.2728	0.5105

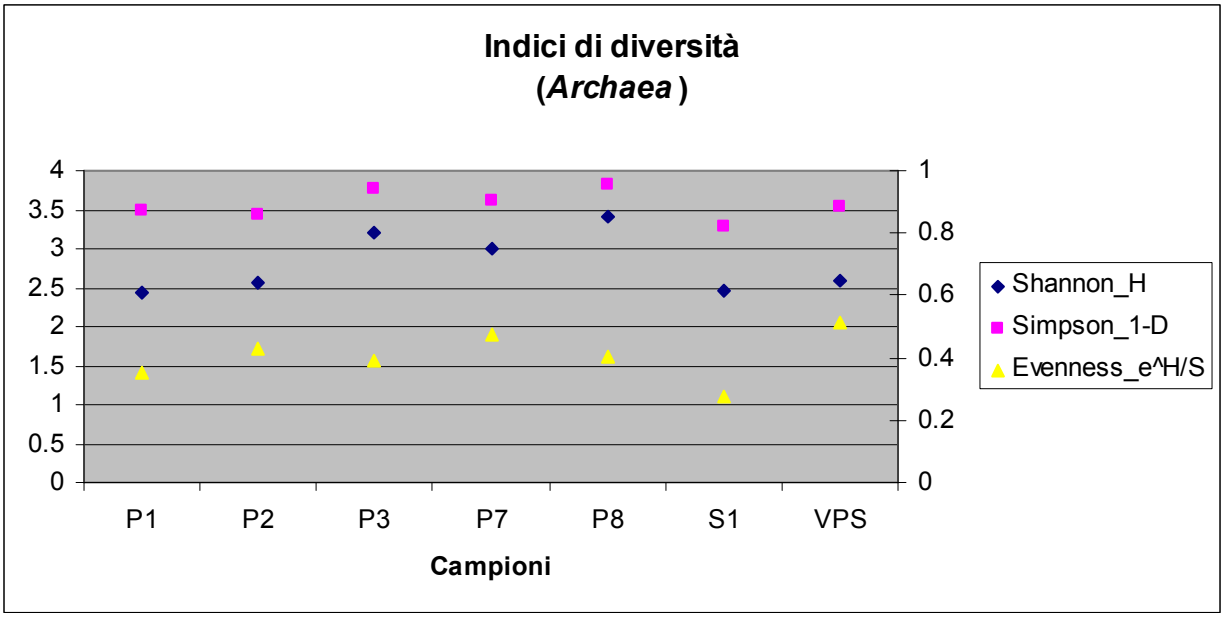

Figura 17. Valori degli indici di diversità calcolati per i dati T-RFLP per gli *Archaea*.

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nell'area campione di "Acqua dei Faggi" le indagini biomolecolari hanno consentito, non solo di caratterizzare le comunità microbiche in acque sorgive ed in acque di falda, ma soprattutto, ai fini della presente ricerca, di accertare che le comunità microbiche stesse possono essere usate come efficaci traccianti naturali per indagare sull'origine di aloclini nei corpi idrici sotterranei, quanto meno nei casi in cui la genesi dell'aloclino è funzione anche di una diversificazione dei caratteri pedologici e di uso del suolo nell'ambito di un medesimo sistema acquifero. Nel caso in esame, infatti, l'aloclino non è solo funzione della miscela tra le acque di neo-infiltrazione e le acque di falda preesistenti nell'acquifero, ma anche, se non soprattutto, del fatto che le suddette acque di neo-infiltrazione attraversano ed interagiscono con un suolo poco diffuso nel sistema acquifero analizzato, nonché caratterizzato da particolari caratteri fisico-chimici che possono influenzare lo sviluppo di una peculiare comunità microbica (vedi la presenza di batteri acetato-assimilatori).

Nell'area campione dell'isola d'Ischia le indagini biomolecolari hanno consentito di caratterizzare le comunità microbiche di acque sotterranee termali ed ipertermali, di affinare le conoscenze circa la struttura ed i meccanismi di funzionamento del complesso acquifero vulcanico, nonché di analizzare i rapporti di interazione tra falda e mare in zone costiere, in presenza di pompaggio da pozzi. La *facies* batterica presente nel pozzo HM sembra essere interamente correlata ad acque termali calde ed ambienti ricchi in zolfo, in accordo con i risultati provenienti da indagini idrochimiche effettuate in questa porzione dell'isola (Chiodini et al., 2004), mentre nel pozzo HP la comunità microbica presente è il risultato del miscelamento di due differenti componenti: acque termali calde ed acque di intrusione marina. Nelle acque campionate nel pozzo HP, almeno due delle sequenze rinvenute appartengono a microrganismi correlati ad ambienti acquatici ipersalini freddi. Questi risultati, insieme a quelli provenienti da indagini idrogeologiche che hanno evidenziato un cono di depressione della falda (molti metri al di sotto del livello del mare) e linee di flusso dirette dalla costa verso il pozzo HP, suggeriscono che il fenomeno di ingressione marina, determinata da pompaggio nei pozzi, possa giocare un ruolo chiave in questa porzione dell'isola. Questa considerazione è ulteriormente supportata da indagini geochimiche che hanno evidenziato tale fenomeno in prossimità di questa area costiera (Celico et al., 1999, Morell et al., 2008).

Per quanto riguarda la componente termale, differenze sono state riscontrate tra le comunità batteriche. Nelle acque relative al pozzo HM, campionate nel settore occidentale dell'isola, è stato rinvenuto il batterio ipertermofilo *Hydrogenobacter subterraneus*, mentre nelle

acque campionate in HP non è stata rinvenuta alcuna sequenza di batteri ipertermofili. Tali risultati sono in accordo con le differenze in temperatura osservate tra i due pozzi (circa 25° C) e suggeriscono che i due pozzi si attestano entro due porzioni del sistema idrotermale dove esistono differenti temperature all'equilibrio. Il fenomeno di ingressione marina determinato da pompaggio nei pozzi non dovrebbe svolgere un ruolo significativo nel determinare tali differenze in quanto rappresenta un fenomeno recente. Per questo, le differenti temperature di equilibrio all'interno dell'acquifero vulcanico sono molto probabilmente dovute al miscelamento, in diverse proporzioni, tra fluidi idrotermali e acque di infiltrazione locale: maggiore è il volume di fluidi termali ascendenti, rispetto al volume delle acque di infiltrazione locale, maggiore è la temperatura locale della falda. Differenze in termini di permeabilità nell'ambito delle differenti rocce vulcaniche svolgono un ruolo cruciale nel governare le proporzioni di miscelamento tra la componente ascendente termale e le acque di infiltrazione efficace (Celico et al., 1999). Tuttavia, bisogna anche tener conto del comportamento idrogeologico delle zone di faglia all'interno del basamento carbonatico delle rocce vulcaniche, in quanto le zone di faglia possono agire come condotti (agevolando la risalita dei fluidi; Drogue, 1985) o come barriere che impediscono totalmente o parzialmente il flusso dei fluidi (Celico et al., 2006). Infatti, in accordo a precedenti ipotesi, (Finetti & Morelli, 1974), è stato dimostrato (Zollo et al., 2003; Judenherc & Zollo, 2004) che esiste una unità carbonatica al di sotto delle baie di Napoli e Pozzuoli ad una profondità di circa 2,5-3 Km, mentre non esiste una camera magmatica a profondità minori di 6 Km. Quindi, la camera magmatica profonda è all'interno o al di sotto del basamento carbonatico e il sistema di alimentazione dell'intera caldera ischitana dovrebbe essere direttamente controllato dalle faglie all'interno dell'unità carbonatica, in accordo con i risultati ottenuti nei pressi della caldera dei Campi Flegrei e del Vesuvio (Judenherc & Zollo, 2004). L'interazione tra fluidi idrotermali e le rocce carbonatiche nel lato occidentale dell'isola d'Ischia è supportata dal rinvenimento di sequenze di *ε-proteobacteria* recentemente isolati da differenti acquiferi carbonatici in cui circolano acque ad elevato tenore in solfuri. Tutto ciò, visto a scala di bacino, supporta l'ipotesi dell'esistenza di differenti distretti idrotermali alimentati dalla stessa camera magmatica (come ipotizzato da Inguaggiato et al., 2000), dove le differenze nei caratteri fisico-chimici delle acque sotterranee sono determinate da differenze in termini di permeabilità delle rocce vulcaniche e delle zone di faglia nel basamento carbonatico.

Nell'area campione di "Pozzo del Sale" le indagini biomolecolari hanno consentito di caratterizzare le comunità microbiche di differenti tipologie di acque sotterranee (oligominerali, saline ed ipersaline fredde) coesistenti in un ristretto areale, nonché di accertare che le comunità stesse riescono a fornire ottime indicazioni in merito al grado di interconnessione idrogeologica

all'interno di un sistema acquifero complesso, quale quello preso in esame. L'analisi delle comunità batteriche ha infatti mostrato significative differenze tra le *facies* microbiche presenti nelle acque campionate nei pozzi e nella sorgente. L'analisi dei profili di DGGE e la *cluster analysis* dei dati di T-RFLP hanno evidenziato la presenza di differenti raggruppamenti con valori di similarità relativamente bassi. Inoltre, i *clusters* ottenuti comprendono pozzi che differiscono sostanzialmente in termini di localizzazione, profondità e chimismo delle acque. I risultati ottenuti, enfatizzati da differenze macroscopiche anche tra pozzi ubicati a pochi metri di distanza e caratterizzati dal medesimo sviluppo verticale, possono essere spiegati solo chiamando in causa una notevole frammentazione dei circuiti idrici sotterranei e, quindi, ipotizzando che l'acquifero sia costituito da un mezzo discontinuo alla scala decametrica ed ettometrica.

In definitiva, l'acquifero analizzato può essere considerato come un mosaico di microcosmi scarsamente interconnessi, ognuno influenzato da molti fattori. Alcuni di questi, come il flusso idraulico, promuove l'interconnessione, ma, evidentemente, l'efficacia di tale interconnessione è scala-dipendente e tende ad aumentare procedendo verso una scala quanto meno chilometrica. Altri fattori, come l'uso del suolo, la litologia e le caratteristiche chimiche delle acque, favoriscono la diversificazione e lo sviluppo di caratteri ecologici sito-specifici.

In sintesi, i risultati principali conseguiti nel corso del dottorato possono essere schematizzati come segue.

All'interno degli ambienti acquatici analizzati è stata riscontrata la presenza di comunità microbiche "sito-specifiche", piuttosto che "sistema-specifiche", ed il carattere "sito-specifico" di tali comunità è apparso fortemente influenzato anche da fattori ambientali arealmente poco rappresentativi nell'ambito dei sistemi acquiferi esaminati. Ciò porta a ritenere che, contrariamente a quanto riportato in alcuni lavori recenti, non esista necessariamente un'unica comunità microbica autoctona acquatica all'interno di sistemi naturali che possono essere considerati un "unicum" dal punto di vista idrogeologico. Tali risultanze consentono però di utilizzare le comunità microbiche, quanto meno in alcuni contesti ambientali, come validi ed efficaci traccianti naturali delle dinamiche idrogeologiche, soprattutto se affiancate ad altri classici traccianti naturali, chimici ed isotopici.

Dal punto di vista metodologico è emerso che l'attesa frammentazione e diversificazione delle comunità microbiche all'interno di un sistema acquatico può essere accertata e caratterizzata soprattutto mediante il prelievo di campioni in punti ubicati anche all'interno del sistema stesso e non esclusivamente presso il collettore principale (ad esempio, una sorgente) del corpo idrico sotterraneo.

L’ulteriore affinamento di quanto sviluppato nel corso della presente ricerca passerà attraverso l’isolamento, la crescita e lo studio dei caratteri fisiologici dei microrganismi identificati nei contesti ambientali di volta in volta oggetto di studio, al fine di rendere quanto più vincolante possibile la presenza dei microrganismi stessi rispetto a specifici caratteri fisici e/o chimici delle diverse componenti dei sistemi acquiferi.

5 BIBLIOGRAFIA

- Avrahami, S., Liesack, W., Conrad, R. (2003) Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology*, **5**, 691-705.
- Baniulyte, D., Favila, E., Kelly, J.J. (2009) Shifts in microbial community composition following surface application of dredged river sediments. *Microbial Ecology*, **57**, 160-169.
- Bano, N. & Hollibaugh, J.T. (2002) Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 505-518.
- Bertin, L., Colao, M.C., Ruzzi, M., Fava, F. (2004) Performances and microbial features of a granular activated carbon packed-bed biofilm reactor capable of an efficient anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, **48**, 413-423.
- Bertin, L., Colao, M.C., Ruzzi, M., Marchetti, L., Fava, F. (2006) Performances and microbial features of an aerobic packed-bed biofilm reactor developed to post-treat an olive mill effluent from an anaerobic GAC reactor. *Microbial Cell Factories*, **5,** 16.
- Bonjour, F. & Aragno, M. (1986) Growth of thermophilic, obligatory chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacteria related to *Hydrogenobacter* with thiosulfate and elemental sulfur as electron and energy source. *FEMS Microbiology Letters*, **35**, 11-15.
- Burton, J.P., Cadieux, P.A., Reid, G. (2003) Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 97-101.
- Carapezza, M. L., Hauser, S., Parello, F., Scelsi, E., Valenza, M., Favara, R., Gurrieri, S. (1988) Preliminary studies on the geothermal fluids of the Island of Ischia: gas geochemistry. *Rendiconti della Società Italiana di Mineralogia e Petrologia*, **43**, 967-973.
- Celico, F., Petrella, E., Celico, P. (2006) Hydrogeological behaviour of some fault zones in a carbonate aquifer of Southern Italy: an experimentally based model. *Terra Nova*, **18**, 308-313.

- Celico, F., Capuano, P., De Felice, V., Naclerio, G. (2008) Hypersaline groundwater genesis assessment through a multidisciplinary approach: the case of Pozzo del Sale spring (southern Italy). *Hydrogeology Journal*, **16**, 1441-1451.
- Celico, P., Stanzione, D., Esposito, L., Formica, F., Piscopo, V., De Rosa, B. (1999) La complessità idrogeologica di un'area vulcanica attiva: l'isola di Ischia (Napoli-Campania). *Bollettino della Società Geologica Italiana*, **118**, 485–504.
- Chaudhary, A., Haack, S.K., Duris, J.W., Marsh, T.L. (2009) Bacterial and archaeal phylogenetic diversity of a cold sulfur-rich spring on the shoreline of Lake Erie, Michigan. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 5025-5036.
- Chiodini, G., Avino, R., Brombach, T., Caliro, S., Cardellini, C., De Vita, S., Frondini, F., Granirei, D., Marotta, E., Ventura, G. (2004) Fumarolic and diffuse soil degassing west of Mount Epomeo, Ischia, Italy. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **133**, 291-309.
- Christensen, J.E., Reynolds, C.E., Shukla, S.K., Reed, K.D. (2004) Rapid molecular diagnosis of *Lactobacillus* bacteremia by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Clinical Medicine & Research*, **2**, 37-45.
- Cocolin, L. & Comi, G. (2005) Use of a culture-independent molecular method to study the ecology of *Yersinia* spp. in food. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 71-82.
- Corniello, A., De Riso, R., Ducci, D., Napolitano, P. (1994) Salt water intrusion in the Ischia Island (Southern Italy). *Proceedings of the 13th Salt-Water intrusion meeting*, Cagliari, Italy, 5-10 June 1994, 363-371.
- Crump, B.C., Kling, G.W., Bahr, M., Hobbie, J.E. (2003) Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2253-2268.
- Donskey, C.J., Hujer, A.M., Das, S.M., Pultz, N.J., Bonomo, R.A., Rice, L.B. (2003) Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *Journal of Microbiological Methods*, **54**, 249-256.
- Drogue, C. (1985) Geothermal gradients and ground water circulation in fissured and karstic rocks: the role played by the structure of the permeable network. *Journal of Geodynamics*, **4**, 219-231.
- Edlund, A., Soule, T., Sjöling, S., Jansson J.K. (2006) Microbial community structure in polluted Baltic Sea sediments. *Environmental Microbiology*, **8**, 223-232.
- Ercolini, D., Hill, P.J., Dodd, C.E.R. (2003) Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 3540-3548.

- FAO. (1988) Soil map of the World, Revised Legend, Reprinted with corrections, World Soil Resources Report, 60, Roma, Italy.
- Farnleitner, A.H., Wilhartitz, I., Ryzinska, G., Kirschner, A.K.T., Stadler, H., Burtscher, M.M., Hornek, R., Szewzyk, U., Herndl, G., Mach, R.L. (2005) Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environmental Microbiology*, **7**, 1248-1259.
- Fedi, S., Tremaroli, V., Scala, D., Peréz-Jiménez, J.R., Fava, F., Young, L., Zannoni, D. (2005) T-RFLP analysis of bacterial communities in cyclodextrin-amended bioreactors developed for biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Research in Microbiology*, **156**, 201-210.
- Finetti, I., Morelli, C. (1974) Esplorazione sismica a riflessione dei Golfi di Napoli e Pozzuoli (Gephysical exploration of gulfs of Napoli and Pozzuoli). *Bollettino di Geofisica Teorica e Applicata*, **16**, 175-222.
- Gich, F., Schubert, K., Bruns, A., Hoffelner, H., Overmann, J. (2005) Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5908-5919.
- Gillot, P.Y., Chiesa, S., Pasquarè, G., Vezzoli, L. (1982) 33,000 yr K/Ar dating of the volcano-tectonic horst of the island of Ischia, Gulf of Naples. *Nature*, **229**, 242-245.
- Gray, N.D., Miskin, I.P., Kornilova, O., Curtis, T.P., Head, I.M. (2002) Occurrence and activity of *Archaea* in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology*, **4**, 158-168.
- Gürtler, V., Barrie, H.D., Mayall, B.C. (2002) Denaturing gradient gel electrophoretic multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *Electrophoresis*, **23**, 3310-3320.
- Hartmann, M. & Widmer, F. (2006) Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Applied and Environmental Microbiology***, 72**, 7804-7812.
- Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W. (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, **35**, 1-21.
- Hjorleifsdottir, S., Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, G.O., Holst, O., Kristjansson, J.K. (2001) Species composition of cultivated and noncultivated bacteria from short filaments in an Icelandic hot spring at 88°C. *Microbial Ecology*, **42**, 117-125.

- Hobel, C.F.V., Marteinsson, V.T., Hreggvidsson, G.O., Kristjánsson, J.K. (2005) Investigation of the microbial ecology of intertidal hot springs by using diversity analysis of 16S rRNA and chitinase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 2771-2776.
- Horz, H.-P., Barbrook, A., Field, C.B., Bohannan, B.J.M. (2004) Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *PNAS*. **101**, 15136-15141.
- Hoshino, T., Terahara, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Inamori Y. (2005) Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, 1165-1175.
- Hreggvidsson, G.O., Skirnisdottir, S., Smit, B., Hjorleifsdottir, S., Marteinsson, V.Th., Petursdottir, S., Kristjansson, J.K. (2006) Polyphasic analysis of *Thermus* isolates from geothermal areas in Iceland. *Extremophiles*, **10**, 563-575.
- Hudson, J.A. (1986) The taxonomy and ecology of the genus *Thermus*. PhD dissertation, University of Waikato, Hamilton, New Zealand.
- Inguaggiato, S., Pecoraino, G., D'Amore, F. (2000) Chemical and isotopical characterisation of fluid manifestations of Ischia Island (Italy). *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **99**, 151-178.
- Judenherc, S., Zollo, A. (2004) The Bay of Naples (southern Italy): Constraints on the volcanic structures inferred from a dense seismic survey. *Journal of Geophysical Research*, **109**, B10312, doi:10.1029/2003JB002876.
- Kolbert, C.P. & Persing, D.H. (1999) Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, **2**, 299-305.
- Lambrakis, N.J. & Stamatis, G.N. (2008) Contribution to the study of thermal waters in Greece: chemical patterns and origin of thermal water in the thermal springs of Lesvos. *Hydrological Processes*, **22**, 171-180.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow). John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, United Kingdom, 115-175.
- Layer, F., Ghebremedhin, B., Moder, K.A., König, W., König, B. (2006) Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**, 2824-2830.
- Lerman, L.S., Fischer, S.G., Hurley, I., Silverstein, K., Lumelsky, N. (1984) Sequence-Determined DNA Separations. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, **13**, 399-423.

- Lima, A., Cicchella, D., Di Francia, S. (2003) Natural contribution of harmful elements in thermal groundwaters of Ischia Island (southern Italy). *Environmental Geology*, **43**, 930-940.
- Macalady, J.L., Lyon, E.H., Koffman, B., Albertson, L.K., Meyer, K., Galdenzi, S., Mariani, S. (2006) Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 5596-5609.
- Marsh, T.L. (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, **2**, 323-327.
- McBain, A.J., Bartolo, R.G., Catrenich, C.E., Charbonneau, D., Ledder, R.G., Gilbert, P. (2003) Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 655-664.
- Morell, I., Pulido-Bosch, A., Daniele, L., Cruz, J.V. (2008) Chemical and isotopic assessment in volcanic thermal waters: Cases of Ischia (Italy) and São Miguel (Azores, Portugal). *Hydrological Processes*, **22**, 4386-4399.
- Moss, J.A., Nocker, A., Lepo, J.E., Snyder, R.A. (2006) Stability and change in estuarine biofilm bacterial community diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 5679-5688.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695-700.
- Naclerio, G., Petrella, E., Nerone, V., Allocca, V., De Vita, P., Celico, F. (2008) Influence of topsoil of pyroclastic origin on microbial contamination of groundwater in fractured carbonate aquifers. *Hydrogeology Journal*, **16**, 1057-1064.
- Nicol, G.W., Glover, L.A., Prosser, J.I. (2003) The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environmental Microbiology*, **5**, 152-162.
- Nielsen, E. M., Engberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C.H., On, S.L.W. (2000) Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 3800-3810.

- Norris, T.B., Wraith, J.M., Castenholz, R.W., McDermott, T.R. (2002) Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Applied and Environmental Microbiology,* **68**, 6300-6309.
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.L., Torsvik, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3367-3373.
- Orsi, G., Gallo, G., Civetta, L. (1990) Evoluzione geologica e magmatologica dell'isola d'Ischia. *Plinius*, **4**, 37.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, **2**, 39-50.
- Panichi, C., Bolognesi, L., Ghiara, M.R., Noto, P., Stanzione, D. (1992) Geothermal assessment of the island of Ischia (southern Italy) from isotopic and chemical composition of the delivered fluids. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **49**, 329-348.
- Peréz-Jiménez, J.R. & Kerkhof L.J. (2005) Phylogeography of sulphate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*drsAB*). *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1004-1011.
- Perreault, N.N., Andersen, D.T., Pollard, W.H., Greer, C.W., Whyte, L.G. (2007) Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high Arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 1532–1543.
- Pester, M., Friedrich, M.W., Schink, B., Brune, A. (2004) *pmoA*-based analysis of methanotrophs in a littoral lake sediment reveals a diverse and stable community in a dynamic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 3138-3142.
- Petrella, E., Falasca, A., Celico, F. (2008) Natural-gradient tracer experiments in epikarst: a test study in the Acqua dei Faggi experimental site, southern Italy. *Geofluids*, **8**, 159-166.
- Petrella, E., Naclerio, G., Falasca, A., Bucci, A., Capuano, P., De Felice, V., Celico, F. (2009) Non-permanent shallow halocline in a fractured carbonate aquifer, southern Italy. *Journal of Hydrology*, **373**, 267-272.
- Pitulle, C., Yang, Y., Marchiani, M., Moore, E.R.B., Siefert, J.L., Aragno, M., Jurtshuk, P. Jr, Fox, G.E. (1994) Phylogenetic position of the genus *Hydrogenobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**, 620-626.

- Poli, S., Chiesa, S., Gillot, P.Y., Gregnanin, A., Guichard, F., Stella, R. (1987) Major and trace element variation versus time in the volcanic product of Ischia (Gulf of Naples, Italy): evidences of successive magmatic cycles. *Contributi di Mineralogia e Petrologia*, **95**, 322.
- Porter, M.L., Summers Engel, A., Kane, T.C., Kinkle, B.K. (2009) Productivity-diversity relationships from chemolithoautotrophically based sulfidic karst systems. *International Journal of Speleology*, **38**, 27-40.
- Pronk, M., Goldscheider, N., Zopfi, J. (2009) Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. *Hydrogeology Journal*, **17**, 37-48.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., Vaughan, E.E. (2002) Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1882-1892.
- Rittmann, A. & Gottini, V. (1980) L'isola d'Ischia. Geologia. *Bollettino del Servizio Geologico d'Italia*, **101**, 131-274.
- Rogers, G.B., Hart, C.A., Mason, J.R., Hughes, M., Walshaw, M.J., Bruce K.D. (2003) Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients: 16S ribosomal DNA (rDNA) length heterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 3548-3558.
- Saikaly, P.E., Stroot, P.G., Oerther, D.B. (2005) Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5814-5822.
- Sánchez, J.I., Rossetti, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Giraffa, G. (2006) Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *Journal of Microbiological Methods*, **65**, 268-277.
- Sekiguchi, H., Watanabe, M., Nakahara, T., Xu, B., Uchiyama, H. (2002) Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5142-5150.
- Settanni, L., Valmorri, S., van Sinderen, D., Suzzi, G., Paparella, A., Corsetti, A. (2006) Combination of multiplex PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated *Lactobacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 3793-3796.

- Stamper, D.M., Walch, M., Jacobs, R.N. (2003) Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 852-860.
- Suzuki, M.T. & Giovannoni S.J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 625-630.
- Suzuki, M., Rappé, M.S., Giovannoni, S.J. (1998) Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**,4522-4529.
- Takai, K., Komatsu, T., Horikoshi, K. (2001) *Hydrogenobacter subterraneus* sp. nov., an extremely thermophilic, heterotrophic bacterium unable to grow on hydrogen gas, from deep subsurface geothermal water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 1425-1435.
- Tedesco, D. (1996) Chemical and isotopic investigations of fumarolic gases from Ischia island (southern Italy): Evidences of magmatic and crustal contribution. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **74**, 233-242.
- Theelen, B., Silvestri, M., Guého, E., van Belkum, A., Boekhout, T. (2001) Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP^{Tm}), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Research*, **1**, 79-86.
- Vezzoli, L. (1988) *Island of Ischia*. C.N.R. *Quaderni Ricerca Scientifica*, **114**, Roma, Italy.
- Winter, C., Hein, T., Kavka, G., Mach, R.L., Farnleitner, A.H. (2007) Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a whole-river approach. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 421-431.
- Yoshie, S., Makino, H., Hirosawa, H., Shirotani, K., Tsuneda, S., Hirata, A. (2006) Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**, 182-189.
- Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. (2002) Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology* **, 68**, 3401-3407.

- Zollo, A., Judenherc, S., Auger, E., D'Auria, L., Virieux, J., Capuano, P., Chiarabba, C., de Franco, R., Makris, J., Michelini, A., Musacchio, G. (2003) Evidence for the buried rim of Campi Flegrei caldera from 3-d active seismic imaging. *Geophysical Research Letters* **30**, doi:10.1029/2003GL018173.

ALLEGATO A

Journal of Hydrology 373 (2009) 267–272

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hydrology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhydrol

Non-permanent shallow halocline in a fractured carbonate aquifer, southern Italy

Emma Petrella [a,*], Gino Naclerio [a], Antonio Falasca [a], Antonio Bucci [a], Paolo Capuano [b], Vincenzo De Felice [a], Fulvio Celico [a]

[a] Università degli Studi del Molise, Groundwater Research Center, Contrada Fonte Lappone, 86090 Pesche (IS), Italy
[b] Università degli Studi di Salerno, Dipartimento di Matematica e Informatica, Via Ponte Don Melillo, 84084 Fisciano (SA), Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 September 2008
Received in revised form 7 April 2009
Accepted 30 April 2009

This manuscript was handled by L. Charlet, Editor-in-Chief, with the assistance of Jiin-Shuh Jean, Associate Editor

Keywords:
Carbonate rock
Fractured aquifer
Halocline
Groundwater

SUMMARY

We carried out hydrogeological, geophysical, hydrochemical, isotopic, and molecular biological investigations in a fractured carbonate aquifer in southern Italy to verify if prolonged variations in groundwater salinity with depth can be due to mixing processes between fresh infiltration water and groundwater.

All investigations revealed the formation of a non-permanent halocline at the experimental site, whose thickness and shape varies over time. Variations in thickness and shape are influenced by infiltration processes. Three main types of Electrical Conductivity (EC) profiles were found during the research period. In the high-flow period, the EC profile consisted of a transition layer and a nearly homogeneous higher salinity groundwater layer, and no mixed layer was observed. A nearly-homogeneous mixed layer was detected in the low-flow period, excluding the late recession when the EC profile was characterized by a higher salinity groundwater layer and a negligible transition layer. The EC profile through the transition layer was approximately symmetric and linear, probably due to a velocity shear across this layer. The velocity shear was probably caused by the difference in opening-porosity detected between the upper and lower carbonate bedrock through geophysical investigations.

The investigated phenomenon is due to water that infiltrates very close to the observation well. In fact: (a) the isotopic composition of the lower salinity groundwater layer in early recharge 2007/2008 ($\delta^{18}O = -8.12‰$; $\delta^{2}H = -49.92‰$) is very close to the composition of rainwater collected in the same period near the observation well ($\delta^{18}O = -8.19‰$; $\delta^{2}H = -51.35‰$); (b) the C_{TIC} composition in the lower salinity groundwater layer (−15,96‰) is very close to the composition (−15.77‰) in the infiltration water collected at the bottom of the soil medium, close to the observation well; (c) the lower salinity groundwater layer is characterized by significant concentrations of acetate (up to 4.5 mg/L) as well as the saturated paste extracts obtained only from the soil medium collected close to observation well (up to 110 mg/L); (d) in the lower salinity groundwater layer acetate-assimilating bacteria belonging to *Betaproteobacteria* and *Bacteroidetes* were found, further supporting that this groundwater layer significantly interacts with the soil medium described above. Similar mean ^{3}H contents in local rainwater (4.6 TU), in the lower salinity groundwater layer (4.5 TU), in the higher salinity groundwater layer (4.5 TU) and in spring water (4.4 TU) clearly show that the halocline formation is not influenced by differences in residence times.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

In fractured aquifers, variations in groundwater salinity with depth have been observed in the proximity of more transmissive fractures (Morin et al., 1997; Cook et al., 1999). Thus, this type of geophysical logging, coupled with other field investigations, is usually used to infer the geologic structure of a fractured aquifer and to detect the types and orientations of openings that have a major control on groundwater flow.

From a theoretical point of view, variations in groundwater salinity with depth may also be due to mixing between fresh infiltration water and groundwater. This should be similar to the effect produced by rainfall on the sea surface, where haloclines can be observed due to mixing between the fresh lens and the sea water (Price, 1979; Soloviev and Lukas, 1996; Wijesekera et al., 1999). Within a fractured aquifer, this type of halocline can be theoretically produced by infiltration water that percolates diffusely through a well-developed opening network, and joins the water table with a salinity significantly lower than that of groundwater.

The main goal of this study was to verify the effectiveness of this hypothesis, analyzing variations in groundwater salinity with depth at an observation well drilled at the Acqua dei Faggi

* Corresponding author. Tel.: +39 0874 404112; fax: +39 0874 404123.
E-mail address: emma.petrella@unimol.it (E. Petrella).

0022-1694/$ - see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jhydrol.2009.04.033

experimental site (southern Italy). Vertical profiles of electrical conductivity were interpreted taking into considerations the results of geophysical, hydrogeological, hydrochemical, isotopic and molecular biological investigations. The hydrogeological behavior of the site has never been influenced by pumping.

Description of the field site

The study area is a carbonate aquifer (Acqua dei Faggi, Longano, southern Italy; Fig. 1) formed predominantly of limestone (Monte Calvello and Monaci Formations; Cretaceous-Oligocene; De Corso et al., 1998) and subordinately of lower permeability rocks (Macchiagodena Formation; Oligocene-Burdigalian; De Corso et al., 1998). The Macchiagodena Formation consists mainly of marls and marly limestone. Limestone is exposed or lies below Vitric Andosols (as defined by the FAO, 1988) throughout the study site, excluding the area close to the well (P1) used to analyze variations of groundwater salinity with depth. At this site, the soil is classified as a Calcaric Cambisol (as defined by the FAO, 1988) and lies above the lower permeability marls and marly limestone.

The aquifer is bounded by fault zones that act as barriers to groundwater flow and compartmentalize the aquifer system. However, some fault zones allow significant groundwater flowthrough, and the interdependence of hydraulic heads up- and down-gradient of these faults has been observed (Celico et al., 2006). The aquifer behaves as a basin-in-series system, where seasonal springs occur along some fault zones (Celico et al., 2006). At the basin scale, the groundwater flows westwards towards the perennial spring (Fig. 1).

The carbonate medium is laterally and vertically well-connected in the subsurface, and the fracture spacing is sufficiently dense to apply the continuum approach to describe groundwater flow at the metric scale (Petrella et al., 2007). A significant vertical heterogeneity of the carbonate bedrock has been found, due to differences in fissuring and karstification with depth (Petrella et al., 2007). Darcy's law can be applied in epikarstic horizons with some karstification, and groundwater flow is also expected to be laminar in diffusely karstified epikarst and in the underlying fractured bedrock (Petrella et al., 2008).

The fractured limestone responds rapidly to recharge events, due to fast and diffuse rainwater infiltration. The funneling effect into larger shafts does not play an important role in the hydrogeological behavior of the aquifer (Petrella et al., 2007).

Materials and methods

Geophysical investigations

One Schlumberger Vertical Electric Sounding (VES) was performed to define the shallow underground resistivity distribution close to observation well P1 (Fig. 1). The electrode distance (AB/2 = 300 m) was limited by local morphological features, but was enough to obtain information up to a depth of several tens of meters. The soundings were modeled using a simple one-dimensional (1D) terrain structure. Due to the roughness of the topography, it was not possible to do 2D profiling. However, several 1D inversions were performed, using different initial models, to check the consistency and uniqueness of the solution. Moreover, using an existing model (Petrella et al., 2007) to compute the expected resistivity curves, an "a posteriori" check of the validity of the suggested models was performed.

Hydrogeological investigations

The hydraulic head was measured at well P1 (130 m deep and fully screened; Fig. 1) on an hourly basis, from January 2007 to April 2008. The head was recorded with a pressure transducer. Precipitation was recorded at a meteorological station on an hourly basis.

Water sampling

Rainwater

Rainwater samples for isotopic analyses were collected at two rain samplers, RWS1 and RWS2, located within the aquifer system, at 1150 and 1014 m above sea level (m asl), respectively (Fig. 1). The sampling at RWS2 was carried out on a weekly basis, from January 2007 to April 2008. RWS1 was used to collect rainwater

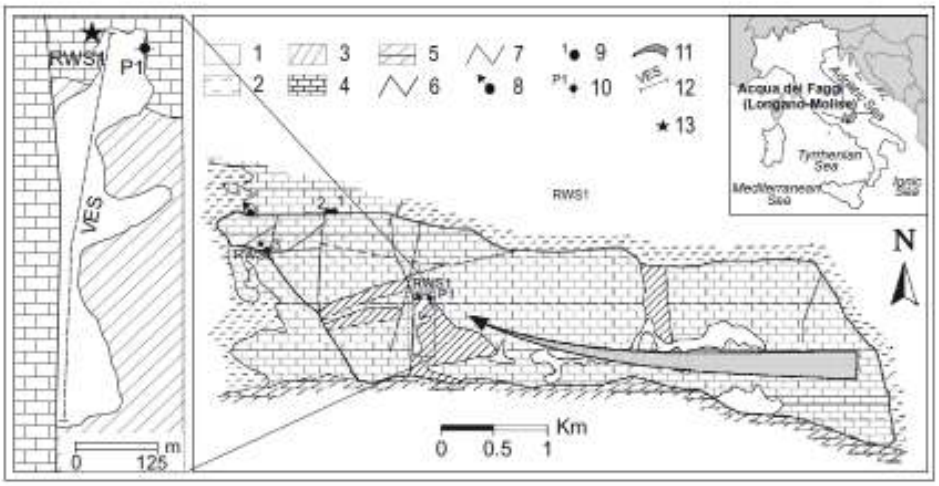

Fig. 1. Hydrogeological map (1 quaternary deposits; 2 marls and clays; 3 marls and marly limestone; 4 limestone; 5 dolostone; 6 aquifer boundary; 7 fault; 8 perennial spring; 9 seasonal spring; 10 well; 11 main groundwater flow direction; 12 Vertical Electric Sounding [VES]; 13 Rain Water Sampler [RWS]).

from all of November 2007 (early recharge 2007/2008) close to P1, and from single rainfall events in February, June and December 2007, and in January 2008.

Polyethylene bottles (10 l) containing about 300 ml of vaseline oil to prevent evaporation processes even under very hot summer conditions were used to collect the samples. Oil contamination was carefully avoided while syringing the water samples out of the bottle.

Groundwater and spring water

Groundwater and spring water samples for chemical and stable isotope ($\delta^{18}O$, $\delta^{2}H$) analyses were collected: (a) on a weekly basis at P1 (1 m below the water table) and at spring 2 (Fig. 1); and (b) on a monthly basis at P1 (at 1060 m asl). During the observation period, the seasonal spring 2 flowed from February to May 2007. Sampling for ^{3}H analyses was carried out at P1 (1 m below the water table and 1060 m asl) on May 21 and September 24, 2007, and January 14, 2008, and at spring 2 on April 1, 2008.

Sampling for $\delta^{13}C_{DIC}$ analyses was carried out at P1 (1 m below the water table) on April 1, 2008, and at the bottom of the Calcaric Cambisol, close to P1, in late March 2008, through a lysimeter.

Water samples (10 l each) for molecular biological analyses were collected on February 15, 2008 in sterile bottles at spring 2 and at P1 (1 m below the water table), and transported in a refrigerated box to the laboratory.

At P1, a stainless steel bailer was used (250 cm^3 volume) fitted with a one-way valve at the lower end and attached to 6 mm plastic tubing at the upper end. The upper end of the tubing was attached at the surface to a pump. The bailer was pressurized with air before lowering it to the chosen sampling depth. Once at the chosen depth, the pressure was released, allowing water to enter the bailer. After the bailer was withdrawn, a sample of water was transferred to a polyethylene bottle.

EC vertical profiles and chemical analyses on groundwater and spring water samples

EC vertical profiles were measured at well P1 on a weekly basis, from January 2007 to April 2008, with a downhole probe. Measurements were carried out at 1-m-depth intervals. The effectiveness of EC values was always verified through laboratory analyses.

With regard to groundwater and spring water samples, the pH measurements were performed in the laboratory with a pH electrode and the specific conductance with a WTW laboratory conductimeter. Bicarbonate was determined by titration with HCl. Major ions and acetate concentrations were determined by ion chromatography using a DIONEX ICS-1000 model connected to a DIONEX AS40 Automated Sampler. For cation preservation, samples were acidified at pH < 3 with a concentrated HNO_3 solution. The accuracy of the analyses was checked by the ionic balance. Analyses with an ionic balance of ±5% were considered acceptable.

Chemical analyses on saturated paste extracts

Eighteen samples of Vitric Andosols and six of Calcaric Cambisols were collected to carry out chemical analyses on saturated paste extracts. Saturated paste extracts provide information on the chemistry of solutes in soil solution because they more closely approximate the water content of the soil under field conditions.

Air dried <2 mm soil samples were saturated with deionized water to create a saturated paste, and the water was then extracted by centrifugation and filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter for chemical analyses. Samples (100–150 g of dried, sieved soil) were placed in beakers and deionized water was added to bring them nearly to saturation. Samples were allowed to stand overnight and were then mixed with a spatula. At saturation, the soil paste glistens as it reflects light, flows slightly when the container is tipped, and slides freely and cleanly off the spatula except for those soils with high clay contents.

Analyses included electrical conductivity (EC), alkalinity, major ions and acetate. Saturated paste extracts were analyzed by the same methods as those described for groundwater and spring water samples. Soil pH was measured on a soil water suspension (1:2.5).

Isotopic analyses

Isotopic analyses ($\delta^{18}O$, $\delta^{2}H$, $\delta^{13}C_{DIC}$, ^{3}H) were carried out at the Laboratorio di Geochimica Isotopica of the University of Parma, and at the Istituto di Geoscienze e Georisorse of the CNR, Pisa, Italy.

The analytical precision was ±0.1‰ for $\delta^{18}O$, ±1‰ for $\delta^{2}H$, ±0.4‰ for $\delta^{13}C_{DIC}$, and ±0.9 TU for ^{3}H.

The compositions of $\delta^{18}O$ and $\delta^{2}H$ are reported in ‰ vs. V-SMOW standard. The composition of $\delta^{13}C_{DIC}$ is reported in ‰ vs. V-PDB standard.

Molecular biological methods

For molecular biological analysis, water samples were filtered through mixed esters of cellulose filters (S-Pak™ Membrane Filters, 47 mm diameter, 0.22 μm pore size, Millipore Corporation, Billerica, MA) within 8 h of collection. Immediately after filtration, filters were stored at −80 °C until nucleic acid extraction.

Nucleic acid extraction was carried out by the method described in Gich et al. (2005). The V3 region of 16S rDNA genes from the bacterioplankton community was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) with one primer set: PRBA338f (5′ACTCCTACGGGAGGCAGCAG; Lane, 1991) and PRUN518r (5′ATTACCGCGGCTGCTGG; Muyzer et al., 1993), which amplified a product 236 bp in length. The GC clamp (5′CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG; Muyzer et al., 1993) was included on the 5′ end of the forward primer.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) was performed with the BIO-RAD DCode™ Universal Mutation Detection System.

Ten bacterial fragments were excised from the DGGE gel and amplified by PCR (Øvreås et al., 1997), and the nucleotide sequences were determined (BMR Genomics, University of Padova, Italy). The sequences were aligned to 16S rDNA sequences obtained from the National Center for Biotechnology Information database by the Mega BLAST search (Basic Local Alignment Search Tool). The ten partial 16S rDNA gene sequences have been deposited in the EMBL (European Molecular Biology Laboratory) Nucleotide Sequence Database under the accession numbers FM180001 to FM180010.

Results and discussion

Halocline features

During the research period, salinity profiles at observation well P1 changed significantly over time, but can be grouped into three main types (Fig. 2A). Type 1 was observed during the high-flow period and consists of two distinct layers: a transition layer (TL) and an interior or higher salinity groundwater layer (HSGL), which was nearly homogeneous down to the maximum investigated depth. Type 2 was observed during the low-flow period and consists of three distinct layers: a nearly-homogeneous mixed layer (ML), a TL, and an HSGL. Type 3 was observed in the late recession and consists of an HSGL and a negligible TL.

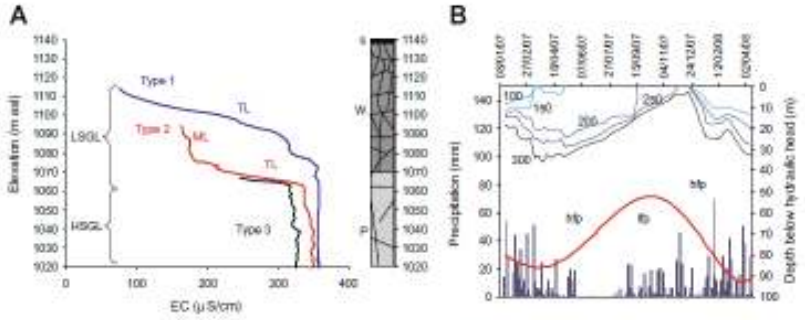

Fig. 2. (A) Main types of EC profiles observed during the research (s is the soil cover, w is the limestone bedrock with a well-developed fracture network, and p is the limestone bedrock with a poorly-developed fracture network). (B) Time–depth contours of EC (numbers are EC values in μS/cm; red thick line is the investigated depth; hfp is the high-flow period; lfp is the low-flow period; blue bars give the precipitation; dates are given in day/month/year).

The HSGL was always below 1062 m asl. Above 1062 m asl, electrical conductivity (EC) profiles changed with the changing hydraulic head. Time–depth contours of EC (Fig. 2B) show the interdependence of recharge events and thickening of the lower salinity groundwater layer (LSGL = ML + TL). However, as observed in early recharge 2007/2008, there is a time delay of about one month between hydraulic head rise due to effective infiltration, and halocline formation at the observation site. At this stage, the time delay may be due to different causes: (a) the area of origin of lower salinity water is relatively far from the observation site; or (b) the area of origin of lower salinity water is close to the observation site, but it flows through a low-permeability medium before flowing through limestone.

The threshold of 1062 m asl is close to an important electrical resistivity (ρ) contrast. In fact, electrical resistivity measurements show (from top to bottom; Fig. 3): (a) a first layer (about 3 m thick) with $\rho \cong 40\ \Omega$ m; (b) a second layer (about 25 m thick) with $\rho \cong 360\ \Omega$ m; (c) a third layer (about 40 m thick) with $\rho \cong 2500\ \Omega$ m, whose bottom is at approximately 1070 m asl; and (d) a fourth layer with $\rho \cong 10{,}000\ \Omega$ m. Taking into consideration the outcropping rocks, the borehole (P1) stratigraphy and the findings of geoelectrical investigations performed by Petrella et al. (2007) in the same aquifer, the said layers correspond to (from top to bottom): (a) soil cover; (b) marls and marly limestone; (c) an upper limestone bedrock with a well-developed fracture network; and (d) a lower limestone bedrock with a poorly-developed fracture network. Thus, the LSGL and HSGL are within two horizons of the limestone bedrock that are significantly different from each other in terms of opening-porosity. According to the findings of Petrella et al. (2008) in the same aquifer, differences in opening-porosity may cause differences in horizontal velocity across the transition zone between the upper and lower limestone bedrock, and then a velocity shear across this zone. This velocity shear may cause (Thorpe, 1971; Turner, 1973) the EC profile (see the complete Type 2 profile) through the transition layer to be approximately symmetric and linear (Fig. 2A).

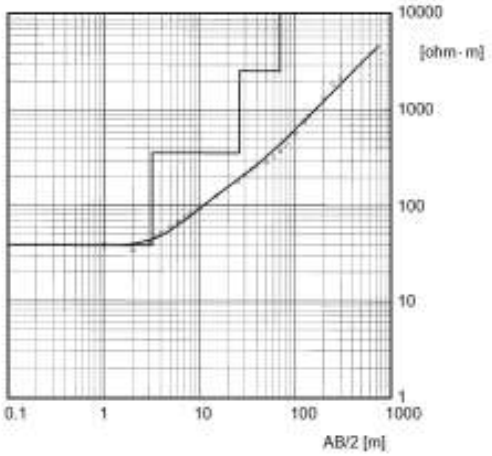

Fig. 3. Apparent resistivity versus AB/2 for the vertical electrical sounding (squares represent the experimental data and the continuous curve represents the model data). Results for a one-dimensional model (step line) are also reported.

Halocline origin

With regard to stable isotopes ($\delta^{18}O$, $\delta^{2}H$; Fig. 4; Table 1), the LSGL has a mean annual composition heavier than that detected in the HSGL and the spring water (S). Taking into consideration the known altitude effect (Dansgaard, 1954), the LSGL is fed by rainwater that infiltrates at a lower mean elevation. Since the isotopic composition of the LSGL in early recharge 2007/2008 ($\delta^{18}O = -8.12‰$; $\delta^{2}H = -49.92‰$) is very close to the composition of rainwater collected in the same period near the observation well ($\delta^{18}O = -8.19‰$; $\delta^{2}H = -51.35‰$), the LSGL is closely related to

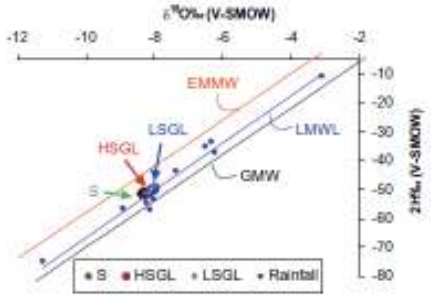

Fig. 4. $\delta^{18}O$ vs. $\delta^{2}H$ relationship in rainfall (Local Meteoric Water Line [LMWL] $\delta^{2}H = 8.2\ \delta^{18}O + 15.21$; $R^2 = 0.97$) and groundwater samples. The Global Meteoric Water Line (GMWL; Craig, 1961) and Eastern Mediterranean Meteoric Water Line (EMMWL; Gat and Carmi, 1970) are given for reference.

Table 1
Stable isotope compositions in the analyzed groundwater and spring water samples, from January 2007 to April 2008 (isotopic values are reported in ‰ vs. V-SMOW standard; LSGL is the lower salinity groundwater layer, HSGL is the higher salinity groundwater layer; S is the spring water).

Samples	Number of samples	Mean $\delta^{18}O$	Mean $\delta^{2}H$
LSGL	59	−8.06 (st.dev. = 0.07)	−50.14 (st.dev. = 0.66)
HSGL	16	−8.25 (st.dev. = 0.05)	−51.53 (st.dev. = 0.34)
S	14	−8.36 (st.dev. = 0.05)	−51.29 (st.dev. = 0.51)

local rainwater, while the HSGL and S are mainly related to rainwater that infiltrates at higher altitudes. The local origin of the LSGL is further supported by other isotopic and chemical features. The $\delta^{13}C_{DIC}$ composition in the LSGL (−15.96‰) is very close to the composition (−15.77‰) in the infiltration water collected at the soil (Calcaric Cambisol) bottom, close to PT, while it is different from the composition at S (−11.51‰). Moreover, the LSGL and the saturated paste extracts obtained from the Calcaric Cambisol show significant concentrations of acetate (up to 4.5 mg/L and 110.3 mg/L, respectively), while the HSGL, S and the saturated paste extracts obtained from the soil type widely distributed in the aquifer system (Vitric Andosol) are acetate-free.

A comparison of the bacterial V3 16S rDNA PCR-DGGE profiles recovered from the LSGL and S demonstrates a different band pattern between water types (Fig. 5). The 16S rDNA gene sequences

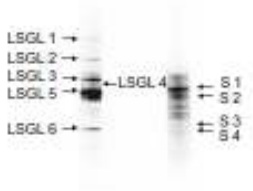

Fig. 5. DGGE profiles of 16S rDNA fragments amplified from DNA extracts from LSGL and S.

(Table 2) extracted from the LSGL are related to acetate-assimilating bacteria (Osaka et al., 2006) belonging to *Betaproteobacteria* and *Bacteroidetes*, while sequences extracted from S are related to *Enterococcus faecalis*, in agreement with previous findings (Celico et al., 2004), *Alphaproteobacteria* and forest soil bacteria. Thus, a single autochthonous microbial community does not exist in the studied aquifer, unlike hypotheses made through studies of spring waters in other carbonate aquifers (Farnleitner et al., 2005; Pronk et al., 2008), and bacterioplankton communities can be used to trace differences between water types within the compartmentalized aquifer system. In the case study, the results of molecular biological analyses further support that the LSGL significantly interacts with the Calcaric Cambisol and has a local origin, and show that S is marginally fed by this groundwater type. The marginal contribution of the LSGL to S-water agrees with the low extension of the said soil and the lower permeability of the underlying marls and marly limestone.

The local origin of the LSGL and its relationships with the Calcaric Cambisol suggest that the time delay (about one month) observed between hydraulic head rise and halocline formation in early recharge is due to the relatively slow percolation of infiltration water through the low-permeability marls and marly limestone that lie between the soil and the limestone bedrock.

The same mean ^{3}H contents in the LSGL and HSGL (4.5 TU) clearly show that differences in hydrochemical features (Table 3) are not influenced by differences in residence times. This is in agreement with the ^{3}H content in S (4.4 TU). The LSGL, HSGL and S are related to recently recharged water, as confirmed by the ^{3}H content in local rainwater collected at sampler RWS1 during all of November 2007 (4.6 TU). The mean ^{3}H content of four single rainfall events collected during the observation period at RWS1 is also in the same range (mean 4.2 TU; weighted mean 4.1 TU).

Conclusions

This interdisciplinary research demonstrates that variations in groundwater salinity with depth in some fractured carbonate aquifers, such as the tested one, may be primarily due to mixing processes between fresh infiltration water and groundwater. Thus,

Table 2
16S rDNA gene sequences recovered from the LSGL (LSGL1–LSGL6) and S (S1–S4) and their closest phylogenetic affiliations.

Sequence	Accession number	Classification/Closest affiliations	Accession number	Similarity (%)
LSGL1	FM180001	*Acidovorax delfuvii* strain b336	EU434529	94
LSGL2	FM180002	*Flavobacterium* sp. HTCC554	AY584585	99
LSGL3	FM180003	*Flavobacterium* sp. DB1.1-1	AM492775	99
LSGL4	FM180004	*Flavobacterium* sp. DB3.4-10	AM493405	98
LSGL5	FM180005	*Flavobacterium* sp. 0499	DQ515962	98
LSGL6	FM180006	*Dechloromonas* sp. EM8269	DQ413167	98
S1	FM180007	*Enterococcus faecalis* strain IJ-12	EU547777	100
S2	FM180008	Uncultured forest soil bacterium clone DUNssu 205	AY913410	96
S3	FM180009	*Devosia yakushimaensis*	AB361068	97
S4	FM180010	Uncultured *alphaproteobacterium* clone UTUA02856	AY144198	99

Table 3
Electrical conductivity (EC) and concentrations of major ions analyzed in groundwater and spring water samples (standard deviation given in brackets; LSGL is the lower salinity groundwater layer, HSGL is the higher salinity groundwater layer; S is the spring water).

Samples	Number of samples	EC (μS/cm)	Na^{+} (mg/L)	K^{+} (mg/L)	Mg^{2+} (mg/L)	Ca^{2+} (mg/L)	Cl^{-} (mg/L)	SO_4^{2-} (mg/L)	HCO_3^{-} (mg/L)
LSGL	59	154.90 (55.86)	2.99 (0.65)	1.43 (0.17)	0.93 (0.34)	25.82 (10.83)	4.05 (1.10)	2.30 (0.62)	82.25 (37.81)
HSGL	16	332.11 (6.21)	2.78 (0.09)	0.54 (0.06)	1.39 (0.33)	61.79 (1.89)	4.83 (1.11)	2.35 (0.86)	193.10 (6.31)
S	14	339.36 (17.57)	2.58 (0.10)	0.51 (0.03)	1.09 (0.17)	68.11 (3.72)	3.81 (0.09)	2.70 (0.18)	208.91 (10.93)

the halocline may be non-permanent, and its thickness and shape may vary over time. Variations in thickness and shape are influenced by infiltration processes. At the study site, three main types of EC profile were found during the research period. In the high-flow period, the EC profile consisted of a TL and an HSGL, with no ML observed. An ML was detected in the low-flow period, excluding the late recession when the EC profile was characterized by an HSGL and a negligible TL. The HSGL was always detected below 1062 m asl, while the TL was detected across the passage between an upper portion of the limestone bedrock with a well-developed opening network, and a lower portion of the bedrock with a poorly-developed opening network. We hypothesize that this variation in opening-porosity with depth may cause a velocity shear that influences the transition layer profile between the lower and higher salinity groundwater. In a wider context, the possible existence of such haloclines and their evolution over time are factors to consider when analyzing the chemical and isotopic signatures of spring water in aquifers like this one during a hydrologic year.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the European Union (KATER II research program). We thank M. Mussi (Istituto di Geoscienze e Georisorse of the CNR, Pisa, Italy), and P. Iacumin and E. Selmo (Laboratorio di Geochimica Isotopica of the University of Parma, Italy) for isotope analyses, and BMR Genomics (University of Padova, Italy) for nucleotide sequencing. Two anonymous reviewers are thanked for a number of critical comments and suggestions that contributed to the improvement of the paper.

References

Celico, F., Varcamonti, M., Guida, M., Naclerio, G., 2004. Influence of precipitation and soil on transport of fecal enterococci in limestone aquifers. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2843–2846.
Celico, F., Petrella, E., Celico, P., 2006. Hydrogeological behaviour of some fault zones in a carbonate aquifer of Southern Italy: an experimentally based model. Terra Nova 18, 308–313.
Cook, P.G., Love, A.J., Dighton, J.C., 1999. Inferring groundwater flow in fractured rock from dissolved radon. Ground Water 37, 606–610.
Craig, H., 1961. Standard for reporting concentrations of deuterium and oxygen-18 in natural waters. Science 133, 1833–1834.
Dansgaard, W., 1954. The O^{18} abundance in fresh water. Geochim. Cosmochim. Acta 6, 241–260.
De Corso, S., Scrocca, D., Tozzi, M., 1998. Geologia dell'anticlinale del Matese e implicazioni per la tettonica dell'Appennino molisano. Boll. Soc. Geol. It. 117, 419–441.
FAO, 1988. Soil map of the World, Revised Legend, Reprinted with corrections, World Soil Resources Report, 60, Roma, Italy.
Farnleitner, A.H., Wilhartitz, I., Ryzinska, G., Kirschner, A.K.T., Stadler, H., Burtscher, M.M., Hornek, R., Szewzyk, U., Herndl, G., Mach, R.L., 2005. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. Environ. Microbiol. 7, 1248–1259.
Gat, J.R., Carmi, I., 1970. Evolution of the isotopic composition of atmospheric waters in the Mediterranean sea area. J. Geophys. Res. 75, 3039–3047.
Gich, F., Schubert, K., Bruns, A., Hoffelner, H., Overmann, J., 2005. Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5908–5919.
Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, United Kingdom, pp. 115–175.
Morin, R.H., Carleton, G.B., Poirier, S., 1997. Fractured-aquifer hydrogeology from geophysical logs: the Passaic Formation, New Jersey. Ground Water 35, 328–338.
Muyzer, G., Dewaal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.
Osaka, T., Yoshie, S., Tsuneda, S., Hirata, A., Iwami, N., Inamori, Y., 2006. Identification of acetate- or methanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. Microb. Ecol. 52, 253–266.
Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.L., Torsvik, V., 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3367–3373.
Petrella, E., Capuano, P., Celico, F., 2007. Unusual behaviour of epikarst in the Acqua dei Faggi carbonate aquifer (Southern Italy). Terra Nova 19, 82–88.
Petrella, E., Falasca, A., Celico, F., 2008. Natural-gradient tracer experiments in epikarst: A test study in the Acqua dei Faggi experimental site, southern Italy. Geofluids 8, 159–166.
Price, J.F., 1979. Observations of a rain-formed mixed layer. J. Phys. Oceanogr. 9, 643–649.
Pronk, M., Goldscheider, N., Zopfi, J., 2008. Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. Hydrogeol. J. doi:10.1007/s10040-008-0350-x.
Soloviev, A., Lukas, R., 1996. Observation of spatial variability of diurnal thermocline and rain-formed halocline in the western Pacific warm pool. J. Phys. Oceanogr. 26, 2529–2538.
Thorpe, S.A., 1971. Experiments on the instability of stratified shear fluids: miscible fluids. J. Fluid Mech. 46, 299–320.
Turner, J.S., 1973. Buoyancy Effects in Fluids. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
Wijesekera, H.W., Paulson, C.A., Huyer, A., 1999. The effect of rainfall on the surface layer during a westerly wind burst in the western equatorial Pacific. J. Phys. Oceanogr. 29, 612–632.

RINGRAZIAMENTI

Le persone da dover ringraziare per il supporto che mi hanno dato in questa lunga avventura durata tre anni sono davvero tante ed è difficile racchiudere in poche parole tutta la bellezza delle esperienze di vita e di lavoro condivise.

Primi fra tutti vorrei ringraziare i miei familiari che mi hanno sempre sostenuto e continuano a sostenermi nelle scelte che faccio, con discrezione e delicatezza, anche nei momenti più difficili.

Un ringraziamento particolare va al prof. Naclerio, per la sua professionalità, la sua disponibilità e per non essere mai venuto meno al suo ruolo di guida in tutto il mio percorso di dottorato.

Non posso non ringraziare il prof. Celico, che mi ha saputo trascinare con la sua passione per la ricerca nelle mille sfide che ci siamo proposti di affrontare, incoraggiandomi sempre a non mollare.

Un pensiero speciale è per Valentina, non solo collega, ma soprattutto grande amica con la quale siamo riusciti ad instaurare un bellissimo rapporto di complicità e rispetto.

Grazie ad Emma, per avere sempre la soluzione a tutti i problemi di lavoro, per essere una preziosissima collega nonché speciale "sorella maggiore" dispensatrice di buoni consigli.

Un pensiero particolare è rivolto poi a tutti i colleghi del Dipartimento di Microbiologia dell'Università Eötvös Loránd di Budapest, per la splendida accoglienza che mi hanno riservato e per aver messo a mia disposizione le loro competente senza alcuna reticenza.

Infine non posso dimenticare tutti i miei amici di sempre perché li considero il mio porto sicuro, una fonte di energia di cui non potrei mai fare a meno.