

INDAGINI SULLA MICROBIOLOGIA DEI COMPLESSI CARSICI NEI GESSI DI BRISIGHELLA E RONTANA

DIANA I. SERRAZANETTI¹, CHIARA MONTANARI², DAVIDE GOTTARDI³,
LUCIA VANNINI⁴, FAUSTO GARDINI⁵

Riassunto

Dal 2010 è in corso il Progetto Life + 08NAT/IT/000369 "Gypsum", cofinanziato dall'Unione Europea, finalizzato alla tutela e gestione dei principali ambienti gessosi dell'Emilia-Romagna. Nell'ambito dell'Azione A3 è stato sviluppato il monitoraggio pluriennale dei principali acquiferi carsici sotto l'aspetto chimico e microbiologico. In generale l'obiettivo di questa sperimentazione è stato quello di valutare l'impatto di sostanze di origine agricola o di altre forme di inquinamento, legate ad insediamenti o attività antropiche o fattori naturali, in acque di grotta. La sperimentazione è stata sviluppata tramite tecniche microbiologiche classiche e di biologia molecolare (PCR 16S rRNA e PCR-DGGE), finalizzate alla caratterizzazione delle popolazioni microbiche presenti nei diversi siti di prelievo e alla determinazione di loro eventuali variazioni e/o evoluzioni.

Parole chiave: complessi carsici, microrganismi, biologia molecolare, impatto antropico.

Abstract

The Project Life + 08NAT/IT/000369 'Gypsum', co-funded by the European Union, has started in the spring of 2010. This project aims to protect and manage the main karstic caves and sites of Emilia-Romagna region. The A3 action provided a periodic monitoring of the main karstic aquifers in terms of chemistry and microbiology. The objective of this study was to evaluate the impact, in the waters of the cave, of agricultural substances or other forms of pollution or settlements related to human activities or natural factors. The experiment was developed using traditional microbiology techniques and molecular biology techniques (PCR 16S rRNA and PCR-DGGE), focused on the characterization of microbial populations in the different sampling sites and determination of their variations and/or changes.

Keywords: Karst Water, Microorganisms, Molecular Biology, Anthropic Ecological Impact.

¹ Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale Agroalimentare, Sede di Cesena, Piazza Goidanich 60, 47521, Cesena (FC) - diana.serrazanetti@gmail.com

² Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale Agroalimentare, Sede di Cesena, Piazza Goidanich 60, 47521, Cesena (FC) - chiara.montanari8@unibo.it

³ Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari, Sede di Cesena, Piazza Goidanich 60, 47521, Cesena (FC) - davide.gottardi2@unibo.it

⁴ Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari / Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale Agroalimentare, Sede di Cesena, Piazza Goidanich 60, 47521, Cesena (FC) - lucia.vannini2@unibo.it

⁵ Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari / Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale Agroalimentare, Sede di Cesena, Piazza Goidanich 60, 47521, Cesena (FC) - fausto.gardini@unibo.it

Dal 2010 è in corso il Progetto Life + 08NAT/IT/000369 “Gypsum”, cofinanziato dall’Unione Europea, finalizzato alla tutela e gestione dei principali ambienti gessosi dell’Emilia-Romagna. Nell’ambito dell’Azione A3 è previsto un monitoraggio pluriennale dei principali acquiferi carsici sotto l’aspetto chimico e microbiologico (BERGIANTI *et alii* 2013).

Nel corso del primo anno sono state analizzate le acque carsiche su circa 50 punti di controllo (inghiottitoi, fiumi, torrenti in grotta e risorgenti), successivamente sono stati monitorati i siti più interessanti sia da un punto di vista di potenziale contaminazione antropica che da un punto di vista ecologico.

In generale l’obiettivo di questa sperimentazione è stato quello di valutare l’impatto di sostanze di origine agricola o di altre forme di inquinamento, legate ad insediamenti o attività antropiche o fattori naturali, in acque di grotta. La sperimentazione è stata sviluppata tramite tecniche microbiologiche classiche e di biologia molecolare (PCR 16S rRNA e PCR-DGGE), finalizzate alla caratterizzazione delle popolazioni microbiche presenti nei diversi siti di prelievo e alla determinazione di loro

eventuali variazioni e/o evoluzioni dovute a fattori quali stagioni e anni.

La contaminazione microbica delle acque delle grotte dei Siti Natura 2000 interessati dal progetto Life “Gypsum” può essere considerata un importante indice di qualità delle acque stesse (monitoraggio di eventuale contaminazione antropica o di allevamenti) e una caratteristica fondamentale per la caratterizzazione dell’ecosistema considerato (presenza di eventuali specie endemiche). In particolare, la tecnica *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) (WU *et alii* 2006) è risultata essere uno strumento fondamentale per lo studio delle diverse ecologie dei campioni considerati. Il *fingerprinting* (impronta digitale del campione) proveniente da un’analisi PCR-DGGE è stato utilizzato per caratterizzare i campioni a seconda dei microrganismi in esso presenti.

Queste analisi sono state sviluppate nei primi due anni del progetto al fine di studiare le popolazioni microbiche presenti tramite l’estrazione del DNA totale del campione. Questa metodica è particolarmente adatta per lo studio di campioni ambientali con elevata diversità perché fornisce una prima immagine dello stato

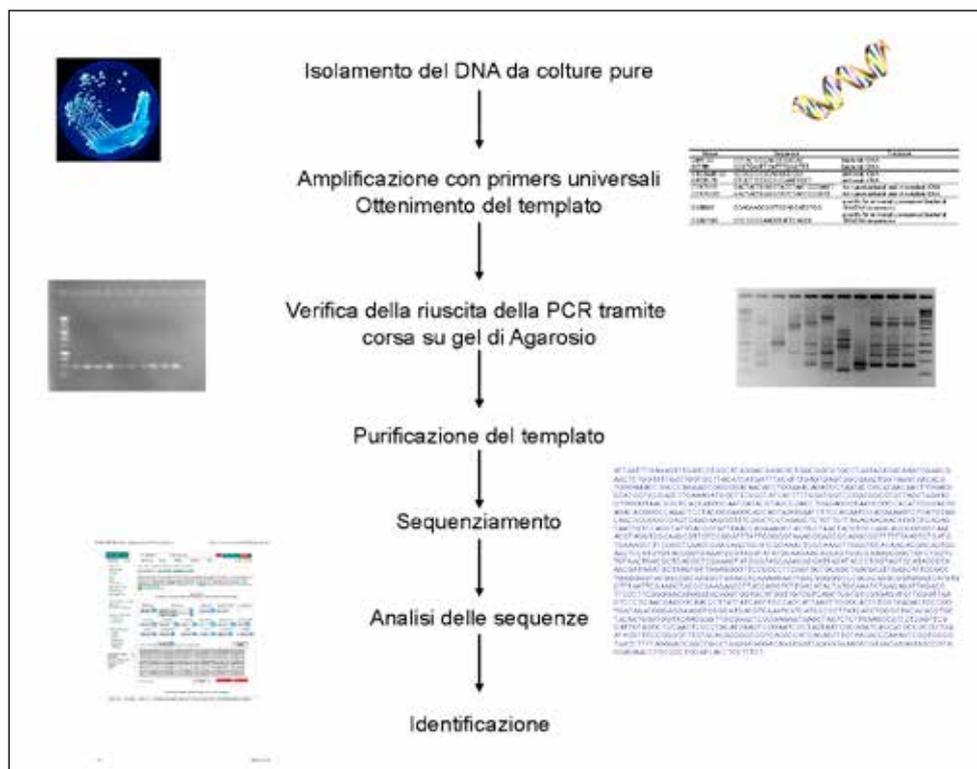


Fig. 1 – Schema di identificazione microbica tramite metodi molecolari.

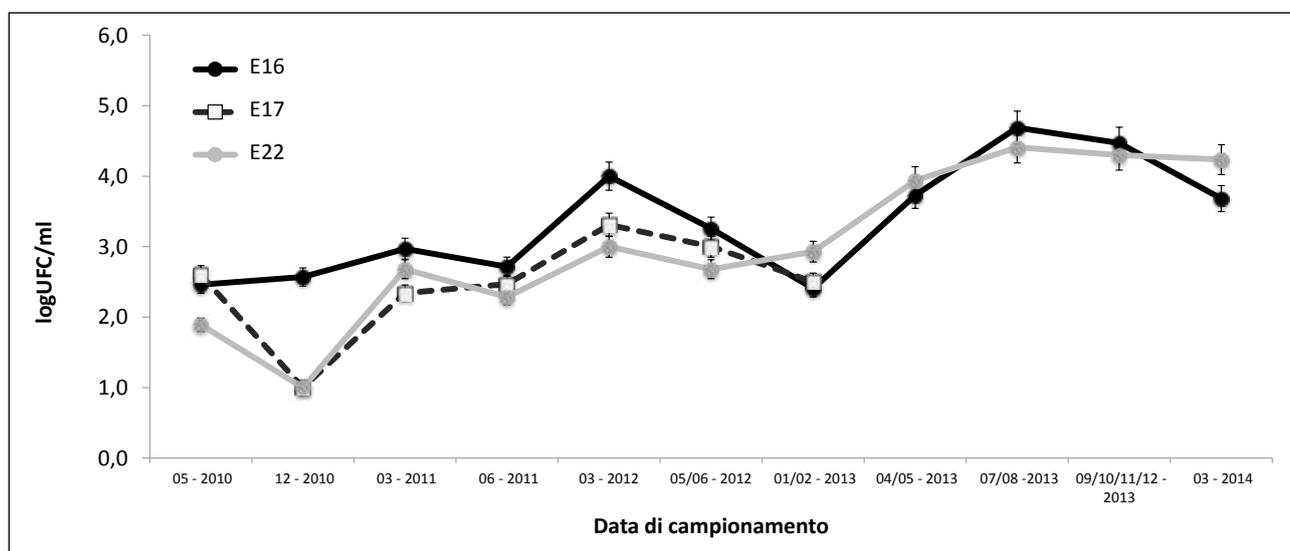


Fig. 2a – Carica microbica totale (log UFC/ml) dei siti nei Gessi di Brisighella.

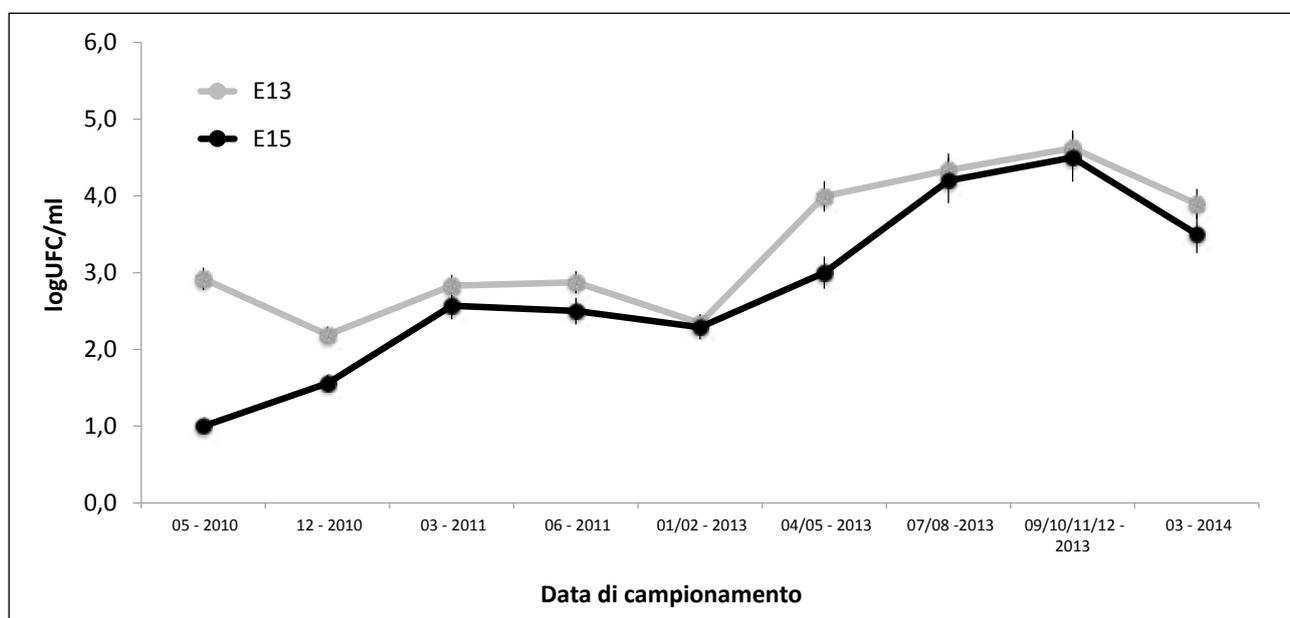


Fig. 2b – Carica microbica totale (log UFC/ml) dei siti nei Gessi di Rontana.

microbico della matrice. Inoltre il sequenziamento di specifiche regioni del DNA dei microrganismi (16S rRNA per i batteri, ITS per lieviti e muffe) permette la loro identificazione a livello di specie. Per questo alcuni microrganismi sono stati isolati e successivamente identificati.

In fig. 1 è riportato lo schema di identificazione microbica tramite metodi molecolari sviluppato durante il progetto.

Nel presente lavoro sono contenuti i risultati di uno studio microbiologico riguardante i Gessi di Brisighella (vedi *supra* in questo stesso volume, GRUPPO SPELEOLOGICI

FAENTINO, SPELEO GAM MEZZANO, fig. 31) e i Gessi di Rontana (vedi *supra* in questo stesso volume, GRUPPO SPELEOLOGICO FAENTINO, SPELEO GAM MEZZANO, fig. 5).

I siti analizzati sono stati classificati con le seguenti sigle:

Gessi di Brisighella

- E16 – Risorgente della Tanaccia;
- E17 – Inghiottitoio della Tana della Volpe;
- E22 – Sorgente sulfurea del Sistema carsico Acquaviva, Saviotti, Leoncavallo, Alien.

Gessi di Rontana

- E13 – Risorgente del Rio Cavinale;
- E15 – Grotta di Selva.

Risultati

Per quanto riguarda l'evoluzione della carica microbica totale durante i 5 anni di campionamento, nelle figg. 2a e 2b si evidenzia come rispetto al 2010 la carica microbica abbia subito un incremento di circa 2 o 3 ordini di grandezza (a seconda del sito di campionamento) durante l'anno 2013.

In generale, la carica microbica totale non supera mai i 5 log UFC/ml di acqua, con un andamento variabile per stagione e sito di prelievo. Si può evidenziare come, nei campioni analizzati per più periodi nell'anno, si ha un aumento nei mesi di aprile-maggio 2013 e luglio-agosto 2013, per poi diminuire nell'ultimo campionamento (autunno-inverno 2013). Questa differenza può essere dovuta alla siccità che solitamente

si riscontra nei mesi primaverili ed estivi. I microrganismi presenti possono essere quindi maggiormente concentrati e la loro proliferazione può essere dovuta a condizioni ambientali più favorevoli (temperature maggiori).

A differenza degli anni precedenti, il 2013 ha presentato cariche microbiche totali maggiori rispetto ai primi anni di analisi (2010, 2011 e 2012). Infatti, la carica microbica totale supera, in alcuni campioni, i 4 log UFC/ml, valori mai raggiunti nell'anno precedente.

Seppure la carica microbica totale abbia avuto un andamento crescente, è importante sottolineare che i valori di coliformi fecali e totali si siano mantenuti sempre al di sotto del limite di determinazione. Il conteggio di tali microorganismi nelle ac-

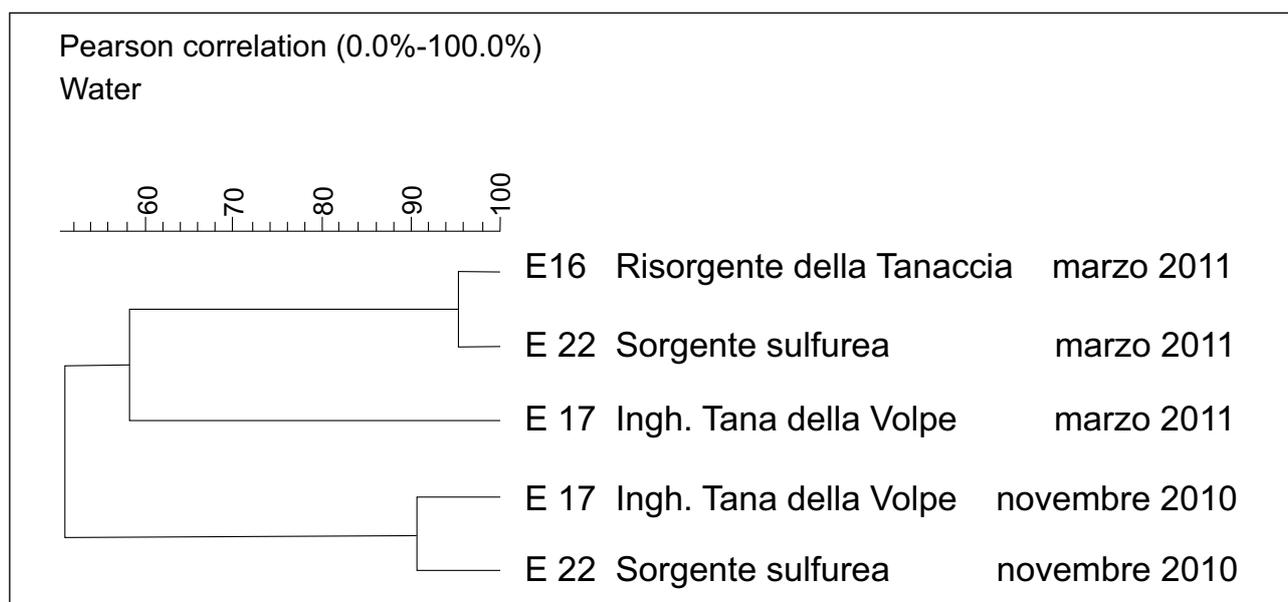


Fig. 3a – Cluster ottenuto dall'analisi di gel DGGE riguardante i campioni appartenenti al sito di campionamento dei Gessi di Brisighella analizzati nei primi due anni di attività.

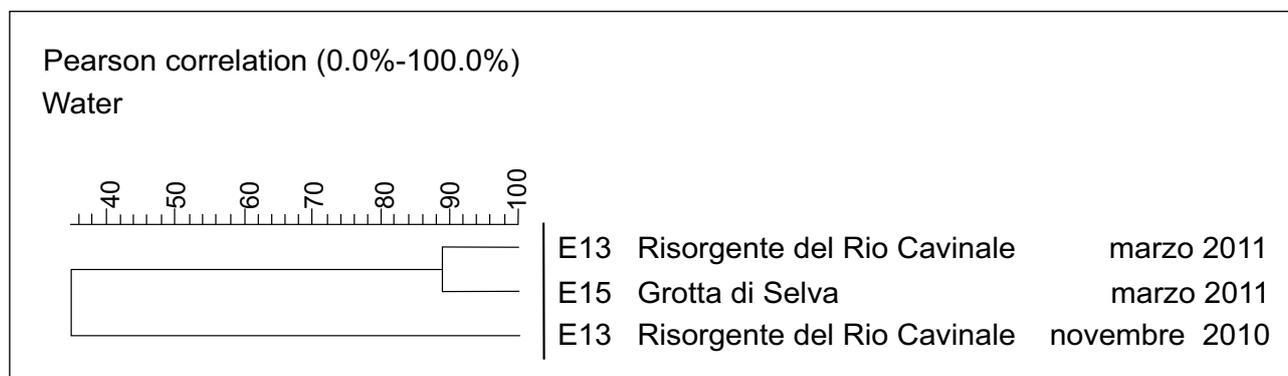


Fig. 3b – Cluster ottenuto dall'analisi di gel DGGE riguardante i campioni appartenenti al sito di campionamento dei Gessi di Rontana analizzati nei primi due anni di attività.

que viene ampiamente utilizzato come indicatore della contaminazione fecale delle stesse, e quindi il loro numero è considerato un indice di qualità dell'acqua. Nel conteggio dei coliformi totali sono compresi un ampio gruppo di batteri, tutti caratterizzati dalla capacità di provocare entro 24-48 ore, alla temperatura di 35-37°C, la fermentazione del lattosio con produzione di acido e gas in terreni di coltura idonei. Pertanto, la ridotta presenza dei coliformi nei campioni analizzati fa ritenere che l'inquinamento antropico, che può avvenire per vicinanza del corso d'acqua o della sorgente a centri abitati e/o allevamenti, sia stato irrilevante.

Le analisi genetiche (sequenziamento della regione 16S rRNA) hanno mostrato la presenza di numerose specie batteriche (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Rahnella aquatilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pedobacter swuonensis*, *Enterobacter* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Raoultella*). I microrganismi identificati possono avere diverse origini, alcuni provengono dal terreno, altri possono essere comuni contaminanti delle acque ed altri, invece, avere un'origine antropica.

Nella fig. 3a sono stati raggruppati i campioni provenienti dai Gessi di Brisighella. Come viene evidenziato in figura, il fattore che influenza maggiormente il raggruppamento dei campioni presi in esame è la stagione di prelievo. Infatti, i campioni E16 e E21, prelevati ed analizzati a marzo 2011, mostrano una similarità di circa il 95%. Allo stesso modo i campioni prelevati a novembre 2010, E17 e E21, mostrano una similarità di circa il 90%.

Nella fig. 3b è riportato il *cluster* ottenuto dall'analisi DGGE dei campioni provenienti dai Gessi di Rontana. Anche in questo caso, seppur i campioni analizzati

siano pochi, si vede come il fattore maggiormente influente nella discriminazione dei campioni è la stagionalità.

Questa sperimentazione, nel suo complesso, ha evidenziato che gli ambienti segregati presi in considerazione, e particolarmente le acque che fluiscono lungo i diversi ecosistemi, hanno mantenuto, nonostante il modificarsi progressivo degli ambienti esterni superficiali, una specifica identità per quanto riguarda la popolazione microbiologica durante i 5 anni di analisi. La presenza di specie inusuali, solo raramente riscontrate nelle acque superficiali o nei suoli, fa ritenere che tali ecosistemi continuino ad essere nicchie caratterizzate da condizioni nutrizionali povere e da valori ambientali sfavorevoli come le basse temperature. Tale risultato suggerisce che il livello di antropizzazione degli ecosistemi presi in considerazione non ha raggiunto livelli sensibili.

Bibliografia

- S. BERGIANTI, B. CAPACCIONI, C. DALMONTE, J. DE WAELE, W. FORMELLA, A. GENTILINI, R. PANZERI, S. ROSSETTI, B. SANSAVINI 2013, *Progetto Life+ 08 NAT/IT/000369 "GYPSUM". Primi risultati sulle analisi chimiche delle acque nei gessi dell'Emilia Romagna*, in F. CUCCHI, P. GUIDI (a cura di), *Atti del XXI Congresso Nazionale di Speleologia. "Diffusione delle conoscenze"*, (Trieste, 2-5 giugno 2011), Trieste, pp. 296-301.
- Q. WU, X.H. ZHAO, S. ZHAO 2006, *Application of PCR-DGGE in Research of Bacterial Diversity in Drinking Water*, "Biomedical and Environmental Sciences" 19, pp. 371-374.