

# **Progetto per un primo censimento della comunità fungina alotollerante nella Riserva Naturale Statale “Saline di Tarquinia (VT)”**

## **INTRODUZIONE**

Un ambiente si definisce estremo quando le condizioni che lo caratterizzano sia fisiche (temperatura, radiazione solare, pressione), o geochimiche (salinità, essiccamento, pH, potenziali redox, metalli, gas) sono vicine ai valori limite nei quali un organismo può vivere (Javaux, 2006). Pochi gruppi tassonomici contano specie che possono colonizzare tali ambienti considerati estremi per la vita alla maggior parte degli eucarioti. Gli ambienti geotermali, terrestri e marini, le sorgenti acide ed alcaline, le regioni polari, le profondità degli oceani, gli ambienti iperalini sono considerati estremi (Nicolaus *et al.*, 2004). Ad oggi è noto che questi ambienti che si credevano troppo ostili per permettere la sopravvivenza di qualsiasi forma di vita microbica (Stetter, 1999), sono in realtà l'habitat naturale di alcuni microrganismi conosciuti come *estremofili* (Nicolaus *et al.*, 2004), che a loro volta vengono classificati secondo le specifiche nicchie ambientali in cui la loro crescita è ottimale (Lincoln *et al.*, 1982).

Le saline rappresentano un ambiente iperalino, con bassi livelli di acqua biologicamente disponibile, concentrazione di NaCl superiore al 100%, alte concentrazioni di ioni tossici, esposizione ad alti livelli di UV e valori di Ph e temperature talvolta estremi (Brok, 1997; Oren, 2002). Gli organismi che vivono negli habitat iperalini sono classificati come alofili, che richiedono necessariamente acque con elevata salinità (Zajc *et al.*, 2012), alotolleranti ed alotolleranti estremi che sopportano range di salinità più ampi (Gunde-Cimerman *et al.*, 2006). Gunde-Cimerman e collaboratori (2000) definiscono come alofili quei funghi che possono crescere in vitro ad una concentrazione salina pari a 3M e possono essere isolati in vivo in ambienti a salinità superiori all'1.7M.

A partire dagli anni 2000 per la prima volta i funghi sono stati individuati come attivi rappresentanti delle comunità biotiche negli ecosistemi acquatici, in particolare molte specie fungine sono state identificate ed altre nuove sono state descritte nelle aree iperaline di tutto il mondo (Butinar *et al.*, 2005; Hyde e Pointing, 2000; Jones *et al.*, 2009). Particolare attenzione è stata rivolta all'ecologia e alla fisiologia di questi organismi, caratterizzati da un'ampia capacità di adattamento alle differenti condizioni, che spesso si esprime con l'attivazione di vie metaboliche inusuali e particolarmente interessanti dal punto di vista biotecnologico (Gunde-Cimerman *et al.*, 2005a, b; Plemenitas *et al.*, 2008). Da tempo si studiano i loro metaboliti il cui potenziale applicativo ha destato grande interesse in diversi processi produttivi, sono utilizzati tra l'altro, come additivi alimentari, biosurfattanti o soluti biocompatibili (Amils *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2009; Oren 2010).

Il progetto si propone di colmare una lacuna conoscitiva sostanziale, in quanto ad oggi non risultano ricerche micologiche effettuate nell'area Riserva Naturale Statale “Saline di Tarquinia” .

Questa prima indagine vuole rappresentare il punto di partenza nello studio della biodiversità fungina, al momento completamente sconosciuto, ed estremamente importante per la conservazione e la protezione di questi ambienti di grande interesse naturalistico, paesaggistico, storico e culturale e che ospitano un alto livello di biodiversità (Sito di importanza comunitaria, Rete Natura 2000).

## FASE 1

### Analisi preliminare delle vasche ed individuazione dei siti di campionamento

Sono stati effettuati due sopralluoghi nell'area di studio il 26/08/2014 ed il 26/09/2014, al fine di individuare i punti di campionamento secondo un gradiente di salinità crescente, che descrivesse al meglio l'intera area. Contestualmente sono stati prelevati campioni di acqua utilizzando un campionatore di liquidi sub-superficiale al fine di mettere a punto il protocollo di isolamento per l'identificazione dei microfunghi presenti nelle vasche.

Durante i sopralluoghi sono stati raccolti con l'ausilio di un Rifrattometro manuale (salinità) e di una sonda multiparametrica, i dati relativi alla salinità, temperatura, ossigeno disciolto partendo dalla vasca 1- foce di Ponente, con salinità di poco maggiore a quella dell'acqua del mare, fino alle vasche della terza sezione che presentano le salinità maggiori (Fig.1).

Al fine di selezionare i siti di campionamento è stato considerato primariamente il valore di salinità registrato (Tab. 1).

Salinità ‰		26/08/2014	26/09/2014
Foce di Ponente	S1	4.2	4.2
	S2a	5.2	5.1
	S2b	6.0	5.8
	S3	6.9	6.1
	S4	8.9	7.1
	Sint	-	16.2
Terza sezione	S5	24.3	20

Tab. 1 – valori di salinità registrati nei siti di campionamento.

Nel secondo sopralluogo si è deciso di inserire un ulteriore punto di campionamento a salinità intermedia (S int) tra S5 ed S4 al fine di ottimizzare i punti di campionamento rispetto al gradiente di salinità.

Sulla base dei dati da noi rilevati (Tab.1) e di quelli raccolti mensilmente agli anni 2013-2014 (Fig. 2), sono stati selezionati 5 punti di campionamento a salinità crescente: S1, S2, S4, Sint, S5.

### Messa a punto delle tecniche di isolamento

I campioni di acqua raccolti dalle cinque stazioni sono stati messi in contenitori sterili, posti in borse termiche e processati nelle 24 ore successive alla raccolta.

Per l'analisi della comunità fungina è stata usata la tecnica della filtrazione e piastratura. Alcune prove preliminari sono state necessarie per individuare i quantitativi di acqua da utilizzare per ottimizzare l'analisi della comunità.

Da ciascun sito di campionamento sono stati filtrati, in una prima prova, in condizioni di sterilità, 80 ml di acqua mediante l'utilizzo di una pompa a vuoto manuale su filtri Watman con pori del diametro di 0.45 µm. Ciascun filtro è stato suddiviso in tre parti. Ciascuna parte è stata frammentata in 15 pezzi e piastrata su due differenti substrati nutritivi Malt Extract Agar (MEA) e Coarn Meal Agar (CMA), i terreni sono stati addizionati con 70 mg/L di Penicillina G, 200 mg/L di Streptomicina e 50 mg/L di Cloramfenicolo, al fine di deprimere la crescita batterica. Una volta allestite le piastre sono state incubate in termostato a 25°C.

Sono stati scelti due terreni con diverse caratteristiche nutrizionali, uno più ricco MEA ed uno più povero CMA, al fine di isolare il maggior numero di funghi possibile, sia quelli a rapido sviluppo che di norma prevalgono su terreni ricchi, sia quelli con accrescimento più lento che tendono a prevalere sui terreni più poveri.

Gli isolati di tutti i campioni hanno mostrato un buono sviluppo su entrambi i terreni di coltura.

Per quanto concerne la quantità del filtrato, i campioni provenienti da S1 e S2 sono risultati leggibili mentre i campioni S4, Sint e S5 sono risultati troppo concentrati ed illeggibili, per questi ultimi si è proceduto con una seconda prova. Sono stati quindi filtrati, utilizzando le procedure precedentemente descritte: 10ml, 20ml, e 30ml. I filtri sono stati quindi divisi e frammentati, come nella prima prova, piastrati ed incubati in termostato. La quantità di filtrato ottimale per i campioni S4, Sint e S5 è 10 ml.

## **FASE 2**

### **Attività di campo**

I campioni di acqua sono stati prelevati il 13/10/2014 da 5 siti di campionamento (S1, S2, S4, Sint e S5 rappresentativi rispetto al gradiente di salinità) individuati nella precedente fase. Le tecniche per la raccolta come pure la misura dei parametri ambientali sono stati effettuati come descritto per le prove preliminari.

### **Attività di laboratorio - Materiali e Metodi**

La comunità fungina presente nei campioni è stata esaminata utilizzando la tecnica delle filtrazioni e piastratura su terreno nutritivo secondo quanto messo a punto nella fase precedente.

Per i terreni nutritivi si è scelto di utilizzare MEA e CMA tal quale (Sal 0), con aggiunta di sale alle concentrazioni del 35 ‰ (Sal 35) e del 100 ‰ (Sal 100). Per ottenere i terreni salini è stata utilizzata acqua di mare filtrata e addizionata con sale marino (DIFCO) fino al raggiungimento della salinità voluta. Ai terreni sono stati aggiunti alcuni antibiotici per inibire lo sviluppo dei batteri (70 mg/L di Penicillina G, 200 mg/L di Streptomicina e 50 mg/L di Cloramfenicolo).

Sono stati prelevati e filtrati sterilmente, con pompe manuali su filtri Watman sterili con pori di 0.45 µm, aliquote di 80 ml di acqua per i siti S1 e S2 e 10 ml di acqua per i siti S4, Sint e S5. Per ciascun campione, e ciascun terreno utilizzato, sono state fatte tre ripetizioni, i relativi filtri sono stati indicati come A, B, C. Ciascun filtro è stato ripartito in tre parti, ciascuna parte è stata ridotta sterilmente in piccoli pezzi (15) e piastrata in capsule di Petri di 9 cm di diametro, su terreno

nutritivo, facendo in modo che ciascuna parte di un filtro (A1,A2,A3) fosse piastrata su uno stesso terreno (MEA o CMA) con concentrazioni saline differenti, secondo il seguente schema:

Terreni	Sal 0	Sal 35	Sal 100
MEA	A1 B1 C1	A2 B2 C2	A3 B3 C3
CMA	A1 B1 C1	A2 B2 C2	A3 B3 C3

Per ciascun Sito di campionamento sono state effettuate 6 filtrazioni ed allestite 18 capsule Petri per l'isolamento. Le piastre sono state incubate in termostato a 25°C fino allo sviluppo delle colonie (Fig. 3a,b,c).

Le singole UFC sono state trasferite su agar nutritivo PDA a Sal 35 ‰. Le colture sono state controllate, purificate ove necessario, e caratterizzate mediante analisi microscopica.

### Conta totale della comunità fungina

Per la conta totale è stata applicata la tecnica delle filtrazioni. Sono state filtrate, in sterilità, differenti aliquote di ciascun campioni (10 ml, 20 ml, 40 ml, 60 ml, 80 ml, 100 ml) su filtri Watman con pori di 45 µm di diametro. Per ciascuna aliquota sono state effettuate tre ripetizioni. I filtri interi sono stati quindi piastrati su due terreni colturali che comunemente vengono impiegati per quantificare la comunità fungina negli ambienti iperalini (Gunde-Cimerman *et al.* 2000); (Fig. 3a,b,c):

DRBC (Dichloran Rose bengal chloramphenicol –  $a_w=1$ )

DG-18 ( $a_w=0.96$ , permette di contare i moderatamente xerofili)

### Analisi Ambientale

Sono stati analizzati cinque siti caratterizzati da diverse condizioni di salinità e con un differente range di variabilità nel corso dell'anno. Le maggiori fluttuazioni nella salinità si riscontrano in Sint e S5 con valori che vanno da un minimo di 36 ‰ a massimi rispettivamente di 276 e 336 ‰. Le fluttuazioni risultano molto ridotte negli altri siti con valori medi di salinità progressivamente crescenti  $37.4 \pm 7.2$  ‰ in S1,  $43.9 \pm 9.1$  ‰ in S2 e  $58 \pm 17.3$  ‰ in S4 (Fig. 2). I massimi di salinità sono registrati da maggio ad ottobre (Fig. 4a ).

Per quanto concerne le temperature dell'acqua non si osservano differenze significative tra le vasche (Fig. 4b), i periodi in cui sono stati registrate le temperature più elevate coincidono con quelli in cui sono stati rilevati i valori massimi di salinità.

## RISULTATI

I campionamenti per le analisi micologiche sono stati effettuati all'inizio di ottobre. I campioni prelevati nel periodo autunnale consentono di studiare le comunità stress-tolleranti alofile che sono state selezionate lungo un gradiente di salinità crescente (S1-S5) alla fine del periodo primaverile-estivo, periodo in cui sono raggiunti i massimi livelli di salinità nelle singole vasche, come pure si registrano le maggiori differenze, sempre in termini di salinità, tra le vasche stesse, come precedentemente evidenziato nell'analisi ambientale (Fig. 4a).

In totale sono stati processati cinque campioni, allestite 270 capsule di Petri (90 per l'isolamento dei miceti e 180 per la conta globale) ed isolate 855 UFC, attribuibili a 26 generi, mentre una quota pari al 22 % degli isolati è risultata composta di *micelia sterilia*. In figura 5a e 5b è riportata rispettivamente la percentuale globale delle colonie identificate su CMA e MEA e delle colonie registrate alle differenti salinità (indipendentemente dal terreno) per l'intera comunità. In figura 5c e 5d sono riportati gli stessi dati per le singole vasche. In generale la maggiore percentuale di colonie (63%) è stata isolata su MEA e sui terreni a salinità del 35‰, mentre la percentuale di colonie isolata sui terreni senza aggiunta di sale e a salinità del 100‰ risulta equivalente. Appare interessante osservare come in S1 che riceve l'acqua direttamente dal mare il maggior numero di colonie sia stato identificato su terreno con salinità del 35‰ mentre nella vasca intermedia il maggior numero di colonie è stato isolato su MEA che, come osservato in precedenza, è un terreno molto ricco dal punto di vista nutrizionale. Questo potrebbe essere correlato al fatto che in Sint è stata segnalata, durante il periodo estivo, una grande presenza di fenicotteri che stazionavano abitualmente all'interno della vasca e questo ha sicuramente arricchito il sistema, in termini di componente organica, favorendo lo sviluppo di un maggior numero di specie ruderali (a rapido accrescimento e più facilmente isolabili su MEA). La presenza dei fenicotteri è probabilmente relazionata all'abbondante presenza, riscontrata nella vasca Sint di *Dunaliella salina* ed *Artemia salina* che come noto, costituiscono il cibo elettivo per questi organismi.

Per quanto riguarda la conta totale (Fig. 6a) si evidenzia che in tutti i siti il numero di specie isolato su terreno DG-18 ( $a_w=0.96$ , specie moderatamente xerofile) risulta maggiore di quello riscontrato su DRBA ( $a_w=1$ ); questo dato appare in linea con quanto riportato da altri autori (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000). Questo indica chiaramente come una quota consistente della comunità sia selezionata dall'ambiente iperalino in tutti i siti di campionamento. Su questi terreni si osserva un netto incremento nel numero delle colonie solo nel campione proveniente dalla vasca Sint, come precedentemente osservato in questa vasca è stato riscontrato un elevatissimo carico di sostanza organica (dati non presentati).

I dati relativi alle UFC isolate nei cinque siti e rilevati utilizzando i terreni CMA e MEA alle differenti salinità sono riportati in figura 6b. I dati confermano il forte incremento delle UFC in Sint, con valori in termini assoluti leggermente superiori a quelli evidenziati nei terreni di conta ( $\cong 25-45$  UFC/10 ml su CMA e MEA), ed un incremento della comunità colturabile in MEA e CMA nei siti con la maggiore salinità, S4 ed S5, rispetto alle vasche S1 ed S2. Al contrario sui terreni DRG e DRBA si osservano valori simili rispettivamente tra S1-S2 e S4-S5 ma con valori superiori in S1-S2.

**Analisi della comunità fungina isolata nelle singole vasche, accanto a ciascuna vasca vengono riportati i valori di salinità (‰) minima, massima, media e deviazione standard calcolata sulla base dei dati mensili raccolti nel 2013-2014.**

**Vasca S1 - (20-50; 37.4 ±7.2)** - In questa stazione sono state isolate 245 UFC (51 UFC/100 ml) riconducibili a 14 generi e 40 specie; il 32% delle colonie isolate sono risultati *micelia sterilia*. Il genere più rappresentato sia come numero di specie che in termini di frequenza percentuale (Rf) è *Cladosporium* con 14 specie (Rf = 53.1), seguito da *Penicillium* ed *Aspergillus* (5 specie; Rf = 10.6 e Rf = 4.9 rispettivamente), *Alternaria* ed *Acremonium* (3 specie; Rf = 6.1 e Rf = 1.2 rispettivamente), *Ulocladium* ed *Eurotium* (2 specie; Rf = 4.9 e Rf = 2.9 rispettivamente). Nessuna specie è stata isolata a tutte le salinità. Come evidenziato dalla PCA (Fig. 7a) e dai dati relativi agli indici di Pearson (Fig. 7b), la parte di comunità isolata su CYA e MEA a salinità 100 risulta positivamente correlata solo al suo interno mentre differisce significativamente da tutte le altre. Correlazioni positive e statisticamente significative sono state evidenziate tra le altre componenti. Per quanto concerne gli isolati S100 si osservano alcune specie esclusive (*Ulocladium* sp.10E, *Dendriphyella* sp.12E e *Penicillium* sp. P25 ) ed altre che risultano prevalenti in questi campioni (*Cladosporium* sp. Fr2). In particolare *Penicillium* sp. P25 e *Cladosporium* sp. Fr2 costituiscono una quota significativa (44% e 27% rispettivamente) degli isolati S100.

Considerando l'intera comunità solo sei specie sono presenti con valori di frequenza percentuale superiore a 5: *Alternaria* sp. 6 (5.3), *Cladosporium* sp. A16 (8.6), *Cladosporium* sp. A17 (18.4), *Cladosporium* sp. Fr2 (9.4), *Cladosporium* sp. Fr3 (7.8) e *Penicillium* sp. P25 (8.1).

**Vasca S2 - (24-58; 43.9 ±9.1)** - In S2 sono state isolate 150 UFC (31UFC/100 ml) attribuite a 11 generi e 43 specie; il 31% delle colonie isolate sono risultati *micelia sterilia*. Come per il campione S1 il genere più rappresentato, sia come numero di specie che in termini di frequenza percentuale, è *Cladosporium* con 17 specie (Rf = 41.3), seguito da *Acremonium* (8 specie, Rf = 6) , *Penicillium* (5 specie, Rf = 4) mentre 5 specie sono risultate attribuibili a Celomiceti (Rf = 5.3).

Confrontando le specie isolate sui differenti terreni ed alle diverse salinità (Fig. 8) non sono state rilevate correlazioni tra i funghi isolati alle salinità maggiori (CMAs100 e MEAs100) e tra questi e gli isolamenti effettuati sui terreni senza sale (S0) o a salinità ridotta (S35). Nessuna specie è stata isolata su entrambi i terreni CMA S100 e MEA S100. Al contrario sono state evidenziate correlazioni statisticamente significative tra gli isolati CMAs35, MEAs35 e CMAs0; i miceti isolati su MEAs0 risultano invece correlati solo con CMAs0 (Fig. 8). Su CMA S100 è stato isolato il maggior numero di specie esclusive (*Bispora* sp.1, 6 diverse specie di *Cladosporium*, 2 specie di Celomiceti e 3 specie di *Penicillium*). Appare evidente che la combinazione di un terreno povero di nutrienti con condizioni osmotrofiche severe favorisce l'isolamento delle specie ad habitus maggiormente alofilico, spesso a sviluppo più lento, che non si riescono ad ottenere sugli altri terreni. In misura minore questo andamento era rilevabile anche nei campioni S1 (2 specie esclusivamente isolate in S1CMAs100 *Dendriphyella* sp. e *Penicillium* sp. 25).

Considerando l'intera comunità solo tre specie sono presenti con valori di frequenza percentuale superiore a 5: *Cladosporium* sp. A18 (11.3), *Cladosporium* sp. Fr4 (10.0), *Bispora* sp.2 (6.0).

**Vasca S4 - (28-110; 57.8 ± 17.3)** - In S4 sono state isolate 85 UFC (142/100 ml), attribuite a 8 generi e 44 specie; il 15% delle colonie isolate sono risultati *micelia sterilia*. Il genere più rappresentato resta come nei campioni precedenti *Cladosporium* ma con un numero di specie decisamente superiore: 23 specie (Rf = 38). I generi con il maggior numero di specie sono: *Alternaria* 7 specie (Rf = 17.6), *Penicillium* 5 specie (Rf = 16.5) e *Aspergillus* 3 specie (Rf = 3.5).

Le analisi di correlazione (Fig. 9b) tra i funghi isolati sui due terreni alle tre salinità mostrano come le diverse situazioni abbiamo selezionato quote diverse della comunità con pochissime sovrapposizioni: nessuna correlazione è risultata statisticamente significativa. 17 specie sono state isolate solo alla salinità 100, 9 su CMA e 8 su MEA (nessuna da entrambi i terreni), 9 solo su terreni a S0 (2 da CMA, 6 MEA, ed 1 da entrambi), infine 15 sono risultate esclusive di S35 (8 su CMA, 6 su MEA e 1 comune).

Considerando l'intera comunità solo quattro specie sono presenti con valori di frequenza percentuale superiore a 5: *Alternaria* sp. 103 (6.0), *Penicillium* sp. P24 (7.1), *Cladosporium* sp. A13 (5.0), *Cladosporium* sp. Fr4 (5.0).

**Vasca Sint - (36-276; 118.7 ± 68.6)** - In questo sito è stata rilevata la maggiore ricchezza micologica sia in termini di UFC che in termini di diversità. Sono state isolate 228 UFC (380 UFC/100 ml) attribuibili a 11 generi ed 83 specie, mentre il 23% degli isolati sono risultati *micelia sterilia*. Il genere più rappresentativo è, analogamente agli altri campioni, *Cladosporium* anche se con un numero di specie decisamente elevato 51 specie (Rf = 47.4) seguito da *Penicillium* (10 specie, Rf = 9.2), *Alternaria* (8 specie, Rf = 11.4) ed *Ulocladium* (4 specie, Rf = 2.6). Come si evince dalla figura 10 i funghi identificati sui diversi terreni alle tre salinità non presentano correlazioni statisticamente significative, nessuna specie è stata isolata a tutte le salinità sui due terreni. 21 specie sono state isolate solo alla salinità 100, 7 su CMA e 13 su MEA (1 da entrambi i terreni), 23 solo su terreni a S0 (8 da CMA, 11 da MEA e 4 da entrambi), infine 21 sono risultate esclusive di S35 (9 su CMA, 9 su MEA e 3 in comune).

Considerando l'intera comunità solo una specie è presente con valori di frequenza percentuale superiore a 5: *Cladosporium* sp. Fr4.

**Vasca S5 - (36-336; 146 ± 93.6)** - In questa vasca che presenta i livelli di salinità più elevati sono state isolate 91 UFC (151 UFC/100 ml), attribuite a 9 generi e 35 specie, mentre il 21% sono risultati miceli non fruttificanti. Come per i siti precedenti il genere maggiormente rappresentato è *Cladosporium* con 17 specie (Rf = 29.2), seguito da *Penicillium* 5 specie (Rf = 11) ed *Ulocladium* 4 specie (Rf = 4.2). Come già osservato nelle altre vasche con salinità maggiori (S4 e Sint), non si hanno, anche in questa stazione, correlazioni significative tra gli organismi isolati sui diversi terreni ed alle differenti salinità (Fig. 11). 11 specie sono state isolate esclusivamente su terreni a salinità del 100 ‰, 12 sono state esclusivamente isolate su terreni senza aggiunta di sale e 9 sui terreni alla salinità del 35‰.

Considerando l'intera comunità solo tre specie superano la frequenza percentuale del 5%: *Alternaria* sp.4 (8.5), *Bispora* sp.1 (8.0), *Bispora* sp.2 (5.0) e *Cladosporium* sp. Fr4 (6.0).

## CONFRONTO GLOBALE E DISCUSSIONE

Dal confronto globale (Fig. 12) della comunità fungina isolata nelle cinque vasche della salina rispetto al terreno di isolamento (CMA e MEA) e alle differenti salinità si osserva una forte correlazione statisticamente significativa (Pearson Index = 0.8) tra gli isolati su MEA e gli isolati a salinità 0. Queste specie sono selezionate da terreno nutritivo ricco ed in assenza di sale. Appare plausibile che queste specie abbiano un habitus maggiormente ruderale caratterizzato da rapido sviluppo in condizione di basso stress ed una abbondante sporulazione. La strategia vitale di questi

organismi li porta a superare i periodi di maggiore stress sotto forma di spore o propaguli (clamidospore) quiescenti in grado di sviluppare rapidamente quando le condizioni tornano ad essere favorevoli, nello specifico ambiente riduzione della salinità. Le specie isolate alle salinità maggiore (S35 e S100) presentano una correlazione statisticamente significativa con il terreno CMA; questa quota della comunità sembra maggiormente specializzata all'ambiente oggetto di studio, sono specie in grado di sviluppare in condizioni di stress, il loro sviluppo è generalmente più lento (K-selected) e sono favorite dalla riduzione nella competizione, associata all'innescarsi delle condizioni stressanti. Nei periodi in cui la salinità non risulta particolarmente elevata, tendono a subire la competizione dei ruderali, ma permangono nel sistema grazie alla produzione di spore e propaguli estremamente resistenti, spesso multicellulari e fortemente pigmentati. Al fine di individuare l'esatto ruolo ecologico delle singole specie sarà necessario allestire prove di stress in laboratorio e valutare le risposte degli organismi non solo in termini di sviluppo miceliare ma anche in termini di adattamenti morfo-fisiologici e riproduttivi. Individuare specie in grado non solo di tollerare, ma di svilupparsi in condizioni alofile estreme, appare estremamente interessante non solo per le potenziali applicazioni biotecnologiche ma soprattutto per valutare lo stato di salute e le capacità di autodepurazione di un sistema complesso che presenta condizioni di elevata salinità.

L'individuazione di una comunità composita che presenta al suo interno specie in grado di tollerare un ampio range di salinità e di sviluppare in condizioni ambientali diverse, è estremamente importante in un ambiente come quello osservato nelle vasche delle saline (in particolare S4, Sint e S5) in cui non solo si raggiungono elevate concentrazioni di sale ma si osservano anche delle ampie fluttuazioni nella salinità (Fig. 2). In questo sistema una comunità composita che va da specie ruderali a rapido accrescimento e debolmente alofile, fino ad organismi alofili "estremi", costituisce una importante risorsa, in quanto consente il mantenimento del sistema soprattutto per quanto concerne la mineralizzazione aerobica della componente organica.

Confrontando i cinque siti di campionamento, selezionati sulla base delle salinità crescenti (Fig.2), si osserva una sostanziale stabilità nel numero delle specie (Fig. 13) nei campioni S1, S2 e S4 e S5 un forte incremento in Sint. Il numero delle colonie presenta una fluttuazione maggiore e tende ad aumentare con l'aumento della salinità, raggiungendo i valori massimi in Sint. Nelle vasche in cui si raggiungono i valori più elevati di salinità e dove si registrano le maggiori fluttuazioni, la comunità fungina appare più ricca sia in termini di numero di specie che in termini di numero di colonie. Come precedentemente osservato, in un ambiente in cui la salinità presenta delle oscillazioni significative nell'arco dell'anno, si possono innescare condizioni tali per cui viene selezionata una comunità composita caratterizzata da specie con diversi gradi di alotolleranza ed in grado di restare quiescenti nei periodi inidonei. Le tecniche di isolamento adottate hanno consentito di fotografare la quota colturabile dell'intera comunità fungina arrivando ad ottenere lo sviluppo di tutti i propaguli presenti nel sistema, anche di quelli eventualmente non attivi al momento dell'isolamento.

La comunità fungina individuata nell'area di studio presenta un certo grado di variabilità rispetto ai siti di campionamento (Fig. 14). In particolare i biota associati alle vasche che presentano le maggiori fluttuazioni di salinità (S4, Sint e S5) presentano tra loro una correlazione positiva e statisticamente significativa (Fig. 14b). Venti specie risultano comuni tra Sint e S4 (Sorrensen= 32%) , 14 specie tra Sint e S5 (Sorrensen= 24%) e 9 tra S4 e S5 (Sorrensen= 23%). Non presentano correlazione statisticamente significative i campioni provenienti da S1 e S2 (Fig. 14b). Appare plausibile che la comunità S1 sia strettamente relazionata alla comunità dei funghi marini, il



sistema appare piuttosto stabile con salinità leggermente superiori all'acqua di mare ma con fluttuazioni modeste. In questo campione il maggior numero di specie è stato identificato alla salinità del 35‰. In S2 si osserva già una selezione della comunità, solo 8 specie risultano comuni con S1, ma dal punto di vista quali-quantitativo i due microbiota non presentano nessuna correlazione (Pearson 0.035). Si osserva una debole correlazione tra S1 e S4, questa appare attribuibile alla comune presenza di poche specie: *Cladosporium* sp. Fr1, *Cladosporium* sp. Fr2, *Cladosporium* sp. Fr3, *Acremonium* sp. che sono presenti in tutti i campioni ad eccezione di S5. Queste specie sono probabilmente in grado di tollerare ampie oscillazioni di salinità, anche se la loro assenza da S5 non ci consente di annoverarli tra gli alotolleranti estremi, questo potrebbe essere legato sia a limiti fisiologici che di competizione ecologica, solo analisi più dettagliate volte a verificare i limiti fisiologici delle specie rispetto alla salinità potranno fornire utili indicazioni sull'ecologia di queste specie. La presenza di queste specie, tipicamente marine, in habitat con salinità che vanno dal 35‰ ad oltre il 140 ‰ appare in linea con quanto osservato in una precedente ricerca su un gruppo di funghi marini che, in condizioni di laboratorio hanno evidenziato una grande capacità di adattamento anche a salinità molto elevate (240 ‰), (Pasqualetti *et al.*, 2014; Pasqualetti & Tempesta, 2014).

Alcuni generi sono esclusivamente presenti in S1 *Epicoccum*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Trichoderma*, *Dendriphyella*, *Drechslera* ed *Ardhacandra*, le specie identificate, appartenenti a questi generi, sono funghi marini con un range di tolleranza alle salinità piuttosto ristretto.

I biota fungini associati a S4, Sint e S5 risultano strettamente correlati, come anche evidenziato dagli elevati valori dell'indice di Pearson ( $\geq 5$ ) e statisticamente significativi con  $P > 99\%$ . Queste comunità non sono solo in grado di tollerare elevate salinità, ma si sviluppano in un ambiente estremamente variabile in cui le condizioni osmotiche del sistema possono variare anche in modo repentino (apporto di acqua, pioggia, evaporazione ecc.). La principale differenza tra queste comunità è la maggiore ricchezza sia in termini di specie, che di UFC nella vasca Sint, attribuibile alle contaminazioni animali a cui è soggetta questa area. Al fine di individuare le specie che potremmo definire alotolleranti estreme possiamo prendere in considerazione le specie esclusivamente presenti in S5, accanto ad alcune specie di *Cladosporium* ed *Ulocladium* ritroviamo *Nigrospora* sp., *Dycima* sp. ed un lievito nero dimorfico (Ascomicete M1). Queste specie presentano dei propaguli riproduttivi caratterizzati da una forte melanizzazione, la presenza di melanina è stata spesso considerata un meccanismo di difesa, che conferisce una elevata resistenza a queste strutture in ambienti caratterizzati da forti stress ambientali.

Da segnalare anche la presenza di due specie *Bispora* sp1 e *Bispora* sp2 che compaiono nelle vasche a salinità maggiori ma che risultano particolarmente abbondanti in S5. Al fine di individuare gli alofili estremi è stata condotta una prova a latere del presente studio, nella quale sono stati utilizzati come terreni di isolamento CMA e MEA con salinità del 240 ‰. Solo i filtrati provenienti da Sint e S5 hanno presentato lo sviluppo di UFC. In particolare in queste condizioni sono state isolate solo le specie di *Bispora*, il lievito dimorfico (Ascomicete M1) ed alcune specie di *Cladosporium*. Inoltre le colonie si sono sviluppate dopo un tempo di incubazione di circa 90 giorni, un tempo lunghissimo rispetto ai 3-10 giorni delle altre prove. Questo periodo è stato probabilmente necessario a queste specie per adattare il loro metabolismo alle condizioni osmotrofiche estreme.

## SVILUPPI FUTURI

La ricerca ha messo in evidenza una elevata ricchezza micologica nelle vasche delle saline, con un certo grado di variabilità rispetto alle condizioni ambientali.

Sono stati individuati generi particolarmente rappresentativi del sistema (*Cladosporium*, *Alternaria*, *Ulocladium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) sia in termini di specie che di frequenza percentuale. Queste specie sono state studiate e caratterizzate morfologicamente e si è deciso di sottoporle ad indagine molecolare.

Al fine di caratterizzare in modo più puntuale la comunità “composita” individuata nella presente ricerca, le specie identificate e conservate saranno sottoposte ad analisi fisiologiche per valutare i loro limiti di tolleranza e gli optimum di crescita. Sulle specie alofile verranno condotti studi applicativi al fine di valutare il loro potenziale biotecnologico.

Sarebbe auspicabile proseguire con studi micologici di base mirati sia ad estendere la conoscenza delle comunità fungine alofile associate ai diversi substrati organici reperibili nelle vasche, come pure monitorare nel tempo la stabilità o la fluttuazione della comunità fungine, in modo da poter valutare lo stato di conservazione di questa importantissima categoria ecologica (decompositori) necessaria per il mantenimento e l'equilibrio del sistema saline.

## BIBLIOGRAFIA

Amils R., Ellis-Evans C., Hinghofer-Szalkay H.G., 2007 - Investigating life in extreme environments—A European perspective. (Ed.): N. Walter, ESF, Cedex Strasbourg, France.

Brock T.D., 1978 – Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer-Verlag, New York, pp. 465.

Butinar L., Zalar P., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N., 2005 – The genus Eurotium – members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. FEMS Microbiology Ecology 51: 155-166.

Chung J., Shin S., Oh J., 2009 - Characterization of a microbial community capable of reducing perchlorate and nitrate in high salinity. Biotechnol. Lett., 31: 959-966.

Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitas A., 2005a - Halotolerant and halophilic fungi. Biodiversity of Fungi: Their Role in Human Life (Deshmukh SK & Rai MK, eds), pp. 69–127. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, New Delhi, India.

Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A., 2005b - Adaptation to Life in High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Springer, Dordrecht, the Netherlands.

Gunde-Cimerman N., Ramos J., Plemenitas A., 2006 - Halotolerant and halophilic fungi mycological research 113: 1231 – 1241

Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitas A., 2000 - Hypersaline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiol Ecol, 32, 235–240.

Hyde K.D., Pointing S.B., 2000 - Marine Mycology. A Practical Approach. Fungal Diversity Press, Hong Kong.

Javaux E.J., 2006 – Extreme life on Earth - past, present and possibly beyond. *Research in Microbiology* **157**: 37-48.

Jones E. B. G., Sakayaroj J., Suetrong S., Somrithipol S., Pang K. L. 2009 – Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Diversity* **35**: 1-203.

Licolen R.J., Boxhall G.A., Clark P.F., 1982 – A Dictionary of ecology, evolution and systematic, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 298.

Nicolaus B., Schiano Moriello V., Lama L., Poli A., Gambacorta A., 2004 – Polysaccharides from extremophilic microorganisms. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **34**: 159-169.

Oren A., 2002 - Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. of Industrial Microbiol. and Biotech.*, **28**: 56-63.

Oren A., 2010 - Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.*, **31**: 825-834.

Pasqualetti M., Paoletti M., Fenice M., Tempesta S., 2014 - Studi preliminari sulla biodiversità dei funghi marini isolati nell'area costiera dell'Isola del Giglio. In: Riassunti. Convegno Gestione Sostenibile del Mediterraneo. Accademia Nazionale dei Lincei. Roma 21 marzo 2014.

Pasqualetti M., Tempesta S., 2014 - I funghi marini possono avere un ruolo negli ambienti iperalini? In: La Riserva Naturale Statale di Tarquinia. Ed. Lorenza Colletti. Rodorigo s.r.l. Roma, 111-117.

Plemenitaš A., Vaupotic T., Lenassi M., Kogej T., Gunde-Cimerman N., 2008 - Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Stud Mycol* **61**: 67–75.

Stetter K.O., 1999 – Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters* **452**: 22-25.

Zajc J., Zalar P., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N., 2012 - The Mycobiota of the Salterns, in *Biology of Marine Fungi*, ed Raghukumar C., editor. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; ), 133–158.