

# CARATTERIZZAZIONE FILOGENETICA DELLA COMUNITÀ BATTERICA DI TRE LAGHI ANTARTICI

L. Michaud, A. Lo Giudice, C. Caruso, S. Mangano, V. Bruni  
Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina, Università di Messina, Salita Sperone  
31, 98166 Messina (vbruni@unime.it)

## Tema 1: Conservazione e gestione degli habitat

### Inquadramento della tematica

Il continente antartico si caratterizza per l'isolamento geografico e climatico, nonché per la scarsa o assente influenza antropogenica. I laghi antartici, riserva naturale di biodiversità, ospitano biotopi incontaminati, spesso soggetti a lunghi periodi di copertura ad opera di ghiaccio o neve, a basse temperature e a livelli trascurabili di radiazione fotosinteticamente attiva. La loro comunità planctonica, dominata da organismi del *microbial loop* (tra cui batteri, protozoi e fitoplancton), è sottoposta ad un'elevata pressione selettiva derivante dalle estreme condizioni ambientali. Per tale motivo, tale comunità è potenzialmente costituita da organismi appartenenti a *taxa* endogeni, magari non ancora descritti, e caratterizzati da nuovi adattamenti biochimici, tra cui proteine anti-gelo, enzimi adattati al funzionamento a bassa temperatura e tolleranza all'essiccamento o ad elevate concentrazioni saline.

### Obiettivi del lavoro

Lo scopo del lavoro è stato quello di conoscere dal punto di vista filogenetico, con tecniche sia dipendenti che indipendenti dalla coltivazione, le comunità batteriche di tre laghi antartici, habitat unici e peculiari da conservare e proteggere.

### Metodologia adottata

Durante l'Estate Australe 2004-05, campioni di acqua superficiale sono stati prelevati con ogni cura di asepsi da tre laghi antartici ubicati nella Terra Vittoria: Crater Cirque (CC; coordinate: 72° 36.531' S - 169° 21.631' E), Inexpressible Island (INI; coordinate: 74° 53' 45.2" S - 163°44' 00.5" E) e Luther Peak (LH; coordinate: 72° 22.276' S - 169° 52.984' E).

L'abbondanza del batterioplancton totale (cellule ml<sup>-1</sup>) è stata stimata mediante conteggi diretti al microscopio ad epifluorescenza, previa colorazione con DAPI (Porter e Feig, 1980). Per la determinazione del numero di microrganismi coltivabili (CFU ml<sup>-1</sup>), ciascun campione è stato diluito serialmente e seminato in duplicato su R2A Agar (Difco). Le piastre sono state incubate a 4°C fino all'arrivo in Italia.

La diversità batterica all'interno della frazione coltivabile è stata investigata dopo isolamento su terreno R2A e *fingerprinting* genetico. Il 16S rDNA dei ceppi isolati è stato sottoposto ad amplificazione via PCR e a successiva analisi di restrizione (ARDRA, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) adoperando l'enzima *AluI*. Sulla base dei risultati ottenuti dal confronto dei profili ARDRA, almeno due rappresentanti per ogni OTU (*Operational Taxonomic Unit*), presumibilmente specie-specifiche, sono stati sottoposti al sequenziamento del 16S rDNA (Michaud et al., 2004).

Per la determinazione dell'abbondanza *in situ* di differenti gruppi batterici mediante *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH), aliquote del campione originale sono state fissate in paraformaldeide (concentrazione finale, 4 %) e conservate a 4°C. I campioni, filtrati su membrane in policarbonato (diametro, 25 mm; porosità, 0,22 µm), sono stati ibridati con le seguenti sonde oligonucleotidiche marcate con il fluorocromo CY3: EUB mix (EUB338 I + EUB338 II e EUB338 III), ALF968, BET42a, GAM42a, ARCH915, HGC69a, LGC mix (LGC354a + LGC354b + LGC354c) e CF319a (Brinkmeyer et al., 2003).

### **Risultati dell'indagine**

L'abbondanza del batterioplancton totale, espressa in cellule ml<sup>-1</sup>, era compresa tra  $2,83 \pm 1,4 \times 10^5$  e  $4,51 \times 10^5$  cellule ml<sup>-1</sup>. La percentuale di coltivabilità, ricavata dal confronto tra i conteggi totali e vitali, è risultata nel range 0,20-12 %.

Differenze nella composizione degli assemblaggi batterici sono state osservate tra i laghi investigati, sia studiando la sola frazione coltivabile che adoperando la FISH sui campioni naturali.

Dalle piastre di R2A sono stati isolati 480 ceppi, di cui: 196 isolati da CC, 146 da LH e 138 da INI. L'analisi dei profili di restrizione ARDRA ha permesso di suddividere i ceppi isolati in 25, 27 e 26 OTU, rispettivamente per i campioni prelevati da CC, LH ed INI. Nel complesso, l'identificazione dei rappresentanti delle OTU ottenute ha condotto all'individuazione di 5 gruppi filogenetici differenti:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  *Proteobatteri*, *Bacteroidetes* e *Attinobatteri*. Una piccola percentuale di ceppi ha mostrato di essere strettamente correlata a batteri non ancora classificati. I  $\gamma$ -*Proteobatteri* sono apparsi predominanti nel lago INI, mentre i ceppi isolati da LH e CC appartengono principalmente ai *Bacteroidetes*. Gli *Attinobatteri* sono stati isolati quasi esclusivamente da CC, mentre gli  $\alpha$ -*Proteobatteri* coltivabili erano pressoché assenti nel lago LH. Il genere *Pseudomonas* è risultato essere predominante tra i  $\gamma$ -*Proteobatteri*, mentre appartenenti a *Flavobacterium* spp. sono apparsi frequenti tra i *Bacteroidetes*. Ceppi strettamente correlati al  $\beta$ -*Proteobatterio* *Simplicispira* sp. R-23033 ed a *Flavobacterium segetis* sp. AT1048 (phylum *Bacteroidetes*) sono risultati comuni ai laghi LH e CC.

Nel complesso, il tasso di ibridizzazione della FISH nei confronti di cellule colorate con DAPI era variabile tra il 57,1% e l'89,2%. In media il 47% delle cellule ibridizzava con la sonda batterica generica EUB338 mix. In tutti e tre i laghi, i batteri ibridanti con la sonda gruppo-specifica CF319a erano predominanti. L'applicazione della FISH ha consentito di individuare anche microrganismi appartenenti ai *Firmicutes* (sonda LGC mix) ed agli *Archea* (sonda ARCH915).

### **Riferimenti Bibliografici**

Michaud L., Di Cello F., Brilli M., Fani R., Lo Giudice A., Bruni V. 2004. Biodiversity of cultivable Antarctic psychrotrophic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea). *FEMS Microbiol. Lett.*, 230: 63-71

Porter K.G., Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 943-948.

Binkmeyer R., Knittel K., Jürgens J., Weyland H., Amann R., Helmke E. 2003. Diversity and Structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 6610-6619.

### **CURRICULUM Luigi Michaud**

Dottore di Ricerca in "Scienze Ambientali" ed in "Ecologia, biodiversità ed evoluzione", attualmente lavora presso il Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina dell'Università di Messina. Si occupa di Ecologia Microbica (in particolare in Antartide ed in impianti acquacoltura). E' autore di 16 fra pubblicazioni nazionali e internazionali, oltre a più di 40 comunicazioni a congresso nazionali e internazionali.

