



ISTITUTO DI RICERCA SULLE ACQUE
del Consiglio Nazionale delle Ricerche

via Salaria km 29,300 CP10
00016 Monterotondo (RM)
☎ +39-06-90672850-1
FAX +39-06-90672787

CNR Short-term mobility – Bando Anno 2009

Istituzione ospitante: Limnological Station - Institute of Plant Biology - University of Zurich



Applicazione della citometria a flusso e del sorting cellulare nello studio delle reti trofiche microbiche

Proponente: Dott. Alberto Puddu (IRSA)
Fruitore: Dott. Stefano Amalfitano (IRSA)
Ospite: Prof. Jakob Pernthaler (UZH)

Descrizione del progetto

Il *sorting* cellulare, ovvero la discriminazione diretta e l'isolamento di diversi gruppi cellulari distinti sulla base di specifiche caratteristiche morfologiche e funzionali, è un'applicazione avanzata della citometria a flusso che sta trovando spazio in studi di ecologia microbica grazie al miglioramento della sensibilità e della velocità di analisi degli strumenti in commercio. Il presente progetto, tramite l'applicazione della tecnica suddetta contribuisce ad indagare le dinamiche strutturali di comunità batteriche acquatiche sottoposte al controllo dei predatori. I meccanismi di resistenza e vulnerabilità microbica alla predazione incidono fortemente sull'efficienza nel trasferimento di energia ai livelli superiori della catena trofica. La conoscenza più approfondita di questi meccanismi è fondamentale per comprendere il ruolo funzionale della comunità microbica come componente basale della piramide trofica acquatica.

Project description

The direct discrimination and isolation of several distinct cell groups on the basis of specific morphological and functional characteristics is an advanced flow cytometry application which is encountering novel opportunities in studies of microbial ecology thanks to new instrumental improvements of cytometric tools. This project, by applying the technique above described, will help to investigate the structural dynamics of aquatic bacterial communities, naturally controlled by grazing activity. The mechanisms of microbial resistance and vulnerability to grazers heavily affects the energy transfer to higher trophic levels. The better understanding of these mechanisms is crucial to define the functional role of microbial communities as the baseline part of the aquatic microbial food web.

Introduzione

Negli ultimi anni la citometria a flusso, associata all'utilizzo di coloranti fluorescenti specifici per la marcatura degli acidi nucleici cellulari (Shapiro, 1995), è sempre più utilizzata in campo ambientale per la caratterizzazione quantitativa e morfologica delle comunità microbiche degli ecosistemi acquatici. Il principale vantaggio dell'applicazione di questo metodo è la rapidità delle misure e l'elevata riproducibilità, favorita dall'alto numero di cellule che è possibile contare in breve tempo, oltre che da una minore soggettività rispetto alle tecniche di microscopia. Il citometro a flusso infatti è in grado di contare singole particelle che passano di fronte ad un raggio laser registrandone, attraverso specifici fotomoltiplicatori, alcune caratteristiche tra cui l'intensità di fluorescenza e la luce rifratta su diversi piani angolari. L'insieme e le diverse combinazioni di dati multiparametrici consentono di distinguere e quantificare cellule (o popolazioni cellulari) distinte sulla base di specifiche caratteristiche strutturali e morfologiche (Bouvier et al., 2007; Felip et al., 2007). Inoltre, attraverso un processo di *sorting* cellulare, lo strumento può riconoscere ed associare una carica elettrostatica a micro-gocce di fluido, create dal particolare sistema di flusso, contenenti i microrganismi con definiti ed omogenei criteri strutturali (es. fluorescenza e dimensioni). Tali gocce possono quindi essere deviate da un campo magnetico per essere isolate, consentendo di selezionare specifici gruppi microbici anche *in vivo* (Reckermann, 2000). Grazie al miglioramento della sensibilità e della velocità di analisi degli strumenti in commercio, questa applicazione avanzata della citometria a flusso sta trovando spazio in studi di ecologia microbica, non solo per la rapida valutazione di parametri di base (es. abbondanza e biomassa batterica) ma anche per comprendere le dinamiche strutturali e quindi il ruolo dei diversi gruppi microbici nei processi ecosistemici (es. ciclo del carbonio e rapporti trofici).

Purtroppo il citometro a flusso è ancora uno strumento molto costoso, per cui la sua utilizzazione è limitata solo a pochi laboratori di ricerca. Con l'obiettivo di acquisire ulteriori competenze nell'utilizzo del citometro a flusso in vista di un possibile futuro acquisto dello strumento presso l'IRSA-CNR, il progetto si è inserito nelle attività di ricerca portate avanti presso la Stazione Limnologica dell'Università di Zurigo che ha in dotazione il Cytopeia's Influx™ cell sorter (Becton & Dickinson), in grado di "smistare" fino a 25.000 cellule/s. In particolare, sono state studiate le dinamiche strutturali di comunità batteriche acquatiche sottoposte al controllo dei predatori, attraverso l'allestimento di microcosmi in laboratorio. I meccanismi di resistenza e vulnerabilità microbica alla predazione incidono fortemente sull'efficienza nel trasferimento di energia ai livelli superiori della catena trofica. Di conseguenza, la conoscenza più approfondita di questi meccanismi è fondamentale per comprendere il ruolo funzionale della comunità microbica come componente basale della piramide trofica acquatica.

Oltre a fornire nuove competenze tecniche, il progetto ha rafforzato la cooperazione tra i gruppi di ricerca delle istituzioni coinvolte che da anni portano avanti una proficua collaborazione scientifica.

Attività svolte durante il periodo di lavoro presso i laboratori della Stazione Limnologia.

05-07 Ottobre: Messa a punto dello schema sperimentale e raccolta dei campioni

07-14 Ottobre: Allestimento ed analisi del primo esperimento in laboratorio

- Conta degli aggregati microbici, formati in seguito al processo di predazione (microscopia ad epifluorescenza, citometria a flusso)
- Quantificazione dei gruppi filogenetici all'interno degli aggregati microbici (tecniche di ibridazione *in situ*, FISH e CARD-FISH)
- *Sorting* degli aggregati e allestimento colture batteriche

14-21 Ottobre: Allestimento ed analisi del secondo esperimento in laboratorio

- Conta degli aggregati microbici e dei batteri filamentosi (microscopia ad epifluorescenza, citometria a flusso)
- Quantificazione dei gruppi filogenetici all'interno degli aggregati microbici (tecniche di ibridazione *in situ*, FISH e CARD-FISH)
- *Sorting* degli aggregati e allestimento colture batteriche

21-25 Ottobre: Allestimento ed analisi di specifiche colture pure batteriche

- Isolamento delle colonie formate in seguito al processo di *sorting* su piastra.
- Allestimento di specifiche colture pure di cellule presenti negli aggregati e di cellule filamentose.
- Test di resistenza dei ceppi isolati in presenza del predatore

Metodi

Campionamento ed allestimento dei microcosmi in laboratorio

I campioni d'acqua sono stati prelevati nel Lago di Zurigo, a circa 5 metri di distanza dalla riva, e filtrati su membrane in policarbonato con porosità 0.8 μm (Nucleopore) per eliminare il particolato e gli organismi di dimensioni superiori, inclusi i predatori naturali (ciliati e flagellati).

I microcosmi sono stati allestiti in beute da 500 ml (Figura 1) utilizzando acqua di lago artificiale con aggiunte di peptone, glucosio ed estratto di lievito (3mg/L).

Nel primo esperimento, per ogni trattamento (3 repliche) sono state effettuate aggiunte di un inoculo di acqua di lago (diluizione 1:10) in modo da raggiungere una concentrazione finale di circa $2.5 \cdot 10^5$ batteri/ml. Nel trattamento di controllo (*bact*) non sono state fatte ulteriori aggiunte, mentre nel secondo trattamento (*bact*+*Ochro*) è stato aggiunto il flagellato mixotrofo *Ochromonas* spp. in modo da raggiungere una concentrazione finale di circa 260 cellule/ml (1:1000 rispetto all'abbondanza batterica). I microcosmi sono stati incubati per 120h al buio alla temperatura ambientale. Due aliquote da 5 ml sono state prelevate da tutte le beute ogni 24h di incubazione e fissate con paraformaldeide (concentrazione finale 2%) e glutaraldeide (c.f. 2%), rispettivamente per le conte al microscopio ed al citometro.

Nel secondo esperimento, è stato mantenuto lo stesso schema sperimentale raddoppiando la concentrazione di predatori nel trattamento *bact*+*Ochro* (500 cellule/ml) e aggiungendo un terzo trattamento (*bact*+*Ochro*+*Sphing*) in cui sono state aggiunte circa 10^3 cellule/ml appartenenti ad un ceppo batterico (*Sphingobium* sp.) noto per formare aggregati in presenza di flagellati predatori.

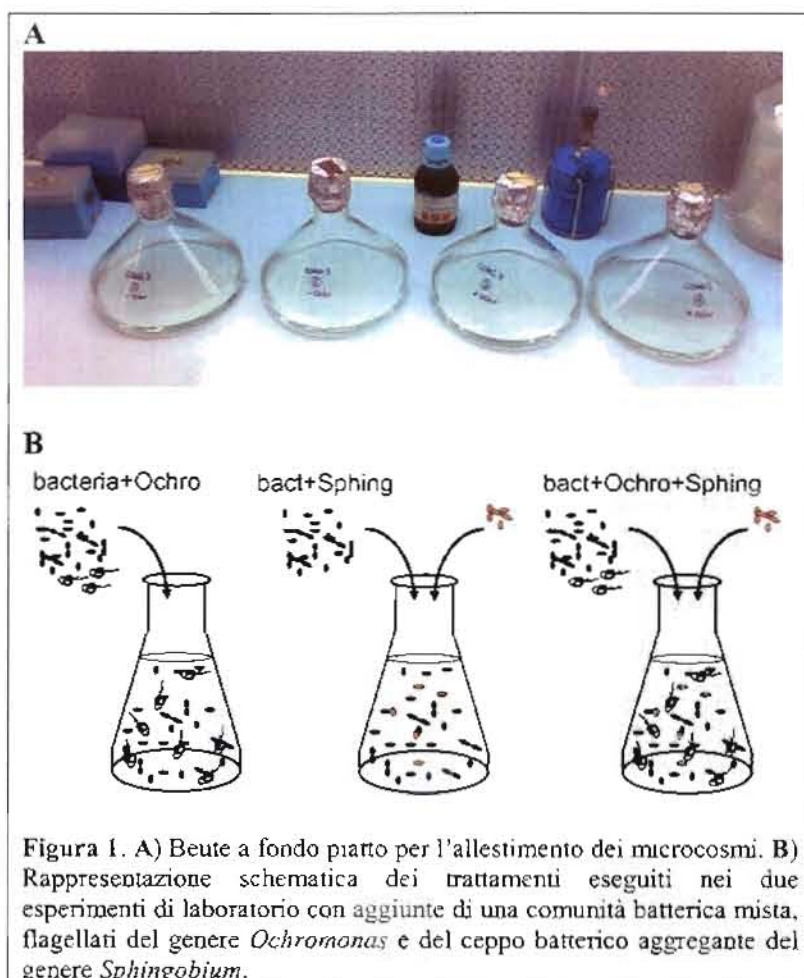
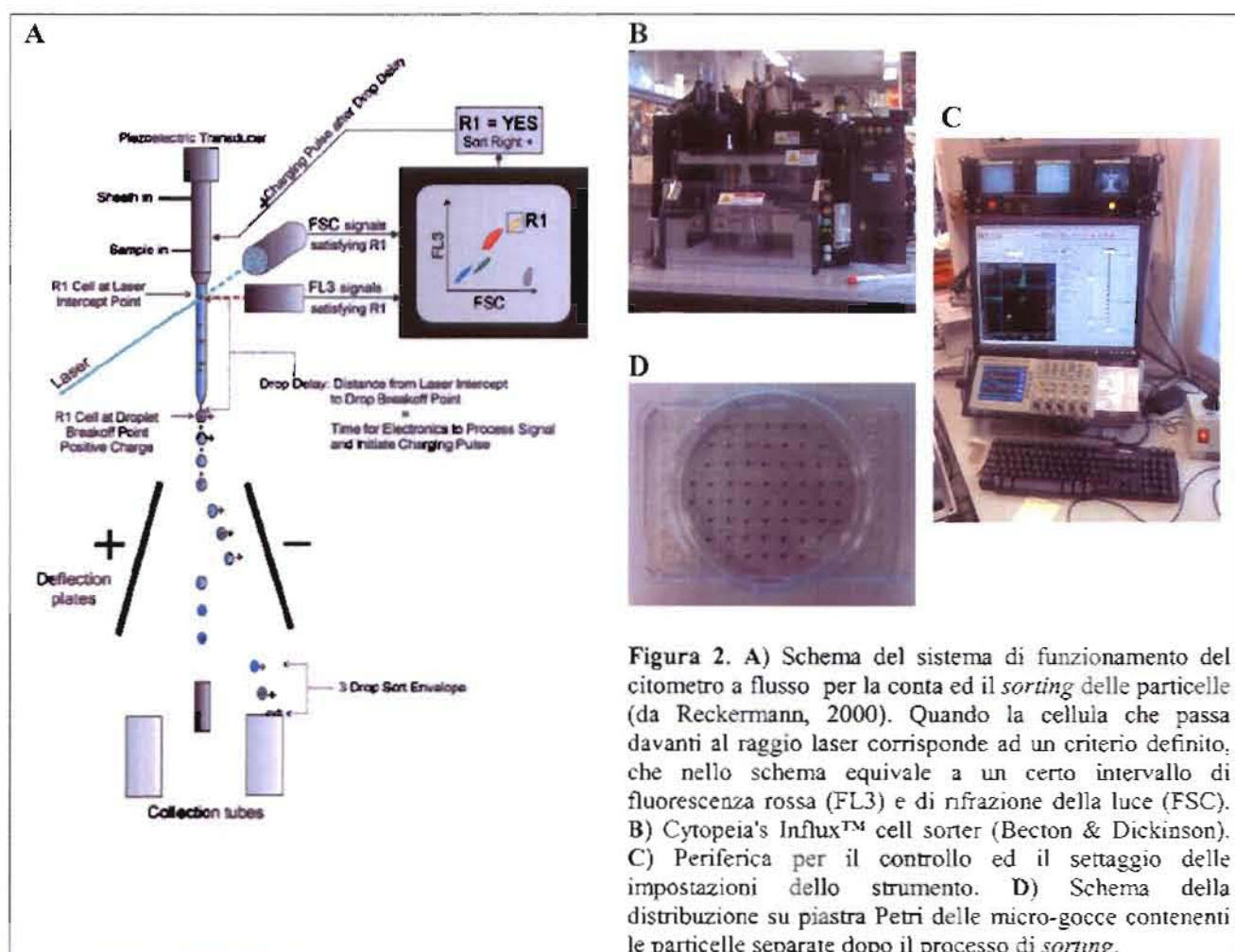


Figura 1. A) Beute a fondo piatto per l'allestimento dei microcosmi. B) Rappresentazione schematica dei trattamenti eseguiti nei due esperimenti di laboratorio con aggiunte di una comunità batterica mista, flagellati del genere *Ochromonas* e del ceppo batterico aggregante del genere *Sphingobium*.

Per la conta totale di cellule, aggregati cellulari e filamenti, le aliquote analizzate sono state marcate con il colorante fluorescente SYBR Green (c.f. 1:20000; Molecular Probes), dopo incubazione al buio per 15 min. Per stimare la densità cellulare si è tenuto conto del volume analizzato determinato in base al tempo di acquisizione. I citogrammi della fluorescenza verde (FL1) in funzione della luce rifratta a 90° (side light scatter - SSC) sono stati utilizzati per identificare e contare cellule ed aggregati batterici distinguendoli graficamente (Gasol e Del Giorgio, 2000). I citogrammi della fluorescenza rossa (FL3) in funzione del SSC sono stati utilizzati per identificare e contare le cellule di *Ochromonas* naturalmente caratterizzate da pigmenti fotosintetici.

Il *sorting* degli aggregati è stato eseguito sulla base del loro specifico segnale della FL1 in funzione del SSC. Ad ogni sessione di lavoro lo strumento è stato calibrato per settare e stabilizzare la distanza tra la punta del capillare e la formazione delle micro-gocce a cui assegnare la carica elettrostatica. Una soluzione di biglie fluorescenti da 0.97 μm di diametro a concentrazione nota (Polyscience) è stata aggiunta come standard interno per controllare il corretto funzionamento dello strumento e delle sue impostazioni. Attraverso il processo di *sorting* gli aggregati con un diametro minore di 70 μm sono stati isolati in micro-gocce che sono state disposte secondo uno schema preciso su un terreno di crescita all'interno di una piastra Petri (Figura 2). Le colonie batteriche formatesi sulle piastre dopo 48h di incubazione sono state prelevate separatamente ed isolate su terreno liquido per ottenere colture pure di ceppi batterici presenti negli aggregati. Ogni coltura pura così ottenuta è stata incubata nuovamente in presenza di *Ochromonas* per testare le capacità aggreganti e di resistenza alla predazione di ogni singolo ceppo isolato dagli aggregati microbici.



La composizione filogenetica degli aggregati è stata analizzata tramite ibridazione in situ (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH) con sonde fluorescenti oligonucleotidiche rRNA specifiche, secondo il protocollo descritto da Pernthaler et al. (2001). In entrambi gli esperimenti, sono state utilizzate le sonde ALF1b, BET42a, GAM42a, CF319a, HGC69a e LGC354abc specifiche rispettivamente per le sottoclassi *Alpha*-, *Beta*- e *Gamma*- dei *Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, *Actinomycetes* e *Firmicutes*, marcate con i fluorocromi fluorescina (FLU - emissione verde) o indocarbocianina (CY3 - emissione rossa).

In casi di identiche condizioni di ibridazione e di stringenza delle sonde oligonucleotidiche, sono state effettuate doppie ibridazioni con sonde differentemente marcate (es. sonda BET42a-FLU e GAM42a-CY3). In caso contrario, sono state effettuate alcune doppie ibridazioni di controllo seguendo il protocollo della Multi-color CARD-FISH (Pernthaler et al., 2004), utilizzando sonde marcate con perossidasi (HRP) per l'attivazione enzimatica di composti attivati della tirammide marcati con i fluorocromi FLU o ALEXA 633 (emissione rossa).

Risultati

Dinamiche di crescita degli aggregati microbici nei microcosmi

In entrambi gli esperimenti, rispetto ai trattamenti di controllo, si è osservato un significativo aumento di aggregati batterici nei trattamenti in presenza del predatore, con valori massimi di circa 800 aggregati/ml e un rapporto 1:1000 con le cellule free-living, dopo 120h di incubazione (Figura 2). Le aggiunte del ceppo batterio aggregante del genere *Sphingobium* non hanno prodotto nessun effetto significativo sulle dinamiche della comunità. Nel secondo esperimento, si è osservata anche la crescita di cellule filamentose che hanno raggiunto concentrazioni elevate nell'ordine di 10^3 filamenti/ml, dopo 48h di incubazione. La presenza di batteri filamentosi è stata confermata sia attraverso l'osservazione dei campioni al microscopio ad epifluorescenza sia attraverso il processo di *sorting* cellulare. Le cellule di *Ochromonas*, utilizzando i batteri come risorsa trofica, hanno superato la concentrazione di circa 10000 individui/ml al termine delle incubazioni (Figura 4).

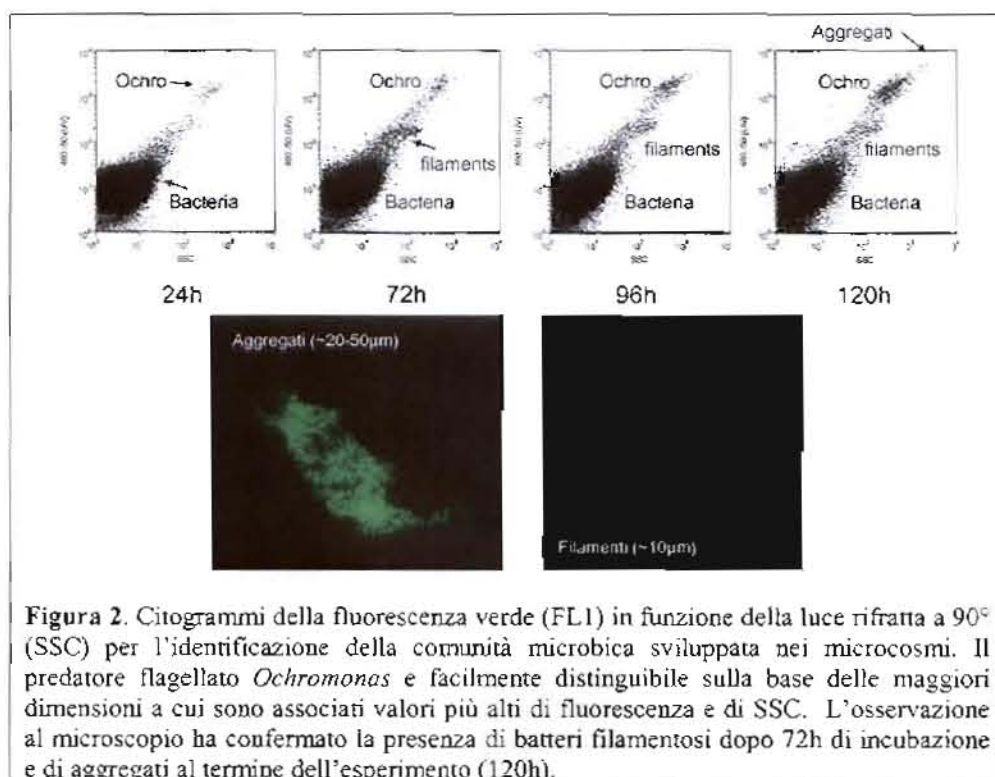


Figura 2. Citogrammi della fluorescenza verde (FL1) in funzione della luce rifratta a 90° (SSC) per l'identificazione della comunità microbica sviluppata nei microcosmi. Il predatore flagellato *Ochromonas* è facilmente distinguibile sulla base delle maggiori dimensioni a cui sono associati valori più alti di fluorescenza e di SSC. L'osservazione al microscopio ha confermato la presenza di batteri filamentosi dopo 72h di incubazione e di aggregati al termine dell'esperimento (120h).

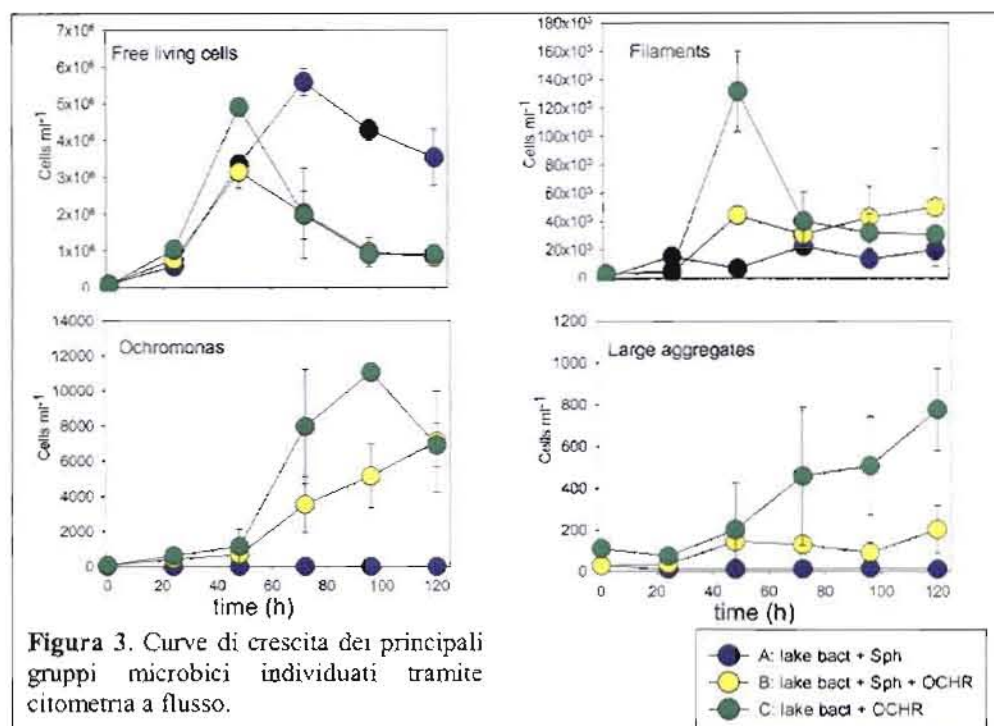


Figura 3. Curve di crescita dei principali gruppi microbici individuati tramite citometria a flusso.

Composizione filogenetica degli aggregati microbici

L'applicazione delle sonde specifiche ha mostrato la presenza solo di alcune sottoclassi batteriche all'interno degli aggregati analizzati nei campioni prelevati dopo 96h e 120h di incubazione. I *Beta-Proteobacteria* sono il gruppo numericamente più abbondante in tutti gli aggregati finora analizzati, con percentuali che variano tra il 70% ed il 90% delle cellule totali. Anche i *Gamma-Proteobacteria* sembrano essere sempre presenti ma con percentuali estremamente più basse che variano tra il 2% e l'8% (esempio in Figura 4). I membri della sottoclasse degli *Alpha-Proteobacteria* hanno raggiunto percentuali del 10% ma non erano presenti in tutti gli aggregati analizzati.

Finora, sia applicando la FISH che la CARD-FISH, non è stato possibile identificare all'interno degli aggregati nessuna cellula appartenente ai gruppi *Cytophaga-Flavobacteria*, *Actinomycetes* e *Firmicutes*.

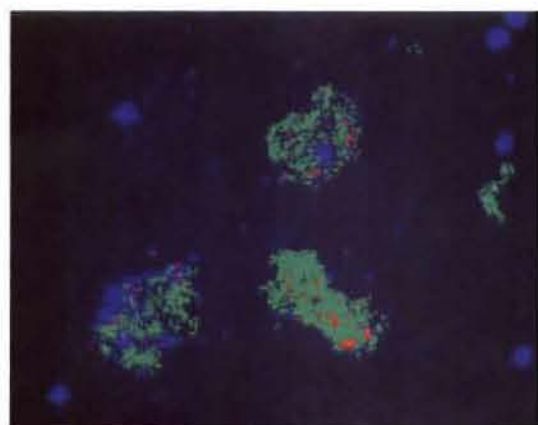


Figura 4. Sovrapposizione delle immagini ottenute dopo l'ibridazione in situ (FISH) con sonde fluorescenti. In blu le cellule totali marcate con DAPI; in verde le cellule ibridate con la sonda BET42a marcata con fluoresceina (FLU). In rosso le cellule ibridate con la sonda GAM42a marcata con indocarbocianina (CY3).

Sorting degli aggregati ed isolamento di ceppi batterici resistenti alla predazione

Attraverso il processo di *sorting* e di piastramento degli aggregati microbici, è stato possibile distinguere ed isolare 50 diverse colonie batteriche su un terreno di agar arricchito. La capacità di resistenza alla predazione attraverso la formazione di aggregati, è stata finora testata su 7 ceppi isolati in coltura pura. Di questi soltanto uno è risultato resistente alla predazione, formando aggregati che non possono essere ingeriti dai flagellati del genere *Ochromonas* (Figura 5).

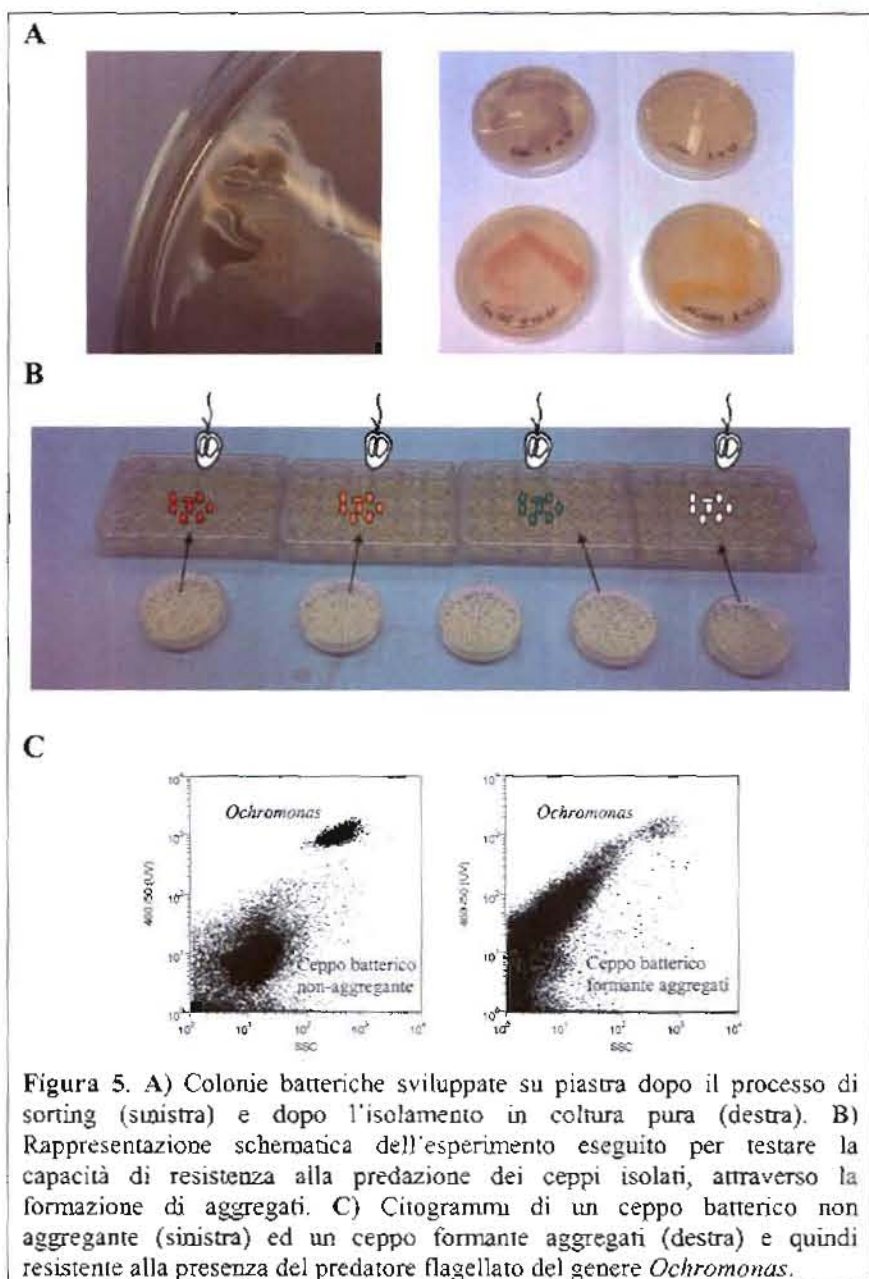


Figura 5. A) Colonie batteriche sviluppate su piastra dopo il processo di sorting (sinistra) e dopo l'isolamento in coltura pura (destra). B) Rappresentazione schematica dell'esperimento eseguito per testare la capacità di resistenza alla predazione dei ceppi isolati, attraverso la formazione di aggregati. C) Citogrammi di un ceppo batterico non aggregante (sinistra) ed un ceppo formante aggregati (destra) e quindi resistente alla presenza del predatore flagellato del genere *Ochromonas*.

Discussione e prospettive di ricerca

Attraverso l'applicazione della citometria a flusso e del sorting cellulare è stato possibile seguire le dinamiche di crescita di un popolamento batterico sottoposto a predazione in un sistema sperimentale controllato. I risultati hanno confermato che l'aggregazione cellulare può costituire un importante meccanismo batterico di difesa contro la predazione da parte dei microrganismi di maggiori dimensioni come i flagellati (Pernthaler et al., 2005). Ogni aggregato è costituito da un popolamento misto di diversi gruppi batterici che trovano un vantaggio selettivo nella co-aggregazione. Nel processo di formazioni dei co-aggregati, alcuni specifici ceppi batterici potrebbero giocare un ruolo fondamentale andando a costituire dei microaggregati monospecifici che potrebbero costituire dei "rifugi" o nuclei di aggregazione per altre specie non-aggreganti e quindi più vulnerabili alla predazione.

Allo stesso tempo, gli aggregati microbici che sfuggono alla predazione da parte dei ciliati potrebbero diventare un'importante risorsa per il successivo livello della catena alimentare (es. i ciliati), complicando ulteriormente la rete dei rapporti trofici che intercorrono tra le varie componenti delle comunità microbiche acquatiche. Di conseguenza, la conoscenza più approfondita dei meccanismi di resistenza e vulnerabilità batterica alla predazione è fondamentale per comprendere il ruolo funzionale della comunità microbica come componente basale della piramide trofica acquatica.

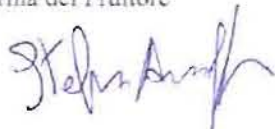
La collaborazione tra i diversi gruppi di ricerca continuerà per terminare le analisi in corso ed approfondire le informazioni sui gruppi batterici isolati attraverso l'analisi delle sequenze geniche del rRNA 16S. In questo modo sarà possibile identificare le specie batteriche che hanno preso parte ai processi di formazione degli aggregati. Inoltre, sulla base delle sequenze geniche, saranno disegnate e testate delle sonde oligonucleotidiche specie-specifiche per valutare la presenza e le dinamiche dei gruppi identificati, nel corso degli esperimenti, anche in aggregati naturalmente presenti in condizioni ambientali.

Il presente progetto ha permesso l'acquisizione delle competenze tecniche per l'utilizzo della citometria a flusso nelle analisi delle comunità microbiche acquatiche ed ha aperto nuove prospettive di ricerca per il gruppo di Ecologia Microbica dell'IRSA.

Bibliografia

- Bouvier, T., Del Giorgio P.A., Gasol J.M., 2007. A comparative study of the cytometric characteristics of High and Low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. *Environ. Microbiol.* 9:2050-2066.
- Felip, M., Andreatta S., et al. 2007. Suitability of flow cytometry for estimating bacterial biovolume in natural plankton samples: comparison with microscopy data. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4508-4514.
- Gasol, J.M., Del Giorgio P.A. 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sci. Mar.* 64:197-224.
- Pernthaler, J., Glöckner F.O., Schönhuber W., Amann R. 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods Microbiol.* 30:207-226.
- Pernthaler, A., Pernthaler J., Amann R. 2004. Sensitive multicolour fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental organisms, p. 711-726. In G. A. Kowalchuk, De Bruijn, F.J., I. M. Head, A. D. L. Akkermans, and J. D. van Elsas (ed.), *Molecular microbial ecology manual*, 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Pernthaler, J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:537-546.
- Reckermann, M. 2000. Flow sorting in aquatic ecology. *Sci. Mar.* 64:235-246.
- Shapiro, H.M., 1995. *Practical flow cytometry*, 3rd ed. Wiley-Liss, New York, NY.

Firma del Fruitore



Firma del Proponente

