

**Relazione dell'attività svolta dalla Dott.ssa Rosabruna La Ferla
del CNR_IAMC_Messina nell'ambito della STM
(AMMCNT. CNR prot. N. 0058167 del 02/09/2015) dal titolo
"Primo screening dell'assemblaggio microbico in campioni di permafrost"**

Dall'3 al 23 Novembre 2015 si è svolto il soggiorno di ricerca della Dott.ssa Rosabruna La Ferla presso Il Laboratorio di Idrobiologia dell'Università Federale di Rio de Janeiro (LH-UFRJ). Il LH-UFRJ, coordinato dal Prof. Rodolfo Paranhos, è un laboratorio polifunzionale per il monitoraggio della qualità ambientale, costituito da due diversi laboratori che provvedono l'uno all'analisi dei descrittori chimici e l'altro all'analisi dei descrittori microbiologici. In quest'ultimo, ed in particolare nell'Unità di Citometria a flusso applicata all'Ecologia Acquatica e oceanografia (UCEA), si è svolta l'attività di STM.

Il permafrost è un terreno perennemente ghiacciato, il cui spessore varia in funzione dell'età geologica in cui possono essere presenti sistemi acquatici correlati (brine). Il permafrost è sottoposto a cicli di gelo/disgelo, essiccazione, ed esposizione ad alte radiazioni solari che sono considerate ai limiti della vita e paragonabili a quelle di Marte. Tuttavia, in tali ambienti estremi, dimora un pool di microorganismi che sono ritenuti le uniche forme di vita qui presenti ed i cui meccanismi fisiologici consentono la sopravvivenza e la vitalità su scale temporali geologiche. Poche sono le conoscenze attuali sulle quantità, vitalità e sul grado di attività metabolica dei popolamenti adattati a tali condizioni, soprattutto in Antartide. In tale contesto, i campioni di permafrost e brine analizzati sono stati forniti dal Progetto Nazionale di Ricerche in Antartide PNRA 2013/AZ1.05 "Ecologia del Permafrost a Victoria Land: passato, presente ed evoluzione futura in un contesto di Cambiamento Climatico".

Da carote prelevate a diverse profondità a Boulder Clay e Dry Valley (Antartide), sono stati sterilmente prelevati sub-campioni di 0.5 g di permafrost, fissati con paraformaldeide sterile prefiltrata (0.22 µm porosità; concentrazione finale al 2%), incubati per 30 min a +4 °C e quindi congelati a -20 °C. I campioni di brina sono stati fissati sia con paraformaldeide sterile (come sopra riportato) che con glutaraldeide (2%) e congelati a -20 °C.

Al momento della partenza per il Brasile, tutti i campioni sono stati conservati in condizioni termicamente protette da scioglimento fino al momento delle analisi presso il LH-UFRJ. Prima del trattamento, i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente in condizioni sterili sotto cappa a flusso laminare. Di seguito, tutti i campioni sono stati asetticamente sottoposti alla quantificazione dei procarioti (batteri e archaea) e dei virus (Virus Like Particles, VPL) mediante citometria a flusso utilizzando i protocolli di seguito riportati.

Durante il soggiorno di STM, il primo obiettivo affrontato è stato quello di sperimentare il migliore protocollo analitico da adottare per lo screening dell'assemblaggio microbico dei campioni.

Analisi dei campioni di permafrost

Per l'estrazione della microflora associata alla matrice sedimentaria (permafrost), in un primo momento si è proceduto con la diluizione di 1 g di campione tal quale in 9 ml di tampone fosfato salino (Phosphate Buffered Saline, PBS) e agitazione su vortex per 3 min. I campioni sono stati quindi colorati con il colorante specifico per acidi nucleici SYBR Green I (concentrazione finale 5×10^{-4} della soluzione stock commerciale di Molecular Probes). Le cellule procariotiche sono state quindi quantificate con un citometro a flusso Facscalibur dotato dei seguenti solid state laser (488 nm, 25 mW) e filtri (green FL1 to 515 ± 30 nm, red FL4 to 660 ± 30 nm) (Gasol e Del Giorgio, 2000; Andrade et al., 2003). Per calibrare e come standard interno, sono stati sistematicamente aggiunti latex beads fluorescenti (diametro 1.58 µm).

Le abbondanze delle cellule procariotiche variavano tra $4,48E+05$ e $3,18E+06$ cellule g^{-1} di permafrost umido. Tali valori sono risultati poco riproducibili nelle repliche e quindi poco affidabili probabilmente a causa delle particelle detritiche non ancora del tutto eliminate. Inoltre tali conteggi risultavano piuttosto bassi rispetto a quelli effettuati in Italia con analisi

d'immagine (stessi campioni e stessa estrazione in PBS) che comunque davano valori non chiaramente leggibili.

Per quanto riguarda i virus, il conteggio delle VLP non risultava attendibile, probabilmente a causa della elevata sensibilità di questa componente a qualunque perturbazione.

I ricercatori del LH-UFRJ hanno consigliato un differente trattamento, che viene da loro utilizzato di routine sui campioni di sedimenti marini o lacustri. Nello specifico, 0.5 g di campione tal quale di permafrost erano trattati asepticamente con l'aggiunta di 5 µl di Tween 80 (10%) e quindi di tetrasodio pirofosfato (10 mM), seguito da sonicazione (3 volte per 1 min) ed, infine, centrifugazione a 800 rpm per 1 min (Danovaro et al, 2001; Duhamel and Jacquet, 2006). Di seguito il surnatante è stato diluito 10x e quindi colorato e trattato come sopra riferito.

Con questo secondo metodo di estrazione, i conteggi delle cellule procariotiche sono risultati mediamente compresi tra $1,69E+06$ e $5,39E+06$ cellule g^{-1} di permafrost umido. I dati ottenuti sono risultati maggiori dei conteggi ottenuti in Italia con analisi d'immagine sui campioni trattati con questo secondo metodo di estrazione (range $2,60E+05$ - $1,77E+06$ cellule g^{-1} di permafrost umido). Tali differenze tra i due tipi di conteggio erano attese e sono frequentemente osservate anche in campioni di diverse matrici. Esse sono ritenute inerenti alle limitazioni tecniche di entrambi i metodi di conteggio, quali le difficoltà di discriminazione delle cellule mediante osservazione diretta al microscopio (cioè quando particelle detritali interferiscono con il conteggio stesso) oppure al "rumore" delle particelle che hanno un livello di fluorescenza superiore alla soglia strumentale del citometro a flusso (Gasol e del Giorgio 2000). Tale discrepanza non si è rivelata però un dato sfavorevole al confronto, ma anzi ha consentito di mettere in luce aspetti intrinseci dei campioni esaminati. In tal senso, l'analisi delle sottopopolazioni con diverso contenuto apparente di DNA (LNA, low nucleic acid e HNA, high nucleic acid) ha evidenziato la presenza di un numero di sottopopolazioni variabili in funzione dei diversi campioni di permafrost. Le sottopopolazioni variavano da 1 (in DY), 2 (EP, BC Lago, BC lago ice e BC 265-275) a 4 (BC1) (Fig. 1 e 2) e questo importante risultato ha corroborato i risultati dell'analisi morfologica delle cellule all'analisi d'immagine, evidenziando un numero differente e comparabile di cluster nei differenti campioni. Sono stati quindi raggiunti il secondo e terzo obiettivo della STM, in quanto è stato possibile valutare la diversità fenotipica sia a livello cellulare che di popolamenti.

Purtroppo, anche con questo metodo di estrazione i conteggi delle VLP non sono risultati attendibili.

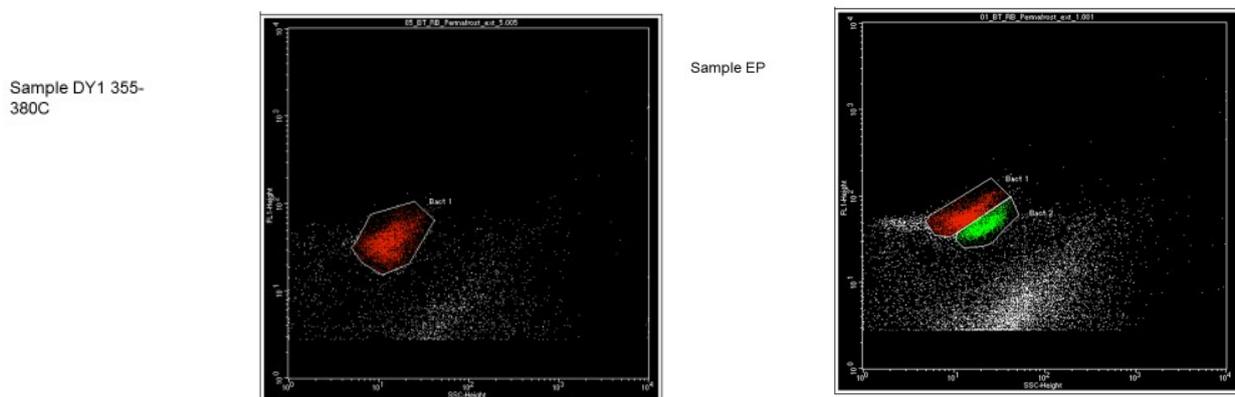
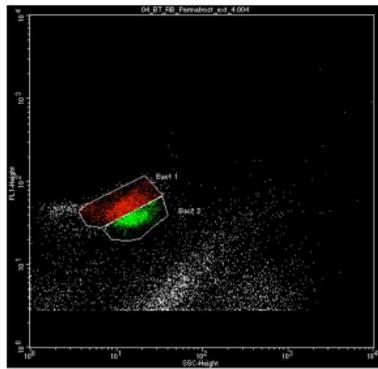
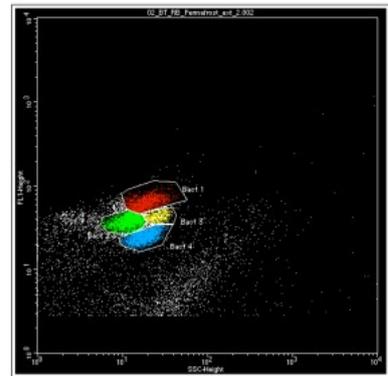


Figura 1: Citogrammi della comunità procariotica nei campioni di permafrost DY1 355-380C ed EP. Le differenti sotto-popolazioni sono discriminate dopo colorazione con SYBR Green I e segnali side-scatter.

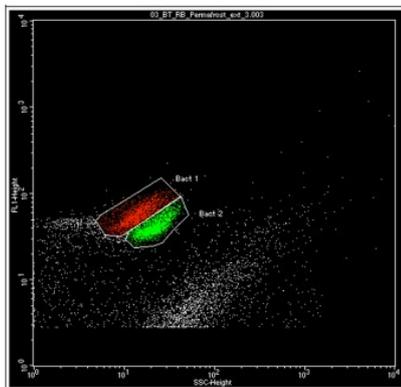
Sample BC FM
535-543



Sample BC LAGO
sedimento



Sample BC
LAGO ICE



Sample BC5 265-
275

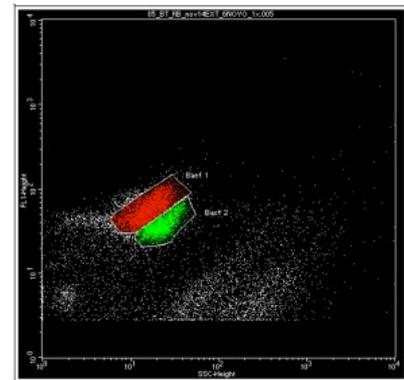


Figura 2: Citogrammi della comunità procariotica nei campioni di permafrost EP, BC FM 535-543, BC Lago, BC lago ice e BC 265-275.

Analisi dei campioni di brine

Differentemente dai campioni di permafrost e nonostante l'elevata salinità, i campioni di matrice acquosa (brine) sono stati direttamente sottoposti a colorazione con Sybr Green I e analizzati al citometro. I conteggi delle cellule procariotiche variavano tra $1.08.E+05$ e $6.11.E+06$ cellule ml^{-1} (valore medio $1.82E+06$ cellule ml^{-1}). Validi conteggi di virus sono stati anche ottenuti dai campioni di brine. Infatti i VPL variavano tra $1.07E+06$ e $1.17E+08$ VPL ml^{-1} (valore medio $3.36E+07$ VLP ml^{-1}) e mediamente le diverse frazioni V1, V2 e V3 costituivano rispettivamente il 78, 21 e 1 % del totale.

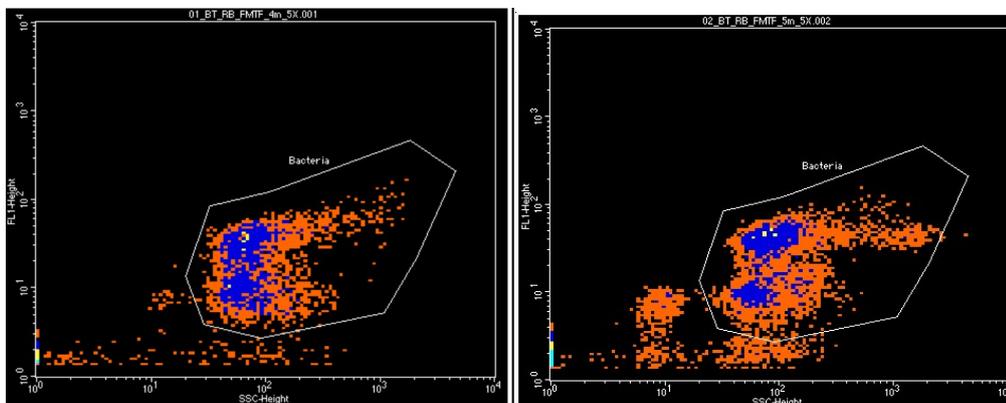


Figura 3: Citogrammi della comunità procariotica nei campioni di brine BT_FMTF4m e BT_FMTF5m

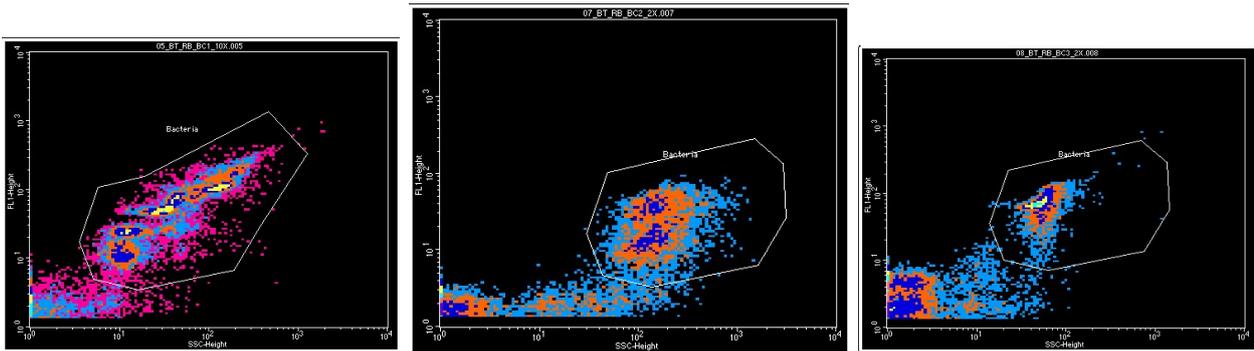


Figura 4: Citogrammi della comunità procariotica nei campioni di brine BT_BC1, BT_BC2 e BT_BC3.

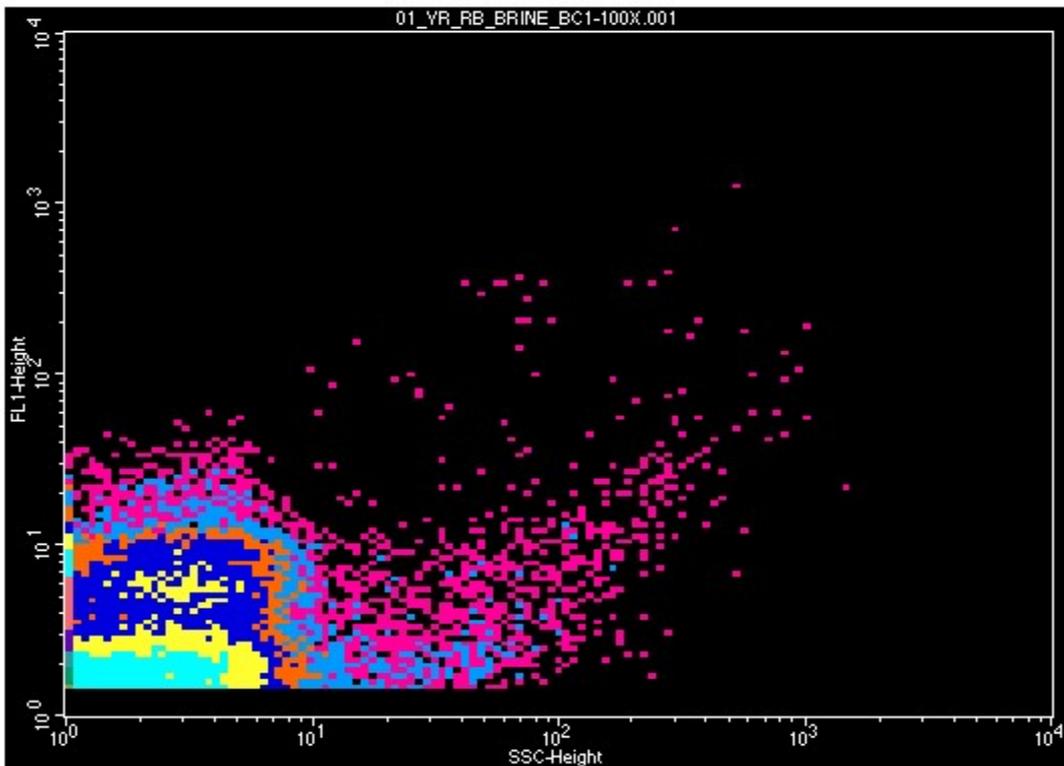


Figura 5: Citogramma della comunità virale (VLP) determinata nel campione di brina BC1.

Infine, il quarto ed ultimo obiettivo della proposta - la stesura di una pubblicazione su rivista indicizzata - è stato perseguito, poiché è stato sottomesso alla rivista FEMS un manoscritto dal titolo: "Prokaryotes in permafrost of the Northern Victoria Land and Upper Victoria Valley (Antarctica): abundances and metabolism" di La Ferla R, Azzaro M, Michaud L, Caruso G, Lo Giudice A, Paranhos R, Cabral As, Conte A, Cosenza A, Maimone G, Papale M, Rappazzo Ac, Guglielmin M.

E' stato infatti deciso di concentrare in una prima fase gli sforzi sulla stesura di un lavoro sui risultati ottenuti dai campioni di permafrost unendo anche l'analisi dei saggi di vitalità cellulare (LIVE/DEAD e CTC) e dei profili fisiologici a livello di comunità (BIOLOG). A seguire si provvederà alla stesura di un lavoro specifico sulle brine.

Conclusioni

Gli obiettivi prefissati sono stati tutti raggiunti. I protocolli analitici adottati hanno consentito di effettuare un primo screening dell'assemblaggio procariotico presente nei campioni analizzati. Comparando le diverse metodologie adoperate è stata riscontrata una certa variabilità in

funzione sia del metodo estrattivo che della natura del campione analizzato. L'estrazione con Tween80 e tetrasodio pirofosfato è risultata la più idonea per i campioni di matrice terrosa. I conteggi cellulari con analisi d'immagine e citometro a flusso hanno fornito – come prevedibile – stime quantitative differenti (10^5 - 10^6 e 10^6 cellule ml^{-1} , rispettivamente) ma andamenti comparabili. Di per se, un interessante riscontro è stato il variabile numero di sottopopolazioni con diverso contenuto apparente di DNA osservato nei differenti campioni. Per quanto concerne la differenziazione fenotipica dei diversi campioni, la distinzione tra sottopopolazioni con diverso contenuto apparente di DNA ha corroborato i risultati ottenuti a livello di morfologia cellulare al microscopio, fornendo un risultato più certo e quantitativamente più valido. Tali riscontri sono verosimilmente attribuibili alle caratteristiche intrinseche dei campioni studiati, e cioè la disomogeneità e/o l'omogeneità causati dalla presenza, o meno, di acqua e dall'isolamento termico dovuto all'età. In definitiva, l'insieme dei risultati ha fornito un quadro abbastanza esaustivo sulla presenza e funzionalità dei popolamenti procariotici in campioni prelevati in siti antartici caratterizzati da differente età, struttura geochimica e litologica.