



*Consiglio Nazionale delle Ricerche*

**Istituto per lo Studio degli Ecosistemi**

*Al* *Consiglio Nazionale delle Ricerche*  
*Direzione Generale*  
*Ufficio Rel. Internazionali*  
*P.le Aldo Moro, 7*  
*00185 ROMA*

**PROGRAMMA DI RICERCA STM**  
**RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE**

Proponente: Dr Gianluca Corno

Il Fruitore: Dr Karel Hornak

Istituto di afferenza : CNR - Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Largo Tonolli 50, 28922 Verbania

**Titolo del programma:**

**Investigazioni sulle possibili relazioni tra i gruppi fitoplanctonici dominanti ed i principali gruppi filogenetici di batterici planctonici a livello di specie e a livelli superiori**

Il progetto di ricerca pianificato è stato svolto interamente, utilizzando le strutture del CNR-ISE di Verbania ed 6 ceppi batterici isolati in ambiente, identificati ed il cui genoma è disponibile presso la banca dati di GenBank. Quattro di questi ceppi facevano già parte della collezione curata da G. Corno presso il CNR-ISE, mentre due (*Limnohabitans parvus* e *Limnohabitans planktonicus*, ceppi di particolare valore scientifico) sono state scelte dalla collezione dell'Accademia delle Scienze Ceca, e sono state acquisite nella collezione del CNR-ISE in seguito a questa STM.

Gli esperimenti, eseguiti in batch cultures della durata di 6 giorni (+3 di acclimatazione dei ceppi), hanno utilizzato un substrato artificiale prodotto in modo che mimasse quelli prodotti dalle specie algali in questione al fine di ridurre la variabilità tra repliche che avevamo potuto notare durante gli esperimenti preliminari effettuati in Rep. Ceca. Sono stati utilizzati due substrati arricchiti quindi con varietà variabili di carbonio organico, in un caso mimando una situazione di normale

concentrazione paragonabile a quella naturale di un grande lago subalpino, in un caso mimando invece una quantità di carbonio 5 volte maggiore, paragonabile a quella immediatamente successiva ad una forte fioritura di microalghe. Il carbonio organico utilizzato è stato selezionato come un mix di estratti di lievito, peptone e glucosio al fine di provvedere molecole più o meno grandi e di coprire in questo modo al meglio la naturale distribuzione del carbonio organico in acqua.

4 ceppi batterici, afferenti a diversi gruppi batterici, e differenziati anche dal punto di vista ecologico e del successo in ambienti naturali, sono stati adattati alle condizioni di laboratorio e cresciuti sia in colture pure, sia in comunità artificiali composte inizialmente da un uguale numero di cellule per ogni ceppo, sempre comunque con concentrazioni finali di  $5 \times 10^5$  cellule per millilitro.

Abbiamo selezionato *Aeromonas hydrophila*, un gammaproteobatterio comune e spesso molto abbondante in acque dolci, dalla forma di un bacillo di mediopiccole dimensioni e senza abilità particolari nel produrre difese contro la predazione; *Brevundimonas* sp., un alfa-proteobatterio di forma coccoide, comune ma raramente dominante in acqua, anch'esso incapace di evidente plasticità morfotipica, ma conosciuto per la propria ben definita abilità di comunicazione e di cooperazione con altri ceppi batterici; *Arthrobacter agilis*, un actinobatterio raro in acqua, patogeno facoltativo di vegetali, ed in grado di sviluppare grandi aggregati di cellule; e un ceppo rappresentante del gruppo dei *Flavobacteria* (sp. Flav 2), anch'esso poco abbondante in acqua ma conosciuto per la sua abilità nell'utilizzo di peptidoglicani e quindi, ragionevolmente favorito da una situazione di crescita post bloom algale.

Le comunità costituite da questi 4 ceppi sono state fatte crescere per tre giorni, sia in medio povero che ricco di carbonio, dopodiché si è provveduto a sdoppiarle e ad invaderne una metà con *Limnohabitans* spp. in quantità pari al 5% del popolamento misurato in ogni singola replica. In totale sono state prodotte 15 repliche per le singole colture e 12 repliche per le comunità.

Le analisi effettuate con cadenza giornaliera durante i 9 giorni di esperimento hanno permesso di conoscere in tempo reale il numero di batteri presenti, la loro differenziazione morfologica ed il loro grado di adattamento all'ambiente attraverso analisi al microscopio ad epifluorescenza di filtri

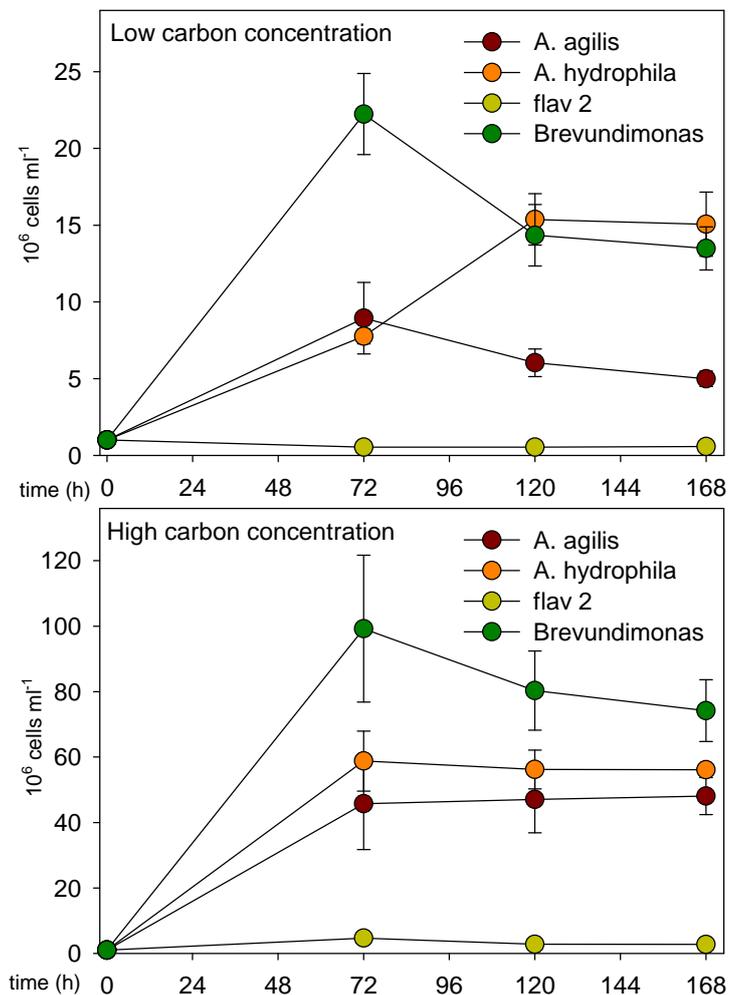


Figura 1: Abbondanze dei ceppi batterici in colture pure a differente concentrazione di carbonio.

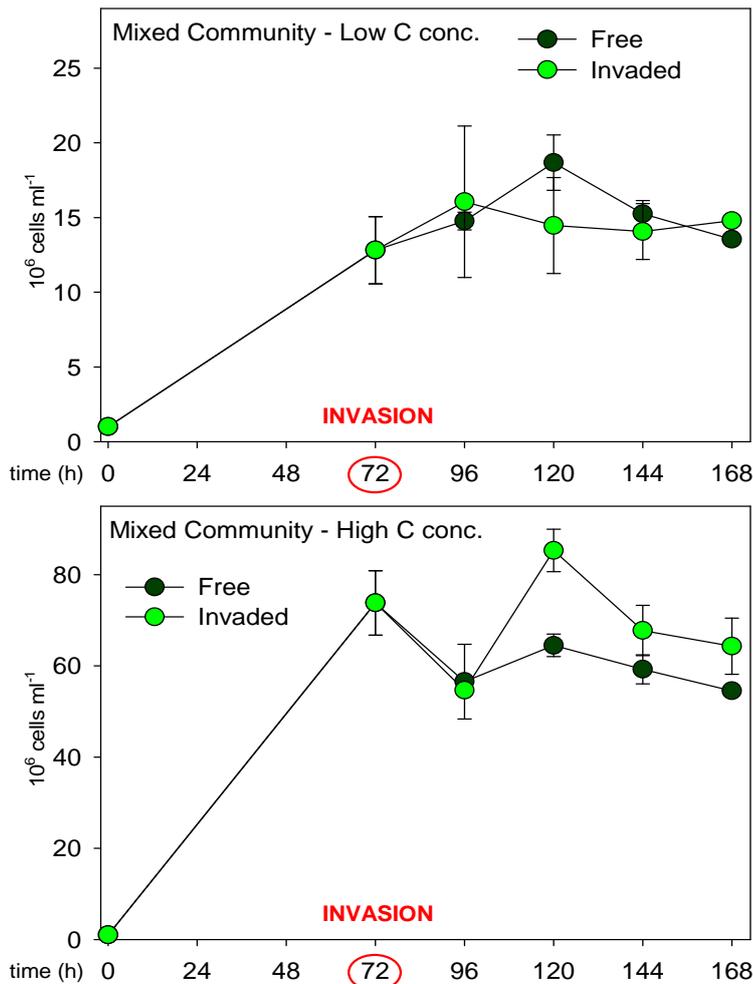


Figura 2: Abbondanze delle comunità artificiali a differente concentrazione di carbonio, senza impatti esterni e invase da *Limnohabitans* spp.

marcati in DAPI. Al tempo stesso si è provveduto a quantificare con esattezza la quantità di DOC disponibile nei campioni ( $5.2 \times 10^9$  fg C ml<sup>-1</sup> al tempo zero per il sistema limitante,  $19.8 \times 10^9$  fg C ml<sup>-1</sup> per il sistema post-bloom).

Il numero di batteri per millilitro, nel periodo di crescita stazionaria, è risultato logicamente molto diverso da trattamento a trattamento. *A. agilis* si è attestato sui 5 e 48 milioni di cellule nelle condizioni più e meno limitanti, *A. hydrophila* a 15 e 56 milioni, *Brevundimonas* sp. a 13 e 74 milioni, Flav 2 a 0.5 e 3 milioni, dimostrando di essere il ceppo che meno si è adattato ai substrati artificiali forniti (Figura 1). La comunità delle 4 specie (Figura 2) si è attestata a 13 e 54 milioni di cellule per millilitro. Il dato quantitativo dimostra che all'interno della comunità c'è effettivamente stata una competizione per il substrato disponibile, che è

evidente soprattutto quando la concentrazione di carbonio è più elevata, e quindi la produzione maggiore. Le possibili interazioni emergenti tra le specie non sono state sufficienti a controbilanciare la competizione che, di fatto, non ha permesso alla comunità un'efficienza pari a quella del singolo ceppo più efficiente (*Brevundimonas* sp.).

Diverso è il caso dei trattamenti con bassa concentrazione di carbonio organico dove la comunità arriva a pareggiare la crescita del ceppo più performante.

In entrambi i casi saranno molto interessanti i dati di distribuzione, che stiamo producendo in queste settimane, sia presso i laboratori dell'ISE che presso l'istituto di provenienza del Dr. Karel Hornak, utilizzando la tecnica del CARD-FISH (Catalyzed reporter deposition Fluorescence In Situ Hybridization, protocollo descritto da Pernthaler et al., *Appl Env Microbiol* 2002) che permette di marcare con sonde specifiche i diversi ceppi da noi utilizzati, e quindi di avere una visione più definita della comunità, aggiungendo la proporzione degli stessi sul totale.

L'invasore selezionato (*Limnohabitans* spp.) ha dimostrato buona adattabilità al substrato (Figura 3) attestandosi a valore intorno ai 12 milioni di cellule per millilitro in condizioni di bassa concentrazione di carbonio e di 37 milioni in condizioni di abbondanza di C. In termini di abbondanza relativa ha dimostrato di non avere un significativo impatto sulla comunità a bassa

concentrazione di C, mentre ha promosso un aumento di biomassa tra il 10 ed il 20% nelle comunità ad alta produttività. Ancora una volta sarà l'analisi CARD-FISH a chiarificare, nel dettaglio, la resistenza della comunità all'invasione e le eventuali modificazioni nella distribuzione delle singole specie dovute alla presenza dell'invasore.

Già questi preliminari risultati ci permettono comunque di validare l'approccio sperimentale utilizzato sia in termini di risultati ottenuti che di validità metodologica. Il substrato utilizzato, seppur artificiale, ha determinato una risposta differente delle comunità microbiche, permettendo una migliore crescita delle cosiddette specie rare, quando cresciute in condizioni di elevata concentrazione di carbonio, a concentrazioni di fosforo, azoto e microelementi costanti. Lo studio dell'eventuale successo di queste

specie, all'interno delle comunità, potrebbe offrire una visione nuova ed illuminante del paradigma della *rare biodiversity* (Pedros-Alio, Science 2007), di tutte quelle specie che pur non risultando quasi mai abbondanti in acqua, si mantengono in essa a bassissime concentrazioni e di fatto non solo contribuiscono largamente alla biodiversità genomica di ogni ecosistema, ma potrebbero anche essere decisive per alcune interazioni fisiologiche ed ecologiche, magari in determinati momenti del ciclo ecologico (per esempio dopo un bloom algale). Il completamento dei dati, in corso in queste settimane presso i due istituti, risulterà, entro l'anno nella *submission* di una pubblicazione congiunta su una rivista di settore ad elevato impact factor, e rappresenta l'inizio di una collaborazione che abbiamo intenzione di proseguire, attraverso scambi di ricercatori e studenti, ed attraverso la ricerca di finanziamenti per progetti comuni, nei prossimi anni.

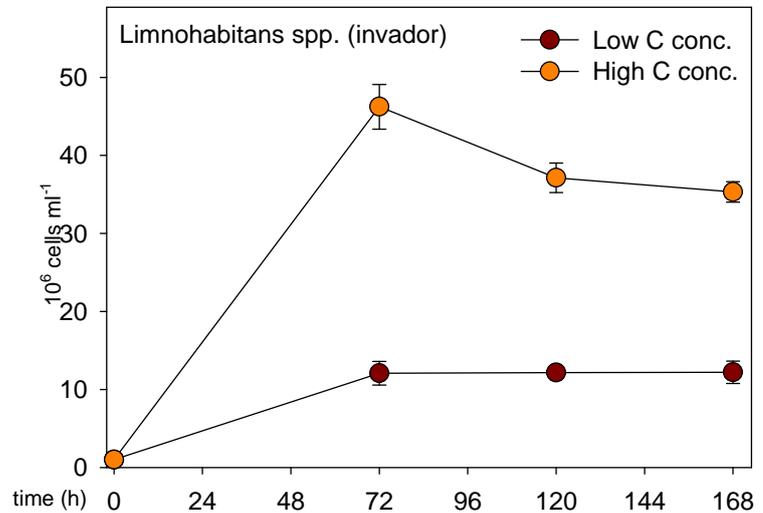


Figura 3: Abbondanze a differente concentrazione di carbonio, di *Limnohabitans spp.* in colture pure.

**Attività svolte durante il periodo di lavoro presso l'ISE.**

**11-14 Aprile:**

- Messa a punto dello schema sperimentale, preparazione dei substrati, quantificazione sperimentale del C in forma disciolta ed adattamento delle colture al substrato selezionato.

**14-20 Aprile:**

- Allestimento ed analisi dell'esperimento in laboratorio
- Conta delle cellule totali nei vari trattamenti (microscopia ad epifluorescenza)
- Preparazione dei campioni per l'analisi dei gruppi filogenetici (tecniche di ibridazione *in situ*, CARD-FISH)

**20-22 Aprile:**

- Preparazione dei campioni per l'analisi dei gruppi filogenetici (tecniche di ibridazione *in situ*, CARD-FISH)
- Analisi dei dati di abbondanza, preparazione di modelli per la stima della biomassa
- Programmazione del restante lavoro presso i due istituti di ricerca

Il Proponente:

Gianluca Corno